

天
净
沙
系
列

CAT#:211262-50
低温运输, -20℃保存

BINGENE

4 × UNG LAMP MasterMix
(可视染料法)

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×UNG LAMP MasterMix（可视染料法）含有可视化 UNG LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于可视化 UNG 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(63℃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，含有可视化染料和 UNG，扩增后可以直接肉眼观察，不需要仪器设备。同时有 UNG-dUTP 防污染系统。 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. 4×MasterMix，比对应的 2×MasterMix 可使用更多的扩增模板。最多可达 11uL，降低漏检的机率。 4. 高扩增效率，一般比 PCR 灵敏一个数量级。 5. 65℃左右等温扩增，不需要贵重仪器。 6. 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的 UNG 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		成 份	编 号	规 格	包装材料
		4×UNG LAMP MasterMix (含可视化染料，待加酶)	211262a	200uL	0.5mL 黄盖管
		Bst DNA 聚合酶-UNG	211262b	50uL	0.5mL 红盖管
		阳性对照模板-引物混合物	210801	50uL	0.5mL 蓝盖管
		使用手册	211262sc	1 份	
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5×LAMP引物混合液。 先加超纯水将自备的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1mL的5×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×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4×UNG LAMP MasterMix（含可视化染料），混匀，稍离心。第一次使用时，请将50uL Bst DNA聚合酶-UNG全部加入到4×UNG LAMP MasterMix中轻柔混匀，然后再使用。对N+2个样品，则在N+4个反应管中加入以下组份，多出一管是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×UNG LAMP MasterMix (加酶后)	5 uL	5 uL	5 uL
自备 5×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 DNA	1-11uL	不加	不加
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

- 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。
注意事项	1. 引物设计对成功扩增十分关键，尽量以保守区设计引物。 2. 引物至少包括 F3/B3 和 FIP/BIP，加入环状引物 F loop/B loop 可以使反应速度大大提高。 3. 应优化引物序列、GC 含量和尽量避免二级结构。 4. LAMP 扩增具有特异性好、灵敏度高、时间快、不需要特殊仪器设备等优点。但太高的灵敏度使得其比普通 PCR 扩增更加容易污染导致假阳性。因此，必须高度重视扩增产物的污染。常规措施包括严格的实验分区、使用荧光定量等不开盖检测方法。实验室一旦遭到污染，很难去除，最好重新设计引物扩增新的靶片段。
关联产品	新型 PCR 和 LAMP 荧光染料