

# 人线粒体DNA定量(qPCR法)试剂盒

## Human Mitochondrial (mtDNA) qPCR Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

### 货号规格/Catalog Number and Size

序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP011 (25T)	IEP011M (50T)	IEP011L (100T)	
01	质粒标准品	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	-20°C
02	样本稀释液	2.5 mL	5 mL	10 mL	-20°C
03	SYBR qPCR Mix	0.25 mL	0.5 mL	1 mL	-20°C
04	mt-ND4 FPrimer	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-20°C
05	mt-ND4 R Primer	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-20°C
06	AIB1 FPrimer	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-20°C
07	AIB1 R Primer	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-20°C

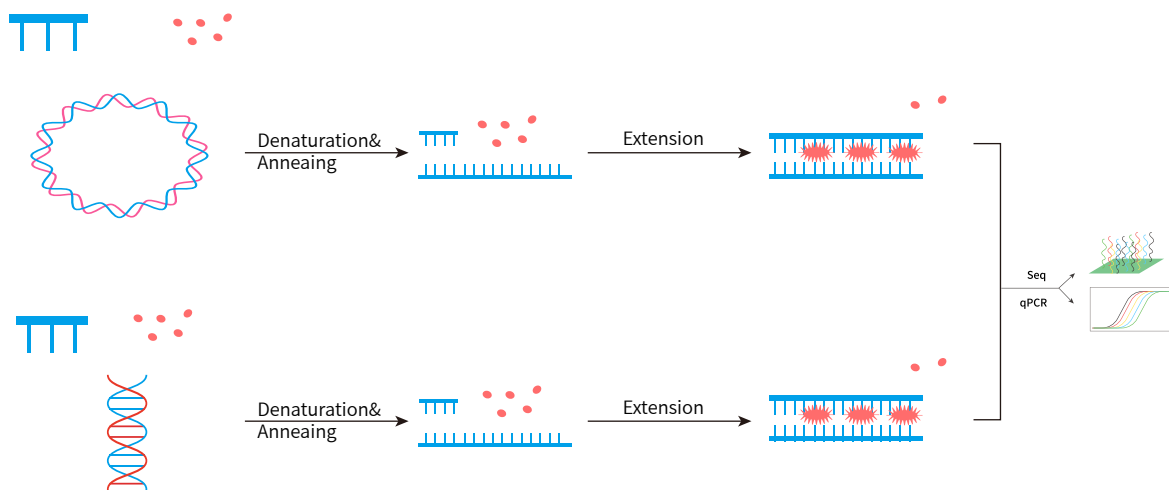
### 产品简介/Product Description

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 是线粒体内独立于细胞核存在的、具有闭合环状结构的双链 DNA 分子。线粒体基因组为多拷贝基因组, mtDNA 的数量(拷贝数)和质量与线粒体功能密切相关。研究表明, mtDNA 拷贝数变异引起线粒体功能紊乱, 进而导致疾病发生。

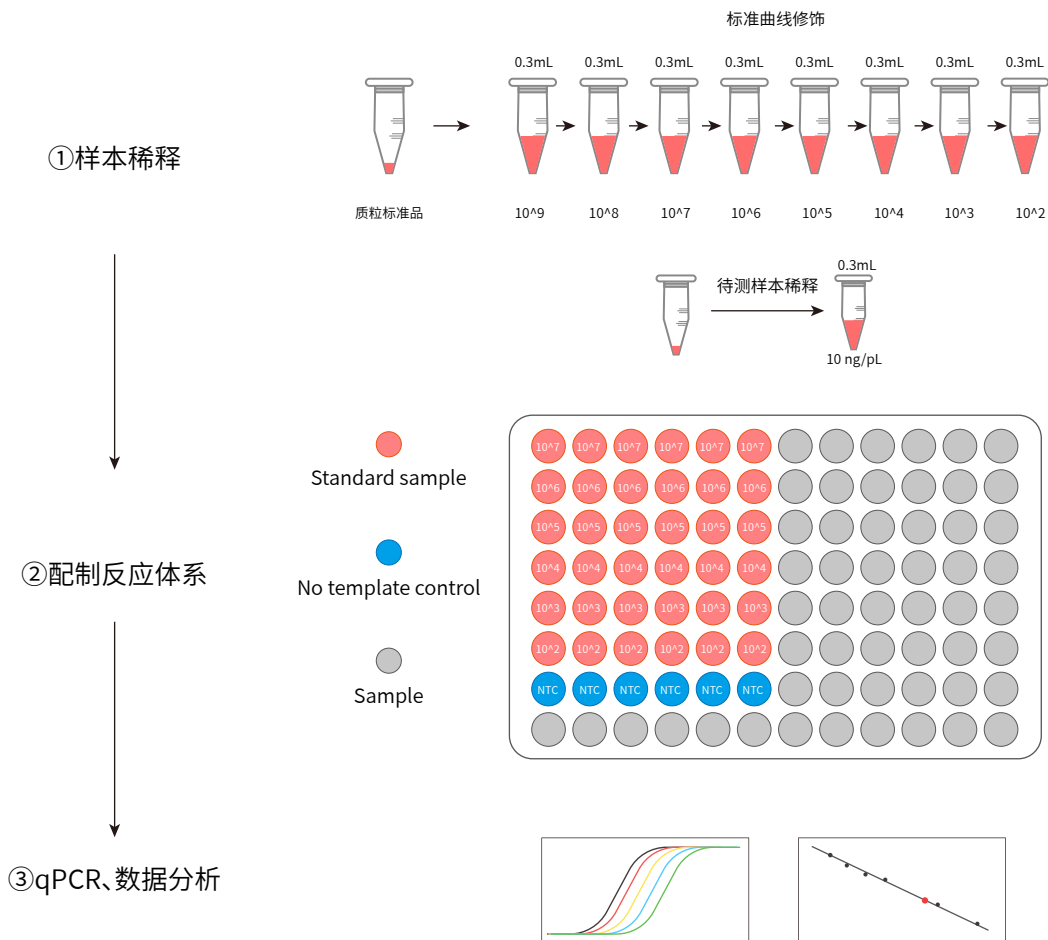
本试剂盒采用 qPCR 方法特异性扩增样本 mtDNA 与核基因组 DNA, 通过建立标准曲线, 对线粒体拷贝数进行定量。

