

**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。

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
LAMP Turbidity Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml

## 使用方法:

1. LAMP Turbidity 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 750  $\mu$ l 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. 按以下组分配置反应混合液

溶解后的 LAMP Reagent	15 $\mu$ l
LAMP Primer Mix	1 or 1.5 or 2 $\mu$ l
模板 DNA or RNA	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O 到总体积	20 $\mu$ l

首次实验时 LAMP Primer Mix 分别采用 1、1.5、2  $\mu$ l 进行实验测试。

3. 反应体系配好后, 充分混匀并短暂离心, 置于 60~65°C 进行反应(首次实验采用 60°C), 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 20、25、30、45min 观察浊度变化。

(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  $\mu$ M、LoopF/B 分别为 8  $\mu$ M、F3/B3 分别为 2  $\mu$ 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。