

## Colorimetric pH Sensitive LAMP Kit (DNA/RNA)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LP321

保存: -20°C保存一年

### 产品说明

本产品包含*Bst* II DNA聚合酶、Reverse Transcriptase (High Temperature)反转录酶、2.5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix、可视化pH指示剂N-Red，只需自备模板、引物。本产品适用于进行以DNA/RNA为模板的可视化LAMP/RT-LAMP反应。

*Bst* II DNA Polymerase为重组*Bacillus stearothermophilus* DNA聚合酶，在大肠杆菌中表达后经纯化分离而得到。该酶具有5'→3'DNA聚合酶活性，缺失5'→3'外切核酸酶活性。Reverse Transcriptase (High Temperature)为耐高温反转录酶，与*Bst* II搭配使用可以RNA为模板下在65°C恒温条件下进行一步法逆转录和LAMP扩增。2.5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix为优化的预混反应液，已包含LAMP扩增所必需的MgSO<sub>4</sub>、dNTPs等组分，体系配制时无需另外加入。N-Red为pH敏感型酸碱指示剂，变色pH范围为6.8~8.0，将N-red比色剂提前加入LAMP反应混合液中，反应结束后无需开盖，通过肉眼观察比较其显色结果，阳性反应孔为洋红色，阴性反应孔为橙黄色。

### 特点

- 等温扩增 (LAMP/RT-LAMP) 能力
- 快速聚合
- 强链置换能力

### 适用范围

- DNA/RNA等温扩增
- 富含GC区域的核酸测序
- 可用于要求嗜温链置换的实验

### 产品组成信息

产品组成	规格01 (100 rxns)	规格02 (200 rxns)
<i>Bst</i> II DNA Polymerase	100 µl	200 µl
Reverse Transcriptase (High Temperature)	100 µl	200 µl
2.5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix	1 ml	2×1 ml
N-red Stain	150 µl	300 µl
RNase-free Water	2×1 ml	4×1 ml

### 使用方法

#### 1、待检核酸样本准备

核酸提取后的样本可作为模板直接加入到反应中。

【注】：本产品N-red为pH敏感型指示剂，核酸样本请避免使用Tris-HCl浓度高的缓冲体系，可能会导致pH指示剂无法变色，影响结果判断；避免使用强酸或强碱的核酸释放剂处理样本，若必须使用，则样本处理完后需将其pH调节至8.0。



## 2、配制反应体系（以25 μl反应体系为例）

从-20℃取出各反应组分，按照下表建议用量进行体系配制：

反应组分	体积	工作浓度
Template ( DNA或RNA )	Variable	> 10拷贝或更多
FIP/BIP Primers	Variable	1.6 μM each
F3/B3 Primers	Variable	0.4 μM each
Loop F/B Primers	Variable	0.8 μM each
2.5×pH Sensitive LAMP Reaction Mix	10 μl	1×
N-Red Stain	1.3~1.5 μl	-
<i>Bst</i> II DNA Polymerase	1 μl	-
Reverse Transcriptase (High Temperature) ( 模板为RNA时加入 )	1 μl	-
RNase-free Water	Variable	-
Total Volume	25 μl	

【注】：①为避免污染，尽量划分实验区域，分别用于组分配制和加入模板，建议在超净台中配制组分，在其他房间的通风橱中加入模板以免出现假阳性结果；②建议在每个样品孔加入20 μl石蜡油进行液封，以避免反应过程中试剂挥发或交叉污染。

## 3、恒温扩增

推荐反应条件：60℃~65℃反应30分钟，具体反应温度根据引物Tm值确定。

【注】：建议在反应结束后设置85℃孵育10分钟，使*Bst* II酶失活。

## 4、结果判读

反应30分钟后，立刻取出反应管，待降温至室温后，置于光线良好的环境中观察（建议以白纸作为背景）：反应液为洋红色或橘红色为阳性，反应液为黄色则为阴性，且颜色变化程度与检测使用的模板量有关，模板高的情况下颜色变化更加明显。如下图1数据展示。

【注】：①按照上述步骤3进行恒温扩增和85℃终止实验后，样品可暂存于室温或4℃，不影响阴/阳样品的颜色；若不设置85℃终止步骤，则反应时间需要准确计时并立即观察拍照，超过说明书规定的时间可能会出现假阳性结果；②可视化LAMP相比荧光定量法，需要更多反应时间积累足够多的产物才能引起反应液颜色变化，因此反应时间与模板量高低有关：当模板量高时，反应30分钟即可；当模板量低时，可能需要延长至60分钟。



图1. N-red可视化LAMP反应结果图

图中NTC为无模板对照，NC为阴性对照，cp为copies，即每个25 μl反应体系中的拷贝数，N-red用量1.35 μl，反应温度为65℃，反应时间为30分钟。



### 操作建议 & 注意事项

- ① *Bst* II DNA聚合酶不能用于热循环测序或PCR;
- ② *Bst* II DNA聚合酶反应温度范围: 50°C~70°C, 最适反应温度65°C;
- ③ 使用本产品可在水浴锅、金属浴、PCR仪或其他具有恒温加热模块的设备进行反应, 建议在配制完体系后于每个样品孔上方加入20  $\mu$ l左右的石蜡油 (PCR级, 自备), 可有效避免试剂挥发或交叉污染而影响结果判断;
- ④ 本试剂盒中缓冲液能力较弱, 为避免影响pH指示剂的颜色变化, 建议使用无核酸水溶解模板, 稀释引物请使用RNase-free Water或0.1 $\times$ TE Buffer;
- ⑤ 由于*Bst* II DNA聚合酶在室温下也具有活性, 配制体系过程中请保持低温 (冰上操作);
- ⑥ 尽量区分实验环境, 在不同的区域进行反应试剂及模板的配制, 反应结束不可开盖以免影响后续实验;
- ⑦ 尽量减少反复开盖次数, 由于本产品使用的是pH指示剂法, 2.5 $\times$ pH Sensitive LAMP Reaction Mix中的缓冲体系能力较弱, 各试剂组分均不可长期接触空气, 否则会吸附空气中的CO<sub>2</sub>致使pH降低而影响实验结果;
- ⑧ N-Red染料长期放置过程中可能会有沉淀析出, 是正常现象, 混匀后加入即可正常使用, 不影响反应性能。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-202212

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

