天净沙系列

CAT#:220305

低温运输，-20℃保存

天净沙

4× RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法）

4× RNA Isothermol Amplification MasterMix (Probe Method)

使用手册 V0.5

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× RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法）含有荧光探针 RNA 恒温扩增所需的所有成分，可以对靶片段进行实时定量 RNA 恒温扩增分析。本试剂盒具有下列特点:

1. 即开即用，含有本公司开发的 RNA 恒温扩增专用荧光探针，专一性强。
2. 在荧光定量 PCR 仪器上进行扩增时，可以实时跟踪扩增过程，但不宜用于定量（这是 RNA 恒温扩增技术决定的）。
3. 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。
4. 高灵敏度，一般比 PCR 灵敏高一个数量级（取决于引物的筛选）。
5. 4×MasterMix，最多可加入 12 μL 模板，降低漏检率。
6. 本试剂盒足够 50 次 20 μL 体系的 RNA 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

本产品使用 5 孔盒包装

成份	编号	规格	包装
4× RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法，待加酶）	220305a	200 μL	0.5 mL 绿盖管
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μL	0.5 mL 红盖管
RNA 恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	220402	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	220305sc	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

RNA 恒温扩增模板、RNA 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. 配制自备的20×RNA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下表所标注的母液浓度，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0.1 mL的20×RNA恒温扩增引物混合液，此混合液足够100次20 μL体系的RNA恒温扩增。如果需要配制的20×RNA恒温扩增引物混合液体积异于0.1 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 20×RNA 恒温扩增引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 μM	32 μL	32 μM
BIP 引物	100 μM	32 μL	32 μM

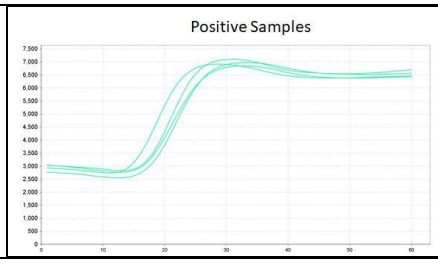
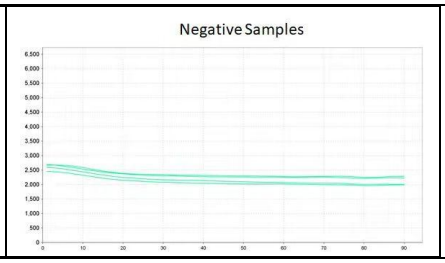
F3 引物	100 μM	4 μL	4 μM
B3 引物	100 μM	4 μL	4 μM
Loop F	100 μM	8 μL	8 μM
Loop B	100 μM	8 μL	8 μM
超纯水		12 μL	
终体积		0.1 mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

3. 在冰上融化4×RNA恒温扩增MasterMix（探针法，待加酶），混匀，稍离心。第一次使用时，请将100 μL逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到4×RNA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RNA恒温扩增阳性对照（PC），一管是RNA恒温扩增阴性对照（NC）：

成份	N+2 个样品管	RNA 恒温扩增扩增 PC	RNA 恒温扩增扩增 NC
4×RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法，加酶后）	各 6 μL	6 μL	6 μL
自备 20×RNA 恒温扩增引物混合液	各 2 μL	不加	2 μL
RNA 恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	不加	4 μL	不加
自备模板 DNA	1-12 μL	不加	不加
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

4. 混匀，置于荧光定量PCR仪器中65℃保温60分钟，每分钟采集一次SYBR通道的荧光信号。如果荧光定量PCR仪不能设置RNA恒温扩增参数，可以把变性复性和扩增三个温度都设置为65℃，三个步骤的总时间为1分钟即可，共60个循环，在任何一步采集荧光信号即可。
5. 结果分析：实验有效性判定。如果两个阳性对照能够得到标准的S型扩增曲线而两个阴性对照都没有扩增，则实验有效，才有必要对样品进行分析。如果阳性对照没有出现S型扩增曲线，则说明试剂盒可能失效，实验无效。如果阴性对照有S型扩增曲线，则说明RNA恒温扩增引物设计得不好，有非特异扩增，需要重新优化引物。也可能是环境或试剂有污染，实验无效。遇到实验无效的情况，请跟厂家客户联系，分析原因后再恢复实验。
6. 如果实验有效，则分析样品。凡是有S扩增曲线的，可以判断为阳性。凡是没有S扩增曲线的，可以判断为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性结果，扩增曲线为S型，右边为阴性结果，扩增曲线不呈S型。

			
关联产品	RNA 恒温扩增饱和荧光染料		

20260806qjy