

GMO元件tE9终止子探针法qPCR试剂盒

GMO Element tE9 Probe PCR Kit

CAT#:BN66070

低温运输, -20℃保存

产品及特点

用PCR筛查转基因植物的时候,通常选择外源启动子、外源功能基因或外源终止子等GMO元件作为靶分子。如果待测样本中有上述靶分子存在,就可以初步断定该样本中有转基因成分。tE9终止子就是这样一种靶分子,它本是豌豆(*Pisum sativum* L.)核酮糖-1,5二磷酸羧化酶小亚基E9 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit E9, rbcS E9)基因的终止子。本产品就是根据其设计的探针法qPCR试剂盒,它具有下列特点:

1. 即开即用,用户只需要提供样品DNA模板。
2. 引物和探针经过优化,灵敏度高,最低检测限可达100拷贝/反应。
3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。
4. 特异性高,引物是根据tE9终止子DNA设计,不会跟其它DNA发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测,又可用于定量检测。用于定量检测时,线性范围至少5个数量级。
6. 本产品足够50次20 μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	编号	规格
2×Probe qPCR MasterMix	60001	500 μL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
tE9终止子qPCR 引物-探针干粉	66070-4	50 次
tE9终止子阳性对照 (1E7拷贝/μL)	66070-5	50 μL
使用手册		1 份

注意: 引物-探针干粉在使用前需要离心,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。

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为24个月。
自备物品	超纯水，样品DNA。
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以1E1-1E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）。 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。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供DNA片段作为阳性对照。 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，最好用带芯枪头（下同）。 3. 在6号管中加入5 μL 1E7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀1分钟，得到1E6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 1E6拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀1分钟，得到1E5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 1E5拷贝/μL的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀1分钟，得到1E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 依次重复上面的操作得到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，最好设置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号稀释液再加上一一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。 8. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。 三、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（直接用第6步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。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最后加）：

成分	样品管 N+3个	PCR阴性 对照管	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各10 μL	10 μL	各10 μL
tE9终止子qPCR 引物-探针混合液	各3 μL	3 μL	各3 μL
待测样本DNA模板	7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第6步所得标准曲线样品稀 释液（1-6号）	不加	不加	各7 μL（1号样 到1号管，2号 样到2号管…）

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℃	10 min
PCR反应 (40个循环)	95℃	15 sec
	60℃	1 min（采集FAM通道荧光信号， 淬灭基团为TAMRA）

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。
13. 如果阴性对照和阳性对照正常，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Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的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，则阴性对照必须无Ct或Ct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，Ct值应该小

	于40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无Ct或Ct大于或等于40，则为阴性。如果Ct小于40则为阳性。
--	--