天净沙系列

CAT#:16-37080

低温运输，-20℃保存

乙型肝炎病毒可视化-荧光染料 LAMP 试剂盒

Hepatitis B Virus Fluorescent and Colorimetric LAMP Kit

使用手册 V1.0

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

乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus,HBV）是引起乙型肝炎（简称乙肝）的病原体，属嗜肝 DNA 病毒科，该科病毒包含正嗜肝 DNA 病毒属和禽嗜肝 DNA 病毒属两个属，引起人体感染的是正嗜肝 DNA 病毒属。HBV 感染是全球性的公共卫生问题，因此 HBV 检测具有重要的意义。本公司开发了基于环介导等温扩增（LAMP）的产品，专门用于检测乙型肝炎病毒。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,根据乙型肝炎病毒保守序列设计 4 条特异引物,不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
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到 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

本产品使用五孔盒包装

成　份	编号	规格	包装
4×LAMP MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法,待加酶）	211223a	200 μL	0.5 mL 绿盖管
Bst DNA 聚合酶 2.0	220319	50 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
20×乙型肝炎病毒 LAMP 引物干粉	yw16-37080dcn	50 次	0.5 mL 白盖管
乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc37080-AB116094	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	16-37080sc	1 份	

注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 55 μL 的超纯水充分混匀和再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

PCR 级石蜡油、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 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（可视化染料-荧光染料双染料法，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：

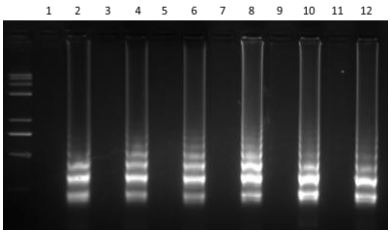
成分	N+2 个样品管	LAMP 阴性对照	LAMP 阳性对照
4×LAMP MasterMix（加酶后）	各 5 μL	5 μL	5 μL
20×乙型肝炎病毒 LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N+2 个样品 DNA	各 14 μL	-	-
超纯水	-	14 μL	-
乙型肝炎病毒 LAMP 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	-	-	14 μL

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 μL 的 PCR 级石蜡油，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℃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℃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℃保温 1 分钟,采集 SYBR 通道的荧光信号。

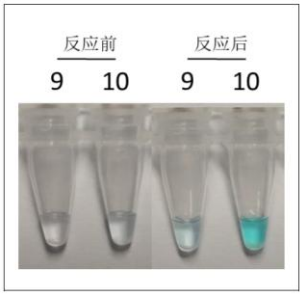
三、结果分析

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 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

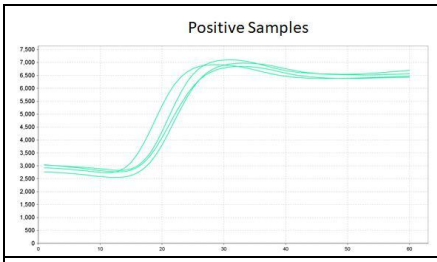
bp 左右的梯形扩增产物），LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：

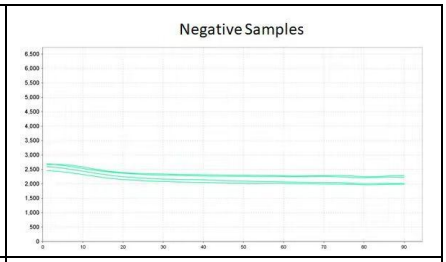


8. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的反应液将呈蓝色，样品制备阳性对照和 LAMP 阳性对照的反应液将呈淡蓝色或无色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见左图（9 为阴性，10 为阳性）。



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	乙型肝炎病毒探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）