

小鼠端粒相对长度检测试剂盒（染料法qPCR法）

Mouse Relative Telomere Length Detection Kit (SYBR qPCR)

CAT#:BN66006

低温运输，-20℃保存

产品及特点

端粒 (Telomere) 是由多个重复核苷酸元件 (TTAGGG) 所串联组成的一段真核细胞染色体末端的DNA序列，除了提供非转录DNA的缓冲物外，还能保护染色体末端免于融合和退化，保护染色体结构稳定和遗传完整。端粒是一个人老化速度的最重要和准确的指标，它的初始长度由遗传和环境因素决定，并且会随着时间的推移而减少。有研究表明，端粒长度与DNA修复、衰老、细胞凋亡及肿瘤发生等有密切的联系，因此，对于研究人员来说，准确而可重复地测量端粒长度尤为重要。本产品主要采用相对定量qPCR来直接比较样本的平均端粒长度，即采用端粒重复序列 (Tel) 的拷贝数与基因组单拷贝基因 (SCR) 的拷贝数比值 (T/S) 作为端粒相对长度。单拷贝基因引物 (SCR) 特异性识别并扩增小鼠10号染色体上100 bp长的区域。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供外周血DNA模板。
2. 操作只需要半天，比Southern杂交检测法快3-5天时间。
3. 无非特异性扩增。每组引物均已经过扩增曲线效率验证 ($E > 98\%$, $R^2 > 0.99$)，熔解曲线分析以及凝胶电泳验证。
4. 使用PCR扩增，几乎每个分子生物学实验都有相关设备，非常方便。
5. 高效可靠的定量，优化了PCR配方，适合低浓度模板的扩增，使定量PCR可以在宽广的定量区域内获得良好的标准曲线。
6. 本产品足够100次/50样的染料法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分	成分	编号	规格	包装																		
	2×染料法qPCR MasterMix	60001	1 mL	1.5 mL管																		
	50× Rox染料	60002	250 μL	1.0 mL管																		
	无核酸酶双蒸水	60003	1 mL	1.5 mL管																		
	10 μM端粒基因引物	66006-4	50 μL	0.5 mL管																		
	10 μM单拷贝基因引物	66006-5	50 μL	0.5 mL管																		
	使用手册		1份	无																		
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。																					
自备试剂	基因组DNA																					
使用方法	一、反应体系																					
	建立如下所述的反应体系。若要进行多个反应，可制备通用组分的预混液，在每管或每孔中加入合适的体积，然后加入特殊的反应组分（例如：模版）																					
	<table><tr><th>成分</th><th>使用量</th><th>终浓度</th></tr><tr><td>2×染料法qPCR MasterMix</td><td>10 μL</td><td>1×</td></tr><tr><td>10 μM端粒基因引物 或10 μM单拷贝基因引物</td><td>0.4 μL</td><td>0.2 μM</td></tr><tr><td>基因组DNA</td><td>0.5~5 ng</td><td></td></tr><tr><td>*50× ROX染料（可选）</td><td>0.4 μL</td><td>1×</td></tr><tr><td>无核酸酶双蒸水</td><td>补足剩余至 20 μL</td><td>——</td></tr></table>				成分	使用量	终浓度	2×染料法qPCR MasterMix	10 μL	1×	10 μM端粒基因引物 或10 μM单拷贝基因引物	0.4 μL	0.2 μM	基因组DNA	0.5~5 ng		*50× ROX染料（可选）	0.4 μL	1×	无核酸酶双蒸水	补足剩余至 20 μL	——
	成分	使用量	终浓度																			
	2×染料法qPCR MasterMix	10 μL	1×																			
	10 μM端粒基因引物 或10 μM单拷贝基因引物	0.4 μL	0.2 μM																			
	基因组DNA	0.5~5 ng																				
	*50× ROX染料（可选）	0.4 μL	1×																			
	无核酸酶双蒸水	补足剩余至 20 μL	——																			
	1. 推荐使用20 μL体系以保证目的基因扩增的有效性和重复性。																					
2. 盖上或密封反应管/PCR板，轻轻混匀。可以稍微离心，确保所有组分都在管底。																						
3. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中，收集数据并分析结果。按下表所示设置您的PCR仪。最适温度和孵育时间可视具体情形而定。																						
*ROX染料																						
可根据选择的仪器在反应体系中加入ROX染料，将反应体系中的荧光信号标准化。下表所列使用不同仪器操作时所需的ROX量（每50 μL反应体系）：																						

仪器	每50 μL体系反应所需的ROX量
ABI7300、7900HT、StepOne等	5 μL
ABI7500、7500Fast、ViiA7、Stratagene Mx3000™、Mx3005P™以及Mx4000等	1 μL
Roche 仪器、Bio-Rad仪器, Eppendorf 仪器等	无需添加

4. 三步法扩增程序:

过程	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR反应 (35-40个循环)	95℃	5 sec
	58℃	30 sec
	72℃	30 sec
溶解曲线分析		按qPCR仪器手册执行

注: 决定最佳退火温度的主要因素为引物长度及引物碱基组成。根据试剂盒端粒及SCR引物组的特性, 我们建议退火温度设置为58℃。

二、结果分析

- 定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。
- 荧光定量PCR检测之后得到基因组单拷贝基因 (SCR) 和用端粒重复序列 (Tel) 的Ct值, 使用 ΔC_t 法计算Tel与SCR的相对拷贝数T/S比率 (T/S ration) : $T/S \text{ ration} = [2^{C_t(Tel)/2^{C_t(SCR)}}] - 1 = 2^{-\Delta C_t}$ 。由于T/S比率同端粒长度成正比关系, 因此可以通过T/S比率来反应端粒的相对长度。