天净沙系列

CAT#:17-001-y-v2

常温运输及保存

人 Y 染色体探针法 PCR 试剂盒 v2.0（含内参，干粉型）

Human Y Chromosome Probe PCR Kit v2.0

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

人 Y 染色体上 95%是男性特异区域，里面含和男性有关的基因。本产品就是以其中一个基因为靶分子，设计的探针法荧光定量 PCR 产品，专门用于检测样品中是否有人 Y 染色体存在，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 干粉型，可常温运输低温保存，而且最高样本加入量达到 15 μL，降低了漏检率。
3. 引物和探针经过优化升级，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
4. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
5. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性结果。
6. 特异性高，引物是根据人 Y 染色体 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
7. 只可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
8. 本产品足够 48 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用带 logo 热封塑料袋包装

成分	编号	规格	包装
PCR MasterMix 冻干微球	250804	8 次×6	密封八联排管
人 Y 染色体专一性 引物-探针干粉（含内参引物探针）	yp17-001-y-v2	48 T	0.5 mL 棕色管
人男性基因组 DNA 阳性对照干粉	220146	48 T	0.5 mL 黄盖管
人女性基因组 DNA 阴性对照干粉	220123	48 T	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	sc17-001-y-v2	1 份	1 份

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 150 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用；人男性基因组 DNA 阳性对照干粉和人女性基因组 DNA 阴性对照干粉在使用前也需要短暂离心，然后在离心管中分别加入 50 μL 超纯水充分混匀后得到人男性基因组 DNA 阳性对照溶液（1E3 拷贝/μL）和人女性基因组 DNA 阴性对照溶液（1E3 拷贝/μL）。以上未用完的溶液均需-20℃保存。

运输及保存

常温运输及保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 DNA，超纯水。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照，选用确定含 Y 染色体的样本），一个是 NC（样品制备阴性对照，选用确定不含 Y 染色体的样本）。

2. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提核酸释放剂。

二、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（本试剂盒提供的人女性基因组 DNA 阴性对照溶液），1 个用于 PCR 阳性对照（本试剂盒提供的人男性基因组 DNA 阳性对照溶液）。

4. 将装有 PCR 冻干微球的八连排管标注出 N+2 个作为样本管，标注 1 个作为扩增阴性对照管，1 个作为扩增阳性对照管：

成分	样品管 (N+2 个)	扩增阳性 对照管	扩增阴性 对照管
人 Y 染色体专一 qPCR 引物-探针混合液 （含内参引物探针）	各 3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测样品	15 μL	不加	不加
人男性基因组 DNA 阳性对照溶液 （1E3 拷贝/μL）	不加	15 μL	不加
人女性基因组 DNA 阴性对照溶液 （1E3 拷贝/μL）	不加	不加	15 μL

注：如果减少样本的用量，必须加入等量的超纯水使加入成份的总体积为 18 μL，在最后计算浓度时稀释度要相应改变。

5. 加入后轻柔吹打数次混匀，短暂离心 10 秒，盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	5 min
PCR 反应 （35 个循环）	95℃	15 sec
	54℃	15 sec
	72℃	15 sec（采集采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，MGB 为淬灭基团）

四、数据处理

6. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 35 的 PCR 反应结果判为阴性。有 Ct 读数，Ct 值小于 35，荧光信号有对数增长，有典型倒 S 型扩增曲线的 PCR 反应结果判为阳性。每个 PCR 反应管需要同时对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到对应靶分子和内参的两个结果。

7. PCR 实验有效性判断：如果样本制备阳性对照管或扩增阳性对照管 FAM 通道结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果样本制备阴性对照管或扩增阴性对照管 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数

	据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果上述阳性对照管和阴性对照管结果正常，则进入下一步。 8. 样本有效性判断：如果样本管 FAM 通道的结果为阳性，Cy5 通道结果是阴性，则样本的阳性结果有效。如果样本管 FAM 通道和 Cy5 通道的结果均为阳性，并且 FAM 通道的 Ct 值小于 Cy5 通道的 Ct 值，则样本的阳性结果有效。如果 FAM 通道的 Ct 值大于 Cy5 通道的 Ct 值，则样本的阳性结果无效。如果样本管 FAM 通道和 Cy5 通道的结果均为阴性，则此样品管的阴性结果无效。可能原因是样本丢失或有抑制剂，需要用其所对应的样品重新提取核酸和进行 PCR 扩增。 9. 本试剂盒用于定性检测，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 35 则均为阴性，如果小于 35 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
关联产品	人 Y 染色体可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