

天
净
沙
系
列

CAT#:17-GMO1026
低温运输, -20℃保存

BINGENE

GMO 外源 npt II 基因探针法 qPCR 试剂盒
GMO nptII 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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	来自于细菌的 nptII 基因编码新霉素磷酸转移酶（Neomycin Phosphotransferase 2），该酶能赋予细胞抗卡那霉素的能力，这是转基因技术中常用的一种筛选标记，因此快速灵敏检测 npt II 时判断某生物是否是转基因生物（GMO）的一个重要的判断指标。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 npt II 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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。 3. 提供阳性对照和内参，便于排除假阴性结果。 4. 特异性高，引物是根据 npt II 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为 5 各数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	2×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）
	nptII 基因 PCR 引物-探针混合液 （含内参探针）	yp17-GMO1026	200 μL（棕色管）
	npt II 基因 PCR 阳性对照 （1×10E7 拷贝/μL）	Pc-GMO1026	50 μL（黄盖管）
	npt II 基因 PCR 内参 （1×10E4 拷贝/μL）	Ic-GMO1026	250 μL（白盖管）
	使用手册	17-GMO1026sc	1 份
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。		
自备试剂	样品 DNA。		
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 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）。 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 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/ μL 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。最后在所有样本中加入 5 μL 本试剂盒提供的 nptII 基因内参（共 50000 拷贝）。
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 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+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
npt IIqPCR 引物-探针混合液 (含内参引物)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测 DNA（含内参）	各 6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 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 6 μL (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
		逆转录	42℃	5 min
		预变性	95℃	3 min
	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	10 sec	
		58℃	5 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阴性，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 值应该小于或等于 35。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

关联产品	GMO 外源 npt II 基因荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒
-------------	--------------------------------------