

Version 1

Code No. AG11752

Specldent 羊源性成分鉴定试剂盒(探针法)

Specldent Ovine-derived DNA Identification Kit (Probe)

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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是使用探针法快速鉴定羊^{*1}源性成分的试剂盒。基于动物种间 16S rRNA (16S ribosomal RNA) 基因多态性进行动物源性成分鉴定。本产品中含有三种不同荧光基团 (FAM、VIC、ROX) 标记的探针, 在同一反应管内可同步检测羊源性 16S rRNA 基因^{*2}、真核生物 18S rRNA (18S ribosomal RNA) 基因^{*3} 以及内参照基因 (Internal Control), 通过检测内参照基因, 可以监控反应是否正常进行。检测 18S rRNA 基因, 可监控真核生物基因组 DNA 提取质量。

本产品中 2X Master Mix for Ovine 已混有 DNA 聚合酶、dNTP Mixture 与反应 buffer, 反应液配制十分简单, 只需加入本产品中的 Primer Mix for Ovine、Probe Mix for Ovine、RNase free water 以及加入待检样本即可进行羊源性成分的鉴定。

本产品 PCR 反应体系进行了优化, 采用了反应性能优越的 *Pro Taq*HS 体系 (混合了 Taq 抗体), 能够有效抑制非特异性扩增, 同时配合精心优化的 buffer, 提高 PCR 扩增效率, 可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应。

***1:** 本产品可对常见羊的品种进行检出, 如普通羊 (*Ovis aries*), 由于不同品种的羊的序列可能存在变异, 因此某些品种的羊可能无法被准确检出。

***2:** 本产品中 16S rRNA 基因能特异性检测羊源性成分, 引物探针序列参考自《中华人民共和国农业行业标准 NY/T 3309-2018》。

***3:** 本产品中 18S rRNA 基因能特异性检测真核生物, 引物探针序列参考自《中华人民共和国国家标准 GB/T 38164-2019》。

➤ 产品组成

组分名称	AG11752 (50 rxns / 25 μ l)
2X Master Mix for Ovine ^{*1}	625 μ l
Primer Mix for Ovine ^{*2}	50 μ l
Probe Mix for Ovine ^{*3}	50 μ l
Control DNA for Ovine ^{*4}	25 μ l
RNase free water	1 ml

***1:** 2X Master Mix for Ovine 含有 *Pro Taq*HS DNA Polymerase、dNTP Mixture 与反应 buffer 等。

***2:** Primer Mix for Ovine 含有羊源性 16S rRNA 基因、真核生物 18S rRNA 基因、Internal Control 检测用引物及 Internal Control 模板。

***3:** Probe Mix for Ovine 含有羊源性 16S rRNA 基因、真核生物 18S rRNA 基因、Internal Control 检测用探针, 需避光保存。

***4:** Control DNA for Ovine 为仅含有羊源性成分特异性序列的质粒模板。

➤ 16S rRNA、Internal Control 及 18S rRNA 探针标记及扩增片段大小

扩增基因	探针标记	扩增长度
16S rRNA 基因	5' FAM, 3' BHQ1	234 bp
Internal Control	5' VIC, 3' BHQ1	117 bp
18S rRNA 基因	5' ROX, 3' BHQ2	137 bp

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品将 DNA 聚合酶、dNTP Mixture 与反应 buffer 等试剂配制成一管，操作简单、快捷，可有效降低实验操作过程造成的样品污染的风险，缩短实验所需时间。
2. 本产品采用了性能优越的 *Pro Taq* HS 及优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高的特性。
3. 本产品可在一管内同步检测羊源性 16S rRNA 基因、真核生物 18S rRNA 基因及 Internal Control，可特异性鉴定羊源性成分。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

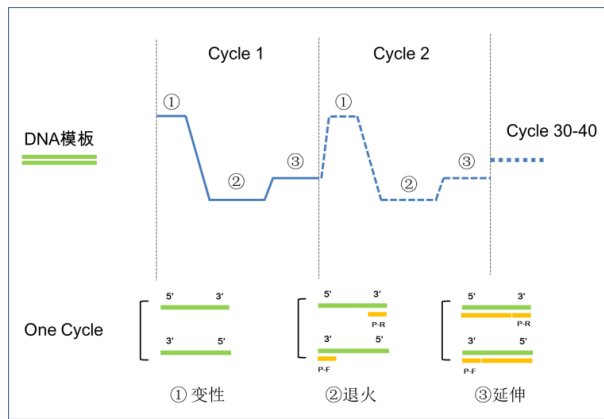
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内可获得大量目的基因片段。扩增详情如下图：

