

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"> 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。 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。 高扩增效率，一般比 RT-PCR 灵敏一个数量级。 65℃左右同时完成逆转录和等温扩增，一步式操作。 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的实时荧光 RT-LAMP 扩增。 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。 20uL 体系最多可以使用 13uL 样本，减少漏检。 本产品只能用于科研，不能用于临床。 																												
规格及成分	<p>本试剂盒使用 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>RT-LAMP MasterMix (荧光染料法，待加酶)</td><td>211210a</td><td>200uL</td><td>0.5mL 黄盖管</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>超纯水，PCR 级</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 本色盖</td></tr> <tr> <td>石蜡油，PCR 级</td><td>220101</td><td>1.5 mL</td><td>1.5 mL 本色盖</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>211210sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr> </tbody> </table>	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
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"> 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

20220113dx