

油菜内源 PE3-PEPcase 基因探针法 qPCR 试剂盒

Rape Endogenous PE3-PEPcase Gene Probe qPCR Kit

目录号: ml107862

使 用 说 明 书

产品及特点

内参基因是转基因检测标识制度中所必需的检测参照基因。在用 PCR 对待检测样品基因组 DNA 的转入基因进行检测时，还需要对内参基因同时进行扩增，以排除假阴性结果，保证检测结果的可靠。同时内参基因的拷贝数是固定不变的，因此通过靶基因和内参基因的 PCR 结果比较，可以对靶基因进行相对定量。因此 GMO 内参基因的检测具有重要的意义。本产品是专用于检测油菜（Rape, Brassica napus, Bna）内源 PE3-PEPcase（Phosphoenolpyruvate carboxylase 2, 烯醇式丙酮酸羧化酶 2）基因的探针法 qPCR 试剂盒，具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供 DNA 样品。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/ μ L。
3. 特异性高，根据油菜内源 PE3-PEPcase 基因保守区域设计引物和探针，能专一性地检测出样品中的油菜内源 PE3-PEPcase 基因，不会跟其他基因发生交叉反应，因此不能检测其他非油菜内源

	PE3-PEPcase 基因成分。 4. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 5. 所用探针为 Cy5 标记，可以跟其他荧光标记的 GMO PCR 检测组合成多重检测。 6. 快速，整个检测过程（按一个样品计）所需时间仅 2 小时。 7. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 8. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR。 9. 本产品只可用于科研。			
规格及成分		成分	规格	包装
		2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
		荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
		油菜内源 PE3-PEPcase 基因探针法 qPCR 引物-探针混合干粉	50 次	0.5mL 棕色管
		油菜内源 PE3-PEPcase 基因 PCR 阳性对照（1E7 拷贝/μL）	50μL	0.5mL 黄盖管
		超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
		使用手册	1 份	无
		本产品采用五孔盒包装		
		注 意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 1E3 拷贝/μL 为例。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。			

1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5 μL 阳性对照（浓度为 1×10^7 拷贝/ μL ，本试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的样本起始体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。如果有 N 个样品，则需要进行 N+2 个样品提取，多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 μL 体系，在样品制备室进行)

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（用第一步稀释得到的标准曲线系列稀释液的第 3 号做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管(1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	10μL	10μL	各 10μL
油菜内源 PE3-PEPcase 基因探针法 qPCR 引物-探针混合液	3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测样品 DNA 模板	7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）	不加	不加	各 7μL

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	3min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	10sec
	58℃	5sec
	60℃	5sec
	72℃	1 min（采集 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。

13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。

	14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Cy5 通道的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Cy5 通道的 Ct 必须没有读数，或者大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Cy5 通道的 Ct 值应该小于 40。对待测样品，如果其 Cy5 通道的 Ct 没有读数、大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。