天净沙系列

CAT#:13-99047yd
低温运输，-20℃保存

天净沙

川贝母电泳法 PCR 鉴定试剂盒（PCR-RFLP 药典法）

Bulbus Fritillariae cirrhosae PCR-RFLP Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

川贝母（*Bulbus Fritillariae cirrhosae*）是百合科贝母属的川贝母、甘肃贝母、暗紫贝母、瓦布贝母、梭砂贝母和太白贝母 6 种贝母的干燥鳞茎，有化痰止咳、清热润肺、散结消痈之功效。由于川贝母的药用价值高、疗效显著、市场需求量大，故常有用 5 种其他贝母（如浙贝母、平贝母、伊贝母、湖北贝母等）混充川贝母的现象，因此精准检测川贝母真假具有重要意义。目前川贝母鉴定最常且最准确的由 2015 年版《中国药典》收录的 PCR-RFLP 法，该方法为 PCR 后再进行酶切电泳分析，本公司根据中国药典的方法开发了本产品，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. 产品经过精心优化，分析灵敏度能到达 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性实验。
4. 特异性高，引物是根据川贝母 DNA 高度保守区设计，生物信息学分析发现它只能检测川贝母，不会跟除此之外的其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的常规 PCR 反应。
6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成　份	编号	规格	包装
2×PCR MasterMix	990805	0.5 mL	0.5 mL 本色管
川贝母 PCR 引物干粉	yw13-99047yd	50 次	0.5 mL 白盖管
川贝母 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc99047yd	250 μL	0.5 mL 黄盖管
Sma I（10 U/μL）	13-99047a	50 μL	0.5 mL 红盖管
10×酶切缓冲液	13-99047b	100 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	13-99047ydsc	1 份	1 份

注：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 110 uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 DNA，超纯水。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用试剂盒提供的 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL，本试剂盒提供）10 μL 加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样品体积一样）。可以直接用水作为制备的阴性对照。
2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 DNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。

二、设置 PCR 反应（20 μL 体系）

3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 DNA 样品，额外增加的两个管一个用于 PCR 阳性对照，另一个用于 PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	PCR 阴性对照	PCR 阳性对照
2×PCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
川贝母 PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
N+2 个样品 DNA 模板	各 8 μL	-	-
PCR 阴性对照（水）	-	8 μL	-
川贝母 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	-	-	8 μL

4. 按下表设置 PCR 反应：

过程	温度	时间
预变性	95℃	5 min
PCR 反应（35 个循环）	95℃	30 sec
	55-58℃	30 sec
	72℃	30 sec
最后延伸	72℃	5 min

5. 取上述 PCR 反应液，进行酶切反应。按照下表在各管中加入下列成分：

成分	用量
10×酶切缓冲液	2 μL
Sma I（10 U/μl）	0.5 μL
上述 PCR 反应液	6 μL
水	11.5 μL

	Sma I 酶切体系总体积 | 20 μL 6. 30℃水浴酶切反应 2 小时。 三、电泳检测 7. 取 8 uL 酶切产物进行常规琼脂糖电泳检测，由于酶切产物较短，建议用 1.5%的琼脂糖凝胶。 8. 供试品凝胶电泳图谱中，在与川贝母阳性对照图谱相应的位置上，在 100～250 bp 应有两条 DNA 条带，空白对照无条带。
关联产品	川贝母可视化染料-荧光染料 LAMP 鉴定试剂盒

20230630wmx