

Code No. CY218

研究用

Takara

CycleavePCR™
肉种判别 Kit (6 种)

说明书

目 录

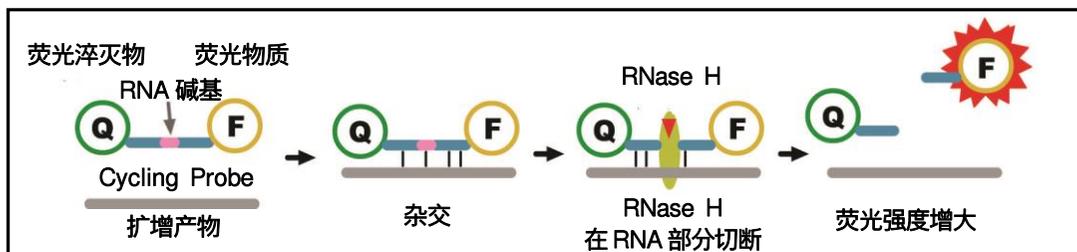
内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒以外所需试剂及仪器	2
● 使用注意	2
● 操作注意	2
● 操作流程	3
● 补充：关于区域划分	8
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

CycleavePCR 肉种鉴定 Kit (6 种) 是以线粒体 DNA 上 Cytochrome C oxidase Subunit I (COX I) 基因区域的动物物种间多态性为基础, 对牛、猪、鸡、马、羊、兔 6 种肉类进行鉴定, 使用 Thermal Cycler Dice Real Time System // 等 Real Time PCR 专用仪器进行扩增检测。

PCR 法是以微量的 DNA 为模板, 对目的基因进行特异性扩增的技术。由 DNA 热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复, 可以在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。使用 Real Time PCR 专用扩增仪可对扩增产物进行实时监测。本制品中的 DNA 聚合酶采用了 Hot Start PCR 专用酶 *Takara Ex Taq HS*, 可以在更短时间内进行高灵敏度的检出, 并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

Kit 中使用了 COX I 区域设计的特异性引物, 对各动物物种进行特异性扩增, 并使用与各物种扩增产物特异性结合的探针进行检测。该检测使用了 Cycling Probe 法, Cycling Probe 法是由 RNA 和 DNA 构成的杂合探针与 RNase H 组合使用的高灵敏度检出法, 能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe 内部含有 RNA 碱基, 一端标记荧光物质, 另一端标记荧光淬灭物质, 当探针处于完整状态时, 由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光, 但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后, RNase H 在 RNA 部分将探针切断, 淬灭抑制作用解除, 荧光物质发出荧光, 通过测定荧光强度, 能够实时监控扩增产物量。制品中目的基因检测用探针使用了 FAM 标记, 内参照检测用探针使用了 ROX 标记, 在同一反应管内对目的基因及内参照 (Internal Control) 同时进行扩增, 通过两种不同荧光标记探针可以对目的基因和内参基因同时检定, 实现双通道同步检测。其中, 对内参照反应的检测, 可以监控反应是否正常进行, 防止假阴性结果的产生。使用 Real Time PCR 进行检测, 无需电泳便可迅速判定结果 (约 80 min)。本制品中含有确认 PCR 扩增反应是否正常的阳性对照用模板、引物和检出用探针, 可确认反应液中有无 PCR 阻害物。



● 制品内容 (25 μl 反应×120 次、各 20 次×6 种)

1. 2×CycleavePCR Reaction Mix (2× conc.)	750 μl × 2 (120 次)
2. Primer · Probe Mix-1 (for beef) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
3. Primer · Probe Mix-2 (for pork) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
4. Primer · Probe Mix-3 (for chicken) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
5. Primer · Probe Mix-4 (for rabbit) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
6. Primer · Probe Mix-5 (for horse meat) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
7. Primer · Probe Mix-6 (for mutton) *1 (5× conc.)	100 μl (20 次)
8. dH ₂ O	1 ml
9. Control DNA for beef *2	50 μl (10 次)
10. Control DNA for pork *2	50 μl (10 次)
11. Control DNA for chicken *2	50 μl (10 次)
12. Control DNA for rabbit *2	50 μl (10 次)
13. Control DNA for horse meat *2	50 μl (10 次)
14. Control DNA for mutton *2	50 μl (10 次)

