

天
净
沙
系
列

CAT#:101114-50
低温运输, -20°C保存

TIANDZ

通用型 RT-LAMP 试剂盒

Universal RT-LAMP Kit

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒可以用于 RT-LAMP 等温扩增，RT-LAMP 即逆转录和 Loop-Mediated Isothermal Amplification (环介导等温扩增) 的结合，专门用于快速扩增 RNA。LAMP 是 2000 年才出现的一种新颖的等温核酸扩增方法。它利用 4 或 6 条模板专一的特异引物和具有链置换能力的 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 RT-PCR 技术，同时还不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程，不依赖任何专门的仪器设备。目前已成功应用于人类及动植物、细菌、病毒、寄生虫、真菌等病原体的快速检测。</p> <p>本试剂盒即根据 LAMP 原理开发，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 整合了所有成分为 2×RT-LAMP Mix，不需要单个准备各成分。RT 和 LAMP 一管式操作，方便快捷，减少污染。 2. 高特异性，由于同时使用 4-6 条特异引物，所以特异性比 RT-PCR 更高。 3. 高扩增效率，扩增效率可达到 10E9-10E10，比 PCR 灵敏 10 倍，最好时可检测到单拷贝的 RNA 分子 4. 65℃左右恒温下完成 RT 和 LAMP 扩增，不需要贵重的热循环仪。。 5. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。 6. 本产品足够 50 次 20uL 体系的 RT-LAMP 扩增，本产品仅限于科研使用。 																			
<p>规格及成分</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">成份</th> <th style="width: 16.5%;">编号</th> <th style="width: 16.5%;">塑料袋包装</th> <th style="width: 34%;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×RT-LAMP Mix</td> <td>101114a</td> <td>500 uL (白盖)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>LAMP 阳性对照模板-引物混合物</td> <td>130923a</td> <td>45 uL (黄盖)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>101114sc</td> <td>1 份</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	塑料袋包装		2×RT-LAMP Mix	101114a	500 uL (白盖)		LAMP 阳性对照模板-引物混合物	130923a	45 uL (黄盖)		使用手册	101114sc	1 份	
成份	编号	塑料袋包装																		
2×RT-LAMP Mix	101114a	500 uL (白盖)																		
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	130923a	45 uL (黄盖)																		
使用手册	101114sc	1 份																		
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																			
<p>自备试剂</p>	<p>RNA 模板及 LAMP 引物 (4 或 6 条)</p>																			
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 配制自备的5×LAMP引物混合液。 先加超纯水将自备的下列6种(或4种)引物干粉稀释到母液浓度(见下表)，然后在一新的离心管中按表中所列体积加入各种引物和超纯水，最后得到 1mL的5×LAMP引物混合液。如果需要配制的5×LAMP引物混合液体积大于或小于1mL，则各成分的用量请按比例调整。此混合液可以在-20℃放置2年。1mL的5×LAMP引物混合液足够250次20uL体积的LAMP或 RT-LAMP扩增。 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">引物名称</th> <th style="width: 25%;">母液浓度</th> <th style="width: 25%;">加入母液量</th> <th style="width: 25%;">在 5×LAMP 引物</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				引物名称	母液浓度	加入母液量	在 5×LAMP 引物												
引物名称	母液浓度	加入母液量	在 5×LAMP 引物																	

			混合液中的浓度
自备 FIP 引物	100 uM	80 uL	8 uM
自备 BIP 引物	100 uM	80 uL	8 uM
自备 F3 引物	100 uM	10 uL	1 uM
自备 B3 引物	100 uM	10 uL	1 uM
自备 Loop F	100 uM	20 uL	2 uM
自备 Loop B	100 uM	20 uL	2 uM
超纯水		780 uL	
合计		1000uL	

2. 在冰上融化各组份后轻柔混匀，按下表在PCR反应管中设置反应，如果有N个样品，则需要设置N+2个反应，多的两个一个是阳性对照，一个是阴性对照：

成份	N 个样品管	阴性对照管	阳性对照管
2×RT-LAMP Mix	各 10 uL	10 uL	10 uL
自备 5×LAMP 引物混合液	各 4 uL	4 uL	
自备 RNA 模板	各 1-100ng	-	
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	-	-	4.5
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL

注：如果在此步少加1 uL水，然后加入自备的可视化染料（本公司有相关产品，编号为130833，可到www.tiandz.com了解），则反应后可直接肉眼判断LAMP扩增是否成功。

3. 混匀，置于63℃保温60分钟。注意：如果不使用Loop引物，则最好保温120分钟；如果使用Loop引物，则最好保温60分钟。
4. 80℃10分钟灭活Bst DNA聚合酶。BstDNA聚合酶有外切酶活性，所以必须灭活，否则它可能会逐渐降解DNA扩增产物。
5. 产物置于-20℃备用或立即用于下游检测。扩增产物可选下列方法之一检测：
 - 1) 如果已经加入LAMP可见光染料，则直接肉眼观察。判断标准见上。
 - 2) 琼脂糖凝胶电泳：取LAMP扩增产物5uL在1-2%的琼脂糖凝胶上进行电泳，如果有扩增将可见LAMP特征性梯状电泳图谱；
 - 3) 向扩增产物中直接加入本公司PCR级绿如蓝染料（产品编号70909，另售）1 uL，混匀，稍离心。如果颜色同阴性对照呈现淡黄色，则无

	<p>扩增。如果同阳性对照呈现淡绿色，表示有LAMP扩增。也可在加入PCR级绿如蓝染料后将反应管在300nm的紫外线下观察，如果颜色同阴性对照呈现弱荧光，则无扩增。如果同阳性对照呈现强荧光，表示有LAMP扩增。</p> <p>6. 结果分析：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 如果阳性对照有扩增，阴性对照没有扩增，则样品数据才有效，否则实验失败，不需要分析数据。 2) 如果阳性对照没有扩增，说明试剂盒有问题，请速跟厂家联系。 3) 如果阴性对照有扩增，说明有污染（过去的扩增产物污染了阴性样品），必须重新设计新的针对不同靶位点的LAMP引物，并且严格注意操作的规范性。
<p>关联产品</p>	<p>2×可视化 RT-LAMP Mix</p>