

扫一扫



感谢关注获取更多精彩

安徽省合肥市黄山路602号
0551-63822150
+8618949874361
zhienbiology@126.com
QQ : 2452679220

附录

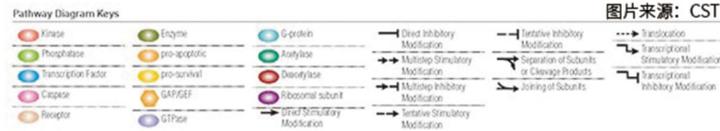
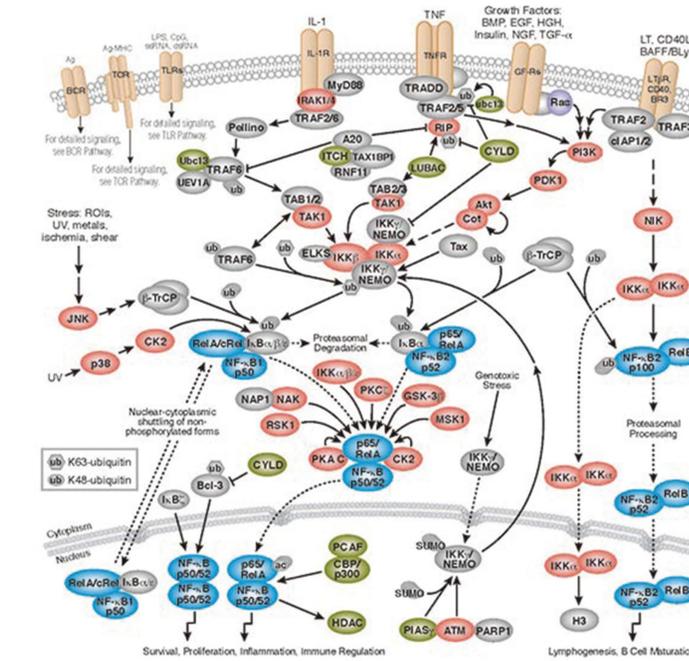
1.NF-κB信号通路描述：

核因子-κB (NF-κB)/Rel 蛋白包括 NF-κB2 p52/p100、NF-κB1 p50/p105、c-Rel、RelA/p65 和 RelB。这些蛋白起到二聚化转录因子的作用，可调节基因表达，并可影响到各种不同的生物学过程，包括先天和适应性免疫、炎症、应激反应、B 细胞发育和淋巴器官形成。在经典（典型）信号通路中，NF-κB/Rel 蛋白与 IκB 蛋白结合并受到其抑制。促炎细胞因子、脂多糖 (LPS)、生长因子以及抗原受体激活一个 IKK 复合体 (IKKβ、IKKα 和 NEMO)，后者将 IκB 蛋白磷酸化。IκB 磷酸化导致其自身泛素化以及蛋白酶体降解，释放 NF-κB/Rel 复合体。活性 NF-κB/Rel 复合体进一步由翻译后修饰（磷酸化、乙酰化、糖基化）作用激活，并转运入胞核，在核内单独或联合其他转录因子，包括 AP-1、Ets 和 Stat，并共同诱导靶基因表达。在备选（或称为非经典）NF-κB 通路中，NF-κB2 p100/RelB 复合体在细胞浆中失活。信号转导通过受体的一个子集，包括 LTβR、CD40 和 BR3，激活激酶 NIK，而 NIK 反过来激活 IKKα 复合体，后者将 NF-κB2 p100 的 C 端残基磷酸化。NF-κB2 p100 的磷酸化导致其自身泛素化，并且蛋白酶体加工为 NF-κB2 p52。这样可产生具备转录能力的 NF-κB p52/RelB 复合体，并转运入胞核，再诱导目的基因表达。在此仅展示 NF-κB 一部分的激动剂的和靶标基因。

泛素化是指泛素分子在一系列特殊的酶作用下，将细胞内的蛋白质分类，从中选出靶蛋白分子，并对靶蛋白进行特异性修饰的过程。这些特殊的酶包括泛素激活酶，结合酶、连结酶和降解酶等。泛素化在蛋白质的定位、代谢、功能、调节和降解中都起着十分重要的作用。同时，它也参与了细胞周期、增殖、凋亡、分化、转移、基因表达、转录调节、信号传递、损伤修复、炎症免疫等几乎一切生命活动的调控。泛素化与肿瘤、心血管等疾病的发病密切相关。因此，作为近年来生物化学研究的一个重大成果，它已然成为研究、开发新药物的新靶点。

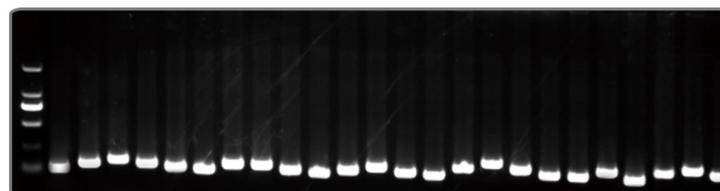
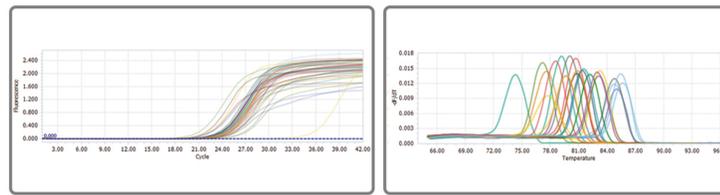
2.NF-κB Signal Pathway schematic diagram

NF-κB Signaling



图片来源: CST

3.Specific Analysis Of NF-κB Signal Pathway PCR Primers



All In One Signal Pathway Detection
SYBR Green Real Time RT-PCR Superkit 2.0
(Immunity and inflammation : NF-κB Pathway)

