天净沙系列

CAT#:18-15000

低温运输，-20℃保存

天净沙

犬细小病毒荧光染料法 LAMP 试剂盒

Canine Parvovirus SYBR LAMP Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

犬细小病毒（Canine Parvovirus，CPV）是一种具有高度传染性的单链 DNA 病毒，基因组长度约为 5000 个碱基，外形为直径约 20-26 nm 的无囊膜正二十面体，俗称“翻肠子”。该病毒属于细小病毒科细小病毒属，主要感染犬类，尤其是幼犬。成年犬被感染后的死亡率高达 10%，而幼犬的死亡率更是高达 91%。该病毒不仅传染性强，而且死亡率高，对犬类健康构成严重威胁。因此快速检测犬细小病毒具有重要的意义。为此，本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了犬细小病毒的检测试剂盒，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，可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。
3. 检测灵敏性一般比 PCR 高 10 倍以上。
4. 特异性高，根据犬细小病毒 DNA 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。
5. 一般 30 分钟内出结果，比 PCR 快。
6. 上样量大，对 20 μL 的反应体系，最大样品加样量高达到 14 μL。
7. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
8. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。
9. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。
10. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的荧光 LAMP 扩增。
11. 只可用于科研。

规格及成分

本产品采购五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
4×LAMP MasterMix （荧光染料法，待加酶）	211222	200 μL	0.5 mL 绿盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 红盖管
20×犬细小病毒 LAMP 引物混合液干粉	yw16-15000	50 次	0.5 mL 白盖管
犬细小病毒 LAMP 阳性对照 （1E4 拷贝/μL）	pc15000	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	18-15000sc	1 份	无

注意：首次使用本试剂盒时，需要加入 55 μL 超纯水到引物干粉管中，涡旋震荡半分钟混匀，得到 20×引物混合液。短暂离心后即可使用。未用完的需要放-20℃保存。

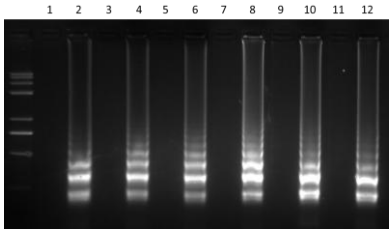
运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

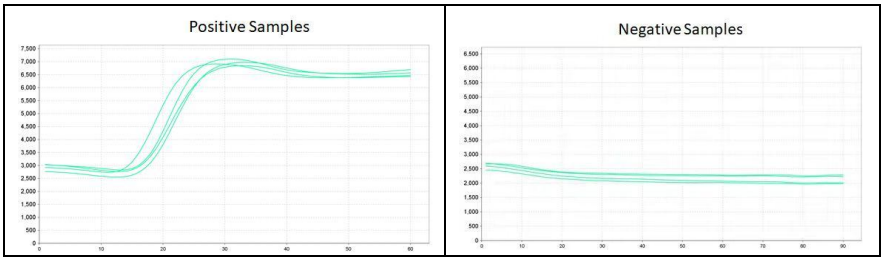
自备试剂	待测样品，荧光定量 PCR 仪。
使用方法	**一、样品 DNA 的制备** 1. 用自选方法纯化样品 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。 2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照（PC）和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 用 10 μL 本试剂盒提供的阳性对照（1E4 拷贝/μL）加一定量的水作为样品制备 PC，加水后的总体积跟所用核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一致。NC 用水替代。 **二、LAMP 反应（20 μL 体系）** 3. 反应设置：第一次使用时请把所有 Bst DNA 聚合酶 2.0（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×LAMP MasterMix（荧光染料法，待加酶）中，轻柔颠倒 20 次充分混匀，然后再取用。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×荧光 LAMP MasterMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
20×犬细小病毒 LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-
超纯水	-	14 μL	-
犬细小病毒 LAMP 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	-	-	14 μL

4. 放荧光定量 PCR 仪上扩增，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** 5. 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 μL 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(200 bp 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. 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	犬细小病毒探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）