

分子诊断技术手册

We I.V.D. that TM

MedixMDx Fast Bst Mix

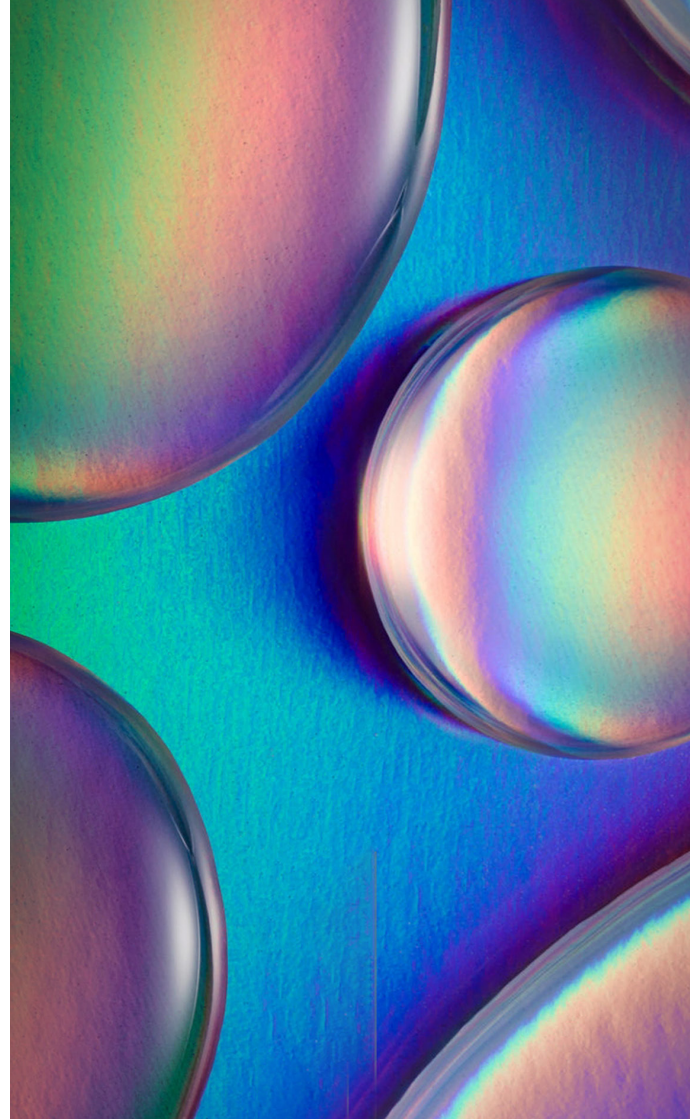
Medix Biochemica

MX2106 MedixMDx Fast Bst Mix

一种简单即用型预混液，含有嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 表达的重组 DNA 聚合酶。

Bst DNA 聚合酶具有较高的链置换活性，具有 5' 到 3' 端聚合酶活性，但缺乏 5' 到 3' 外切酶活性。MedixMDx Fast Bst Mix 适用于核酸等温扩增方法，如环介导等温扩增 (LAMP)。

LAMP 等温扩增通常用于终点法。如果将合适的染料添加到混合物中可进行实时检测。





MedixMDx Fast Bst Mix 即用型预混液，优化的缓冲液体系确保高扩增产率和高性能，使用时只需要添加引物、模板和水。同时对抑制物具有高度耐受性，即使对于难处理的粗样本（如血液），也可达到快速、稳健的 LAMP 反应效果。常规反应温度为 65°C，这种酶在 55°C - 70°C 的温度范围内仍具有活性，当温度 $\geq 80^{\circ}\text{C}$ 时失去活性。

MedixMDx Fast Bst Mix 预混液同时配有单独的荧光染料，支持使用荧光定量 PCR 仪在 FAM 通道上进行实时 LAMP 反应检测。

方法

配有荧光染料的 MedixMDx Fast Bst Mix 预混液与其他供应商进行了比较, 并基于文献 (Nagamine et al, 2002.1) 中的引物设计方案, 针对 λ DNA (GeneBank NC_001416) 进行 LAMP 引物设计。DNA 模板按照 53.2, 5.3, 0.5, 0.27 fg/rxn 进行梯度稀释, 并添加无模板阴性对照 (NTC)。25 μ L 的反应体系, 65°C 孵育 50 分钟, 为了能够采用终点法进行分析, 将反应后样品在 95°C 下灭活 10 分钟。

