

Code No. RR911

研究用

Takara

Real Time PCR Ovine
DNA Detection Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 适用的 Real Time PCR 扩增仪	1
● 保 存	1
● 检出通道	2
● Control DNA for Ovine 及 Internal Control DNA 扩增片段大小	2
● 双标记荧光探针法说明	2
● 注意事项	2
● DNA 样品制备	3
● 实验操作	3
● 结果判定	5
● 相关产品	6

● 制品说明

本制品是利用Real Time PCR技术快速检测羊（绵羊和山羊*）基因组DNA的试剂盒。采用双标记荧光PCR技术，根据线粒体DNA cytochrome c oxidase subunit I (COX I) 基因上动物种间多态性的差异进行羊源性成分鉴定。应用多色荧光检测技术，对反应液中含有的两种不同荧光染料进行双通道同步检测，在同一反应管内对羊的COX I基因及内参照（Internal Control）同时进行扩增，并通过标记两种不同荧光物质（FAM、HEX）的特异性探针进行特异性杂交，实现多色荧光同步检测。其中对内参照反应的检测，可以监控反应是否正常进行，防止假阴性结果。制品中2X Premix for Ovine已经将DNA聚合酶、反应用Buffer、dNTP等试剂预混在一起。进行实验时，PCR反应液的配制十分简单。PCR反应用DNA聚合酶使用了Hot Start法用DNA聚合酶*TaKaRa Ex Taq[®]* HS，与Takara精心研制的Real Time PCR用Buffer组合使用，可以有效抑制非特异性的PCR扩增，大大提高了PCR的扩增效率。本检测无需电泳，简单快速。本制品适用于食品、化妆品和饲料等样品中羊（绵羊和山羊）源性成分的鉴别。

本试剂盒（原Code No. D319）为《SN/T 2051-2008食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法实时PCR法》附录C所述试剂盒。

*：本制品经验证可对常见羊的品种进行检出，如绵羊(Sheep)、山羊(Goat)等，但由于检测品种不同，扩增序列可能存在变异，因此某些品种的羊可能无法被检出。另外，对于鸭(Duck)、鹅(Goose)、马(Horse)、猪(pork)、鸡(chicken)、兔(rabbit)、水牛(Bubalus bubalis)、牦牛(Bos grunniens)、黄牛(Bos taurus)、人(Human)、White Tail Deer (白尾鹿)、Axis Deer (印度梅花鹿)、Turkey(火鸡)和Ostrich(鸵鸟)等这些物种，添加genome DNA 10 ng量时，无检出或有检出时但Ct值在35以上。（上述记载以外的物种没进行过确认。）

● 制品内容 (25 μl反应×50次)

1. 2X Premix for Ovine* ¹	650 μl
2. Primer Mix for Ovine* ²	50 μl
3. Probe Mix for Ovine* ³	50 μl
4. dH ₂ O	1 ml
5. Control DNA for Ovine (10 ng/μl)	15 μl

*1 2X Premix For Ovine 中含有反应用 dNTP Mixture、Buffer、酶等。

*2 Primer Mix for Ovine 中含有扩增用引物及内参照（Internal Control）。

*3 Probe Mix for Ovine 中含有检测用探针，须避光保存。

● 适用的 Real Time PCR 扩增仪

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960, 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760, 终卖)
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
- Applied Biosystems QuantStudio 3 / 5 Real Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System and StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler 96/480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Gentier 96E/96R 全自动医用PCR分析系统（西安天隆科技）

● 保 存： -20℃

● 检出通道

	Target	Channel
Probe Mix	Ovine	FAM
	Internal Control	HEX

● Control DNA for Ovine 及 Internal Control DNA 扩增片段大小

DNA 种类	扩增片段大小
Control DNA for Ovine	105 bp
Internal Control DNA	92 bp

● 双标记荧光探针法说明

荧光检测方法采用如图 1 显示的双标记荧光探针法。双标记荧光探针法是使用 5' 端带有荧光物质（如：FAM 等），3' 端带有淬灭物质（如：Eclipse 等）的双标记荧光探针进行荧光检测的方法。当探针完整时，5' 端的荧光物质受到 3' 端的淬灭物质的制约，不能发出荧光。而当双标记荧光探针被分解后，5' 端的荧光物质便会游离出来，发出荧光。当 PCR 反应液中加入荧光探针后，在 PCR 反应的退火过程中，荧光探针便会和模板杂交，进一步在 PCR 反应的延伸过程中，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针，游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度，可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。具体原理见图 1。

