

猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D7586S	猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒	25次
D7586M	猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒, 即Feline Panleukopenia Virus (FPV) Colorimetric LAMP Assay Kit, 也称猫细小病毒(猫泛白细胞减少症、猫瘟)等温扩增变色检测试剂盒、Feline Parvovirus (FPV) Colorimetric LAMP Assay Kit, 是一种通过环介导等温扩增(Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)法扩增猫细小病毒DNA, 并通过反应体系的颜色变化检测猫是否感染细小病毒的试剂盒。本试剂盒采用了dU掺入和UDG酶防止等温扩增产物污染技术, 可快速、有效、高灵敏度地检测猫细小病毒, 并且采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。
- 猫细小病毒(Feline panleukopenia virus or parvovirus, FPV), 又称猫瘟热病毒、猫泛白细胞减少症病毒、猫传染性肠炎病毒, 是一种单链DNA病毒, 属于细小病毒科细小病毒属。在电子显微镜下, FPV呈圆形或六角形, 无囊结构[1]。基因组长度约为5200nt, 包含两个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 分别编码结构蛋白(VP1和VP2)和非结构蛋白(NS1和NS2)。受FPV感染的动物白细胞急剧下降, 同时伴有严重的发热、呕吐、腹泻等症状。病毒主要侵害幼猫, 几乎所有猫科动物易感, 死亡率较高, 可通过患病动物的粪便、尿液和呕吐物迅速传播, 在可妊娠期间垂直传播, 导致胎儿小脑发育不全。因此, 早期和快速诊断FPV是非常必要的, 以便分离受感染的猫并实施针对性治疗, 降低发病率和死亡率。
- FPV感染的主要症状为发热、呕吐、腹泻, 在临床上极易与其它胃肠道疾病混淆, 因此仅依靠临床表现来诊断是否感染FPV较为困难。到目前为止, 临床诊断FPV感染的方法有电子显微镜(Electron microscope, EM)、病毒分离(Virus isolation, VI)、乳胶凝集(Latex agglutination test, LAT)、血球凝集(Hemagglutination, HA)、ELISA和PCR分析等[2]。虽然电子显微镜和病毒分离较为特异和敏感, 但这些技术在临床使用过程中昂贵且耗时。乳胶凝集法虽然检测速度快, 但缺乏特异性。对于血球凝集或血清凝集抑制实验, 由于FPV血凝活性弱且该方法对操作条件要求较高, 相关实验条件较为苛刻, 在临床检测中也易出现假阴性结果。此外, 虽然ELISA和PCR因其高灵敏度和特异性被广泛使用, 但仍需配备相关的仪器设备, 相关检测人员也需具有相应的技术能力, 导致该方法的适用性受到一定的限制。
- 等温扩增技术(Isothermal amplification technology)是核酸体外扩增技术, 其反应过程始终维持在一定的恒定温度下, 通过添加不同活性的酶和各自特异性引物进行核酸的快速扩增[3]。本试剂盒采用的是环介导核酸等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 其特点是针对靶基因的6个区域设计4-6条特异引物, 使用链置换DNA聚合酶(Bst DNA Polymerase)启动DNA的合成, 形成哑铃状互补链, 并进一步通过连续链置换进入循环扩增阶段, 扩增的最后产物是具有不同个茎环结构、多环花椰菜样结构的DNA的混合物。LAMP仅需在等温条件下(如60-65°C)保温30-60分钟, 即可完成核酸扩增反应。与常规PCR相比, LAMP不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程, 具有简单、快速、灵敏性高、特异性强等特点[4]。本试剂盒以猫细小病毒VP2基因最保守的区域作为LAMP靶点, 设计特异性并对于猫细小病毒的大部分突变体有兼容性的引物。
- **本试剂盒灵敏度高, 反应时间短。**本试剂盒的灵敏度比传统的PCR方法高2-5倍, 通过阳性质粒计算检测下限约为20-500 copies/ μ l, 且仅需45分钟就能完成检测反应。
- **本试剂盒特异性强。**本试剂盒根据猫细小病毒保守序列设计6条特异引物, 不会与其它生物的DNA发生交叉反应。
- **本试剂盒采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。**本试剂盒优化了指示剂染料, 猫细小病毒DNA片段被快速大量扩增后, 反应管内液体的颜色由紫罗兰或蓝紫色变成天蓝色或深天蓝色即为猫细小病毒阳性。



