



**GenePharma**

# **Custom gene qRT-PCR Quantitation Kit**

**For the detection and quantification of mRNAs  
using real-time RT-PCR detection instruments**

**User Manual**

B001-V003-20210719



# 介绍

## 产品简介

本产品为客户提供了便捷、准确的基因定量检测试剂，此反应体系经过精心优化，具有检测特异性强，扩增效率高的特点。

## 相对定量的计算基础

基因表达的相对定量是由实验中得到的阈值循环数（Ct）计算而来。阈值循环数是指在这一个循环时， $\Delta Rn$ 出现具有统计学意义的增长并且第一次被检测到。这样，在PCR反应时，含有更高初始模板浓度的样品就会比低模板浓度的样品更早到达检测阈值，并得到一个更小的阈值循环数。一次理想的定量实验中，PCR反应的每个循环中，产物都会成倍增长。因此阈值循环数每相差1个单位就等于2倍的初始模板浓度的差距。例如，如果 Ct 值增加了1个单位，那么初始模板浓度就减少一倍；如果 Ct 值减少一个单位，那么就说明初始模板浓度增加了一倍。因此这种属性被应用于计算目标基因和内参基因之间表达的相对定量值。更多信息请参照手册中数据分析部分。

## 组分和保存

客户定制基因定量检测试剂盒包括以下组分,按照所述条件短期贮存,长期贮存请全部置于-20℃,保质期3个月;如需要,可将dNTP、探针等试剂分装成小份避免试剂反复冻融,如反复冻融扩增效果和保质期将会根据冻融次数缩短。

Reagent	Amount				Storage
	50 rxns	100 rxns	200 rxns	500 rxns	
5×RT buffer	200 µl	400 µl	0.8 ml	2×1 ml	4℃
dNTP (10 mM)	40 µl	80 µl	160 µl	400 µl	-20℃
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	-20℃
Random N6 (100 µM)	250 µl	500 µl	1 ml	2.5 ml	4℃
Gene specific RT primer (10 µM)	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	4℃
Gene specific primer Set (10 µM)	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl	4℃
Gene specific probe (10 µM) <sup>1</sup>	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl	4℃
ROX reference dye (50×) <sup>2</sup>	20 µl/100 µl	40 µl/200 µl	80 µl/400 µl	200 µl/1 ml	4℃
2×Real-time PCR Master Mix <sup>3</sup>	0.5 ml	1 ml	2×1 ml	5×1 ml	4℃
rTaq DNA polymerase (5 U/µl)	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	-20℃
RNase free H <sub>2</sub> O	2×1.5 ml	2×1.5 ml	4×1.5 ml	10×1.5 ml	4℃



### NOTE

1. Gene specific probe (10 µM) 为探针法试剂盒专有的TaqMan探针, 5'标记FAM荧光基团, 3'标记BHQ1荧光基团, 其原理是利用Taq酶的3'→5'外切酶活性, 在PCR过程中水解探针, 从而产生和目的片段同步增长的荧光信号, **请务必将探针避光保存**;
2. ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 需要使用低浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems 7000/7300/7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System, 配套ROX 终浓度1× (0.4 µl); 需要使用高浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR System和QuantStudio系列, 配套ROX 终浓度为5× (2 µl)。其他品牌仪器不需要ROX校准, ROX Reference Dye需要避光保存;
3. 吉玛的专用的荧光定量PCR缓冲混合液, 预混了反应所需的试剂, 其中染料法试剂盒的Master Mix含有SYBRGreen I 荧光染料, **需要避光保存**, 而探针法试剂盒的Master Mix不含荧光染料, 所以不需要避光保存。

## 用户需要自备材料

### RNA酶抑制剂 (RNase inhibitor)

RNA酶抑制剂是从人胎盘中提取的一种广谱的核糖核酸酶抑制剂，分子量约50KDa，在cDNA合成过程中可保护RNA不被RNA酶降解，提高cDNA质量。

### 良好光学PCR板 或PCR管

为了消除在荧光检测的步骤中由于PCR管或是PCR96孔板所带来的误差，我们推荐您使用与ABI PRISM 7000/7300/7500/7900, MX3000p/4000p等仪器配套的PCR管及96孔板。