使用 BioRad CFX Opus 96 仪器进行实时检测, 每 15 秒在 FAM 通道上获取一次荧光读数。使用 2% Invitrogen E-gel 琼脂糖凝胶对反应样品进行凝胶电泳观察。

该研究在两种不同实验条件下进行: 按照试剂盒中提供的最佳反应条件, 或在强 PCR 反应抑制物存在的条件下进行反应, 如在最终反应混合物中存在 0.5% 或 2% (v/v) 的血液。

通常反应时间 30 分钟即可。本研究为了探究试剂性能, 采用 50 分钟较长反应时间。

快速、灵敏

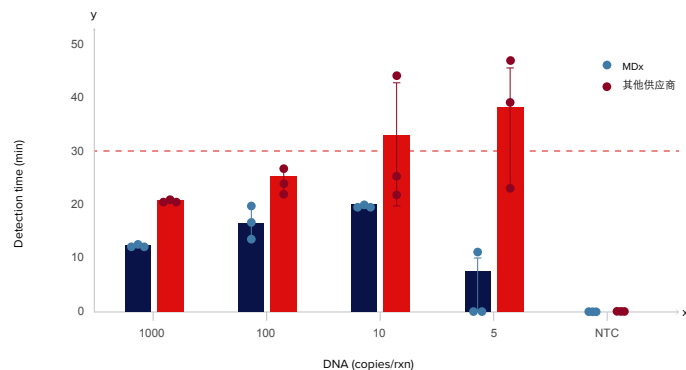
MedixMDx Fast Bst Mix 预混液对不同浓度 DNA 模板进行检测, 均可在 10-20 分钟内完成。同其他供应商比较, 平均反应时间缩短 10 分钟 (图 1)。

MedixMDx Fast Bst Mix 预混液的检测灵敏度可达到 10 copies/rxn DNA (0.5 fg/rxn), 相较于其他供应商的预混液灵敏度更高。在 30 分钟反应时间内, 其他供应商预混试剂并不能对含有特定浓度的 DNA 模板的样本进行足够有效的扩增。

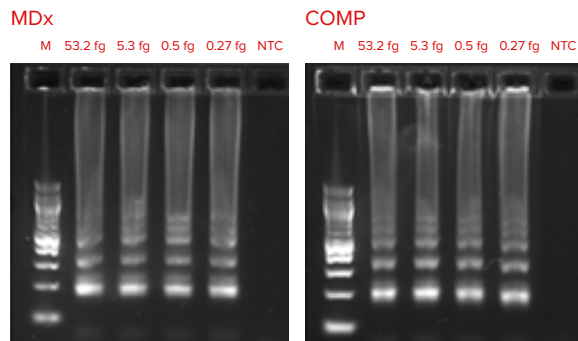
当 DNA 模板浓度低于 10 copies/rxn 时, 可能会产生不一致或不可重复的结果。

图1. MedixMDx Fast Bst Mix 预混液与其他供应商在最佳反应条件下的对比结果

A. 根据记录的荧光信号将检测时间进行标准化计算



B. 琼脂糖凝胶电泳结果

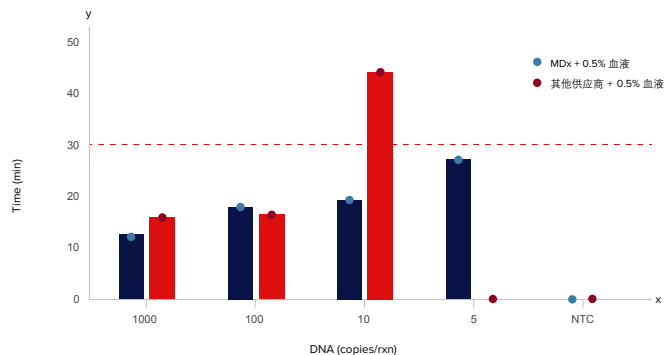


即使检测样本中含有 0.5% (v/v) 血液，也不影响 MedixMDx Fast Bst Mix 在灵敏度或检测时间方面的稳定表现，对不同浓度模板 DNA 检测均可在 10-20 分钟内完成 (图 1, 图 2)。

