

# 人 Y 染色体探针法 qPCR 检测试剂盒

## Human Y Chromosome Probe PCR Kit

目录号: [ml108208](#)

# 使 用 说 明 书

<b>产品及特点</b>	<p>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:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。</li><li>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。</li><li>3. 提供阳性对照, 便于排除假阴性实验。</li><li>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。</li><li>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。</li></ol>
--------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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 20 $\mu$ L 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

成分	规格	包装
2 $\times$ 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)	150 $\mu$ L	0.5mL 棕色管
人男性基因组 DNA 阳性对照(1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管
人女性基因组 DNA 溶液(1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 白色盖
使用手册	1 份	无
本产品采用 5 孔盒包装		

### 使用方法

- 一、稀释标准曲线样品** (以 10E0-10E4 拷贝/ $\mu$ L 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 45 $\mu$ L 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 5 $\mu$ L 1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E3 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
  4. 换枪头，在 2 号管中加入 5 $\mu$ L 1 $\times$ 10E3 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E2 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
  5. 换枪头，在 1 号管中加入 5 $\mu$ L 1 $\times$ 10E2 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E1 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
  6. 换枪头，在 0 号管中加入 5 $\mu$ L 1 $\times$ 10E1 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E0 拷贝/ $\mu$ L 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( $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )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 $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$

12. 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°C	5min
PCR 反应 (50 个循环)	95°C	15sec
	54°C	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, 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

	<p>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><b>17.</b> 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>
<b>自备试剂</b>	样品 DNA。
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。