

天
净
沙
系
列

CAT#:14-105

低温运输, -20℃保存

TIANDZ

狗源性成分染料法荧光定量 PCR 试剂盒

Canis-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; 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狗的成分。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. 根据国家标准 GB/T21105-2007 设计引物，能专一性地检测出样品中的狗源成分，但不能检测其他非狗源的成分。 3. 荧光定量 PCR 检测，比常规 PCR 更加灵敏。 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. 对混合样品中狗源成分的检测下限为 0.01%，对样品中狗源成分的核酸检测下限为 0.1ng/μL。 8. 本只能用于科研，足够 50 次 20μL 体系的荧光定量 PCR。			
规格及成分		成分	编号	十孔盒包装（去纸托）
		2×qPCR MagicMix	90408	0.5 mL（棕色）
		荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（黄盖）
		狗源性成分 PCR 引物混合液	14-105yw	100 μL（白盖）
		狗源性成分 PCR 阳性对照	14-105pc	50 μL（黄盖）
		天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次（成分见下）
		免 DNA 提取试剂溶液 A 成分一	130982a	50 μL（白盖）
		免 DNA 提取试剂溶液 A 成分二	130982	100 μL（绿盖）
		免 DNA 提取试剂溶液 B	130982c	400 μL（红盖）
		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 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 1×10^8 拷贝/ μL ，试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^7 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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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

7. 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。
8. 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 DNA 释放剂试用装。则按下面步骤操作：
9. 配制溶液 A 工作液。以配制 1mL 工作液 (足够 10 个样品) 为例：在一干净塑料管中加入 10 μL 溶液 A 成分一，20 μL 溶液 A 成分二和 970 μL 超纯水，充分混合均匀即可。溶液 A 工作液可室温放置，但最好在一周内用完，不要长期放置。一次检测一个样品需要 100 μL 溶液 A 工作液，1mL 工作液足够 10 个样品。如果待测样品数量为其他数字，配制的溶液 A 工作液的体积需要做相应的调整。
10. 在标记好的 N+2 个离心管中，加入 1-5mg 固体样品 (半粒芝麻大小) 或 5 μL 液体样品待测样品。在样品制备阳性对照中加入 5 μL 阳性对照，在样品制备阴性对照中加入 5 μL 水。
11. 在每个管中加入 100 μL 溶液 A 工作液，确保固体样品被溶液淹埋，如果是液体样品则震荡混匀。
12. 95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 分钟。
13. 待冷却到常温后加入 10 μL 溶液 B 并混匀得 DNA 释放液。每个样品得到的 DNA 释放液足够进行 50-100 次 PCR。

三、设置 qPCR 反应 (20 μL 体系，在样品制备室进行)

14. 如果只做 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 个用于标准曲线样品 (也充当 PCR 阳性对照)。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

15. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。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 （棕色管）	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
狗源性成分 PCR 引物混 合液（白盖）	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10×ROX（见注）	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 DNA 模板	各 6 μL	不加	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。

16. 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	94℃	3 min
PCR 反应 (35 个循环)	94℃	45 sec
	56℃	45 sec（采集 SYBR 通道的荧光信号）
	72℃	45 sec
最后延伸	72℃	5 min

五、数据处理

17. 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。

六、电泳检测

18. 如果有必要电泳确认，可取 5-10 μL PCR 产物直接在琼脂糖凝胶上电泳产物的大小为 213bp。开盖电泳验证容易污染实验环境，强烈不建议采用此方法。

关联产品

狗源性成分可视化 LAMP 检测试剂盒