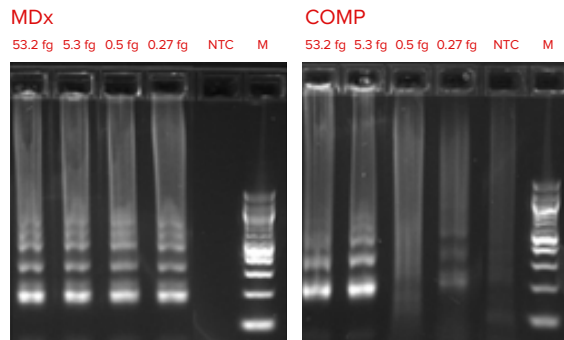
其他供应商预混液，当检测样本中含有 0.5% (v/v) 血液时表现不理想，仅可检测到 100 copies/rxn (图 2)。

图2. MedixMDx Fast Bst Mix预混液与其他供应商检测结果对比，每个反应中含有 0.5% 的血液

A. 根据记录的荧光信号将检测时间进行标准化计算



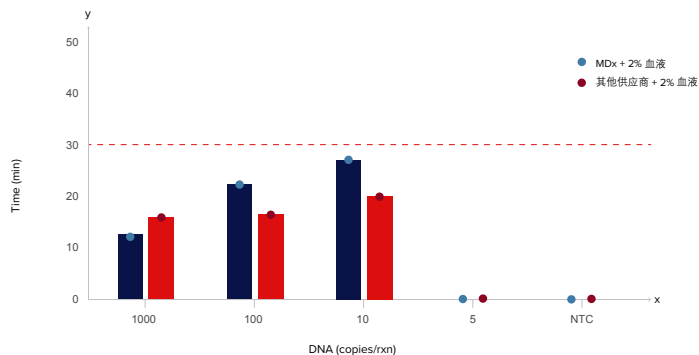
B. 琼脂糖凝胶电泳结果



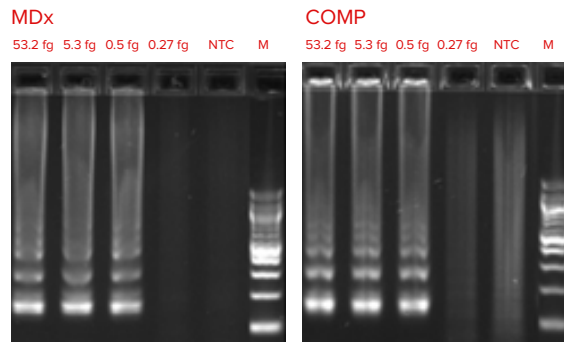
对含有复杂基质的样品进行扩增，如添加 2% (v/v) 浓度的血液 (每反应体系中添加 0.5 μ L 未稀释血液)，与正常样品检测比较，MedixMDx Fast Bst Mix 检测时间增加 2-4 分钟，试验灵敏性不受影响 (图 1, 图 3)。

图3. MedixMDx Fast Bst Mix预混液与其他供应商检测结果对比，每个反应中含有 2% 的血液

A. 根据记录的荧光信号将检测时间进行标准化计算



B. 琼脂糖凝胶电泳结果



结论

MedixMDx Fast Bst Mix 是一种快速、灵敏的等温 DNA 聚合酶预混液，其性能表现优于所对比的其他供应商的 Bst 预混液。

MedixMDx Fast Bst Mix 预混液不受复杂基质影响，即使样本中存在 2% (v/v) 的血液也能有效进行目标 DNA 的扩增，检测时间几乎不受影响。

联系我们

medixchina@medixbiochemica.com

1. Nagamine *et al.* Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2002;16:223–229.

Medix Biochemica

Copyright © V1 30/06/2022 Medix Biochemica. All rights reserved.