产品简介

1、产品用途：本试剂盒用于大鼠NF-κB信号通路相关研究。

2、本试剂盒包含第一链cDNA合成及逆转录后Real Time RT-PCR所需的各种酶、buffer和特异性引物等各种组分。

3、本产品以提取的总RNA为模板，特别添加了gDNA Remover，在合成第一链cDNA的同时去除RNA模板中基因组来源的DNA残留。逆转录后的cDNA经过稀释后即可使用本试剂盒中包含的2×SYBR Green Mix以及特异性设计的信号通路靶基因荧光定量PCR检测引物进行后续靶基因表达量检测分析。

4、产品特点：本试剂盒特点在于包含大鼠NF-κB信号通路所有靶基因检测的高特异性荧光定量PCR扩增引物及内参引物，所有引物扩增产物溶解曲线峰图为特异性单峰，电泳条带单一。

产品目录号：ZN-SP512

储存条件：避光，-20℃，保质2年。

本试剂盒提供经过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。

试剂盒组成

1、第一链cDNA合成组分

Component	ZN-SP512-01	ZN-SP512-02	ZN-SP512-05
Oligo dT Primer (0.5 μg/μL)	10 μL	20 μL	50 μL
Random Primer ₆ (0.5 μg/μL)	10 μL	20 μL	50 μL
2×ZN RT Reaction Mix	100 μL	200 μL	500 μL
Script RT/RI znzyme Mix	10 μL	20 μL	50 μL
gDNA Remove ^{1*}	10 μL	20 μL	50 μL
DNase/RNase free ddH ₂ O	250 μL	500 μL	2 mL

● 1* gDNA Remove特异性水解双链DNA，在逆转录的同时去除基因组DNA，但又不会水解cDNA中的单链DNA。

2、PCR组分

Component	ZN-SP512-01	ZN-SP512-02	ZN-SP512-05
2×SYBR Green Premix EX-Taq	2.5 mL	5 mL	12.5 mL
ROX Reference I (50×) ^{1*}	100 μL	200 μL	500 μL
ROX Reference II (50×) ^{23*}	100 μL	200 μL	500 μL
DNase/RNase free ddH ₂ O	2 mL	4 mL	10 mL

● 1* 为低浓度校正染料，适用于Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real Time PCR System ，Agilent MX3000/3005P。

● 2* 为高浓度校正染料，适用于Applied Biosystems 7000/7300/7700/7900/7900Fast/StepOnePlus Real-Time PCR System。

● 3*ROX Reference II浓度为I的50倍，以下机型不反应体系不需要添加ROX Thermal Cycler Dice Real Time System III (CodeNo.TP950/TP970/TP980/TP990) Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760) Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid) LightCycler96/480 System (Roche) CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad)
注：不需要添加ROX的机器，试剂盒中不提供该组分。

3、NF-κB 通路 specific primers

(本表尚未完全列出所有可检基因，实际可根据客户需求定制待测基因)

Primers List	ZN-SP512-01	ZN-SP512-02	ZN-SP512-05
IL-1R Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
MyD88 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
IRAK1/4 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
TAK1 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
TAB1/2 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
IKKα Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
IκBα Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
NF-κB1p50 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
MSK1 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
RSK1 Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL
GAPDH Primer Mix	30 μL	60 μL	150 μL

特别优化的反应体系与条件

1、逆转录第一链cDNA合成

Component	Volume	Comment
Total RNA/mRNA ^{1*}	2-7 μL (2~3μg)	50 ng-5 μg
Oligo dT or Random Primer 6(0.5 μg/μL) ^{2*}	1 μL	可二选一加入
2×ZN RT Reaction Mix	10 μL	
Script RT/RI znzyme Mix	1 μL	
gDNA Remove	1 μL	
DNase/RNase free ddH ₂ O ^{3*}	to 20 μL	根据RNA浓度调整
Total Volume	20 μL	

● 1* 推荐RNA逆转录量为2~3μg，该逆转录体系可对50 ng-5 μg宽泛范围内的总RNA进行高效逆转录。

● 2* Oligo dT or Random Primer₆可以任选一种加入，也可以根据实际情况2种组分均加入0.5~1 μL。

● 3* 调整DNase/RNase free ddH₂O的体积，使体系最终体积为20 μL。

将以上各组分混匀后，置于42 ℃水浴锅中孵育30 min，得到第一链cDNA，用DNase/RNase free ddH₂O适当稀释后（cDNA推荐3~10倍稀释），进行后续QPCR反应。

对于复杂模板RNA，建议先将模板RNA、逆转录引物、DNase/RNase free ddH₂O先混合（8 μL），65℃热激5 min，再置于冰上孵育3 min，离心后再加入剩余混合体系12 μL。

2、QPCR反应体系：推荐使用20 μL

Component	Volume	Comment
2×SYBR Green Premix EX-Taq	10 μL	
Primer Mix ^{1*}	1 μL	10 μmol/L F/R
cDNA	2 μL	
DNase/RNase free ddH ₂ O ^{2*}	7 μL	
Total Volume	20 μL	

● 1* Primer Mix为上游引物F和下游引物R的等体积混合物，浓度均为正常工作浓度10 μM。

● 2* 若使用机器需要添加ROX，则DNase/RNase free ddH₂O加入6.6 μL。

3、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*}	
	98 ℃	10 s	
Melting	65 ℃	60 s	1
	98 ℃	10 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。

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，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2~3 μg。

3、当逆转录样本量较多时，推荐先配制除RNA模板及DNase/RNase free ddH₂O以外的混样，然后再分装至各样本。

4、酶、buffer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。

声明

本产品仅用于科研，不用于临床诊断

投诉电话：0551-63822150

服务邮箱：zhienbiology@126.com