一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30~40 次。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

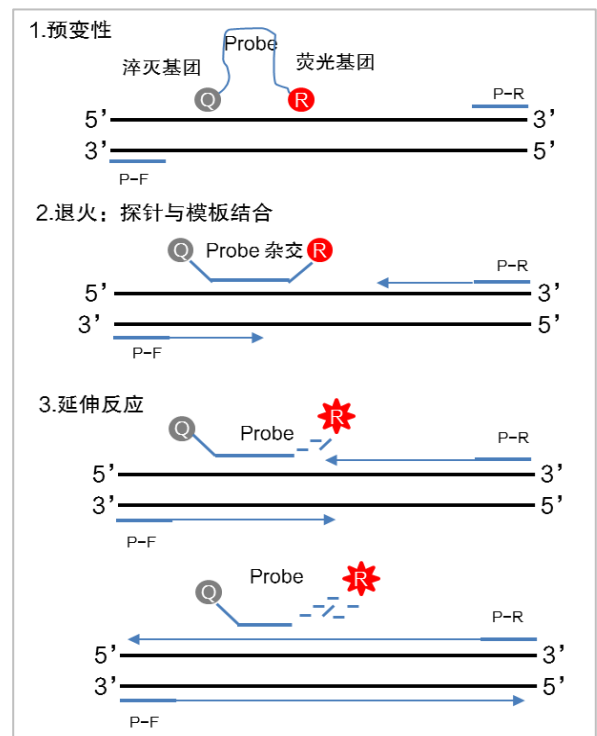
步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



2. 荧光探针 qPCR 检测原理

荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质（如：FAM），3' 端标记有淬灭物质（如：BHQ），当探针保持完整时，5' 端荧光基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5' 端荧光基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。

在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针，使得 5' 端荧光基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。



➤ 使用注意事项

1. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 本产品中 2X Master Mix for Ovine 避免反复冻融，使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低；同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
3. 本产品中 2X Master Mix for Ovine 可能会产生白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。
4. 本产品中 Primer Mix for Ovine、Probe Mix for Ovine、Control DNA for Ovine 请涡旋振荡混匀后使用，其中 Primer Mix for Ovine 含有 Internal Control 模板，实验过程中注意防污染，另外 Probe Mix for Ovine 含探针，需避光保存。
5. 所有反应预混液建议在冰上进行配制。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

引物、探针、水 (RNase-free)、1.5 ml 离心管 (RNase-free)、定量 PCR 管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)、移液器。

➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

1. 实验组别^{*1}

组别	实验目的
Sample	检测是否含有羊源性成分。
Negative Control	排除实验操作过程污染造成假阳性结果, 影响结果判定。
Positive Control	排除实验操作过程失误造成假阴性结果, 影响结果判定。

*1: 建议按照推荐的实验组别进行检测实验。

2. 配制 qPCR 反应液^{*1}

组分名称	Sample	Negative Control	Positive Control
2X Master Mix for Ovine ^{*2}	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
Primer Mix for Ovine	1 μl	1 μl	1 μl
Probe Mix for Ovine	1 μl	1 μl	1 μl
Template	< 100ng ^{*3,4}	- ^{*5}	1 μl ^{*6}
RNase free water	Up to 25 μl	Up to 25 μl	Up to 25 μl

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 使用前可上下颠倒混匀, 请勿涡旋振荡混匀, 防止酶活降低, 同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。

*3: 进行 Sample 检测时, 25 μl 体系里, gDNA 模板添加量通常不高于 100 ng, 必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

*4: 该制品灵敏度极高, 25 μl 反应体系中, 建议将模板稀释后加入 2-5 μl/样本, 以提升实验的准确度及重复性。

*5: 进行 Negative Control 反应时, 用 RNase free water 作为 Template。

*6: 进行 Positive Control 反应时, 使用本产品中 Control DNA for Ovine 作为 Template, 每个反应添加 1 μl; 也可根据扩增的结果稀释 10-100 倍后进行实验。

3. qPCR 反应条件^{*1} (荧光通道选择: FAM、VIC、ROX)

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 ^{*2}	60°C	30 sec	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 此步骤进行荧光信号采集。

➤ 结果判定

为确保检测结果的准确性, 在进行 Sample 检测时, 请务必进行 Negative Control 实验和 Positive Control 实验。

实验结果的判定说明见下表^{*1}:

实验类型	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道	结果判定
Negative Control ^{*2}	-	+	-	/
Positive Control ^{*3}	+	+	-	/
Sample ^{*4}	+	+	+	判定为含有该动物源性成分。
	-	+	+	判定为不含有该动物源性成分或含量低于检测界限。

