

家鸽性别测定探针法 qPCR 试剂盒

Columba livia domestica Sex Determination Probe qPCR Kit

目录号: [ml108063](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

家鸽在我们日常生活中十分常见，它在生态、经济和文化等方面都具有重要的价值。家鸽是单态性鸟，即雌雄同型，无论是幼鸟还是成鸟都很难从外观形态或其他行为上区分雌雄性别，给家鸽行业的从业者带来不便。例如对于肉鸽来说，雄鸽进食量大，但产肉不如雌鸽，故养雌鸽经济效益更高，但没法通过肉眼进行筛选，因此家鸽的性别鉴定技术的研究和建立具有十分重要的意义。本产品就是以家鸽 CHD (Chromobox-Helicase-DNA Binding Protein, 染色体螺旋蛋白)基因为靶点，设计的专门检测家鸽性别的探针法 qPCR 试剂盒，**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 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，用于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性实验。

4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据家鸽 CHD-W 和 CHD-Z 基因设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。彼此也不会发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 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×Probe qPCR MasterMix	500 μ L	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
家鸽性别测定 PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	50 次	0.5mL 棕色管
家鸽 CHD-W 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
家鸽 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 蓝盖管
使用手册	1 份	1 份
本产品使用五孔盒包装		
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 220 mL 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、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。
2. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 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。

二、Probe qPCR 反应 (20 μ L 体系, 在样品制备室进行)

3. 如果做只做 1 次重复实验, 则标记 N+3 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 CHD-W 基因 PCR 阳性对照 (直接用本试剂盒提供的 CHD-W 阳性对照为模板), 1 个用于 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照 (直接用本试剂盒提供的 CHD-Z 阳性对照为模板)。

4. 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	CHD-W PCR 阳性对照	CHD-Z PCR 阳性对照
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	各 10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
家鸽性别测定 PCR 引物-探针 混合液(含内参引物探针)	各 4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
N+2 个待测样 (自带内源性内参)	各 6 μ L	不加	不加	不加
家鸽 CHD-W 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	6 μ L	不加
家鸽 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	不加	6 μ L
超纯水	不加	6 μ L	不加	不加

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 $^{\circ}$ C	4min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	45 sec (采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 荧光信号, 淬灭基团均为 BHQ)

四、数据处理

	6. 阴性阳性判断: 没有 Ct 读数, 或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数, Ct 值小于 40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个反应管均可得到 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 数值和对应的阴性和阳性结果。 7. 实验有效性判断: 如果样本制备阳性对照管或/和 PCR 阳性对照管的 FAM 通道信号结果为阴性, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 需要重做扩增或/和核酸制备, 也可以直接跟仪器和试剂厂家联系。如果样本制备阴性对照管或/和 PCR 阴性对照管的 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, 需要分析污染原因并将污染清除。如果两个阳性对照和两个阴性对照结果正常, 说明本次实验有效, 可以进入下一步分析。 8. 样本 CHD-W 基因检测有效性判断: 如果待测样本 FAM 通道的结果为阳性, 则无论该样本的 Cy5 通道 (对应内源内参) 的结果是阴性还是阳性, 该样本 FAM 通道的结果有效。如果待测样本管 FAM 通道的结果为阴性, Cy5 通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。 9. 样本 CHD-Z 基因检测有效性判断: 如果待测样本 HEX 通道的结果为阳性, 则无论该样本的 Cy5 通道 (对应内源内参) 的结果是阴性还是阳性, 该样本 HEX 通道的结果有效。如果待测样本管 HEX 通道的结果为阴性, Cy5 通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。 10. 性别判断: 如果样本同时为有效的 FAM 阳性和 HEX 阳性, 相当于 CHD-W 和 CHD-Z 均为阳性, 则为雌性。如果样本为 HEX 阳性信号阳性, 相当于 CHD-Z 阳性, 则为雄性。
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 有效期 1 年。

