天净沙系列

CAT#:231220-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

Tth DNA 聚合酶 RT-PCR 活性筛选试剂盒

Tth DNA Polymerase RT-PCR Activity Probe 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

本产品是专门用于筛选 Tth DNA 聚合酶 RT-PCR 活性的试剂盒，用于快速比较各种 Tth DNA 聚合酶突变体的 RT-PCR 活性。本产品具下列特点:

1. 即开即用，用户只需要提供待测 Tth DNA 聚合酶。
2. 预混液整合了绝大部分所需成份，不需要单独添加，减少了操作误差。
3. 可用于筛选 Tth DNA 聚合酶的 RT-PCR 活性，也可用于筛选其抑制剂或促效剂。
4. 含 Tth DNA 聚合酶阳性对照，便于在实验异常时分析原因。
5. 基于 TaqMan 探针法，故待测 Tth DNA 聚合酶需要有 5-3 核酸外切酶活性。如果突变灭活了此活性，需使用另一款产品（染料法筛查试剂盒）。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 筛选反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
Tth 筛选探针法 MasterMix 成份 A	231220-2a	0.5 mL	0.5 mL 本色管
Tth 筛选探针法 MasterMix 成份 B	231220-2b	0.5 mL	0.5 mL 绿盖管
模板干粉	231220-2c	50 T	0.5 mL 黄盖管
阳性对照	231220-2d	20 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	231220-2sc	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、qRT-PCR 反应（20 μL 体系）

2. 首次使用本试剂盒时，需要将装有模板干粉的离心管短暂离心，然后加入 65 μL 超纯水，涡旋震荡 30 秒，得模板溶液，放冰上待用。由于模板为 RNA，故当次实验没有用完的本溶液，需要放-80℃保存。
3. 如果有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则标记 N + 2 个 PCR 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。如果要测试抑制剂或促效剂，可以使用超纯水的预留体积。按下表设置反应：

成分	N 个样本管	阴性对照	阳性对照
配制预混液	在一 1.5 mL 离心管中，加入 8 μL×(N+3) 超纯水，10 μL×(N+3) MasterMix 成份 A，1 μL×(N+3) MasterMix 成份 B，1 μL×(N+3) 模板溶液。轻柔吹到混匀。		
分装预混液	各 19 μL	各 19 μL	各 19 μL
N 个待测样本	各 1 μL	不加	不加
超纯水	不加	1 μL	不加
阳性对照	不加	不加	1 μL
终体积	各 20 μL	20 μL	20 μL

4. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qPCR:

过程	温度	时间
逆转录	65℃	30 min.
预变性	95℃	5 min.
PCR 反应（45 个循环）	95℃	15 sec.
	52℃	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

5. 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。
6. 比较 N 个样本的 Ct 值，Ct 越低说明扩增效果越好，样本的 RT-PCR 活性越高。

关联产品	Taq DNA 聚合酶活性筛选试剂盒，铵体系