# 技术路线/Technology mapping

## 1. 原理流程图



## 2. 实验流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 标准品稀释 (选做)

①取质粒标准品，冰上充分溶解后震荡 30 s 充分混匀，记为 0 号管，并按下表进行梯度稀释；

管号	稀释倍数	拷贝数	梯度稀释
1	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^9$	30 $\mu$ L 0号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
2	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^8$	30 $\mu$ L 1号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
3	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^7$	30 $\mu$ L 2号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
4	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	30 $\mu$ L 3号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
5	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	30 $\mu$ L 4号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
6	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^4$	30 $\mu$ L 5号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
7	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^3$	30 $\mu$ L 6号管+270 $\mu$ L 样本稀释液
8	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^2$	30 $\mu$ L 7号管+270 $\mu$ L 样本稀释液

②稀释完成后，取 3~8 号管作为标准曲线检测管。

注意：

1. 如选择不自行绘制标曲，则标注 (选做) 的步骤可不做，后续使用试剂盒自带的标准曲线进行拷贝数计算；
2. 标准曲线检测范围：100~ $1 \times 10^7$  Copies/ $\mu$ L；
3. 实验过程使用无 RNase DNase 的离心管和枪头；
4. 每一管标准品溶液稀释完成后，都应充分震荡混匀再进行下一次稀释；
5. 以上操作应在冰上进行，标准品溶液  $-20^\circ\text{C}$  保存。

### 2. 样本准备

①取待测样本，冰上充分溶解后，加入样本稀释液至终浓度为 10 ng/ $\mu$ L；

注意：以上操作应在冰上进行。

### 3. Taqman probe qPCR 反应

①配制 qPCR 反应体系：12.5  $\mu$ L SYBR qPCR Mix (2 $\times$ )、1  $\mu$ L mt-ND4 F Primer (10  $\mu$ M)、1  $\mu$ L mt-ND4 R Primer (10  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ L mt-ND4 Probe (20  $\mu$ M)、1  $\mu$ L AIB1 F Primer (10  $\mu$ M)、1  $\mu$ L AIB1 R Primer (10  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ L AIB1 Probe (20  $\mu$ M)、2  $\mu$ L DNA 模板、ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25  $\mu$ L；

注意：如待测样本 n 个，则所需总反应孔数为标准曲线 18 个 (选做) + 样本 (n $\times$ 3) 个 + NTC3 个；根据实验需求配制好大体系后，一次性分装至各反应孔。如选择不自行绘制标曲，则标准曲线反应孔可不配制。

②qPCR 程序设置：25 $^\circ\text{C}$  预处理 10 min；95 $^\circ\text{C}$  预变性 30 s；40 个循环：95 $^\circ\text{C}$  变性 5 s、55 $^\circ\text{C}$  退火 30 s (采集 FAM、VIC 荧光信号)。

注意：

1. qPCR 反应一般设 3 个重复孔；
2. 每对引物均需要设置对应的标准曲线 (选做) 和以 ddH<sub>2</sub>O 为模板的 NTC 阴性对照；
3. 为保证结果有效性，每次实验应重新配制标准曲线 qPCR 反应体系；
4. 为避免体积误差，在配制大体系时应多预 2 个孔；
5. 以上操作应在冰上进行，标准品溶液、Mix、引物、探针和样本溶液  $-20^\circ\text{C}$  保存。

#### 4. 结果分析

①绘制标准曲线：以  $\log_2$  拷贝数为 x 轴，以平均 Ct 值为纵轴，分别绘制 mt-ND4 与 AIB1 的标准曲线；

②拷贝数计算：将待测样本 mt-ND4 与 AIB1 的平均 Ct 值分别代入相应的标准曲线，得出各自拷贝数；

根据公式：绝对拷贝数 = mt-ND4 拷贝数 / AIB1 拷贝数，得出待测样本中单个细胞线粒体的拷贝数。

注意：标准曲线 mt-ND4:  $y = -0.9035x + 36.652$ ,  $R^2 = 0.9988$

AIB1:  $y = -0.9315x + 37.021$ ,  $R^2 = 0.9987$

#### 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