图1. 碧云天猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒(D7586)的检测效果图。不含猫细小病毒基因质粒, 和含10fg、100fg、1pg、10pg和100pg的猫细小病毒基因质粒的样品使用本试剂盒进行检测, 反应条件为61°C 45分钟, 低至10fg阳性质粒就可以观察到非常显著的颜色变化, 而不含该阳性质粒的样品颜色无变化。本图仅供参考, 不同批次的产品, 阴性和阳性的颜色可能会与本图略

有差异，实际检测时阳性和阴性相比有明显的颜色变化即可。

- **本试剂盒采用防污染技术，有效避免污染。**本试剂盒使用了dU和热敏型UDG酶，可以使扩增产物中掺入dU并且在等温扩增前37°C孵育5-15分钟可有效消除等温扩增过程中带来的产物污染问题。在进行等温扩增时，热敏型UDG酶会被失活，从而不会干扰后续的等温扩增检测。
- 本试剂盒提供了阳性对照Positive Control，可用于确定试剂盒是否能正常工作。建议每次检测都设置阳性对照。
- 本产品如果用于常规的20μl反应体系，小包装可以进行25次检测，中包装可进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7586S-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	250μl
D7586S-2	LAMP Primer Mix (10X)	50μl
D7586S-3	Bst DNA Polymerase	25μl
D7586S-4	Positive Control	50μl
D7586S-5	Nuclease-free Water	250μl
D7586S-6	Mineral Oil	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7586M-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	1ml
D7586M-2	LAMP Primer Mix (10X)	200μl
D7586M-3	Bst DNA Polymerase	100μl
D7586M-4	Positive Control	200μl
D7586M-5	Nuclease-free Water	1ml
D7586M-6	Mineral Oil	2ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中LAMP Master Mix with UDG (2X)需避光保存。尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 使用前需确保试剂完全融化，上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- 等温扩增是超高灵敏度的检测，请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。等温扩增反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。尽管本试剂盒采用UDG酶防污染技术，但仍请仍勿打开PCR管盖，等温扩增产物宜密封后按扩增后产物要求处理，以避免超高浓度的扩增产物由于气溶胶等因素污染实验环境。
- 本产品含颜色指示剂，未进行反应前，如果加入样品后颜色和阴性、阳性颜色有明显差异，则需要稀释样品或者使用DNA提取试剂盒处理样品，或者需要适当调整样品的pH至接近中性。
- 本等温扩增体系需要高浓度的二价离子，样品中不能含有高浓度的EDTA等金属离子螯合剂。
- 建议使用带滤芯的吸头配制等温扩增体系，可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 移液器使用前建议使用DNA清除试剂处理，以避免可能的假阳性。推荐使用RNase, DNase, RNA and DNA Away (R0127)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂：

- 水浴锅或者普通PCR仪。
- DNase-free 的带滤芯吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)，0.2ml PCR管(FTUB322/FTUB323)或qPCR八联排管(FTUB325/FTUB326/FTUB328/FTUB329)。

2. 样本准备：

本试剂盒可用于检测感染猫细小病毒的血液、口鼻拭子、肛拭子等样品，用病毒DNA提取试剂盒提取后再进行LAMP检测，推荐使用BeyoMag™磁珠法病毒RNA/DNA抽提试剂盒(R0083)。如果急需检测，也可以取0.5-2μl液体样品，未经DNA提取直接作为模板尝试用于LAMP检测，但直接检测的灵敏度会有所下降。

3. LAMP反应体系的设置：

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置LAMP反应体系(以每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品、阴性对照(Negative

