天净沙系列

CAT#:17-60140

低温运输，-20℃保存

天净沙

MS2 噬菌体探针法 qRT-PCR 试剂盒

MS2 Phage Probe qRT-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

本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的专门检测 MS2 噬菌体的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照和内参，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据 MS2 噬菌体 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
MS2 噬菌体 qRT-PCR 引物-探针干粉（含内参探针）	yp17-60140	50 次	0.5 mL 棕色管
MS2 噬菌体 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc60140-V00642	50 μL	0.5 mL 黄盖管
通用内参(1E4 拷贝/μL)	pd200	250 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	17-60140sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉(含内参探针)在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存

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 RNA。

使用方法

一、稀释含内参的标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 1E3 拷贝/μL 为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。

1. 标记 7 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1、0。
2. 在 0 号管中加入 280 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，35 μL 本试剂盒提供的内参，震荡一分钟混匀。内参的浓度为 1111 拷贝/μL。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45 μL/管加入到标记的 1-6 号管中，每管中

含内参 50000 拷贝。最好用带芯枪头（下同）。

4. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线 PC 样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品，每个样品中内参的浓度固定为 1E3 拷贝/μL，总拷贝数为 5E4。放冰上待用。

二、样品 RNA 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），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μL 第 6 步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样，以此作为 PC（共含 5E5 拷贝阳性对照和 5E4 拷贝内参）。另外用水作为 NC，但需要加入 5μL 本试剂盒提供的内参（共 5E4 拷贝），水和内参的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。
9. 用自选方法纯化样品的 RNA（含内参），本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 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+9 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），6 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
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	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
MS2 噬菌体 qRT-PCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测 RNA（含内参）	各 5 μL	不加	不加

超纯水	不加	5 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（含内参，1-6 号）	不加	不加	各 5 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR:

过程	温度	时间
逆转录	50℃	10 min
预变性	95℃	5 min
RT-PCR 反应（40 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	45 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

四、数据处理

13. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。
14. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 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。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 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。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。
15. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。
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为一条跟 X 轴平行的横线。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，再推算出其浓度。
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 40 则均为阴性，如果小于 40 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 MS2 噬菌体可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