

天
净
沙
系
列

CAT#:211224-50
低温运输，-20℃保存

BINGENE

RT-LAMP MasterMix

(可视化染料-荧光染料双染料法)

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	RT-LAMP MasterMix(可视染料-荧光染料双染料法)含有可视化 RT-LAMP 和荧光 RT-LAMP 扩增所需的所有成分，可以同时用于可视化和荧光 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： 1. 即开即用，含有可视化染料和荧光染料两种染料，扩增后可以直接肉眼判读，也可以实时荧光检测（需要荧光 PCR 仪）。 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 体系的双染料 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 <table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>规 格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)</td><td>211224a</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>211209sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成 份	编 号	规 格	包装材料	RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)	211224a	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	211209sc	1 份	无
成 份	编 号	规 格	包装材料																													
RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)	211224a	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	211209sc	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	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。

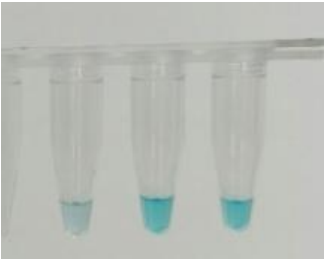
引物名称	母液浓度	加母液量	在20×LAMP引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 uM	32uL	32 uM
BIP 引物	100 uM	32 uL	32 uM
F3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
B3 引物	100 uM	4 uL	4 uM
Loop F	100 uM	8 uL	8 uM
Loop B	100 uM	8 uL	8 uM
超纯水		12 uL	
终体积		0.1mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

3. 在冰上融化RT-LAMP MasterMix（含可视化染料和荧光染料，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，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30uL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. 荧光检测 Ct 阈值设定（对荧光 LAMP 反应）：在前 10 分钟荧光值会升高后再趋于稳定，故只能取第 10 到 15 分钟的荧光值作阈值。此现象估计是常温下可视化染料和荧光染料结合并对后者产生淬灭作用，加热到 65℃后两种染料分开，淬灭逐渐解除，荧光逐渐升高，10 分钟后稳定。没加可视化染料反应无此现象。 6. 实验有效性的判断：样品制备阳性对照和扩增阳性对照都应该有阳性结果（Ct 在 60 以内或反应液呈蓝色），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应该有阴性结果（Ct 大于 60 或反应液呈淡蓝色），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。 7. 如果阳性和阴性对照结果合乎预期，则实验有效，可以分析样品的情况。如果肉眼观察，样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明有扩增，如果接近扩增阴性对照，则说明无扩增。反应结果示例如下（左边一个管为阴性，右边两个管为阳性）：  8. 如果是用荧光 PCR 仪，样品 Ct 小于阈值则为阳性，大于阈值则为阴性。 9. 当实时荧光检测和可视化检测同时使用时，如果不一致，以实时荧光 LAMP 的数据为准。一般可视化结果滞后实时荧光检测结果 20-30 分钟，也就是说，在 qPCR 仪上第 30 分钟时呈现阳性的样品，其颜色变化在第 50-60 分钟时才能观察到。
关联产品	新型 PCR 和 LAMP 专用荧光染料