



DNA 恒温快速扩增试剂盒（胶体金试纸条型）使用说明书

【产品名称】

通用名称：DNA 恒温快速扩增试剂盒（胶体金试纸条型）

【包装规格】

货号：EDN-DT01

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 39~42℃），在辅助蛋白和单链结合蛋白 SSB 的帮助下，重组酶和引物形成蛋白/单链核苷酸的复合体 Rec/ssDNA，进行同源搜索并结合目的同源域，在同源位置形成 D-loop 区域并开始进行链交换；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。依赖 nfo 酶的作用，加入根据模板设计的特异的分子探针，使用胶体金技术（三明治夹心法）可以对最终结果进行检测。

【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 15 min）等优点，反应组分为干粉状态，操作简便，易于保存。

本试剂对设备要求低，金属浴、水浴锅等即可进行反应操作，无需购买 PCR 扩增仪等价格高昂的专属设备。

【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；下游引物的 5'端标记一个修饰基团（常用生物素）。

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。

【胶体金探针设计】

在上下游引物中间，设计一段长度为 46-52nt 与目的片段互补的序列；5'端修饰一个抗原标记（典型 FAM）；在 5'端和 3'末端的中部位置标记一个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为 nfo 的识别位点；3'末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer 等。

【试剂盒组成】

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

【试剂盒储存】

1. 运输温度：≤20℃ 的恒温环境；
2. 储存条件：储存温度 ≤-20℃（±5℃）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 μL AD buffer
(注意: AD 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, 并相应调整加入的 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, 然后立即将反应管放入恒温设备中 39~42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10~20 min;

- (6) 反应结束后, 取 10 μL 加入含有 190 μL ddH₂O 的离心管中, 混合均匀后, 将胶体金试纸条的样品端插入离心管中平

衡, 进行试纸条显色, 5 min 内观察质控线与检测线判读结果。

体系配制

组分	体积 (μL)
AD buffer	29.4
上游引物(10 μM)*	2
下游引物(10 μM)*	2
探针(10 μM)*	0.6
ddH ₂ O 和核酸模板	13.5
B buffer	2.5
总体积	50

*正对照反应体系单元配制: 正对照模板-IV 加入 5 μL , 加入 4.6 μL 正对照引物探针 Mix-IV (已包含探针和上/下游引物), 其他组分参照体系配制。

(本试剂盒中正对照探针为 FAM 修饰, 下游引物为 Biotin 修饰, 请选择适配的核酸试纸条进行检测)

【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。

