



# GMO 外源 cry3A 基因探针法 qPCR 试剂盒

GMO Exogenous cry3A Gene Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

	<p>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, <b>它具有下列特点:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1.</b> 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。</li> <li><b>2.</b> 引物和探针经过优化, 灵敏度高, 检测限可达 100 拷贝/反应。</li> <li><b>3.</b> 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li><b>4.</b> 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。</li> <li><b>5.</b> 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。</li> <li><b>6.</b> 本产品足够 50 次 20 <math>\mu\text{L}</math> 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</li> <li><b>7.</b> 本产品只能用于科研。</li> </ol>																											
<b>规格及成分</b>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #668dce; color: white;"> <th style="padding: 5px;">成分</th><th style="padding: 5px;">规格</th><th style="padding: 5px;">包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">2×Probe qPCR MasterMix</td><td style="padding: 5px;">0.5mL</td><td style="padding: 5px;">0.5mL 本色管</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td style="padding: 5px;">1mL</td><td style="padding: 5px;">1.5mL 绿盖管</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">超纯水</td><td style="padding: 5px;">1mL</td><td style="padding: 5px;">1.5mL 蓝盖管</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">GMO 外源 cry3A 基因 qPCR 引物-探针干粉</td><td style="padding: 5px;">50 次</td><td style="padding: 5px;">0.5mL 棕色管</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">GMO 外源 cry3A 基因阳性对照(1E7 拷贝/<math>\mu\text{L}</math>)</td><td style="padding: 5px;">50<math>\mu\text{L}</math></td><td style="padding: 5px;">0.5mL 黄盖管</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">使用手册</td><td style="padding: 5px;">1 份</td><td style="padding: 5px;">无</td></tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 5px;">本产品采用五孔盒包装</td></tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 5px;"><b>注 意:</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 162<math>\mu\text{L}</math> 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20°C保存。</td></tr> </tbody> </table>	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/ $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$	0.5mL 黄盖管	使用手册	1 份	无	本产品采用五孔盒包装			<b>注 意:</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 162 $\mu\text{L}$ 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20°C保存。		
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/ $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$	0.5mL 黄盖管																										
使用手册	1 份	无																										
本产品采用五孔盒包装																												
<b>注 意:</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 162 $\mu\text{L}$ 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20°C保存。																												
<b>使用方法</b>	<p><b>一、稀释标准曲线样品</b> (以 1E1-1E6 拷贝/<math>\mu\text{L}</math> 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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1.</b> 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。</li> <li><b>2.</b> 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu\text{L}</math> 荧光 PCR 专用模板稀释液, 用带芯枪头 (下同)。</li> <li><b>3.</b> 在 6 号管中加入 5 <math>\mu\text{L}</math> 1E7 拷贝/<math>\mu\text{L}</math> 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E6</li> </ol>																											

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  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  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/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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。
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 $\mu\text{L}$ 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 qPCR MasterMix	各 10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
GMO 外源 cry3A 基因 qPCR 引物-探针混合液	各 3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	各 3 $\mu\text{L}$

	N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
	超纯水	不加	7μL	不加
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL

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°C	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	15sec
	60°C	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。

PCR 编号	TW-E10169
说明书	1 份
自备试剂	超纯水，样品 DNA
运输及保存	低温运输，-20°C 保存，有效期 2 年

**上海通蔚**

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

**技术支持：15800441009**