

GMO 外源 cry3A 基因探针法 qPCR 试剂盒

GMO Exogenous cry3A Gene Probe PCR Kit

目录号: ml107585

使 用 说 明 书

产品及特点

苏云金芽孢杆菌的 cry3A 基因编码杀虫晶体蛋白 3A (Crystal Protein 3A, Cry3A), 其全长为 1794bp。Cry3A 蛋白对鞘翅目害虫有很好的毒杀功效, 因此 cry3A 基因作为杀毒功能基因在转基因技术中广泛使用。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测 cry3A 基因的试剂盒, **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, 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 cry3A 基因高度保守区设计, 不会跟其他基因的 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 μ L 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	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
GMO 外源 cry3A 基因 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
GMO 外源 cry3A 基因阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
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。		

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, 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，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 μ L 上步所得 4 号稀释液再加上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 μ L 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加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管(1-6 管)
2×Probe qPCRMasterMix	各 10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
GMO 外源 cry3A 基因 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
待测样本 DNA 模板	7 μ L	不加	不加
超纯水	不加	7 μ L	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 μ L

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℃	5min
	PCR 反应	95℃	15sec
	(45 个循环)	60℃	1 min（采集 FAM 通道，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。			
自备试剂	超纯水，样品 DNA。		
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。		