

天
净
沙
系
列

CAT#:16-32410
低温运输, -20℃保存

BINGENE

双芽巴贝斯虫荧光及可视化 LAMP 试剂盒

B. bigemina Fluorescent & Colorimetric LAMP Kit

使用手册 V1.0

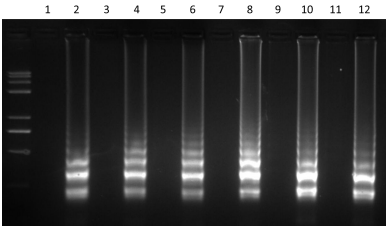
江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

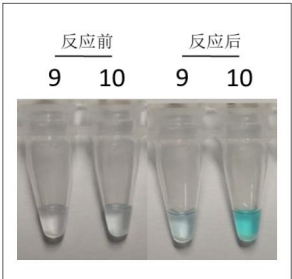
产品及特点	双芽巴贝斯虫 (<i>Babesia bigemina</i>) 是一种对牛危害较大的血液寄生虫, 虫体经二棘雪蜱、镰形扇头蜱和微小牛蜱等中间宿主传播。感染牛后, 常出现贫血、发热、血红蛋白尿、共济失调等症状, 严重时引起死亡, 极大地威胁着南方省份养牛业的发展。因此对双芽巴贝斯虫的快速准确鉴定有重要作用, 为此本公司根据独有的双染料 LMAP 技术, 开发了简单快捷的双芽巴贝斯虫 LAMP 检测试剂盒, 它具有下列特点: 1. 即开即用, 用户只需要提供 DNA 样品。 2. 恒温扩增, 可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。 3. 含可见光和荧光染料, 既可以用金属浴和水浴扩增用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, 根据双芽巴贝斯虫保守序列设计 4 条特异引物, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 6. 一般 30 分钟内出结果, 比 PCR 快。 7. 上样量大, 对 20 μL 的反应体系, 最大样品加样量高达 14 μL。 8. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。 9. 提供无传染性的阳性对照, 便于分析实验结果。 10. 本产品只能用于定性分析, 不推荐用于定量分析。 11. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光及可视化 LAMP 扩增。 12. 只可用于科研。			
规格及成分	本产品采购 5 孔盒包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	4 $\times$ LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法, 待加酶)	211223a	200 μ L	0.5mL 绿盖管
	Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50 μ L	0.5mL 红盖管
	20 $\times$ 双芽巴贝斯虫 LAMP 引物混合液干粉	yw16-32410-LQ	干粉	0.5mL 白盖管
	双芽巴贝斯虫 LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	pc32410-GQ21	250 μ L	0.5mL 黄盖管
	超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管
	使用手册	16-32410sc	1 份	无
	注意: 引物干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 55uL 的超纯水充分混匀和再使用, 未用完的需要-20 $^{\circ}$ C 保存。			
运输及保存	低温运输, -20 $^{\circ}$ C 保存, 保存期限为一年。			

自备试剂	待测样品。																								
使用方法	一、样品 DNA 的制备 1. 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。 2. 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。 二、LAMP 反应（20μL 体系） 3. 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><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><tr><td>4×荧光/可见光 LAMP MagicMix（加酶后）</td><td>各 5 μL</td><td>5 μL</td><td>5 μL</td></tr><tr><td>20×双芽巴贝斯虫 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>第 2 步所得阳性对照的 10 倍稀释液</td><td>-</td><td>-</td><td>14 μL</td></tr></table> 4. 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。 5. 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。 6. 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。 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	成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照	4×荧光/可见光 LAMP MagicMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL	20×双芽巴贝斯虫 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	-	第 2 步所得阳性对照的 10 倍稀释液	-	-	14 μL
成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照																						
4×荧光/可见光 LAMP MagicMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL																						
20×双芽巴贝斯虫 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	-																						
第 2 步所得阳性对照的 10 倍稀释液	-	-	14 μL																						

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 10μL 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。

