

小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)

产品编号	产品名称	包装
D8033S	小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)	50次
D8033M	小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)	200次

产品简介:

- 碧云天的小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法), 即Mouse Mitochondrial DNA Copy Number qPCR Kit with SYBR Green, 也称线粒体DNA拷贝数小鼠线粒体生物合成检测试剂盒(Mouse Mitochondrial Biogenesis Assay Kit by mtDNA Copy Number)、线粒体与细胞核DNA比例检测试剂盒(Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit), 是一种通过染料法qPCR (Quantitative PCR) 扩增线粒体与核基因DNA, 并快速、高效、灵敏地定量不同小鼠样品的线粒体DNA相对于核基因组DNA拷贝数, 从而用于评估线粒体生物合成、功能状态等的试剂盒。如果自行准备线粒体DNA标准品, 也可以对线粒体DNA进行绝对拷贝数检测。本产品为防污染型, 含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性结果或CT值偏低的情况。
- 小鼠线粒体DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA), 是一种单倍体双链环状DNA, 长度为16.5kb, 编码37个基因。线粒体的分裂对于细胞的正常功能有重要作用。每个细胞中的线粒体数量因线粒体的分裂和融合而发生变化, 通常较难对于线粒体数量直接进行定量, 线粒体DNA拷贝数(Mitochondrial DNA copy number, mtDNA-CN)可以相对精确进行定量, 并可以作为评价线粒体功能的生物标志物[1]。大量证据表明, mtDNA-CN的改变一方面和生理功能的变化有关, 另一方面也和各种与年龄相关的疾病, 如癌症、糖尿病和神经退行性疾病等密切相关。与核基因组DNA不同的是, mtDNA以多拷贝形式(例如100-10000个)存在, 具体数量取决于细胞类型[2]。定量PCR通常被认为是检测mtDNA-CN的金标准, 通过将线粒体DNA的拷贝数与核DNA的拷贝数进行比较, 以实现mtDNA-CN的相对定量[3]。如有必要也可以设置mtDNA的标准品, 以进行绝对定量。
- 本试剂盒提供了qPCR实验所需的预混液BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)和特异性引物, 预混液包含了BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、SYBR Green I荧光染料、稳定剂和镁离子等所有的通用组分。本试剂盒提供了两对引物, 一对是基于小鼠线粒体基因组DNA设计的引物(mtDNA Primer Mix); 一对是基于小鼠2号染色体上编码β-2微球蛋白(beta-2 microglobulin, B2M)的单拷贝基因(Single copy reference, SCR)而设计的核DNA引物(nDNA Primer Mix), 用于定量的均一化。每组引物均经过充分的筛选并验证, 特异性高, 通常不会出现非特异性扩增。
- 本试剂盒检测灵敏, 扩增效率高, 所用引物组检测2.5-40ng/μl范围内的基因组DNA样品时, 扩增效率可达94%-95%。不同浓度梯度的小鼠肝组织基因组DNA分别使用mtDNA Primer Mix和nDNA Primer Mix扩增, 并绘制标准曲线。结果显示两个标曲均呈现良好的线性关系, 表明本试剂盒具有稳定的扩增效果, 线粒体DNA拷贝数定量准确度高。使用本试剂盒分别使用mtDNA Primer Mix和nDNA Primer Mix的扩增曲线及标准曲线可参考图1。

