

天
净
沙
系
列

CAT#:16-85600
低温运输, -20℃保存

BINGENE

凝结芽孢杆菌荧光及可视化 LAMP 试剂盒
Bacillus coagulans C&F 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	凝结芽孢杆菌（<i>Bacillus coagulans</i>）分类学上属于芽孢杆菌属，细胞呈杆状，革兰氏阳性菌，端生芽孢，无鞭毛。它是一种益生菌、是活性菌，主要调节肠道的菌群，可以治疗因肠道菌群失调引起的急慢性腹泻，慢性便秘，腹胀和消化不良等。因此快速检测凝结芽孢杆菌具有重要意义。为此本公司开发了简单快捷的凝结芽孢杆菌双染料 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,根据凝结芽孢杆菌保守序列设计 4 条特异引物,不会跟其他细菌的 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 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		<table><tr><th>成 份</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>4×荧光及可见光 LAMP MagicMix</td><td>180601a</td><td>250μL（绿盖）</td></tr><tr><td>20×凝结芽孢杆菌 LAMP 引物混合液</td><td>yw16-85600</td><td>50μL（白盖）</td></tr><tr><td>凝结芽孢杆菌 LAMP 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）</td><td>pc85600</td><td>50μL（黄盖）</td></tr><tr><td>PCR 级石蜡油</td><td>130841</td><td>300μL（本色盖）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>100935</td><td>1mL（紫盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>16-85600sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成 份	编号	五孔盒包装	4×荧光及可见光 LAMP MagicMix	180601a	250μL（绿盖）	20×凝结芽孢杆菌 LAMP 引物混合液	yw16-85600	50μL（白盖）	凝结芽孢杆菌 LAMP 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）	pc85600	50μL（黄盖）	PCR 级石蜡油	130841	300μL（本色盖）	超纯水	100935	1mL（紫盖）	使用手册	16-85600sc	1 份
成 份	编号	五孔盒包装																					
4×荧光及可见光 LAMP MagicMix	180601a	250μL（绿盖）																					
20×凝结芽孢杆菌 LAMP 引物混合液	yw16-85600	50μL（白盖）																					
凝结芽孢杆菌 LAMP 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）	pc85600	50μL（黄盖）																					
PCR 级石蜡油	130841	300μL（本色盖）																					
超纯水	100935	1mL（紫盖）																					
使用手册	16-85600sc	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 10 μ L 本试剂盒提供的阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L) 的 1000 倍 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L) 稀释液加一定量的水作为核酸提取的样品，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。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

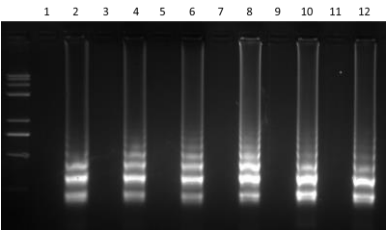
成分	N+2 个 样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照
4 $\times$ 荧光/可见光 LAMP MagicMix	各 5 μ L	5 μ L	5 μ L
20 $\times$ 凝结芽孢杆菌 LAMP 引物混合液	各 1 μ L	1 μ L	1 μ L
N+2 个样品 DNA	各 14 μ L	-	-
超纯水	-	14 μ L	-
第 2 步所得阳性对照 的 10 倍稀释液	-	-	14 μ L

4. 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 30-50 μ L 本试剂盒提供的石蜡油，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 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟进行扩增。
5. 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 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟进行扩增。
6. 如果使用荧光定量 PCR 仪，则设置 60 次循环，每次 65 $^{\circ}$ C 保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

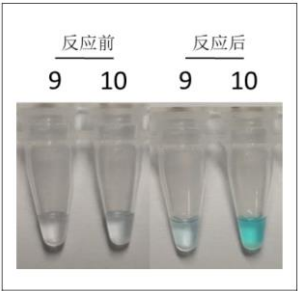
三、结果分析

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 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

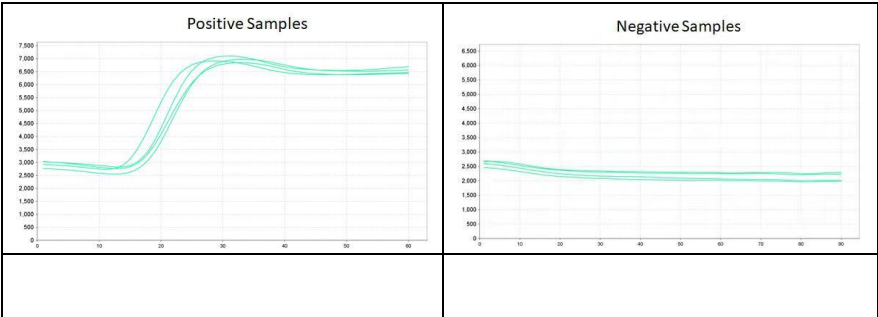
左右的梯形扩增产物), LAMP 阴性结果必须无条带, 否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常, 再分析待测样品。典型的电泳结果见下表, 奇数样为阴性结果, 偶数样为阳性结果:



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

凝结芽孢杆菌荧光及可视化 LAMP 试剂盒