



Human Genomic DNA Quantification Kit

人类基因组DNA定量试剂盒

目录号：CW2683S (1 mL)

CW2683M (5 mL)

保存条件：-20°C，如需频繁使用，可存放于2-8°C，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW2683S 1 mL	CW2683M 5 mL
2×GoldStar TaqMan Mixture	1 mL	5×1 mL
Primer Mix 1	300 μL	5×300 μL
Human DNA Standard 1 (100 ng/μL)	100 μL	5×100 μL
50× High ROX	40 μL	200 μL

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。

注意: 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 (10 mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释, 稀释后浓度尽量在0.05-10 ng/μL 之间。4°C冰上放置备用。

2. 标准品稀释: 按照下表, 先将Human DNA Standard 1 (100 ng/uL) 用TE按下表稀释出5个不同浓度的标准品。10 ng/μL的DNA Standard 1 (Std. 1) 可在-20°C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°C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 [100 ng/μL DNA Standard 1]+ 90 TE
Std.2	2.5	20 [Std. 1] +60 TE
Std.3	0.625	20 [Std. 2] +60 TE
Std.4	0.15625	20 [Std. 3] +60 TE
Std.5	0.0390625	20 [Std. 4] +60 TE

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	10 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10 sec	55
退火/延伸	60 $^{\circ}$ C	30 sec	

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。

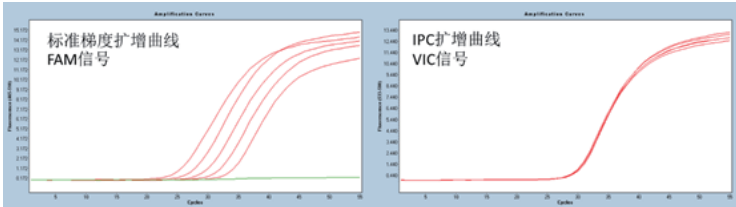
DNA Standard名称	DNA Standard浓度 (ng/ μ L)
DNA Standard 1	10
DNA Standard 2	2.5
DNA Standard 3	0.625
DNA Standard 4	0.15625
DNA Standard 5	0.0390625

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。