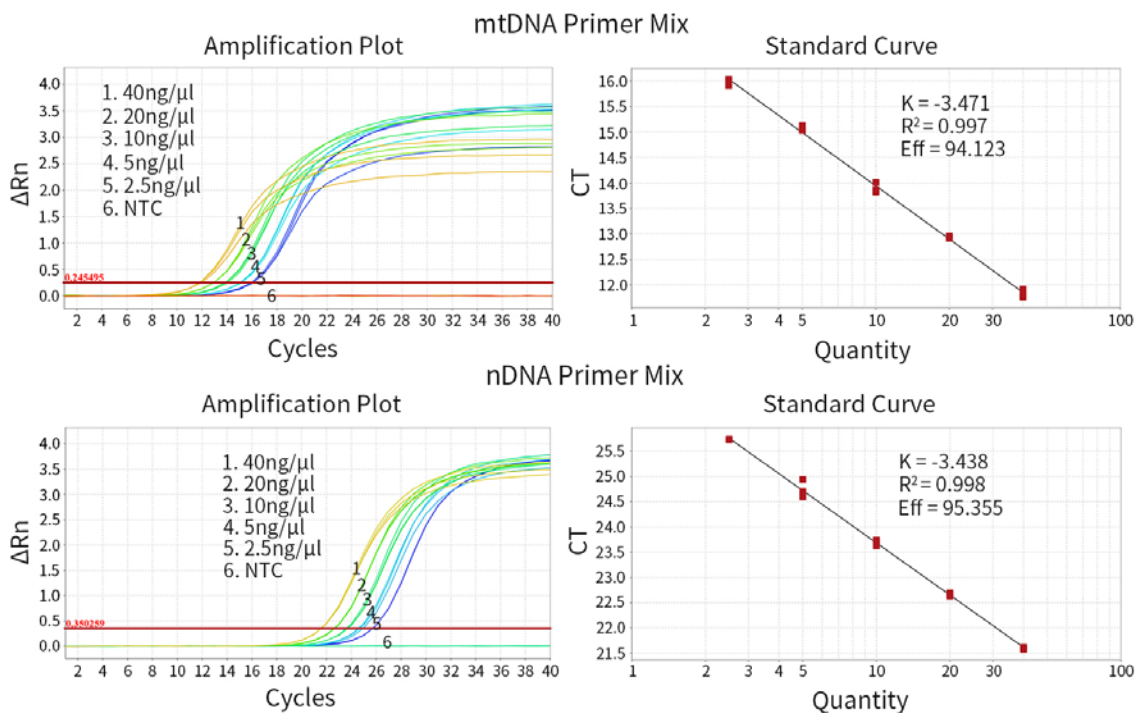


图1. 碧云天小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法) (D8033)分别使用mtDNA Primer Mix、nDNA Primer Mix对于不同浓度梯度的小鼠肝组织基因组DNA的扩增曲线及标准曲线。NTC, No Template Control。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供了Low ROX和High ROX，广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是校正与PCR无关的荧光波动，从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起，如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同，请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择添加高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX。常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500(Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT (Fast); ABI StepOne (Plus)

- 本试剂盒如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl)或384孔板qPCR检测(建议反应体系为10μl)，本产品小包装分别可以进行50次和100次检测，中包装分别可进行200次和400次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8033S-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	500μl
D8033S-2	mtDNA Primer Mix (20X)	50μl
D8033S-3	nDNA Primer Mix (20X)	50μl
D8033S-4	Ultrapure Water	400μl
D8033S-5	Low ROX (50X)	20μl
D8033S-6	High ROX (50X)	20μl
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D8033M-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	2ml
D8033M-2	mtDNA Primer Mix (20X)	200μl
D8033M-3	nDNA Primer Mix (20X)	200μl
D8033M-4	Ultrapure Water	1.5ml
D8033M-5	Low ROX (50X)	80μl
D8033M-6	High ROX (50X)	80μl
-	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)须避光保存，并尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 使用前请务必确保试剂完全融化，充分混匀后使用。混匀过程尽量避免产生气泡。
- BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)中含有荧光染料，保存本产品或设置PCR反应体系时应避免强光照射，以尽量避免荧光淬灭问题。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测，请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。虽然本产品为防污染型，但仍建议勿在PCR反应设置区域撕开PCR封板膜或打开PCR管盖，PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理，以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系，这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™ 无菌滤芯盒装吸头 (FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 如需进行线粒体DNA的绝对定量检测，需自备小鼠线粒体DNA标准品。小鼠线粒体DNA标准品可以使用纯化的小鼠线粒体提取。

- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂：

- 荧光定量PCR仪。
- DNase-free、RNase-free的吸头、离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜。

2. 样品准备：

选择合适的基因组DNA抽提试剂盒，用于提取细胞或组织的基因组DNA。推荐使用基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，离心柱式)(D0063)或BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，磁珠法)(D0088)，或推荐使用BeyoMag™磁珠法血液基因组DNA抽提试剂盒(D0091)用于血液样品基因组DNA的提取。