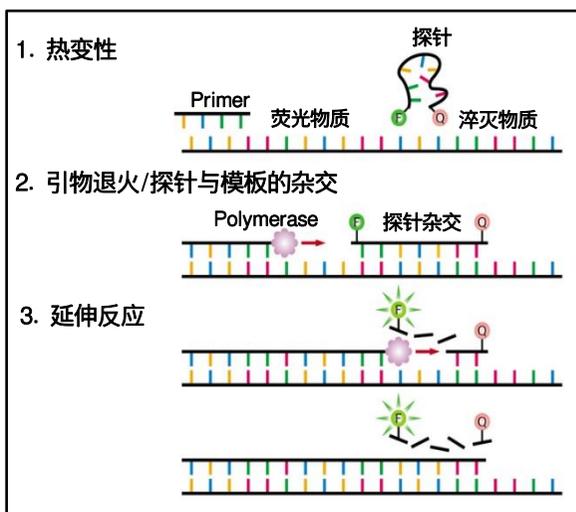


图 1. 双标记荧光探针法原理图

● 注意事项

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. 本试剂盒检测灵敏度高，为了防止污染，实验要分区操作。

① 第一区：反应液配制区。

② 第二区：样品制备区。

③ 第三区：样品添加区及反应检测区。

} 三个区之间必须进行物理性隔离，
避免人为因素造成污染。

- 2X Premix for Ovine 制品融解后, 请上下颠倒轻轻均匀混合, 避免起泡, 并经轻微离心后使用。
- Probe Mix for Ovine 应避光保存。
- 配制 Real Time PCR 反应液时应避免强光照射。
- 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染的)枪头、Microtube 等, 尽量避免污染。

● DNA 样品制备

建议使用 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 (Code No. 9765) 或 DNA Isolation Reagent for Meat and Meat Products (Code No. 9178) 制备基因组 DNA。

● 实验操作

- 按下列组份配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
2X Premix for Ovine	12.5 μ l
Primer Mix for Ovine	1 μ l
Probe Mix for Ovine* ¹	1 μ l
样品 DNA* ²	1 μ l
dH ₂ O	up to 25 μ l

*1 探针的添加量与使用的 Real Time PCR 扩增仪有关, 添加量可在 1~3 μ l 之间进行适当调整。

*2 Negative Control 反应时, 用 dH₂O 替代样品 DNA;
Positive Control 反应时, 用 Control DNA for Ovine 替代样品 DNA。

- 按下列条件进行 PCR 反应:

- 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System III, //, IV, and Lite 的反应条件。

Pattern	Hold	2 Step PCR	
Segment	1	1	2
Temperature (deg)	95.0	95.0	60.0
Hold Time (mm:ss)	00:10	00:05	00:30
Cycle	1	40	
Data Collection	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 10 秒

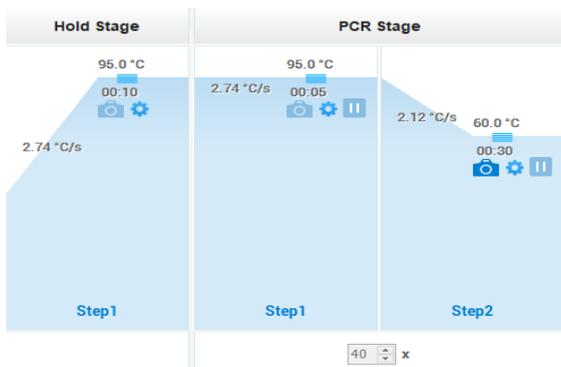
Stage 2: PCR 反应

Cycle: 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

b. Applied Biosystems QuantStudio5



两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 10秒

Stage 2: PCR 反应

Cycle: 40

95°C 5秒

60°C 30秒

*: 其它仪器设定时间根据仪器使用说明在 20~34 sec 范围内进行调整。

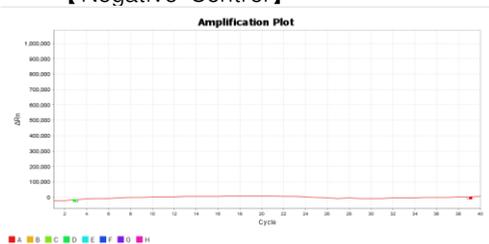
3. 结果 (Negative Control 和 Positive Control 反应结果)。

以 Applied Biosystems QuantStudio5 反应结果为例。

Well	Target Name	Sample Na...	Task	Dyes	Cr
A1	RR911-FAM	H2O	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined
A1	RR911-HEX	H2O	NTC	VIC-NFQ-MGB	19.440
Well	Target Name	Sample Na...	Task	Dyes	Cr
A7	RR911-FAM	Ovine	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	17.784
A7	RR911-HEX	Ovine	UNKNOWN	VIC-NFQ-MGB	19.537

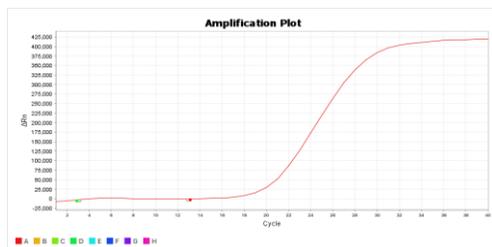
Site	Sample
A7	Control DNA for Ovine (Positive Control)
A1	dH2O (Negative Control)

