



DNA 恒温快速扩增试剂盒（荧光型）使用说明书

【产品名称】

通用名称：DNA 恒温快速扩增试剂盒（荧光型）

【包装规格】

货号：EDN-DY01

规格：48 份/盒

【原理概述】

本试剂盒基于一种常温恒温核酸快速扩增技术：在常温恒温下（一般为 39 °C~42 °C），在辅助蛋白和单链结合蛋白的帮助下，重组酶和引物形成复合体；进行同源搜索并结合目的同源域，此时在该同源位置形成 D-loop 区并开始进行链交换；伴随着重组酶从复合体上解离，聚合酶也结合到引物的 3'末端，开始链的延伸。同时依赖核酸外切酶的作用，加入根据模板设计的特异的分子探针，使用荧光监测设备能实现对目标片段扩增过程的实时监控。

【产品特点】

本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、反应时间短（仅需 20 min）等优点，反应组分为干粉状态，操作简便，易于保存。

可适用于各种品牌的荧光定量 PCR 仪、恒温荧光扩增仪器等荧光检测设备。

【引物设计】

建议使用长度在 30-35 bp 的引物，引物过短会影响扩增速度和检测灵敏度；引物设计避免形成二级结构而影响扩增；扩增子长度建议在 150-300 bp。

【荧光探针设计】

探针序列不与特异性引物识别位点重叠，长度为 46-52 nt，序列避免回文序列、内部二级结构和连续的重复碱基。探针共有四

个修饰位点：距离 5'端的约 30~35 nt 的中部位置标记一个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为核酸外切酶的识别位点；THF 位点的上游标记一个荧光基团，下游标记一个淬灭基团，两个基团的间距为 2-4 nt；THF 距离 3'末端约 15 nt，并且 3'末端标记一个封闭基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer。

【试剂盒组成】

组成	含量
A buffer	1.6 mL×1 管
B buffer	150 μL×1 管
正对照模板	100 μL×1 管
正对照引物探针 Mix	70 μL×1 管
试剂	48 份
使用说明书	1 份

【试剂盒储存】

1. 运输温度：≤ 20 °C 的恒温环境；
2. 储存条件：储存温度 ≤ -20 °C（± 5 °C）恒温环境，避光保存，避免重压、反复冻融；
3. 产品有效期：14 个月；
4. 生产日期见外包装。

【操作步骤】

提前将试剂盒所需组分组取出，室温融化，震荡混匀。

- (1) 每个干粉反应管加入 29.4 μL A buffer（注意：A buffer 需完全融化混匀，否则会对实验效果产生影响）；
- (2) 每个反应管分别加入 2 μL 上游引物、2 μL 下游引物和 0.6 μL 探针（引物和探针浓度为 10 μM，对于多个反应、步骤 1 和步骤 2 可以混合后再分装至反应管中）；



- (3) 向反应管中依次加入 5 μL 核酸模板和 8.5 μL ddH₂O（可根据实际需求调整加入模板的体积，并相应调整加入 ddH₂O 体积，至模板与 ddH₂O 总体积为 13.5 μL ）；
- (4) 最后向反应管中加入 2.5 μL B buffer 并充分混合（注意：**a. B buffer 是启动反应的缓冲液，一旦进入体系意味着酶被激活；b. 请务必上下颠倒甩动反应管 8-10 次进行混匀，涡旋、弹管子等方式可能无法有效混匀；c. 对于多个反应，建议提前将 B buffer 加至反应管的盖子内侧，盖上盖后上下颠倒后混匀，可保证反应同时启动）**）；
- (5) 混匀后，将反应液甩（或快速离心）至管子底部，然后将反应管放入荧光检测设备中。荧光检测程序设置为：恒温 39~42 $^{\circ}\text{C}$ ；每 30 s 采集一次 FAM 通道（信号采集通道的选择与荧光探针设计一致）荧光值；反应时间 20 min。

注：如使用 ABI 系列 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

体系配制

组分	体积 (μL)
A buffer	29.4
上游引物(10 μM)*	2
下游引物(10 μM)*	2
探针(10 μM)*	0.6
ddH₂O 和 DNA 模板	13.5
B buffer	2.5
总体积	50

*正对照反应单元体系配制：正对照模板加入 2 μL ，加入 4.6 μL 正对照引物探针 Mix（已包含探针和上/下游引物），其他组分参照体系配制。

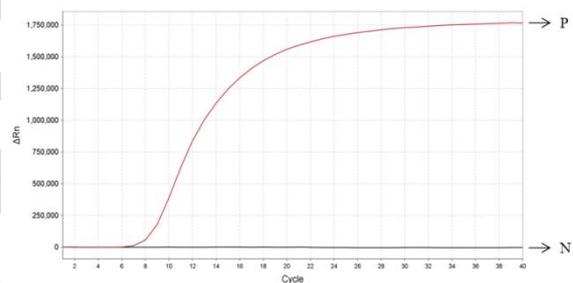
正对照荧光结果图


图 1. P：正对照；N：阴性对照

【注意事项】

1. 由于试剂盒灵敏度非常高，在进行反应时请注意避免核酸污染，并设置空白对照；
2. 使用时请取出实验所需的冻干试剂的数量，剩余部分请置于存储条件下。
3. 使用有效期内试剂，且组分不得与其他批号的相应试剂混用。

