

M5 HiPer 可视化 LAMP 检测试剂盒 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer 可视化 LAMP 检测试剂盒	50T	MF896-01

【储存条件】 -20℃储存；

【产品简介】

本产品是整合可视化 LAMP 和荧光染料 LAMP 而成的产品，它既可以用于荧光染料法 LAMP 扩增及检测，也可以用于可视化 LAMP 扩增及检测，适用于各种针对核酸的快速定性检测。本产品具有下列特点：

- 1.65℃恒温扩增，不需要贵重的仪器设备，只需要恒温水浴或金属浴。
- 2.一般 60 分钟内出结果（具体时间取决于靶分子的浓度）。
- 3.最大样品加样量高达到 14 μL（对 20 μL 的反应体系），减少了漏检机率。
- 4.含可视化染料和荧光染料，故既可以用肉眼终点判断结果（终点法可视化 LAMP），也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测（实时荧光 LAMP）。
- 5.灵敏性可达 10 拷贝/反应以下（跟引物设计密切相关），故假阴性率更低。
- 6.只能进行定性检测，不建议用于定量检测。
- 7.本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光及可视化 LAMP 扩增。
- 8.本产品只能用于科研。

【产品组分】

4×LAMP MasterMix（含可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）	200 μL（绿盖）
Bst DNA 聚合酶 2.0	50 μL（红盖）
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	50 μL（蓝盖）

【自备试剂】 LAMP 模板、LAMP 引物

【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。本公司发现很多水浴锅或金属浴温度显示根本不准，故建议先用阳性对照和阴性对照测试所用仪器在 60℃、62.5℃、65℃、67.5℃和 70℃五个温度下扩增效果，最后选择阳性和阴性颜色差异最大的温度进行扩增。不要轻易更换恒温设备。

一、样品 DNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的各种免提取的核酸释放剂。
2. 如果有 N 个样品，则至少需要做 N+2 个样品制备，多出的两个一个是样品制备阳性对照（制备时加入自备的、跟要检测的靶分子相同的阳性对照模板，一起经历提取过程）和一个样品制备阴性对照（用水替代样品）。最后 N+2 个样品一起进行 DNA 提取操作，得到 N+2 个 DNA 样品。

二、配制并测试自备的 20×LAMP 引物混合液

3. 用超纯水将自备的 6 种（或 4 种）LAMP 引物干粉分别稀释到 100μM，然后按下表配制 100μL 的 20×LAMP 引物混合液，此混合液足够 100 次 20 μL 体系的 LAMP 扩增。如果需要配制的引物混合液体积异于 100 μL，则各成分的用量需按比例调整。引物混合液可以在-20℃放置 2 年。

引物名称	母液浓度	配制 100 μ L 混合液所需量	在 20 \times LAMP 引物混合液中的浓度
FIP 引物	100 μ M	32 μ L	32 μ M
BIP 引物	100 μ M	32 μ L	32 μ M
F3 引物	100 μ M	4 μ L	4 μ M
B3 引物	100 μ M	4 μ L	4 μ M
Loop F	100 μ M	8 μ L	8 μ M
Loop B	100 μ M	8 μ L	8 μ M
自备超纯水		12 μ L	

注意：如果设计的LAMP引物不含Loop引物，则按上表配制时Loop引物用超纯水替代，使得总体积为100 μ L。

- 测试引物的专一性：用 qPCR 仪器做加模板和不加模板（至少 1000 拷贝/反应）的荧光 LAMP 反应，测试每套 LAMP 引物的专一性。无模板反应的 Ct 值比有模板反应的 Ct 值相差越大，LAMP 引物的非特异扩增就越低，专一性就越强。用户需要根据每套 LAMP 引物的测试结果设定该套 LAMP 阴性和阳性的阈值（本产品只用于定性）。如果没有 qPCR 仪器，只能用肉眼检测法来筛选引物，则扩增 1 小时后加模板的反应呈现蓝色，不加模板的反应呈现淡蓝色的引物，就可以使用。扩增后都呈现蓝色的引物，有非特异扩增，不能使用。都呈现淡蓝色的引物，没有扩增，也不能使用，上述两种情况均需要重新设计。

