

## SpecIdent 羊源性成分鉴定试剂盒 (探针法)

### SpecIdent Ovine-derived DNA Identification Kit (Probe)

Code No. AG11752

**包装量:** 50 rxns / 25  $\mu$ l  
**保存温度:** -20°C

#### 产品概述

本产品是使用探针法快速鉴定羊<sup>1</sup>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<sup>2</sup>、真核生物 18S rRNA (18S ribosomal RNA) 基因<sup>3</sup>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运行。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

2X Master Mix for Ovine <sup>*1</sup>	625 $\mu$ l
Primer Mix for Ovine <sup>*2</sup>	50 $\mu$ l
Probe Mix for Ovine <sup>*3</sup>	50 $\mu$ l
Control DNA for Ovine <sup>*4</sup>	25 $\mu$ 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 基因与 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。

#### 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或者 -20°C 冰袋运输

#### 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。

#### 实验操作

##### 1、实验组别<sup>\*1</sup>

实验组别	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<sup>\*1</sup>

组分名称	Sample	Negative Control	Positive Control
2X Master Mix for Ovine <sup>*2</sup>	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	< 100 ng <sup>*3,4</sup>	- <sup>*5</sup>	1 μl <sup>*6</sup>
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、反应条件<sup>\*1</sup>

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	1
变性	95°C	5 s	} 45
退火和延伸 <sup>*2</sup>	60°C	30 s	

\*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<sup>\*1</sup>:

实验类型	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道	结果判定
Negative Control <sup>*2</sup>	-	+	-	/
Positive Control <sup>*3</sup>	+	+	-	/
Sample <sup>*4</sup>	+	+	+	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。