- *1: 含有荧光标记探针, 要注意避光。
- *2: Control DNA 为确认反应性能的阳性对照, 浓度约为 2 ng/μl。

【反应液组份说明】

2×CleavePCR Reaction Mix: 含有酶、Buffer、dNTP Mixture。

Primer·Probe Mix: 检测各目的基因的引物与探针的混合液, 含有内参照检测用引物和探针。使用引物对目的基因或内参照基因分别进行扩增, 由不同荧光物质标记的探针分别对目的基因或内参照基因进行特异性检出。目的基因检测探针用FAM标记、内参照检测探针用ROX标记。

目的基因: 本Kit可鉴定beef、pork、chicken、rabbit、horse meat、mutton 6种肉种。

内参照: 含有与目的基因序列无关的DNA分子, 用于判断假阴性结果。所有反应体系中都设有内参照, 如果目的基因无检出, 而内参照有检出, 可判定PCR反应无阻碍, 目的基因在检出界限以下。如果目的基因、内参照都无检出, 可判定PCR反应不正常。另外, 目的基因DNA量多时, 目的基因的扩增反应会优先进行, 导致内参照反应起峰较晚、荧光信号强度弱或无信号, 这时判定目的基因为阳性。

dH₂O: 灭菌水。

Control DNA: 各目的基因的阳性对照DNA。

● 保存: -20℃

● 试剂盒以外所需的试剂及仪器

【试剂】

DNA提取试剂

NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10)

NucleoSpin Tissue XS (Code No. 740901.10)

【仪器】

1. Real Time PCR仪及专用Tube*

Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760)

Thermal Cycler Dice Real Time System Software

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

* 建议使用Thermal Cycler Dice Real Time System 专用8联0.2 ml Tube。

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat caps (Code No. NJ600)

2. 小型离心机

【器具】

1. 200 μl、20 μl、10 μl用微量移液枪

2. 微量移液枪专用枪头(附带疏水性过滤膜)

● 使用注意

设计的Probe/Primer序列内发生基因变异、缺失/或插入时, 可能会出现无法检出的情况。

(关于检测结果判定时产生的相关问题, Takara Bio不承担任何责任。)

● 操作注意

- 1) Real Time PCR仪的使用请按照说明书进行。
- 2) 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解, 则不能准确检测。实验者的汗液和唾液也可能会带入核酸酶, 操作中应注意。
- 3) 建议从反应液的配制到检测样品的添加, 设定以下3个实验区域, 并进行物理性隔离(参考“补充:

关于区域划分”)。在各区域要避免开闭含有扩增产物的反应管。

区域 1: 反应液的配制及分装。

区域 2: 检测样品的制备。

区域 3: 向反应液中添加检测样品, 进行反应、检出。

由于本 Kit 使用了 Real Time PCR 的方法, 扩增反应与检测同时进行, 反应后的扩增产物无需进行电泳。另外, 为了避免污染, 严禁从 Tube 中取出扩增产物。

● 操作流程

1. 样品的制备。

使用 DNA 制备 Kit, 从检测样品中提取 DNA。

2. Real Time PCR 仪的准备。

3. 反应液的配制。

配制反应液

↓

将反应液分装到反应 Tube 中, 添加阴性对照、检测样品、阳性对照。

4. 使用 Real Time PCR 仪进行反应, 结果判定。

将反应管放入 Real Time PCR 仪中, 开始反应。

↓

结果显示

画面上表示出 Real Time PCR 扩增曲线

↓

反应完成

↓

结果判定

1. 样品的制备 (在区域2进行)。

(使用DNA制备Kit)

使用NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10) 等DNA制备Kit, 根据说明书进行操作。

(简易法)

1) 将检测样品切碎, 取25 mg放入1.5 ml Tube中。

2) 在25 mg检测样品中加入100 μ l的灭菌水, 盖紧盖, 95°C热处理5 min。

3) 离心 (12,000 rpm 5 min 室温), 取上清, 作为检测样品。用此法制备的检测样品, 有时会对PCR反应产生阻碍或模板量太低而得不到扩增曲线, 需注意。

