

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。

橙绿变色染料 (OG Dye) 以冻干的形式预加在 8 联管盖上。在 LAMP 反应完毕后 (在反应完毕前, 务必不能将管盖上染料混入反应液中), 将 0.2ml EP 管颠倒溶解 OG 染料后。LAMP 的反应产物将与 OG 染料形成强烈的绿色肉眼可见变色反应 (阳性), 而未发生扩增的 EP 管为深橙色 (阴性)。

组分

名称	48T
LAMP OG Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml
0.2ml EP 管	48 支
含冻干 OG 染料 EP 管盖	48 支

使用方法:

1. LAMP OG 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°C 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°C 保存 1 个月, 在 -60°C 以下长期保存。
2. OG 染料已经预先加入在 EP 管盖上, 为干粉形式, 其牢固的结合在管盖上, 仅有反应完毕后, 将 EP 管倒置后才能将其溶解, 溶解后其将立即终止 LAMP 反应, 并与 LAMP 反应产物形成鲜亮的绿色可见光。在配制反应液和反应过程中务必不能将 EP 管盖上的染料混入反应液中, 否则会导致 LAMP 反应终止。

3. 配制反应体系

在 0.2ml EP 反应管中加入下述试剂

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

全部试剂加入完毕后, 轻弹 EP 管底部后, 再盖上含 OG 染料的 EP 管盖 (**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**)。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。

4. 反应体系配好后, 置于 60~65°C (首次实验采用 60°C) 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)。

5. 观察结果: 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。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 30s。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。(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。