Code No. RR928

研究用

TaKaRa

Real Time PCR Martes DNA Detection Kit

说明书

v201702Da

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
● 探针标记	1
● Control DNA for Martes 扩增片段大小	1
● 双标记荧光探针法说明	2
● 注意事项	2
● DNA 样品制备	2
● 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技术快速检测貂*基因组DNA的试剂盒。制品中2×Premix for Martes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，灵敏度高、特异性强。

本试剂盒的引物探针序列，参考自《SN 3730.1-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 1 部分：貂成分检测 实时荧光PCR法》。

* 本制品经验证可对常见貂的品种进行检出，如美洲水貂（Mustela vison）、美洲水鼬（Neovison vison）、黄喉貂(Martes flavigula)、紫貂(Martes zibellina)、日本貂（Martes melampus)等，但由于基因序列的多样性，存在不能检出所有貂源品种的可能性。

● 制品内容（25 μl反应×50次）

1. 2×Premix for Martes*1	650	μl
2. Primer Mix for Martes*2	50	μl
3. Probe Mix for Martes*3	50	μl
4. dH_2O	1	ml
5. Control DNA for Martes（10^5 copies/μl）	15	μl

*1 2×Premix for Martes 中含有反应用 dNTP Mixture、Buffer、酶等。

*2 Primer Mix for Martes 中含有扩增用引物。

*3 Probe Mix for Martes 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 *II*（Code No.TP900/TP960）

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（Code No.TP700/TP760）

Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System and StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）

LightCycler/LightCycler 480 System（Roche Diagnostics）

Smart Cycler System/Smart Cycler II System(Cepheid)

其他 Real Time PCR 扩增仪

● 保　存：　-20℃

● 探针标记

	Target	Reporter	Quencher
Probe	Martes	FAM	Eclipse

● Control DNA for Martes 扩增片段大小

DNA 种类	扩增片段大小
Control DNA for Martes	161 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 、TAMRA 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。

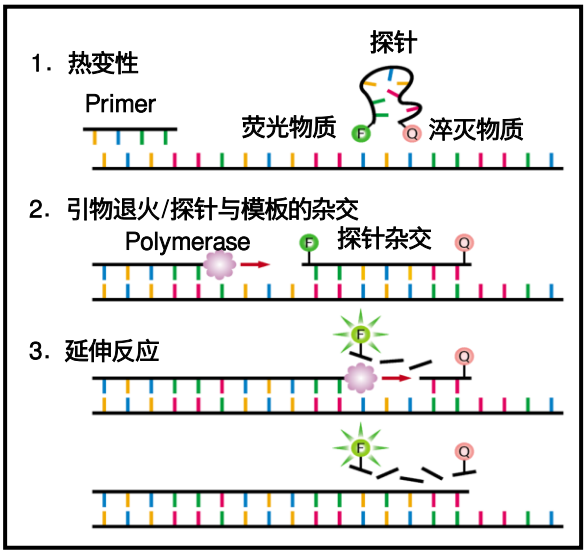


图 1．双标记荧光探针法原理图

● 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。
2. 2×Premix for Martes 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。
3. Probe Mix for Martes 应避光保存。
4. 配制 Real Time PCR 反应液时应避免强光照射。
5. 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

1. 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

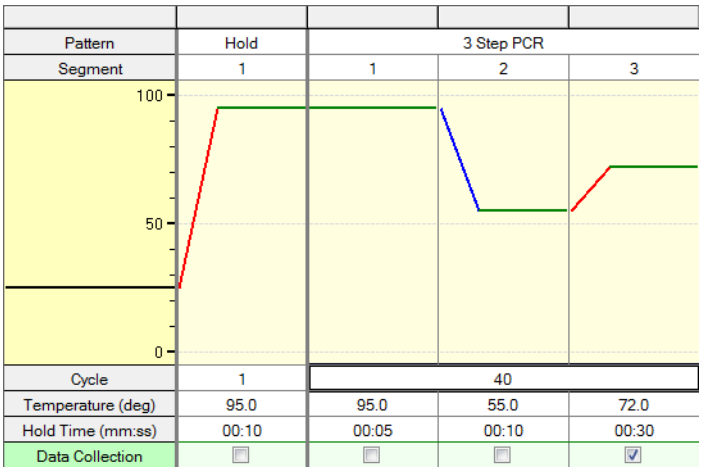
试剂	使用量
2×Premix for Martes	12.5 μl
Primer Mix for Martes	1 μl
Probe Mix for Martes*1	1 μl
样品 DNA*2	1 μl
dH_2O	up to 25 μl

