|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:990504****低温运输，-20℃保存** |  |
| [**探针法qRT-PCR试剂盒**](http://www.bingene.com/46139.html) |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：**[**www.bingene.com**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 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：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。
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。
 |
| **规格及成分** | 本产品采用塑料袋包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| 探针法qRT-PCR缓冲液 | 990504a | 500 μL | 0.5mL蓝盖管 |
| 探针法qRT-PCR酶混合液 | 990504b | 100 μL | 0.5mL红盖管 |
| 使用手册 | 990504sc | 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** | RNA模板、引物、TaqMan探针、超纯水。 |
| **使用方法** | 一、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）。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **N个样品管** | **6个标准曲线管** | **NC管** |
| 探针法qRT-PCR缓冲液 | 各10 μL | 10 μL | 10 μL |
| 自备引物1（10uM） | 各1uL | 各1uL | 1uL |
| 自备引物2（10uM） | 各1uL | 各1uL | 1uL |
| N个自备模板RNA | 各1-2uL | 不加 | 不加 |
| 自备阳性对照模板（6个梯度） | 不加 | 各1uL（1管加1个梯度） | 不加 |
| 阴性对照模板（水） | 不加 | 不加 | 1uL |
| 自备探针（5uM） | 各1uL | 各1uL | 1uL |
| 自备50×ROX I染料或自备50×ROXII染料（见注） | 各0.4uL | 各0.4uL | 0.4uL |
| 探针法qRT-PCR酶混合液 | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| 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：AgilentMX3000和MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、，、SmartCycler System、Thermal Cycler Dice RealTime 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ROXI的机型：ABIPrism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。
3. 需要使用ROXII的机型：ABIPrism7500、7500Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、CorbettRotorGene3000。

二、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：盖上盖子后上机，按下面参数进行RT-PCR：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **步骤** | **反应参数** | **备注** |
| 逆转录（RT步骤） | 50℃ | 30 min |
| 预变性 | 94℃ | 2 min |
| PCR反应（45个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 60 sec（采集FAM通道的荧光信号，淬灭基团为TAMRA） |

**三、数据处理**1. 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。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。
 |
| **关联产品** | 染料法RT-PCR试剂盒 |

20220609fn