

人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D8025S	人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒	50次
D8025M	人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒	200次

产品简介:

- 碧云天研发生产的人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒, 即Human Telomere Length SYBR Green qPCR Kit, 也称人端粒长度染料法qPCR试剂盒、端粒相对长度检测试剂盒、Human Telomere Length qPCR Kit with SYBR Green, 是一种通过染料法qPCR (Quantitative PCR)扩增端粒与内参基因DNA, 并快速、高效、灵敏地定量不同人类样品的端粒相对长度的试剂盒。本产品为防污染型, 含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性或CT值偏低。
- 端粒(Telomere, Tel)是真核生物染色体末端的由短串联DNA重复序列(TTAGGG)及其相关蛋白组成的保护性复合物。随着细胞分裂的进行, 端粒的长度也会随之缩短。端粒极短的细胞就会进入衰老状态, 这是一种不可逆的细胞生长停滞状态。因此, 端粒的长度可作为判断细胞是否进入衰老状态的重要标志[1]。端粒可以作为受环境暴露和生活经历累积影响的生物标志物, 也是重大疾病的风险因素[2]。越来越多的证据表明, 端粒缩短对健康状况有负面影响, 并与包括衰老和癌症在内的许多健康问题有关。因此, 端粒长度的量化在细胞生物学的许多方面具有重要意义, 包括染色体不稳定性、DNA修复、衰老、细胞凋亡、细胞功能障碍和致癌等[3]。
- 本试剂盒提供了qPCR实验所需的预混液BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)和特异性引物, 预混液包含了BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、SYBR Green I荧光染料、稳定剂和镁离子等所有的通用组分。本试剂盒设计了两对引物, 一对是基于端粒重复序列设计的端粒引物(Telomere Primer Mix); 一对是基于12号染色体上编码酸性核糖体磷酸蛋白(Acidic ribosomal phosphoprotein, PO)的单拷贝基因(Single copy reference, SCR)而设计的内参引物(Control Primer Mix), 用于数据的均一化定量。
- 本试剂盒检测灵敏, 扩增效率高, 所用引物组检测1.25-20ng/μl范围内的基因组DNA样品时, 扩增效率可达95%。不同浓度梯度的HeLa细胞基因组DNA分别使用Telomere Primer Mix和Control Primer Mix扩增, 并绘制标准曲线。结果显示两个标曲均呈现良好的线性关系, 表明本试剂盒具有稳定的扩增效果, 端粒相对长度定量准确度高。使用Telomere Primer Mix的扩增曲线及标准曲线可参考图1, 使用Control Primer Mix的扩增曲线及标准曲线可参考图2。

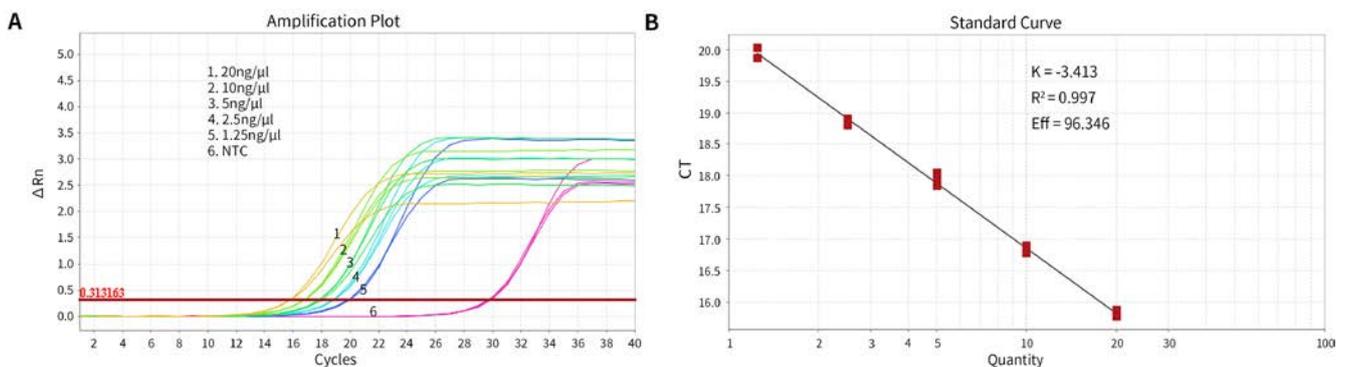


图1. 碧云天人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒(D8025)中Telomere Primer Mix对于不同浓度梯度的HeLa细胞基因组DNA的扩增曲线及标准曲线。NTC, No Template Control。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。
 注: 由于端粒序列的串联重复特性, 端粒引物组可能在NTC中形成微量的引物二聚体。NTC组Ct值为28或更大就表示反应中有引物二聚体的形成, 可以作为阴性结果处理。

