

描述: Bst DNA 聚合酶是 *Bacillus stearothermophilus* DNA 聚合酶的一部分, 具有很强的链置换活性, 以及 5'→3' 的 DNA 聚合酶活性, 因此可以应用于 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 检测实验。该制品内含 Bst4.0 DNA 聚合酶因此既可以扩增 DNA, 也可以直接扩增 RNA 分子。

LAMP 是一种新型核酸扩增技术。采用 4 或 6 条能够识别目的基因上的 6 个特异区域的引物, 依赖与 Bst DNA 聚合酶的强链置换活性, 在 30~60 分钟内 DNA 扩增可达 10^9 ~ 10^{10} 倍。本试剂盒采用 SYBR Green 染料实时监测 LAMP 扩增结果。

组分

名称	50T
LAMP SYBR Green Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml

使用方法:

1. LAMP SYBR Green Reagent 为干粉形式, 包含 Bst 4.0 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 0.75ml 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. 按以下组分配置反应混合液

溶解后的 LAMP SYBR Green Reagent	15 μ l
LAMP Primer Mix	0.5 or 1 or 1.5 μ l
模板 DNA or RNA	1 μ l
ddH ₂ O 到总体积	20 μ l

首次实验时 LAMP Primer Mix 分别采用 0.5、1、1.5 μ l 进行实验测试。

3. 荧光定量 PCR 仪的设置

LAMP SYBR Green 的检测可以使用标准定量 PCR 仪 (也可使用恒温荧光设备)。

使用定量 PCR 仪进行 LAMP SYBR Green 扩增程序:

步骤 1: 60℃ 10s

步骤 2: 60℃ 50s 收集信号, 循环 25 次

总反应时间为 25min。

(在 LAMP 反应结束后禁止将反应管盖打开, 否则可能会导致气溶胶污染)。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。

LAMP 实验的条件优化

(1) LAMP Primer Mix 浓度: FIP/BIP 分别为 16 μ M、LoopF/B 分别为 8 μ M、F3/B3 分别为 2 μ M。

(2) 对成功建立 LAMP 检测方法至关重要的四个参数分别是: 引物位置、引物使用浓度、反应温度 (60~65℃) 和反应时间。引物使用浓度、反应温度是优先要确认的参数, 如经过参数调整后仍不能达到检测用标准, 则重新设计引物组合, 再进行测试。