天净沙系列

CAT#:16-1950

低温运输，-20℃保存

天净沙

可可丛枝病菌可视化染料-荧光染料恒温扩增试剂盒

Crinipellis perniciosa Colorimetric and Fluorescent Isothermal Amplification 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

本公司开发了简单快捷的可可丛枝病菌双染料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. 含可见光和荧光染料，既可以用可见光肉眼判断结果，也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。
4. 检测灵敏度一般比 PCR 高 10 倍以上。
5. 特异性高，根据可可丛枝病菌 DNA 保守序列设计 4 条特异引物，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 一般 60 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 体系的荧光及可视化恒温扩增扩增。
12. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
4×恒温扩增 Master Mix （可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）	211223a	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冻干粉	yw16-1950-ITS-sl-5	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）	pc1950-EU047936-ITS	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	16-1950sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 1 年。

自备物品

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（PPC，用确定为阳性的样本为起始材料）和一个样品制备阴性对照（PNC，用确定为阴性的样

本为起始材料）。

二、恒温扩增反应（20 μL 体系）

3. 首次使用本试剂盒时，先短暂离心装引物-探针冻干粉的离心管，然后加入 55 μL 超纯水充分混匀，得到 20×可可丛枝病菌恒温扩增引物混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

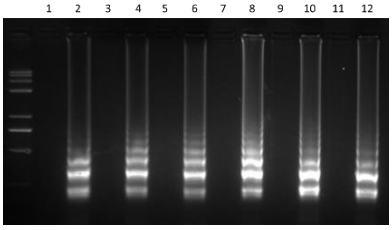
4. 反应设置：第一次使用本试剂盒时，请把所有 Bst DNA 聚合酶 2.0（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。如果有 N + 2 个 DNA 纯化样品，则最好设置 N + 4 个恒温扩增扩增。多出的两个分别用于恒温扩增扩增阳性对照和恒温扩增扩增阴性对照。在 N + 4 个 PCR 管中加入下列成分：

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-荧光染料，已加酶）	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	不加	不加
超纯水	不加	14 μL	不加
第 2 步所得阳性对照的 10 倍稀释液	不加	不加	14 μL

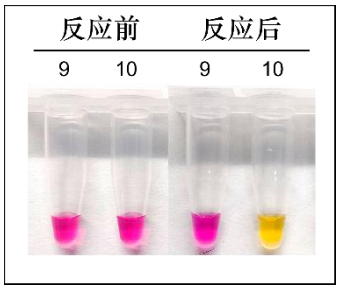
5. 放荧光定量 PCR 仪中进行扩增。循环参数是 60 次循环，每个循环为 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。不推荐使用金属浴或水浴，因为其温度波动大，导致假阳性率很高。

三、结果分析

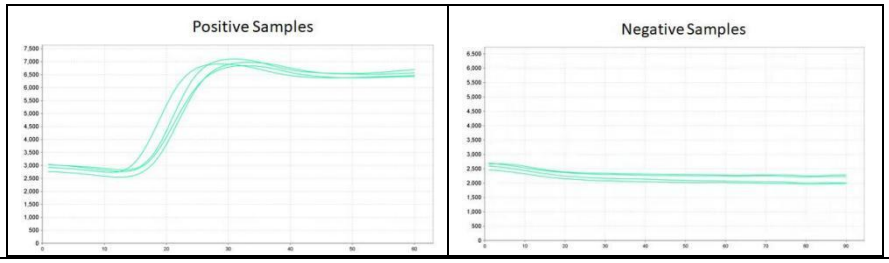
6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μL 恒温扩增扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。恒温扩增阳性对照必须有正常恒温扩增条带（200 bp 左右的梯形扩增产物），恒温扩增阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果恒温扩增阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下图，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可见光（肉眼）分析：PPC 和恒温扩增阳性对照的反应液必须呈黄色，PNC 和恒温扩增阴性对照的反应液必须呈红色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性对照结果呈阳性，阴性对照结果呈阴性，则实验有效，可以继续分析待测样品的情况。若待测样品管的颜色接近恒温扩增阳性对照管，则说明样品为阳性；若接近恒温扩增阴性对照，则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见下图（9 阴性、10 阳性）。



8. 荧光分析（仅限于用 qPCR 仪进行反应的场景）：PPC 和恒温扩增阳性对照的反应液将有标准的 S 扩增曲线，PNC 和恒温扩增阴性对照的反应液将没呈平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性对照结果呈阳性，阴性对照结果呈阴性，则实验有效，可以继续分析样品的情况。若待测样品的荧光曲线为 S 型，则该样品为阳性，如果为平线，则该待测样品为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。



关联产品 可可丛枝病菌探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）