

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:17-GMO1024  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

GMO 外源 gfp 基因探针法 qPCR 试剂  
GMO gfp Gene Probe qPCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, 简称 GFP)是由 <i>gfp</i> 基因编码的、由 238 个氨基酸组成的蛋白质,从蓝光到紫外线都能使其发出绿色荧光。现在 <i>gfp</i> 基因常用作转基因生物的外源标记基因,因此快速灵敏检测转基因生物中的 <i>gfp</i> 基因具有重要意义。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 <i>gfp</i> 基因的试剂盒,它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用,用户只需要提供样品 DNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化,分析灵敏性高,可以达到 100 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照和内参,便于排除假阴性结果。</li> <li>4. 特异性高,引物是根据 <i>gfp</i> 基因设计,不会跟其他基因的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>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为 5 各数量级。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的探针法 PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>Probe PCR MagicMix</td> <td>190303</td> <td>0.5 mL (本色盖)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL (绿盖管)</td> </tr> <tr> <td><i>gfp</i> 基因 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)</td> <td>yp17-GMO1024</td> <td>200 <math>\mu</math>L (棕色管)</td> </tr> <tr> <td><i>gfp</i> 基因 PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E7 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>pc-GMO1024</td> <td>50 <math>\mu</math>L (黄盖管)</td> </tr> <tr> <td><i>gfp</i> 基因 PCR 内参 (1<math>\times</math>10E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>icpc17-GMO1024-dx2</td> <td>250 <math>\mu</math>L (白盖管)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>17-GMO1024sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	2 $\times$ Probe PCR MagicMix	190303	0.5 mL (本色盖)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)	<i>gfp</i> 基因 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)	yp17-GMO1024	200 $\mu$ L (棕色管)	<i>gfp</i> 基因 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)	pc-GMO1024	50 $\mu$ L (黄盖管)	<i>gfp</i> 基因 PCR 内参 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	icpc17-GMO1024-dx2	250 $\mu$ L (白盖管)	使用手册	17-GMO1024sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
2 $\times$ Probe PCR MagicMix	190303	0.5 mL (本色盖)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)																						
<i>gfp</i> 基因 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)	yp17-GMO1024	200 $\mu$ L (棕色管)																						
<i>gfp</i> 基因 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)	pc-GMO1024	50 $\mu$ L (黄盖管)																						
<i>gfp</i> 基因 PCR 内参 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	icpc17-GMO1024-dx2	250 $\mu$ L (白盖管)																						
使用手册	17-GMO1024sc	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20<math>^{\circ}</math>C 保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 DNA。</p>																							
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、<b>稀释标准曲线样品</b> (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/<math>\mu</math>L 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E4 拷贝/<math>\mu</math>L 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)。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管,分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。</li> <li>2. 在 0 号管中加入 280<math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 35<math>\mu</math>L 本试剂盒提供的内参 (共 3.5<math>\times</math>10E5 拷贝, 浓度为 1.1<math>\times</math>10E3 拷贝/<math>\mu</math>L), 震荡一分钟混匀。用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45<math>\mu</math>L/管加入到标记的 1-6 号</li> </ol>																							

管中（每管含内参约  $5 \times 10^4$  拷贝，浓度为  $1 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ），最好用带芯枪头（下同）。

3. 在 6 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 5 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 4 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品,每个样品中内参的浓度固定为  $10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。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  $10\mu\text{L}$  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。最后所有纯化的样本中加入  $5\mu\text{L}$  ( $50000$  拷贝) 内参。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA (含内参),本试剂盒跟市场上大多数 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、Probe qPCR 反应 ( $20\mu\text{L}$ 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最后加)：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
$2 \times$ Probe qPCR MagicMix	各 $10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$	各 $10 \mu\text{L}$
Gfp 基因 qPCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各 $4 \mu\text{L}$	$4 \mu\text{L}$	各 $4 \mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA (含内参)	各 $6 \mu\text{L}$	不加	不加

超纯水	不加	6 $\mu$ 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 6 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 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 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 (37 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	60 sec (采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 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。对任何阴性样品, 如果内参无 Ct, 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。
13. 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。
14. 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 Ct 必须等于或者大于 36, 或者没有 Ct 值。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 36。对待测样品, 如果其 Ct 小于 36 则为阳性。如果在大于或等于 36 则为阴性。对任何阴性样品, 如果内参无 Ct, 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。

#### 关联产品

GMO 外源 gfp 基因荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