# 方法

## 1. 基因特异性逆转录引物的稀释

试剂盒中提供的基因特异性逆转录引物是10  $\mu\text{M}$ 的贮存液，针对本试剂盒，使用时稀释10倍成1  $\mu\text{M}$ 逆转录引物工作液。在一次标准的基因特异性逆转录中，逆转录引物的终浓度为60 nM。此用量针对本试剂盒提供的MMLV酶，如果逆转录酶为客户自购，以说明书为准。



### NOTE

1. 为了节省逆转录试剂和获得更稳定的结果，我们建议可以将数个目标基因逆转录引物（eg. 10  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{l}$ ）和内参逆转录引物（eg. GAPDH RT 引物10  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{l}$ ）混合，一起稀释10倍成1  $\mu\text{M}$ 逆转录引物工作液（eg. 加80  $\mu\text{l}$  RNase free  $\text{H}_2\text{O}$ ），一次逆转录反应同时得到目标基因和内参基因定量PCR cDNA模板，获得和分开逆转录同样的效果。
2. 经试验测试，对于同一样品，内参基因定量RT-PCR无批间差异，结果稳定。

## 2. 本试剂盒提供了2种逆转录体系，可以根据要求选择其中1种

### 2.1 随机引物N6逆转录反应体系的制备

A. 在无RNase的离心管中混合下列试剂进行预变性：

Component	Final Con.	Vol/1 rxn
Random N6 (100 $\mu\text{M}$ )	25 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{l}$
RNA Sample <sup>1</sup>	1-3 $\mu\text{g}$	2 $\mu\text{l}$

B. 加热70°C 5 min后，马上放于冰盒上；

C.按照下表提供的 20  $\mu\text{l}$  逆转录反应体系混合其他试剂；

Component	Final Con.	Vol/1 rxn
5 $\times$ RT buffer	1 $\times$	4 $\mu\text{l}$
dNTP (10 mM)	0.375 mM	0.75 $\mu\text{l}$
RNase inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ ) <sup>2</sup>	0.5 U/ $\mu\text{l}$	0.25 $\mu\text{l}$
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	40 U	0.2 $\mu\text{l}$
RNase Free $\text{H}_2\text{O}$		To 13 $\mu\text{l}$

<sup>1</sup>RNA 模板量可以根据实验的需要从1  $\mu\text{g}$  到3  $\mu\text{g}$  或者更多

<sup>2</sup>RNase inhibitor为非必需试剂，请客户自备；



### NOTE

在逆转录反应之前须将除了逆转录酶外的各种试剂混匀，可用手指轻弹装试剂的管子，逆转录mix可用移液器吸打几次，千万不要用振荡器。

D. 运行逆转录程序：37°C 60 分钟，85°C 5 分钟，4°C 保存。

（如客户自行提供逆转录试剂，反应条件须参考试剂供货说明书）



## NOTE

逆转录反应 85°C 5 分钟结束后立即将cDNA产物取出，快速置冰上冷却，后续所有步骤都在冰上进行，不要将cDNA产物随便从冰上移走。

## 2.2 基因特异性逆转录反应体系的制备

A. 在无RNase的离心管中混合下列试剂进行预变性：

Component	Final Con.	Vol/1 rxn
Gene specific RT primer (1 $\mu$ M)	60 nM	1.2 $\mu$ l
RNA Sample <sup>1</sup>	1-3 $\mu$ g	2 $\mu$ l

B. 加热70°C，5 min后，马上放于冰盒上；

C.按照下表提供的20  $\mu$ l 逆转录反应体系混合其他试剂；

Component	Final Con.	Vol/1 rxn
5 $\times$ RT buffer	1 $\times$	4 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0.375 mM	0.75 $\mu$ l
RNasin inhibitor (40 U/ $\mu$ l) <sup>2</sup>	0.5 U/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l) <sup>1</sup>	40 U	0.2 $\mu$ l
RNase Free H <sub>2</sub> O		To 16.8 $\mu$ l

