天净沙系列

CAT#:12-1950

低温运输，-20℃保存

天净沙

可可丛枝病菌可视化染料恒温扩增试剂盒

Crinipellis perniciosa Colorimetric Isothermal Amplification Kit

使用手册 V0.52

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

本公司根据独有的可视化恒温扩增技术，开发了简单快捷的可可丛枝病菌可视化恒温扩增检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供 DNA 样品。
2. 恒温扩增，可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 含可见光染料，可以用可见光肉眼判断结果。
4. 检测灵敏性一般比 PCR 高 10 倍以上。
5. 特异性高，根据可可丛枝病菌保守序列设计 6 条特异引物，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 一般 30 分钟内出结果，比 PCR 快。
7. 上样量大，对 20 μL 的反应体系，最大样品加样量高达到 14 μL。
8. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
9. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。
10. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。
11. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的可视化恒温扩增扩增。
12. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，待加酶）	211221a	200 μL	0.5 mL 绿盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 红盖管
20×可可丛枝病菌恒温扩增引物干粉	yw12-1950	50 次	0.5 mL 白盖管
可可丛枝病菌恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc12-1950	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	12-1950sc	1 份	无

注：引物-干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 55 μL 超纯水充分混匀后得到引物混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂

待测样品。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，包括本

公司的免提取的核酸释放剂。

2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照（PC）和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 用 10 μL 本试剂盒提供的阳性对照（1E4 拷贝/μL）加一定量的水作为样品制备 PC，加水后的总体积跟所用核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致。NC 用水替代。

二、恒温扩增反应（20 μL 体系）

3. 反应设置：第一次使用时请把所有 Bst DNA 聚合酶 2.0（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，待加酶）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。如果有 N+2 个 DNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个恒温扩增扩增，增加恒温扩增扩增阳性对照和恒温扩增扩增阴性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	恒温扩增阴性对照	恒温扩增阳性对照
4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
20×可可丛枝病菌恒温扩增引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-
超纯水	-	14 μL	-
可可丛枝病菌恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	-	-	14 μL

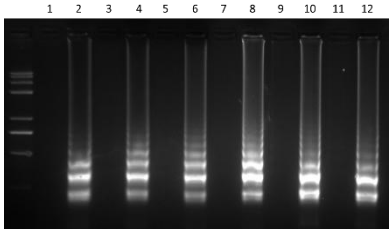
4. 不推荐使用金属浴或水浴，因为其温度波动大，导致假阳性率很高。如果使用金属浴或水浴保温，没有热盖，则每个反应管中加入 50 μL 自备的 PCR 级石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发到管盖下方凝集，反应体积变化，会严重影响反应效率，增加假阳性率。最后置于 65℃保温 60 分钟进行扩增。

5. 如果使用常规 PCR 仪进行恒温扩增反应，设置程序时必须打开热盖，设置成 65℃保温 60 分钟进行扩增。

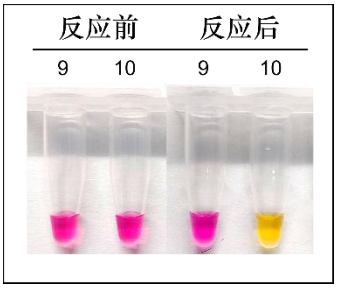
三、结果分析

6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μL 恒温扩增扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。恒温扩增阳性对照必须有正常恒温扩增条带（200 bp 左右的梯形扩增产物），恒温扩增阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果恒温扩增阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴

性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和恒温扩增阳性对照的反应液将呈黄色，样品制备阴性对照和恒温扩增阴性对照的反应液将呈红色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见下图（9 为阴性，10 为阳性）。



关联产品	可可丛枝病菌荧光定量 PCR 试剂盒