

Colorimetric pH Sensitive LAMP Kit (DNA/RNA) (可冻干版, 含保护剂)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LP322

保存: -20°C保存一年

产品说明

本产品为Colorimetric pH Sensitive LAMP Kit (DNA/RNA) (货号: LP321) 的可冻干版, 包含高浓度*Bst* II DNA聚合酶、Reverse Transcriptase (High Temperature)反转录酶、5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix、可视化pH指示剂N-Red, 并配套提供冻干保护剂。本产品可用于制备冻干微球, 进行以DNA/RNA为模板的可视化LAMP/RT-LAMP反应。

Bst II DNA Polymerase为重组*Bacillus stearothermophilus* DNA聚合酶, 在大肠杆菌中表达后经纯化分离而得到。该酶具有5'→3'DNA聚合酶活性, 缺失5'→3'外切核酸酶活性。Reverse Transcriptase (High Temperature)为耐高温反转录酶, 与*Bst* II搭配使用可以RNA为模板下在65°C恒温条件下进行一步法逆转录和LAMP扩增。5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix为可冻干的LAMP预混反应液, 已包含必需的MgSO₄、dNTPs等组分, 体系配制时无需另外加入。N-Red为pH敏感型酸碱指示剂, 变色pH范围为6.8~8.0, 将N-red比色剂提前加入LAMP反应混合液中, 反应结束后无需开盖, 通过肉眼观察比较其显色结果, 阳性反应孔为洋红色, 阴性反应孔为橙黄色。

特点

- 等温扩增 (LAMP/RT-LAMP) 能力
- 快速聚合
- 强链置换能力

适用范围

- DNA/RNA等温扩增
- 富含GC区域的核酸测序
- 可用于要求嗜温链置换的实验

产品组成信息

产品组成	规格01 (100 rxns)	规格02 (200 rxns)
<i>Bst</i> II DNA Polymerase (高浓度)	10 µl	20 µl
Reverse Transcriptase (High Temperature) (高浓度)	10 µl	20 µl
5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix	0.5 ml	1 ml
N-red Stain	150 µl	300 µl
冻干保护剂	0.75 ml	2×0.75 ml
RNase-free Water	2×1 ml	4×1 ml

使用方法

1、待检核酸样本准备

核酸提取后的样本可作为模板直接加入到反应中。本产品N-red为pH敏感型指示剂, 核酸样本请避免使用Tris-HCl浓度高的缓冲体系, 可能会导致pH指示剂无法变色, 影响结果判断; 避免使用强酸或强碱的核酸释放剂处理样本, 若必须使用, 则样本处理完后需将其pH调节至8.0。



2、配制冻干反应体系（以15 μl冻干体系为例）

从-20℃取出各反应组分，按照下表建议用量进行体系配制：

反应组分	体积
5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix	5 μl
冻干保护剂	7.5 μl
N-Red Stain (加或不加)	1.5 μl
<i>Bst</i> II DNA Polymerase (高浓度)	0.1 μl
Reverse Transcriptase (High Temperature) (高浓度) (模板为RNA时加入)	0.1 μl
RNase-free Water	Variable
Total Volume	15 μl

*注意：可以选择在冻干体系中加入N-red染料直接冻干成含有染料的橙黄色微球，也可选择在微球复溶时加入，不影响反应效果，但只需加入一次即可，即若冻干时已加入染料，则复溶时无需再次加入。

3、冻干（推荐微球冻干程序）

步骤	阶段	温度/℃	斜率时间/min	控温时间/min	真空度/Pa
1	预冻	-50	0	40	-
2		-49	0	120	0
3	升华干燥	-45	10	600	0
4		-40	10	480	0
5		-35	10	180	0
6	解析干燥	26	150	240	0
7	样品储存	4	0	1440	0

*注意：微球冻干前，需提前开启冻干机的“隔板制冷”，待板层温度降至-50℃后再放入待冻干样品，关紧舱门，按照预设步骤1~7自动完成冻干过程。

4、微球复溶（25 μl LAMP扩增体系）

反应组分	体积	体积
冻干微球	15 μl水或复溶液	-
FIP/BIP Primers	Variable	1.6 μM each
F3/B3 Primers	Variable	0.4 μM each
Loop F/B Primers	Variable	0.8 μM each
N-Red Stain (加或不加)	1.5 μl	-
Template (DNA或RNA)	Variable	> 50拷贝或更多
RNase-free Water	Variable	-
Total Volume	25 μl	

