天净沙系列

CAT#:240504-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

大肠杆菌专用 2×探针法 qRT-PCR MasterMix

2×Probe qRT-PCR MasterMix for *E.coli*

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

本产品是专门用于检测大肠杆菌基因的探针法 qRT-PCR Master Mix。目前大多数 Taq DNA 聚合酶都是从大肠杆菌中表达并提取，因此不可避免地污染有痕量的大肠杆菌基因组 DNA，在空白样本或模板浓度很低的样本中，大肠杆菌专一的引物和探针可能会识别 Taq DNA 聚合酶带来的痕量的大肠杆菌基因组 DNA，产生假阳性。为了克服此棘手问题，本公司开发了本产品，它具有下列特点：

1. 用特殊工艺除去了 Taq DNA 聚合酶中痕量大肠杆菌 DNA 污染，在扩增大肠杆菌样本时不会出现假阳性。
2. 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。
3. 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）。
4. 既可用于 TaqMan 探针 qRT-PCR，也可以是分子信标（molecμLar beacon）探针 qRT-PCR。
5. 灵敏度和专一性比染料法荧光定量 RT-PCR 更高。
6. 既可用于定性实验，也可以用于定量检测。用于定量时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 可用于基因表达分析、SNP 分析、拷贝数分析等实验。
8. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-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 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
大肠杆菌专用探针法 qRT-PCR 缓冲液	240504-2a	500 μL	1.5 mL 蓝盖管
大肠杆菌专用探针法 qRT-PCR 酶混合液	240504-2b	50 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	240504-2sc	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、Probe qRT-PCR 反应（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
大肠杆菌专用探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL
大肠杆菌专用探针法 qRT-PCR 酶混合液	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。

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 ROX I 的机型：ABIPrism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。

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

二、程序设置

2. 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

3. 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。
4. 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 40。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 40 则为阳性。

关联产品	染料法 RT-PCR 试剂盒