

天
净
沙
系
列

CAT#:16-24810
低温运输, -20℃保存

BINGENE

诺如病毒 G1 型可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒

Norwalk Viruses G1 Fluorescent & Colorimetric RT-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

诺如病毒 (Norovirus, NV) 又称诺瓦克病毒 (Norwalk Viruses), 是人类杯状病毒科 (Human Calicivirus, HuCV) 中诺如病毒 (Norovirus, NV) 属的一种病毒。诺如病毒感染性腹泻在全世界范围内均有流行, 全年均可发生感染, 感染对象主要是成人和学龄儿童, 寒冷季节呈现高发。诺如病毒变异快、环境抵抗力强、感染剂量低, 感染后潜伏期短、排毒时间长、免疫保护时间短, 且传播途径多样、全人群普遍易感, 因此, 诺如病毒具有高度传染性和快速传播能力, 因此对其进行快速诊断具有重要的意义。诺如病毒分 5 个基因组 (G I ~G V), 其中只有 G I、G II 和 G IV 可以感染人, 而 G III、G V 分别感染牛和鼠。我国目前最常见的诺如病毒为 G I 和 G II 型, 本产品就是专门检测诺如病毒 G I 型的双染料 RT-LAMP 产品, 它具有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供病毒 RNA 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 RT-PCR 高 10 倍以上, 分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应左右。
5. 特异性高, 根据诺如病毒 G1 型 RNA 保守序列设计 4 条特异引物, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
6. 一般 35 分钟内出结果, 比 RT-PCR 快。
7. 提供无传染性的阳性对照, 便于分析实验结果。
8. 本产品只能用于定性分析, 不推荐用于定量分析。
9. 上样量大, 对 20 μ L 的反应体系, 最大样品加样量高达 13 μ L。
10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
11. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的染料法荧光及可视化 RT-LAMP 扩增。
12. 只可用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装材料
RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料, 待加酶)	211224a	200 μ L	0.5 mL 本色盖
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μ L	0.5 mL 红盖管
20 \times 诺如病毒 G1 型 RT-LAMP 引物混合液	yw16-24810sf	50 μ L	0.5 mL 白盖管
诺如病毒 G1 型 RT-LAMP 阳性对 照 (1 \times 10E4 拷贝/ μ L)	pc16-24810- M87661	250 μ L	0.5 mL 黄盖管

	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
	使用手册	16-81920sc	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

一、样品 RNA 的制备

- 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 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) 10uL 加一定量的水，使其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致，以此作为 PC，NC 用水替代。

二、RT-LAMP 反应 (20μL 体系)

- 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶) 中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。
- 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，需要设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加 RT-LAMP 阴性对照和 RT-LAMP 阳性对照。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

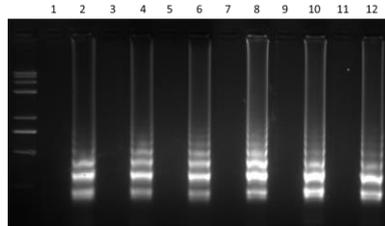
成分	N+2 个样品管	RT-LAMP 阴性对照	RT-LAMP 阳性对照
RT-LAMP MasterMi (可视化染料-荧光染料，已加酶)	各 6 μL	6 μL	6 μL
20× 诺如病毒 G1 型 RT-LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N+2 个样品 RNA	各 13 μL	-	-
诺如病毒 G1 型 RT-LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	-	-	1-13 μL
超纯水	-	13 μL	补水到 20 μL

- 本产品含两种染料，故最好使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

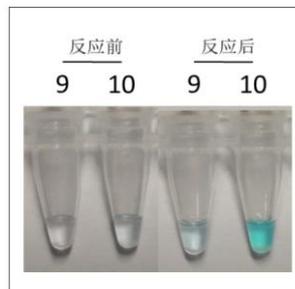
三、结果分析

- 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

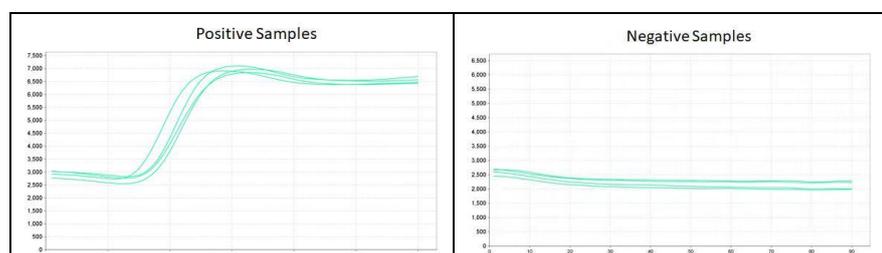
的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μ L RT-LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RT-LAMP 阳性对照必须有正常 RT-LAMP 条带（200bp 左右的梯形扩增产物），RT-LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RT-LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将呈蓝色，样品制备阳性对照和 RT-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）。



8. 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 RT-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 RT-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	诺如病毒 G1 型荧光定量 RT-PCR 试剂盒	