

描述: Bst 3.2 DNA Polymerase 经酶电子重构架和进化筛选 (*in silico* Design & *invitro* Evolution), 其为 Bst 3.0 的升级品, 用于 DNA 的 LAMP 扩增。

性能提升包括: (1) Bst 3.2 包含热启动 Aptamer, 该配体确保酶在<30°C 时, 酶活封闭效率>90%, 在>60°C 时 1min 内完全释放酶活。该特性利于室温建立反应体系, 并大幅降低了低温条件下的非特异扩增; (2) 反应温度提升到 70°C, 大幅降低引物 Dimer 的形成, 提高扩增特异性, 并使得粗样品核酸释放更加充分; (3) 包含 Helicaser, 因此, 允许在不使用 F3/B3 引物的情况下进行 eLAMP 扩增 (easy LAMP), 并允许 FIP/BIP 的引物用量降低一倍。这将进一步降低非特异扩增, 并使得扩增均一性大幅提升。

名 称	1600 U	16 KU
HS Bst3.2 Pol-GFree(16U/μl)	100μl	1 ml
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	1.5 ml	15 ml
100mM Mg ²⁺	1ml	10 ml
10xGuHCl	1.5ml	15 ml

注意: HotStart Bst3.2 (16U/μl) 与 10×IsoAmp Buffer2 均不含甘油, 可用于冻干体系。10xGuHCl 为 500 mM, 1x 下 50 mM 的 GuHCl 能显著加速 LAMP 扩增约 3~4min, 必要时还可以作为样本的裂解液。

单位定义: 一个活力单位即在 65°C 条件下, 30 分钟内催化 10nmol dNTP 的掺入反应成为酸不溶性物质所需的酶量。

储存: 长期保存请置于-20°C 以下 (2 年有效); 制品反复冻融 10 次不影响性能, 但应避免反复冻融; 制品一经融化推荐置于 2-8°C 保存, 在此条件下制品稳定储存 1 个月。

其它说明:

- (1) Bst 4.2 & 3.2 Polymerase 在用于 LAMP 扩增时的推荐反应温度为 70°C。由于 Helicaser 的反应温度为 70°C, 因此该酶在 65°C 扩增时, 性能会大幅下降。
- (2) 制品中包含高浓度的盐组分, 使用时做好个人防护, 防止制品与皮肤、眼、鼻、呼吸道等接触和吸入, 一旦接触或吸入, 请用大量的清水冲洗。
- (3) 防止气溶胶污染, 尽可能进行分区操作。

典型的 LAMP 反应

1. 10xLAMP Primer Mix 的配制

	标准 LAMP	eLAMP
FIP/BIP	16 μM each	8~16 μM each
LF/LB	4~8 μM each	4~8 μM each
F3/B3	2 μM each	非必须

注意: eLAMP (easy LAMP) 为去除 F3/B3 引物的方法, 为 Bst4.2-3.2 系列专用的使用策略, 对于大多数引物组, 在 Helicaser 的加持下, 扩增速度几乎不受影响。

2. 配制 LAMP 反应体系

HS Bst 3.2 Pol-GFee (16U/μl)	0.25~0.5 μl
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	2.5 μl
10xGuHCl	2.5 μl
dNTP Mixture(10mM each)	2.5 μl
100 mM Mg ²⁺	1.5 μl
*10X Primers	2.5 μl
模板 DNA	10 ng
ddH ₂ O Up to	25 μl

注意: 关于 Bst 酶的用量, 对于绝大多数的 LAMP 扩增来讲, 0.16-0.32U/μl 的浓度, 均可获得理想的扩增结果, 必要条件下进行其它调整。

3. 扩增反应: 置于 70°C 反应 20~40min。

使用注意事项:

- (1) 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。
- (2) dNTP 推荐的使用浓度为 1 mM, 必要条件下可在 0.5~1.25 mM 间调整。
- (3) 使用无模板 DNA 作为对照检测扩增的特异性。
- (4) GuHCl 具有强腐蚀性, 不建议冻干入球, 推荐采用 250 mM 或 500 mM 的 GuHCl 来裂解、变性样本后, 一起加入反应体积 (5μl 或 2.5μl)。