天净沙系列

CAT#:231220

低温运输，-20℃保存

天净沙

Tth DNA 聚合酶逆转录活性筛选试剂盒

Tth DNA Polymerase RT Activity Screening 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 Tth DNA 聚合酶逆转录活性筛选试剂盒，它利用 PCR 原理筛选 Tth DNA 聚合酶的逆转录活性。本产品具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 Tth DNA 聚合酶样品。
2. 操作步骤最大限度地简化，能减少污染，降低实验误差。
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。
4. 可以用于筛选 Tth DNA 聚合酶的逆转录活性（注：不能用于筛选其 RT-PCR 活性）。
5. 本产品足够 100 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
Tth 逆转录反应液成份 A	231220a	1 mL	1 mL 本色管
Tth 逆转录反应液成份 B	231220b	0.1 mL	0.5 mL 绿盖管
Tth 逆转录反应终止液	231220c	0.1 mL	0.5 mL 黄盖管
逆转录引物-模板混合物	231220d	50 T	0.5 mL 本色管
阳性对照（有 RT 活性的 Tth）	231220e	10 μL	0.5 mL 红盖管
PCR 引物-探针混合物	231220f	50 T	0.5 mL 本色管
2×探针法 qPCR MasterMix	231220g	1 mL	1.5 mL 红盖管
使用手册	231220sc	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

待测 Tth DNA 聚合酶，超纯水。

使用方法

一、样品制备

1. 用自选方式制备待测 Tth DNA 聚合酶样本，记录下其总体积 V mL 便于后续计算酶比活性。

二、Tth 逆转录反应（20 μL 体系）

2. 首次使用本试剂盒时，需要在装有模板-逆转录引物混合物的离心管中，加入 110 μL 超纯水。涡旋震荡 30 秒混匀，得模板-逆转录引物混合液。放冰上待用。由于模板为 RNA，故当次实验没有用完的，需要放-80℃保存。
3. 如果有 N 个待测样本，每个做一次重复，则需要标记 N+2 个反应管，其中 N 个管用于 N 个待测样本，多出的 2 个管分别用于阴性对照和阳性对照。按下表加入各成分：

成分	N 个样品管	阴性对照	阳性对照
Tth 逆转录反应液成份 A	各 10 μL	10 μL	10 μL

Tth 逆转录反应液成份 B	各 1 μL	1 μL	1 μL
模板-逆转录引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
超纯水	各 6 μL	7 μL	6 μL
N 个待测 Tth DNA 聚合酶	各 1 μL	不加	不加
阳性对照	不加	不加	1 μL

4. 盖上盖子后上机，65℃逆转录 30 分钟。

5. 各加入 Tth 逆转录反应终止液 1 μL，65℃ 30 分钟。

三、PCR 反应（50 μL 体系）

6. 首次使用本试剂盒时，需要在装有 PCR 引物-探针混合物的离心管中，加入 220 μL 超纯水。涡旋震荡 30 秒混匀，得 PCR 引物-探针混合液。放冰上待用。当次实验没有用完的，需要放-20℃保存。

7. 直接在每个管中加入 4 μL 上步所得 PCR 引物-探针混合液。

8. 上机按下表程序进行 PCR:

步骤	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR（35-45 次循环）	95℃	15 sec
	60℃	15 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号）

四、数据处理

1. 实验有效性判断：如果阳性对照有标准的倒 S 扩增曲线，Ct 值不超过 25；阴性对照无 Ct 值，或 Ct 超过 35，则实验有效，可以分析待测样本的数据。如果阳性对照没有有标准的倒 S 扩增曲线，Ct 值超过 25，说明试剂、仪器或操作有问题，则整个实验也无效。如果阴性对照有小于 35 的 Ct 值，说明试剂或环境有污染，则整个实验无效。实验无效时，需要先找到原因后再继续实验。

2. 比较 N 个样本的 Ct 值，Ct 越低说明扩增效果越好，RT-PCR 活性越高。

关联产品	Tth DNA 聚合酶 RT-PCR 活性筛选试剂盒