

Version 1

Code No. AG12701

Acculso Bca LAMP 试剂盒

Acculso Bca LAMP Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品中 *Bca* DNA Polymerase 来源于嗜热细菌 *Bacillus Caldotenax*, 具有 5' →3' DNA 聚合酶活性以及强链置换活性, 但缺失 5' →3' 核酸外切酶活性, 该酶可用于等温扩增反应, 如 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)。

本产品的 buffer 经过优化, 具有灵敏度高、稳定性好的优点, 可对靶基因进行准确检测, 重复性好, 可信度高, 反应完成后可通过琼脂糖凝胶电泳或添加核酸染料等方法验证结果。

➤ 产品组成

| 组分名称 | AG12701 (200 rxns / 25 μl) |
|---|---------------------------------|
| <i>Bca</i> DNA polymerase (8 U/μl) | 200 μl |
| 10X <i>Acculso Bca</i> Buffer ^{*1} | 500 μl |
| dNTP Mix (10 mM each) | 700 μl |
| MgSO ₄ Solution (100 mM) | 300 μl |
| RNase free water | 1 ml x 4 pcs |

*1: 10X *Acculso Bca* Buffer 中含有 20 mM Mg²⁺。

➤ 保存

保存温度: -20°C保存

运输温度: 干冰运输或-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 恒温反应: 在恒定温度下反应, 无需 PCR 热变性扩增循环。
2. 反应快速: 可在 10 ~ 60 min 内完成扩增, 实验方便快捷。
3. 特异性强: 采用 4 ~ 6 条引物, 识别靶基因的 4 ~ 6 个位点, 保证扩增的特异性。

➤ 实验原理

LAMP 扩增原理

LAMP 是一种新的核酸体外扩增技术, 属于等温扩增技术中的一种, 不同于 PCR 技术需要“高温变性-低温退火-引物延伸”的三种温度循环, LAMP 技术利用一种具有高度链置换活性的 DNA 聚合酶, 可在同一温度下不断的进行扩增反应, 在极短时间内获得大量目的基因片段。LAMP 反应的进行需要四条引物参与: F3/B3、FIP/BIP, 若添加额外的两条引物: Loop F/Loop B, 则可大幅提高扩增速率, 各引物的序列位置见图 1。

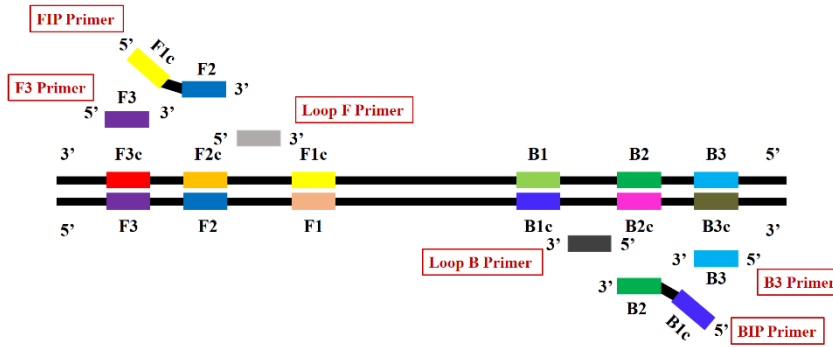


图 1 LAMP 扩增反应所需 6 种引物的序列位置

注：Loop F Primer 位于 F2c 的 5' 末端与 F1c 的 3' 末端之间，Loop B Primer 位于 B1c 的 3' 末端与 B2c 的 5' 末端之间；

扩增详情如图 2 所示，引物 FIP 最先与目的序列结合，并在 *Bca* DNA Polymerase 的作用下进行扩增，然后引物 F3 与目的序列结合，进行扩增，由于 *Bca* DNA Polymerase 的链置换效果，将“片段 A”从双链中置换出来，并因部分序列反向互补而自身成环；引物 BIP 与 B3 通过相同的原理进行结合、扩增，最终形成哑铃状结构的“片段 B”，“片段 B”两端茎环结构的环状部分均处于单链状态，无需变性即可与引物 FIP/BIP、Loop F/Loop B 结合，并在 *Bca* DNA Polymerase 的作用下继续进行扩增，且生成产物仍具有茎环结构，可与引物结合开启扩增。