注：经提取后的样品须稀释至2.5-40ng/μl范围内任一浓度，并至少足够用于两个样品的检测。浓度过高或过低都可能会影响检测效果。

3. qPCR反应体系的设置：

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置qPCR反应体系(以96孔板，每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、标准品和无模板阴性对照(No Template Control, NTC)。对于每个待测样品，都需要准备2个反应体系，分别用于线粒体DNA引物(mtDNA Primer Mix)和核DNA引物(nDNA Primer Mix)的扩增。可使用Ultrapure Water作为阴性对照(NTC)。建议每次检测都设置NTC。

Reagent	Volume
BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, UDG)	10μl
mtDNA Primer Mix (20X) or nDNA Primer Mix (20X)*	1μl
Template	2μl
Without or Low/High ROX (50X)	0 or 0.4μl
Ultrapure Water	To 20μl

*注：对于线粒体DNA引物(mtDNA Primer Mix)反应体系，仅加入mtDNA Primer Mix (20X)；对于核DNA引物(nDNA Primer Mix)反应体系，仅加入nDNA Primer Mix (20X)。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。推荐BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm)(E6686)或BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式，2500rpm)(E6758)进行PCR管或板的短暂离心。
- 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。

4. qPCR反应程序：

本试剂盒建议采用如下的qPCR程序，本程序是以QuantStudio™ 6 Flex Systems荧光定量PCR仪为例：

- UDG酶处理：50°C 5分钟；
- 预变性：95°C 2分钟；
- 变性：95°C 15秒；
- 退火/延伸：55°C 15秒；
- 重复步骤c和d，总共40个循环；
- 熔解曲线分析(可选)：95°C 15秒，60°C 15秒，95°C 15秒；
- 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果。

5. 反应结果的定量判断：

- 无模板阴性对照(NTC)：线粒体DNA引物检测结果应为Undetermined或CT值≥38，核DNA引物检测结果应为Undetermined或CT值≥38。
- 根据线粒体DNA引物组(mtDNA)和核DNA引物对照组(nDNA)的扩增CT值的平均值计算样品的线粒体DNA相对拷贝数：
 - $\Delta CT(\text{mtDNA}) = CT(\text{mtDNA, Sample 2}) - CT(\text{mtDNA, Sample 1})$
 - $\Delta CT(\text{nDNA}) = CT(\text{nDNA, Sample 2}) - CT(\text{nDNA, Sample 1})$
 - $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{mtDNA}) - \Delta CT(\text{nDNA})$
 - 样品2相对于样品1的线粒体DNA相对拷贝数 = $2^{-\Delta\Delta CT}$

c. 计算示例：

使用本试剂盒检测2个小鼠肝组织基因组DNA样品的线粒体DNA相对拷贝数，对应的扩增CT值的平均值及根据步骤b计算所得的 ΔCT 及样品2相对于样品1的线粒体DNA相对拷贝数($2^{-\Delta\Delta CT}$)见下表。

结论：样品2的线粒体DNA平均拷贝数是样品1的1.39倍。

Sample	mtDNA	nDNA	$\Delta CT(\text{mtDNA})$	$\Delta CT(\text{nDNA})$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1	12.28	21.03	1.1	1.57	-0.47	1.39
2	13.38	22.60				

参考文献：

- Castellani CA, Longchamps RJ, Sun J, Guallar E, Arking DE. Mitochondrion. 2020. 53: 214-223.

2. Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, et al. Biol Reprod. 2010. 83(1): 52-62.
3. Ashar FN, Moes A, Moore AZ, Grove ML, Chaves PHM, et al. J Mol Med (Berl). 2015. 93(2): 177-186.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0063	基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 离心柱式)	50次
D8025	人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒	50/200次
D0088S	BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 磁珠法)	50次
D0091	BeyoMag™磁珠法血液基因组DNA抽提试剂盒	50/200/800次
D8033	小鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)	50/200次
D8036	人线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)	50/200次
D8039	大鼠线粒体DNA拷贝数qPCR检测试剂盒(染料法)	50/200次
D9501	BeyoNGS™人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina)	8/96次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20/100片/包装
FSF039	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20/100片/包装
FTIP631-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(0.5-10μl, 无色加长, 4.5cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP631-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(0.5-10μl, 无色加长, 4.5cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP635-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(1-200μl, 黄色加长, 5.6cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP635-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(1-200μl, 黄色加长, 5.6cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP638-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长, 10.2cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP638-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长, 10.2cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB335-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒
FTUB339-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
ST873-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR级, Sterile)	100ml
E6686	BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm)	1套
E6758	BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)	1套

Version 2025.10.11