

天
净
沙
系
列

CAT#:190504-1
CAT#:190504-10
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

一步式探针法 qRT-PCR 试剂盒

One-Step Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是基于荧光探针检测的即用型 RT-PCR 试剂盒，可以对靶 RNA 分子进行实时定量 RT-PCR 分析 (quantitative RT-PCR、qRT-PCR)。产品含有经过优化的缓冲液组分、逆转录酶、热启动 Taq DNA 聚合酶、Taq DNA 稳定剂、dNTPs、MgCl₂ 和稳定剂等所有实时定量 RT-PCR 所需要的成分，用户只需加入 RNA 模板、引物和探针即可进行探针法实时定量 RT-PCR 反应，具有广泛的用途。本产品具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 以 2×Mix 提供，用户只需准备模板、引物、探针和 ROX 染料（取决于 qPCR 仪器）即可以进行探针法实时定量 RT-PCR 实验，非常方便快捷，降低了操作误差。 2. 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。灵敏度最高时可以达到 50 拷贝/反应（跟模板质量，引物设计等相关）。 3. 既可用于 TaqMan 探针 qRT-PCR，也可以是分子信标(molecular beacon)的 qRT-PCR。 4. 灵敏度和专一性比染料法荧光定量 RT-PCR 更高。 5. 可用于基因表达分析、SNP 分析、拷贝数分析等实验。也可以用于定性检测。 6. 本产品只能用于科研，1mL 足够 100 次 20uL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 																								
<p>规格及成分</p>	<p>1 mL 规格</p> <table border="1" data-bbox="486 1019 1355 1272"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>190504a</td> <td>1 mL (橙色盖)</td> </tr> <tr> <td>5×探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td>190504b</td> <td>0.2 mL (红色盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>190504sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>10mL 规格</p> <table border="1" data-bbox="448 1337 1393 1592"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>190504a</td> <td>1 mL×10 (橙色盖)</td> </tr> <tr> <td>5×探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td>190504b</td> <td>0.2 mL×10 (红色盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>190504sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	塑料袋包装	2×探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	1 mL (橙色盖)	5×探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	0.2 mL (红色盖)	使用手册	190504sc	1 份	成份	编号	十孔盒包装	2×探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	1 mL×10 (橙色盖)	5×探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	0.2 mL×10 (红色盖)	使用手册	190504sc	1 份
成份	编号	塑料袋包装																							
2×探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	1 mL (橙色盖)																							
5×探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	0.2 mL (红色盖)																							
使用手册	190504sc	1 份																							
成份	编号	十孔盒包装																							
2×探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	1 mL×10 (橙色盖)																							
5×探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	0.2 mL×10 (红色盖)																							
使用手册	190504sc	1 份																							
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，不冻融时保存期限为 12 个月。如果需要每天使用，可在 4℃放置三周。</p>																								
<p>自备试剂</p>	<p>RNA 模板、引物、TaqMan 探针、超纯水。</p>																								
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 如果有 N 个样品并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个是做标准曲线的阳性对照，一个是阴性对照 (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）。 <table border="1" data-bbox="426 2011 1417 2089"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>N 个样品管</th> <th>6 个标准曲线管</th> <th>NC 管</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管																				
成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管																						

2×探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 uL	各 10 uL	10 uL
自备引物 1 (10uM)	各 1 uL	各 1 uL	1 uL
自备引物 2 (10uM)	各 1 uL	各 1 uL	1 uL
N 个自备模板 RNA	各 1-2 uL	不加	不加
自备阳性对照模板 (6 个梯度)	不加	各 1 uL (1 管加 1 个梯度)	不加
阴性对照模板 (水)	不加	不加	1 uL
自备探针 (0.5uM)	各 1 uL	各 1 uL	1 uL
自备 50×ROX I 染料 或 自备 50×ROX II 染料 (见注)	各 0.4 uL	各 0.4 uL	0.4 uL
5×探针法 qRT-PCR 酶混合液	2 uL	2 uL	2 uL
补超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

注，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。

2. 放入荧光 PCR 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考，一定需要根据靶分子长度，引物和探针的 Tm 值、标记染料的种类等进行调节。一般选择三步法 PCR：

步骤	反应参数	备注
逆转录 (RT 步骤)	94℃ 30 分钟	
预变性	94℃ 2 分钟	
PCR (35-45 次循环)	94℃ 15 秒	靶分子长度最好在 80-200bp
	55-65℃ 15-30 秒	在此步采集荧光信号，通道根据标记染料决定
	72℃ 30 秒	

如果引物 Tm 值接近 60℃，也可以选择两步法 PCR：

步骤	反应参数	备注
逆转录 (RT 步骤)	94℃ 30 分钟	

	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="443 136 783 210">预变性</td> <td data-bbox="783 136 1062 210">94℃ 2 分钟</td> <td data-bbox="1062 136 1398 210"></td> </tr> </table>	预变性	94℃ 2 分钟				
	预变性	94℃ 2 分钟					
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="443 210 783 293" rowspan="2">PCR (35-45 次循环)</td> <td data-bbox="783 210 1062 293">94℃ 15 秒</td> <td data-bbox="1062 210 1398 293">靶分子长度最好在 80-200bp</td> </tr> <tr> <td data-bbox="783 293 1062 398">60℃ 30-60 秒</td> <td data-bbox="1062 293 1398 398">在此步采集荧光信号, 通道根据标记染料决定</td> </tr> </table>	PCR (35-45 次循环)	94℃ 15 秒	靶分子长度最好在 80-200bp	60℃ 30-60 秒	在此步采集荧光信号, 通道根据标记染料决定	
PCR (35-45 次循环)	94℃ 15 秒		靶分子长度最好在 80-200bp				
	60℃ 30-60 秒	在此步采集荧光信号, 通道根据标记染料决定					
<p>3. 数据处理</p> <p>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, 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 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。</p> <p>如果把本试剂盒用于定性检测, 只判断阳性或阴性。一般情况下, 阴性对照 Ct 大于或等于 40 (阈值需要以阴性对照的 Ct 值确定, 此处为便于叙述以 40 为例, 具体情况很可能阈值不一样)。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。</p>							
<p>关联产品</p>	染料法 qPCR MagicMix						