天净沙系列

CAT#:211204

第 1 部分：常温运输和保存

第 2 部分：低温运输，-20℃保存

天净沙

免提取 LAMP 试剂盒（荧光染料法）

Extraction-Free LAMP Kit (SYBR Method)

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是 4×LAMP MasterMix（荧光染料法）和免提取样本 DNA 释放剂的组合。前者含有荧光染料法 LAMP 扩增所需的所有成分，可以用于荧光染料法 LAMP 等温扩增。免提取样本 DNA 释放剂可用于处理各种样品，直接不经过提取直接用于 PCR 或 LAMP 扩增。本试剂盒具有下列特点：

1. 即开即用，用户不需要单独准备每个成分。
2. 不需要单独进行核酸纯化。
3. 含有荧光染料，如果使用荧光扩增仪（如荧光 PCR 仪），则可以进行实时荧光 LAMP 定性检测。不建议用于实时荧光 LAMP 定量检测，因为 LAMP 技术本身并不适合用于定量检测。
4. 灵敏度比常规的电泳法 LAMP 检测一般高 10 倍，比常规 PC 高 100 倍。
5. 闭管操作，不需要再打开反应管，避免了常规 LAMP 电泳取样时引起的扩增产物污染。
6. 高特异性，本公司精心优化的 MasterMix 配方，假阳性率一般比自配的 LAMP 试剂更低。
7. 本试剂盒足够 50 次免提取样本处理和 50 次 20 μL 体系的 LAMP 扩增。
8. 提供扩增对照，便于在遇到困难时分析原因。
9. 本产品只能用于科研，不能用于临床。

规格及成分

免提取 LAMP 试剂盒第 1 部分，编号 211204pt1，规格 50 次，5 孔盒包装

成 份	编 号	规 格	包 装
免提取 DNA 模板制备溶液 A 成分 1	210904a1	0.1 mL	0.5 mL 白盖管
免提取 DNA 模板制备溶液 A 成分 2	210904a2	0.1 mL	0.5 mL 紫盖管
免提取 DNA 模板制备溶液 B	210904b	0.5 mL	0.5 mL 绿盖管

免提取 LAMP 试剂盒第 2 部分：编号 211204pt2，规格 50 次，5 孔盒包装

成 份	编 号	规 格	包 装
4×LAMP MasterMix（荧光染料法，待加酶）	211222a	200 μL	0.5 mL 黄盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 红盖管
阳性对照模板-引物混合物	211202c	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	211204sc	1 份	无

运输及保存

第 1 部分常温运输和保存，第 2 部分低温运输，-20℃保存。有效期一年。

自备试剂

超纯水、LAMP 模板、LAMP 引物

使用方法

1. 打开金属浴或 PCR 仪，把温度调到 95℃。
2. 配制 1 mL 工作液（足够 10 个样品，如果样品不止 10 个，需要按比例增加）：在一干净的 1.5 mL 自备塑料离心管中加入 10 μL 免提取模板制备溶液 A 成分 1，20 μL 免提取模板制备溶液 A 成分 2 和 970 μL 超纯水，充分混合均匀待用。溶液 A 工作液可室温放置，但最好在一周内用完。
3. 标记 10 个 PCR 管（方便后续用 PCR 仪加热保温），分别加入 100 μL 上步所配制的溶液 A 工作液。
4. 参考下表在管中加入待处理样品。如果是固体样品，需要确保固体样品被溶液 A 工作液淹埋，如果是液体样品则震荡混匀即可。动物组织 1-5 mg、鼠尾 2 mm、血液样品不超过 20 μL、植物叶片 1-5 mg、植物种子 1-5 mg、0.2-0.5 mL 微生物培养物离心所得的沉淀、血清血浆等蛋白浓度高的液体样品 10-30 μL、其他液体样品（如保存液中的病毒样品）50-100 μL。对上表未列出的样品，用户需要自己摸索最佳用量。对富含多醌多酚的植物材料（如棉花），使用量最好不要超过 0.5 mg。
5. 在金属浴或 PCR 仪上 95℃保温 10 分钟。
6. 待冷却到常温。
7. 每个管中加入 10 μL 溶液 B 并轻柔吹打混匀得 DNA 释放液。这些 DNA 释放液足够进行 50-100 次 PCR 或 LAMP 扩增。
8. 配制5×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1 mL的5×LAMP引物混合液，此混合液足够250次20 μL体系的LAMP扩增。如果需要配制的5×LAMP引物混合液体积异于1 mL，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 μM	80 μL	8 μM
BIP 引物	100 μM	80 μL	8 μM
F3 引物	100 μM	10 μL	1 μM
B3 引物	100 μM	10 μL	1 μM
Loop F	100 μM	20 μL	2 μM
Loop B	100 μM	20 μL	2 μM

超纯水		780 μL	
终体积		1 mL	

注：如果没有Loop引物，则用水替代。

9. 在冰上融化4×LAMP MasterMix（荧光染料法），混匀，稍离心。第一次使用时，请将50 μL 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（加酶后）	5 μL	5 μL	5 μL
自备 5×LAMP 引物混合液	4 μL	不加	4 μL
阳性对照模板-引物混合物	不加	4 μL	不加
自备模板 DNA	1-2 μL	不加	不加
补自备超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

10. 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50 μL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。
11. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取10 μL LAMP扩增产物跟自备上样液混合后进行2%琼脂糖凝胶电泳。LAMP阳性对照必须有正常LAMP条带（200 bp左右的梯形扩增产物），LAMP阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果LAMP阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果。
12. 荧光分析（仅限于用qPCR仪进行反应的场景）：样品制备阳性对照和LAMP阳性对照的反应液将有标准的S扩增曲线，样品制备阴性对照和LAMP阴性对照的反应液将没呈平线，没有S曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的荧光曲线为S型，则说明样品为阳性，如果为平线则说明待测样品为阴性。

关联产品	LAMP 专用荧光染料