



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.PI3K/Akt 信号通路描述：

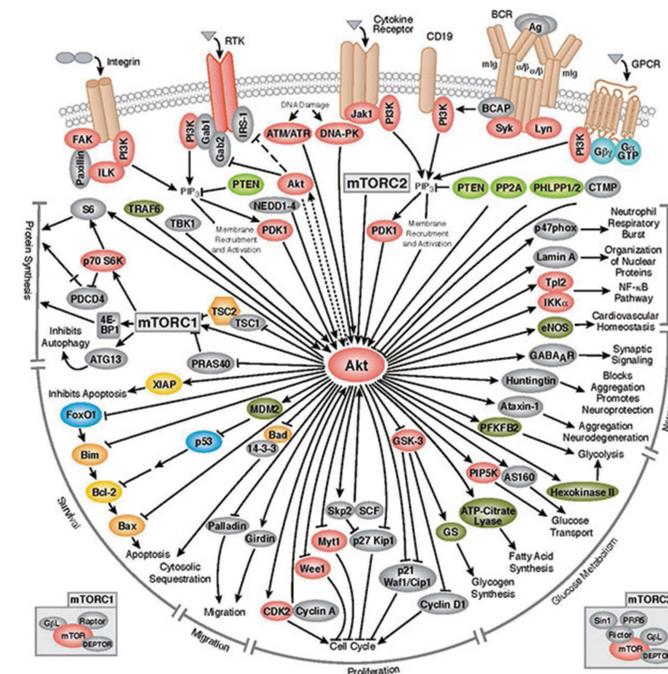
自首次发现以来，丝氨酸/苏氨酸激酶Akt作为一种原癌基因，已经成为医学界主要的关注热点，这是因为它在调控包括代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成等方面发挥重要作用。能够激活Akt信号级联放大的因子，包括受体酪氨酸激酶、整合素、B细胞和T细胞受体、细胞因子受体、G 蛋白偶联受体，以及其他能够通过磷脂酰肌醇三激酶 (PI3K) 诱发三磷酸 (3,4,5)磷脂酰肌醇 (PIP3) 生成的刺激。这些脂质可作为具有普列克底物蛋白同源性(PH) 结构域的蛋白质膜的停泊位点，其中包括 Akt 及其上游激活剂 PDK1。膜上的 PDK1 在 Akt 的苏氨酸 308 位点将其磷酸化，导致 Akt 的部分激活。丝氨酸 473 位点被 mTORC2 磷酸化，可激发 Akt 的完全的酶活性。PI3K 相关激酶 (PIKK) 家族成员，包括 DNA-PK，也同样能在 Akt 丝氨酸 473 位点将其磷酸化。Akt 可被蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 以及 PH-结构域富含亮氨酸-重复-包含蛋白磷酸酶 (PHLPP1/2)去磷酸化。

PI3K/Akt信号通路失调见于多种人类疾病，包括癌症、糖尿病、心血管疾病和神经疾病。在癌症中，已发现两处可增强PI3K内在激酶活性的突变。另外，人类肿瘤中PTEN常发生突变或缺失。Akt的活化突变也有报道。Akt 信号转导失调造成人类疾病的频率之高，导致PI3K和Akt的小分子抑制剂的积极开发达到顶峰。

存在三种高度关联的 Akt 亚型 (Akt1、Akt2 和 Akt3)，可以将含有共同磷酸化基序 RxRxxS/T 的底物磷酸化。Akt 各亚型可共享多种底物，但也已发现亚型特异性 Akt 底物。例如，所有Akt 各亚型都能够将 PRAS40 磷酸化，但只有 Akt1 能够磷酸化肌动蛋白相关的蛋白 palladin。

Akt 通过作用于 TSC1/TSC2复合体以及mTORC信号转导，进而调节细胞生长。Akt 通过磷酸化 CDK的抑制剂 p21和 p27进而影响细胞增殖。Akt 是细胞存活的主要调节因子，通过直接抑制促凋亡蛋白 (如 Bad) 或抑制由转录因子 (如 FoxO) 产生促凋亡信号实现调节。Akt通过激活 AS160 和PFKFB2，对调节代谢发挥重要作用。另外，已有证据显示，Akt可调节参与神经功能的多种蛋白，包括 GABA 受体、ataxin-1 和 huntingtin 蛋白。Akt 通过磷酸化 palladin 和 vimentin，参与细胞迁移和侵袭。Akt还可以通过磷酸化 IKKα和Tpl2，调节NF-κB信号转导。由于Akt/PKB 在调节各种细胞功能方面都扮演着重要角色，这使其成为人类疾病治疗的重要靶标。

2.PI3K/Akt Signal Pathway schematic diagram PI3 Kinase/Akt Signaling



Pathway Diagram Key

→ Direct Stimulatory Modification	→ Multistep Inhibitory Modification	→ Direct Inhibitory Modification	→ Tentative Stimulatory Modification
→ Direct Inhibitory Modification	→ Tentative Stimulatory Modification	→ Multistep Stimulatory Modification	→ Transcriptional Inhibitory Modification
→ Multistep Stimulatory Modification	→ Tentative Inhibitory Modification	→ Multistep Inhibitory Modification	

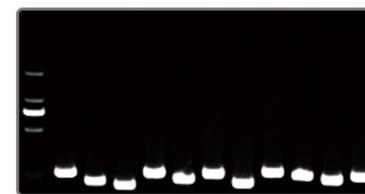
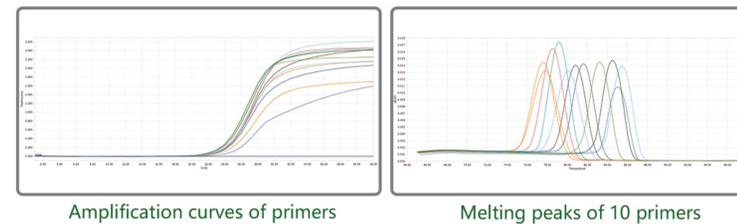
Legend: Kinase, Phosphatase, Transcription Factor, Receptor, pro-apoptotic, pro-survival, GAP/GEF, GTPase, G-protein, Acetylase, Deacetylase

图片来源: CST



All In One Signal Pathway Detection
SYBR Green Real Time RT-PCR Superkit 2.0
(Immunity and inflammation : PI3K/Akt Signal Pathway)

3.Specific Analysis Of PI3K/Akt Signal Pathway PCR Primers



Agarose gel electrophoresis of PCR product

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PI3K/Akt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PI3K/Akt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-SP519

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-SP519-01	ZN-SP519-02	ZN-SP519-05
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-SP519-01	ZN-SP519-02	ZN-SP519-05
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、PI3K/Akt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-SP519-01	ZN-SP519-02	ZN-SP519-05
PI3K Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
Akt Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
JAK1 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
PDK1 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
FoxO1 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
Bad Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
PTEN Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
PP2A Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
PHLPP1/2 Primer Mix	30 µL	60 µL	150 µL
IKKα 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 °C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°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 ^{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 °C	30 s	1
Amplification ^{1*}	94 °C 61 °C ^{2*}	5 s 35 s ^{3*}	40
Melting	98 °C 65 °C 98 °C	10 s 60 s 10 s	1

● 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