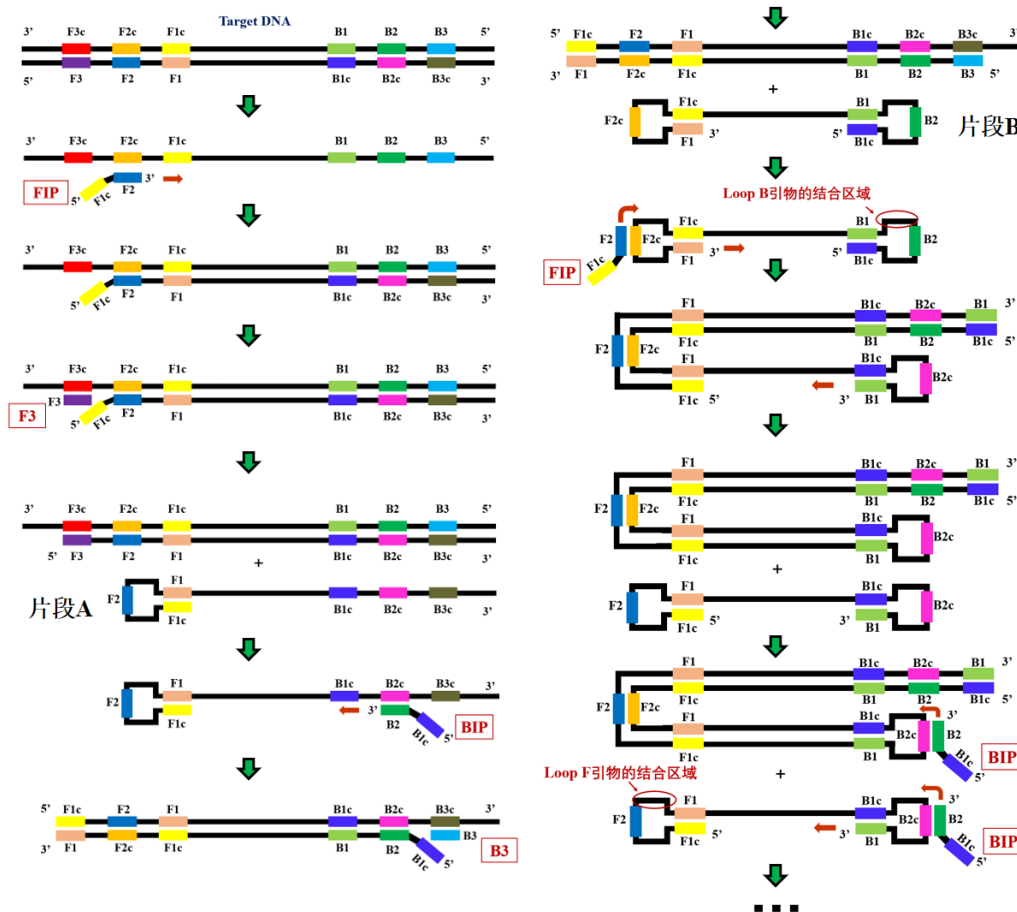


图 2 LAMP 扩增反应步骤与原理

➤ 使用注意事项

1. 10X *Acculso Bca* Buffer 易起泡，使用时应轻柔混匀。
2. *Bca* DNA polymerase 振荡易失活，建议离心后用移液枪进行吹打混匀。
3. 反应混合液与模板的配制最好在不同区域进行，以避免污染。
4. 由于反应较快，建议最后添加模板，以保证结果的可靠性。
5. 所有试剂使用前短暂离心将溶液收集至离心管底部，避免损失。
6. 所有反应混合液需在冰上配制。
7. 本产品不可用于 PCR 反应。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)。

2. 仪器：

PCR 仪或者其他恒温设备、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1. 配制反应体系

按照下表在冰上配制反应液：

| 组分名称 | 反应终浓度 | 25 μ l 体系 |
|--|------------------|------------------|
| <i>Bca</i> DNA polymerase (8 U/ μ l) | 0.32 U/ μ l | 1.0 μ l |
| 10X <i>Acculso Bca</i> Buffer ^{*1} | 1X | 2.5 μ l |
| dNTP Mix (10 mM each) | 1.4 mM | 3.5 μ l |
| MgSO ₄ Solution (100 mM) ^{*1} | 8 mM | 1.5 μ l |
| Primer F3/B3 (10 μ M each) ^{*2} | 0.2 μ M each | 0.5 μ l |
| Primer FIP/BIP (50 μ M each) ^{*3} | 1.6 μ M each | 0.8 μ l |
| Primer Loop F/Loop B (10 μ M each) ^{*4} | 0.4 μ M each | 1.0 μ l |
| DNA Template ^{*5} | - | \leq 100 ng |
| RNase free water | - | up to 25 μ l |

*1: 推荐反应中 Mg²⁺终浓度为 8 mM，1X *Acculso Bca* Buffer 中已包含 2 mM Mg²⁺，可根据实验需求，Mg²⁺终浓度在 6 mM ~ 12 mM 的范围内进行调整。

*2: Primer F3/B3 的推荐反应体系终浓度为 0.2 μ M each，其用量可根据扩增情况在 0.1 ~ 0.3 μ M each 范围内调整。

*3: Primer FIP/BIP 的推荐反应体系终浓度为 1.6 μ M each，其用量可根据扩增情况在 1.2 ~ 2.0

μ M each 范围内调整。

- *4: Primer Loop F/Loop B 的推荐反应体系终浓度为 0.4 μ M each, 其用量可根据扩增情况在 0.2 ~ 0.8 μ M each 范围内调整。
- *5: 在 25 μ l 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 100 ng。必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

2. 反应条件

将含有反应液的 PCR 管放置于 PCR 仪或者其他恒温设备中, 然后按照下表条件进行 LAMP 反应:

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------------------|----------------------|-----|
| Step 1 | 65°C ^{*1} | 30 min ^{*2} | 1 |
| Step 2 | 80°C | 2 min ^{*3} | 1 |

*1: 反应温度通常设定为 65°C, 若扩增序列 GC 含量较低, 可适当降低反应温度, 调整范围为 50 ~ 68°C。

*2: 反应时间通常设定为 30 min, 可根据模板扩增难易程度在 10 ~ 60 min 范围内进行调整。

*3: *Bca* DNA polymerase 可在 80°C 下 2 min 失活。

3. 结果检测

反应结束后, 取 2 ~ 5 μ l LAMP 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

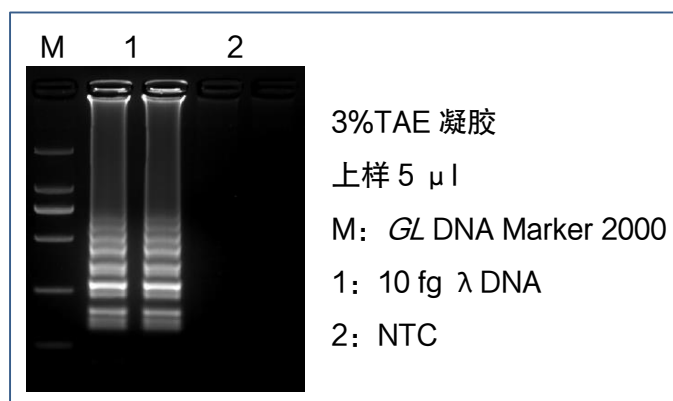
➤ 实验例

1. 以 λ DNA 为模板, 利用本产品进行扩增, 可检测到 10 fg 的 λ DNA。

反应程序:

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|--------|-----|
| 65°C | 30 min | 1 |
| 80°C | 2 min | 1 |

电泳结果如下图所示:

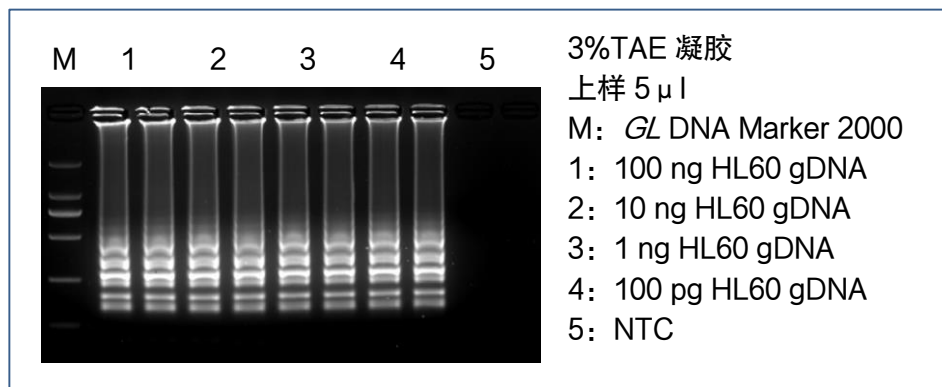


2. 以 HL60 gDNA 为模板，添加不同模板量（100 ng、10 ng、1 ng、100 pg），利用本产品进行扩增，在模板量低至 100 pg 时仍然能扩增出目的条带。

反应程序：

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|--------|-----|
| 65°C | 30 min | 1 |
| 80°C | 2 min | 1 |

电泳结果如下图所示：



➤ 产品注意事项

1. 引物的设计

- ❖ 推荐使用 LAMP 引物设计专用软件：PrimerExplorer。

网页版网址为：primerexplorer.jp/e/，软件操作指南可于网址 primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html 进行下载。该软件可针对目的片段初步筛选出可用于 LAMP 扩增的引物，但具体扩增效果仍需实验进行验证。

2. 合适的反应温度及时间

- ❖ 对于 GC 含量低于 60% 的扩增序列，反应温度可在 50 ~ 65°C 之间进行调整，不同序列最佳反应温度不同；而对于 GC 含量高于 60% 的扩增序列，建议使用 65 ~ 68°C 作为反应温度。
- ❖ 本产品反应速度较快，一般 30min 足够完成扩增，若反应模板量较低或模板比较复杂，可适当延长反应时间，若反应模板量较高或模板比较简单，则可适当缩短反应时间。

3. 防止污染措施

- ❖ 本产品检测灵敏度较高，容易被空气中的气溶胶所污染，建议所有实验步骤于超净工作台内进行，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁，并建议使用带滤芯枪头，以避免污染。

- ❖ 本产品扩增产物量较大，请勿在反应体系配制区域开盖进行电泳，以免对后续实验造成污染。
- ❖ 多次开盖会增加试剂被污染的风险，若单次实验用量较少，建议将试剂分装后使用。
- ❖ 若因污染导致阴性样本持续出现扩增，建议更换未启用的试剂与引物，并用紫外光对实验环境进行照射以消除环境中的气溶胶污染，或者使用核酸清除剂（推荐使用本公司核酸&核酸酶清除剂，Code. No AG21302）仔细清洁实验台。