

**描述：**鼠疫（plague）是由鼠疫耶尔森菌（Yersinia pestis）感染引起的烈性传染病，属国际检疫传染病和我国法定甲类传染病。

LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）是一种新型核酸扩增技术。Haigene 依托强大的工具酶开发背景，首次开发出具有强链置换能力、高效 DNA 合成能力、具有外切活性的 Bst 5.0 DNA 聚合酶，无论以 DNA 为模板还是以 RNA 为模板，均可实现 60~65℃ 恒温条件下类似 TaqMan PCR 方法的扩增（LAMP Taqman 技术）。整个检测时间通常在 15~30min 内即可完成检测。

本试剂盒根据鼠疫耶尔森菌的特异性序列基因设计引物，采用 LAMP TaqMan 技术，以提取的 DNA 为模板进行定性检测（**血清、血浆、全血等样品无法直接用于本试剂盒检测**），该试剂盒的灵敏度为 2~10 copy。

#### 组分

名称	50 次
LAMP TaqMan Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml
Plague LAMP TaqMan Assay	1 支
Plague 阳性标准品（ $10^5$ Copy/ $\mu$ l）	1 支

#### 使用方法：

1. LAMP TaqMan Reagent 为干粉形式，包含 Bst 5.0 DNA 聚合酶、dNTP 等，在未溶解前，该制品可 -20℃ 长期保存，并可室温运输，性能无下降。使用前每瓶用 0.75 ml 的 LAMP Buffer 溶解后，可立即使用，剩余试剂可在 -20℃ 保存 1 个月，在 -60℃ 以下长期保存。

2. Plague LAMP TaqMan Assay 为干粉形式，该制品可 -20℃ 长期保存，并可室温运输，性能无下降。使用前每瓶用 125  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解后，可立即使用，剩余试剂可在 -20℃ 保存 1 个月，在 -60℃ 以下长期保存。

3. 阳性标准品为干粉形式，首次使用前加入 100  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O，漩涡 10s 溶解后，保存于 -20℃。溶解后的制品浓度为  $10^5$  copy/ $\mu$ l，每次实验时采用 2.5  $\mu$ l 即可。

#### 4. 仪器和程序设置

LAMP 的检测可以使用标准定量 PCR 仪（也可使用恒温荧光设备），荧光通道选择 FAM。

使用定量 PCR 仪进行 LAMP 荧光扩增程序如下：

步骤 1：60℃ 10s

步骤 2：60℃ 50s 收集信号，循环 30 次

总反应时间为 30min。

#### 5. 配置反应体系

溶解后的 LAMP TaqMan Reagent 15  $\mu$ l

溶解后的 Plague LAMP TaqMan Assay 2.5  $\mu$ l

检测模板 DNA 2.5  $\mu$ l

反应体系配好后，充分混匀并短暂离心，置于荧光定量 PCR 仪上进行反应即可。

**注意：**LAMP 反应高度敏感，反应结束后，务必不要打开管盖，以防止气溶胶污染。一旦发生气溶胶污染，请使用 HaiGene 的 DNA 气溶胶污染去除剂（A6001）进行环境清理。

#### 6. 结果判读

##### 6.1 结果判读成立条件

阴性水对照不起峰、阳性标准品在 10~14 min 起峰条件下结果判读有效。

##### 6.2 阳性结果判读

有扩增曲线，判定为阳性。

##### 6.3 阴性结果判读

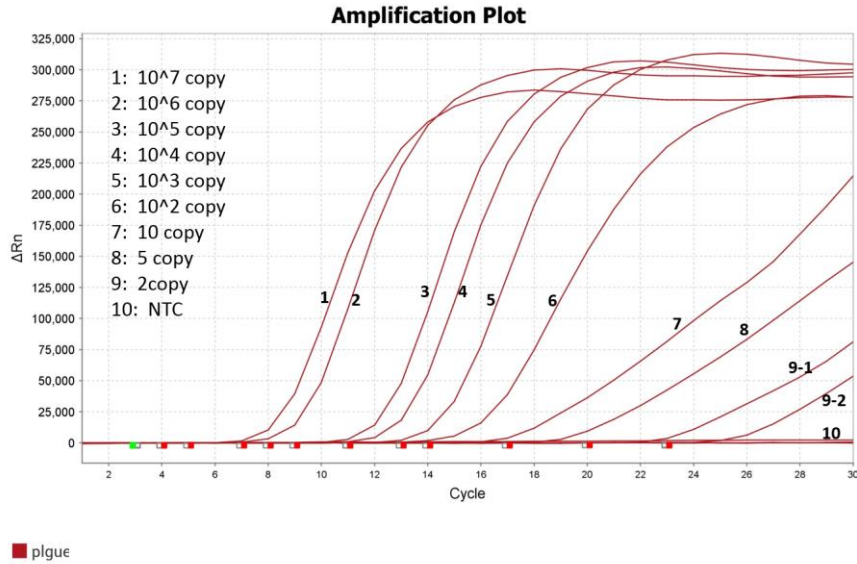
平线表明为阴性样本。

**\*特殊说明：**本试剂盒测试时所用模板为标准质粒，未对鼠疫杆菌样本进行检测。

## 性能测试

### 1. 灵敏度检测

1-10: 模板浓度为  $10^7$  copy~2 copy, 均可检测出, 且 NTC 平线。该试剂盒灵敏度为 2~10 copy。



### 2. 抗干扰检测

1-3: 单管反应中 100 copy 标准质粒, 并加入 0、50ng、100ng 人基因组作为干扰, 结果表明添加基因组后对灵敏度无影响。4-5: 单管反应中 100 copy 标准质粒, 并加入 1ul 人血清、1ul 人血浆, 扩增结果无信号 (可能抗凝剂或血清血浆中的无关蛋白抑制反应。血清、血浆、全血等样品无法直接用于本试剂盒检测)。6: 单管反应中无标准质粒, 加入 50ng 人基因组, 扩增结果无信号, 表明鼠疫杆菌特异性引物与人源基因序列无交叉, 引物特异性良好。7: NTC, 曲线平滑无扩增, 表明引物特异性良好。

