天净沙系列

CAT#:211221

低温运输，-20℃保存

天净沙

4×恒温扩增 MasterMix（可视染料法）

4× Isothermal Amplification MasterMix (Colorimetric Method)

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

4×恒温扩增 MasterMix（可视染料法）含有可视化恒温扩增扩增所需的所有成分，可以用于可视化恒温扩增等温扩增。恒温扩增（Isothermal Amplification），利用 4 条模板专一的特异引物和具有链置换能力的 Bst DNA 聚合酶，在等温条件下（63℃左右）30-60 分钟完成扩增。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上能媲美甚至优于定性 PCR 技术，同时还不需要昂贵的仪器设备。目前已成功应用于生物的快速检测，广泛用于各个领域。本试剂盒具有下列特点：

1. 即开即用，含有可视化染料，扩增后可以直接肉眼观察，不需要仪器设备。
2. 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。
3. 4× MasterMix，比对应的 2× MasterMix 能使用能多的扩增模板。最多可达 11 μL，降低漏检的机率。
4. 高扩增效率，一般比 PCR 灵敏一个数量级。
5. 65℃左右等温扩增，不需要贵重仪器。
6. 本试剂盒足够 50 次 20 μL 体系的恒温扩增。
7. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。
8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成 份	编 号	规 格	包 装
4×恒温扩增 MasterMix（含可视化染料，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
阳性对照模板-引物混合物	211202c	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	211202sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

恒温扩增模板、恒温扩增引物

使用方法

1. 制备模板DNA：用于选用合适的方法制备模板DNA。如果有N个样品，最好设置N + 2个样品制备，多出的两个一个是样品制备阳性对照，一个是样品制备阴性对照。
2. 配制5×恒温扩增引物混合液。

   先加超纯水将合成的HPLC级别的下列引物干粉稀释到标准所标注的母液浓度，然后在一新的离心管中按表中所列体积加入各种引物母液和超纯水，最后得到1 mL的5×恒温扩增引物混合液，此混合液足够250次20 μL体系的恒温扩增扩增。如果需要配制的5×恒温扩增引物混合液体积异于1 mL，则各成分的用量请按比例调整。引物混合液

可以在-20℃放置2年。

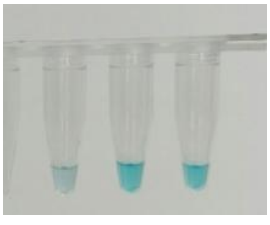
引物名称	母液浓度	加母液量	在 5×恒温扩增 引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 μM	80 μL	8 μM
BIP 引物	100 μM	80 μL	8 μM
F3 引物	100 μM	10 μL	1 μM
B3 引物	100 μM	10 μL	1 μM
Loop F	100 μM	20 μL	2 μM
Loop B	100 μM	20 μL	2 μM
超纯水		780 μL	
终体积		1 mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

3. 在冰上融化4×恒温扩增MasterMix（含可视化染料），混匀，稍离心。第一次使用时，请将50 μL Bst DNA聚合酶2.0全部加入到4×恒温扩增MasterMix中轻柔混匀，然后再使用。如果有N个样品，则在N + 2个反应管中加入以下组份，多出的一管是恒温扩增扩增阳性对照（PC），一管是恒温扩增扩增阴性对照（NC）：

成份	N+2 个样品管	恒温扩增 扩增 PC	恒温扩增 扩增 NC
4×恒温扩增 MasterMix （加酶后）	5 μL	5 μL	5 μL
自备 5×恒温扩增引物混合液	4 μL	不加	4 μL
阳性对照模板-引物混合物	不加	4 μL	不加
自备模板 DNA	1-11 μL	不加	不加
补自备超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

4. 混匀，置于65℃保温60分钟。如果是在PCR仪中保温，必须加热盖。如果用金属浴或水浴保温，没有热盖，必须覆盖50 μL的石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发，严重影响反应效率。
5. 扩增结束后肉眼观察结果判断阴性和阳性。典型的结果见下图：左边管为阴性，右边两个管为阳性。



6. 结果分析：如果本试剂盒提供的阳性对照-引物混合物呈现阳性而阴性对照为阴性，则

	实验有效。如果阳性对照-引物混合物呈现阴性，则操作有问题或者试剂盒有问题，请跟厂家联系。如果阴性对照（水作为模板）也呈现阳性，则说明恒温扩增样品或试剂有过去的扩增产物的污染，需要注意操作的规范性，如果不能解决，可以重新设计引物扩增新的靶片段。 7. 也可以电泳检测实验结果（强烈不推荐此法，因为电泳时产生的气溶胶非常容易污染环境，使得今后用同一引物扩增时产生假阳性）：取5-10 μL扩增产物和自备的上样液混合，上样，进行2-3%的琼脂糖凝胶电泳，有恒温扩增的样品将可见恒温扩增特征性电泳图谱。
注意事项	1. 引物设计对成功扩增十分关键，尽量以保守区设计引物。 2. 引物至少包括 F3/B3 和 FIP/BIP，加入环状引物 F loop/B loop 可以使反应速度大大提高。 3. 应优化引物序列、GC 含量和尽量避免二级结构。 4. 恒温扩增扩增具有特异性好、灵敏度高、时间快、不需要特殊仪器设备等优点。但太高的灵敏度使得其比普通 PCR 扩增更加容易污染导致假阳性。因此，必须高度重视扩增产物的污染。常规措施包括严格的实验分区、使用荧光定量等不开盖检测方法。实验室一旦遭到污染，很难去除，最好重新设计引物扩增新的靶片段。
关联产品	4×荧光染料法恒温扩增试剂盒