

天
净
沙
系
列

CAT#:211210-50
低温运输, -20℃保存

BINGENE

RT-LAMP MasterMix (荧光染料法)

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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	<p>RT-LAMP MasterMix（荧光染料法）含有荧光 RT-LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于实时荧光 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(65℃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 LAMP 专用的荧光染料，可以进行实时荧光检测（需要荧光 PCR 仪），但不建议用于定量分析。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℃左右同时完成逆转录和等温扩增，一步式操作。5. 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的实时荧光 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 13uL 样本，减少漏检。8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。			
规格及成分	本试剂盒使用 5 孔盒包装			
	成 份	编 号	规 格	包装材料
	RT-LAMP MasterMix (荧光染料法，待加酶)	211210a	200uL	0.5mL 黄盖管
	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
	超纯水，PCR 级	210806	1 mL	1.5 mL 本色盖
	石蜡油，PCR 级	220101	1.5 mL	1.5 mL 本色盖
	使用手册	211210sc	1 份	无
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	<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20×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下表所标注的母液浓度，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0.1mL的20×RT-LAMP引物混合液，此混合液足够100次20uL体系的RT-LAMP扩增。如果需要配制的20×RT-LAMP引物混合液体积异于0.1mL，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20×LAMP引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 uM	32uL	32 uM
BIP 引物	100 uM	32 uL	32 uM
F3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
B3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
Loop F	100 uM	8 uL	8 uM
Loop B	100 uM	8 uL	8 uM
超纯水		12 uL	
终体积		0.1mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

3. 在冰上融化RT-LAMP MasterMix（荧光染料法，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中并轻柔颠倒混匀1分钟，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 20×RT-LAMP 引物 混合液	1 uL	不加	1 uL
阳性对照模板-引物混合物	不加	4 uL	不加
自备模板 RNA	1-13uL	不加	不加
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

4. 混匀，放荧光定量PCR仪器上65℃保温90分钟，每分钟采集一次SYBR通道的荧光信号。

	<p>5. 反应结束后，按下面的步骤处理和分析数据。</p> <p>6. 阈值的设定：LAMP 的阈值跟 LAMP 引物的专一性密切相关，因此新设计的引物需要先在 不加模板的情况下进行 LAMP 扩增，测定其 Ct。Ct 最好没有，如果有也最好不要低于 60（每分钟采集一次荧光信号的话）。如果低于 60，则最好重新设计引物。</p> <p>7. 实验有效性的判断：如果阈值设定为 60，则样品制备阳性对照和扩增阳性对照的 Ct 应该在 60 以内，样品制备阴性对照、无模板阴性对照和无引物无模板阴性对照的 Ct 应该大于 60，否则提取实验或扩增实验无效。对无效的实验不需要分析样品的结果，需要寻找原因或跟厂家联系。</p> <p>8. 如果实验有效，则可以分析样品的数据。样品 Ct 小于阈值则判读为阳性，大于阈值则判读为阴性。</p>
关联产品	新型 PCR 和 LAMP 专用荧光染料