



All-in-One™ qPCR Primer Manual and Validation Report

Catalog number: HQP006940

GeneCopoeia, Inc.; 广州复能基因有限公司

地 址：广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼

订购热线：4006 020 200

技术支持：020-32068595

传 真：020-32052877

网 址：www.genecopoeia.com.cn; www.fulengen.com

E-Mail: sales@fulengen.com; support@fulengen.com

邮 编：510663

For Research Use Only

Primer Manual and Validation Report

- I. 概述
- II. 产品信息
- III. 产品使用流程
- IV. 推荐的配套使用试剂
- V. 产品应用
- VI. All-in-One qPCR Primer 验证报告

I. 概述

All-in-One qPCR Primer 是采用本公司独特的算法设计，以单链 cDNA 为模板，经 qPCR 实验验证并优化的 qPCR 引物，配合含 SYBR Green 的 qPCR 试剂使用（特别针对本公司的 All-in-One qPCR Mix），主要应用于检测 mRNA 水平上基因的表达量差异

II. 产品信息

Catalog#	Primer ID	Accession#	PCR Size	Gene symbol	Package Conc.	Package size
HQP006940	Hs-QRP-20169	NM_002046	152	GAPDH	2 μ M	200 rxn
HQT000001	Positive Control cDNA Mix				10 \times Mix	3 rxn

储存条件：-20 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融

III. 产品使用流程

1. 客户收到本产品时，需在离心机上 12000rpm 离心 30sec，使其液体完全流到离心管底部；如每次引物的使用量不是很多，建议客户对收到的产品进行分装并于 -20 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融；
2. 本产品为特异基因检测的上游引物和下游引物混合液，已用灭菌 ddH₂O 稀释到使用浓度 2 μ M（即为 10 \times Primer 包装），使用时客户仅需参考其 PCR 反应体系的大小，吸取一定量的本产品，使其终浓度达整个反应体系的 1 \times 量（即终浓度为 0.2 μ M）即可
3. 使用时客户仅需参考其 PCR 反应体系的大小，吸取一定量的该产品引物，使其终浓度为 0.2 μ M 即可；该产品需推荐配合 All-in-One qPCR Mix 使用，具体使用方法敬请参考“All-in-One qPCR Primer 验证报告”中 Page 7 的“qPCR 检测”部分；
4. 产品中附有公司进行产品验证的 Positive cDNA Mix 模板，客户如需要，可参考“qPCR Primer 验证报告”中 Page7 的“qPCR 检测”部分对本产品进行质检；
5. 本产品需配合含 SYBR Green 的 qPCR 试剂使用，不一定适合探针法检测。

All-in-One qPCR Primer Manual and Validation Report

6. 本产品中配有的 **Positive Control cDNA Mix** 是利用 **All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit** 进行合成的 cDNA 产物。配合 **All-in-One qPCR Mix** 可用于对 qPCR Primer 进行验证。

IV. 推荐的配套使用试剂

Additional products used or recommended	Catalog numbers
All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	AORT-050 (50 synthesis reactions)
	AORT-020 (20 synthesis reactions)
All-in-One™ qPCR Mix	AOPR-0200 (200 qPCR reactions)
	AOPR-0600 (600 qPCR reactions)
	AOPR-1200 (1200 qPCR reactions)

V. 产品应用

All-in-One qPCR Primer 为应用于 qPCR 反应的引物，主要用来检测 mRNA 水平上基因的表达量差异：如 shRNA 干扰后对基因表达量下降程度的检测。

VI. All-in-One qPCR Primer 验证报告

A 材料和方法

1. 验证实验仪器

iQ5 Real Time PCR Detection System: Bio-Rad

2. 验证的实验材料及试剂

All-in-One First-Strand cDNA Synthesis Kit (**Catalog Nos.** AORT-050)

All-in-One qPCR Mix (**Catalog Nos.** AOPR-0200)

验证模板：人源十个不同的组织所制备的 cDNA

B 验证流程

RNA 抽提

1. 样品处理

取一定量的十个不同的人源组织标本至冷冻的研钵中，加入液氮研磨至细粉，最后转移至有 1ml TRIzol 的离心管中，反复振荡约 5min。(如为细胞样品，则取约 $10^6\sim 10^7$ 左右的细胞数至 1ml TRIzol 中，反复吹打至裂解。)

2. 相分离

室温放置 10min 左右后，每 1ml TRIzol 中加入氯仿为 200 μ l，盖上盖子，剧烈振荡约 1min，室温静置 2~5min，然后 12000g 冷冻离心 15min (6 $^{\circ}$ C)，小心取出样品，通过观察可以发现样品分三层，其中最上层含有 RNA 样品。

