



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

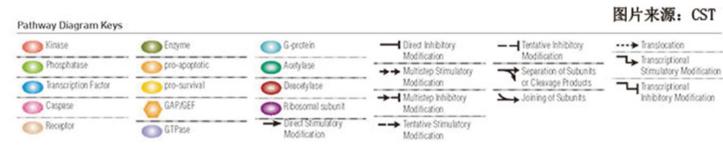
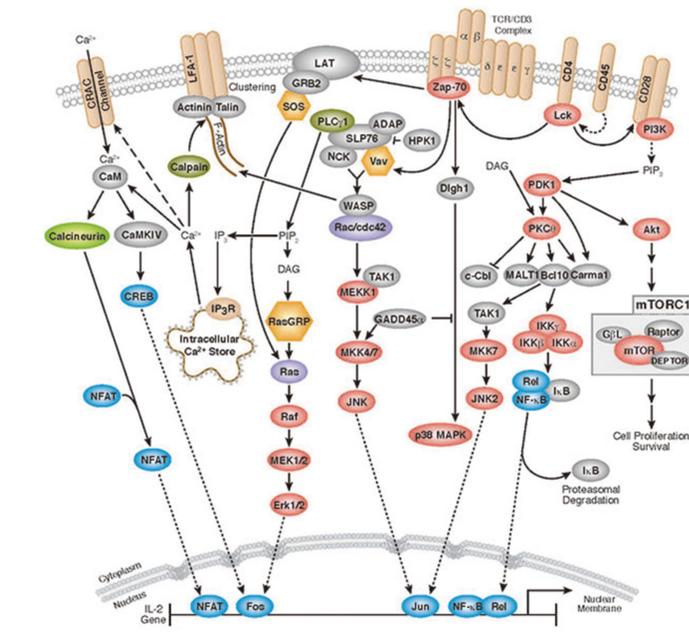
#### 1.TCR通路描述：

T 细胞受体 (TCR) 激活可促进许多信号转导级联反应，通过调控细胞因子产物、细胞生存、增殖和分化来最终决定细胞命运。TCR 激活的早期事件是由淋巴细胞蛋白质酪氨酸激酶 (Lck)，对 TCR/CD3 复合体胞质一侧的免疫受体酪氨酸依赖性活化基序 (ITAMs) 的磷酸化作用。

CD45 受体的酪氨酸磷酸酶可调节 Lck 和其他 Src 家族酪氨酸激酶的磷酸化和激活。Zeta 链相关蛋白激酶 (Zap-70) 受到招募，聚集至 TCR/CD3 复合体处并激活，从而启动对下游接头蛋白或骨架蛋白的招募和磷酸化。SLP-76 被 Zap-70 磷酸化后促进招募 Vav (一种鸟苷酸交换因子)、接头蛋白 NCK 和 GADS，以及一种可诱导 T 细胞激酶 (Itk)。磷脂酶 C  $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) 被 Itk 磷酸化后导致磷脂酰肌醇-4,5 二磷酸 (PIP2) 的水解，产生第二信使甘油二酯 (DAG) 和三磷酸肌醇 (IP3)。DAG 激活 PKC $\theta$  和 MAPK/Erk 通路，二者均可促进转录因子 NF- $\kappa$ B 活性。

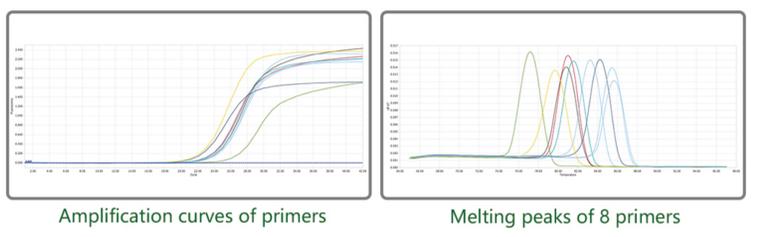
IP3 触发 Ca<sup>2+</sup> 从 ER 释放，并促使细胞外 Ca<sup>2+</sup> 通过钙离子释放活化 Ca<sup>2+</sup> (CRAC) 通道进入细胞。钙离子结合的钙调蛋白 (Ca<sup>2+</sup>/CaM) 激活钙调磷酸酶，后者通过转录因子 NFAT 促进 IL-2 的基因转录。取决于细胞类型和环境，这些通路中某些位点的反馈调节可得到不同结果。来自其他的细胞表面受体 (如 CD28 或 LFA-1) 信号的参与会进一步调控细胞反应。

#### 2.TCR Signal Pathway schematic diagram T Cell Receptor Signaling



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

#### 3.Specific Analysis Of TCR Signal Pathway PCR Primers



合肥知恩生物技术有限公司

## 产品简介

1、产品用途：本试剂盒用于大鼠T细胞受体信号通路相关研究。

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T细胞受体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，所有引物扩增产物熔解曲线峰图为特异性单峰，电泳条带单一。

产品目录号：ZN-SP515

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-SP515-01	ZN-SP515-02	ZN-SP515-05
Oligo dT Primer (0.5 µg/µL)	10 µL	20 µL	50 µL
Random Primer <sub>6</sub> (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 <sup>1*</sup>	10 µL	20 µL	50 µL
DNase/RNase free ddH <sub>2</sub> 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-SP515-01	ZN-SP515-02	ZN-SP515-05
2×SYBR Green Premix EX-Taq	2.5 mL	5 mL	12.5 mL
ROX Reference I ( 50× ) <sup>1*</sup>	100 µL	200 µL	500 µL
ROX Reference II ( 50× ) <sup>23*</sup>	100 µL	200 µL	500 µL
DNase/RNase free ddH <sub>2</sub> 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、T细胞受体信号通路 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-SP515-01	ZN-SP515-02	ZN-SP515-05
Lck Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
Zap-70 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
LAT Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
SLP76 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
NCK Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
Vav Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
CaM Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
IL-2 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 <sup>1*</sup>	2-7 µL ( 2~3µg )	50 ng-5 µg
Oligo dT or Random Primer 6(0.5 µg/µL) <sup>2*</sup>	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 <sub>2</sub> O <sup>3*</sup>	to 20 µL	根据RNA浓度调整
<b>Total Volume</b>	<b>20 µL</b>	

● 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 Primer<sub>6</sub>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 ddH<sub>2</sub>O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 °C水浴锅中孵育30 min，得到第一链cDNA，用DNase/RNase free ddH<sub>2</sub>O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 ddH<sub>2</sub>O先混合（8 µL），65°C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 <sup>1*</sup>	1 µL	10 µmol/L F/R
cDNA	2 µL	
DNase/RNase free ddH <sub>2</sub> O <sup>2*</sup>	7 µL	
<b>Total Volume</b>	<b>20 µL</b>	

● 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 ddH<sub>2</sub>O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 °C	30 s	1
Amplification <sup>1*</sup>	94 °C	5 s	40
	61 °C <sup>2*</sup>	35 s <sup>3*</sup>	
	98 °C	10 s	
Melting	65 °C	60 s	1
	98 °C	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 ddH<sub>2</sub>O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