天净沙系列

CAT#:12-64800

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 登革热病毒可视化染料 RNA 恒温扩增试剂盒

Dengue Virus Colorimetric RNA Isothermol Amplification 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

本公司基于可视化 RT-LMAP 技术，开发了简单快捷的登革热病毒可视化 RNA 恒温扩增检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供 RNA 样品。
2. 恒温扩增，可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 检测灵敏度一般比 RT-PCR 高 10 倍以上。
4. 特异性高，根据登革热病毒保守序列设计 6 条特异引物，不会跟其他生物的 RNA 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 体系的可视化 RNA 恒温扩增扩增。
11. 本产品只可用于科研。

## 规格及成分

本产品采购五孔盒包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 4×RNA 恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，待加酶） | 211221a | 200 μL | 0.5 mL 绿盖管 |
| 逆转录酶-扩增酶混合液 | 211208b | 50 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 20×登革热病毒 RNA 恒温扩增引物干粉 | yw12-64800 | 50 次 | 0.5 mL 白盖管 |
| 登革热病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL） | pc12-64800 | 250 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL 蓝盖管 |
| 使用手册 | 12-64800sc | 1 份 | 无 |

注：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 超纯水充分混匀后得到 RNA 恒温扩增引物混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

## 运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

## 自备物品

待测样品 RNA。

## 使用方法

**一、样品 RNA 的制备**

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 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、RNA 恒温扩增反应（20 μL 体系）**

3. 反应设置：第一次使用时请把所有逆转录酶-扩增酶混合液（50 μL，本试剂盒提供）加入到 4×RNA 恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，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 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RNA 恒温扩增扩增,增加 RNA 恒温扩增扩增阳性对照和 RNA 恒温扩增扩增阴性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

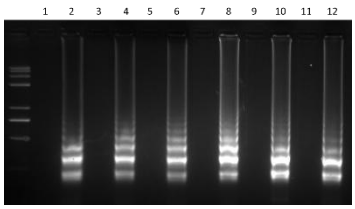
| 成分 | N+2 个样品管 | RNA 恒温扩增阴性对照 | RNA 恒温扩增阳性对照 |
|---|---|---|---|
| 4×RNA 恒温扩增 MasterMix（可视化染料法，加酶后） | 各 5 μL | 5 μL | 5 μL |
| 20×登革热病毒 RNA 恒温扩增引物混合液 | 各 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| N+2 个样品 RNA | 各 14 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 14 μL | 不加 |
| 登革热病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL） | 不加 | 不加 | 14 μL |

4. 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。如果使用金属浴或水浴保温，没有热盖，则每个反应管中加入 50 μL 自备的 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。

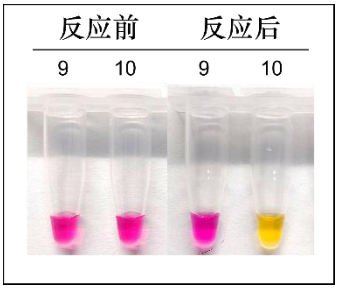
5. 使用常规 PCR 仪进行 RNA 恒温扩增反应，设置程序时必须打开热盖，设置成 65℃保温 60 分钟进行扩增。

**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 RNA 恒温扩增扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RNA 恒温扩增阳性对照必须有正常 RNA 恒温扩增条带（200 bp 左右的梯形扩增产物），RNA 恒温扩增阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RNA 恒温扩增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：




7. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 RNA 恒温扩增阳性对照的反应液将呈黄色，样品制备阴性对照和 RNA 恒温扩增阴性对照的反应液将呈红色，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）。




| | |
|---|---|
| **关联产品** | 登革热病毒可视化染料-荧光染料 RNA 恒温扩增试剂盒 |

20260730qjy