

天
净
沙
系
列

CAT#:20-24730
低温运输, -20℃保存

BINGENE

三日疟原虫探针法 LAMP 试剂盒 (含内参)

Plasmodium malariae Probe LAMP Kit (with Internal Control)

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	三日疟原虫（ <i>Plasmodium malariae</i> ）是一种广泛分布于亚洲、非洲和南美洲的疟原虫，由卡米洛·高尔基发现于 1882 年，可引发三日疟，造成频繁的发烧，每次发作间隔时间为 72 小时。和主要的疟原虫（恶性疟原虫、间日疟原虫）相比死亡率较低，因此对三日疟原虫的快速准确鉴定有重要意义。本公司根据独自开发的探针法 LMAP 技术，开发了简单快捷的三日疟原虫探针法 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，反应设置更加简单。 3. 含荧光探针，可以对扩增进行实时荧光检测（需要荧光 PCR 仪）。 4. 检测灵敏性一般比 PCR 高 10 倍以上。 5. 特异性高，根据三日疟原虫保守序列设计的 4 条特异引物和 1 条探针，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 6. 一般 630 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. 提供内参，便于排除假阴性结果。 11. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。 12. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 LAMP 扩增。 13. 只可用于科研。																																
规格及成分	<table><tr><th colspan="4">本产品采用 5 孔盒包装</th></tr><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>4×LAMP MasterMix（探针法，待加酶）</td><td>220303a</td><td>200μL</td><td>0.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>Bst DNA 聚合酶 2.0</td><td>11-220319</td><td>50μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>20×三日疟原虫探针法 LAMP 引物-探针混合液</td><td>yp20-24730</td><td>50μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>三日疟原虫 LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）</td><td>pc20-24730</td><td>250μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>三日疟原虫 LAMP 内参对照（1×10E4 拷贝/μL）</td><td>Ic20-24730</td><td>250μL</td><td>0.5mL 紫盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>20-24730sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	本产品采用 5 孔盒包装				成份	编号	规格	五孔盒包装	4×LAMP MasterMix（探针法，待加酶）	220303a	200μL	0.5mL 绿盖管	Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50μL	0.5mL 红盖管	20×三日疟原虫探针法 LAMP 引物-探针混合液	yp20-24730	50μL	0.5mL 棕色管	三日疟原虫 LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	pc20-24730	250μL	0.5mL 黄盖管	三日疟原虫 LAMP 内参对照（1×10E4 拷贝/μL）	Ic20-24730	250μL	0.5mL 紫盖管	使用手册	20-24730sc	1 份	无
本产品采用 5 孔盒包装																																	
成份	编号	规格	五孔盒包装																														
4×LAMP MasterMix（探针法，待加酶）	220303a	200μL	0.5mL 绿盖管																														
Bst DNA 聚合酶 2.0	11-220319	50μL	0.5mL 红盖管																														
20×三日疟原虫探针法 LAMP 引物-探针混合液	yp20-24730	50μL	0.5mL 棕色管																														
三日疟原虫 LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	pc20-24730	250μL	0.5mL 黄盖管																														
三日疟原虫 LAMP 内参对照（1×10E4 拷贝/μL）	Ic20-24730	250μL	0.5mL 紫盖管																														
使用手册	20-24730sc	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 10 μ L 本试剂盒提供的样品阳性对照（1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L）和 10 μ L 内参阳性对照（1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L）加一定量的水作为核酸提取阳性对照样品，加水后的总体积必须跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致。NC 用 10 μ L 本试剂盒提供的 10 μ L 内参阳性对照（1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L）加一定量的水充当，加水后的总体积必须跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致。。

二、探针法 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，增加的两个反应分别是 LAMP 扩增阳性对照和 LAMP 扩增阴性对照。首次使用本试剂盒时，需要将 Bst DNA 聚合酶 2.0 全部加入到 4 $\times$ LAMP MasterMix（探针法）中，轻柔颠倒混匀 1 分钟后再使用。未用完的部分需要放-20 $^{\circ}$ C 保存。在 N+4 个 PCR 管中分别加入下列成分：

成分	N+2 个 样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照
4 $\times$ LAMP MasterMix (探针法，加酶后)	各 5 μ L	5 μ L	5 μ L
20 $\times$ 三日疟原虫 LAMP 引物-探针混合液	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	-
三日疟原虫 LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)			3.5 μ L
三日疟原虫 LAMP 内参对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	-	-	3.5 μ L

4. 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 FAM 通道和 HEX 通道的荧光信号。

三、结果分析

5. 实验有效性的判断：样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的 FAM 信号（对应样本）和 HEX 信号（对应内参）必须有标准的 S 扩增曲线，样品制备阴性对照的 HEX 信号（对应内参）必须有标准的 S 扩增曲线，LAMP 阴性对照的 FAM 信号和 HEX 信号必须呈现一条平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如

	果上述阳性对照和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。 6. 待测样品的结果判断：在实验有效的情况下，才有必要分析代测样品管的荧光信号。如果其 FAM 荧光信号曲线为 S 型（无论 HEX 信号如何），则说明样品为阳性。如果 FAM 荧光信号为平线则说明待测样品为阴性。如果 HEX 荧光信号为 S 曲线，说明代测样品（FAM 曲线）为真阴性。如果 HEX 荧光信号也是平线，说明此样品可能是假阴性，此样品需要重复测试。
关联产品	三日疟原虫荧光定量 PCR 试剂盒

20220526dx