



【注意事项】

1. 引物设计对成功扩增十分关键。除用于 SNP 分型外, 尽量以保守区设计引物。引物至少包括 F3/B3 和 FIP/BIP, 加入环状引物 Floop/Bloop 可以使反应速度大大提高。应优化引物序列、GC 含量和尽量避免二级结构。反应中各个引物的浓度及比例对扩增效果有一定的影响。建议先将所有引物混合在一起, 配制成 10× 浓度以方便使用。
2. 1×U-LAMP Mix 中已含有 8mM Mg²⁺, 这可满足多数扩增反应。如特殊需要, 可自行补加至合适浓度。
3. LAMP 扩增具有特异性好、灵敏度高、时间快、不需要特殊仪器设备等优点。但太高的灵敏度使得其比普通 PCR 扩增更加容易污染导致假阳性。因此, 必须高度重视扩增产物的污染。常规措施包括严格的实验分区、添加 UNG 和 dUTP (可能导致反应效率下降)、使用荧光定量等不开盖检测方法。实验室一旦遭到污染, 所有相关试剂必须全部更换, 必要时还得更换实验室。
4. 严防操作环境、使用的容器耗材和试剂的 RNase 污染。所用器具与耗材进行无 RNase 处理。操作过程中勤换手套。
5. 要确证扩增的为目标基因, 可以使用特定的限制性酶切和/或 Southern 杂交。
6. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品等用途。

【技术支持信息】

如有任何问题或欲索取更多产品信息, 请 Email 至 mylab@163.com; 或拨打电话: 010-62960868。莱博公司还可提供相关的实验技术服务。

北京美莱博医学科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 1 号国际科技创业园 1#-804

电话:86-10-8289 3546-801

传真:86-10-62960868-806

邮编:100085

<http://www.mylab.com.cn> mylab_sales@163.com

MyLab®等温扩增检测系列

RT-ULAMP 通用型 RNA 快速扩增试剂盒

Ver 1.0

使用说明书



北京美莱博医学科技有限公司

2008 年 9 月



【规格】50T。

【背景】 逆转录环介导等温扩增技术(Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP)是一种新颖的 RNA 扩增方法。其基本原理是采用 4/6 条特异引物（针对基因的 6/8 个区域）及一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶和 AMV 反转录酶，在 60~65℃ 左右对 RNA 进行同步反转录及等温扩增，短时间扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝。RT-LAMP 具有高特异性、高效性、快速、简便、易检测等特点。RT-ULAMP 是我公司在 LAMP 基础上改进开发的一种技术，它在尽可能保留了 LAMP 的优点的同时，降低了扩增产物污染机会和假阳性率。

【用途与特点】 RT-ULAMP通用型RNA扩增试剂盒可以用于一切与LAMP相关的快速RNA等温扩增技术。其中，2xU-LAMP Mix包含了除酶、引物和模板外的所有成份，使用十分方便；优化的酶配方，使得扩增更加快速高效。

【组成及保存条件】

编号	试剂盒组成	体积(50T)	保存条件
1	2xU-LAMP Mix *	500μl	-20℃
2	酶混合物	125μl	-20℃
3	MgCl ₂ (25 Mm)	200μl	-20℃
4	对照引物Mix (10x)	10μl	-20℃
5	对照模板RNA	10μl	<-20℃
6	无核酸酶ddH ₂ O	1000μl	-20℃

*: 2xMix的组成为40mM Tris-HCl (pH 8.8), 20mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 16mM MgSO₄, 0.2% Triton X-100, 2.4mM dNTP、1.6M甜菜碱及其它稳定剂和增强剂。

【灵敏性与质量控制】

在优化条件下，使用本试剂盒的试剂，可检测到单拷贝的RNA分子。

【有效期】 试剂盒有效期大于 12 个月。



【使用方法】

使用时只需取适量 2x U-LAMP Mix 溶液，加入酶、引物和模板 RNA，并加入去离子水补足体积，使 U-LAMP Mix 的浓度为 1x 即可进行反应。1x U-LAMP Mix 中 Mg²⁺浓度为 8mM，可根据实验需要补加 MgCl₂（试剂盒中已提供）。

【反应举例】

注意：以下举例多数情况下可供参考。实际反应条件因模板、引物等的不同而各异，需根据实际情况，设定最佳反应条件。

以乳腺癌细胞 RNA 为模板，扩增 CK19 基因，反应体系为 20μl。

👉 制备反应液:

在冰上溶解除酶外的各种组份，混匀，稍离心。在反应管中加入以下组份:

2x U-LAMP Mix	10μl
对照引物 Mix	2μl
Template RNA	2μl
酶混合物	2.5μl
ddH ₂ O	补至 20μl

如在反应管中加入 20xSmartGreen（美莱博公司生产，另售）1μl，可直接在荧光定量 PCR 仪中进行荧光定量检测。

👉 等温扩增:

混匀，置于 60℃ 保温 30~90min，80℃ 10min 灭活 *Bst* DNA 聚合酶。产物置于 -20℃ 备用或立即用于下游检测。

👉 扩增产物的检测。有以下几种常用方案:

1. 琼脂糖凝胶电泳。取扩增产物 5μl，1~2% 的琼脂糖凝胶电泳，可见 LAMP 特征性电泳图谱；
2. 向扩增产物中直接加入 20xSmartGreen（美莱博公司生产，另售）1μl，混匀，稍离心。将反应管置于紫外透射仪或凝胶成像系统中，紫外灯下可见绿色荧光产生；
3. 荧光定量检测；
4. 反应产物沉淀的肉眼检测等。