天净沙系列

CAT#:211224

低温运输，-20℃保存

天净沙

4×RNA 恒温扩增 MasterMix(可视化染料-荧光染料双染料法)

4× RNA Isothermal Amplification MasterMix (Colorimetric-SYBR 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

RNA 恒温扩增 MasterMix（可视染料-荧光染料双染料法）含有可视化 RNA 恒温扩增和荧光 RNA 恒温扩增所需的所有成分，可以同时用于可视化和荧光 RNA 恒温扩增等温扩增。RNA 恒温扩增即 Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification（逆转录-环介导等温扩增），它利用 4 条模板专一的特异引物、逆转录酶和具有链置换能力的 Bst DNA 聚合酶，在等温条件下(65℃左右) 30－60 分钟完成逆转录和恒温扩增扩增。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 RT-PCR 技术，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. 即开即用，含有可视化染料和荧光染料两种染料，扩增后可以直接肉眼判读，也可以实时荧光检测（需要荧光 PCR 仪）。
2. 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。
3. 高扩增效率，一般比 RT-PCR 灵敏一个数量级。
4. 65℃左右同时完成逆转录和等温扩增，一步式操作。
5. 本试剂盒足够 50 次 20 μL 体系的双染料 RNA 恒温扩增。
6. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。
7. 20 μL 体系最多可以使用 13 μL 样本，减少漏检。
8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。

规格及成分

本试剂盒使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
RNA 恒温扩增 MasterMix （可视化染料-荧光染料，待加酶）	211224a	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
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	211224sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

RNA 模板、RNA 恒温扩增引物

使用方法

1. 制备模板RNA：用于选用合适的方法制备模板RNA。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标准所标注的母液浓度，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×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。

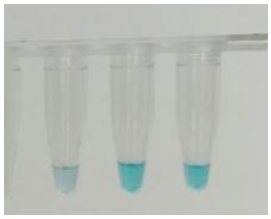
3. 在冰上融化RNA恒温扩增MasterMix（含可视化染料和荧光染料，待加酶），混匀，稍离心。第一次使用时，请将100μL逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到RNA恒温扩增MasterMix中并轻柔颠倒混匀1分钟，然后再使用。如果有N个样品，则在N+2个反应管中加入以下组份，多出的一管是RNA恒温扩增阳性对照（PC），一管是RNA恒温扩增阴性对照（NC）：

成分	N+2 个样品管	RNA 恒温扩增 PC	RNA 恒温扩增 NC
RNA 恒温扩增 MasterMix（加酶后）	6 μL	6 μL	6 μL
自备 20×RNA 恒温扩增引物混合液	1 μL	不加	1 μL
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 RNA	1-13 μL	不加	不加
补自备超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

4. 混匀，荧光PCR仪器上65℃保温60分钟，每分钟采集1次SYBR通道的荧光信号。

三、可视化结果分析及解读

5. 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。

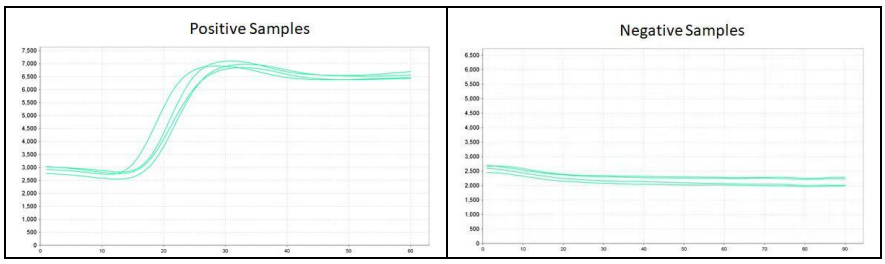


6. 结果分析：如果本试剂盒提供的阳性对照-引物混合物呈现阳性而阴性对照为阴性，则实验有效。如果阳性对照-引物混合物呈现阴性，则操作有问题或者试剂盒有问题，请跟厂家联系。如果阴性对照（水作为模板）也呈现阳性，则说明恒温扩增样品或试剂有过去的扩增产物的污染，需要注意操作的规范性，如果不能解决，可以重新设计引物扩增新的靶片段。

四、荧光染料法结果分析及解读

7. 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。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。

8. 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。



9. 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	恒温扩增饱和荧光染料