**构巢曲霉探针法荧光定量PCR试剂盒说明书**

产品特点

1. 使用化学修饰的热启动聚合酶，反应特异性高，\*程度地避免了非特异扩增；

2. 反应缓冲液经充分优化，反应灵敏快速，40个循环只需20多分钟；

3. 抗干扰能力强，反应重复性高，适合对土壤、粪便、肿瘤和血液来源的复杂样本中的靶基因进行检测分析。

在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，zui后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

特异性荧光标记：

TaqMan法

TaqMan探针的特性：

（1）5′端标记有报告基团（Reporter, R），如FAM、VIC等

（2）3′端标记有荧光淬灭基团 （Quencher, Q）

（3）探针完整，R所发射的荧光能量被Q基团吸收 ，无荧光， R与Q分开，发荧光

（4）Taq酶有 5′→3′外切核酸酶活性，可水解探针

相对定量通过内标定量：

内标（Endogenous Control）通常是β-actin、GAPDH基因等看家基因，在细胞中的表达量或在基因组中的拷贝数恒定，受环境因素影响小，内标定量结果代表了样本中所含细胞或基因组数量。

相对定量分析方法 ：

2-ΔΔCt

前提：目标序列和内参序列的扩增效率接近100％且偏差在5％以内

1、用内参基因的CT值归一目标基因的CT值：

ΔCT（test）= CT（target,test）-CT（ref,test）

ΔCT（calibrator）= CT（target,calibrator）-CT（ref, calibrator）

2、用校准样本的ΔCT值归一试验样本的ΔCT值：

ΔΔCT= ΔCT（test） - ΔCT（calibrator）

3、计算表达水平比率：

2 –ΔΔCT=表达量的比值

荧光定量PCR检测方法包括以下步骤：

(1)将参照基因与待测目的基因片段等比例连接，克隆到同一个质粒载体上，构建一种可同时用于参照基因以及待测目的基因扩增检测的标准品，并将所得标准品按照浓度梯度稀释后同时用于绘制参照基因以及待测目的基因的标准曲线；

(2)待测样本与步骤(1)所述标准品经同步进行实时荧光定量PCR扩增后，目的基因与参照基因按照各自的标准曲线计算各自的拷贝数，计算待测样本的目的基因与参照基因拷贝数比值，即得目的基因的拷贝数相对定量检测结果。

其中步骤(1)为：将参照基因与待测目的基因片段等比例连接，克隆到同一个质粒载体上，构建一种可同时用于参照基因以及待测目的基因扩增检测的标准品，并将所得标准品按照浓度梯度稀释后同时用于绘制参照基因以及待测目的基因的标准曲线。

其中所述参照基因为本领域常规参照基因，较佳地管家基因，优选地为RPPH1的扩增区域，其中所述质粒载体为本领域常规质粒载体，较佳地为PCR克隆载体，优选地为TA cloning载体，所述TA cloning载体较佳地为pMD18-T载体。其中所述标准品的核酸序列如序列表中SEQ ID NO:6所示。所述的等比例较佳地为1：1。由于标准品中待测目的基因与参照基因的比例为1:1，解决了目前相对标准曲线法应用中目的基因与参照基因的浓度比例关系难以控制的问题，提高HER2基因扩增检测的可靠性。

步骤(2)为：待测样本与步骤(1)所述标准品经同步进行实时荧光定量PCR扩增后，目的基因与参照基因按照各自的标准曲线计算各自的拷贝数，计算待测样本的目的基因与参照基因拷贝数比值，即得目的基因的拷贝数相对定量检测结果。

其中所述待测目的基因为本领域常规待测目的基因，较佳地为肿瘤或者疾病的特异性基因，更佳地为HER2基因的扩增区域，所述荧光定量PCR扩增为本领域常规荧光定量PCR扩增方法，所述荧光定量PCR扩增方法较佳地为多通道荧光定量PCR扩增，更佳地为双通道荧光定量PCR扩增。 正辛酸乙酯shēng huà shì jì容量：100毫克 大鼠环加氧酶2(COX-2)免疫试剂盒 Rat cyclooxygenase-2,COX-2 ELISA Kit

实验注意事项：

1）RT-PCR可以检测组织、细胞、血液、细菌等很多材料，不同的样本有不同要求，实验前请充分沟通确认实验方案和样本情况；

2）客户尽可能提供实验的背景信息、物种、基因准确的名称和ID号；

3）客户尽量不要提供DNA或RNA样品。

4）样本保存于液氮或干冰，也可以保存于Trizol液中。

实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）是指在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，\*通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。实时荧光定量PCR的化学原理包括探针类和非探针类两类，探针类是利用与靶细胞序列特异性杂交的探针来指示扩增产物的增加，非探针类是利用荧光染料或者特异性设计的引物来指示扩增的增加。运用该技术可以对DNA、RNA样品进行定量（包括\*定量和相对定量）和定性分析。

主要服务：DNA或RNA的\*定量分析、基因表达差异分析、基因分型。

主要技术：引物设计、RNA提取、cDNA合成、qPCR。