5、恒温扩增

推荐反应条件：60℃~65℃反应30分钟，具体反应温度根据引物Tm值确定。建议在反应结束后设置85℃孵育10分钟，使*Bst* III酶失活。



6. 结果判读

反应30分钟后，立刻取出反应管，待降温至室温后，置于光线良好的环境中观察（建议以白纸作为背景）：反应液为洋红色或橘红色为阳性，反应液为黄色则为阴性，且颜色变化程度与检测使用的模板量有关，模板高的情况下颜色变化更加明显。如下图1数据展示。

【注】：①按照上述步骤5进行恒温扩增和85°C终止实验后，样品可暂存于室温或4°C，不影响阴/阳样品的颜色；若不设置85°C终止步骤，则反应时间需要准确计时并立即观察拍照，超过说明书规定的时间可能会出现假阳性结果；②可视化LAMP相比荧光定量法，需要更多反应时间积累足够多的产物才能引起反应液颜色变化，因此反应时间与模板量高低有关：当模板量高时，反应30分钟即可；当模板量低时，可能需要延长时间至60分钟。

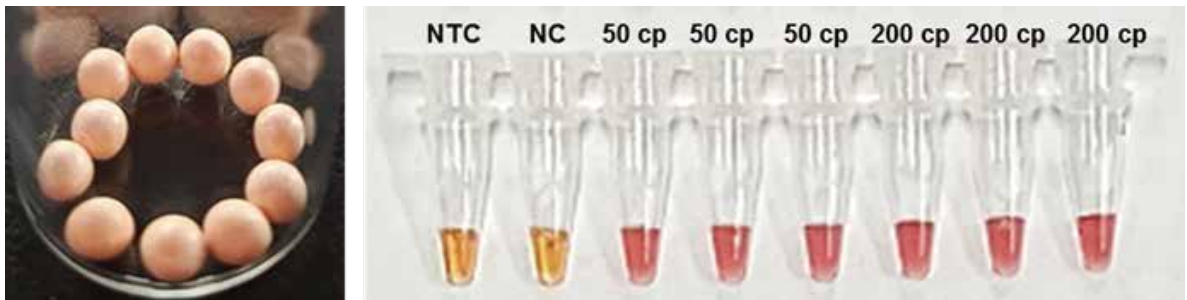


图1. 微球产品图及可视化LAMP扩增反应结果图

图中NTC为无模板对照，NC为阴性对照，cp为copies，即每个25 μ l反应体系中的拷贝数，

操作建议&注意事项

- 1、冻干前的所有试剂组分避免反复冻融。
- 2、当配制冻干体系进行冻干时，必须加入冻干保护剂，否则会影响冻干效果。
- 3、辅料配方，各液体组分如果发生变化，需重新测定冻干参数，并对冻干程序做相应调整。
- 4、冻干设备的具体要求：
 - 4.1 冻干机冷阱温度（空载） $\leq -60^{\circ}\text{C}$ ，各板层温度 $\leq -50^{\circ}\text{C}$ ，且温度均一性 $\leq \pm 1^{\circ}\text{C}$ ；
 - 4.2 仪器有真空调节功能，极限真空度 $\leq 3 \text{ pa}$ ，抽空速率 $\leq 30 \text{ min}$ （大气压至10 pa）；
 - 4.3 仪器有压力升测试功能，且冻干实验前，需进行真空泄漏率测试；
 - 4.4 仪器有惰性气体回填功能、压盖功能，冻干完成后可掺入惰性气体保护；
 - 4.5 不同厂家不同规格型号的冻干机会存在差别，使用前需对冻干机相关性能进行充分验证。
- 5、*Bst* III DNA聚合酶不能用于热循环测序或PCR，最适反应温度65°C；
- 6、使用本产品扩增反应可在水浴锅、金属浴、PCR仪或其他具有恒温加热模块的设备进行反应，建议在配制完体系后于每个样品孔上方加入20 μ l左右的石蜡油（PCR级，自备），可有效避免试剂挥发或交叉污染而影响结果判断；
- 7、本试剂盒中pH指示剂颜色变化受缓冲液浓度影响较大，建议使用无核酸水溶解模板，稀释引物请使用RNase-free Water或0.1 \times TE Buffer；
- 8、尽量减少反复开盖次数，各试剂组分均不可长期接触空气，否则会吸附空气中的CO₂致使pH降低而影响实验结果判断；
- 9、建议区分实验环境，在不同的区域进行反应试剂及模板的配制，反应结束不可开盖以免造成气溶胶污染影响后续实验。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202301

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

