



# Human Genomic DNA

## 人基因组DNA

目录号：CW0565S (20  $\mu$ g)

保存条件：-20°C保存

### 产品内容

Component	CW0565S 20 $\mu$ g
Human Genomic DNA	20 $\mu$ g (200 ng/ $\mu$ L)

### 产品简介

该产品是从293T细胞中提取的高纯度的基因组DNA提取物，琼脂糖凝胶（0.7%）电泳检测显示该DNA提取物大小在15 Kb以上，且基本无降解，产品最终保存在TE Buffer中，可广泛应用于PCR、酶切、杂交、微阵列分析等分子生物学实验。

## 使用前准备及注意事项

长期保存建议置于 $-70^{\circ}\text{C}$ ，使用前应先从冰箱内取出，平衡至室温后离心再打开瓶盖使用。样品开封后，应尽快恢复密封状态。

## 使用方法（以qPCR实验为例）

### 1. 扩增模板准备

将待检测样品用TE (10 mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA) 稀释，稀释后浓度尽量在0.05-10 ng/ $\mu\text{L}$ 之间。 $4^{\circ}\text{C}$ 冰上放置备用。

2. 标准品稀释：按照下表，先将Human DNA Standard 1 (100ng/uL) 用TE按下表稀释出5个不同浓度的标准品。10 ng/ $\mu\text{L}$ 的DNA Standard 1 (Std. 1) 可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 稳定保存1个月；Std2-5只能当天使用，配好后暂时不用时应 $4^{\circ}\text{C}$ 或冰上放置。

标样	对应浓度 (ng/ $\mu\text{L}$ )	最小稀释体积 (单位: $\mu\text{L}$ )
Std.1	10	10 [100 ng/ $\mu\text{L}$ DNA Standard 1]+ 90 TE
Std.2	2.5	20 [Std. 1] +60 TE
Std.3	0.625	20 [Std. 2] +60 TE
Std.4	0.15625	20 [Std. 3] +60 TE
Std.5	0.0390625	20 [Std. 4] +60 TE

### 3. qPCR反应体系配制

配制前预先将所需要用到的冷冻保存的试剂完全融化并多次颠倒混匀，然后短暂离心后备用。20  $\mu\text{L}$ 的基础反应体系如下。

20  $\mu\text{L}$ 的基础反应体系如下：

试剂	20 $\mu\text{L}$ 反应体系
2 $\times$ qPCR Mix	10 $\mu\text{L}$
Primer Mix	X $\mu\text{L}$
Probe Mix	X $\mu\text{L}$
Template	4 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	补至20 $\mu\text{L}$

注意： High Rox机型：每50  $\mu\text{L}$ 反应体系加入1  $\mu\text{L}$  50 $\times$ High Rox；

Low Rox机型：每500  $\mu\text{L}$ 反应体系加入1  $\mu\text{L}$  50 $\times$ High Rox。

通常引物浓度以0.2  $\mu\text{M}$ 可以得到较好结果，可以在0.1-1.0  $\mu\text{M}$ 作为设定范围的参考。使用的探针浓度，与使用的荧光定量PCR仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。

根据需要配出足够量的反应体系混合物，反应体系配完并充分混匀后，按每孔16  $\mu\text{L}$ 体积加入反应孔中。然后将准备好的标准品及稀释好的样品加入对应反应孔，加入量为4  $\mu\text{L}$ /孔。空白对照管中加入TE，同样加入量为4  $\mu\text{L}$ /孔。

推荐使用20  $\mu\text{L}$ 反应，如需进行更小体系反应，将体系各组分等比减少即可。

#### 4. qPCR反应程序

以下举例为本公司GoldStar Probe Mixture产品反应条件为例，实际操作中应根据所用PCR产品模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

步骤	温度	时间	
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	} 55
退火/延伸	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	

## 数据分析

### 1. 标准曲线制作

参照数据处理Excel表绘制标准曲线。标准曲线相关系数R2应不低于0.98，以Ct值为纵坐标时，斜率应位于-3.1与-3.6之间，如标准曲线参数不合理，建议重复实验。