

穿山甲源性成分探针法 PCR 试剂盒

Manis pentadactyla-Ingredient Probe PCR Kit

目录号: ml104718

使 用 说 明 书

产品及特点

本试剂盒可用于检测食品或其他材料中是否有穿山甲源性成分。现代食品加工工艺极大改变了食材原有的味道、气味、色泽、纹理和质地等特性，因此传统的感官鉴别技术已经无法对食材的真伪进行准确的鉴定。同时部分食材还有致敏性，因此基于基因检测的快速灵敏的食材来源检测技术将对食品监管和安全提供重要的保障。本公司开发了简单快捷的穿山甲源性成分探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒，**它有下列特点：**

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
3. 根据穿山甲保守区域设计引物和探针，能专一性地检测出样品中的穿山甲源性成分，但不能检

	测其他非穿山甲源性成分。 4. 对混合样品中穿山甲源性成分的检测下限为 0.01%，对样品中穿山甲源性成分的核酸检测下限为 0.1ng/mL。 5. 既可以定性检测，也可以定量检测。用于定量时线性范围至少有 5 个数量级。 6. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 7. 一管式闭管操作，降低了交叉污染。 8. 快速，整个检测过程（按一个样品计）所需时间仅为 2.0 小时。 9. 本产品足够 50 次 20 mL 体系的荧光定量 PCR。 10. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	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
	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
	穿山甲源性成分探针法 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
	穿山甲源性成分探针法 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
	使用手册	1 份	无
	本产品采用五孔盒包装		
	注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 162 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/mL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的		

DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。
2. 用带芯枪头分别加入 45 mL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5 mL 1×10^7 拷贝/mL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10^6 拷贝/mL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 5 号管中加入 5 mL 1×10^6 拷贝/mL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 拷贝/mL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 4 号管中加入 5 mL 1×10^5 拷贝/mL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^4 拷贝/mL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 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），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 mL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 mL 体系，在样品制备室进行)

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 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（用水做模板），6 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（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
穿山甲源性成分探针法 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液(1-6 号)	不加	不加	各 7μL

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℃	2min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 BHQ-1 为淬灭基团)

四、数据处理

12. 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。

13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 40。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 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

自备试剂

样品 DNA。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。