【Negative Control】



FAM 通道扩增曲线图

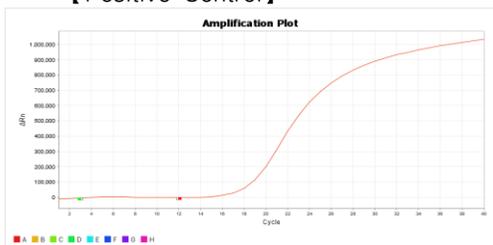
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



HEX 通道扩增曲线图

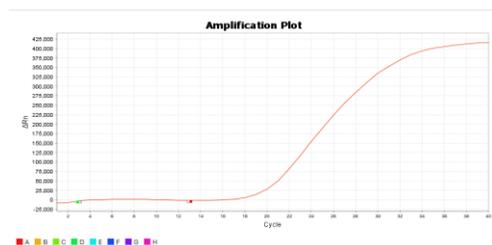
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【Positive Control】



FAM 通道扩增曲线图

(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



HEX 通道扩增曲线图

(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

4. 结果分析。

请参见“结果判定”部分。

● 结果判定

为确保检测结果的准确性,在进行实际样品检测时,请务必进行 Negative Control 实验和 Positive Control 实验。

① Negative Control 实验。

在配制 Real Time PCR 反应液时,用 dH₂O 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表:

FAM 荧光	HEX 荧光	结果判定
-	+	结果正常。
-	-	可能是操作失败或试剂失活。
+	+ (-)	PCR 反应体系污染。在确保反应体系不被污染的情况下再次进行反应。

② Positive Control 实验。

在配制 Real Time PCR 反应液时,用 Control DNA for Ovine 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表:

FAM 荧光	HEX 荧光	结果判定
+	+	结果正常。
-	+	PCR 反应失败。可能是未添加 Control DNA for Ovine 或 Control DNA for Ovine 分解。
-	-	PCR 反应失败。可能是实验操作失败或试剂失活。

③ 实际样品的检测。

对各种实验结果的判定情况说明见下表:

FAM 荧光	HEX 荧光	结果判定
+	- (+)	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常,检测实际样品时,不管 HEX 荧光信号是否被检出(如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增),只要有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 ≤ 35,判定为含有羊源性成分;如果 Ct 值 > 35,可视为不含有羊源性成分。
-	+	如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常,检测实际样品时有 HEX 荧光检出,无 FAM 荧光检出,判定为不含有羊源性成分或含量低于检测界限。
-	-	PCR 反应失败。注意以下几个方面后再次进行反应。 ① 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常,则可能是样品 DNA 制备有问题,如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的 Positive Control 实验结果不正常,则可能是实验操作失败或试剂失活。

附：各物种检出结果例

物种	检测结果 (Genome DNA 10 ng 量添加)
绵羊 (Sheep)	有检出
山羊 (Goat)	有检出
鸭 (Duck)	没有检出
鹅 (Goose)	有 Ct 值, 但大于 35 圈
马 (Horse)	没有检出
猪 (Pork)	没有检出
鸡 (Chicken)	没有检出
兔 (Rabbit)	没有检出
水牛 (Bubalus bubalis)	没有检出
牦牛 (Bos grunniens)	有 Ct 值, 但大于 35 圈
黄牛 (Bos taurus)	没有检出
人 (Human)	没有检出
白尾鹿 (White Tail Deer)	没有检出
印度梅花鹿 (Axis Deer)	没有检出
火鸡 (Turkey)	没有检出
鸵鸟 (Ostrich)	没有检出

Note: 上述表格记载以外的物种没进行过确认。

● 相关产品

1. Real Time PCR Bovine DNA Detection Kit (Code No. RR910)
2. Real Time PCR Porcine DNA Detection Kit (Code No. RR912)
3. Real Time PCR Bovine and Ovine DNA Detection Kit (Code No. RR913)
4. Real Time PCR Rabbit DNA Detection Kit (Code No. RR914)
5. Real Time PCR Mammalian DNA Detection Kit (Code No. RR915)
6. Real Time PCR Chicken DNA Detection Kit (Code No. RR916)
7. Real Time PCR Cat DNA Detection Kit (Code No. RR926)
8. Real Time PCR Martes DNA Detection Kit (Code No. RR928)
9. Real Time PCR 18S DNA Detection Kit (Code No. RR930)
10. Real Time PCR Duck DNA Detection Kit (Code No. RR934)
11. TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 (Code No. 9765)
12. DNA Isolation Reagent for Meat and Meat Products (Code No. 9178)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.
Thermal Cycler Dice and CronoSTAR are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202405Da