

TaKaRa Code: D322

**Real Time PCR
Rabbit DNA Detection Kit
(50 次量)**

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

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 Rabbit 及 Internal Control DNA 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	4
● 实验例	5
● 相关制品	8

● 制品说明

本制品是利用Real Time PCR技术快速检测兔基因组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兔源性成分鉴定。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，在同一反应管内对兔的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 2×Premix for Rabbit 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。本制品适用于食品、化妆品和饲料等样品中兔源性成分的鉴别。

● 制品内容 (25 µl 反应×50 次)

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

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

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

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

● 适用的 Real Time PCR 扩增仪

ABI PRISM7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

LightCycler (Roche Diagnostics)

Smart Cycler® System (Cepheid)

Mx3000P (Stratagene)

其他各种多通道检出 Real Time PCR 扩增仪

● 保 存: -20℃

● 探针标记

	Target	Reporter	Quencher
Probe Mix	Rabbit	FAM	Eclipse
	Internal Control	HEX	Eclipse

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

DNA 种类	扩增片段大小
Control DNA for Rabbit	111 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：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。

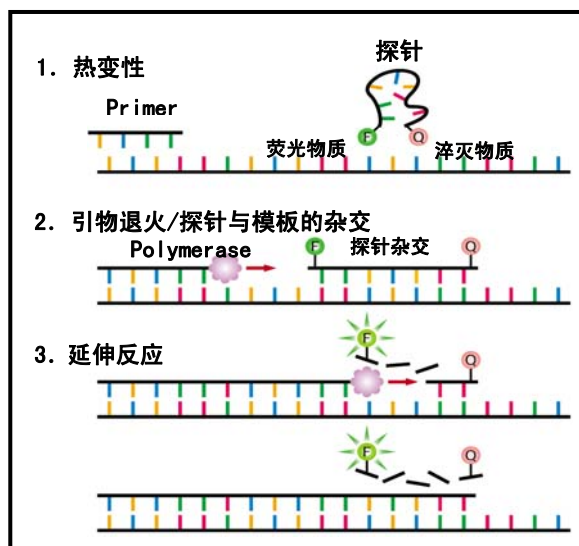


图 1. 双标记荧光探针法原理图

●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 Rabbit 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 Rabbit 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 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (TaKaRa Code: DV811A) 制备基因组 DNA。

●实验操作

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

2×Premix for Rabbit	12.5	μl
Primer Mix for Rabbit	1	μl
Probe Mix for Rabbit*1	1	μl
样品 DNA*2	1	μl
dH ₂ O	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 dH₂O 替代样品 DNA；

Positive Control 反应时，用 Control DNA for Rabbit 替代样品 DNA。

2. 按下列条件进行 PCR 反应。

95℃	10 sec	} 40 Cycles
95℃	5 sec	
60℃	20~34 sec*	

* 使用仪器不同，设定时间不同。

使用 Applied Biosystems 公司 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。7700/7900HT 设定为 30 秒，7000/7300 设定为 31 秒，7500 设定为 34 秒，7500 Fast 设定为 25 秒。

其它仪器设定时间根据仪器使用说明在 20~30 sec 范围内进行调整。

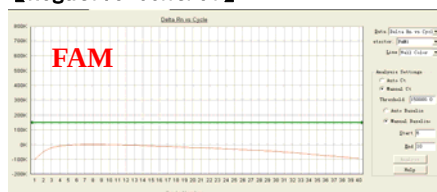
3. 结果 (Negative Control 和 Positive Control 反应结果)。

以 ABI PRISM 7300 反应结果为例。

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
C6	Negative Control	FAM1	Unknown	Undet.
C6	Negative Control	HEX1	Unknown	30.73
C7	Positive Control	FAM1	Unknown	19.67
C7	Positive Control	HEX1	Unknown	29.96

