天净沙系列

CAT#:211221-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

4×可视化染料恒温扩增预混液（红黄色变）

4×Colorimetric Isothermal Amplification Premix (Red Yellow Change)

使用手册 V1.01

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 4×可视化染料恒温扩增预混液（红黄色变），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。
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，可以用肉眼终点判断结果（终点法可视化恒温扩增）。
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

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
4×可视化染料恒温扩增预混液，待加酶（红黄色变）	211221-3a	200 μL	0.5 mL 棕盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 黄盖管
恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	220402	50 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	211221-3sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂

恒温扩增模板及恒温扩增引物。

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，则按上表配制时Loop引物用超纯水替代，使得总体积为100 μL。

4. 测试引物的专一性：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：第一次使用请把所有 Bst 酶（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×可视化染料恒温扩增预混液，待加酶（红黄色变）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。如有 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：

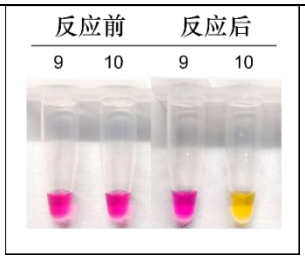
成分	N+2 个 样品管	无模板阴性 对照管	扩增阳性 对照管
4×可视化染料恒温扩增预混液 （加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
自备 20×引物混合液	各 1 μL	1 μL	-
自备的 N+2 个 样品 DNA	1-14 μL	-	-
恒温扩增阳性对照 模板-引物混合物	-	-	4 μL
超纯水	补到 20 μL	补到 20 μL	补到 20 μL

7. 不推荐使用金属浴或水浴，因为温控不准确，会导致假阳性。推荐使用 PCR 仪，无热盖款需每管再加 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。

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。

关联产品	免核酸纯化病毒保存液