

天
净
沙
系
列

CAT#:16-37080
低温运输, -20℃保存

BINGENE

乙型肝炎病毒可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒

Hepatitis B Virus Fluorescent and 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	乙型肝炎病毒（HepatitisBVirus,HBV）是引起乙型肝炎（简称乙肝）的病原体，属嗜肝 DNA 病毒科，该科病毒包含正嗜肝 DNA 病毒属和禽嗜肝 DNA 病毒属两个属，引起人体感染的是正嗜肝 DNA 病毒属。HBV 感染是全球性的公共卫生问题，因此 HBV 检测具有重要的意义。本公司开发了基于环介导等温扩增（LAMP）的产品，专门用于检测乙型肝炎病毒。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，双重结果判读。既可以肉眼判断结果，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,根据乙型肝炎病毒保守序列设计 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 20μL 的反应体系，最大样品加样量高达 14μL。 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	本产品采用 5 孔盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶)</td><td>211223a</td><td>200μL</td><td>0.5mL (绿色盖)</td></tr><tr><td>Bst DNA 聚合酶</td><td>11-220319</td><td>50μL</td><td>0.5mL (红盖管)</td></tr><tr><td>20×乙型肝炎病毒 LAMP 引物混合液</td><td>yw16-37080</td><td>50μL</td><td>0.5mL (白盖管)</td></tr><tr><td>乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>pc60908-37080</td><td>500μL</td><td>0.5mL (黄盖管)</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1mL</td><td>1.5mL (蓝色盖)</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>16-37080sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶)	211223a	200μL	0.5mL (绿色盖)	Bst DNA 聚合酶	11-220319	50μL	0.5mL (红盖管)	20×乙型肝炎病毒 LAMP 引物混合液	yw16-37080	50μL	0.5mL (白盖管)	乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc60908-37080	500μL	0.5mL (黄盖管)	超纯水	210806	1mL	1.5mL (蓝色盖)	使用手册	16-37080sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																										
4×LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶)	211223a	200μL	0.5mL (绿色盖)																										
Bst DNA 聚合酶	11-220319	50μL	0.5mL (红盖管)																										
20×乙型肝炎病毒 LAMP 引物混合液	yw16-37080	50μL	0.5mL (白盖管)																										
乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc60908-37080	500μL	0.5mL (黄盖管)																										
超纯水	210806	1mL	1.5mL (蓝色盖)																										
使用手册	16-37080sc	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 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 14 μ L 本试剂盒提供的阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)，NC 用水替代。

二、LAMP 反应 (20 μ L 体系)

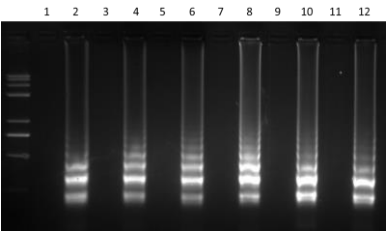
3. 反应设置：如果有 N+2 个 DNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 LAMP 扩增，增加 LAMP 扩增阳性对照和 LAMP 扩增阴性对照各 1 个。第一次使用本试剂盒的时候，需要将所有 Bst DNA 聚合酶 2.0 全部加入到 4 $\times$ LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶) 中，轻柔颠倒混匀 1 分钟。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照
4 $\times$ LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料双染料法，加酶后)	各 5 μ L	5 μ L	5 μ L
20 $\times$ 乙型肝炎病毒 LAMP 引物混合液	各 1 μ L	1 μ L	1 μ L
N+2 个样品 DNA	各 14 μ L	-	-
超纯水	-	14 μ L	-
乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	-	-	14 μ L

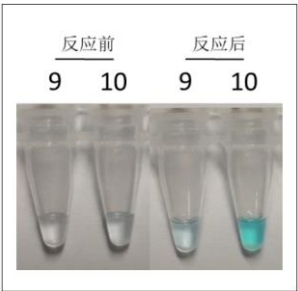
4. 本产品含两种染料，故最好使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次 65 $^{\circ}$ C 保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

三、结果分析

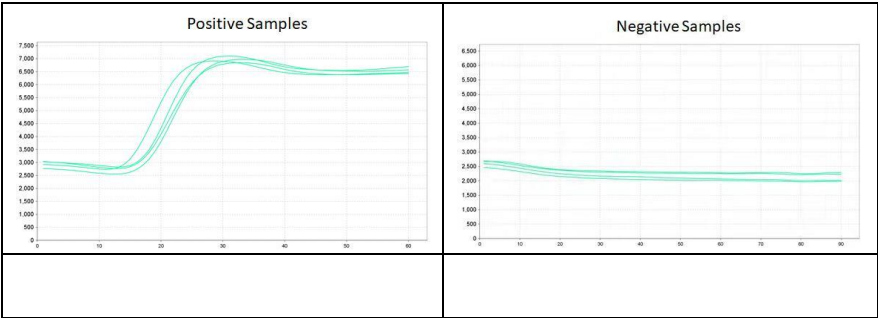
5. 电泳分析 (强烈建议不要采取此方法)：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μ L LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。LAMP 阳性对照必须有正常 LAMP 条带 (200bp 左右的梯形扩增产物)，LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



6. 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）。



7. 荧光分析（推荐使用）：样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的扩增曲线将有标准的 S 扩增曲线，样品制备阴性对照和 LAMP 阴性对照的扩增曲线将为平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效，请跟厂家联系。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 乙型肝炎病毒染料法荧光定量 PCR 试剂盒