|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:13-99047****低温运输，-20℃保存** |  |
| **川贝母PCR试剂盒**[**Bulbus *Fritillariae* *cirrhosae***](http://www.bingene.com/94221.html)***r* PCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：**[**www.bingene.com**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 川贝母（*Fritillariae Cirrhosae* Bulbus）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。目前川贝母鉴最常且最准确的方法是由2015年版《中国药典》收录的PCＲ-ＲFLP法。该法需要在PCR后进行酶切电泳分析，操作繁琐。因此本公司根据PCR原理开发了本产品，它具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA。
2. 根据川贝母高度DNA保守区域设计引物，能专一性地检测出样品中的川贝母成分，但不能检测其他非川贝母成分。
3. 比ELISA更加灵敏。对混合样品中川贝母DNA的检测下限为1000拷贝/反应。
4. 快速，整个检测过程（按一个样品计）需2.0小时左右。
5. 提供阳性标准品，便于分析实验结果。
6. 本产品足够50次20μL体系的常规PCR检测。
7. 本只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **成 份** | **编 号** | **五孔盒包装** |
| PCR MagicMix 3.0 | 90805 | 0.5 mL（本色管） |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL（蓝盖管） |
| 川贝母PCR引物混合液 | yw13-99047 | 100 μL（白盖管） |
| 川贝母PCR阳性对照（1×10E4拷贝/μL） | pc99047 | 250 μL（黄盖管） |
| 使用手册 | 13-99047sc | 1份 |

 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃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。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | 一、样品DNA的制备1. 用自选方法纯化N+2个样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数DNA提取试剂盒兼容。
2. 如果有N个样品，则需要做N+2个提取，包括一个样品制备阳性对照和一个样品制备阴性对照。样品制备阳性对照是在跟试剂盒所要求的样品体积相当的水中（如果试剂盒一次处理需要200μL样品，则此处使用200μL水），加10μL本试剂盒提供的PCR阳性对照（1×10E4拷贝/μL），样品制备阴性对照是直接用所需量的水。提取结束后最后得到模板DNA放冰上待用。

二、设置PCR反应（20μL体系）1. 对N+2个样品，在PCR时需要增加一个PCR阳性对照和一个PCR阴性对照，故需要设置N+4个反应。在N+4个PCR管中分别加入下列成分：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **N+2个****样品管** | **PCR****阴性对照** | **PCR****阳性对照** |
| PCR MagicMix 3.0  | 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 | - | - |
| 超纯水 | - | 8 μL | - |
| 川贝母PCR阳性对照（1×10E4拷贝/μL） | - | - | 8 μL |

1. 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℃ | 45 sec |
| 54℃ | 45 sec |
| 72℃ | 30 sec |
| 最后延伸 | 72℃ | 10 min |

三、电泳检测1. 取10uL扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，建议用1.5%的琼脂糖凝胶。
2. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为230bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或PCR阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。如果所有样品和PCR阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排查原因。
3. 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。
 |
| **关联产品** | 川贝母荧光及可视化LAMP扩增试剂盒 |

20220301dx