3. RNA 沉淀

小心吸取上清液约 450 μ l (每 1ml TRIzol 的吸取量) 至含有 600 μ l 冷冻异丙醇的新离心管中，混匀，-20 $^{\circ}$ C 放置约 10min，12000g 冷冻离心 10min (6 $^{\circ}$ C)。

4. RNA 洗涤

去上清，加入 500 μ l 冷冻的 75% 乙醇，弹起沉淀后 12000g 冷冻离心 5min (6 $^{\circ}$ C)，去上清，再稍离，吸去上清液。

5. RNA 溶解

风干约 5~10min(注意不能风太干，只需要沉淀泛白即可)，加入 DEPC 水约 30 μ l。贴上标签后-80 $^{\circ}$ C 保存。

6. RNA 浓度测定

吸取 1 μ l 抽提的 RNA 用 DEPC 水稀释 10 倍后，在 Nanodrop 上测定 RNA 浓度，以 DEPC 水做空白对照，同时记录 RNA 浓度及其 A 260/OD280。

7. RNA 电泳检测

7.1. 变性胶制备

取 1g Agarose + 75ml 去离子水煮沸，冷却至 70 $^{\circ}$ C 左右加入 10ml 10 \times Mops 和 15ml 甲醛及 EB。倒胶至宽口梳子的胶板上，盖上盖子。

7.2. 电泳缓冲液配制(1 \times Mops)

取 50ml 10 \times Mops，用去离子水稀释至 500ml，倒入电泳槽中，再在电泳缓冲液中添加 EB。

7.3. RNA 样品处理

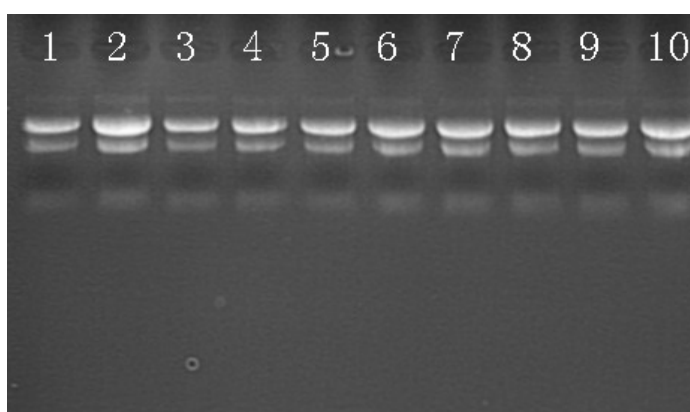
取 RNA 样品 3 μ l, 补充 DEPC 水至 18 μ l, 65 $^{\circ}$ C 变性 10min 后立即冷却, 加入 2 μ l 10 \times RNA loading buffer 即可电泳

7.4. RNA 电泳

先把 RNA 胶放入电泳槽中, 100V 作用电泳约 5min, 再在点样孔中点入处理过的 RNA 样品, 100V 左右电泳至溴酚蓝至胶的 1/3 处, 取胶拍照。

8. RNA 检测结果

8.1. 十个不同组织的 RNA 电泳图 (取各 3 μ l RNA 样品):



各泳道所对应的样品信息见下表 8.2

8.2 RNA 电泳的各泳道所对应的样品及其样品浓度和 A260/OD280

泳道	组织	Conc.(ng/ μ l)	A 260/OD280
1	脑	2385	1.9
2	肺	2430	1.94
3	肝	2521	1.91
4	肾	6444	1.94
5	乳腺	2785	1.87
6	睾丸	2972	1.9
7	胎盘	3515	1.91
8	脾	3344	1.91
9	心脏	3394	1.91
10	胰腺	3101	1.91

NOTE: RNA 的质量是定量 PCR 实验的保证, 请严格按照所使用的 RNA 抽提试剂盒的要求及其步骤进行操作。抽提结束后, 敬请电泳检测 RNA 抽提质量

反转录反应

All-in-One qPCR Primer Manual and Validation Report

1. 融解反应所需的 First-Strand cDNA Synthesis Kit 中的试剂，上下轻微颠倒混匀，进行短暂离心后放置冰上待用。

2. RNA-Primer Mix 的配制反应（所有反应液的配制都在冰上操作）

在预冷的 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 13 μ l

试剂组分	体积	终浓度
Total tissues RNA	1 μ g RNA 量	
250 μ M Random primer	1 μ l	10 μ M
H ₂ O (RNase / DNase Free)	至总体积 13 μ l	