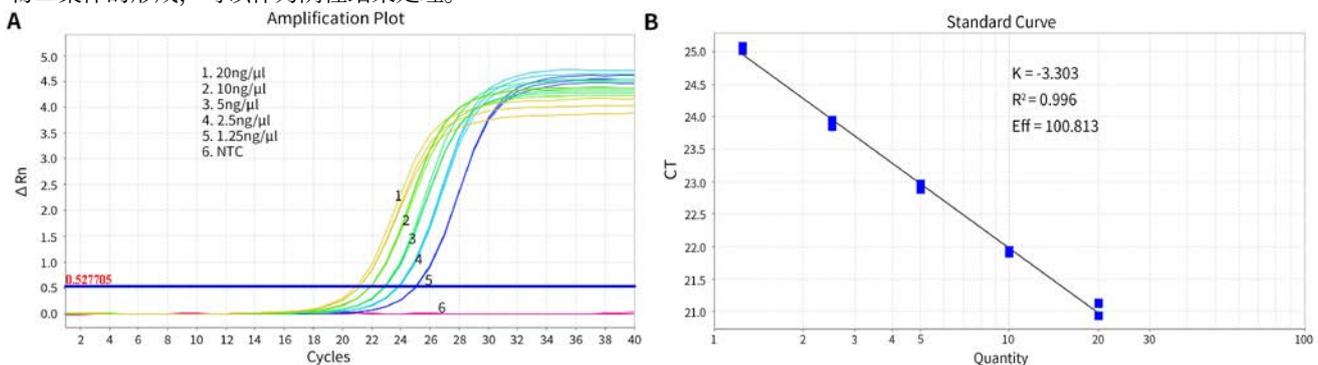


图2. 碧云天人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒(D8025)中Control Primer Mix对于不同浓度梯度的HeLa细胞基因组DNA的扩增曲线及标准曲线。NTC, No Template Control。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供了Low ROX和High ROX，广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动，从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起，如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同，请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择添加高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX。常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500 (Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT (Fast); ABI StepOne (Plus)

- 本试剂盒如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20 μ l)或384孔板qPCR检测(建议反应体系为10 μ l)，本产品小包装分别可以进行50次和100次检测，中包装分别可进行200次和400次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8025S-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	500 μ l
D8025S-2	Telomere Primer Mix (20X)	50 μ l
D8025S-3	Control Primer Mix (20X)	50 μ l
D8025S-4	Ultrapure Water	400 μ l
D8025S-5	Low ROX (50X)	20 μ l
D8025S-6	High ROX (50X)	20 μ l
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D8025M-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	2ml
D8025M-2	Telomere Primer Mix (20X)	200 μ l
D8025M-3	Control Primer Mix (20X)	200 μ l
D8025M-4	Ultrapure Water	1.5ml
D8025M-5	Low ROX (50X)	80 μ l
D8025M-6	High ROX (50X)	80 μ l
-	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。其中BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)须避光保存，并尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 使用前请务必确保试剂完全融化，充分混匀后使用。混匀过程尽量避免产生气泡。
- BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)中含有荧光染料，保存本产品或设置PCR反应体系时应避免强光照射，以尽量避免荧光淬灭问题。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测，请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。虽然本产品为防污染型，但仍建议勿在PCR反应设置区域撕开PCR封板膜或打开PCR管盖，PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理，以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系，这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™ 无菌滤芯盒装吸头 (FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂:

- 荧光定量PCR仪。
- DNase-free、RNase-free的吸头、离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜。

2. 样品准备:

选择合适的基因组DNA抽提试剂盒,用于提取细胞或组织的基因组DNA。推荐使用基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型,离心柱式)(D0063)或BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型,磁珠法)(D0088),或推荐使用BeyoMag™磁珠法血液基因组DNA抽提试剂盒用于血液样品基因组DNA的提取。**注:**经提取后的样品须稀释至1.25-20ng/μl范围内任一浓度,并至少足够用于两个样品的检测。浓度过高或过低都可能影响检测效果。

3. qPCR反应体系的设置:

- 融解并混匀反应所需的各种溶液,置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置qPCR反应体系(以96孔板,每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、标准品和无模板阴性对照(No Template Control, NTC)。对于每个待测样品,都需要准备2个反应体系,分别用于端粒引物(Telomere Primer Mix)和内参引物(Control Primer Mix)的扩增。可使用Ultrapure Water作为阴性对照(NTC)。建议每次检测都设置NTC。

Reagent	Volume
BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	10μl
Telomere Primer Mix (20X) or Control Primer Mix (20X)*	1μl
Template	2μl
Without or Low/High ROX (50X)	0 or 0.4μl
Ultrapure Water	To 20μl

*注:对于端粒引物(Telomere Primer Mix)反应体系,仅加入Telomere Primer Mix (20X);对于内参引物(Control Primer Mix)反应体系,仅加入Control Primer Mix (20X)。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀,室温离心数秒,使液体体积聚于管底。推荐BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm)或BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式,2500rpm)进行PCR管或板的短暂离心。
- 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上,开始PCR反应。

4. qPCR反应程序:

本试剂盒建议采用如下的qPCR程序,本程序是以QuantStudio™ 6 Flex Systems荧光定量PCR仪为例:

- UDG酶处理:50°C 5分钟;
- 预变性:95°C 10分钟;
- 变性:95°C 15秒;
- 退火:60°C 30秒;
- 延伸:72°C 30秒;
- 重复步骤c-e,总共40个循环;
- 熔解曲线分析(可选):95°C 15秒,60°C 15秒,95°C 15秒;
- 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果。

5. 反应结果的定量判断:

- 无模板阴性对照(NTC):端粒引物检测结果应为CT值≥28,内参引物检测结果应为Undetermined或CT值≥38。

- 根据端粒引物组(Tel)和内参引物对照组(PO)的扩增CT值计算样品的端粒相对长度:

(a) 样品1的 ΔCT (Sample 1) = CT (Tel, Sample 1) - CT (PO, Sample 1)

(b) 样品2的 ΔCT (Sample 2) = CT (Tel, Sample 2) - CT (PO, Sample 2)

(c) 样品间 $\Delta\Delta CT$ = ΔCT (Sample 2) - ΔCT (Sample 1)

(d) 样品2相对于样品1的端粒相对长度 = $2^{-\Delta\Delta CT}$

- 计算示例:

使用碧云天端粒长度染料法qPCR检测试剂盒(D8025)检测2个HeLa细胞基因组DNA样品的端粒相对长度,对应的扩增CT值及根据步骤b计算所得的 ΔCT 及样品2相对于样品1的端粒相对长度($2^{-\Delta\Delta CT}$)见下表。

结论:样品2的平均端粒长度是样品1的1.04倍。

Sample	Tel	PO	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1	16.55	20.80	-4.25	-	-
2	18.42	22.73	-4.31	-0.06	1.04

参考文献:

- Jue L, Elissa E, Joshua C, Candyce K, Elizabeth S, et al. J Immunol Methods. 2010. 352(1-2): 71-80.
- Lin J, Smith DL, Esteves K, Drury S. Psychoneuroendocrinology. 2019. 99: 271-278.
- Monaghan P, Haussmann MF. Trends Ecol Evol. 2006. 21(1):47-53.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0063	基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 离心柱式)	50次
D0088S	BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 磁珠法)	50次
D8018	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA染料法)	50次/200次
D8021	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)	50次/200次
D8025	人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒	50次/200次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20片/100片
FSF039	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/100片
FTIP631	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(0.5-10μl, 无色加长, 4.5cm)	10盒/50盒
FTIP635	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(1-200μl, 黄色加长, 5.6cm)	10盒/50盒
FTIP638	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长, 10.2cm)	10盒/50盒
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB335	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
ST873-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR级, Sterile)	100ml
E6686	BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm)	1套
E6758	BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)	1套

Version 2024.09.10