<sup>1</sup> RNA 模板量可以根据实验的需要从1  $\mu$ g 到3  $\mu$ g 或者更多

<sup>2</sup> RNase inhibitor为非必需试剂，请客户自备；



## NOTE

1. 请把所有的试剂，反应的混合液和样品至于冰上；
2. 在逆转录反应之前须将除了逆转录酶外的各种试剂混匀，可用手指轻弹装试剂的管壁，逆转录 mix可用移液器吸打几次，**请勿使用振荡器**。

D. 运行mRNA逆转录程序：42°C 45 分钟，85°C 5 分钟，4°C 保存。

（如客户自行提供逆转录试剂，反应条件须参考试剂供货说明书）



## NOTE

逆转录反应 85°C 5 分钟结束后立即将cDNA产物取出，快速置冰上冷却，后续所有步骤都在冰上进行，不要将cDNA产物随便从冰上移走。

### 3. mRNA 逆转录产物的操作

混匀cDNA并且从中吸取2  $\mu$ l(20  $\mu$ l体系) 作为定量PCR的模板。如果逆转录引物工作液是多种基因逆转录引物的混合液, 此cDNA产物可作为其荧光定量PCR反应共同模板。cDNA暂时不用, 可将其存放于-20 $^{\circ}$ C, 三天内可保持稳定, 长期保存请冻存于-80 $^{\circ}$ C。

### 4. 定量PCR 反应mix 制备

1. 建议客户在使用前混匀并低速离心,确保2 $\times$  Real-time PCR Master Mix、50 $\times$  ROX Reference Dye、引物、模板完全溶解, 所有的试剂都在管底或板孔底部。
2. 建议置于冰上进行Real Time PCR反应液的配制:

表一、染料法定量 PCR 20 $\mu$ l反应体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2 $\times$ Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1 $\times$	10 $\mu$ l
Gene specific Primer set (10 $\mu$ M) <sup>1</sup>	0.2 $\mu$ M	0.4 $\mu$ l
ROX reference dye (50 $\times$ )	1 $\times$ or 5 $\times$	0.4 $\mu$ l / 2 $\mu$ l
rTaq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 U	0.2 $\mu$ l
RT product		2 $\mu$ l
RNase Free H <sub>2</sub> O		To 20 $\mu$ l

表二、探针法定量 PCR 20 $\mu$ l反应体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2 $\times$ Real-time PCR Master Mix (FAM)	1 $\times$	10 $\mu$ l
Gene specific Primer set (10 $\mu$ M) <sup>1</sup>	0.2 $\mu$ M	0.4 $\mu$ l
Gene specific Probe (10 $\mu$ M) <sup>2</sup>	0.10 $\mu$ M-0.20 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l-0.4 $\mu$ l
ROX reference dye(50 $\times$ )	1 $\times$ or 5 $\times$	0.4 $\mu$ l / 2 $\mu$ l
rTaq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 U	0.2 $\mu$ l
RT product		2 $\mu$ l
RNase Free H <sub>2</sub> O		To 20 $\mu$ l



#### NOTE

<sup>1</sup>引物终浓度为0.2  $\mu$ M可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。可以在0.1-0.5  $\mu$ M范围内调整: 扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 发生非特异扩增时, 可适当减少PCR反应体系中的引物浓度;

<sup>2</sup>探针体系会因序列不同浓度有所调整, 表中给出的是通用的范围, **每个试剂盒都经过吉玛公司的精心验证, 具体条件可以质检报告所述条件为参考。**

## 5. 实时定量 PCR 反应程序

### A: (推荐)

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	3 min	
PCR反应	40×	95℃	12 sec	
		62℃	40 sec	采集

