

描述: 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。

用于 RT-LAMP 实验, 尽管 Bst4.2 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。

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	800U	4000U
Lyo-HS Bst4.2 Polymerase	1 bead	5 beads
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	1.5 ml	1.5 mlx2
100mM Mg ²⁺	1.5 ml	1.5 ml
1M GuHCl	1.5 ml	1.5 ml
HGStoreBuffer25	1 ml	1 ml

单位定义: 一个活力单位即在 70°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:

- 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。
- 溶解: 冻干酶以冻干球 (直径 4mm) 形态提供, 每个球包含 800U 的 Bst 4.2, 每个球用 95 μl 的 HGStoreBuffer25 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 Bst 4.2 为 8U/μl。
- 关于 RT-LAMP, 对于 RNA 样本推荐加入 Max65 RTase 逆转录酶, 以提高 RNA 检测速度, 1x 下的浓度

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 50 mM 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。

(6) 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

HS Bst4.2 (8U/μl)	1 μl	0.32U/μl
10×IsoAmp Buffer2(Mg ²⁺ free)	2.5 μl	1x
dNTP Mixture(25mM 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	10 ng	
ddH ₂ O Up to	25 μl	

3. 配制 RT-LAMP 反应体系

HS Bst4.2 (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(25mM 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 RNA	10 ng	
ddH ₂ O Up to	25 μl	

4. 扩增反应: 置于 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 Bst4.2 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。