

马源性 DNA 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

产品组成

马源性 DNA 荧光 PCR 检测试剂盒	50 tests
Cat. No.	7802050
核酸扩增试剂	
马源 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（马肉中组织总 DNA）	50 µl×1

产品储存与有效期

产品请置于 - 20℃ 储存，不宜反复冻融，有效期为两年。

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

本试剂盒采用《SN/T 3730.5-2013》标准中的马线粒体 DNA 特异性检测引物和荧光探针，使用热启动 DNA 聚合酶（Hot Start Taq DNA Polymerase）、四种单核苷酸（dNTPs）等成分，利用 PCR 技术实现对马线粒体 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、羊、猪、鸡、鸭、兔、驴、鼠、鹅等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（为避免样品间的交叉污染，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 8 联排 PCR 管的转子）
5. 荧光定量 PCR 仪

注意事项

1. 本产品中含有荧光探针，产品保存或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
2. 避免反复冻融本产品，反复冻融可能使产品性能下降。
3. 配制 PCR 反应液时，试剂请于冰上放置、操作，并使用洁净的吸头（推荐使用带滤芯的吸头）和离心管，避免污染。
4. 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 DNA，进行反应、检出（**扩增结束后的 PCR 反应管严禁开盖！**）。

操作步骤

1. 配制 PCR 反应液

- (1) 将各组分放在室温完全溶解，颠倒混匀并简短离心，置于冰上。按下表组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	用量 (μl)
马源 PCR 主反应液	34.6
Taq 酶混合液	0.4

- (2) 根据要检测的样品量计算好各试剂使用量，加入 1.5 ml 离心管中，充分混匀，简短离心，向设定的 n 个（n=待检样品数+1 管阳性对照+1 管阴性对照）PCR 反应管中分别加入 35 μl PCR 反应液，转移至加样区。（注意：由于移液器的误差，通常配制好的 n 个 PCR 反应液只能分装 n-1 个 PCR 管，因此建议配液时按 n+1 个数量计算各试剂使用量。）

* 例：需要检测 5 个样品时，则应按 8 个（n+1 个）PCR 反应液的量配制试剂，即：马源 PCR 主反应液 $34.6 \times 8 = 276.8 \mu\text{l}$ ，再加入 Taq 酶混合液 $0.4 \times 8 = 3.2 \mu\text{l}$ ，混匀后按每管 35 μl 的体积分装到 7 个 PCR 管中，剩余的 PCR 反应液则丢弃不用。

2. 加样

向 PCR 管中分别加入 5 μl 制备好的检测样品 DNA 溶液及对照品（通常是阴性对照 1 管、阳性对照 1 管），记录样品添加顺序，盖紧管盖，简短离心。

3. PCR 反应

将 PCR 管放入荧光定量 PCR 仪中，按下表程序进行 PCR 反应，荧光信号的收集（Detector）设定为 FAM，参比（Passive）设定为 None。

阶段	循环数	温度(°C)	时间(min:sec)	内容	荧光信号采集
Stage 1	1	95	01:00	预变性	否
Stage 2	40	95	00:10	变性	否
		60	00:30	退火+延伸	是

* 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

- (1) 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) 阳性对照：有典型扩增曲线且 Ct 值 ≤ 35。

3. 结果判断

- (1) 样品检测结果 Ct 值 ≤ 35 或有明显指数增长期，可直接判断为“检出马源性 DNA 成分”。
(2) 样品检测结果 Ct 值在 35~38 范围内，此时应对样品进行重复检测。如果重复检测 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) 样品检测结果 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“未检出马源性 DNA 成分”。