* 肉类罐头、火腿、香肠、烹饪的汉堡包等使用上述任何一种方法制备的检测样品, 都可以进行6种肉种的判定。

* 如果是生精肉, 建议使用DNA制备Kit, 若使用简易法制备DNA, 会对PCR反应产生阻碍, 造成肉种鉴定困难。

制备的DNA样品使用分光光度计进行浓度测定。使用本Kit进行Real Time PCR反应, 每个反应最大模板添加量在200 ng以下。

2. Real Time PCR仪的准备。

因Real Time PCR仪插入电源后需预热一段时间, 所以在反应液制备之前请插上电源。Real Time PCR仪的设定请参照后面的介绍。

3. 反应液的配制。

本Kit可在一个Tube中同时检出待测样品和内参照的扩增产物 (6种目的基因需分别在不同的Tube中检出)。为得到正确的检测结果, 每种目的基因检测同时都需进行各自的阳性对照和阴性对照实验。

1) 在冰上配制如下反应液。(在区域1进行)

配制除检测样品以外的反应组份(反应管数+ α 管),分装到反应Tube后,再添加检测样品或阳性对照、阴性对照。反应管数是检测样数+2管(阳性对照和阴性对照,阴性对照添加灭菌水)。

试剂	使用量	终浓度
2×CycleavePCR Reaction Mix	12.5 μ l	1×
各Primer·Probe Mix (5×conc.)	5 μ l	1×
检测样品或阳性对照或灭菌水	5 μ l*	
dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 在这个阶段不添加检测样品等模板。

2) 将除检测样品等模板以外的组份(20 μ l)分装到反应Tube中。(移到区域3)

3) 样品(模板)的添加。(在区域3进行)

—管作为阴性对照添加灭菌水,剩余的Tube里添加样品或阳性对照,盖紧盖。

* 因为是定量检测,所以在盖Tube盖时要戴手套,避免污染。

4) 反应管用小型离心机进行轻微离心,放入Real Time PCR仪上。

* 配制完的反应液,尽量在一个小时内进行反应。

4. Real Time PCR反应和结果判定(在区域3进行)。

每种Real Time PCR仪的操作方法有所不同,详细操作方法请参照其说明书。以下简单介绍使用Thermal Cycler Dice Real Time System // (Takara) 及Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 的操作方法及结果判定。

【Thermal Cycler Dice Real Time System //】

1) 创建一个新的运行文件,在“New Experiment Options”窗口选择Experiment Type “Plus/Minus Assay*”。



* : Thermal Cycler Dice Real Time System Software具备Plus/Minus Assay的分析软件。仪器软件需要升级请联系Takara Bio。

2) Thermal Profile Setup界面,按以下PCR条件进行设定。

初期变性(Hold)

Cycle: 1

95°C 10 sec.

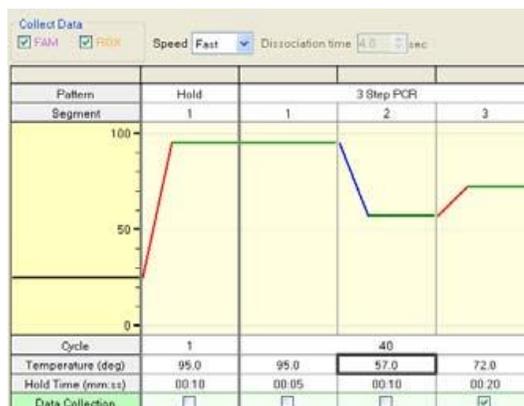
3 Step PCR

Cycle: 40

95°C 5 sec.

57°C 10 sec.

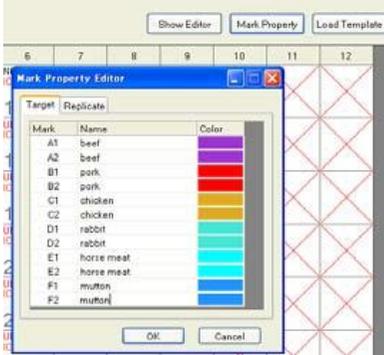
72°C 20 sec. (检出)



