



人 Y 染色体探针法 qPCR 检测试剂盒

Human Y Chromosome Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

产品及特点	人 Y 染色体上 95%是男性特异区域，里面含和男性有关的基因。本产品就是以其中一个基因为靶分子，设计的探针法荧光定量 PCR 产品，专门用于检测样品中是否有人 Y 染色体存在，它具有下列特点：																										
	1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。																										
	2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 10 拷贝/反应。																										
	3. 提供阳性对照，便于排除假阴性实验。																										
	4. 能检测内源性内参基因（位于 X 染色体），便于排除假阴性样品。																										
	5. 特异性高，引物是根据人 Y 染色体高度保守区设计，不会跟人的其他染色体的 DNA 发生交叉反应。																										
	6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量时其线性范围不少于 5 个数量级。																										
	7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。																										
	8. 本产品只能用于科研。																										
规格及成分	<table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>0.5mL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>人 Y 染色体专一性引物-探针混合液（含内参）</td><td>150μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>人男性基因组 DNA 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>KI 多瘤病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用 5 孔盒包装</td></tr></table>	成分	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	人 Y 染色体专一性引物-探针混合液（含内参）	150μL	0.5mL 棕色管	人男性基因组 DNA 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管	KI 多瘤病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 白盖管	使用手册	1 份	无	本产品采用 5 孔盒包装				
	成分	规格	包装																								
	2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管																								
	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																								
	人 Y 染色体专一性引物-探针混合液（含内参）	150μL	0.5mL 棕色管																								
	人男性基因组 DNA 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管																								
	KI 多瘤病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 白盖管																								
	使用手册	1 份	无																								
本产品采用 5 孔盒包装																											
使用方法	一、 <u>稀释标准曲线样品</u> （以 10E0-10E4 拷贝/μL 这 5 个 10 倍稀释度为例）。																										
	1. 标记 4 个离心管，分别为 3，2，1，0。																										
	2. 分别加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头（下同）。																										
	3. 在 3 号管中加入 5μL 1×10E4 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E3 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。																										
	4. 换枪头，在 2 号管中加入 5μL 1×10E3 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，																										

- 得 1×10^2 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 1 号管中加入 $5\mu\text{L}$ 1×10^2 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^1 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 0 号管中加入 $5\mu\text{L}$ 1×10^1 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^0 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 上面的操作得到 0-3 号标准曲线样品, 将试剂盒提供的人男性基因组 DNA 阳性对照(1×10^4 拷贝/ μL)当成 4 号样品, 共 5 个样品, 放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是 PC (样品制备阳性对照, 选用确定含 Y 染色体的样本), 一个是 NC (样品制备阴性对照, 选用确定不含 Y 染色体的样本)。
9. 用自选方法纯化样品 DNA, 本产品跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行)

10. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+8 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (本试剂盒提供的人女性 DNA 溶液), 5 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (本试剂盒提供的人女性 DNA 溶液), 1 个用于 PCR 阳性对照 (本试剂盒提供的人男性 DNA 阳性对照)。下面只以定量分析为例。
11. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (0-4 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 $10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$
人 Y 染色体专一 qPCR 引物-探针混合液 (含内参)	各 $3\mu\text{L}$	$3\mu\text{L}$	各 $3\mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA 样本	各 $7\mu\text{L}$	不加	不加
超纯水	不加	$7\mu\text{L}$	不加

第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (0-4 号)	不加	不加	各 7 μ L
--------------------------	----	----	-------------

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	10min
PCR 反应 (50 个循环)	95℃	15sec
	54℃	15sec
		15 sec (采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，MGB 为淬灭基团)

四、数据处理

13. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 45 的 PCR 反应结果判为阴性。有 Ct 读数，Ct 值小于 45，荧光信号有对数增长，有典型倒 S 型扩增曲线的 PCR 反应结果判为阳性。每个 PCR 反应管需要同时对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到对应靶分子和内参的两个结果。

14. PCR 实验有效性判断：如果样本制备阳性对照管或扩增阳性对照管 FAM 通道结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果样本制备阴性对照管或扩增阴性对照管 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果上述阳性对照管和阴性对照管结果正常，则进入下一步。

15. 样本有效性判断：如果样本管 FAM 通道的结果为阳性，Cy5 通道结果是阴性，则样本的阳性结果有效。如果样本管 FAM 通道和 Cy5 通道的结果均为阳性，并且 FAM 通道的 Ct 值小于 Cy5 通道的 Ct 值，则样本的阳性结果有效。如果 FAM 通道的 Ct 值大于 Cy5 通道的 Ct 值，则样本的阳性结果无效。如果样本管 FAM 通道和 Cy5 通道的结果均为阴性，则此样品管的阴性结果无效。可能原因是样本丢失或有抑制剂，需要用其所对应的样品重新提取核酸和进行 PCR 扩增。

16. 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，

	<p>r2 必须大于 0.95。内参 Cy5 通道读数的标准曲线将跟 FAM 的标准曲线平行。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再换算成浓度 X 拷贝/反应。</p> <p>17. 如果用于定性实验, 对待测样品, 如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 45 则均为阴性, 如果小于 45 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本, 如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性, 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。</p>
PCR 编号	TW-E10239
说明书	1 份
自备试剂	样品 DNA
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 有效期 1 年

生产企业: 上海通尉实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54845833

技术支持: 15800441009