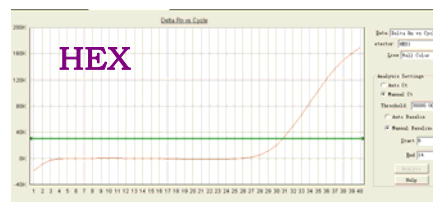
Site	Sample
C6	dH ₂ O (Negative Control)
C7	Control DNA for Rabbit (Positive Control)

【Negative Control】



FAM 通道扩增曲线图

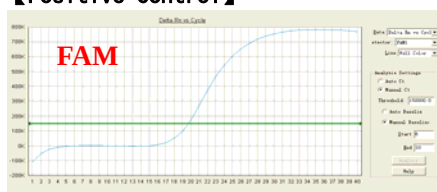
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



HEX 通道扩增曲线图

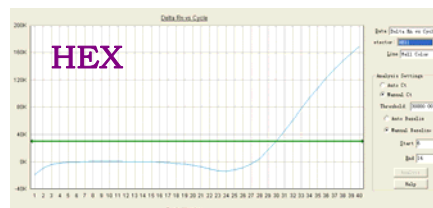
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【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。

请参见本页的“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 Rabbit 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 Rabbit 或 Control DNA for Rabbit 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，判定为含有兔源性成分；如果 Ct 值 > 35，可视为不含有兔源性成分。
—	+	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，判定为不含有兔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。

●实验例

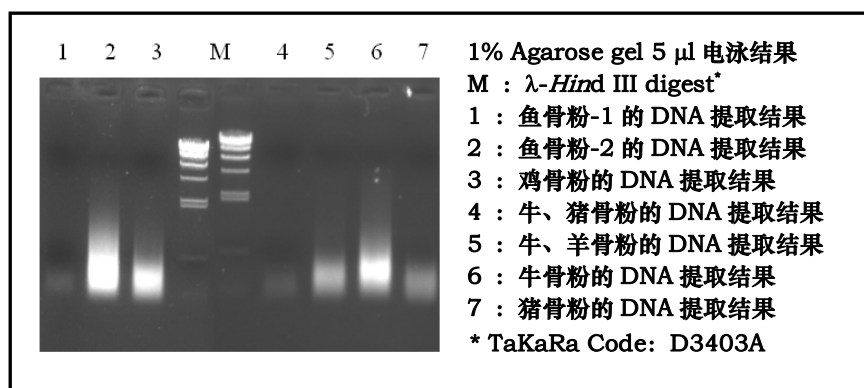
对 7 份饲料样品进行兔源性成分检测。本实验使用的定量 PCR 仪为 ABI PRISM 7300。

样品明细见下表：

No.	样品名称
1	鱼骨粉-1
2	鱼骨粉-2
3	鸡骨粉
4	牛、猪骨粉
5	牛、羊骨粉
6	牛骨粉
7	猪骨粉

1. 基因组 DNA 的提取。

使用 TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (TaKaRa Code: DV811A) 分别从 100 mg 上述样品中提取基因组 DNA，最终溶于 50 μ l TE Buffer 中，并取 5 μ l 进行电泳确认，结果如下：



2. PCR 扩增反应。

① 按下列组份配制实验反应液。

2×Premix for Rabbit	12.5 μ l
Primer Mix for Rabbit	1 μ l
Probe Mix for Rabbit	1 μ l
样品 DNA*	1 μ l
dH ₂ O	up to 25 μ l

* Negative Control 反应时，用 dH₂O 替代样品 DNA；

Positive Control 反应时，用 Control DNA for Rabbit 替代样品 DNA。

② 按下列条件进行 PCR 反应。

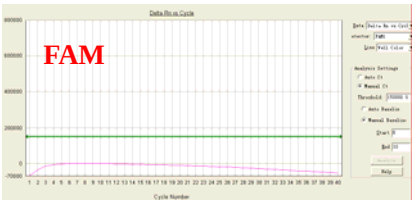
95℃	10 sec	} 40 Cycles
95℃	5 sec	
60℃	31 sec	