3) 点击画面右下方的“Start Run”键，开始反应。



4) 在Plate Setup画面设定样品的信息。反应不使用的Well请设定为Omit Filter。



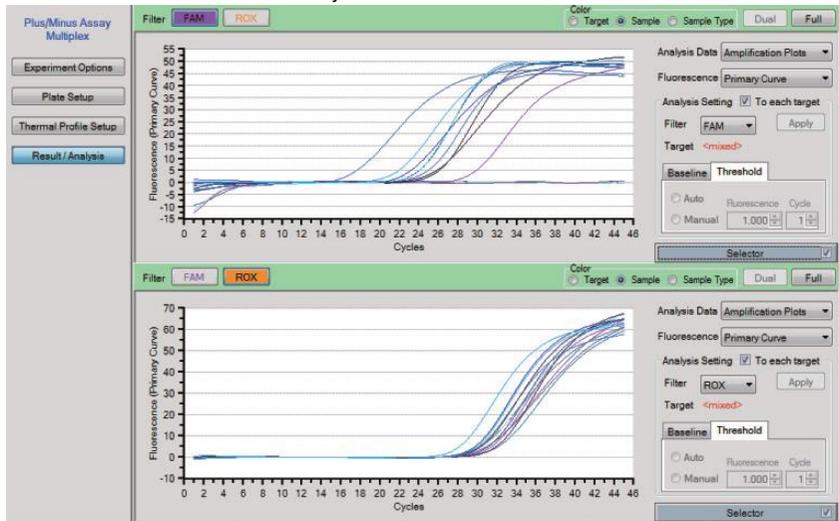
(参考)
Target Mark的A1、A2、B1、B2、.....
中的1表示FAM通道，2表示ROX通道。

Internal Control默认设定为ROX（不可变更）。

为了提高检测可信度，建议使用2管以上进行同一样品检测反应。

5) 结果分析

① 反应结束后，点击Result/Analysis。



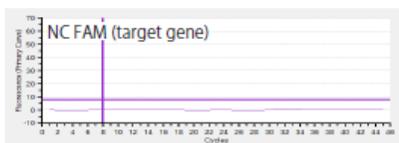
画面的上部分为目的基因检出的FAM通道的扩增曲线，下部分为内参对照（IC）检出的ROX通道的扩增曲线。（阈值显示为Auto）

② 确认 NC（阴性对照）、PC（阳性对照）的扩增曲线。

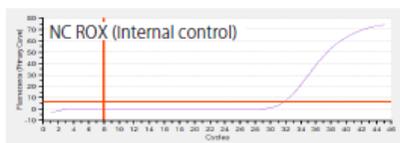
NC 扩增曲线的表示：在"Selector"，选择<N>。

FAM 通道的荧光信号 base line（本底信号）无变化，没有达到阈值。而 ROX 通道有扩增曲线，且超过阈值。

FAM 通道（目的基因检出）



ROX 通道（IC 检出）

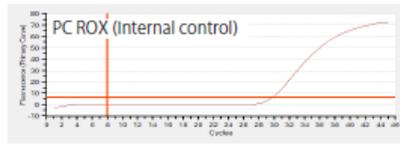
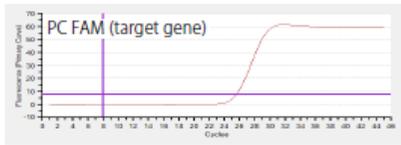


PC 扩增曲线的表示：在"Selector"，选择<P>。

确认 FAM 通道的扩增曲线超过阈值，同时 ROX 通道的扩增曲线也超过阈值。

FAM 通道 (目的基因检出)

ROX 通道 (IC 检出)



