

天
净
沙
系
列

CAT#:16-68400
低温运输, -20℃保存

BINGENE

登革热病毒荧光及可视化 RT-LAMP 试剂盒

Dengue Virus 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	登革病毒（Dengue Virus）属于黄病毒科黄病毒属中的一个血清型亚群，主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊等媒介昆虫传播，引起登革热以及发病率和死亡率很高的登革出血热和登革休克综合征。因此登革病毒的快速准确鉴定有重要意义，为此本公司根据独有的双染料 RT-LAMP 技术，开发了简单快捷的登革病毒 RT-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，根据登革病毒 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 30 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 μL 的反应体系，最大样品加样量高达 13μL。 10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。 11. 本产品足够 50 次 20 μL 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 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)</td><td>211224a</td><td>200μL</td><td>0.5 mL 本色盖</td></tr><tr><td>逆转录酶-扩增酶混合液</td><td>211208b</td><td>100μL</td><td>0.5 mL 红盖管</td></tr><tr><td>20×登革病毒 RT-LAMP 引物混合液</td><td>yw16-64800</td><td>50μL</td><td>0.5 mL 白盖管</td></tr><tr><td>登革病毒 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）</td><td>Pc64800</td><td>250μL</td><td>0.5 mL 黄盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>16-64800sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				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	200μL	0.5 mL 本色盖	逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100μL	0.5 mL 红盖管	20×登革病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-64800	50μL	0.5 mL 白盖管	登革病毒 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	Pc64800	250μL	0.5 mL 黄盖管	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管	使用手册	16-64800sc	1 份	无
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	200μL	0.5 mL 本色盖																													
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100μL	0.5 mL 红盖管																													
20×登革病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-64800	50μL	0.5 mL 白盖管																													
登革病毒 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	Pc64800	250μL	0.5 mL 黄盖管																													
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管																													
使用手册	16-64800sc	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

- 1. 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。
- 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）加一定量的水充当，总体积必须核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC 用水替代。

二、RT-LAMP 反应（20μL 体系）

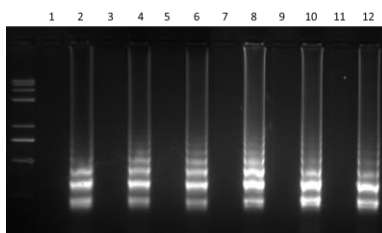
- 3. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RT-LAMP MasterMix（可视化染料-荧光染料，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。
- 4. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加 RT-LAMP 阴性对照和 RT-LAMP 阳性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

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

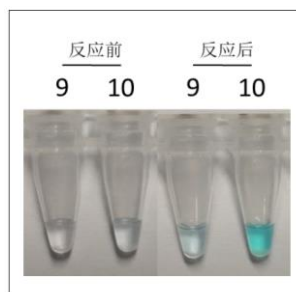
- 5. 本产品含两种染料，故最好使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

三、结果分析

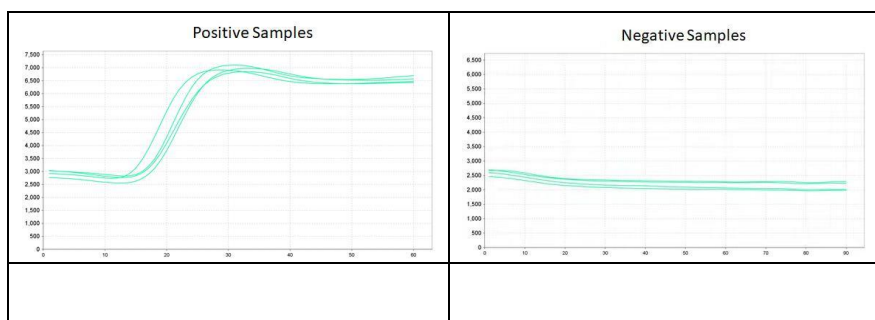
- 6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10μL RT-LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RT-LAMP 阳性对照必须有正常 RT-LAMP 条带（200bp 左右的梯形扩增产物），RT-LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RT-LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



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

登革病毒荧光定量 RT-PCR 试剂盒