

Human Genomic DNA Quantification Kit 人类基因组 DNA 定量试剂盒

项目号:H665940

保存条件: -20℃, 12个月, 如需频繁使用, 可存放于2-8℃, 尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	H665940-1ml	H665940-5ml
2×GoldStar TaqMan Mixture	1ml	5×1ml
Primer Mix 1	300μl	5×300μl
Human DNA Standard 1 (100ng/μl)	100μl	5×100μl
50×High rox	40μl	200μl

产品简介

本产品是采用探针法进行实时荧光定量 PCR (qPCR), 实现对从各种样品(石蜡样本、流式分选的细胞、血清或血浆样本及少量临床样本等)中抽提的 DNA 进行浓度和质量的准确检测。产品提供了 qPCR 过程中所需的全套试剂, 包括反应混合液, 引物混合物, 标准品, 只需添加提取好的 DNA 即可开始实验, 操作简单方便、省时省力。反应混合物使用了高效、快速的热启动 GoldStar Taq DNA Polymerase, 扩增灵敏度高, 特异性好, 缩短了程序反应的时间。

ROX 染料用于校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同, 因此 ROX 染料的浓度必须与相应的荧光定量 PCR 仪相匹配。

不需要 ROX 校正的仪器: Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96 等。

需要 Low ROX 校正的仪器: ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio®3 System, QuantStudio®5 System, QuantStudio®6 Flex System, QuantStudio®7 Flex System, ViiA 7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000 等。

需要 High ROX 校正的仪器: ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus 等。

注: High Rox 和 Low Rox 的配制方法见使用方法 3 中说明。

适用范围

本产品适用于科研、临床、法医学和亲子鉴定等领域对人基因组 DNA 样品浓度的定量检测。

使用方法

1. 扩增模板准备

将待检测样品用 TE (10mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释, 稀释后浓度尽量在 0.05-10ng/μl 之间。4℃冰上放置备用。

2. 标准品稀释: 按照下表, 先将 Human DNA Standard 1 (100ng/μl) 用 TE 按下表稀释出 5 个不同浓度的标准品。10ng/μl 的 DNA Standard 1 (Std.1) 可在-20℃稳定保存 1 个月; Std2-5 只能当天使用, 配好后暂时不用时应 4℃或冰上放置。

标样	对应浓度 (ng/μl)	最小稀释体积 (单位: μl)
Std. 1	10	10[100ng/μl DNA Standard 1]+90TE
Std. 2	2.5	20[Std. 1]+60TE
Std. 3	0.625	20[Std. 2]+60TE
Std. 4	0.15625	20[Std. 3]+60TE
Std. 5	0.0390625	20[Std. 4]+60TE

3. qPCR 反应体系配制

配制前预先将所需要用到的冷冻保存的试剂完全融化并多次颠倒混匀，然后短暂离心后备用。20 μ l 的基础反应体系如下。

20 μ l 的基础反应体系如下：

试剂	20 μ l 反应体系
2 \times GoldStar TaqMan Mixture	10 μ l
Primer Mix	3 μ l
Template	4 μ l
ddH ₂ O	3 μ l

注意：High Rox 机型：每 50 μ l 反应体系加入 1 μ l 50 \times High Rox；Low Rox 机型：每 500 μ l 反应体系加入 1 μ l 50 \times High Rox。

根据需要配出足够量的反应体系混合物，反应体系配完并充分混匀后，按每孔 16 μ l 体积加入反应孔中。然后将准备好的标准品及稀释好的样品加入对应反应孔，加入量为 4 μ l/孔。空白对照管中加入 TE，同样加入量为 4 μ l/孔。

推荐使用 20 μ l 反应，如需进行更小体系反应，将体系各组分等比减少即可。

4. qPCR 反应程序

本试剂盒的 PCR mix 含目的基因的 FAM 荧光探针和内参照 Internal PCR Control (IPC) 的 VIC 荧光探针，检测时需要选择水解探针双荧光的 qPCR 程序。请根据所用仪器说明进行设定。

PCR 反应温度条件如下：

步骤	温度	时间	循环
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10sec	55
退火/延伸	60 $^{\circ}$ C	30sec	

数据分析

1. 标准曲线制作

参照数据处理 Excel 表绘制标准曲线。标准曲线相关系数 R² 应不低于 0.98，以 Ct 值为纵坐标时，斜率应位于 -3.1 与 -3.6 之间，如标准曲线参数不合理，建议重复实验。

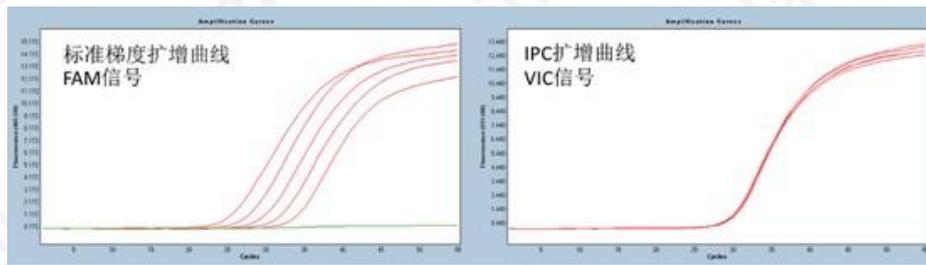
DNA Standard 名称	DNA Standard 浓度 (ng/ μ l)
DNA Standard 1	10
DNA Standard 2	2.5
DNA Standard 3	0.625
DNA Standard 4	0.15625
DNA Standard 5	0.0390625

2. 结果分析及浓度计算

目的基因 FAM 信号的实验复孔间的 Ct 差异应不超过 0.3，否则需删除无效数据或重复实验，请勿使用标准曲线有效 Ct 范围外的 Ct 计算样品的浓度。

样品浓度的具体计算参照数据处理 Excel 表。

若 FAM 信号不正常，需分析内参照 Internal PCR Control (IPC) 的 VIC 信号，确认 PCR 反应过程是否异常。若样品孔 VIC 信号的 Ct 值显著大于标准品或空白对照孔，说明样品对 PCR 反应有抑制。



注意事项

1. 在试验前，应仔细阅读本说明。应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作。
2. 使用请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
3. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 配制反应液时，请使用新的或者无污染的枪头和离心管，尽量防止污染。