天净沙系列

CAT#:16-32850

低温运输，-20℃保存

BINGENE

肠道沙门氏菌荧光及可视化 LAMP 试剂盒

Salmonella enterica 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

肠炎沙门氏菌（*Salmonella enteritidis*）属于无宿主特异性而有侵害性的病原菌之一，宿主包括人和各种动物。该菌不仅能引起家禽发病死亡造成严重的经济损失，而且被污染的家禽产品作为肠炎沙门氏菌的携带者，还严重危害人类健康。 据报道，日、美等发达国家发生的食物中毒事件中 40%～80%是由禽沙门氏菌引起的，其中主要病原为肠炎沙门氏菌。由肠炎沙门氏菌引起人的急性胃肠炎（食物中毒），在世界各国有增加的趋势，已成为国际公共卫生的一个重要课题。因此对肠道沙门氏菌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，开发了简单快捷的肠道沙门氏菌 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,根据肠道沙门氏菌保守序列设计 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到 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

成　份	编号	五孔盒包装
4×荧光及可见光 LAMP MagicMix（待加酶）	180601a	200μL（绿色盖）
Bst DNA 聚合酶	211202b	50μL（红盖管）
20×肠道沙门氏菌 LAMP 引物混合液	yw16-32850	50μL（白盖管）
肠道沙门氏菌 LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	pc32850-CP050723.1	500μL（黄盖管）
PCR 级石蜡油	220101	1.5mL（蓝色盖）
使用手册	16-32850sc	1 份

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 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)，NC 用水替代。

二、LAMP 反应（20μL 体系）

3. 第一次使用时需要将本试剂盒提供的 50uL Bst DNA 聚合酶全部加到 4×荧光及可见光 LAMP MagicMix 中，轻柔颠倒 1 分钟混匀。
4. 反应设置：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：

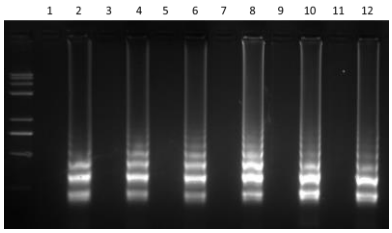
成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照
4×荧光及可见光 LAMP MagicMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
20×肠道沙门氏菌 LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-
超纯水	-	14 μL	-
肠道沙门氏菌 LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	-	-	14 μL

5. 如果使用金属浴或水浴保温，没有热盖，建议在每个反应管中加入 30μL 本试剂盒提供的 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。
6. 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。
7. 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。

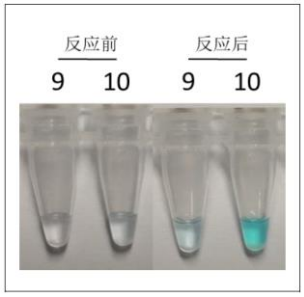
三、结果分析

8. 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 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

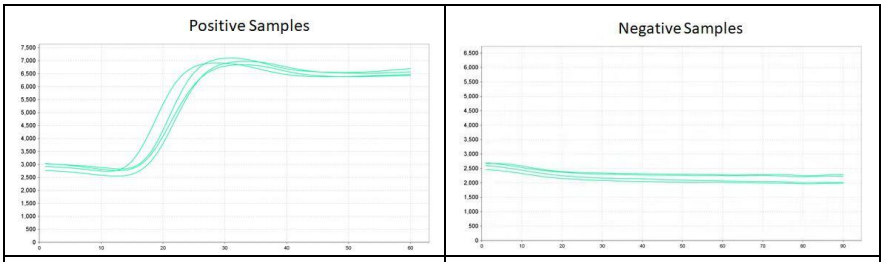
左右的梯形扩增产物），LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



9. 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）。



10. 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	肠道沙门氏菌探针荧光定量 PCR 试剂盒