天净沙系列

CAT#:16-227-16

低温运输，-20℃保存

天净沙

16 种鱼源性成分可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒

16 Species of Fish-Ingredient Colorimetric and Fluorescent LAMP Kit

使用手册 V0.52

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

本公司开发了简单快捷的可用于检测食品或其他材料中是否有大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、 北太平洋无须鳕、狭鳕、细鳞壮鳕、革平鲀、六线鱼、大黄鱼、舌鳎、牙鲆、大菱鲆、细鳞大麻哈鱼、大西洋鲑鱼、史氏鲟、小体鲟、欧鳇共 16 种鱼成分的双染料 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. 检测灵敏度一般比 PCR 高 10 倍以上。
5. 特异性高，根据 16 种鱼源性成分 DNA 保守序列各设计 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. 本产品只可用于科研。

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 Master Mix（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
20×16 种鱼源性成分 LAMP 引物冻干粉	yw16-227-16	50 次	0.5 mL 白盖管
16 种鱼源性成分 LAMP 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc227-16	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	16-227-16sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为两年。

自备物品

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(PPC，用确定为阳性的样本为起始材料）和一个样品制备阴性对照（PNC，用确定为阴性的样本为起始材料）。

二、LAMP反应（20 μL体系）

3. 首次使用本试剂盒时，先短暂离心装引物-探针冻干粉的离心管，然后加入55 μL超纯水充分混匀，得到20×16种鱼源性成分LAMP引物混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

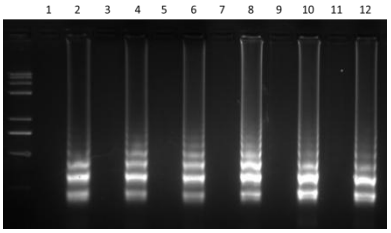
4. 反应设置：第一次使用本试剂盒时，请把所有Bst DNA聚合酶2.0（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×LAMP MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）中，轻柔颠倒20次充分混匀，然后再取用。如果有N + 2个DNA纯化样品，则最好设置N + 4个LAMP扩增。多出的两个分别用于LAMP扩增阳性对照和LAMP扩增阴性对照。在N + 4个PCR管中加入下列成分：

成分	N+2个样品管	LAMP阴性对照	LAMP阳性对照
4×荧光/可见光LAMP Master Mix（加酶后）	各5 μL	5 μL	5 μL
20×16种鱼源性成分LAMP引物混合液	各1 μL	1 μL	1 μL
N + 2个样品DNA	各14 μL	不加	不加
超纯水	不加	14 μL	不加
第2步所得阳性对照的10倍稀释液	不加	不加	14 μL

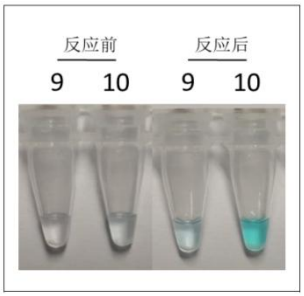
5. 放荧光定量PCR仪中进行扩增。循环参数是60次循环，每个循环为65℃保温1分钟，采集SYBR通道的荧光信号。不推荐使用金属浴或水浴，因为其温度波动大，导致假阳性率很高。

三、结果分析

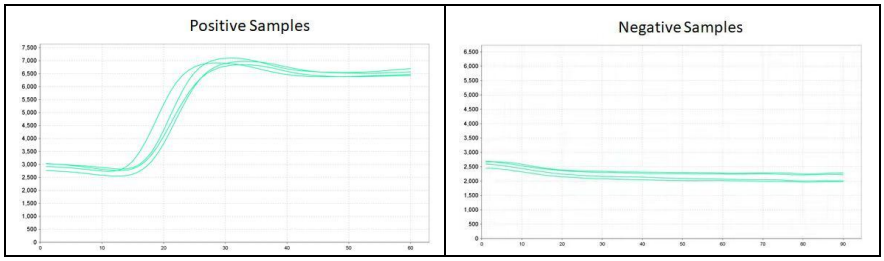
6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取10 μL LAMP扩增产物跟自备上样液混合后进行2%琼脂糖凝胶电泳。LAMP阳性对照必须有正常LAMP条带(200 bp左右的梯形扩增产物），LAMP阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果LAMP阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下图，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可见光（肉眼）分析：PPC 和 LAMP 阳性对照的反应液必须呈蓝色，PNC 和 LAMP 阴性对照的反应液必须呈淡蓝色或无色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性对照结果呈阳性，阴性对照结果呈阴性，则实验有效，可以继续分析待测样品的情况。若待测样品管的颜色接近 LAMP 阳性对照管，则说明样品为阳性；若接近 LAMP 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 阴性、10 阳性）。



8. 荧光分析（仅限于用 qPCR 仪进行反应的场景）：PPC 和 LAMP 阳性对照的反应液将有标准的 S 扩增曲线，PNC 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。如果阳性对照结果呈阳性，阴性对照结果呈阴性，则实验有效，可以继续分析样品的情况。若待测样品的荧光曲线为 S 型，则该样品为阳性，如果为平线，则该待测样品为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。



四、其他 15 种鱼源性成分检测

他 15 种鱼的源性成分检测方法同 1-8 步，只是阳性对照与引物探针不同。

关联产品	16 种鱼源性成分探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）