

天
净
沙
系
列

CAT#:16-79500
低温运输, -20℃保存

BINGENE

猫杯状病毒可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒

Feline Calicivirus 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	猫杯状病毒(Feline Calicivirus, FCV)是一种 RNA 病毒，会引起猫杯状病毒感染，是一种猫病毒性呼吸道传染病，主要表现为上呼吸道症状，即精神沉郁、浆液性和粘液性鼻漏、结膜炎、口腔炎、气管炎、支气管炎，伴有双相热。猫杯状病毒感染是猫的多发病，发病率高，死亡率低，因此猫杯状病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。本公司开发了基于环介导等温扩增（LAMP）的产品，专门用于检测猫杯状病毒，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，根据猫杯状病毒 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 20μL 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×猫杯状病毒 RT-LAMP 引物混合液</td><td>yw16-79500</td><td>50μL</td><td>0.5 mL 白盖管</td></tr><tr><td>猫杯状病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>pc79500</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>16-79500sc</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×猫杯状病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-79500	50μL	0.5 mL 白盖管	猫杯状病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc79500	250μL	0.5 mL 黄盖管	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管	使用手册	16-79500sc	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×猫杯状病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-79500	50μL	0.5 mL 白盖管																										
猫杯状病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc79500	250μL	0.5 mL 黄盖管																										
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管																										
使用手册	16-79500sc	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）

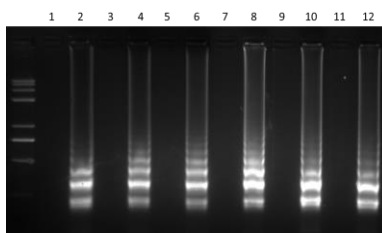
- 3. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RT-LAMP MasterMix（可视化染料-荧光染料，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。
- 4. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加 RT-LAMP 阴性对照和 RT-LAMP 阳性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

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×猫杯状病毒 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	-
猫杯状病毒 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	-	-	13 μL

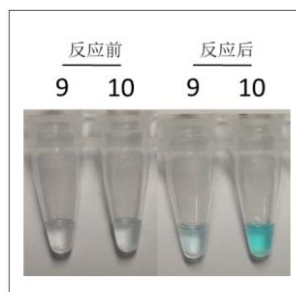
- 5. 本产品含两种染料，故最好使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

三、结果分析

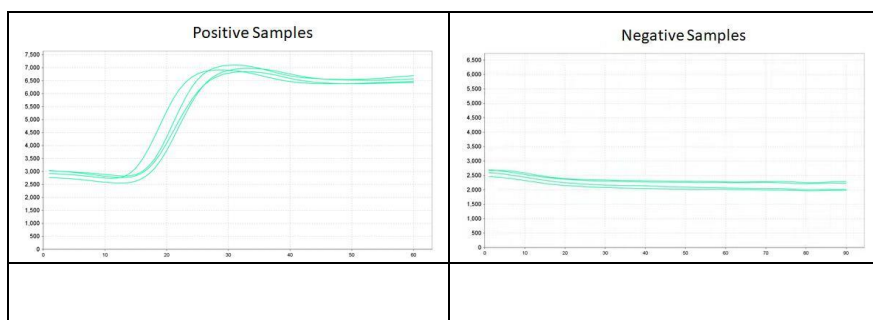
- 6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10μL RT-LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RT-LAMP 阳性对照必须有正常 RT-LAMP 条带（200bp 左右的梯形扩增产物），RT-LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RT-LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



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

猫杯状病毒荧光定量 RT-PCR 试剂盒