3. RNA 变性

混匀 RNA-Primer Mix，进行短暂离心，65 $^{\circ}$ C 变性 10min 后立即置冰上。

4. 配制反转录反应液。

在 RNA-Primer Mix 反应管内加入以下试剂至总体积 25 μ l

试剂组分	体积	终浓度
RNA-Primer Mix	13 μ l	
5 \times RT Reaction Buffer	5 μ l	1 \times
25mM dNTP	1 μ l	1mM
25U/ μ l RNase Inhibitor	1 μ l	1 U/ μ l
200U/ μ l M-MLV RTase	1 μ l	8 U/ μ l
H ₂ O (RNase / DNase Free)	4 μ l	
总体积	25μl	

5. 反转录反应

混匀反应 Mix，短暂离心后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

6. 灭活并保存反转录产物

反应结束后，85 $^{\circ}$ C 灭活处理 5min，把各组织 RNA 反转录产物混合，后再用灭菌 ddH₂O 对此 cDNA Mix 稀释 5 倍，形成 Positive cDNA Mix。最后 -20 $^{\circ}$ C 保存此反转录产物。

qPCR 检测

1. 将 2 \times All-in-One qPCR Mix 在室温下融解，轻柔得上下颠倒混匀并进行短暂离心。同时在使用过程中始终保持避光。

All-in-One qPCR Primer Manual and Validation Report

2. 冰上进行 qPCR 反应液的配制（所有检测进行复孔测试，同时进行 NTC（No template control）测试）

试剂组分	体积	终浓度
2×All-in-One qPCR Mix	10 μL	1×
All-in-One qPCR Primer (2μM)	2 μL	0.2μM
1 st strand cDNA (5 倍稀释液)	2 μL	
ddH ₂ O	6 μL	
Final Volume	20 μL	

Note: 在实验中设计了 NTC (No Template Control), 其为阴性对照, 即用水来代替模板 cDNA, 其它试剂不变, 从而来质控是否体系有污染; 实验中如需更改反应体积, 敬请保持最适条件下各组分的比例; 试剂盒中的 50× Rox Reference Dye 使用在需用 Rox 校正的仪器, 如 ABI 的定量 PCR 仪

3. 充分混匀 qPCR 反应液, 添加至 PCR 反应管中, 短暂离心, 确保所有试剂到反应管底部。
4. qPCR 反应, 使用标准的三步法进行检测 (以 Bio-Rad 的 iQ5 进行实验的设计)

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95°C	10min	否
40	变性	95°C	10sec	否
	退火	60°C	20sec	否
	延伸	72°C	15sec	是

反应结束后, 立即进行融解曲线分析

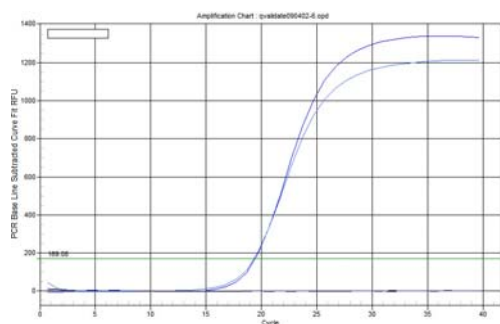
检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
72°C~95°C	0.5°C/次	10 sec/次	是
30°C		30sec	否

Note: 以上的反应条件主要参考的为 Bio-Rad 的 iQ5 定量 PCR 仪器, 如使用的为不同公司的定量 PCR 仪, 请按照不同的仪器要求, 调整 qPCR 反应的延伸时间及其融解曲线分析的条件; 各 miRNA 的退火温度可能例有差别, 具体请参考测试结果部分。

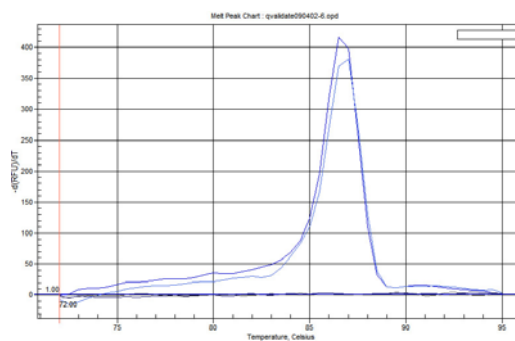
C. 引物验证结果

1. GAPDH (Hs-QRP-20169 primer)

推荐退火温度为 60℃



GAPDH Amplification curve



GAPDH melting analysis curve

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。

GeneCopoeia Products are for Research Use Only

Copyright © 2009 GeneCopoeia, Inc.

Trademarks: iQ5™ (Bio-Rad); GeneCopoeia™, OmicsLink™, All-in-One™, (GeneCopoeia Inc.); Trizol™

(Invitrogen); NanoDrop™ (Thermo Scientific)

AOqPM-0310