

上海通蔚

TW—reagent.com 上海通蔚

# 鸟纲通用性别测定探针法 qPCR 试剂盒

Aves Sex Determination Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>鸟类在我们日常生活中十分常见，它在生态、经济和文化等方面都具有重要的价值。地球上大约60%的鸟类是单态性鸟，即雌雄同型，无论是幼鸟还是成鸟都很难从外观形态或其他行为上区分雌雄性别，给人们生产生活带来不便。例如对于肉鸽来说，雄鸽进食量大，但产肉不如雌鸽，故养雌鸽经济效益更高；而对于孔雀来说，雄鸟具有孔雀特有的尾屏，开屏时显得异常艳丽、光彩夺目，其观赏价值远高于雌鸟，因此鸟类的性别鉴定技术的研究和建立具有十分重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测鸟纲性别的试剂盒，<b>它具有下列特点：</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板</li> <li>2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照，用于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性实验。</li> <li>4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。</li> <li>5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据鸟纲基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。</li> <li>7. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的探针法 PCR 反应。</li> <li>8. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																		
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="354 1276 1536 1728"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>Probe qPCR MasterMix</td> <td>500<math>\mu</math>L</td> <td>0.5mL 本色管</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>鸟纲通用性别测定 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)</td> <td>50 次</td> <td>0.5mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>鸟纲通用性别测定 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>50<math>\mu</math>L</td> <td>0.5mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</p> <p><b>注意：</b>引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 216mL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20<math>^{\circ}</math>C 保存。</p>	成分	规格	包装	2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	鸟纲通用性别测定 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕色管	鸟纲通用性别测定 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管	使用手册	1 份	无
成分	规格	包装																	
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色管																	
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																	
鸟纲通用性别测定 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕色管																	
鸟纲通用性别测定 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管																	
使用手册	1 份	无																	
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一、稀释标准曲线样品</b>（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/<math>\mu</math>L 这 6 个 10 倍稀释度为例）。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。</li> </ol>																		

2. 在各管中加入 45 $\mu$ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5  $\mu$ L 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

## **二、样品 DNA 的制备**

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是制备 PC (样品制备阳性对照), 一个是制备 NC (样品制备阴性对照)。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照, 用确认是阴性的样本作为阴性对照。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容, 也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

## **三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu$ L 体系, 在样品制备室进行)**

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照 (直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L

鸟纲通用性别测定 PCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各 3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测样 (含内源性内参)	各 6 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	6 $\mu$ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 6 $\mu$ L

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	4min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ)

#### 四、数据处理

12. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。

13. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。

14. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。

15. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，

	<p>r2 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>16.</b> 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。</p>
<b>PCR 编号</b>	TW-E10240
<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	样品 DNA
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

**技术支持：15800441009**