

描述: 该制品为 Bst4.2 LAMP 冻干瓶形式的预混试剂, 利于运输和存储。冻干品中包含反应 Buffer、dNTP、Mg²⁺、HotStart Bst 4.2 聚合酶、耐热逆转录酶 Max65 RTase、荧光染料(同 FAM 和 SYBR Green 荧光通道)、海藻糖、甘露醇等冻干赋形剂。通用于 DNA 或 RNA 的靶标检测。

Bst4.2 DNA 聚合酶经酶电子重构架和进化筛选 (in silico Design & invitro Evolution), 作为 Bst3.0 的升级产品, 该酶维持了 3.0 的快速扩增能力, 并将耐热温度提高了 5°C, 允许在 70°C 进行 LAMP 扩增。

性能特点: (1) Bst4.2 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) 使用该酶进行 LAMP 扩增, 允许不使用 F3/B3 引物, 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。

组分

名 称	2ml (100Tx20μl)	10ml (500Tx20μl)
Fluo Lyo-Bst4.2 LAMP Mix	1 瓶	1 瓶 x5
HGStoreBuffer5	1 ml	1 ml x5
1 M GuHCl	1.5 ml	1.5 ml

储存与运输:

- (1)核心扩增试剂为冻干品形态, 未开封状态下[-15°C以下(效期 36 个月)];
- (2)冻干品使用 HGStoreBuffer5 溶解后[-15°C以下(效期 6 个月)];
- (3) 冻干品使用 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) 用于冻干品的溶解液 (HGStoreBuffer5): 10mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 5% Glycerol, 0.1% Tween20。除此外, 也可使用 5%甘油或 ddH₂O 溶解酶制品。
- (2) Fluo Lyo-Bst4.2 LAMP Mix 的溶解: 每瓶冻干品试剂, 为 2ml 的总反应体积, 满足 100 次 20μl 的 LAMP 扩增反应。每瓶试剂用 900 μl 的 HGStoreBuffer5 溶解, 总体积为 1000μl (冻干品溶解后, 实际体积约 100 μl)。此时, 试剂为 2xBst4.2 LAMP Mix。
- (3) 关于 RT-LAMP, 该制品中包含了耐热逆转录酶 Max65 RTase, 可直接用于 RNA 的 RT-LAMP 反应。
- (4) 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应。

(5) Bst4.2 DNA 聚合酶在用于 LAMP 扩增时的推荐反应温度为 70°C。该酶在 65°C 扩增时, 性能会大幅下降。

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 系列专用的使用策略, 对于大多数引物组, 扩增速度变化不明显。

2. 配制 LAMP 反应体系

2xBst4.2 Mix	10 μl
1 M GuHCl	1 μl
10X Primers	2 μl
模板 DNA/RNA	10 ng
ddH ₂ O Up to	20 μl

3. 扩增反应: 置于 70°C 反应, 20~40min, 30s 收集一次信号 (Ex/Em=480/520)。