



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. TLR通路描述 :

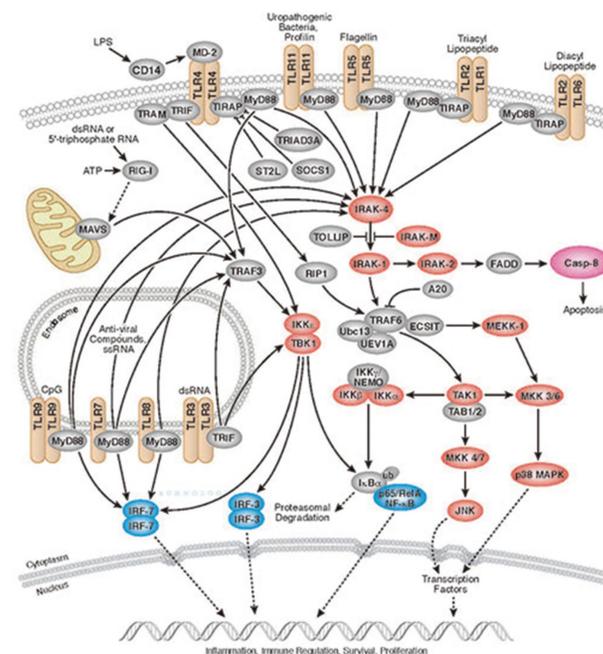
Toll 样受体 (TLRs) 可识别不同的病原体相关分子模式, 并在先天性免疫应答中扮演着不可或缺的角色。它们是抵御病原体入侵的第一道防线, 在炎症、免疫细胞调控、存活和增殖方面发挥着关键作用。

到目前为止, 已发现11个 TLR 家族成员, 其中 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR11 位于细胞表面, 而 TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 位于内体/溶酶体部分。TLR 信号转导通路的激活来源于细胞浆 Toll/IL-1 受体 (TIR) 的结构域, 该结构域与 TIR 结构域包含的接头蛋白 MyD88 发生相互作用。经过配体的刺激, 通过两个分子死亡结构域的相互作用, MyD88 将 IL-1 受体相关激酶-4 (IRAK-4) 吸引到 TLRs。IRAK-1 经磷酸化而激活并与 TRAF6 发生作用, 从而激活 IKK 复合体并导致 MAP 激酶和 NF-κB 的激活。Tollip 和 IRAK-M 均与 IRAK-1 相互作用, 并负性调节 TLR 介导的信号转导通路。调节这些通路的其他模式包括通过 RIP1 并依赖 TRIF 来诱导的 TRAF6 信号转导, 以及通过 ST2L、TRIAD3A 和 SOCS1 负性调控 TIRAP 介导的下游信号转导。

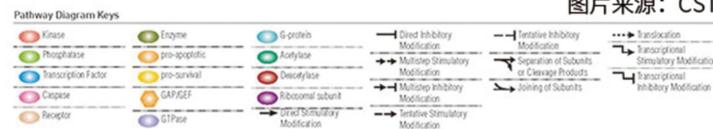
MyD88 非依赖通路通过 TRIF 和 TRAF3 激活, 导致IKKε/TBK1的募集, IRF3 磷酸化以及 β 干扰素的表达。TIR 结构域含有接头蛋白如 TIRAP、TRIF 和 TRAM, 此结构域可为单个 TLR 信号转导级联提供特异性, 从而调控 TLR 介导的信号转导通路。TRAF3 通过自身降解, 对依赖于 MyD88和依赖于TRIF 的信号转导调节具有非常重要的作用, 分别可激活依赖于 MyD88 的信号转导和抑制依赖于 TRIF 的信号转导 (反之亦然)。

#### 2. TLR Signal Pathway schematic diagram

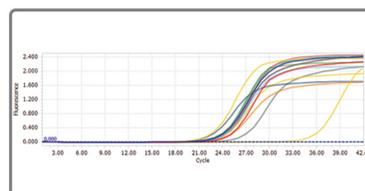
### Toll-like Receptor Signaling



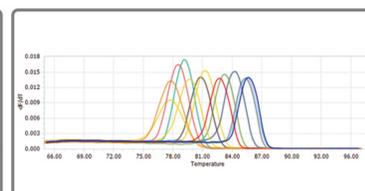
图片来源: CST



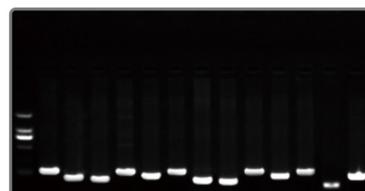
#### 3. Specific Analysis Of TLR Signal Pathway PCR Primers



Amplification curves of primers



Melting peaks of 12 primers



Agarose gel electrophoresis of PCR product

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

## 产品简介

1、产品用途：本试剂盒用于大鼠Toll 样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Toll样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，所有引物扩增产物溶解曲线峰图为特异性单峰，电泳条带单一。

产品目录号：ZN-SP513

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-SP513-01	ZN-SP513-02	ZN-SP513-05
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-SP513-01	ZN-SP513-02	ZN-SP513-05
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、Toll样受体号通路 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-SP513-01	ZN-SP513-02	ZN-SP513-05
TLR1 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
TLR2 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
TLR4 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
TLR5 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
TLR6 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
TLR11 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
MyD88 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
IRAK4 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
IRAK1 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
IκBα 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