

DNA/RNA 恒温扩增试剂(用于 LAMP 恒温扩增)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

其为单一组分的 Mix (2.5 倍浓度)，包含了低缓冲盐 (Low Salt)、Mg²⁺、dNTP、Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶等，使用时只需要加入引物、模板即可进行核酸恒温扩增。Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶具有依赖于 RNA 模板的聚合酶活性 (逆转录)，还具有依赖于 DNA 的聚合酶活性，因此无论 DNA 或 RNA 样本均可使用该制品进行恒温扩增。

由于 LAMP 在反应时会产生大量的 H⁺，导致反应体系 pH 下降 (通常由 pH8.8，下降到 7.2 以下)，因此，低缓冲盐体系条件下，可搭配 pH 敏感染料实现可视化检测 LAMP 检测。该制品中包含终浓度 25 μM 的 Tris (pH8.8) 缓冲盐。在搭配 pH 敏感染料的情况下，可进行变色 LAMP 扩增。此外，本试剂中不含有甘油，可用于建立冻干体系。

储存: -20℃ 保存 1 年；-80℃ 保存 2 年；短期使用放置于 2-8℃，保存 1 个月。反复冻融 10 次，不影响使用。如有白色沉淀，于 37℃ 水浴放置 10min 后溶解沉淀，不影响使用。

使用实例 (以 LAMP 红黄变色扩增为例)：

1. 搭配使用红色 pH 指示染料管，进行 LAMP 变色反应，该染料管包含红色 pH 指示染料，其已经烘干于 0.2 ml EP 管的底部。其在 pH>8.5 时为红色，在 pH<7.2 时为黄色，因此可用于检测 LAMP 的扩增产物。该染料管性能稳定，可室温长期保存。在搭配其它 pH 指示染料的情况下，可自行选择并调整优化。
2. 配制反应体系 (在 0.2ml pH 指示染料管中进行)

<u>2.5xBst4.0 LS MasterMix</u>	<u>10 μl</u>
<u>10xLAMP Primer Mix</u>	<u>2.5 μl</u>
<u>模板 DNA/RNA</u>	<u>X μl</u>
<u>ddH₂O 到总体积</u>	<u>25 μl</u>

3. 盖上管盖，漩涡 20s (中间可轻弹 1-2 次)，使底部染料彻底溶解。并放置到离心机上短离心，使液体至底部。置于 65° C 进行反应 20~30min。肉眼观察结果，黄色为阳性，红色为阴性。
4. 10xLAMP Primer Mix 的配制，FIP/BIP 分别为 16 μM、LoopF/B 分别为 4~8 μM、F3/B3 分别为 2 μM。引物的稀释液均使用 ddH₂O (pH8.0-9.0)，不能使用含有 Tris 缓冲盐系统。由于该变色方法对 pH 敏感，多数情况下引物溶解后成酸性，因此在 10x 引物中加入终浓度 1mM NaOH 使引物恢复到中性 pH (~8.5)，注意 NaOH 需新鲜配制，可配制成 50-100mM 浓度使用。

其它注意事项:

(1) 该试剂对影响 pH 的缓冲盐敏感, 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。

(2) 在使用粗制样本时建议使用 ddH₂O 保存的样本进行检测。在对粗制样本进行检测时, 最佳的粗制样本为拭子样本, 拭子样本经 ddH₂O 浸泡后, 可以直接使用浸泡液作为模板进行扩增, 无需核酸纯化步骤。

(3) 关于 DEPC 水使用的特殊说明: 由于 DEPC 处理过的 ddH₂O 显示很强的酸性, 会直接导致溶解后的冻干球成黄色。所以 DEPC 处理过的 H₂O 必须经 NaOH 溶液调整 pH 到 8.0-9.0 后方可使用。我们推荐直接使用, 水机制备的 18.2 Ω H₂O, 不影响 RNA 样本的扩增。

(4) 该试剂中不含有甘油组分, 具有冻干经验的人员可进行冻干试剂的开发。