

## 驴源性DNA荧光PCR检测试剂盒

### 产品组成

驴源性 DNA 荧光 PCR 检测试剂盒	50tests
Cat. No.	7809050
核酸扩增试剂	
驴源 PCR 主反应液	1 ml×2
Taq 酶混合液	30 μl×1
对照品	
阴性对照	50 μl×1
阳性对照（驴肉中组织总 DNA）	50 μl×1

### 产品储存与有效期

试剂请保存于 -20℃，不宜反复冻融，有效期为两年；使用前应在室温下完全融化，并充分颠倒混匀后稍事离心。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本试剂盒利用一对驴线粒体 DNA 的特异性引物，一条特异性荧光探针，采用热启动 DNA 聚合酶（Hot Start Taq DNA Polymerase）、四种单体核苷酸（dNTPs）等成分，并应用 PCR 技术实现对驴线粒体 DNA 保守基因的扩增，同时通过外标的方法实现对样品中的线粒体 DNA 进行检测。DNA 检测下限为 0.1 pg/μl。

本试剂盒对牛、马、羊、猪、鸡、鸭、兔、鼠、鹅样本均无非特异性扩增。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 1.5 ml 离心管，8 联排或单管 PCR 管
2. 移液器及吸头（为避免样品间的污染，请选用含有滤芯的移液器吸头）
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器

### 注意事项

1. 使用前将试剂放在室温完全溶解，并颠倒混匀简短离心，使试剂沉积到管底。
2. 配制 PCR 反应液时，试剂请于冰上放置并避免强光照射。
3. 建议从反应液的配制到检测样品的添加，至少设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。区域 1：反应液的配制及分装。区域 2：检测样品 DNA 的制备。区域 3：向反应液中添加检测样品的 DNA，进行反应、检出（**扩增结束后的 PCR 反应管严禁打开！**）。

## 操作步骤：

1. 每个测试反应体系配制如下：

试剂	驴源 PCR 主反应液	Taq 酶
用量 (μl)	34.6	0.4

2. 根据要检测的样本量计算好各试剂组分使用量，加入1.5 ml离心管中，充分混匀，简短离心，向设定的n个（n=样本数+1管阳性对照+1管阴性对照）PCR反应管中分别加入35 μl PCR检测反应液，转移至样本处理区（注意由于移液器的误差，通常混好的n个样本PCR检测反应液只够分装n-1个PCR管，建议计算检测样本数时增加一管）。

\* 例：如果需要检测5个样本，则应按8个（n+1个）PCR检测反应液的量配制试剂，即：驴源检测PCR主反应液 $34.6 \times 8 = 276.8 \mu\text{l}$ ，再加入Taq酶 $0.4 \times 8 = 3.2 \mu\text{l}$ ，混匀后按每管35μl将PCR检测反应液分装到7个PCR管中，多余的PCR检测液则丢弃不用。

3. 加样

在PCR反应管中分别加入制备好的DNA溶液及对照品（通常是阴性对照1管、阳性对照1管）各5 μl，盖紧管盖，简短离心，将反应管放入荧光PCR检测仪中，记录样本摆放顺序。

4. PCR反应

步骤	循环数	温度(°C)	反应时间(min:sec)
1	1	95	01:00
2	40	95	00:15
		60	00:35

荧光信号的收集（Detector）设定为FAM，参比（Passive）设定为None，数据的采集定在60°C。

\* 注意：本产品不含Rox参比，若所用仪器需要使用Rox做为参比或想获得更好的曲线效果，可单独订购50×ROX Reference Dye/50×ROX Reference Dye II（Simgen Cat.No.7709005/7710005）。

## 结果分析：

1. 阈值设定

阈值设为500（ABI、Roche、Bio-Rad、Agilent Technologies等进口仪器无需设置）。

2. 质控标准

2.1. 本试剂盒对驴源性成分DNA的检测下限为0.1 pg/μl。

2.2. 阴性对照：Ct值>38或无Ct值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期。

2.3. 阳性对照：有典型扩增曲线且Ct值≤35。

3. 结果判断

3.1. 样本检测结果Ct值≤35或有明显指数增长期，可直接判断为“检出驴源性DNA成分”。

3.2. 样本检测结果Ct值在35~38范围内，此时应对样本进行重复检测，如果重复实验结果Ct值仍在35~38范围内，有明显指数增长期，则判定为阳性，否则为阴性。

3.3. 样本检测结果Ct值>38或无Ct值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期，可直接判断为“未检出驴源性DNA成分”。