

天
净
沙
系
列

CAT#:202001
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

2 × 双染料 RT-LAMP MagicMix

2 × Double Dyes RT-LAMP MagicMix

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 12 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 D405

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

产品及特点

本产品是 2×双染料 RT-LAMP MagicMix，可以用于 RT-LAMP 等温扩增，LAMP 即 Loop-Mediated Isothermal Amplification（环介导等温扩增），是 2000 年才出现的一种新颖的等温核酸扩增方法。它利用 4 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（65℃左右）30-60 分钟完成扩增。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。基于本公司的专利技术，本公司开发了此产品，它具有下列特点：

1. 10-60 分钟出结果(取决于样品浓度),RT 和 LAMP 一步完成,比 RT-PCR 快 1 小时以上。
2. 只进行定性检测仅需千余元的恒温水浴锅,不需几十万的荧光 PCR 仪,适合基层单位。
3. 含可见光和荧光染料,肉眼可判断结果(阴性呈浅蓝、阳性呈蓝色,见下图),故可以用水浴锅进行扩增。不确定结果还可用荧光 PCR 仪进行更精准的荧光读数再来研判。也可以直接用荧光 LAMP 进行检测。
4. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
5. 特异性比 RT-PCR 高,因 LAMP 扩增使用 4-6 条引物而不是两条。
6. 灵敏性比 RT-PCR 高,可达 10 拷贝/反应以下,故假阴性率更低。
7. 现只可用于科研。

规格及成分

成 份	编 号	塑料袋包装
2×双染料 RT-LAMP MagicMix	202001a	500μL (绿盖)
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	130923a	45 uL (黄盖)
超纯水	100935	1mL (蓝盖)
使用手册	202001sc	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂

RT-LAMP 模板及 LAMP 引物等。

使用方法

准备工作：如果使用水浴锅或金属浴，需要在实验启动前打开并调到 65℃。如果用金属浴，还必须在孔中加水以填充金属孔和反应管间的空隙。

一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容，可以选购本公司的 RNA 提取试剂盒，其使用手册可以从本公司网站 www.tiandz.com 通过搜索产品名称或产品编号下载。

2. 如果有 N 个样品，则至少需要做 N+2 个样品制备，包括一个制备阳性对照和一个制备阴性对照。前者用试剂盒体提供的阳性对照，后者直接用试剂盒体提供的超纯水。使用量根据所选择的试剂盒决定。最后 N+2 个样品一起进行 RNA 提取操作，得到 N+2 个 RNA 样品。

二、RT-LAMP (20 μ L 体系)

3. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加扩增阳性对照和扩增阴性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

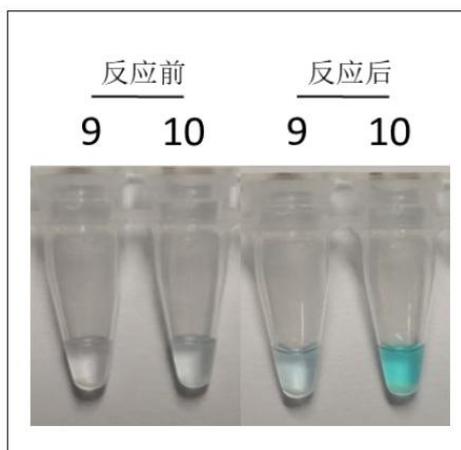
成分	N+2 个样品管	扩增阴性对照管	扩增阳性对照管
2 \times RT-LAMP MagicMix	各 10 μ L	10 μ L	10 μ L
自备引物混合液	各 4 μ L	4 μ L	-
自备 N+2 个样品 RNA	各 6 μ L	-	-
超纯水	-	6 μ L	-
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	-	-	10 μ L

4. 混匀，此时反应液呈现非常浅的蓝色，由于是否有反应是跟扩增阴性对照和反应前的颜色对比，所以不但要设置扩增阴性对照，并且在反应前要手机照相留存以便反应后比对颜色变化。
5. 置于室温 5 min（让 UNG 灭活可能的上一轮 LAMP 产物污染），然后进行扩增。由于本产品含双染料，所以根据实验室条件可以选择两种方式进行扩增和检测。
6. 如果使用荧光定量 PCR 仪：把 PCR 三个步骤的温度都设为 65 $^{\circ}$ C，1 次循环 1 分钟，60 个循环，在任何一个步骤采集每分钟采集 FAM 通道的荧光信号。
7. 如果使用金属浴或水浴：先在管中加 50 μ L 石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发，影响反应效率。确认下预先开启的水浴或金属浴温度为 65 $^{\circ}$ C，把管子放浮板上后放水浴上保温 60 分钟，或放入金属浴反应孔 60 分钟。

三、结果分析及解读

8. 反应结束后，先用肉眼检测。具体是将反应管放置在白色背景（如白纸）前观察，观察反应液颜色并用手机照相留底。阳性对照将呈现蓝色，无模板的阴性对照将呈现无色或非常浅的蓝色，样品管的颜色如果接近阳性对照则说明有扩增，如果接近阴性对照则说明无扩增。标准的反应结果如下

图（9 号为阴性，10 号为阳性，此处的 9 号和 10 号跟下步的电泳照片中的 9 号和 10 号是相同的两个样品）：



9. 如果肉眼有疑惑，可以再用荧光 PCR 仪判断。将同一试管放入 PCR 仪，循环数设为 1，循环步骤设为 1，温度设为常温，读取荧光信号，阴性对照的荧光信号应在 1 万以下，阳性对照的荧光信号应在 1 万以上。否则此次实验无效。如果阴性对照和阳性对照荧光读数在上述范围，实验有效，再分析样品，荧光信号读数在 5 千以下的判断为阴性，读数在 1 万以上的判断为阳性，在之间的需要重复。
10. 如果是直接用荧光 PCR 仪器进行扩增的，则以最后一次采集的荧光绝对读数为准进行分析。不比较 Ct 值。阈值一般取 1 万，如果荧光绝对读数低于 10000，则为阴性。如果荧光读数的绝对值高于 1 万，则判别为阳性。

关联产品

2019-nCoV 冠状病毒 S 基因探针法荧光定量 PCR 试剂盒