

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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	<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">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)。2. UNG-dUTP 系统为内源式，不需要增加任何操作步骤。3. 65℃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。4. 一般 60 分钟内出结果（具体时间取决于靶分子的浓度）。5. 最大样品加样量高达 14 μL (对 20 μL 的反应体系)，减少了漏检机率。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）。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。8. 只能进行定性检测，不建议用于定量检测。9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光及可视化 LAMP 扩增。10. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品采用 5 孔盒包装			
	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
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。			
自备试剂	LAMP 模板及 LAMP 引物。			
使用方法	<p>准备工作：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℃。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℃、62.5℃、65℃、67.5℃和 70℃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>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none">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。			

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 100μM，然后按下表配制 100μL 的 20×LAMP 引物混合液，此混合液足够 100 次 20 μL 体系的 LAMP 扩增。如果需要配制的引物混合液体积异于 100 μL，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 μL 混合液所需量	在 20×LAMP 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
自备超纯水		12 μL	

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 μL。

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 μL 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（50uL，本试剂

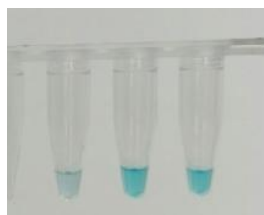
盒提供) 加入到 4×UNG-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法, 待加酶) 中, 轻柔颠倒 20 次充分混匀, 然后再取用。如果有 N+2 个 DNA 纯化样品, 则最好设置 N+5 个 LAMP 扩增, 增加扩增阳性对照、无模板阴性对照、无引物无模板阴性对照各 1 个。在 N+5 个 0.2mL 的 PCR 管中按下表加入下列成分:

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。



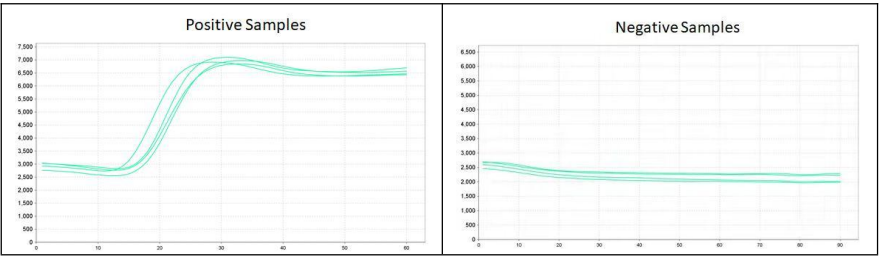
- 结果分析: 如果本试剂盒提供的阳性对照-引物混合物呈现阳性而阴性对照为阴性, 则实验有效。如果阳性对照-引物混合物呈现阴性, 则操作有问题或者试剂盒有问题, 请跟厂家联系。如果阴性对照 (水作为模板) 也呈现阳性, 则说明LAMP样品或试剂有过去的扩增产物的污染, 需要注意操作的规范性, 如果不能解决, 可以重新设计引物扩增新的靶片段。

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