天净沙系列

CAT#:15-99165

低温运输，-20℃保存

天净沙

罗汉果探针法 PCR 鉴定试剂盒（不含内参）

Siraitia grosvenorii Probe PCR 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

罗汉果是重要的中药，有重要的经济价值，故掺伪掺杂现象严重，因此，罗汉果成分的快速鉴定具有重要意义。为此，本公司以探针法 PCR 技术为基础开发了罗汉果的 PCR 鉴定试剂盒，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. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，至少可以达到 0.1 ng/反应。
3. 特异性高，引物是根据罗汉果 DNA 高度保守区设计，不会跟其他常见伪混中药的 DNA 发生交叉反应。
4. 提供 PCR 阳性对照，便于排除假阴性结果。
5. 提供一个混伪阴性对照，便于排除假阳性结果。如果需要更多混伪物种的 DNA，需要另购。
6. 本试剂盒只能用于定性检测，不能用于定量分析。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
罗汉果 PCR 引物-探针干粉	yp15-99165	50 次	0.5 mL 棕色管
罗汉果 PCR 阳性对照	3-g99165	50 μL	0.5 mL 黄盖管
混伪阴性对照	3-g99158	50 μL	0.5 mL 紫盖管
使用手册	15-99165sc	1 份	无

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，核酸纯化试剂盒。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N + 2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照，自备，需要用确认是阳性的材料为对照），一个是 NC（样品制备阴性对照，自备，需要用确认是阳性的材料为对照）。
2. 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相关 DNA 纯化试剂盒。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 首次使用本试剂盒时，需要将引物-探针干粉短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水，震荡 30 秒充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的引物-探针混合液需要-20℃保存。

4. 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（混伪阴性对照），1 个用于 PCR 阳性对照（罗汉果 PCR 阳性对照）。

5. 在标记管中按下表加入各成分（注意：待测样本每反应需要至少 1 ng DNA。本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	PCR 阳性对照
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
罗汉果 PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
混伪阴性对照	不加	7 μL	不加
罗汉果 PCR 阳性对照	不加	不加	7 μL

6. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qPCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	5 min.
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec.
	52℃	30 sec.
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

三、数据处理

7. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。

8. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以分析待测样本的数据。

9. 对待测样本，如果其 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 44，则判为阴性。如果小于 44，则判为阳性。

关联服务 中药真伪鉴定服务