③ 样品结果的表示：在"Selector"，选择<U> 确认扩增曲线。

6) 结果表示

在"Analysis Data"选择"Plate Format"。



综合判定结果的表示

阴性对照 <N>、阳性对照 <P>的结果表示：

OK：对照反应正常（表示反应正常进行。）

OUT：对照反应异常（表示反应没有正常进行。）

检测样品 <U> 的结果表示

Posi：目的基因的检出为阳性

Nega：目的基因在检测界限以下

ND：不能判定（PCR 反应不正常）

Internal Control、目的基因都没能检测到，不能判定结果

Error：同一 Replicate 编号的判定结果不同

* 根据是否超过阈值来判定。

【使用Applied Biosystems 7500 Fast Real -Time PCR System】

扩增反应按以下顺序进行。

- 1) 在Advanced Setup界面选择New Experiment。
- 2) 在Experiment Properties选择Quantification-Standard Curve和TaqMan Reagents或其他。（选择Other时，不选择Include Melt Curve的☑）
- 3) 在Plate Setup的Define Target中，Target Name输入beef（或pork, chicken, rabbit, horse meat, mutton）、Reporter选择FAM, Quencher选择（none）。
- 4) 在Plate Setup的Define Target中，Target Name输入IC、Reporter选择ROX、Quencher选择（none）。
- 5) 在Define Samples中输入样品信息：Negative Control（NC）、Positive Control（PC）和Sample。
- 6) 将4)、5)、6) 作成的样品信息添加到Plate Layout。Passive Reference选择（none）。

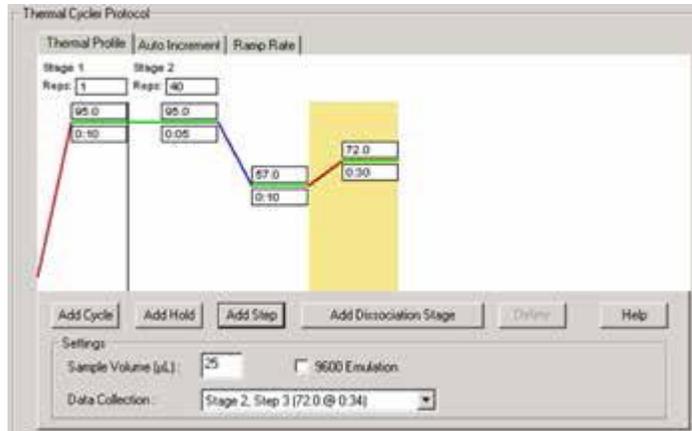
7) 点击Instrument键，输入以下反应条件：

Stage 1: 预变性

Reps: 1
95°C 10 sec.

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40
95°C 5 sec.
57°C 10 sec.
72°C 30 sec. (检出)

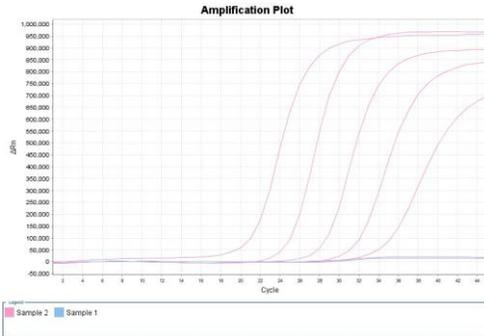


8) 将反应Tube放入PCR仪，点击Start键开始反应。

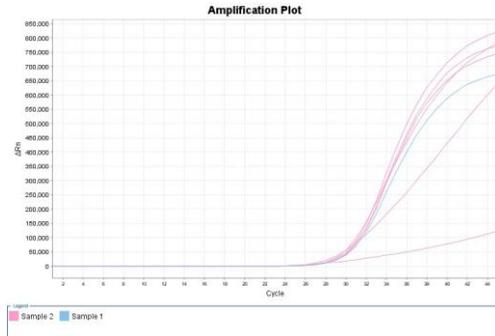
9) 反应结束后在Analysis界面，点击Amplification Plot确认扩增曲线。

(从菜单选择各目的基因)

* 如果需要设定Threshold和Baseline时在Manual 中设定。



目的基因的检出 (FAM)



内参对照的检出 (ROX)

