

**CAT#: GZ14507**

---



# 核桃源性成分染料法荧光定量 PCR 试剂盒

*Walnut--Derived Material* SYBR qPCR Kit

**使用手册 V3.1**

北生京泽（启东）生物科技有限公司  
江苏省南通市启东市启东经济开发区林洋路 500 号  
网址：[www.bsgeneze.com](http://www.bsgeneze.com)；电话：40001-59600

## 💡 产品及特点

本试剂盒可用于检测食品或其他材料中是否有核桃源性成分。现代食品加工工艺极大改变了食材原有的味道、气味、色泽、纹理和质地等特性，因此传统的感官鉴别技术已经无法对食材的真伪进行准确的鉴定。同时部分食材还有致敏性，因此基于基因检测的快速灵敏的食材来源检测技术将对食品监管和安全提供重要的保障。本产品是根据染料法荧光定量 PCR 原理开发的核桃源性成分检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物等组分经过优化，灵敏度高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据核桃源性成分 DNA 高度保守区设计，不会跟其他微生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 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。
6. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的染料法荧光定量 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

## 📋 成分规格

产品组成	编号	规格
2 $\times$ SYBR qPCR Mix	GZ020801	550 $\mu$ L
DEPC-H <sub>2</sub> O	GZ070401	1 mL
荧光模板稀释液	GZ070407	1 mL
核桃源性成分 染料法 qPCR 引物混合液	GZ14507yw	110 $\mu$ L
核桃源性成分染料法 qPCR 阳性对照 ( $1 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu$ L)	GZ14507pc	50 $\mu$ L

## ➤ 保存条件

低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保存期限为一年。阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。

## 使用方法

### 一、DNA 提取(样本制备区)

1. (选做) 如果有 N 个样品待提取, 最好设置 N+2 个提取, 多出的是 PC (样品制备阳性对照) 和 NC (样品制备阴性对照)。可以取阳性对照的 1000 倍稀释液 10 $\mu$ L 再加上一定量的水, 使总体积与待提取样品的规定体积一致, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。

2. 用自选方法提取纯化样品 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。

### 二、稀释标准曲线样品(样本制备区)

(由于阳性对照浓度高, 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行, 避免污染样品或本试剂盒的其他成分)。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O, (最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>8</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 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样品。放冰上待用。

若无需制作标准曲线, 将阳性对照稀释到 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 拷贝/ $\mu$ L 即可。

### 三、试剂配制(试剂准备区)

向各 qPCR 管中分别加入下列成分。

成分	N 个待测样品管	qPCR 阴性对照	qPCR 阳性对照
2 $\times$ SYBR qPCR Mix	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
核桃源性成分染料法 qPCR 引物混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L

注: 需使用 ROX Reference Dye I 的机型: ABI Prism5700、7000、7300、7700、7900、

7900HT、7900HT Fast、Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX Reference Dye II 的机型：ABI Prism 7500/7500Fast、ViiA7, Stratagene MX4000/MX3005P/MX3000P。

不需要使用 ROX 的机型：Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler。

转移至模板添加区。

#### 四、添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 8  $\mu$ L 模板，加样顺序为阴性对照 (DEPC-H<sub>2</sub>O)、待测样品模板、核桃源性成分 qPCR 阳性对照，离心 30 秒，立即进行扩增反应。

#### 五、扩增反应(扩增及产物分析区)

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置，进行扩增，扩增程序如下：

过程	温度	时间
预变性	95°C	10 min
qPCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	60 sec (SYBR 通道采集荧光信号)
按仪器预设程序进行熔解曲线分析		

#### 六、结果分析

1. 如果制作标准曲线，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，推算出其浓度。

2. 如果未制作标准曲线，按照如下标准判定结果：

阳性对照 (1 $\times$ 10E5 拷贝/ $\mu$ L) 结果：Ct 值<30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果：Ct 值>35 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果：Ct 值<33，有明显指数增长，表明样本中检测出核桃源性成分，结果为阳性；Ct 值>35 或无 Ct 值，表明样本中未检测出核桃源性成分，结果为阴性；Ct 值在 33-35 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 33-35 范围，熔解曲线的峰值与阳性对照相同，则该样本判断为阳性；若不相同，熔解 T<sub>m</sub> 值与目的扩增片段 T<sub>m</sub> 值相差  $\geq 2^{\circ}\text{C}$ ，则为非特异性扩增，该样本判断为阴性。