

RT-LAMP pH Sensitive Dye Chromogenic Version Freeze-Dryable Reagent

RT-LAMP pH 敏感染料显色版可冻干试剂

产品信息

产品名称	产品编号	规格
RT-LAMP pH Sensitive Dye Chromogenic Version Freeze-Dryable Reagent	13920ES60	100 T
RT-LAMP pH 敏感染料显色版可冻干试剂	13920ES80	1,000 T
	13920ES92	10,000 T

产品描述

本产品将 LAMP 可视光染料整合到 buffer 中, buffer 中含 dATP、dCTP、dGTP 和 dUTP 等 Bst II DNA Polymerase 扩增必须的组分, 同时包含 pH 敏感指示剂, 试剂盒含有无甘油 Bst II DNA Polymerase、UDGase、RT enzyme 等, 可用于冻干反应体系的配制, 同时含有冻干保护剂, 可以直接上冻干机冻干。本试剂具有较高的扩增效率和灵敏度, 扩增结果可肉眼判断, 阳性反应孔为橙黄色, 阴性反应空为洋红色, 反差极大。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		13920ES60 (100 T)	13920ES80 (1,000 T)	13920ES92 (10,000 T)
13920-A	2.5×pH Sensitive Reation Buffer	1 mL	10 mL	100 mL
13920-B	无甘油 RT 酶 Mix	50 μL	500 μL	5 mL
13920-C	无甘油 Bst 酶	30 μL	300 μL	3 mL
13920-D	冻干保护剂	500 μL	5 mL	50 mL

运输与保存方法

Part I: 组分 13920-A/D 【2.5×pH Sensitive Reation Buffer/冻干保护剂】干冰运输, -20°C 保存, 有效期 6 个月。

Prat II: 组分 13920-B/C 【无甘油 RT 酶 Mix/Bst 酶】冰袋运输, 4°C 保存, 有效期 3 个月。

注意事项

1. 使用本试剂前请仔细阅读说明书。
2. 整个实验, 应规范操作, 包括反应体系的配制、样本处理及加样。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

1. 待检样本准备

核酸提取后样本: 直接作为模板, 加入反应体系中。

煮沸法: 临床采集的拭子样本直接放入水中, 置于 95°C 水浴锅或金属浴中进行 5 min 的热裂解, 释放核酸, 混匀后即可作为模板加入反应体系中。

【注】:

- 1) 处理样本的试剂不能使用强酸或强碱的核酸释放剂, 若必须使用, 则样本处理完后, 需将样本的 pH 调节至 8.0。
- 2) 加入的样本中, 避免使用 Tris-HCl 等高浓度的缓冲体系, 避免 pH 指示剂不能发生变色, 影响实验结果判读。

2. 冻干上机反应体系配置

将 A 组分从 -20°C 取出, 溶解后颠倒混匀, 瞬时离心确保所有液体落到管底。根据待检测样品量, 配制如下体系 (通常实验需要设置阴性对照和阳性对照):

组分	单次反应体积 (μL)	终浓度
2.5×pH Sensitive Reaction Buffer	10	1×
Bst 酶	0.3-1.2	0.32U/μL-1.28U/μL
RT 酶 Mix	0.5	-
10×Primers ^a	2.5	1×
冻干保护剂	5	-

a **【注】:** 不同引物的最适 Bst 酶用量不同, 更换引物建议按照推荐的酶量梯度筛选最适酶用量。

3. 冻干上机

3.1 辅料配方发生微小的变化, 需重新测定冻干参数, 并做相应调整。

3.2 各组份使用前充分混匀, 避免剧烈震荡产生过多气泡。反应体系配制好后, 建议震荡 5-10 s 后瞬时离心再上机。冻干粉 8 联排管盖为冻干试剂制备专用, 上机时请更换普通 8 联排管盖。

3.3 冻干设备要求:

冷阱盘管表面温度 ≤ -60°C

板层温度 ≤ -45°C, 温度均一性 ±1°C (性能详细说明及验证方案咨询翌圣生物技术人员)

可做压升测试 (冻干生产前, 做泄漏率测试)

3.4 环境要求:

溶液分装及配置尽量在万级层流保护下进行, 环境空间尘埃掉落进溶液中成为冻干过程的晶核, 影响溶液的结晶的过冷度, 导致产品质量不一致性。

3.5 真空控制

掺气方式: 建议掺入气体为高纯氮气

3.6 冻干试剂 MIX 工艺参数设定参考 (冻干设备升华效率 ≥ 1mm/小时)

	温度	斜率时间	时间	真空 Pa	备注	
预冻	1	-45°C	—	2 h	—	常温最快速率降温
	2	-45°C	—	—	—	保持, 根据包材验证保持时间
真空	3	-45°C	—	—	15	
	4	-40°C	—	10 h	15	
升华阶段	5	0°C	2 h	0 h	15	无斜率控制型冻干机, 可分 6 个阶段升温
	6	25°C	2 h	4 h	15	
解析干燥	7	30°C	—	2 h	0	
含水量控制	8	压升测试重制时间: 30 min				压升测试: 2 min < 5 Pa

3.7 实验过程中请使用 RNase free 耗材。

3.8 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

4. 冻干粉使用

组分	单次反应体积 (μL)	终浓度
DEPC H ₂ O 复溶	20	1×
模板	5	-

【注】:

- 1) 各组份使用前充分混匀, 避免剧烈震荡产生过多气泡。反应体系配制好后, 建议震荡 5-10 s 后瞬时离心再上机;
- 2) 冻干粉 8 联排管盖为冻干试剂制备专用, 上机时请更换普通 8 联排管盖。

5. 反应孔设置:

- 1) 阴性对照推荐设置空白 (不加模板) 对照以及 NTC (一般为水) 对照。
- 2) 10×Primers: 16 μM FIP/BIP, 2 μM F3/B3, 4 μM Loop F/B each。
- 3) 模板加入量在 1-8 μL 内调整; 推荐模板 DNA 溶解于去离子水中。

6. 加样

- 1) 如果反应是在水浴锅中进行, 则每管加入 20 μL 矿物油 (自备), 以防止液体蒸发导致结果的误差。如果反应是在 PCR 仪中进行, 不需要加矿物油 (请开启热盖)。
- 2) 为避免污染, 建议用户在超净台中配制组分, 在其他房间的通风橱中加入模板以免出现假阳性结果。
- 3) 由于本试剂使用的是 pH 指示剂法, 该试剂中的缓冲液能力较弱, 试剂不可长期接触空气, 否则会吸附空气中的二氧化碳致使试剂变酸, 导致试剂颜色变浅, 影响实验结果判读。

7. 反应条件

温度	时间	作用
25-37°C	2-5 min	降解含 U 模板
60-65°C	30 min	恒温扩增
85°C	5 min	失活

【注】:

- 1) 本试剂盒所用酶对温度非常敏感, 强烈建议使用 PCR 仪操作; 如用水浴锅, 应先加热使其达到规定温度后再反应。温差超过 2°C, 将导致扩增效率降低, 使阳性反应无法在说明书规定的时间内洋红色变成橙黄色。
- 2) 反应温度需要根据引物的 T_m 值进行调整。
- 3) 反应时间依据模板浓度而定, 低浓度模板可能需要 60 min 时间才能有比较明显的反应。

8. 结果判断

反应 30 min 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)。如反应液为洋红色, 则为阴性结果; 如反应液为橙黄色则为阳性结果。

【注】: 反应的时间必须准确计时, 超过说明书规定的反应时间可能会出现假阳性。反应管不可开盖, 否则会污染, 影响后续实验。