3. 实验结果

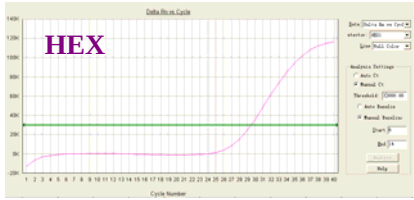
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
G2	Negative Control	FAM1	Unknown	Undet.
G2	Negative Control	HEX1	Unknown	29.46
G3	fish MBM-1	FAM1	Unknown	Undet.
G3	fish MBM-1	HEX1	Unknown	28.88
G4	fish MBM-2	FAM1	Unknown	Undet.
G4	fish MBM-2	HEX1	Unknown	29.49
G5	chicken MBM	FAM1	Unknown	Undet.
G5	chicken MBM	HEX1	Unknown	29.21
G6	cattle&pig MBM	FAM1	Unknown	Undet.
G6	cattle&pig MBM	HEX1	Unknown	28.95
G7	cattle&sheep MBM	FAM1	Unknown	Undet.
G7	cattle&sheep MBM	HEX1	Unknown	27.04
G8	cattle MBM	FAM1	Unknown	Undet.
G8	cattle MBM	HEX1	Unknown	26.37
G9	pig MBM	FAM1	Unknown	Undet.
G9	pig MBM	HEX1	Unknown	27.32
G10	Positive Control	FAM1	Unknown	20.41
G10	Positive Control	HEX1	Unknown	30.16

Site	Sample
G2	dH ₂ O (Negative Control)
G3	鱼骨粉-1
G4	鱼骨粉-2
G5	鸡骨粉
G6	牛、猪骨粉
G7	牛、羊骨粉
G8	牛骨粉
G9	猪骨粉
G10	Control DNA for Rabbit (Positive Control)