Control)或阳性对照(Positive Control)。Negative Control可使用Nuclease-free Water, Positive Control可使用Positive Control或确定感染猫细小病毒的样品。建议每次检测都设置Negative Control和Positive Control。

注1: 通常推荐把样品前处理的房间、LAMP反应体系配制的房间、处理扩增产物的房间按顺序分成3个房间, 以避免出现假阳性。高浓度阳性对照处理时须特别小心, 仅稀释好的阳性对照可以进入LAMP反应体系配制的房间。

Reagent	Volume
LAMP Master Mix with UDG (2X)	10µl
LAMP Primer Mix (10X)	2µl
Nuclease-free Water	5µl
Template	2µl
Bst DNA Polymerase	1µl
Total Volume	20µl

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。
d. 如果使用含热盖的PCR仪, 可直接开始反应; 如果使用水浴锅反应, 每管需要添加20µl Mineral Oil以防止水份蒸发至管盖, 影响反应效果。

4. 反应条件:

- a. 37°C水浴或PCR仪反应5-10分钟, 通常就可以有效去除反应体系内容可能的本试剂盒等温扩增产物造成的环境污染。**说明:** 初次进行检测时无需进行本步骤; 确定从未打开等温扩增反应体系管盖的情况下, 也无需进行本步骤; 仅当本试剂盒的扩增产物可能污染检测环境的时候, 需要执行本步骤。
b. 后续如果使用水浴锅反应, 应提前使温度上升至61°C, 然后放入带浮漂的反应管, 水浴45分钟。水浴锅的温度波动需要尽量控制在1°C以内。
c. 后续如果使用PCR仪反应, 按照 ‘61°C, 45分钟; 4°C, forever; 热盖温度, 105°C’ 设定程序。

注: 经过实际测试, 温度为61-63°C均可, 但61°C效果更好。

5. 结果判断:

取出反应管, 室温放置, 以白色为背景, 观察颜色变化。如果显示紫罗兰或蓝紫色, 为阴性; 如果显示天蓝色或深天蓝色, 则为阳性。具体显色效果可参考图1。

注1: 如果样品中模板量比较多, 在35-45分钟时即可出现颜色变化; 如果样品中模板量比较少, 需将反应适当延长至总计50-55分钟。如果延长时间后, 仍然没有变色, 即为阴性。延长时间过久, 阴性也可能会变色, 出现假阳性。

注2: 反应后, 切勿开盖。等温扩增的产物非常多, 气溶胶等因素很容易污染实验环境。判断结果后, 用密封后按实验室废弃物处置要求进行处理。如果确需开盖进行后续的分析检测, 建议在相对隔离的其它实验室内操作。

参考文献:

1. Wang Y, Pan Y, Wu J, Tong X, Sun J, et al. 3 Biotech. 2021. 11(9):400.
2. Wang ZH, Wang XJ, Hou SH. J Virol Methods. 2019. 271:113679.
3. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Chem Rev. 2015. 115(22):12491-545.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Nucleic Acids Res. 2000. 28(12):E63.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7580S	猫细小病毒(FPV)染料法qPCR检测试剂盒	50次
D7580M	猫细小病毒(FPV)染料法qPCR检测试剂盒	200次
D7583S	猫细小病毒(FPV)探针法qPCR检测试剂盒	50次
D7583M	猫细小病毒(FPV)探针法qPCR检测试剂盒	200次
D7586S	猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒	25次
D7586M	猫细小病毒(FPV)等温扩增变色检测试剂盒	100次
D7589S	猫细小病毒(FPV)等温扩增荧光检测试剂盒	25次
D7589M	猫细小病毒(FPV)等温扩增荧光检测试剂盒	100次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20片/包装
FSF035-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	100片/包装
FSF039-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/包装
FSF039-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	100片/包装
FTUB325-125pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒
FTUB325-1250pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
FTUB326-300pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明, 6条/袋)	6条/袋, 50袋/箱

FTUB326-1500pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明, 6条/袋)	6条/袋, 250袋/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
FTUB335-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒
FTUB339-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱

Version 2023.12.20