天净沙系列

CAT#:990408-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

2× qPCR MasterMix(可视化染料-荧光染料双染料法)

2× qPCR MasterMix (Colorimetric-SYBR Method)

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

本产品是整合可视化和荧光染料 qPCR 而成的产品，它既可以用于荧光染料法 qPCR 及检测，也可以用于可视化qPCR及检测，适用于各种针对核酸的快速定性检测。本产品具有下列特点：

1. 使用方便，用户只需准备模板和引物即可。
2. 含可视化染料和荧光染料，故既可以用肉眼终点判断结果，也可用荧光qPCR仪进行实时荧光检测。
3. 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。
4. 阴性阳性结果颜色对比强烈。
5. 快捷，即用型的预配液使加样操作步骤简化，避免了交叉污染，降低实验误差。
6. 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。
7. 即可用于定性检测，也可用于定量检测。
8. 本规格有 1 mL，足够 100 次 20 μL 体系的染料法可视化及荧光 PCR。
9. 本产品只供科研使用。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成份	编号	规格	包装
2× qPCR MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法)	990408-2	1 mL	1 mL 本色管
使用手册	990408-2sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 模板、引物、超纯水。

使用方法

1. 如果有 N 个样品（最好含一个样本制备阳性对照和一个样本制备阴性对照）并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个用于 6 点标准曲线，一个是扩增阴性对照（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扩增阳性对照（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）。

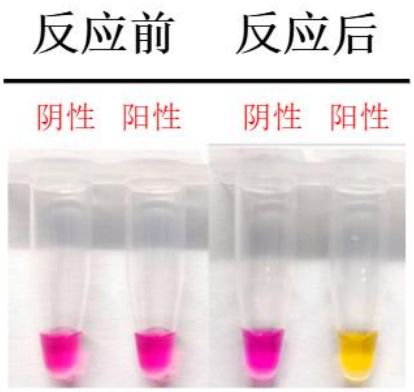
成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管
2× qPCR MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法)	各 10 μL	各 10 μL	10 μL
自备引物 1（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备引物 2（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备模板 DNA			
基因组 DNA	10-100 ng	不加	不加

或 cDNA	1-10 ng	不加	不加
自备阳性对照模板（6 各梯度）	不加	各 1 μL	不加
阴性对照模板(一般用水)	不加	不加	1 μL
自备 50×自备 ROX I 或 ROX II 染料(见附)	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 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。

循环步骤	反应参数	备注
预变性	95℃ 5 分钟	
qPCR (35-45 次循环)	94℃ 10 秒	
	55-65℃ 15-30 秒	靶分子长度最好在 80-200 bp
	72℃ 40 秒	（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析	按 qPCR 仪器手册执行	

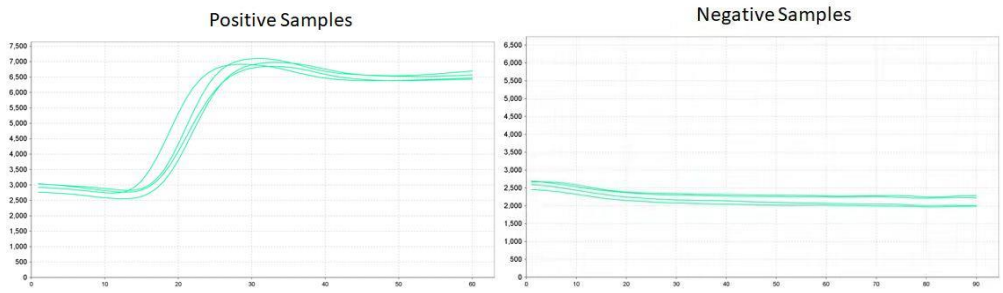
3. 可视化结果分析：扩增结束后肉眼观察结果判断阴性和阳性。典型的结果见下图：左边管为阴性，右边管为阳性



4. 荧光染料法结果分析：

5. 结果分析：实验有效性判定。如果两个阳性对照能够得到标准的 S 型扩增曲线而两个阴性对照都没有扩增，则实验有效，才有必要对样品进行分析。如果阳性对照没有出现 S 型扩增曲线，则说明试剂盒可能失效，实验无效。如果阴性对照有 S 型扩增曲线，则说明扩增引物设计得不好，有非特异扩增，需要重新优化引物。也可能是环境或试剂有污染，实验无效。遇到实验无效的情况，请跟厂家客户联系，分析原因后再恢复实验。

6. 如果实验有效，则分析样品。凡是有 S 扩增曲线的，可以判断为阳性。凡是没有 S 扩增曲线的，可以判断为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性结果，扩增曲线为 S 型，右边为阴性结果，扩增曲线不呈 S 型。



7. 当实时荧光检测和可视化检测同时使用时，如果不一致，以实时荧光 PCR 扩增的数据为准。一般可视化结果滞后实时荧光检测结果 20-30 分钟，也就是说，在 qPCR 仪上第 30 分钟时呈现阳性的样品，其颜色变化在第 50-60 分钟时才能观察到。
8. 对定量检测，以 6 个标准曲线样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
9. 对定性检测，则得到有效 Ct 值的样本为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

附：

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：Agilent MX3000 和 MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、Smart Cycler System、Thermal Cycler Dice Real Time 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：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。
3. 需要使用 ROX II 的机型：ABI Prism7500、7500 Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、Corbett RotorGene 3000。

关联产品	2×探针法 qPCR MasterMix