



## 家鸽性别测定探针法 qPCR 试剂盒

Columba livia domestica Sex Determination Probe qPCR Kit

货号: JLC\_Y7401

使

用

说

明

书

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>家鸽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。家鸽是单态性鸟，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，给家鸽行业的从业者带来不便。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，但没法通过肉眼进行筛选，因此家鸽的性别鉴定技术的研究和建立具有十分重要的意义。本产品就是以家鸽 CHD (Chromobox-Helicase-DNA Binding Protein, 染色体螺旋蛋白)基因为靶点，设计的专门检测家鸽性别的探针法 qPCR 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家鸽 CHD-W 和 CHD-Z 基因设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。彼此也不会发生交叉反应。</li> <li>6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。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>	<p><b>成分</b></p>	<p><b>规格</b></p>
<p>2<math>\times</math>Probe PCR Magic Mix</p>		<p>500 <math>\mu</math>L</p>	<p>0.5 mL 本色</p>
<p>荧光 PCR 专用模板稀释液</p>		<p>1 mL</p>	<p>1.5 mL 绿盖</p>
<p>家鸽性别测定 PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)</p>		<p>50 次</p>	<p>0.5mL 棕色</p>
<p>家鸽 CHD-W 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</p>		<p>50 <math>\mu</math>L</p>	<p>0.5 mL 黄盖</p>
<p>家鸽 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</p>		<p>50 <math>\mu</math>L</p>	
<p>使用手册</p>		<p>1 份</p>	<p>1 份</p>
<p>本产品使用五孔盒包装</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 220 mL 超纯水充分后再使用，未用完的需要-20<math>^{\circ}</math>C保存。</p>			

## 使用方法

**一、样品 DNA 的制备**

1. 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。
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)**

3. 如果只做 1 次重复实验，则标记 N+3 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 CHD-W 基因 PCR 阳性对照（直接用本试剂盒提供的 CHD-W 阳性对照为模板），1 个用于 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照（直接用本试剂盒提供的 CHD-Z 阳性对照为模板）。
4. 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	CHD-W PCR 阳性对照	CHD-Z PCR 阳性对照
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
家鸽性别测定 PCR 引物-探针 混合液(含内参引物探针)	各 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
N+2 个待测样（自带内源性内参）	各 6 $\mu$ L	不加	不加	不加
家鸽 CHD-W 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ $\mu$ L)	不加	不加	6 $\mu$ L	不加
家鸽 CHD-Z 基因 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ $\mu$ L)	不加	不加	不加	6 $\mu$ L
超纯水	不加	6 $\mu$ L	不加	不加

5. 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°C	4 min.
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec.
	60°C	45 sec (采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道光信号, 淬灭基团均为 BHQ)

#### 四、数据处理

**6. 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。每个反应管均可得到 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 数值和对应的阴性和阳性结果。

**7. 实验有效性判断:** 如果样本制备阳性对照管或/和 PCR 阳性对照管的 FAM 通道信号结果为阴性, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 需要重做扩增或/和核酸制备, 也可以直接跟仪器和试剂厂家联系。如果样本制备阴性对照管或/和 PCR 阴性对照管的 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, 需要分析污染原因并将污染清除。如果两个阳性对照和两个阴性对照结果正常, 说明本次实验有效, 可以进入下一步分析。

**8. 样本 CHD-W 基因检测有效性判断:** 如果待测样本 FAM 通道的结果为阳性, 则无论该样本的 Cy5 通道 (对应内源内参) 的结果是阴性还是阳性, 该样本 FAM 通道的结果有效。如果待测样本管 FAM 通道的结果为阴性, Cy5 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。

**9. 样本 CHD-Z 基因检测有效性判断:** 如果待测样本 HEX 通道的结果为阳性, 则无论该样本的 Cy5 通道 (对应内源内参) 的结果是阴性还是阳性, 该样本 HEX 通道的结果有效。如果待测样本管 HEX 通道的结果为阴性, Cy5 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。

**10. 性别判断:** 如果样本同时为有效的 FAM 阳性和 HEX 阳性, 相当于 CHD-W 和 CHD-Z 均为阳性, 则为雌性。如果样本为 HEX 阳性信号阳性, 相当于 CHD-Z 阳性, 则为雄性。

<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: 上海机纯实业有限公司**

**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: 021-54720761**

**技术支持: 13166274223**