

描述: Bst3.2 DNA 聚合酶经酶电子重构架和进化筛选 (in silico Design & invitro Evolution), 将 Bst2.0 和 Bst3.0 特性融合, 保留了 3.0 的快速扩增能力和内置 RT 活性, 融合了 2.0 的扩增特异性佳和 dUTP 使用能力 (允许使用 50% 的 dUTP 来代替 dTTP)。该酶具有 5'-3' 的 DNA 聚合酶活性和强烈的链置换活性, 但该酶 5'-3' 和 3'-5' 的外切酶活性缺失。

用于 RT-LAMP 实验, 尽管 Bst3.2 DNA 聚合酶本身具有良好内置的 RT 活性, 但在低 Copy 样本的 RT-LAMP 中表现出反应速度滞后, 因此在 RT-LAMP 反应时仍然建议搭配耐热逆转录酶 Max65 RTase, 该组合方案下使用性能等同于 HaiGene 的 Bst4.0 DNA/RNA 聚合酶。

组分

名 称	800U	4000U
Lyo-Bst3.2 DNA Polymerase	1 bead	5 beads
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	1.5 ml	1.5 mlx2
100 mM Mg ²⁺	1.5 ml	1.5 ml
1 M GuHCl	1.5 ml	1.5 ml
HGStoreBuffer25	1 ml	1 ml

单位定义: 一个活力单位即在 65°C 条件下, 30 分钟内催化 25nmol dNTP 的掺入反应成为酸不溶性物质所需的酶量。

储存与运输: (1)核心酶制品为冻干品形态, 未开封状态下[-15°C 以下(效期 36 个月)];

(2)酶制品使用 HGStoreBuffer25 溶解后[-15°C 以下(效期 12 个月)];

(3)酶制品使用 ddH₂O 溶解后[-15°C 以下(效期 2 个月)], [-60°C 以下(效期 12 个月)]。

(4)运输条件: 室温(<37°C), 28 天以内。收到货物后-15°C 以下保存。

使用前事项:

(1) 用于冻干酶的溶解液(HGStoreBuffer25): 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 25% Glycerol, 0.1% Tween20。除此外, 也可使用 15~25%甘油或 ddH₂O 溶解酶制品。

(2) 溶解: 冻干酶以冻干球 (直径 4mm) 形态提供, 每个球包含 800U 的 Bst3.2, 每个球用 95 μl 的 HGStore Buffer25 溶解, 总体积为 100 μl (每个冻干球溶解后, 实际体积约 5 μl)。此时, 溶解后的 Bst3.2 为 8U/μl。

(3) RT-LAMP 中, 对于 RNA 样本推荐加入 Max65 RTase 逆转录酶以提高 RNA 检测速度, 1x 浓度为 2U/μl。

(4) Mg²⁺的使用浓度为 4~10 mM 浓度, IsoBuffer 中没有 Mg²⁺, 通常情况下, 在 6-8 mM Mg²⁺条件下可获得较好

的 LAMP 结果。

(5) 未知的原因, 在反应体系中加入 50mM GuHCl, 对多数引物来讲, 可加速 LAMP 扩增 3~5min, 并提高 LAMP 检测灵敏度。但这不是绝对的, 有些引物组具有相反的效果。

(6) Bst3.2 的最佳活性温度区间为 55~70°C, 在 LAMP 反应中推荐使用 65~70°C, 其它类实验中需要自行调整。

典型的 LAMP 反应

1. 10xLAMP Primer Mix 的配制

	10xPrimer Mix	1x 浓度
FIP/BIP	10-16 μM each	1-1.6 μM each
LF/LB	4~8 μM each	0.4~0.8 μM each
F3/B3	2 μM each	0.2 μM each

2. 配制 LAMP 反应体系

Bst 3.2 (8U/μl)	1 μl	0.32U/μl
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	2.5 μl	1x
dNTP Mixture(25 mM each)	1 μl	1 mM
100mM Mg ²⁺	1.5 μl	6 mM
1M GuHCl	1.25 μl	50 mM
10X Primers	2.5 μl	
模板 DNA	10ng	
ddH ₂ O Up to	25 μl	

3. 配制 RT-LAMP 反应体系

HS Bst 4.2 (8U/μl)	1 μl	0.32U/μl
Max65 RTase (100U/μl)	0.5 μl	2U/μl
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	2.5 μl	1x
dNTP Mixture(25 mM each)	1 μl	1 mM
100 mM Mg ²⁺	1.5 μl	6 mM
1 M GuHCl	1.25 μl	50 mM
10X Primers	2.5 μl	
模板 RNA	10 ng	
ddH ₂ O Up to	25 μl	

4. 扩增反应: 置于 65-70°C 反应 20~40min。

注意: 对于绝大多数的 LAMP 扩增来讲, 0.16-0.32U/μl 的 Bst3.2 浓度, 均可获得理想的扩增结果, 必要条件下进行其它调整。Max65 RTase 的使用浓度在 2~4U/μl 进行调整。以上反应条件仅供参考, 进一步的条件优化, 需根据实际实验数据进行调整。dNTP 推荐的使用浓度为 1 mM, 必要条件下可在 0.5~1.4 mM 间调整。在其它类型的实验中, Mg²⁺和 dNTP 等参数需要自行调整。