杭 州 新 景 生 物 试 剂 开 发 有 限 公 司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F
邮编：310030 电话：0571-87381295 传真：0571-87381297

鸟类性别鉴定试剂盒说明书

产品组成

鸟类性别鉴定试剂盒 Cat. No.	50 tests 7811050
鸟类性别鉴定 PCR 主反应液	1 ml×2
Taq 酶混合液	30 μl ×1
阴性对照	50 μl ×1
雌鸟阳性对照	50 μl ×1
雄鸟阳性对照	50 μl ×1

产品储存与有效期

试剂请保存于－20℃，不宜反复冻融，使用前应在室温下完全融化，并充分混匀后稍事离心；有效期为二年。

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

本试剂盒利用鸟类性染色体 CHD 基因上的一对引物，采用耐热 DNA 聚合酶（Taq 酶）、四种单体核苷酸（dNTPs）等成分，应用 PCR 技术实现对引物的扩增，通过琼脂糖凝胶电泳方法确定鸟类性别。

本试剂盒只适用于非平胸鸟的性别鉴定，现存的大部分鸟类都属于非平胸鸟，平胸鸟仅有鸵鸟、鸸鹋、鹤鸵、鹅鸵(美洲鸵鸟)、几维。

用户需自备的试剂与物品

1. DNA 提取试剂盒
2. 1.5 ml 离心管，PCR 管
3. 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）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 PCR 管的转子）

注意事项

为了实验结果的准确性和避免产生污染，建议从反应液的配制到检测样品的添加，设定以下 4 个实验区域，并进行物理性隔离。在 1-3 区域要严禁打开含有扩增产物的反应管。

区域 1：PCR 反应液的配制及分装（实验室有正压要求）。

区域 2：检测样品核酸的制备（实验室有负压要求）。

区域 3：向反应液中添加检测样品，进行 PCR 反应（实验室有负压要求）。

区域 4：电泳检测（！实验室有负压要求）。

使用前准备

1．样本处理（区域2）

使用DNA提取试剂盒，从检测样本中提取DNA。可参考下列样本选择合适的试剂盒：

羽毛样本：微量DNA提取试剂盒（Simgen，Cat.No.3102050）

新鲜血液样本：全血DNA小量试剂盒（Simgen，Cat.No.3001050）

干血斑样本：干血斑DNA提取试剂盒（Simgen，Cat.No.3012050）

2．扩增试剂准备（区域1）

从试剂盒中取出PCR主反应液和Taq酶混合液，在室温下融化并颠倒混匀简短离心，使试剂沉降到管底。

3．电泳检测准备（区域4）

配置1%~2%的琼脂糖凝胶，等PCR扩增结束后进行电泳检测。

操作步骤：

1. 每个测试反应体系配制如下：

试剂	鸟类性别鉴定 PCR 主反应液	Taq 酶混合液
用量（μl）	34.6	0.4

2. 配制反应体系并分装（区域1）

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管雌鸟阳性对照+1管雄鸟阳性对照+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）。

* 举例：如果需要检测检测4个样本，则应按8个（n+1个）PCR检测反应液的量配制试剂，即：鸟类性别鉴定PCR主反应液34.6×8=276.8 μl，再加入Taq酶混合液0.4×8=3.2 μl，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（区域3）

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、雌鸟阳性对照 1 管、雄鸟阳性对照 1 管）各 5 μl，盖紧管盖，做好标记，简短离心。将反应管放入 PCR 仪中，按下表条件设置 PCR 反应：

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	94	03:00
2	35	94	00:30
		55	00:45
		72	00:50
3	1	72	08:00
4	1	4	∞

4. 电泳检测（区域4）

将做好的琼脂糖凝胶放入电泳缓冲液中，加入5 μl PCR扩增产物、5 μl对照品扩增产物，在电泳缓冲液中电泳20~25分钟后取出放在凝胶成像仪中观察电泳条带。

结果分析：

1．质控标准

1.1. 阴性对照扩增产物没有条带。

1.2. 雄鸟阳性对照为一条带，雌鸟阳性对照为二条带，

上述两点有一点不符合，则实验结果无效。

2．结果判断

2.1. 若扩增产物仅有一条明亮清晰的条带，可直接判断为“雄鸟”。

2.2. 若扩增产物有两条明亮清晰的条带，可直接判断为“雌鸟”。

2.3. 若扩增产物有两条条带，但一条明亮、一条暗淡，则应重复检测或报告注明 “不排除送检样品有污染可能性”。