

天
净
沙
系
列

CAT#:16-13602
低温运输, -20℃保存

BINGENE

猴痘病毒中非株可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒

Monkeypox Virus Central African Strain Fluorescent & Colorimetric LAMP Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点

猴痘病毒 (Monkeypox Virus) 属正痘病毒属, 可在非洲绿猴肾细胞中培养生长, 导致细胞病变。人类感染猴痘, 主要通过被已感染的动物咬伤, 或直接接触被感染动物的血液、体液、猴痘病损而感染; 通常由动物传给人, 偶也可以发生人到人的猴痘传播。一般认为是在直接的、长时间面对面的接触中, 通过含毒的大量呼吸飞沫而传播。猴痘还可以通过直接接触感染者的体液或病毒污染的物品 (如衣服和被褥) 而传播。主要临床症状为发热、剧烈头痛、淋巴结肿大、背痛、肌肉痛 (肌肉疼痛) 以及倍感无力 (精神不振)。猴痘病毒有两个主要毒株: 中非 (刚果) 毒株和西非毒株。前者死亡率高达 10%, 而西非毒株的致死率约为 1%。因此对猴痘病毒中非株的快速准确鉴定有重要作用, 为此本公司根据双染料 LMAP 技术, 开发了简单快捷的猴痘病毒中非株 LAMP 检测试剂盒, 它具有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供 DNA 样品。
2. 恒温扩增, 可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 含可见光和荧光染料, 既可以用金属浴和水浴扩增用可见光肉眼判断结果, 也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。
4. 检测灵敏性一般比 PCR 高 10 倍以上。
5. 特异性高, 根据猴痘病毒中非株保守序列设计 4 条特异引物, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 本产品不可检测猴痘病毒西非株。
7. 一般 30 分钟内出结果, 比 PCR 快。
8. 上样量大, 对 20 μ L 的反应体系, 最大样品加样量高达到 14 μ L。
9. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
10. 提供无传染性的阳性对照, 便于分析实验结果。
11. 本产品只能用于定性分析, 不推荐用于定量分析。
12. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的荧光及可视化 LAMP 扩增。
13. 只可用于科研。

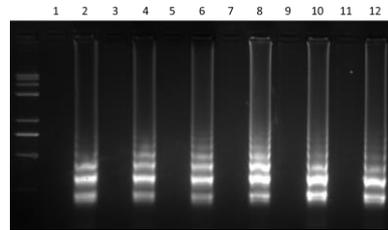
规格及成分

成份	编号	规格	包装材料
4 \times LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法, 待加酶)	211223a	200 μ L	0.5mL 绿色盖
Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50 μ L	0.5mL 红盖管
20 \times 猴痘病毒中非株 LAMP 引物混合液	yw16-13602	50uL	0.5mL 白盖管
猴痘病毒中非株 LAMP 阳性对照 (1 \times 10E4 拷贝/ μ L)	pc13602-AF346406.1	250uL	0.5mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管

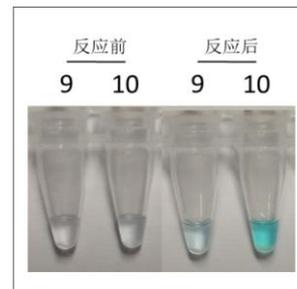
	使用手册	16-13602sc	1 份	无																								
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。																											
自备试剂	待测样品。																											
使用方法	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 用自选方法纯化样品 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照 (PC) 和一个样品制备阴性对照 (NC)。PC 用 10μL 本试剂盒提供的阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL) 加一定量的水作为样品制备 PC，加水后的总体积跟所用核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致。NC 用水替代。 <p>二、LAMP 反应 (20μL 体系)</p> <ol style="list-style-type: none"> 反应设置：第一次使用时请把所有 Bst DNA 聚合酶 2.0 (50μL，本试剂盒提供) 加入到 4×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+4 个 LAMP 扩增，增加 LAMP 扩增阳性对照和 LAMP 扩增阴性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分： <table border="1" data-bbox="513 1200 1426 1666"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>N+2 个样品管</th> <th>LAMP 阴性对照</th> <th>LAMP 阳性对照</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，加酶后)</td> <td>各 5 μL</td> <td>5 μL</td> <td>5 μL</td> </tr> <tr> <td>20×猴痘病毒中非株 LAMP 引物混合液</td> <td>各 1 μL</td> <td>1 μL</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>N+2 个样品 DNA</td> <td>各 14 μL</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>-</td> <td>14 μL</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>猴痘病毒中非株 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>14 μL</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> 如果使用金属浴或水浴保温，没有热盖，则每个反应管中加入 50μL 自备的 PCR 级石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发到管盖下方凝集，反应体积变化，会严重影响反应效率，增加假阳性率。最后置于 65℃保温 60 分钟进行扩增。 如果使用常规 PCR 仪进行 LAMP 反应，设置程序时必须打开热盖，设置成 65℃保温 60 分钟进行扩增。 如果使用荧光定量 PCR 仪，则设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。 				成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照	4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，加酶后)	各 5 μL	5 μL	5 μL	20×猴痘病毒中非株 LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL	N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-	超纯水	-	14 μL	-	猴痘病毒中非株 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	-	-	14 μL
成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照																									
4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，加酶后)	各 5 μL	5 μL	5 μL																									
20×猴痘病毒中非株 LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL																									
N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-																									
超纯水	-	14 μL	-																									
猴痘病毒中非株 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	-	-	14 μL																									

三、结果分析

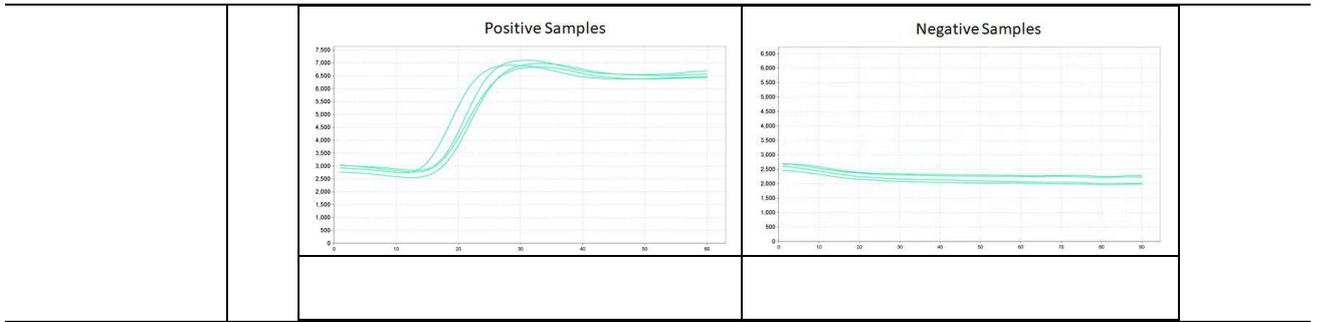
7. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μ L LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。LAMP 阳性对照必须有正常 LAMP 条带(200bp 左右的梯形扩增产物)，LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



8. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的反应液将呈蓝色，样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的反应液将呈淡蓝色或无色，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。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见左图（9 为阴性，10 为阳性）。



9. 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。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。



关联产品

猴痘病毒中非株荧光定量 PCR 试剂盒