### B: (可选)

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	3 min	
PCR反应	40×	95℃	12 sec	
		62℃	30 sec	
		72℃	30 sec	采集



### NOTE

1. 染料法荧光基团选择SYBR，探针法荧光基团选择FAM，淬灭基团选择NONE；需要ROX校准的仪器选择ROX作为校准染料。
2. 用户可根据具体需求选择扩增反应程序，操作步骤参考本公司荧光定量检测试剂盒。

(如客户自行提供反应试剂，反应条件须参考试剂供货说明书)

# 数据分析

## 1. 设置一个校正样品

在做相对定量之前，首先必须确定校正样品，通常校正样品可以是正常的或是没经过实验处理的样品。

## 2. 选择合适基因作为标准化内参

相对Ct法定量，标准化基因通常为管家基因或者一些经过表达谱分析验证过的基因。可以用目标基因的Ct值减去标准化基因的Ct值得到校正样品和其他样品的 $\Delta Ct$ 。我们推荐任何一个样品的标准化基因的Ct值不能大于或等于30，如果该基因的Ct值确实稳定在30或以上，您可以考虑增加用于逆转录的初始总RNA的量。

## 3. 计算

### 目标基因相对于标准化基因的表达比率

每个样品对应每个基因至少要做 2-3 个复孔

第一步  
设计基因  
相对定量实验



第二步  
进行荧光定量 PCR 反  
应来得到每个反应的目  
标基因和标准化基因的  
Ct值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Ct 1	24.60	26.21	23.6	30.40	22.66	24.21
Ct 2	24.31	26.15	23.40	30.35	22.56	24.60
Ct 3	24.72	26.35	23.52	30.41	22.48	24.66



**IMPORTANT**

注意复孔间的Ct值差异不要大于0.5，否则我们推荐重复实验

第三步  
计算样品和校正样品  
三复孔的平均值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56

$$\text{Sample 1 } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{P53}) - \text{Ct}(\text{GAPDH})$$

第四步  
目标基因的平均Ct值减去  
GAPDH的Ct平均值，计算  
各个样品的 $\Delta\text{Ct}$ 值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
$\Delta\text{Ct}$	-	1.70	-	6.88	-	1.93

$$\Delta\Delta\text{Ct}(\text{sample1}) = \Delta\text{Ct}(\text{sample1}) - \Delta\text{Ct}(\text{calibrator1})$$

第五步  
样品的 $\Delta\text{Ct}$ 值减去校正样品  
的 $\Delta\text{Ct}$ 值，计算得到各个  
样品的 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
$\Delta\text{Ct}$	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23

$$\text{Relative Expression Ratio}(\text{sample1}) = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}(\text{sample1})$$

第六步  
计算相对表达比率

	校正样品		样品 1		样品 2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
$\Delta\text{Ct}$	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	-	1.00	-	0.027	-	0.85

## 附录

万维网

您可以通过浏览器访问吉玛网站，获取我们的网络资源：

- 下载PDF格式的手册
- 搜索我们的产品目录号和完整的彩色图解说明
- 能够获得我们热销的新产品和特有产品的信息
- 获得吉玛公司产品的引证
- 索要产品目录以及相关产品宣传资料

联系我们

如果您需要更多的信息或者技术上的帮助，请打电话或者电子邮件来联系我们

上海吉玛制药技术有限公司

地址：上海张江高科技园区哈雷路1011号

邮编：201203

电话：86-21-51320195

传真：86-21-51320295

E-mail: [service@genepharma.com](mailto:service@genepharma.com)

网 址: [www.genepharma.com](http://www.genepharma.com)

苏州吉玛基因股份有限公司

地址：苏州工业园区生物纳米科技园东平街199号

邮编：215125

电话：0512-86668828

传真：0512-86665900

E-mail: [szservice@genepharma.com](mailto:szservice@genepharma.com)

网 址: [www.genepharma.com](http://www.genepharma.com)

©2005–2006 Genepharma Corporation. All rights reserved. For research use only.  
Not in-tended for any animal or human.

