

# 人线粒体 DNA 探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Mitochondrial DNA Probe qPCR Kit

**使用手册 V3.0**

## 💡 产品及特点

本试剂盒可用于检测人线粒体 DNA。线粒体是真核细胞的“能量工厂”，通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation,OXPPOS)提供细胞各种生理活动所需约 90%的 ATP。人线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)全长 16569 bp，为环状双链分子，根据两条链在氯化铯梯度中浮动密度的显著差异分为重链(heavy strand,H)和轻链(light strand,L)，其中重链的鸟嘌呤(guanine,G)含量较高。本产品是根据探针法荧光定量 PCR 原理开发的人线粒体 DNA 检测试剂盒，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. 引物等组分经过优化，灵敏度高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据人线粒体 DNADNA 序列高度保守区设计，不会跟其他生物样本的 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 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

## 📋 成分规格

| 产品组成  | 规格          |
|---|-------------|
| 2 $\times$ Probe qPCR Mix                           | 550 $\mu$ l |
| DEPC-H <sub>2</sub> O                               | 1 ml        |
| 荧光模板稀释液   | 1 ml        |
| 人线粒体 DNA qPCR 引物-探针混合液                              | 260 $\mu$ l |
| 人线粒体 DNA qPCR 阳性对照<br>(1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L) | 50 $\mu$ l  |

## ✈️ 保存条件

低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保存期限为一年。阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。

## 使用方法

### 一、DNA 提取(样本制备区)

1. (选做) 如果有 N 个样品待提取, 最好设置 N+2 个提取, 多出的是 PC (样品制备阳性对照) 和 NC (样品制备阴性对照)。可以取阳性对照的 1000 倍稀释液 10 $\mu$ L 再加上一定量的水, 使总体积与待提取样品的规定体积一致, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。

2. 用自选方法提取纯化样品 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。建议使用病毒基因组 DNA 提取试剂盒 (Cat: GZ010701-50) 提取 DNA

### 二、稀释标准曲线样品(样本制备区)

(由于阳性对照浓度高, 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行, 避免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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L 荧光模板稀释液, (最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>8</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 拷贝/ $\mu$ L 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。  
若无需制作标准曲线, 将阳性对照稀释到 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 拷贝/ $\mu$ L 即可。

### 三、试剂配制(试剂准备区)

若有 N 个待检样品, 准备 N+2 个 qPCR 管(N 个待检样品+1 个阴性对照+6 个阳性对照), 向各 qPCR 管中分别加入下列成分。

| 成分                        | N 个待检样品管     | qPCR 阴性对照  | qPCR 阳性对照  |
|---------------------------|--------------|------------|------------|
| 2 $\times$ Probe qPCR Mix | 各 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L |
| 人线粒体DNAqPCR 引物-探针混合液      | 各 5 $\mu$ L  | 5 $\mu$ L  | 5 $\mu$ L  |

转移至样本准备区。

### 四、添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 5 ul 模板，顺序为阴性对照（DEPC-H<sub>2</sub>O）、待测样品模板、人线粒体 DNAqPCR 阳性对照，离心 30 秒，立即进行扩增反应。

## 五、扩增反应(扩增及产物分析区)

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置，进行扩增，扩增程序如下：

| 过程                  | 温度           | 时间     |
|---------------------|--------------|--------|
| 预变性                 | 95℃          | 3 min  |
| qPCR 反应<br>(45 个循环) | 95℃          | 15 sec |
|                     | 60℃          | 20 sec |
| 信号通道                | FAM 通道采集荧光信号 |        |

## 六、结果分析

1. 如果制作标准曲线，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，推算出其浓度。

2. 如果未制作标准曲线，按照如下标准判定结果：

阳性对照结果：Ct 值 < 30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果：Ct 值 > 38 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果：Ct 值 < 35，有明显指数增长，表明样本中检测出人线粒体 DNA，结果为阳性；Ct 值 > 38 或无 Ct 值，表明样本中未检测出人线粒体 DNA，结果为阴性；Ct 值在 38-45 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 38-45 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。