

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。

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 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍。

在 LAMP 的高效反应过程中会产生大量的焦磷酸根离子, 其与镁离子结合形成焦磷酸镁白色沉淀, 因此在实验过程中可通过检测反应液的浊度变化进行实时定量检测。也可在反应结束后肉眼直接观察焦磷酸镁沉淀, 根据是否形成白色沉淀来判断反应是否发生。

组分

名称	50T	200T
2×Turbidity LAMP Mix	0.65 ml	1.25 mlX2
5M Betain	1 ml	1 mlX4
Bst 2.0 DNA Polymerase	50 μ l	200 μ l

储存: -20℃可保存 3 年。

反应实例

1. 按以下组分配置反应混合液

2xTurbidity LAMP Mix	12.5 μ l
10×LAMP Primer Mix	2.5 μ l
5M Betain	0~4 μ l
模板 DNA	X μ l
Bst2.0 DNA Polymerase	1 μ l
ddH ₂ O	Up to 25 μ l

2. 反应体系配好后, 充分混匀并短暂离心, 置于 60~68℃ 进行反应, 连接 LAMP 实时浊度仪, 对浊度变化进行实时检测。也可肉眼分别于 30min、45min、60min 观察浊度变化。必要情况下 85℃ 热失活 5min (可选)。

LAMP 实验的条件优化

(1) 10×LAMP Primer Mix 配置

	浓度	首次实验浓度	引物储液浓度
FIP	8~16 μ M	8,12,16 μ M	100 μ M
BIP	8~16 μ M	8,12,16 μ M	100 μ M
Loop F	2~8 μ M	2,4,8 μ M	100 μ M
Loop R	2~8 μ M	2,4,8 μ M	100 μ M
F3	0.5~2 μ M	0.5,1,2 μ M	100 μ M
B3	0.5~2 μ M	0.5,1,2 μ M	100 μ M

(2) Betain 使用浓度

测试浓度	5M Betain 25 μ l 体系添加量
0 M	0 μ l
0.25 M	1.25 μ l
0.4 M	2 μ l
0.6 M	3 μ l
0.8 M	4 μ l

(3) Turbidity LAMP 对照设置

	浊度对照	阴性对照	实验样品
ddH ₂ O	✓	✓	✓
Turbidity LAMP Mix	✓	✓	✓
LAMP Primer Mix	✓	✓	✓
5M Betain	可选	可选	可选
模板 DNA	✓	✗	✓
Bst2.0	✗	✓	✓

(4) 反应温度设置

通常反应温度为 65℃, 由于引物的效率差异, 可在 60、63、65、68℃ 进行适当调整。首次实验建议采用 60、65℃

注意事项

- 为了减少交叉污染, 请分区操作 (试剂和模板 DNA 的配置操作最好在不同区域中进行)。
- 实验时, 所需模板量取决与样品类型 (0.1 ng~100 ng), 可先进行预实验确定模板量。
- 各区物品均为专用, 不可交叉使用, 防止污染。
- 实验过程中应穿工作服, 带手套, 建议使用带滤芯的一次性吸嘴。