天净沙系列

CAT#:16-81310

低温运输，-20℃保存

天净沙

长枝木霉可视化染料-荧光染料恒温扩增试剂盒

Trichoderma longibrachiatum 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长枝木霉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，根据长枝木霉 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。
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×长枝木霉恒温扩增引物冻干粉	yw16-81310zsr	50 次	0.5 mL 白盖管
长枝木霉恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc81310-KF595263-TUBB1	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	16-81310sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

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×长枝木霉恒温扩增引物混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

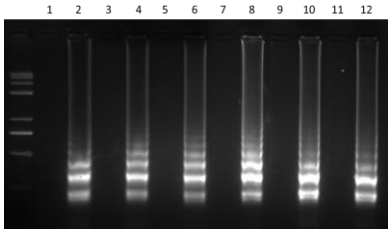
4. 反应设置：第一次使用本试剂盒时，请把所有 Bst DNA 聚合酶 2.0（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。如果有 N + 2 个 DNA 纯化样品，则最好设置 N + 4 个恒温扩增。多出的两个分别用于恒温扩增阳性对照和恒温扩增阴性对照。在 N + 4 个 PCR 管中加入下列成分：

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×长枝木霉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

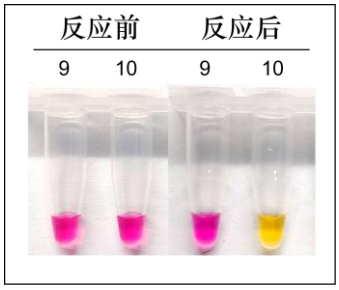
5. 放荧光定量 PCR 仪中进行扩增。循环参数是 60 次循环，每个循环为 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。不推荐使用金属浴或水浴，因为其温度波动大，导致假阳性率很高。

三、结果分析

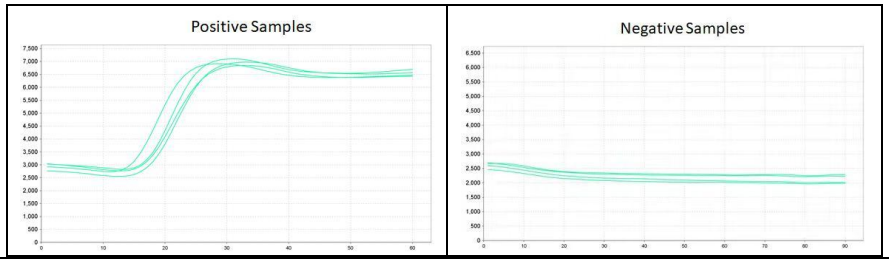
6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μL 恒温扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。恒温扩增阳性对照必须有正常恒温扩增条带（200 bp 左右的梯形扩增产物），恒温扩增阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果恒温扩增阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下图，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



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	长枝木霉探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）