

描述: Bst dU5.0 DNA 聚合酶融合了 Bst2.0(dUTP 渗入能力)、Bst3.0(快速扩增)、Bst4.2 (70°C 高温反应) 优势于一身。与其它高性能的 LAMP DNA 聚合酶相比, 该酶最大特点为可完全使用 dUTP(100%)来代替反应体系中的 dTTP。

用于 RT-LAMP 实验, 尽管 Bst dU5.0 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) Bst dU5.0 包含热启动 Aptamer, 其确保在 <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) 在 65-70°C 条件下, 均可有效进行 LAMP 扩增; (3) 相比于 Bst2.0 使用 dUTP 的使用比例仅 50% (这无法满足 LAMP 的防污染要求), Bst dU5.0 无需使用 dTTP, 可完全替换成 dUTP, 反应速度变化不明显。在配合热敏 UDG 的条件下, 可有效的防止气溶胶引起的污染。

组分

名 称	800U	4000U
Lyo-HS Bst dU5.0 Polymerase	1 bead	5 beads
10×IsoAmp Buffer3(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 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) 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 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 Bst dU5.0, 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 dU5.0 为 8U/μl。

(3) 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) Bst dU5.0 可以使用 dNTP 或 dU/VTP, 推荐的使用浓度为 1 mM each, 必要条件下可在 0.5~1.25 mM 间调整。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 在防污染的实验中, 热敏 UDG 使用浓度 1x 下 10mU/μl。体系配制完毕后, 室温放置 2~5min 消化 dU 污染物, 再上机检测。由于 UDG 在 65-70°C 条件下需要 2~3min 失活, 因此加入 UDG 后, 通常反应时间会推迟 2~3min。对于产物中 AT 含量较高的实验, 通常可有效消除 100cps/μl 的污染物, 而 GC 含量较高时消除能力可能会下降到 10cps/μl。

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

HS Bst dU5.0 (8U/μl)	1 μl	0.32U/μl
10×IsoAmp Buffer3(Mg ²⁺ free)	2.5 μl	1x
dU/VTP Mixture(25mM each)	1 μl	1 mM
100 mM 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 Bst dU5.0 (8U/μl)	1 μl	0.32U/μl
Max65 RTase (100U/μl)	0.5 μl	2U/μl
10×IsoAmp Buffer3(Mg ²⁺ free)	2.5 μl	1x
dU/VTP Mixture(25mM each)	1 μl	1 mM
100 mM 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 65~70°C 反应 20~40min (优选 70°C)。

注意: 对于绝大多数的 LAMP 扩增来讲, 0.16-0.32U/μl 的 Bst dU5.0 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。