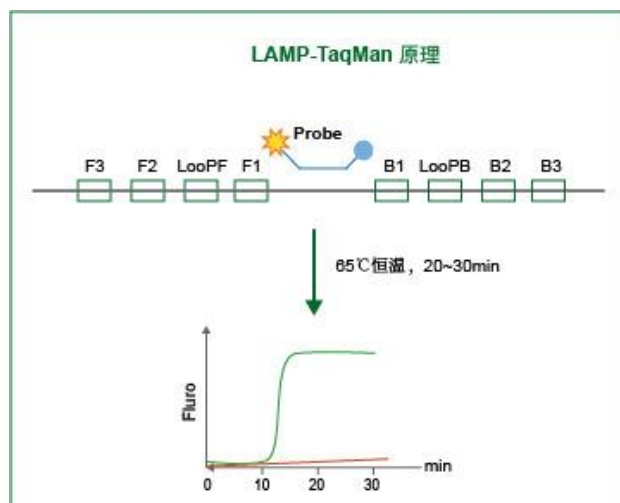


**描述:** LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 是一种新型核酸扩增技术。LAMP 技术自 2000 年由 Notomi 首次公布后, 因其具有的快速扩增能力, 使其成为诊断试剂的明星潜力技术。但发展至今近 20 年时间, 其仍然无法在诊断试剂领域获得广泛应用。LAMP 技术的突出问题就是其假阳性、非特异扩增严重, 无法产生高特异性信号。将类似标准定量 PCR 中的 TaqMan 探针技术应用到 LAMP 检测中, 一直是分子生物家追求的目标。至今, 虽有多种探针设计方案, 但均无法满足准确、可靠、快速的要求。

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°C 恒温条件下类似 TaqMan PCR 方法的扩增。整个检测时间通常在 15~25min 内即可完成检测。

## 原理



## 组分

名称	50 次
LAMP TaqMan Buffer2D	1 ml
ASFV LAMP TaqMan Assay	1 瓶
ASFV 阳性标准品 (10 <sup>5</sup> Copy/μl)	1 支

**储存:** ASFV LAMP TaqMan Assay 为冻干品形式, 内含 Bst 5.0 DNA 聚合酶、dNTP、扩增引物、探针, 每瓶可用于 50 头份的扩增反应。该制品在未溶解干粉状态下, 可置于室温保存 6 个月, -20°C 长期保存 (推荐保存温度), 并可采用室温运输。冻干品溶解后, 置于 -20°C 以下保存 (1 个月)。

## 1. 试剂盒性能说明:

1.1 靶标基因及探针: 针对非洲猪瘟 VP72 外膜蛋白。

1.2 试剂盒灵敏度: 试剂盒灵敏度与反应时间相关

60°C 反应时间	检测灵敏度
15min	10 Copy
25min (推荐反应时间)	2 Copy
35min	1 Copy

1.3 防污染的说明: 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。

## 2. 仪器和程序设置

LAMP TaqMan 的检测可以使用标准定量 PCR 仪 (也可使用恒温荧光设备), 探针报告基因为 FAM。

使用定量 PCR 仪进行 LAMP TaqMan 扩增程序如下:

步骤 1: 60°C 10s

步骤 2: 60°C 50s 收集信号, 循环 25 次

总反应时间为 25min。

## 3. 使用方法

### 3.1 溶解 LAMP TaqMan 冻干制品

小心打开西林瓶铝盖, 向每瓶冻干品中加入 1 ml LAMP TaqMan Buffer2D, 放置在漩涡混合仪上漩涡 10s 将冻干制品溶解 (或用 1ml 吸头吹打混合均匀)。溶解后的制品可立即使用或 -20°C 保存。溶解后的试剂标记为 LAMP TaqMan Mix。

### 3.2 溶解阳性标准品

阳性标准品为干粉形式, 首次使用前加入 100μl 的 ddH<sub>2</sub>O, 漩涡 10s 溶解后, 保存于 -20°C。溶解后的制品浓度为 10<sup>5</sup> copy/μl, 每次实验时采用 1μl 即可。

### 3.3 配置反应体系

溶解后的 LAMP TaqMan Mix	20 μl
检测模板 DNA	1 μl

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。

## 4. 结果判读

### 4.1 结果判读成立条件

阴性水对照不起峰、阳性标准品在 10~14min 起峰条件下结果判读有效。

### 4.2 阳性结果判读

有扩增曲线, 判定为阳性。在 25min 以后起峰但不明显的情况下, 通常 Copy 数小于 2copy。需要进行复核实验, 仍然起峰的情况, 表明为阳性。否则表明为阴性。

### 4.3 阴性结果判读

平线表明为阴性样本。