天净沙系列

CAT#:990504

低温运输，-20℃保存

天净沙

探针法 qRT-PCR 试剂盒

Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于荧光探针检测的即用型 RT-PCR 试剂盒，可以对靶 RNA 分子进行实时定量 RT-PCR 分析（quantitative RT-PCR、qRT-PCR）。产品含有经过优化的缓冲液组分、逆转录酶、热启动 Taq DNA 聚合酶、Taq DNA 稳定剂、dNTPs、$MgCl_2$ 和稳定剂等所有实时定量 RT-PCR 所需要的成分，用户只需加入 RNA 模板、引物和探针即可进行探针法实时定量 RT-PCR 反应，具有广泛的用途。本产品具有下列特点：

1. 以 2×Mix 提供，用户只需准备模板、引物、探针和 ROX 染料（取决于 qPCR 仪器）即可以进行探针法实时定量 RT-PCR 实验，非常方便快捷，降低了操作误差。
2. 各成分的浓度和比例都经过精心优化，反应的灵敏度高，特异性强。灵敏度最高时可以达到 50 拷贝/反应（跟模板质量，引物设计等相关）。
3. 既可用于 TaqMan 探针 qRT-PCR，也可以是分子信标（molecular beacon）的 qRT-PCR。
4. 灵敏度和专一性比染料法荧光定量 RT-PCR 更高。
5. 可用于基因表达分析、SNP 分析、拷贝数分析等实验。也可以用于定性检。
6. 本产品只能用于科研，足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成分	编号	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	1.5 mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	990504sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

RNA 模板、引物、TaqMan 探针、超纯水。

使用方法

一、如果有 N 个样品并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个是做标准曲线的阳性对照，一个是阴性对照（NC）。在 N+7 个 PCR 管中，加入下列成分。如果是做定性分析，则 6 个做标准曲线的样品缩减成一个阳性对照（PC），用户自己需要根据下表进行适当修改（把 6 个标曲反应改成 1 个阳性对照反应）。

成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL

探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	1 μL	1 μL	1 μL
自备引物 1（10 μM）	各 0.8 μL	各 0.8 μL	0.8 μL
自备引物 2（10 μM）	各 0.8 μL	各 0.8 μL	0.8 μL
自备探针（10 μM）	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 μL
N 个自备模板 RNA	各 1-2 μL	不加	不加
自备阳性对照模板（6 个梯度）	不加	各 1 μL (1 管加 1 个梯度)	不加
阴性对照模板（水）	不加	不加	1 μL
自备 50×ROX I 染料或自备 50×ROXII 染料（见注）	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 μL
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

注，下列信息仅供参考，具体以 qPCR 仪器的使用手册为准。

1、不需要 ROX 的机型:AgilentMX3000 和 MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、SmartCycler System、Thermal Cycler Dice RealTime System 等型号的荧光 PCR 仪器不需要加 ROX 染料，但加入的话也不会影响整个 PCR 分析

2、需要使用 ROXI 的机型:ABIPrism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。

3、需要使用 ROXII 的机型：ABIPrism7500、7500Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、CorbettRotorGene3000。

二、放入荧光 PCR 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考，一定需要根据靶分子长度，引物和探针的 Tm 值、标记染料的种类等进行调节。一般选择三步法 PCR：盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR:

两步法 RT-PCR 程序:

步骤	反应参数	备注
逆转录（RT 步骤）	50℃	10 min
预变性	94℃	2 min
PCR 反应（35-45 个循环）	94℃	15 sec
	60℃	45-60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA)

三步法 RT-PCR 程序:

步骤	反应参数	备注
逆转录（RT 步骤）	50℃	10 min
预变性	94℃	2 min
PCR 反应（35-45 个循环）	94℃	15 sec
	55-65℃	15 sec

	72℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

三、数据处理

1. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性。一般情况下，阴性对照 Ct 大于或等于 40（阈值需要以阴性对照的Ct值确定，此处为便于叙述以40为例，具体情况很可能阈值不一样）。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

关联产品	染料法 RT-PCR 试剂盒