*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 μl 之间进行适当调整。

*2 Negative Control 反应时，用 dH_2O 替代样品 DNA；Positive Control 反应时，用 Control DNA for Martes 替代样品 DNA。

2. 按下列条件进行 PCR 反应：

a. 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System *II* and *Lite* 的反应条件。
建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序



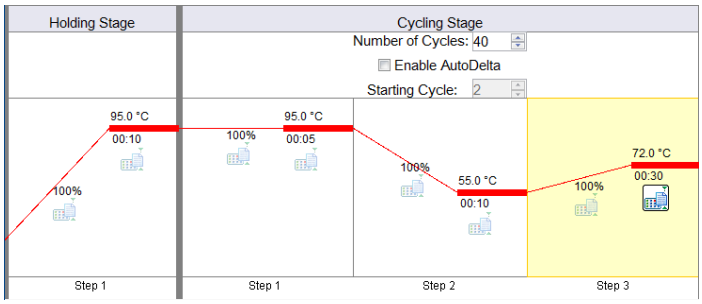
两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1：预变性
Cycle：1
95℃ 10 秒

Stage 2：PCR 反应
Cycle：40
95℃ 5 秒
55℃ 10 秒
72℃ 30 秒

b. 应用 Thermo Fisher Scientific Real Time PCR 扩增仪的反应条件

例：Applied Biosystem 7500 Fast，建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1：预变性
Cycle：1
95℃　10 秒
Stage 2：PCR 反应
Cycle：40
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　30 秒

其它仪器设定时间根据仪器使用说明在 20～34 秒范围内进行调整。

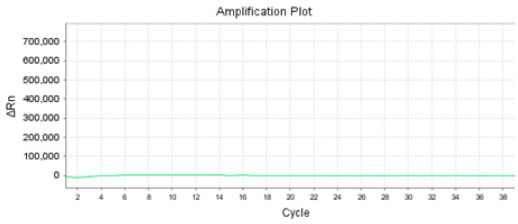
◆特别提示：
本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95℃、5～15 分钟的酶的活性化反应。

3. 结果（Negative Control 和 Positive Control 反应结果）。
以 ABI 7500 Fast 反应结果为例。

#	Well	Sample Name	Target Na...	Dyes	CT
42	D6	Plasmid (Control DNA for Martes)	貂	FAM-N...	24.641
43	D7	H2O	貂	FAM-N...	Undeter...

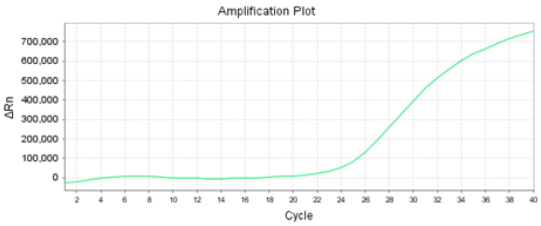
Site	Sample
D6	Control DNA for Martes（Positive Control）
D7	dH_2O（Negative Control）

【Negative Control】



FAM 通道扩增曲线图
（Y 轴：FAM 荧光信号值；X 轴：循环圈数）

【Positive Control】



FAM 通道扩增曲线图
（Y 轴：FAM 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 dH_2O 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	结果判定
−	结果正常。
+	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 Martes 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	结果判定
+	结果正常。
−	PCR 反应失败。可能是未添加 Control DNA for Martes 或 Control DNA for Martes 分解。也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	结果判定
+	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，判定为含有貂源性成分。
−	1. 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时，无 FAM 荧光检出，判定为不含有貂源性成分或含量低于检测界限。 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。

● 相关产品

1. Real Time PCR Bovine DNA Detection Kit（Code No. RR910）
2. Real Time PCR Ovine DNA Detection Kit（Code No. RR911）
3. Real Time PCR Porcine DNA Detection Kit（Code No. RR912）
4. Real Time PCR Bovine and Ovine DNA Detection Kit（Code No. RR913）
5. Real Time PCR Rabbit DNA Detection Kit（Code No. RR914）
6. Real Time PCR Mammalian DNA Detection Kit（Code No. RR915）
7. Real Time PCR Chicken DNA Detection Kit（Code No. RR916）
8. Real Time PCR Cat DNA Detection Kit（Code No. RR926）
9. Real Time PCR Lophius DNA Detection Kit（Code No. RR927）
10. Real Time PCR Prunus armeniaca DNA Detection Kit（Code No. RR929）
11. Real Time PCR 18S DNA Detection Kit（Code No. RR930）
12. TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0（Code No. 9765）
13. 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 is a trademark 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.takara-bio.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: http://www.takara.com.cn

v201702Da