天净沙系列

CAT#:17-001-Y

低温运输，-20℃保存

天净沙

人 Y 染色体探针法 qPCR 试剂盒（含内参）

Human Y Chromosome Probe 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

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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 10 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于排除假阴性实验。
4. 能检测内源性内参基因（位于 X 染色体），便于排除假阴性样品。
5. 特异性高，引物是根据人 Y 染色体高度保守区设计，不会跟人的其他染色体的 DNA 发生交叉反应。
6. 可用于定性检测。
7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用 5 孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
人 Y 染色体专一性 引物-探针混合液（含内参）	yp17-001-Y	150 μL	0.5 mL 棕色管
人男性基因组 DNA 阳性对照 (1E3 拷贝/μL)	220146	50 μL	0.5 mL 黄盖管
人女性基因组 DNA 阴性对照 (1E3 拷贝/μL)	220123	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	sc17-001-Y	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 DNA。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 1E0-1E4 拷贝/μL 这 5 个 10 倍稀释度为例）。

1. 标记 4 个离心管，分别为 3，2，1，0。
2. 分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头（下同）。
3. 在 3 号管中加入 5 μL 1E4 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E3 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 2 号管中加入 5 μL 1E3 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E2 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 1 号管中加入 5 μL 1E2 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充

分震荡 1 分钟，得 1E1 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

6. 换枪头，在 0 号管中加入 5 μL 1E1 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E0 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

7. 上面的操作得到 0-3 号标准曲线样品，将试剂盒提供的人男性基因组 DNA 阳性对照(1E4 拷贝/μL)当成 4 号样品，共 5 个样品，放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 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）。

9. 用自选方法纯化样品 DNA，本产品跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行）

10. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+8 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 DNA 溶液），5 个用于标准曲线。如果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 DNA 溶液），1 个用于 PCR 阳性对照（本试剂盒提供的人男性 DNA 阳性对照）。下面只以定量分析为例。

11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (0-4 号管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
人 Y 染色体专一 qPCR 引物-探针混合液（含内参）	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (0-4 号)	不加	不加	各 7 μL（1 号样到 1 管，2 号样到 2 管…）

12. 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 (50 个循环)	95℃	15 sec
	54℃	15 sec
	72℃	15 sec（采集 FAM 和 Cy5 通道

		的荧光信号，MGB 为淬灭基团）

四、数据处理

13. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 45 的 PCR 反应结果判为阴性。有 Ct 读数，Ct 值小于 45，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。
14. 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。
15. 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。
16. 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95。内参 Cy5 通道读数的标准曲线将跟 FAM 的标准曲线平行。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算成浓度 X 拷贝/反应。
17. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 45 则均为阴性，如果小于 45 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	血浆直扩法人 Y 染色体探针法 qPCR 检测试剂盒（含内参）