10) 点击 View Well Table 键能得到结果数据。

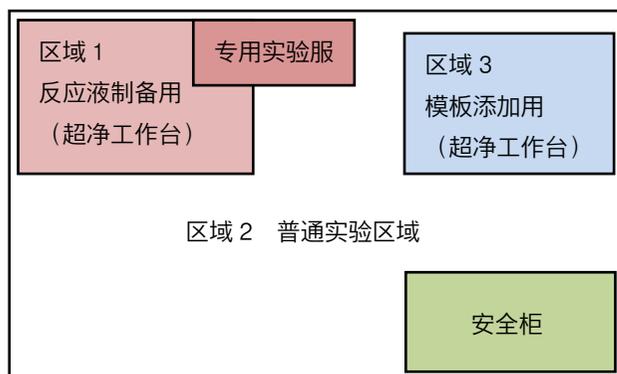
#	Well	Omit	Target Name	Task	Dyes	Cr	Cr Mean	Cr SD	Quantity	Quantity	Quantity	Sample No.
IC												
1	A6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	26.776	26.776					Sample 1
2	B6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	26.749	26.749					Sample 2
3	C6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	26.668	26.668					Sample 2
4	D6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	26.568	26.568					Sample 2
5	E6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	26.506	26.506					Sample 2
6	F6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	25.935	25.935					Sample 2
7	G6	<input type="checkbox"/>	IC	UNKNOWN	ROX-NFG-MGB	25.947	25.947					Sample 2
chicken												
8	A6	<input type="checkbox"/>	chicken	NTC	FAM-NFG-MGB	30.855	30.855					Sample 1
9	B6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	30.050	30.05		1	1		Sample 2
10	C6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	29.704	29.704		10	10		Sample 2
11	D6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	28.323	28.323		100	100		Sample 2
12	E6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	25.273	25.273		1,000	1,000		Sample 2
13	F6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	22.449	22.449		10,000	10,000		Sample 2
14	G6	<input type="checkbox"/>	chicken	STANDARD	FAM-NFG-MGB	Undeterm.			100,000			Sample 2
No Target Name												
15	A1	<input type="checkbox"/>										
16	A2	<input type="checkbox"/>										
17	A3	<input type="checkbox"/>										
18	A4	<input type="checkbox"/>										
19	A5	<input type="checkbox"/>										
20	A7	<input type="checkbox"/>										

* StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作也同上，但 ROX 的检出灵敏度较低，全部目的基因同时表示时，ROX (IC) 的扩增曲线偏低，结果解析时，要将 FAM 和 ROX 标记的目的基因要分别进行解析。

◆ 关于判定结果的注意事项

- 如果在阴性对照反应中，FAM通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定中得到扩增曲线时（在Plate Format中显示为OUT）：
 - 可能有污染，去除反应液配制场所及使用机器的污染后，请再次反应。
- 如果在阳性对照反应中，FAM通道和ROX通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定中得不到扩增曲线（在Plate Format中显示为OUT）：
 - 因某种PCR原因导致PCR反应或Cycling Probe的检出异常，请再次反应。
- 在阳性对照反应的ROX通道下有荧光信号检出，在FAM通道下无荧光信号检出。（在Plate Format中显示为OUT）：
 - Primer·Probe Mix有问题或阳性对照模板有降解。
- 在检测样品的反应中，FAM通道和ROX通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定时都得不到扩增曲线（在Plate Format中显示为ND）：
 - 因某种PCR原因或Cycling Probe的检出异常，请再次反应。
 - 样品中可能混有反应抑制物质，将样品进行稀释或重新制备，再次反应。
- 检测样品在FAM通道有扩增曲线，在ROX通道无扩增曲线：
 - 当目的基因DNA多时，优先进行目的基因的扩增反应，竞争抑制了内参照的扩增反应，这时判定为目的基因阳性，在Plate Format中显示为Posi。
- 因检出对象个体不同，有时扩增区域存在基因突变导致无法检出。

● 补充：关于区域划分



区域 1: 只进行反应试剂、Real Time PCR 反应液的配制及分装（无模板操作区）。

区域 2: 普通实验区域
进行样品处理及 DNA 制备。根据需要设置安全柜。

区域 3: 高浓度 DNA 操作区域
在分装完成的反应液中添加模板 DNA, 标准品的稀释也在此区域进行。

● 参考文献

B. Parodi, O. Aresu, *et. al.*, Species Identification and Confirmation of Human and Animal Cell Lines: A PCR-Based Method, *BioTechniques* **32**: 432-440 (2002)

● 关联产品

Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900/TP960)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760)

96 well Hi-Plate for Real Time (Code No. NJ400)

Sealing Film for Real Time (Code No. NJ500)

Plate Sealing Pads (Code No. 9090)

0.2 ml Hi-8-Tube (Code No. NJ300)

0.2 ml Hi-8-Flat Cap (Code No. NJ302)

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)

48 well snap plate (Code No. NJ700)

Flat cap for snap plate (Code No. NJ720)
NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250)
NucleoSpin Tissue XS (Code No. 740901.10/.50/.250)
NucleoSpin Food (Code No. 740945.10/.50/.250)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.
CycleavePCR and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>