

描述: 该制品专为 RNA 样本的 LAMP 扩增反应设计, 制品中 Bst 4.0+ DNA Polymerase 中包含 Bst 2.0 DNA 聚合酶、极其耐热 ThermoStable V 反转录酶、Rnase Inhibitor, 在 RNA 的 LAMP 扩增中无需再加入任何其它酶制品即可用于 RNA 的 LAMP 扩增。除此外, Bst4.0+ DNA Polymerase 聚合酶中不含有甘油成分, 因此可用于建立 LAMP 引物 mix 与酶制品的冻干品, 以提高 LAMP 检测制品的稳定性和易用性。

Bst 4.0+ DNA Polymerase 可搭配不同的反应 Buffer 从而实现不同的显色与检测方式。三种 Buffer 均已包含 dNTP、Mg²⁺和相应的反应缓冲盐。其中 2xRed IsoAmp BufferD 用于红黄变色反应, 扩增完毕后阳性样品为黄色, 阴性样品为红色。2xSG IsoAmp BufferD 包含 SYBR Green 染料用于实时荧光检测。2x IsoAmp BufferD 用于浊度分析、浊度仪或搭配 OG 橙绿变色反应管(阳性样本为绿色、阴性样本为橙黄色)。

货号	名称
A3825	Bst4.0+ Polymerase (250 µl)
A3825-01	2xRed IsoAmp BufferD (1 ml)
A3825-02	2xIsoAmp BufferD (1 ml)
A3825-03	2xSG IsoAmp BufferD (1 ml)

注意: Bst4.0+ DNA Polymerase: 2.5 µl 该制品包含 8U Bst2.0 DNA Polymerase、20U ThermoStable V Reverse、8U Rnase Inhibitor、22%海藻糖。不含甘油, 可用于冻干。

储存: 长期保存制品于-20℃, 保存 2 年。短期保存置于 4℃, 保存 3 个月, 避免反复冻融。

使用实例 (以 LAMP 恒温扩增为例)

1. 红黄变色反应 (使用货号 A3825-01)

(1) 在 0.2 ml EP 反应管中加入下述试剂

2xRed IsoAmp BufferD	10 µl
Bst4.0+ DNA Polymerase	2.5 µl
10xLAMP Primer Mix	2 µl
模板 RNA	X µl
ddH ₂ O 到总体积	20 µl

10xLAMP Primer Mix 浓度: FIP/BIP 分别为 16 µM、LoopF/B 分别为 4 µM、F3/B3 分别为 2 µM

(2) 反应体系配好后, 置于 60~68℃(首次实验采用 65℃) 进行反应 20~45min。肉眼观察结果, 黄色为阳性, 红色为阴性。

注意: 红黄变色反应依赖于反应体系中 pH 的变化来实现, 因此模板中 Tris 盐、NaOH 等成分对反应有至关重要的影响。在采用核酸纯化的样本检测时, 推荐使用 ddH₂O 进行洗脱, 在使用粗制样本时建议使用 ddH₂O 保存的样本进行检测。除此外, 可使用 HaiGene 精心研制的 LAMP 专用快速核酸释放剂。

2. 橙绿反应体系配制 (使用货号 A3825-02+A3821)

(1) 在 0.2ml EP 反应管中加入下述试剂

2xIsoAmp BufferD	10 µl
Bst4.0+ DNA Polymerase	2.5 µl
*10xLAMP Primer Mix	2 µl
模板 RNA	X µl
ddH ₂ O 到总体积	20 µl

*10xLAMP Primer Mix 浓度: FIP/BIP 分别为 16 µM、LoopF/B 分别为 4 µM、F3/B3 分别为 2 µM

全部试剂加入完毕后, 轻弹 EP 管底部后, 再盖上 OG 橙绿变色管(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 µl, 以阴性不变色, 阳性样品正常变色为准, 作为后续测试用量。

(2) 反应体系配好后，置于 60~68℃（首次实验采用 65℃）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）。

(3) 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。

3. 浊度反应（使用货号 A3825-02）

(1) 配制反应体系

在 0.2ml EP 反应管中加入下述试剂

2xIsoAmp BufferD	10 μ l
Bst4.0+ DNA Polymerase	2.5 μ l
*10xLAMP Primer Mix	2 μ l
模板 RNA	X μ l
ddH ₂ O 到总体积	20 μ l

*10xLAMP Primer Mix 浓度：FIP/BIP 分别为 16 μ M、LoopF/B 分别为 4 μ M、F3/B3 分别为 2 μ M。

(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。必要时 85℃ 热失活 5min（可选）。

4. SYBR Green 法（使用货号 A3825-03）

(1) 配制反应体系

在 0.2ml EP 反应管中加入下述试剂

2x SG IsoAmp BufferD	10 μ l
Bst4.0+ DNA Polymerase	2.5 μ l
*10xLAMP Primer Mix	2 μ l
模板 RNA	X μ l
ddH ₂ O 到总体积	20 μ l

*10xLAMP Primer Mix 浓度：FIP/BIP 分别为 16 μ M、

LoopF/B 分别为 4 μ M、F3/B3 分别为 2 μ M。

(2) 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。

关于制品冻干

1. 引物及酶制品的冻干（可参考）

Bst4.0+ DNA Polymerase	2.5 μ l
10xLAMP Primer	2 μ l
45%海藻糖	0.5 μ l
Total	5 μ l

将该制品进行冻干处理，获得冻干品。

2. 冻干制品的 LAMP 扩增

向一份冻干品中加入 10 μ l 的 2xIsoAmp BufferD 溶解冻干制品，并加入最多 10 μ l 的检测 RNA 模板，总体积为 20 μ l。进行 LAMP 扩增。

注意事项

1. 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。

2. 在用于其它恒温扩增反应时（如 CPA、SMAP 等），可参考如上策略进行使用，反应时间可能会需要调整。

3. 关于矿物油的使用，在配制完 LAMP 反应体系后，可加入一滴矿物油覆盖于反应液上部，以减少气溶胶的污染。