

Code No. 3788

研究用

TaKaRa

Transgene Detection Primer Set
for Real Time (Mouse)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	1
● 保 存	1
● 实验操作	1
● 使用例	2
● 附 录	3
● 关联产品	3

● 制品说明

转基因鼠中作为导入基因的报告基因 GFP (EGFP、AcGFP1) 和 lacZ 基因被广泛使用。通过 Real Time PCR 方法对报告基因进行检测，可以筛选导入基因个体。

本制品中还含有作为内参照使用的小鼠基因组 DNA 检测用的 Primer Mix (检测 Ywhaz 基因和 Raver2 基因)，使用 Primer Mix (检测 Ywhaz 基因和 Raver2 基因) 可以应用相对定量法对各种样品间导入的基因量进行比较。

● 制品内容 (100 次量*1)

包含以下 6 对引物

Primer 名称	浓度	包装量	扩增片段大小
1.GFP_primer-1*2	2 μ M each	500 μ l	127 bp
2.GFP_primer-2*3	2 μ M each	500 μ l	162 bp
3.lacZ_primer-1*4	2 μ M each	500 μ l	96 bp
4.lacZ_primer-2*4	2 μ M each	500 μ l	141 bp
5.Reference_primer-1*5	2 μ M each	500 μ l	115 bp
6.Reference_primer-2*6	2 μ M each	500 μ l	89 bp

- *1 使用 TB Green[®] *Premix ExTaq*[™] II 试剂配制 25 μ l 反应体系的使用次数。
- *2 GFP Primer-1 是在 EGFP 和 AcGFP1 相同序列区域设计的引物对 (Primer Mix)。
- *3 GFP Primer-2 是在 EGFP 特异区域设计的引物对 (Primer Mix)，不能检出 AcGFP1 基因。
- *4 lacZ primer-1, 2 是分别在 lacZ (β -galactosidase) 基因两个不同区域设计的引物对 (Primer Mix)。
- *5 Reference_primer-1 是扩增小鼠第 15 号染色体上的 Ywhaz 基因一部分的引物对 (Primer Mix)。
- *6 Reference_primer-2 是扩增小鼠第 4 号染色体上的 Raver2 基因一部分的引物对 (Primer Mix)。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

Real Time PCR 试剂

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)

1.5 ml 微量离心管

微量移液器和枪头

Real Time PCR 仪

如 Thermal Cycler Dice[™] Real Time System // (Code No. TP900: 终卖) 等

● 保 存: -20℃。

● 实验操作

1. 基因组 DNA 的提取

以从老鼠尾部提取基因组 DNA 为例，为了实现 Real Time PCR 准确定量，建议使用高纯度的基因组 DNA，可使用 NucleoSpin Tissue 等柱纯化方法，也可以使用苯酚/氯仿抽提的方法纯化基因组 DNA。若只判定导入基因的有无，也可采用简易方法进行基因组 DNA 提取 (参见“附录”)。

2. Real Time PCR 反应

Primer Mix 以外试剂配成混合液后分装到各 Tube 中，最后加入各 Primer Mix。按照这个顺序进

行反应液配制，可以减小模板加入量的误差，得到稳定的实验结果。

【Real Time PCR 实验例】

试剂：TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)

Real Time PCR 仪：Thermal Cycler Dice Real Time System II (终卖)

- 1) 按如下成分配制 PCR 反应混合液。本制品中有 6 种 Primer Mix，当 6 种 Primer Mix 都使用时，除 Primer Mix 以外的其他试剂先配制成 7 份混合液，各取 20 μ l 分装后，分别加入各 Primer Mix 5 μ l。

试剂	1 个反应	7 个反应
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2X)	12.5 μ l	87.5 μ l
Primer Mix (2 μ M each)	5.0 μ l	-
基因组 DNA*	2.0 μ l	14.0 μ l
灭菌水	5.5 μ l	38.5 μ l
Total	25 μ l	

*：如果基因组 DNA 加入量过多，嵌合试剂的荧光背景会很高，这时可以将基因组 DNA 稀释 10 倍或者减少为 10–20 ng。

- 2) Real Time PCR 反应

95°C 1 min 预变性
95°C 5 sec
60°C 30 sec
} 40 Cycles
融解曲线分析

注意：PCR 反应条件请按照 TB Green *Premix Ex Taq* II 的标准条件进行设定。预变性时间请设定为 1 min。

● 使用例

以小鼠基因组 DNA 为模板，通过 Real Time PCR 方法对纯合体和杂合体基因型进行判定。

从导入 1 copy 的 EGFP 基因及 lacZ 基因的转基因小鼠尾部材料*中提取基因组 DNA，通过 Real Time PCR 方法进行两个基因的检测。

注意：小鼠尾是自然科学研究机构池中先生和竹林先生提供的。

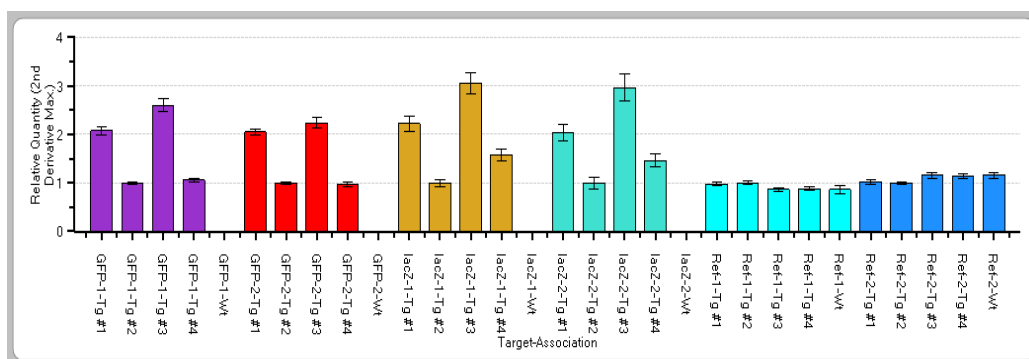
本实验用 5 种样品根据小鼠交配方式判定 Tg#1、Tg#3 为纯合体，Tg#2、Tg#4 为杂合体，Wt 是没有导入 EGFP、lacZ 基因的小鼠。

【方法】

使用 NucleoSpin Tissue 从小鼠尾部提取基因组 DNA。取 1 μ l 作为 Real Time PCR 反应的模板。使用本制品的 Primer 和 TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) 进行 Real Time PCR 反应。以两种基因作为内参，对相对表达量进行解析。

【结果】

使用 $\Delta\Delta$ Ct 方法将 Real Time PCR 反应结果进行相对量解析。4 种样品中，样品 Tg#1、Tg#3 的 EGFP 基因和 lacZ 基因表达量是样品 Tg#2、Tg#4 的 2 倍。但 Wt 没有检出 lacZ 基因和 EGFP 基因，这个结果与基因型一致。



● 附录

简化的碱性热提取法制备基因组 DNA

1. 将小鼠尾部切段，长度约 2–3 mm，放入 1.5 ml 的螺帽管中。
2. 加入 100 μ l 的 NaOH 溶液 (0.025 N NaOH, 2 mM EDTA)。
3. 100°C 反应 20–30 分钟。
4. 简单离心，加入 100 μ l 的 40 mM Tris-HCl (pH7.5–8.0) 后立即盖上管盖。
5. 涡旋混匀。
6. 离心 30 秒钟，取 0.5–1.0 μ l 上清液作为 Real Time PCR 模板。

● 关联产品

NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250)

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)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

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>