

天
净
沙
系
列

CAT#:211208-50
低温运输, -20℃保存

BINGENE

RT-LAMP MasterMix (含电泳示踪剂)

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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	RT-LAMP MasterMix 含有 RT-LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于 RT-LAMP 等温扩增。RT-LAMP 即 Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (逆转录-环介导等温扩增)，它利用 4 条模板专一的特异引物、逆转录酶和具有链置换能力的 Bst DNA 聚合酶，在等温条件下(63℃左右) 30－60 分钟完成逆转录和 LAMP 扩增。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上能媲美甚至优于定性 RT-PCR 技术，同时还不需要昂贵的仪器设备。目前已成功应用于生物的快速检测，广泛用于各个领域。本试剂盒具有下列特点： 1. 即开即用，含有红色电泳示踪剂，扩增后可以直接上样，不需要上样液。 2. 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。 3. 高扩增效率，一般比 RT-PCR 灵敏一个数量级。 4. 65℃左右逆转录和等温扩增，不需要贵重仪器。 5. 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的 RT-LAMP 扩增。 6. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。 7. 20uL 体系可以加 10uL 的模板。 8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。				
规格及成分		成 份	编 号	规 格	包 装
		RT-LAMP MasterMix (含电泳示踪剂，待加酶)	211208a	200uL	0.5mL 白盖管
		逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100uL	0.5mL 红盖管
		阳性对照模板-引物混合物	211202c	50uL	0.5mL 蓝盖管
		使用手册	211202sc	1 份	
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。				
自备试剂	RNA 模板、RT-LAMP 引物				
使用方法	1. 制备模板RNA：用于选用合适的方法制备模板RNA。如果有N个样品，最好设置N+2个样品制备，多出的两个一个是样品制备阳性对照，一个是样品制备阴性对照。 2. 配制5×RT-LAMP引物混合液。 先加超纯水将合成的HPLC级别的下列引物干粉稀释到标准所标注的母液浓度，然后在一新的离心管中按表中所列体积加入各种引物母液和超纯水，最后得到1mL的5×RT-LAMP引物混合液，此混合液足够250次20uL体系				

的LAMP扩增。如果需要配制的5×RT-LAMP引物混合液体积异于1mL，则各成分的用量请按比例调整。引物混合液可以在-20℃放置2年。

引物名称	母液浓度	加母液量	在 5×LAMP 引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 uM	80 uL	8 uM
BIP 引物	100 uM	80 uL	8 uM
F3 引物	100 uM	10 uL	1 uM
B3 引物	100 uM	10 uL	1 uM
Loop F	100 uM	20 uL	2 uM
Loop B	100 uM	20 uL	2 uM
超纯水		780 uL	
终体积		1 mL	

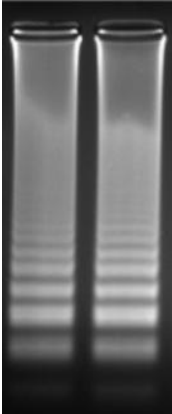
注：如果没有Loop引物，则用水替代。

3. 在冰上融化RT-LAMP MasterMix（待加酶），混匀，稍离心。第一次使用时, 请将100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到RT-LAMP MasterMix 中并轻柔混匀，然后再使用。如果有N个样品，则在N+2个反应管中加入以下组份，多出一管是RT-LAMP扩增阳性对照（PC），一管是RT-LAMP 扩增阴性对照（NC）：

成份	N+2 个样品管	RT-LAMP 扩增 PC	RT-LAMP 扩增 NC
RT-LAMP MasterMix (加酶后)	6 uL	6 uL	6 uL
自备 5×RT-LAMP 引物 混合液	4 uL	不加	4 uL
阳性对照模板-引物混合物	不加	4 uL	不加
自备模板 RNA	1-6uL	不加	不加
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

注意：由于本产品含有电泳示踪剂，不宜加入可视化染料，否则会产生颜色干扰。可加入某些荧光染料，具体可以加入哪些，需要预先测试电泳示踪剂对荧光染料的影响。如果加入了荧光染料，则需要在荧光定量PCR仪上进行反应和实时检测。

4. 混匀，置于65℃保温60分钟。如果是在PCR仪中保温，必须加热盖。如果用金属浴或水浴保温，没有热盖，必须覆盖50uL的石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发，严重影响反应效率。

	5. 扩增结束后取5-10uL扩增产物直接上样（本产品含有红色电泳示踪剂，不需要再加上样液，红色示踪剂的泳动速度相当于50bp的DNA）进行2-3%的琼脂糖凝胶电泳，有RT-LAMP扩增的样品将可见LAMP特征性DNA梯度电泳图谱（见下图）： 
	6. 结果分析：如果本试剂盒提供的阳性对照-引物混合物能够扩增而阴性对照不能扩出，则实验有效。如果阳性对照-引物混合物没有扩增出条带，则试剂盒的问题，请跟厂家联系。如果阴性对照（水作为模板）有扩增出条带，则说明RT-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RT-LAMP引物扩增新的靶片段。
关联产品	新型 PCR 和 LAMP 专用荧光染料