

Code No. 3789

研究用

TAKARA

External Standard Kit
(λ polyA) for qPCR

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备材料	1
● 操作方法	1
● 实验例	2
● 参考文献	3
● 关联产品	3

● 制品说明

在基因表达分析中，内参基因常常被用来校正目的基因的表达量。目的基因表达水平由内参基因来校正的方法即相对定量。管家基因常被作为内参基因来使用，但在某些实验中也很难确定稳定表达的基因。这种情况下，添加外源的标准RNA到反应液中作为参照，对于相对定量的准确性比较有效。

本试剂盒提供了Real Time RT-PCR实验用的外部参照，包含了对照RNA (λ polyA⁺ RNA-A)、稀释液 (EASY Dilution) 和用于检测的引物 (Real Time Primer for λ polyA)。对照RNA是以 λ DNA片段作为模板体外转录获得约1.0 kb的polyA⁺ RNA，此RNA用于Real Time RT-PCR实验中研究真核生物基因表达的外部参照。另外，由于 λ polyA⁺ RNA-A在3' 末端有polyA序列，也可以使用oligo dT引物进行反转录反应。

● 制品内容

Real Time Primer for λ polyA	10 μ M each	200 μ l
EASY Dilution (for Real Time PCR)*		1 ml
λ polyA ⁺ RNA-A	10 ng/ μ l	15 μ l

* EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160) 可以单独购买。

● 保存:

Real Time Primer for λ polyA 和 EASY Dilution (for Real Time PCR): -20°C

λ polyA⁺ RNA-A: -80°C

● 试剂盒外必备材料:

- 反转录和Real Time PCR反应试剂，如：
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)
One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)
- 0.2 ml和1.5 ml microtubes
- 微量移液器和枪头
- Thermal cycler
- Real Time PCR仪

● 操作方法:

1. 稀释 λ polyA⁺ RNA-A

使用 EASY Dilution (for Real Time PCR) 对 10 ng/ μ l λ polyA⁺ RNA-A (约 1.8×10^{10} copies/ μ l) 制备适合 Real Time PCR 实验的连续梯度稀释液 (详见下面的“实验例”)。分装成适合的体积，保存于-80°C，避免反复冻融。

2. 添加 λ polyA⁺ RNA-A 到 Real Time RT-PCR 反应液中

λ polyA⁺ RNA-A 的使用量取决于添加的反应步骤，调整 λ polyA⁺ RNA-A 添加量以达到 Real Time PCR 反应液中含约 $10^2 \sim 10^7$ copies 的模板。

例如:

添加 λ polyA⁺ RNA-A 到 RNA 提取前的细胞悬液中

取 1.8×10^8 copies 的 λ polyA⁺ RNA-A 加入到 350 μ l 的细胞悬液中，在 RNA 提取后终体积为 50 μ l。此时，在总 RNA 溶液中的 λ polyA⁺ RNA-A 浓度相当于 3.6×10^6 copies/ μ l。

添加 λ polyA⁺ RNA-A 到反转录反应前的 RNA 溶液中

取 1.8×10^7 copies 的 λ polyA⁺ RNA-A 加入到总 RNA 中，终体积为 10 μ l。取 2 μ l 作为反转录反应 (反应液体积为 20 μ l) 的模板，此时，在反转录反应液中的 λ polyA⁺ RNA-A 浓度相当于 1.8×10^5 copies/ μ l。

● 实验例:

λ polyA⁺ RNA-A 作为参照的基因表达分析实验 (相对定量)

(方法)

不同小鼠组织来源的四种 Total RNA 样品中, 每种 500 ng Total RNA 中加入 1.8×10^8 copies 的 λ polyA⁺ RNA-A。使用 PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) 进行反转录反应, 然后由 Real Time PCR 检测 λ polyA⁺ RNA-A 和目的基因 Pah 与 Sord。反转录反应和 PCR 反应按照说明书的反应条件进行操作。以肝脏来源的样品作为标准品进行标准曲线制备。

检测基因: (A) λ polyA⁺ RNA-A; (B) Pah; (C) Sord

样品: Total RNA, 来源于小鼠(a)肝脏, (b)脑, (c)心脏, (d)肾脏组织

实验样品: cDNA, 1 ng each

标准品: 肝脏cDNA, 5 pg-50 ng (1: 9稀释, 6个梯度)

不添加模板的阴性对照 (NTC)

*cDNA 量相当于 Total RNA 量。

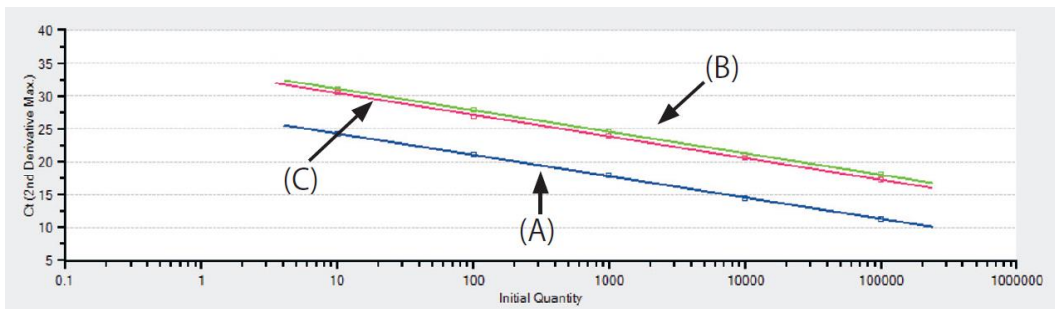
试剂: PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)

TB Green *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)

仪器: Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900: 终卖)

(结果)

标准曲线显示了目的基因和外部参照基因良好的准确性。根据标准曲线确定的每种实验样品的数值, 与 λ polyA⁺ RNA-A 参照校正后, 获得了 Pah 和 Sord 基因表达的相对定量结果。

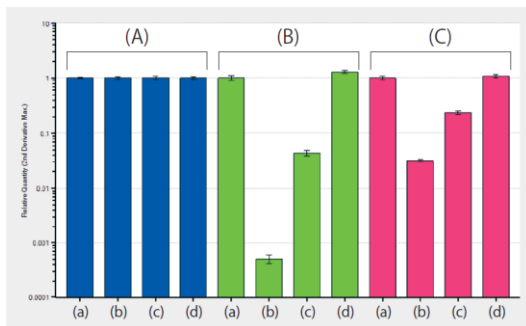


(A) λ polyA⁺ RNA-A (蓝); R2:1.000 Eff:103.6% $Y = -3.238 \times \text{LOG}(X) + 27.52$

(B) Pah (绿); R2:1.000 Eff:102.2% $Y = -3.271 \times \text{LOG}(X) + 34.37$

(C) Sord (粉); R2:0.999 Eff:101.2% $Y = -3.294 \times \text{LOG}(X) + 33.73$

相对定量结果



检测基因: (A) λ polyA⁺ RNA-A; (B) Pah; (C) Sord

样品: Total RNA, 来源于小鼠(a)肝脏, (b)脑,

(c)心脏, (d)肾脏组织

● 参考文献

Giltsbach R, Kouta M, Bonisch H, and Bruss M. Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* . (2006) **40**(2): 173–177.

● 关联产品

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B)
PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

PrimeScript, *Premix Ex Taq*, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202204Da