

描述: 该制品为单一组分的 MasterMix (2.5 倍浓度), 包含了标准反应缓冲液、Mg²⁺、dNTP、Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶等, 使用时只需要加入引物、模板即可进行核酸恒温扩增。Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶具有依赖于 RNA 模板的聚合酶活性 (逆转录), 还具有依赖于 DNA 的聚合酶活性, 因此无论 DNA 或 RNA 样本均可使用该制品进行高效的恒温扩增。该制品是进行 LAMP 及 RT-LAMP 扩增反应的绝佳试剂。优化的反应体系, 确保快速的完成检测试剂的反应体系建立。

本试剂专为 OG 橙绿可视化变色反应设计。但也可用于自行搭配其它荧光染料, 如 SYBR Green I, Eva Green, SYTO-9 等。注意本试剂不支持 HNB 显色法、浊度、pH 变色法。其它检测方式未予测试。此外, 本试剂中不含有甘油, 可用于建立冻干体系。

货号	名称	规格
A3824-02	2.5xBst4.0 Basic MasterMix	1 ml

储存: -20°C 保存 1 年; -80°C 保存 2 年; 短期使用放置于 2-8°C, 保存 1 个月。反复冻融 10 次, 不影响使用。如有白色沉淀, 于 37°C 水浴放置 10min 后溶解沉淀, 不影响使用。

使用方法: (进行 LAMP 橙绿变色扩增):

1. 关于 OG 橙绿变色管(货号: A3828-21)说明: 橙绿变色染料 (OG Dye) 以烘干的形式预加在八联管盖上。LAMP 反应完毕后, 将 0.2 ml EP 管颠倒溶解 OG 染料后。LAMP 的反应产物将与 OG 染料形成绿色肉眼可见变色反应 (阳性), 而未扩增的 EP 管为深橙色 (阴性)。本试剂管常温长期保存, 同时可搭配 Lyo Bst 4.0 Basic IsoAmp Bead 冻干球组装成稳定的检测试剂。

2. 配制变色 LAMP 反应体系

在 OG 染料管 (0.2ml EP) 反应管中加入下述试剂

2.5xBst4.0 Basic MasterMix	10 µl
10xLAMP Primer Mix	2.5 µl
模板 DNA/RNA	X µl
ddH ₂ O 到总体积	25 µl

10xLAMP Primer Mix 浓度: FIP/BIP 分别为 16 µM、LoopF/B 分别为 4~8 µM、F3/B3 分别为 2 µM。

注意: 全部试剂加入完毕后, 轻弹 EP 管底部后, 再盖上 OG 橙绿变色管 (盖上管盖后务必不能再剧烈混合与倒置, 以防止将管盖上的 OG 染料溶解, OG 染料一旦混入反应液中将会终止 LAMP 反应)。

3. 反应体系配好后, 置于 65°C 进行反应 15~30min。(扩增良好的引物组合, 通常 20min 即可变色, 一般不超过 30min)。

4. 观察结果: 反应结束后, 从加热装置中将反应管取出, 室温 2min, 使整个反应管冷却下来。再次用力将反应管盖压紧, 以防止液体泄露。将反应 EP 管倒置, 并手腕轻甩, 反应液浸泡 EP 管盖上的 OG 染料, 静置 1min (中间可轻弹 1-2 次, 以加速溶解 OG 染料)。再将 EP 反应管正置, 并轻甩反应液到 EP 管底部, 此时扩增样品将变为鲜艳肉眼可见绿色, 而阴性未发生扩增的管将为深橙色。

注意: (1) 观察结果时, 尽可能不要与配制反应空间共用, 以防止污染操作台。(2) 尽管 HaiGene 选取的为高密封性的 EP 管, 但也时有 EP 管发生液体泄露。在反应管倒置时, 可用纸巾包裹 EP 管, 一旦发生泄露, 丢弃纸巾, 防止台面污染。(3) 整个操作过程, 佩戴手套、口罩等个人防护用品。

注意事项:

(1) OG 染料管, 支持的总反应体积为 20-25 µl, 更大的体积可能导致颜色浓度下降。

(2) 关于矿物油的使用, 在配制完 LAMP 反应体系后, 可加入一滴矿物油覆盖于反应液上部, 以减少气溶胶的污染。矿物油并不影响 OG 染料的溶解。

(3) 在使用其它荧光染料时, 使用浓度可自行优化, 通常来讲, 参考供应商提供浓度的 0.25-0.8x, 过高浓度的染料可能导致扩增失败。

(4) 本试剂不支持浊度、pH 变色、HNB 变色反应, 请勿尝试。

(5) 该试剂中不含有甘油组分, 具有冻干经验的人员可进行冻干试剂的开发。