天净沙系列

CAT#:990103

低温运输，-20℃保存

天净沙

2×染料法 Tth qRT-PCR MasterMix

2× SYBR Tth qRT-PCR MasterMix

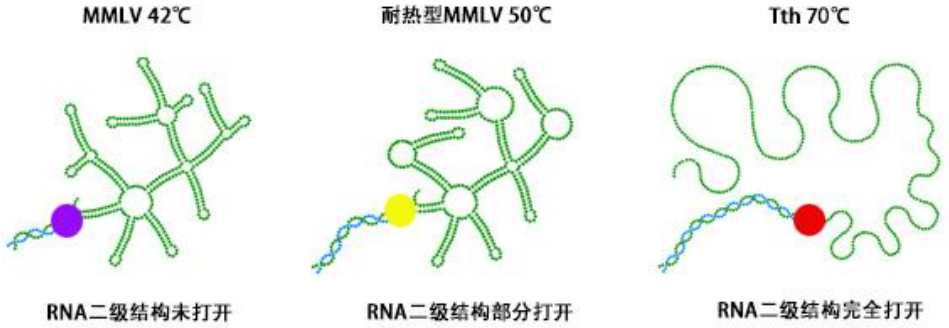
使用手册 V1.1

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 Tth DNA 聚合酶的荧光染料法 RT-PCR MasterMix，它含有经过优化的缓冲液组分、Tth DNA 聚合酶、dNTPs、SYBR Green I 等所有实时定量 RT-PCR 所需要的成分。与常用的基于 MMLV-Taq DNA 酶的 RT-PCR 体系相比，它们的区别如下：



本产品具有下列特点：

1. 方便，用户只需准备模板、引物即可以进行实时定量 RT-PCR 实验。
2. 产品为 2×预配液，操作步骤已经最大限度地简化，能减少污染，降低实验误差。
3. 60-70℃进行 RT-PCR，避免了 RNA 二级结构打不开问题和非特异扩增问题。
4. 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。
5. 本规格有 1 mL，足够 100 次 20 μL 体系的染料法荧光定量 RT-PCR。
6. 比进口同类产品性价比更高。
7. 本系列产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成分	编号	规格	包装
2×染料法 Tth qRT-PCR MasterMix 成份 1	990103a	1 mL	1.5 mL 棕色管
2×染料法 Tth qRT-PCR MasterMix 成份 2	990103b	0.1 mL	0.5 mL 绿盖管
使用手册	990103sc	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

RNA 模板、引物、超纯水。

使用方法

1. 按下表设置染料法 Tth RT-PCR 反应，以一个样本为例：

成分	样品管	阴性对照	阳性对照
2×染料法 Tth qRT-PCR MasterMix 成份 1	10 μL	10 μL	10 μL
2×染料法 Tth qRT-PCR MasterMix 成份 2	1 μL	1 μL	1 μL
自备引物 1（10 μM）	1 μL	1 μL	1 μL

自备引物 2（10 μM）	1 μL	1 μL	1 μL
自备模板 RNA（100 ng-1 μg）	1-2 μL	-	-
阳性对照 RNA 模板（100 ng-1 μg）	-	1-2 μL	-
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

2. 放入荧光 PCR 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考，一般需要根据靶分子长度，引物的 Tm 值等进行调节。一般选择三步法 PCR:

步骤	温度	时间
逆转录（RT 步骤）	50℃	2 min
	60-70℃	30 min（具体温度根据引物 Tm 决定）
预变性	95℃	3 min
PCR（35-45 次循环）	95℃	15 sec
	55-65℃	15-30 sec
	72℃	30 sec（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析	按 PCR 厂家建议进行	

如果引物 Tm 值接近 60℃，也可以选择两步法 PCR:

步骤	温度	时间
逆转录（RT 步骤）	50℃	2 min
	60-70℃	30 min（具体温度根据引物 Tm 决定）
预变性	95℃	3 min
PCR（35-45 次循环）	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析	按 PCR 厂家建议进行	

3. 定量分析数据处理: 根据溶解曲线分析剔除假阳性样本。如果样本经过溶解曲线分析，其数据有效，则进行定量分析。以 6 个 10 倍稀释的标准曲线样本的浓度的 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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。
4. 定性分析数据处理: 根据溶解曲线分析剔除假阳性样本。如果样本经过溶解曲线分析，其数据有效，则进行定型分析。阴性对照 Ct 大于或等于 40（此处为便于叙述姑且以 40 为例，具体设置成多少需要用户根据引物探针的具体情况测试确定）。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 40。

	对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40 则为阳性。
关联产品	探针法 Tth qRT-PCR 试剂盒