

天净沙系列

CAT#:16-36030
低温运输, -20℃保存

BINGENE

肺炎克雷伯菌荧光及可视化 LAMP 试剂盒

Klebsiella pneumoniae 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

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella Pneumoniae*) 是肠杆菌科克雷伯氏菌属中最为重要的一类菌 (俗称肺炎杆菌)，是革兰阴性杆菌，其所致疾病占克雷伯氏菌属感染的 95% 以上。存在于人体上呼吸道和肠道，当机体抵抗力降低时，便经呼吸道进入肺内而引起大叶或小叶融合性实变，以上叶较为多见。肺炎克雷伯杆菌感染时，起病急，伴寒战高热，出现全身衰竭症状，咳砖红色胶冻样痰。完善胸部影像学检查，可看到肺叶或肺段实变，呈蜂窝状脓肿，且有叶间隙下坠。因此对肺炎克雷伯菌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，开发了简单快捷的肺炎克雷伯菌 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，根据肺炎克雷伯菌保守序列设计 5 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。

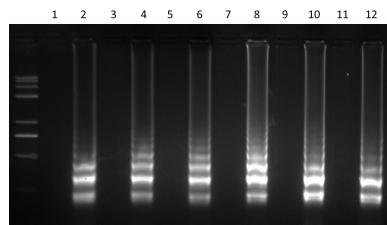
规格及成分

本产品采购 5 孔盒包装

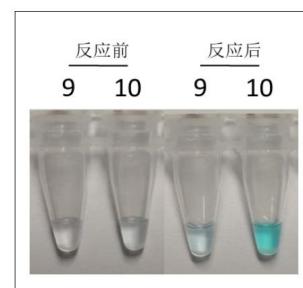
成份	编号	规格	包装材料
4 \times LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶)	211223a	200 μL	0.5mL 绿盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50 μL	0.5mL 红盖管
20 \times 肺炎克雷伯菌 LAMP 引物混合液	yw16-36030--2	50 μL	0.5mL 白盖管
肺炎克雷伯菌 LAMP 阳性对照 (1 \times 10E4 拷贝/ μL)	pc36030-CP1069	250 μL	0.5mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管
使用手册	16-36030sc	1 份	无

运输及保存	低温运输, -20°C 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"> <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×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×肺炎克雷伯菌 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> </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°C 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°C 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°C 保温 1 分钟, 采集 SYBR 通道的荧光信号。 <p>三、结果分析</p>	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×肺炎克雷伯菌 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	-	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×肺炎克雷伯菌 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	-																						
第 2 步所得阳性对照的 10 倍稀释液	-	-	14 μL																						

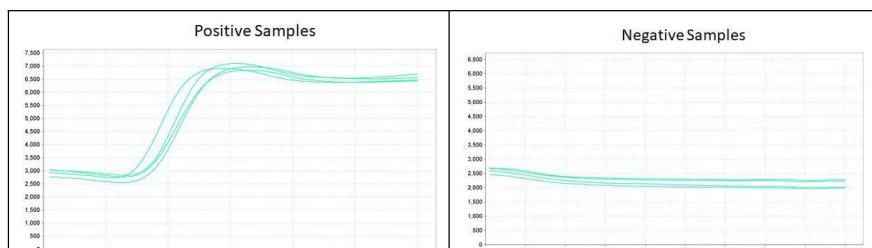
7. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 $10\mu\text{L}$ LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。LAMP 阳性对照必须有正常 LAMP 条带 (200bp 左右的梯形扩增产物)，LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



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	肺炎克雷伯菌荧光定量 PCR 试剂盒	

20221019fn