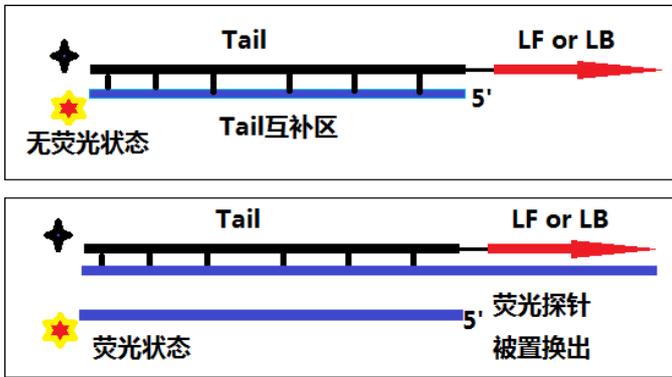


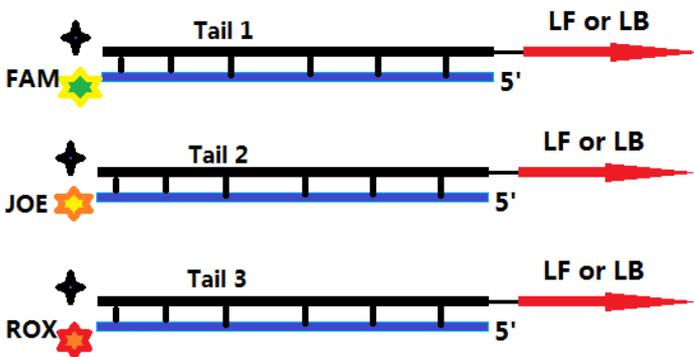
描述: 该 DP-Probe(DisPlaceable Probe)为链置换荧光探针, 专用于 LAMP 的荧光扩增。Loop DP-Probe 在搭配 HotStart Bst4.2 Basic 试剂时表现出极为出色的特异性, 可以大幅降低非特异性扩增。Loop DP-Probe Pair 是将 Loop 引物进行改造 (LF/B 任意一条均可), 其由两条标记引物退火组成: 荧光猝灭引物 (5'IBFQ+Tail+Loop) 和 荧光报告引物 (Tail 互补区+3'发光基团), 其不发荧光。在 LAMP 反应中 Loop 引物渗入到“哑铃”结构, 由扩增返回“哑铃”延伸并置换出游离的荧光报告引物, 累积产生荧光信号。详细的原理可参考文献 PMID: 33626039。有经验的研究人员可根据参考文献自行制备 LAMP Loop DP-Probe Pair, 经验不足的人员可委托 HaiGene 来制备, HaiGene 提供三种荧光标记的探针。需要客户提供 Loop 序列, 并指明需要的荧光标记 (FAM/JOE/ROX)。



组分:

名称	800T
25xLAMP Loop DP-Probe Pair	800 μ l

储存: -20 $^{\circ}$ C 保存 12 个月, 分装保存, 避免反复冻融。



eLAMP DP-Probe 试剂的开发简述

1. 引物的粗筛选

无论是变色、试纸条、荧光法 eLAMP 试剂的开发, 前期的测试过程, HaiGene 推荐采用价格较低的液体 HotStart Bst4.2 SYBR Green 试剂 (货号: A3831-02) 进行粗筛选。通常筛选的引物为 3-5 组。

10xeLAMP Mix: FIP/BIP=8 μ M each; LF/LB=4 μ M each.

测试样品: 10e3、100、25、10Copies/管, NTC(16-32 重复)

2.5xBst4.2 SYBR Green Mix 10 μ l

10x ePrimer Mix 2.5 μ l

HotStart Bst 4.2 (8U/ μ l) 1 μ l

模板 DNA/RNA X μ l

ddH₂O 到总体积 25 μ l

置于 70 $^{\circ}$ C 反应 45min, 1min 收集一次荧光信号。良好的引物组具有以下特性 (Ct): 10e3copies =5-10min; 25copies <15min; 10Copies<20min, NTC 均>40min. 以上实验需要反复确认, 以确保核心引物的工作效率, 否则重新筛选, 再进行后续的其他测试。

2. Loop DP-Probe Pair 的制备

根据上述引物组的筛选情况, 选取最佳引物组。在此基础上改造 LF 或 LB, 改造哪一条效果更佳, 必须经过测试。下面以改造 LF 为例进行说明。HaiGene 通常提供 25x 的 LF DP-Probe Pair (或自行制备)。注意: (1) 测试试剂更改为 HotStart Bst4.2 Basic 试剂 (货号: A3831-01)。(2) 10xeLAMP Mix 引物浓度有调整。

10xeLAMP Mix: FIP/BIP=8 μ M each; LB=4 μ M; LF=3 μ M.

2.5xBst4.2 Basic Mix 10 μ l

10x ePrimer Mix 2.5 μ l

25x LF DP-Probe Pair 1 μ l

HotStart Bst 4.2 (8U/ μ l) 1 μ l

模板 DNA/RNA X μ l

ddH₂O 到总体积 25 μ l

置于 70 $^{\circ}$ C 反应 45min, 1min 收集一次荧光信号 (注意根据探针荧光标记, 选取正确的荧光通道)。与 SYBR Green 结果相比来看, 时间会滞后 1-3min. NTC 的控制会明显提升。此时可进一步做后续的其他项目测试。

3. 如有试剂冻干制备的需求可采用如下几种方案:

- (1) A3831-01(液体试剂)+PrimerMix 自行冻干 (专业人员使用)。
- (2) PrimerMix+A3831-20(引物冻干剂)自行冻干, 加入 A3831-03(冻干球)。
- (3) A3831-00 (HotStart Bst4.2), 全程自行冻干 (专业人员使用)。
- (4) 委托 HaiGene 进行全体系冻干。