

天净沙系列

CAT#:211202-50  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

**4 × UNG-LAMP MasterMix**

**(可视化染料-荧光染料双染料法)**

---

**使用手册 V1.0**

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<b>产品及特点</b>	<p>本产品是整合 UNG-dUTP 防污染系统、可视化 LAMP、荧光染料 LAMP 而成的产品，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. UNG-dUTP 系统可以防止扩增产品对后续实验的污染(如果后续实验也使用本产品的话，如果后续实验使用不含 UNG-dUTP 的试剂盒，则无效果)。</li> <li>2. UNG-dUTP 系统为内源式，不需要增加任何操作步骤。</li> <li>3. 65°C 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。</li> <li>4. 一般 60 分钟内出结果 (具体时间取决于靶分子的浓度)。</li> <li>5. 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。</li> <li>6. 含可视化染料和荧光染料，故既可以用肉眼终点判断结果 (终点法可视化 LAMP)，也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测 (实时荧光 LAMP)。</li> <li>7. 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。</li> <li>8. 只能进行定性检测，不建议用于定量检测。</li> <li>9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光及可视化 LAMP 扩增。</li> <li>10. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																				
<b>规格及成分</b>	<p>本产品采用 5 孔盒包装</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4 × UNG-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料 双染料法，待加酶)</td><td>211202a</td><td>200 μL</td><td>0.5 mL 绿盖管</td></tr> <tr> <td>Bst 3.0-UNG 混合液</td><td>11-220319</td><td>50 μL</td><td>0.5 mL 红盖管</td></tr> <tr> <td>LAMP 阳性对照 模板-引物混合物</td><td>211202</td><td>50 μL</td><td>0.5 mL 蓝盖管</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>211202sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	4 × UNG-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料 双染料法，待加酶)	211202a	200 μL	0.5 mL 绿盖管	Bst 3.0-UNG 混合液	11-220319	50 μL	0.5 mL 红盖管	LAMP 阳性对照 模板-引物混合物	211202	50 μL	0.5 mL 蓝盖管	使用手册	211202sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																		
4 × UNG-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料 双染料法，待加酶)	211202a	200 μL	0.5 mL 绿盖管																		
Bst 3.0-UNG 混合液	11-220319	50 μL	0.5 mL 红盖管																		
LAMP 阳性对照 模板-引物混合物	211202	50 μL	0.5 mL 蓝盖管																		
使用手册	211202sc	1 份	无																		
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20°C 保存，保存期限为一年。																				
<b>自备试剂</b>	LAMP 模板及 LAMP 引物。																				
<b>使用方法</b>	<p><b>准备工作：</b>如果使用水浴锅或金属浴，需要在实验启动前打开并调到 65°C。如果用金属浴，还必须在孔中加水以填充金属孔和反应管间的空隙。本公司发现很多水浴锅或金属浴温度显示根本不准，故建议先用阳性对照和阴性对照测试所用仪器在 60°C、62.5°C、65°C、67.5°C 和 70°C 五个温度下扩增效果，最后选择阳性和阴性颜色差异最大的温度进行扩增。不要轻易更换恒温设备。</p> <p><b>一、样品 DNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> </ol>																				

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（制备时加入自备的、跟要检测的靶分子相同的阳性对照模板，一起经历提取过程）和一个样品制备阴性对照（用水替代样品）。最后 N+2 个样品一起进行 DNA 提取操作，得到 N+2 个 DNA 样品。

## 二、配制并测试自备的20×LAMP引物混合液

3. 用超纯水将自备的 6 种（或 4 种）LAMP 引物干粉分别稀释到 100 $\mu$ M，然后按下表配制 100 $\mu$ L 的 20×LAMP 引物混合液，此混合液足够 100 次 20  $\mu$ L 体系的 LAMP 扩增。如果需要配制的引物混合液体积异于 100  $\mu$ L，则各成分的用量需按比例调整。引物混合液可以在-20℃放置 2 年。

引物名称	母液浓度	配制 100 $\mu$ L 混合液所需量	在 20×LAMP 引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 $\mu$ M	32 $\mu$ L	32 $\mu$ M
BIP 引物	100 $\mu$ M	32 $\mu$ L	32 $\mu$ M
F3 引物	100 $\mu$ M	4 $\mu$ L	4 $\mu$ M
B3 引物	100 $\mu$ M	4 $\mu$ L	4 $\mu$ M
Loop F	100 $\mu$ M	8 $\mu$ L	8 $\mu$ M
Loop B	100 $\mu$ M	8 $\mu$ L	8 $\mu$ M
自备超纯水		12 $\mu$ L	

注意：如果设计的LAMP引物不含Loop引物，则按上表配制时Loop引物用超纯水替代，使得总体积为100  $\mu$ L。

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 LAMP 反应，测试每套 LAMP 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，LAMP 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 LAMP 引物的测试结果设定该套 LAMP 阴性和阳性的阈值（本产品只用于定性）。如果没有 qPCR 仪器，只能用肉眼检测法来筛选引物，则扩增 1 小时后加模板的反应呈现蓝色，不加模板的反应呈现淡蓝色的引物，就可以使用。扩增后都呈现蓝色的引物，有非特异扩增，不能使用。都呈现淡蓝色的引物，没有扩增，也不能使用，上述两种情况均需要重新设计。

## 三、LAMP 扩增（20 $\mu$ L 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 Bst3.0-UNG 混合液（50 $\mu$ L，本试剂

盒提供)加入到4×UNG-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法,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LAMP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0.2mL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×UNG-LAMP MagicMix (加酶后)	各5 μL	5 μL	5 μL
自备20×引物混合液	各1 μL	1 μL	-
自备的N+2个样品DNA	1-14 μL	-	-
LAMP阳性对照模板-引物混合物	-	-	4 μL
超纯水	补到20μL	补到20μL	补到20μL

- 如使用金属浴、水浴或普通无热盖PCR仪,则每管再加50μL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。
- 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FAM通道采集一次荧光信号。

### 三、可视化结果分析及解读

- 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。



- 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LAMP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

- 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。

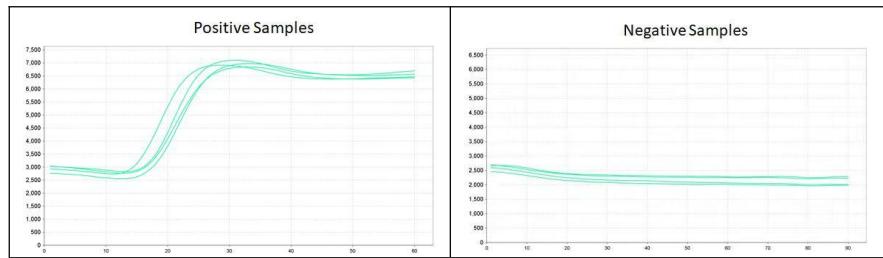
如果阳性对照没有出现S型扩增曲线，则说明试剂盒可能失效，实验无效。

如果阴性对照有S型扩增曲线，则说明LAMP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。

12. 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。



13. 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 LAMP  
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

免核酸纯化病毒保存液

20220106dx