天净沙系列

CAT#:250210

低温运输，-20℃保存

天净沙

一步法 qRT-PCR 试剂盒-探针法

One-Step qRT-PCR Probe Kit

使用手册 V0.5

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一步法 qRT-PCR 试剂盒，将反转录（RT）和 qPCR 两个步骤合并在一个反应管中，不同于两步法要进行两次加样和反应，本产品只需要一次加样就可以完成逆转录及 PCR 扩增。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
一步法探针 qRT-PCR 缓冲液	250210a	500 μL	1.5 mL 蓝盖管
一步法探针 qRT-PCR 酶混合液 v2	250210bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	250210sc	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、体系配制（20 μL 体系，在样品制备室进行）

1. 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
一步法探针 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL
一步法探针 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×ROX II 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。

2. 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
3. 需要使用 ROX I 的机型：ABIPrism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。
4. 需要使用 ROX II 的机型：ABIPrism7500、7500Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、CorbettRotorGene3000。

二、设置程序

5. 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	94℃	15 sec

（35-45 个循环）	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

6. 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