

天
净
沙
系
列

CAT#:211209-50
低温运输, -20℃保存

BINGENE

RT-LAMP MasterMix (含可视化染料)

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

<p>产品及特点</p>	<p>RT-LAMP MasterMix (可视化法) 含有可视化 RT-LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于可视化 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，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：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，含有可视化染料，扩增后可以直接肉眼判读。 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 体系的可视化 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 体系最多可以使用 10uL 样本。 8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。 																				
<p>规格及成分</p>	<p style="text-align: center;">本试剂盒使用 5 孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="507 1245 1433 1581"> <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>RT-LAMP MasterMix (含可视化染料，待加酶)</td> <td>211209a</td> <td>200uL</td> <td>0.5mL 白盖管</td> </tr> <tr> <td>逆转录酶-扩增酶混合液</td> <td>211208b</td> <td>100uL</td> <td>0.5mL 红盖管</td> </tr> <tr> <td>阳性对照模板-引物混合物</td> <td>211202c</td> <td>50uL</td> <td>0.5mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>211209sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	RT-LAMP MasterMix (含可视化染料，待加酶)	211209a	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	211209sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																		
RT-LAMP MasterMix (含可视化染料，待加酶)	211209a	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	211209sc	1 份	无																		
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																				
<p>自备试剂</p>	<p>RNA 模板、RT-LAMP 引物</p>																				
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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。

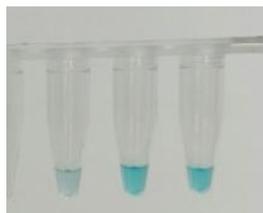
- 在冰上融化RT-LAMP MasterMix（含可视化染料，待加酶），混匀，稍离心。第一次使用时，请将100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到RT-LAMP MasterMix中并轻柔混匀，然后再使用。如果有N个样品，则在N+2个反应管中加入以下组份，多出的一管是RT-LAMP扩增阳性对照（PC），一管是RT-LAMP扩增阴性对照（NC）：

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	1-10uL	不加	不加
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

注意：由于本产品含有可视化染料，故可能会对额外加入的荧光染料产生干扰。如果用户自己还要加入荧光染料，需要预先测试兼容性。

- 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。
- 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。



6. 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。
7. 也可以电泳检测实验结果（强烈不推荐此法，因为电泳时产生的气溶胶非常容易污染环境，使得今后用同一引物扩增时产生假阳性）：取5-10uL扩增产物和自备的上样液混合，上样，进行2-3%的琼脂糖凝胶电泳，有LAMP扩增的样品将可见LAMP特征性电泳图谱。

关联产品

新型 PCR 和 LAMP 专用荧光染料