天净沙系列

CAT#:211222

低温运输，-20℃保存

4×恒温扩增 MasterMix（荧光染料法）

4× Isothermol Amplification MasterMix (Fluorescent Method)

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

本产品是荧光染料法的 4×恒温扩增 MasterMix，可以用于荧光染料法恒温扩增。恒温扩增（Isothermal Amplification），利用 4 条模板专一的特异引物和具有链置换能力的 Bst DNA 聚合酶，在等温条件下（63℃左右）30-60 分钟完成扩增。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上能媲美甚至优于定性 PCR 技术，同时还不需要昂贵的仪器设备。目前已成功应用于生物的快速检测，广泛用于各个领域。本试剂盒具有下列特点:

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. 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。
5. 只能进行定性检测，不建议用于定量检测。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光染料法恒温扩增。
7. 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 (荧光染料法，待加酶)	211222a	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	211222sc	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）。

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（荧光染料法，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：

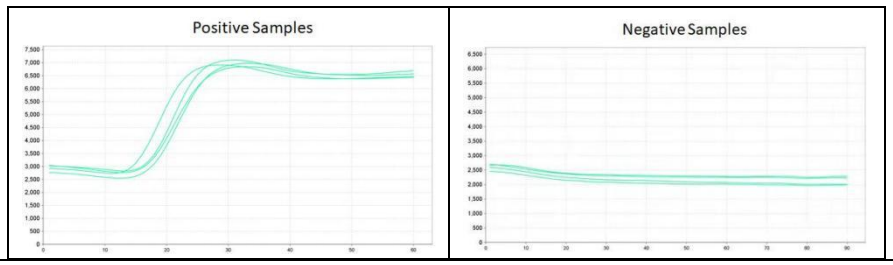
成分	N+2 个样品管	无模板阴性对照管	扩增阳性对照管
4×恒温扩增 MasterMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
第 3 步得到的 20×引物混合液	各 1 μL	1 μL	-
第 2 步得到的 N+2 个样品 DNA	1-14 μL	-	-
恒温扩增阳性对照模板-引物混合物	-	-	4 μL
超纯水	补到 20 μL	补到 20 μL	补到 20 μL

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。

四、荧光染料法结果分析及解读

9. 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。

10. 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	免核酸纯化病毒保存液