三、LAMP 扩增（20 μ L 体系）

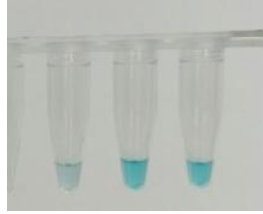
- 预先将保温设备调到 65 $^{\circ}$ C。
- 反应设置：第一次使用时请将所有 Bst 酶（50 μ L，本试剂盒提供）加入到 4 \times LAMP MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。如果有 N+2 个 DNA 纯化样品，则最好设置 N+5 个 LAMP 扩增，增加扩增阳性对照、无模板阴性对照、无引物无模板阴性对照各 1 个。在 N+5 个 0.2mL 的 PCR 管中按下表加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	无模板阴性对照管	扩增阳性对照管
4 \times LAMP MagicMix（加酶后）	各 5 μ L	5 μ L	5 μ L
自备 20 \times 引物混合液	各 1 μ L	1 μ L	-
自备的 N+2 个样品 DNA	1-14 μ L	-	-
LAMP 阳性对照模板-引物混合物	-	-	4 μ L
超纯水	补到 20 μ L	补到 20 μ L	补到 20 μ L

- 如使用金属浴、水浴或普通无热盖 PCR 仪，则每管再加 50 μ L 自备石蜡油。如不加石蜡油，保温期间水分会蒸发，非特异扩增会增加。如果使用带热盖的 PCR 仪器，则不需要加石蜡油。
- 立即放到 65 $^{\circ}$ C 并保温 90 分钟。如果使用荧光定量 PCR 仪：聚合温度设为 65 $^{\circ}$ C，1 次循环 1 分钟，90 个循环，每分钟在 SYBR 通道采集一次荧光信号。

三、可视化结果分析及解读

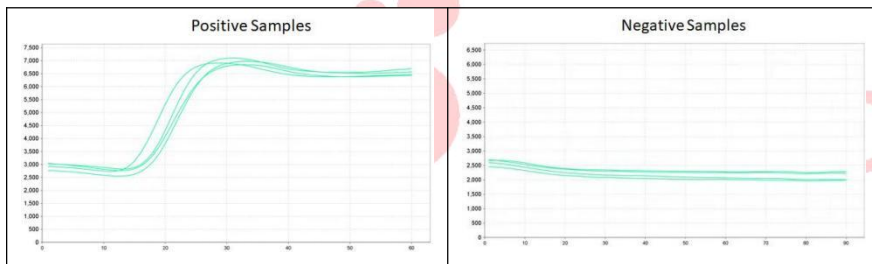
9. 扩增结束后肉眼观察结果判断阴性和阳性。典型的结果见下图：左边管为阴性，右边两个管为阳性。



10. 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。

四、荧光染料法结果分析及解读

11. 结果分析：实验有效性判定。如果两个阳性对照能够得到标准的 S 型扩增曲线而两个阴性对照都没有扩增，则实验有效，才有必要对样品进行分析。如果阳性对照没有出现 S 型扩增曲线，则说明试剂盒可能失效，实验无效。
12. 如果阴性对照有 S 型扩增曲线，则说明 LAMP 引物设计得不好，有非特异扩增，需要重新优化引物。也可能是环境或试剂有污染，实验无效。遇到实验无效的情况，请跟厂家客户联系，分析原因后再恢复实验。
13. 如果实验有效，则分析样品。凡是有 S 扩增曲线的，可以判断为阳性。凡是没有 S 扩增曲线的，可以判断为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性结果，扩增曲线为 S 型，右边为阴性结果，扩增曲线不呈 S 型。



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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。