注意:

*1: 若 CT 值 ≤ 35, 表示阳性 “+”; 若 CT 值 > 35, 表示阴性 “-”。

*2: 对于 Negative Control 组: ①若 FAM 通道为 “+”, 可能是 PCR 反应体系污染, 建议在操作过程中注意防污染并重新进行 PCR 反应; ②若 VIC 通道为 “-”, 可能是实验操作失误或试剂失活; ③若 ROX 通道为 “+”, 由于该通道检测 18S rRNA 基因, 真核生物中普遍存在, 容易扩增, 建议在操作过程中注意防污染。

*3: 对于 Positive Control 组: ①若 FAM 通道为 “-”, 可能是未添加 Control DNA for Ovine 或 Control DNA for Ovine 降解; ②若 VIC 通道为 “-”, 可能是实验操作失误或试剂失活; ③若 ROX 通道为 “+”, 由于该通道检测 18S rRNA 基因, 真核生物中普遍存在, 容易扩增, 建议在操作过程中注意防污染。

*4: 对于 Sample 组: ①若 VIC 通道为 “-”, 可能是检测样品浓度高抑制内参照基因的扩增, 建议稀释样品后再次进行 PCR 反应; ②若 ROX 通道为 “-”, 则可能是样品 DNA 制备有问题, 建议重新提取 DNA 后再次进行 PCR 反应。

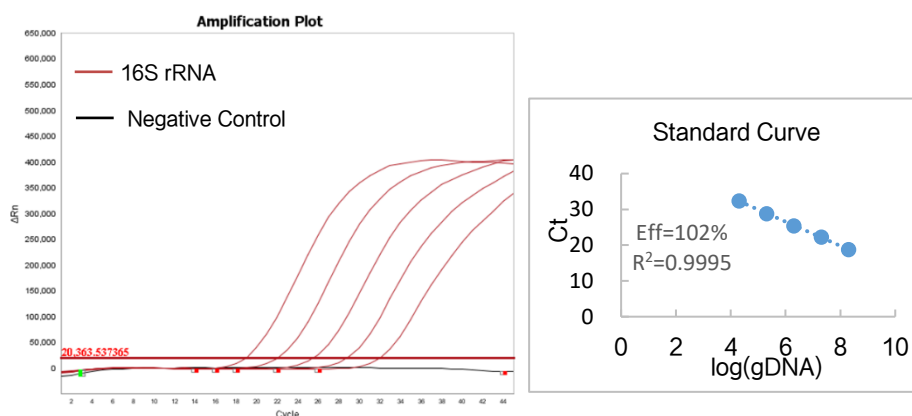
实验例

- 使用本产品对 Ovine gDNA 进行三重检测, 分别检测羊源性 16S rRNA 基因(FAM 通道)、真核生物 18S rRNA 基因(ROX 通道)、Internal Control 基因(VIC 通道)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验组别如下表:

Group	Template
Sample 1	10ng Ovine gDNA
Sample 2	1ng Ovine gDNA
Sample 3	100pg Ovine gDNA
Sample 4	10pg Ovine gDNA
Sample 5	1pg Ovine gDNA
Negative Control	用 RNase free water 代替模板
Positive Control	Control DNA for Ovine

- Sample 组与 Negative Control 组实验结果如下:

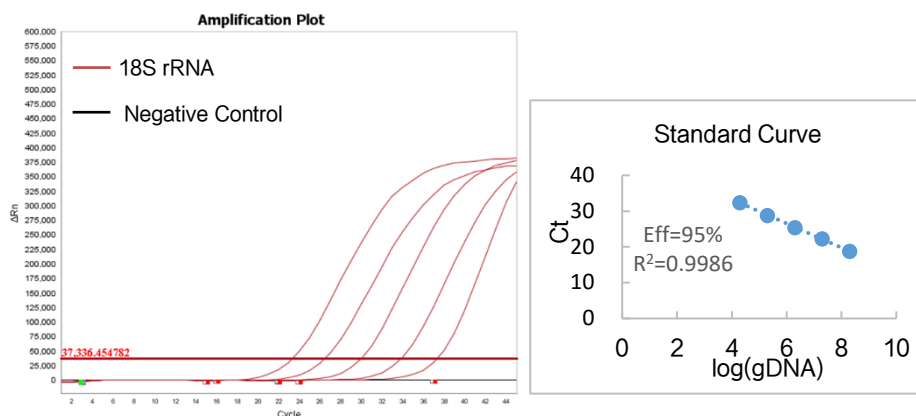
<FAM 通道>



羊源性 16S rRNA 检测结果如上图所示:

- 扩增效率为 102%, $R^2=0.9995$;
- 可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 10 ng-1 pg gDNA 进行 qPCR 反应的扩增曲线呈现良好的线性关系;
- Negative Control 在 45 cycles 内没有检出。

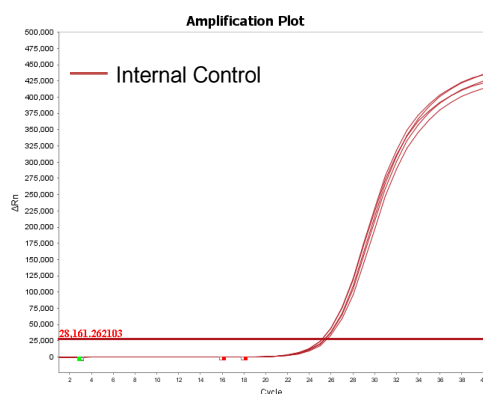
<ROX 通道>



真核生物 18S rRNA 检测结果如上图所示：

- 1、扩增效率为 95%， $R^2=0.9986$ ；
- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng-1 pg gDNA 进行 qPCR 反应的扩增曲线呈现良好的线性关系；
- 3、Negative Control 在 45 cycles 内没有检出。

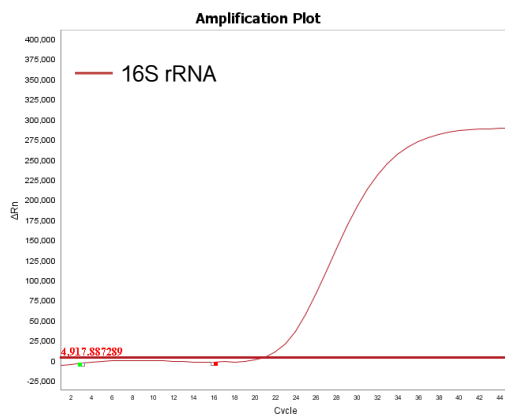
<VIC 通道>



Internal Control 检测结果如上图所示：每个反应孔均正常检出。

2) Positive Control 组实验结果如下：

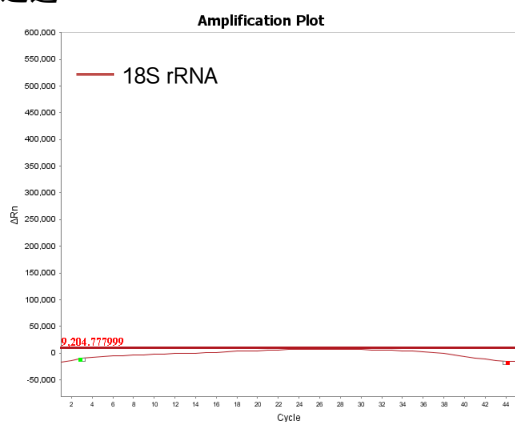
<FAM 通道>



羊源性 16S rRNA 检测结果如上图所示：

1、Positive Control 能获得良好的扩增；

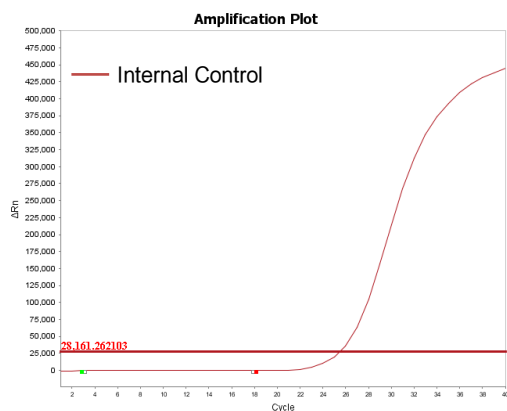
<ROX 通道>



真核生物 18S rRNA 检测结果如上图所示：

1、Negative Control 在 45 cycles 内没有检出。

<VIC 通道>



Internal Control 结果如上图所示：反应孔正常检出。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低：导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高：导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高，扩增曲线异常。可适当降低模板量，可将模板适当稀释后加样。
- ❖ 提供的 Control DNA 由于模板拷贝数较高，扩增曲线平台期可能会略有下降，可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：含有抑制 PCR 反应的物质，会导致扩增结果 Ct 值较大或导致不能扩增，PCR 反应扩增效率较低，可提高模板的稀释倍数或重新制备模板。
- ❖ 模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品-20℃存放可能会产生白色沉淀，使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。