

牛、羊源 DNA 实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【目录号】AD-010-050

【用途】

本试剂盒采用探针法三重实时荧光 PCR 方法检测牛、羊源基因组 DNA。根据牛和羊线粒体 DNA 上的 *cytb* 基因的特异片段设计引物及探针，应用三种不同荧光探针染料在同一反应管内进行目的基因和内质控基因的三重检测。本试剂盒牛、羊特异引物和探针在目的基因同源区域进行设计，黄牛、奶牛、牦牛、绵羊和山羊等均可以检测，但检测品种不同，目标序列可能有所差异，因此某些品种可能无法检出。

【试剂盒组成】

组成	25μl 反应×50 次	贮藏条件
阴性对照 (ddH ₂ O)	1 mL	-20℃
牛、羊源阳性对照-E7 copies/μL (PTC)	20 μL	
2×Probe PCR PreMix for Bovine and Ovine	700 μL	
牛、羊源引物、探针、内质控 Mix (引物 Mix)	110 μL	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

- **试剂：**核酸提取试剂。
- **仪器：**掌式离心机、四通道荧光 PCR 扩增仪、-20℃冰箱、可调移液器（2.5μL、20μL、200μL、1000μL）。
- **耗材：**荧光 PCR 反应管、吸头（10μL、200μL、1000μL）。

【使用注意事项】

- 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
- PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。严禁器材和试剂倒流。
- 所有试剂应在规定条件下储存。冻存的试剂使用前应完全融化、混匀，瞬时离心 15s，使液体全部沉于管底，放于冰盒中，吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取，使用后立即放回-20℃冻存。
- 注意防止试剂盒各组分污染。
- 严格遵守操作说明。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制，整个实验过程严格控制污染。
- 避免反复冻融试剂降低检测灵敏度，本试剂盒应尽量在 3 次内用完。

【实时荧光 PCR 操作】

按下表配制 PCR 反应体系。

试剂	添加量（每 25 μ L 体系）
2 \times Probe PCR PreMix for Bovine and Ovine	12.5 μ L
引物 Mix	2 μ L
模板 DNA*	1 μ L
ddH ₂ O	9.5 μ L

*：阳性对照使用试剂配套阳性对照作为模板 DNA 添加，阴性对照使用 ddH₂O 即可。

将以上配制的反应体系充分混匀后，瞬时离心使试剂回到管底，在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：95 °C 10 s；循环 95 °C 5 s，60 °C 30 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 °C 30 s）收集荧光信号（报告基团“牛源基因-FAM、羊源基因-ROX、内质控-HEX”，淬灭基团全部设为 None。使用 ABI 7500 仪器时，由于无 HEX 通道建议用 VIC 通道代替，另外退火时间设置为 31 s）。

【结果判定】

1. 结果分析条件设定

阈值设定原则：仪器自动生成，或者根据具体扩增曲线或仪器噪音情况进行适当调整。另外，为保证实验的准确，在进行样本检测时，建议同时进行阴性对照和阳性对照的扩增。

2. 试验成立条件

阳性对照及内质控基因的 Ct 值均 <35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照均无 Ct 值或者 Ct 值 ≥ 35 且无特异性扩增曲线，判为试验有效，试验无效时建议检查实验操作、使用的设备、耗材或清洁环境和用具后重新进行试验。

3. 结果描述及判定

FAM 通道和 HEX 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为牛源成分阳性，样本含有牛源性成分。FAM 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为牛源成分阴性，不含牛源性成分（或者可能含有可检测范围外牛品种）；FAM 通道 $35 \leq$ Ct 值 <40 并出现特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为牛源成分疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 <40 判为阳性，否则判为阴性。

ROX 通道和 HEX 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为羊源成分阳性，样本含有羊源性成分。ROX 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为羊源成分阴性，不含羊源性成分（或者可能含有可检测范围外羊品种）；ROX 通道 $35 \leq$ Ct 值 <40 并出现特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为羊源成分疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 <40 判为阳性，否则判为阴性。

综合判定结果见下页表格：

综合判定结果	检测结果		
	FAM	ROX	HEX
含有牛、羊源性成分	+	+	+
含牛源性成分，不含羊源性成分	+	—	+
不含牛源性成分，含羊源性成分	—	+	+
不含牛、羊源性成分	—	—	—
试剂失效或者体系配制错误等	—	—	—
阳性质控失效	+/-	+/-	—

注：“+”代表检测阳性；“—”代表检测阴性。

【规格】50 次/盒

【保存及有效期】于-20℃以下保存，有效期为 12 个月。