# 小鼠 MAPKKK 基因 qPCR 检测试剂盒说明书

产品规格：100T
储存条件：避光，-20 ℃。
有 效 期：2 年。

## 一、产品简介

1、产品用途：本试剂盒用于检测单基因相对表达量。
2、产品特点：本试剂盒中的高特异性 qPCR 引物，其熔解曲线为特异性单峰。本试剂盒提供特别优化的反应体系和扩增条件，能够提供极佳的检测特异性和扩增效率，检测范围宽，同时适用于高拷贝及低拷贝基因的检测。

## 二、试剂盒组成

1、PCR 组分

| Component | Volume |
|---|---|
| 2×SYBR Green Premix *EX-Taq* | 1 ml |
| Primer Mix | 100 µl |
| $ddH_2O$ | 1 ml |

## 三、特别优化的反应体系与条件

1、qPCR 反应体系：推荐使用 20 µL

| Component | Volume |
|---|---|
| 2×SYBR Green Premix *EX-Taq* | 10 µl |
| Primer Mix | 1 µl |
| $ddH_2O$ | 7 µl |
| cDNA | 2 µl |
| Total Volume | 20 µl |

2、QPCR 反应条件：推荐使用两步法

| QPCR stage | Temperature | Times | Cycles |
|---|---|---|---|
| Preincubation | 94 ℃ | 30 s | 1 |
| Amplification[1*] | 94 ℃ | 5 s | 40 |
| | 61 ℃ [2*] | 35 s [3*] | |
| Melting | 98 ℃ | 10 s | 1 |
| | 65 ℃ | 60 s | |
| | 98 ℃ | 1 s | |

1* 为保证 PCR 检测的特异性，本产品推荐使用 2 步法扩增。

23* 退火延伸的温度和时间是本试剂盒根据特异性设计靶基因引物的特性，经过优化而设定的，请勿随意更改。

## 四、注意事项

1、逆转录过程尽量避免 RNase 污染，所有使用的离心管及吸头都应为 RNase-free。

2、尽可能使用高质量的 RNA 模板（强烈建议 RNA 提取及逆转录过程中使用含有 gDNA 去除的试剂盒及逆转录试剂），为了提高后期检测质量，逆转录 RNA 用量尽量不低于 500 ng，推荐 500 ng~1 μg。

3、cDNA 模板建议适当稀释后再进行 qPCR 检测（3-10 倍稀释）。

4、酶及各种引物尽可能避免反复冻融，融化后应彻底混匀后再吸取，使用时各组分全程冰盒上操作。

**常见问题：**

1、问：熔解曲线有杂峰？

答：可能原因有：RNA 提取质量不高，有基因组残留。在 RNA 提取及逆转录过程中没有去除基因组，建议使用本公司推荐的 RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒；检测样本中基因含量低；部分特殊基因需要在指定模型下检测等。

2、问：检测基因含量低？

答：可能原因有：参考内参基因的 CT 值，如果内参 CT 值偏大，则为样本制备有问题，需要重新制备样本。如果内参 CT 值正常，而靶基因检测 CT 值大，可能该样本中靶基因含量

就是低。也可能是部分特殊基因需要在指定模型下检测等。

3、问：能否改变 qPCR 反应条件？
答：如果检测出现 CT 值大，熔解曲线有杂峰等异常情况，可以尝试适当变更退火延伸温度及时间。正常情况不建议调整。