



多药耐药基因 MDR1 mRNA 核酸扩增 (RT-PCR)

荧光检测试剂盒使用说明书

MDR1 mRNA RT-PCR Detection Kit

前言

多药耐药基因 MDR1 的表达产物 P 糖蛋白是一种 ATP 依赖型膜转运蛋白，它可以将药物及许多其他相关分子从细胞内排出，参与许多正常的生理活动。MDR1 基因在许多肿瘤细胞中均呈高表达，是导致肿瘤细胞对药物产生耐受的重要因素之一。

本试剂盒采用实时荧光定量 RT-PCR 技术，可以精确检测微量肿瘤组织、外周血及其他组织和体液中细胞的 MDR1 表达，能够对肿瘤的治疗方案的确定、治疗效果的评价和预后提供帮助，并与其他与 MDR1 表达相关的科研工作提供有力的工具。

检测标本

外周血、骨髓、组织等

检测目标

胃癌、肝癌、肠癌、肺癌、脑胶质瘤、卵巢癌、白血病等各种肿瘤细胞的多药耐药性

试剂盒规格及组成

试剂盒规格 20 次/盒。

试剂盒组成

Trizol	12.5ml
75%酒精	5ml
RT 反应液	450 μ l
m-MLV 逆转录酶	25 μ l
RNasin	25 μ l
MDR1 PCR 反应液	1505 μ l
Taq 酶	70 μ l
DEPC-H ₂ O	500 μ l
阴性对照	20 μ l

阳性对照	20 μ l
标准品 (10 ⁹ copy/ml)	2 支
稀释液	500 μ l/支

自备试剂、材料

1.5ml Eppendorf 管、0.5 ml Eppendorf 管，10 μ l 、200 μ l 、1000 μ l 吸头（进口，无菌）、氯仿、异丙醇。（注意：所用的实验器材都要 DEPC 处理，做到无 RNA 酶污染）

建议： 鉴于荧光 PCR 反应的灵敏度要求，请使用本公司推荐的相应耗材。

标本的采集、处理和保存

本试剂盒上适用于外周血有核细胞检测。

静脉血 5ml（肝素抗凝）*，用淋巴细胞分离液分离有核细胞，将有核细胞收集到 1.5ml 管中（进口，无菌），1,5000rpm 离心 5min，弃上清，在沉淀中加入 Trizol 500 μ l（请参照 Trizol 的使用说明书）混匀置室温 10 分钟，加入氯仿 100 μ l 混匀，4 ^oC 10000rpm 10 分钟，吸取上层水相于 1.5ml 管中，并加入 3 倍体积的异丙醇（预冷）混匀，置冰上 20 分钟，离心 15000rpm 15 分钟（沉淀 RNA）。弃上清液，用 75%酒精 200 μ l 漂洗一次，快速离心吸干液体（注意保留沉淀的 RNA），气干后加入无菌 DEPC 水 20 μ l 溶解 RNA，按后续实验步骤操作。如隔天进行后续实验可使 RNA 沉淀保存在酒精中，暂存 -20^oC。

*建议使用负压针筒抽血，**取第二管血进行检测**，以防止表皮细胞掺入。

检测所需仪器设备

定量 PCR 仪 PE7700、PE5700、FTC2000、低温离心机、微量移液器、恒温水浴箱。

试剂盒使用方法

- * 每次检测应设立阳性和阴性对照。
- * 阳性对照为酒精沉淀的 RNA，使用时在 4^oC 15000rpm 离心 15 分钟。弃上清液，气干后加入无菌 DEPC 水 20 μ l 溶解 RNA，然后直接进行后续 RT 反应和 PCR 扩增。
- * 4 根 DNA 标准品管的浓度分别是 4 \times 10⁸copy/ml, 4 \times 10⁷copy/ml, 4 \times 10⁶copy/ml, 4 \times 10⁵copy/ml。

1. 逆转录反应：

- (1) 标本处理后的 RNA 70 ^oC 预变性 5 分钟，迅速置于冰浴以防 RNA 复性。
- (2) 按每个反应取 RT 反应液 18 μ l、M-MLV 逆转录酶 1 μ l、RNasin 1 μ l 计算加于一总的无菌

离心管中，混匀。

建议：对于 N 个 RT 反应，应配制 N+1 倍体积的 RT 反应液，以确保分到每个反应管中有足够的体积。

(3) 用微量加样器在每个反应管中加入 20 μ l 上述反应液。

(4) 加入预变性的 RNA 5 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 分钟。

2. PCR 扩增：

(1) 按每个反应取 PCR 反应液 43 μ l、Taq 酶 2 μ l 计算加于一总的无菌离心管中，混匀。

建议：对于 N 个 PCR 反应，应配制 N+1 倍体积的 RT 反应液，以确保分到每个反应管中有足够的体积。

(2) 用微量加样器在每个反应管中加入 45 μ l 上述反应液。

(3) 加入 RT 反应产物 5 μ l，按如下条件进行扩增。(同法加入标准品，阳性和阴性对照)

预变性	95 $^{\circ}$ C	5 分钟
	{ 95 $^{\circ}$ C	30 秒 }
	{ 62 $^{\circ}$ C	30 秒 } 35 个循环
	{ 72 $^{\circ}$ C	30 秒 }
延伸	72 $^{\circ}$ C	10 分钟
	4 $^{\circ}$ C	保存

如使用 PE7700 荧光仪，可采用 95 $^{\circ}$ C 5 分钟，然后 95 $^{\circ}$ C 30 秒，62 $^{\circ}$ C 20 秒，72 $^{\circ}$ C 20 秒进行 35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 10 分钟，4 $^{\circ}$ C 保存。

44) 根据所获得的标准曲线，得到各检测标

本的浓度(基因拷贝数/ml)。

实验结果判断

1. 基线设定：以 PE7700 为例，基线一般以 3-10 个循环的平均荧光信号为基线再分析 CT 值。基线设定的原则以刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点。

2. 阈值设定：曲线高于阴性对照 (Ct=35 选择拐点)，标准曲线线性相关性 ≥ 0.97 。

3. Ct < 35 的样品，按照标准曲线计算浓度。Ct = 35 的样品定为阴性。

注意事项

1. 在实验前应仔细阅读此说明书。
2. 实验操作的各个阶段应在不同的实验室或在实验室相对隔离的不同区域内进行，一般分为试剂准备区，样品处理区，PCR 反应及产物检测区。
3. 试剂准备和样品处理应在超净工作台中进行。
4. 实验操作的各阶段应使用专用的仪器和设备，以防止污染。
5. 标本采集用品，实验操作所需的消耗用品应一次性使用，使用前进行无菌处理。
6. 实验操作过程中应穿工作服，戴一次性塑料薄膜手套。
7. 请在本试剂盒有效期内使用。

储存

请按试剂盒中的标签说明将PCR反应试剂存于-20 °C保存，尽量减少反复冻融。

有效期

按照注明的温度存放，保质期为六个月。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