【Negative Control 的扩增曲线】

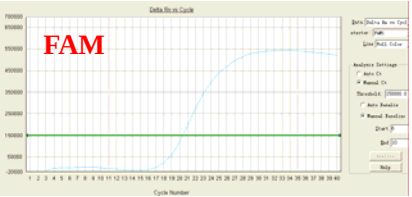


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

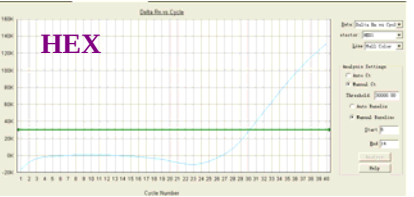


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【Positive Control 的扩增曲线】

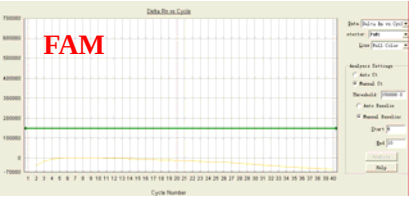


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【鱼骨粉-1 的扩增曲线】

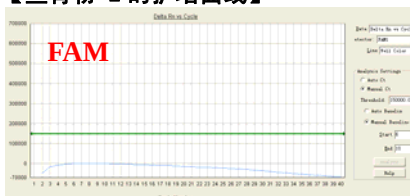


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

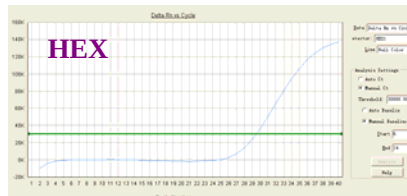


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【鱼骨粉-2 的扩增曲线】

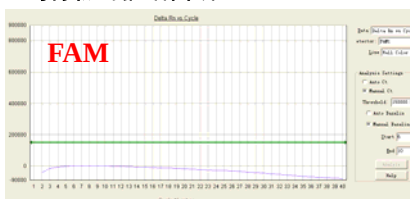


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

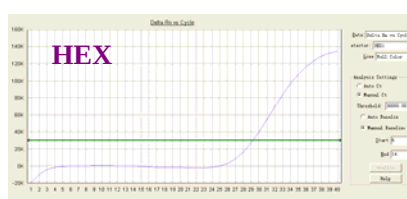


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【鸡骨粉的扩增曲线】



FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

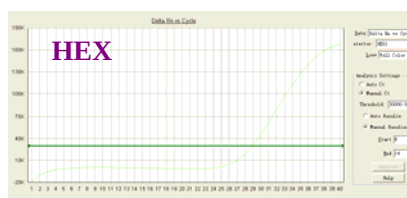


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【牛、猪骨粉的扩增曲线】

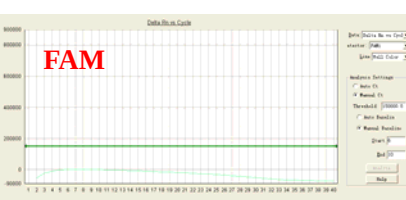


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

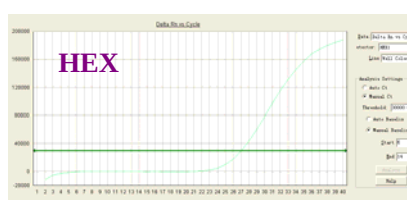


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【牛、羊骨粉的扩增曲线】

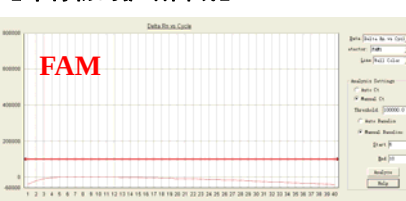


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

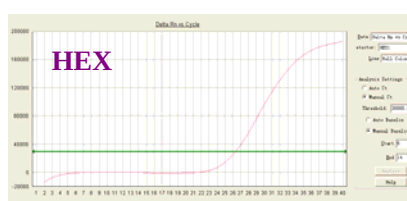


HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【牛骨粉的扩增曲线】

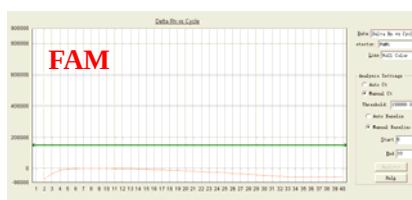


FAM 通道扩增曲线图
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



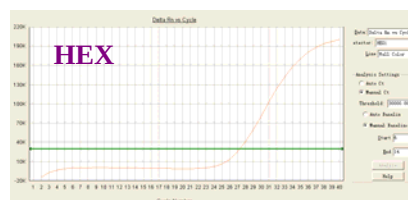
HEX 通道扩增曲线图
(Y 轴: HEX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

【猪骨粉的扩增曲线】



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。

根据检测结果可以对 7 份饲料样品中是否含有兔源性成分作出如下判定:

No.	样品	判定结果
1	鱼骨粉-1	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
2	鱼骨粉-2	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
3	鸡骨粉	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
4	牛、猪骨粉	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
5	牛、羊骨粉	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
6	牛骨粉	不含有兔源性成分或含量低于检测界限
7	猪骨粉	不含有兔源性成分或含量低于检测界限

● 相关制品

1. CycleavePCR™ Meat Species Identification Kit Version 2.0 (TaKaRa Code: DCY204)
2. Real Time PCR Bovine Detection Kit (TaKaRa Code: D318)
3. Real Time PCR Ovine Detection Kit (TaKaRa Code: D319)
4. Real Time PCR Porcine Detection Kit (TaKaRa Code: D320)
5. Real Time PCR Bovine and Ovine Detection Kit (TaKaRa Code: D321)
6. Real Time PCR Mammalian Detection Kit (TaKaRa Code: D323)

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