天净沙系列

CAT#:211223-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

4×恒温扩增 MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，红黄色变）

4× Isothermol Amplification MasterMix (Colorimetric-SYBR Method，Red Yellow Change)

使用手册 V1.1

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

本产品是整合可视化恒温扩增和荧光染料恒温扩增而成的产品，它既可以用于荧光染料法恒温扩增及检测，也可以用于可视化恒温扩增及检测，适用于各种针对核酸的快速定性检测。本产品具有下列特点：

1. 65℃恒温扩增，不需要贵重的仪器设备，只需要恒温水浴或金属浴。
2. 一般 60 分钟内出结果（具体时间取决于靶分子的浓度）。
3. 最大样品加样量高达到 14 μL（对 20 μL 的反应体系），减少了漏检机率。
4. 含可视化染料和荧光染料，故既可以用肉眼终点判断结果（终点法可视化恒温扩增），也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测（实时荧光恒温扩增）。
5. 灵敏性可达 10 拷贝/反应以下（跟引物设计密切相关），故假阴性率更低。
6. 只能进行定性检测，不建议用于定量检测。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光及可视化恒温扩增。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用 5 孔盒包装

成份	编号	规格	包装
4×恒温扩增 MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法， 红黄色变，待加酶)	211223-2a	200 μL	0.5 mL 绿盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 红盖管
恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	220402	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	211223-2sc	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

恒温扩增模板、恒温扩增引物、qPCR 仪。

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，也可以选购本公司的各种免提取的核酸释放剂。
2. 如果有 N 个样品，则至少需要做 N+2 个样品制备，多出的两个一个是样品制备阳性对照（用确认是阳性的样本为起始材料）和一个样品制备阴性对照（用确认是阴性性的样本为起始材料）。N+2 个样品一起进行提取得到 N+2 个 DNA 样本。

二、配制并测试自备的20×恒温扩增引物混合液

3. 用超纯水将自备的 4-6 种恒温扩增引物干粉分别稀释到 100 μM，然后按下表配制 100 μL 的 20×恒温扩增引物混合液：

引物名称	母液浓度	配制 100 μL 混合液所需量	在 20×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
自备超纯水		12 μL	

注意：如果设计的恒温扩增引物不含Loop引物，则其加入体积用超纯水替代。

4. 测试引物的专一性：用 qPCR 仪器做加模板和不加模板（至少 1000 拷贝/反应）的荧光恒温扩增反应，测试每套恒温扩增引物的专一性。无模板反应的 Ct 值比有模板反应的 Ct 值相差越大，恒温扩增引物的非特异扩增就越低，专一性就越强。用户需要根据每套恒温扩增引物的测试结果设定该套恒温扩增阴性和阳性的阈值(本产品只用于定性)。如果没有 qPCR 仪器，只能用肉眼检测法来筛选引物，则扩增 1 小时后加模板的反应呈现黄色，不加模板的反应呈现淡红色的引物，就可以使用。扩增后都呈现黄色的引物，有非特异扩增，不能使用。都呈现淡红色的引物，没有扩增，也不能使用，上述两种情况均需要重新设计。

三、恒温扩增（20 μL 体系）

5. 预先将保温设备调到 65℃。

6. 反应设置：第一次使用时请把所有 Bst 酶（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+5 个恒温扩增，增加扩增阳性对照、无模板阴性对照、无引物无模板阴性对照各 1 个。在 N+5 个 0.2 mL 的 PCR 管中按下表加入下列成分：

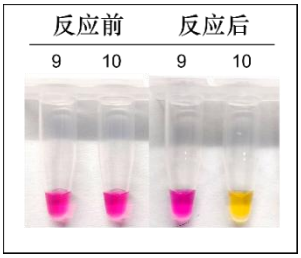
成分	N+2 个样品管	无模板阴性对照管	扩增阳性对照管
4×恒温扩增 MasterMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
第 3 步得到的 20×引物混合液	各 1 μL	1 μL	-
第 2 步得到的 N+2 个样品 DNA	1-14 μL	-	-
恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	-	-	4 μL
超纯水	补到 20 μL	补到 20 μL	补到 20 μL

7. 如使用金属浴、水浴或普通无热盖 PCR 仪，则每管再加 50 μL 自备石蜡油。如不加石蜡油，保温期间水分会蒸发，非特异扩增会增加。如果使用带热盖的 PCR 仪器，则不需要加石蜡油。

8. 立即放到 65℃并保温 90 分钟。如果使用荧光定量 PCR 仪：聚合温度设为 65℃，1 次循环 1 分钟，90 个循环，每分钟在 SYBR 通道采集一次荧光信号。

三、可视化结果分析及解读

9. 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。

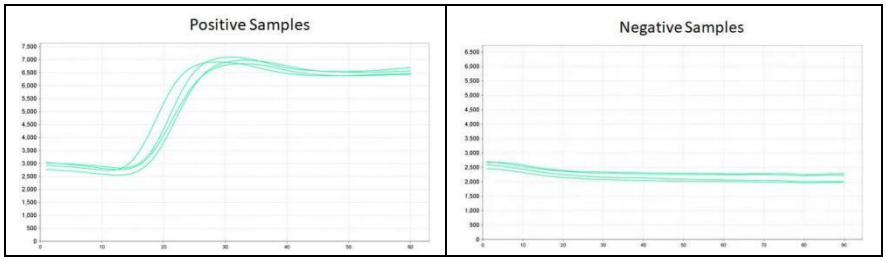


10. 结果分析：如果本试剂盒提供的阳性对照-引物混合物呈现阳性而阴性对照为阴性，则实验有效。如果阳性对照-引物混合物呈现阴性，则操作有问题或者试剂盒有问题，请跟厂家联系。如果阴性对照（水作为模板）也呈现阳性，则说明恒温扩增样品或试剂有过去的扩增产物的污染，需要注意操作的规范性，如果不能解决，可以重新设计引物扩增新的靶片段。

四、荧光染料法结果分析及解读

11. 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。此时请跟厂家客户联系。

12. 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。



13. 当实时荧光检测和可视化检测同时使用时，如果不一致，以实时荧光恒温扩增的数据为准。一般可视化结果滞后实时荧光检测结果 20-30 分钟，也就是说，在 qPCR 仪上第 30 分钟时呈现阳性的样品，其颜色变化在第 50-60 分钟时才能观察到。

关联产品	免核酸纯化病毒保存液