|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-112****低温运输，-20℃保存** |  |
| **鹿源性成分染料法荧光定量PCR试剂盒****Cervus-Derived Material SYBR PCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **北京天恩泽基因科技有限公司****北京市海淀区上地信息路26号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦506****网址：[www.tiandz.com](http://www.tiandz.com/)；电话：400-6765278；电邮：order@tiandz.com** |
| **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鹿的成分。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。本产品就是为满足这一需求根据PCR原理开发的产品，它具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA。
2. 根据鹿保守区域设计引物，能专一性地检测出样品中的鹿成分，包括马鹿、梅花鹿、坡鹿、水鹿和白唇鹿，但不能检测其他动物成分。
3. 荧光定量PCR检测，既可以定量，也可以定性，比常规PCR更加灵敏和灵活。
4. 快速，整个检测过程（按一个样品计）所需时间仅为2.0小时。
5. 一管式闭管操作，降低了交叉污染。
6. 提供阳性标准品，便于分析实验结果。
7. 对混合样品中鹿成分的检测下限为0.1%，对样品中鹿成分的核酸检测下限为 1.0ng/µL。
8. 本只能用于科研，足够50次20μL体系的荧光定量PCR。
9. 本产品参考国家标准GB/T21106-2007制备。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 十孔盒包装 |
| 2×qPCR MagicMix | 90408 | 0.5 mL（棕色） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（黄盖） |
| 鹿源性成分染料法PCR引物混合液 | 14-112yw | 100 μL（白盖） |
| 鹿源性成分染料法PCR阳性对照（1×10E8拷贝/μL） | 14-112pc | 50 μL（黄盖） |
| [天净沙核酸释放剂试用装](http://www.tiandz.com/22140.html) | 61202 | 20次（1mL，绿盖） |
| 使用手册 | 13-510sc | 1份 |

 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，有效期一年。使用本试剂盒提供的阳性对照时，由于其浓度较高，一定要注意不要污染其他试剂和成分。最好在专门的区域操作。 |
| **自备试剂** | DNA模板 |
| **使用方法** | **一、稀释标准曲线样品**（以10E2-10E7拷贝/μL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，本产品不提供动物样品做阳性对照，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7，6，5，4，3，2。
2. 用带芯枪头分别加入45 μL荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在7号管中加入5 μL阳性对照（浓度为1×10E8拷贝/μL，试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E7拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在6号管中加入5 μL 1×10E7拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL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**1. 用自选方法纯化样品的DNA，本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容。
2. 如果有N个样品，则需要进行N+2个样品提取，多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。如果用本试剂盒自带的天净沙核酸释放剂试用装，则登陆公司网站[www.tiandz.com](http://www.tiandz.com)输入产品名称天净沙核酸释放剂或产品编号61202下载。

**三、设置qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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，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（用第4号阳性对照稀释液，浓度为10000拷贝/μL）。下面只描述定量分析的步骤，定性分析只是把6个标曲反应缩减成1个，其余不变。
2. 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最后加）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（2-7管）** |
| 2×qPCR MagicMix | 各10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 鹿源型成分染料法PCR引物混合液 | 各2 μL | 2 μL | 各2 μL |
| 自备10×ROX (见注) | 各2 μL | 2 μL | 各2 μL |
|  N+2个制备的DNA模板 | 各6 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 6 μL | 不加 |
| 第7步所得标准曲线样品稀释液（2-7号） | 不加 | 不加 | 各6μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

注:仅ABI7500、7700和7900仪器需要使用ROX作为对照，其他荧光PCR仪器（如iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000和LightCycler480）不需要使用ROX，则用水替代。1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行qPCR（具体PCR参数可以根据qPCR仪器的不同而自行优化）。

**四、qPCR反应参数**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 95℃ | 3 min |
| PCR反应（40个循环） | 95℃ | 0.5 min |
| 60℃ | 1 min（采集FAM通道的荧光信号） |

**五、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。
2. 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Ct必须大于或等于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** | 鹿源性成分可视化LAMP检测试剂盒 |

20190225dx