



## 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，重组酶和引物形成蛋白/单链核苷酸的复合体 Rec/ssDNA，在辅助蛋白和单链结合蛋白 SSB 的帮助下，侵入双链 DNA 模板；在侵入位点形成 D-loop 区域，并开始对 DNA 双链进行扫描；待找到与引物互补的目的区域后，复合体 Rec/ssDNA 解体的同时，聚合酶也结合到引物的 3' 末端，开始链的延伸。本试剂盒在 39℃ 下，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，通常不超过 500 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  $\geq 35$  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  $\geq 15$  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 $\mu$ L×1 管
正对照模板	100 $\mu$ L×1 管
正对照引物探针 Mix	70 $\mu$ L×1 管
试剂	48 份
使用说明书	1 份

### 【试剂盒储存】

1. 运输温度： $\leq 20$  °C 的恒温环境；
2. 储存条件：储存温度  $\leq -20$  °C ( $\pm 5$  °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 30 分钟将试剂盒所需组分取出，室温融化，震荡混匀。

- (1) 每个干粉反应管加入 29.4  $\mu$ L 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  $\mu\text{L}$  上游引物、2  $\mu\text{L}$  下游引物和 0.6  $\mu\text{L}$  探针（引物和探针浓度为 10  $\mu\text{M}$ ，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  $\mu\text{L}$  核酸模板和 8.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O（可根据实际需求调整加入模板的体积，并相应调整加入 ddH<sub>2</sub>O 体积，至模板与 ddH<sub>2</sub>O 总体积为 13.5  $\mu\text{L}$ ）；
- (4) 最后向反应管中加入 2.5  $\mu\text{L}$  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，然后立即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 ( $\mu\text{L}$ )
<b>A buffer</b>	29.4
<b>上游引物(10 <math>\mu\text{M}</math>)*</b>	2
<b>下游引物(10 <math>\mu\text{M}</math>)*</b>	2
<b>探针(10 <math>\mu\text{M}</math>)*</b>	0.6
<b>ddH<sub>2</sub>O 和 DNA 模板</b>	13.5
<b>B buffer</b>	2.5
<b>总体积</b>	<b>50</b>

\*正对照反应单元体系配制：正对照模板加入 2  $\mu\text{L}$ ，加入 4.6  $\mu\text{L}$  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

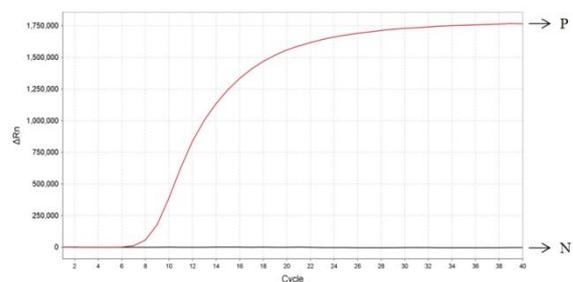


图 1. P：正对照；N：阴性对照

**【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。

