

天
净
沙
系
列

CAT#:211222-50
低温运输，-20℃保存

BINGENE

4 × 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	4×LAMP MasterMix（荧光染料法）含有荧光染料法 LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于荧光染料实时 LAMP 等温扩增。LAMP 即 Loop-Mediated Isothermal Amplification（环介导等温扩增），它利用 4 条模板专一的特异引物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 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，含有本公司开发的 LAMP 专用荧光染料，比常规的 SYBR 更好，不会产生抑制。 2. 在荧光定量 PCR 一起上进行扩增时，可以实时跟踪扩增过程，但不宜用于定量（这是 LAMP 技术决定的）。 3. 高特异性，精心优化的配方，非特异扩增比自配的试剂更低。 4. 高灵敏度，一般比 PCR 灵敏一个数量级（取决于引物的筛选）。 5. 4×MasterMix，最多可加入 14uL 模板，降低漏检率。 6. 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的 LAMP 扩增。 7. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。 8. 本产品只能用于科研，不能用于临床。																				
规格及成分	本产品使用 5 孔盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>4×LAMP MasterMix (含荧光染料，待加酶)</td><td>211222a</td><td>200uL</td><td>0.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>Bst DNA 聚合酶 2.0</td><td>11-220319</td><td>50uL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>LAMP 阳性对照 模板-引物混合物</td><td>220402</td><td>50uL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>211222sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	4×LAMP MasterMix (含荧光染料，待加酶)	211222a	200uL	0.5mL 绿盖管	Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50uL	0.5mL 红盖管	LAMP 阳性对照 模板-引物混合物	220402	50uL	0.5mL 黄盖管	使用手册	211222sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																		
4×LAMP MasterMix (含荧光染料，待加酶)	211222a	200uL	0.5mL 绿盖管																		
Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50uL	0.5mL 红盖管																		
LAMP 阳性对照 模板-引物混合物	220402	50uL	0.5mL 黄盖管																		
使用手册	211222sc	1 份	无																		
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																				
自备试剂	LAMP 模板、LAMP 引物																				
使用方法	1. 制备模板DNA：用于选用合适的方法制备模板DNA。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. 配制自备的20×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×LAMP引物混合液，此混合液足够100次20uL体系的LAMP扩增。如果需要配制的20×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。

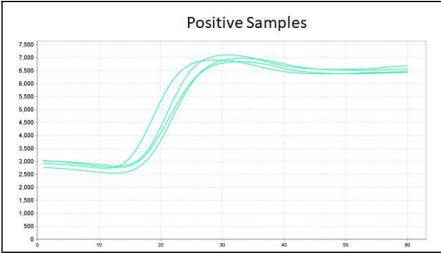
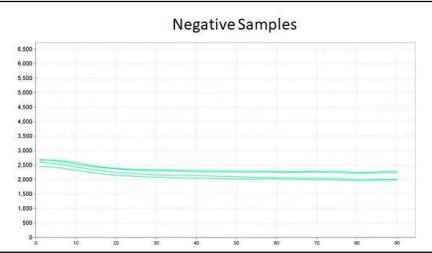
引物名称	母液浓度	加母液量	在20×LAMP引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 uM	32uL	32 uM
BIP 引物	100 uM	32 uL	32 uM
F3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
B3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
Loop F	100 uM	8 uL	8 uM
Loop B	100 uM	8 uL	8 uM
超纯水		12 uL	
终体积		0.1mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

- 在冰上融化4×LAMP MasterMix（含荧光染料，待加酶），混匀，稍离心。第一次使用时，请将50uL Bst DNA聚合酶2.0全部加入到4×LAMP MasterMix中轻柔混匀，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LAMP扩增阳性对照（PC），一管是LAMP扩增阴性对照（NC）：

成份	N+2 个样品管	LAMP 扩增 PC	LAMP 扩增 NC
4×LAMP MasterMix (含荧光染料，加酶后)	5 uL	5 uL	5 uL
自备 20×LAMP 引物混合液	1 uL	不加	1 uL
LAMP 阳性对照 模板-引物混合物	不加	5 uL	不加
自备模板 DNA	1-14uL	不加	不加
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

- 混匀，置于荧光定量PCR仪器中65℃保温60分钟，每分钟采集一次SYBR通道的荧光信号。如果荧光定量PCR仪不能设置恒温扩增参数，可以把变性复性和扩增三个温度都设置为65℃，三个步骤的总时间为1分钟即可，共60个循环，在任何一步采集荧光信号即可。
- 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。 6. 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。 Positive Samples  Negative Samples 
关联产品	LAMP 饱和荧光染料