

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 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍。该试剂盒配备变色反应指示剂, 其含有羟基萘酚蓝 (HNB) 指示染料, 阳性扩增样品的颜色由紫罗兰色变为天蓝色。

组分

名称	50T
LAMP HNB Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml

使用方法:

1. LAMP HNB Reagent 为干粉形式, 包含 Bst4.0 DNA 聚合酶、dNTP、HNB 显色剂等, 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 LAMP 反应混合液

溶解后的 LAMP HNB Reagent	15 μ l
LAMP Primer Mix	1 or 1.5 or 2 μ l
模板 DNA	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 1、1.5、2 μ l, 以阴性不变色, 阳性样品正常变色为标准, 作为后续测试用量。

3. 反应体系配好后, 置于 60~65℃ (首次实验采用 60℃) 进行反应 20~45min (扩增良好的引物组合, 通常 25min 即可变色, 一般不超过 45min, 首次实验设置 20、25、30、45min)。

注意: 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. 四个重要的参数, 将对成功建立 LAMP 检测方法至关重要, 分别是: 引物位置; 引物使用浓度; 反应温度; 反应时间。引物使用浓度、反应温度、反应时间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。