

描述: 该制品 5x 浓度的全预混液, 不含甘油, 可用于研发冻干制品。预混液包含反应 Buffer、dU/VTp(不含 dTTP)、Mg²⁺、荧光染料、HotStart Bst dU5.0 聚合酶、海藻糖、甘露醇等稳定剂。通用 DNA 或 RNA 的靶标检测。Bst dU5.0 DNA 聚合酶是 HaiGene 于 2025 年底推出的创新酶。该酶融合了 Bst2.0(dUTP 渗入能力)、Bst3.0(快速扩增、抗杂质)、Bst4.2 (70°C 高温反应) 优势于一身, 与高性能的 Bst XT 等聚合酶相比, 该酶还可完全使用 dUTP(100%) 来代替反应体系中的 dTTP。100%dUTP 的使用能力, 对于 LAMP 的防污染至关重要。

制品性能: (1) 制品中的 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) dTTP 被完全替换成 dUTP, 速度几乎无下降。在配合热敏 UDG 的条件下, 可有效的防止气溶胶引起的污染。(4) 该制品不含甘油, 因此, 无论是科研或生产, 均可以依次试剂为基础进行冻干制品研发。便于研究、开发、生产于一体流程化操作。

组分

名 称	100Tx20μl	500Tx20μl
5xBst dU5.0 Fluo Mix	400 μl	400 μl x5
10xGuHCl	1.5 ml	1.5 ml

注意事项:

- (1) 长期保存请置于-20°C 以下 (24 个月有效); 通常在室温 28°C 条件下 3~5min 即可融化, 反复冻融 20 次不影响性能。
- (2) 1xBst dU5.0 Fluo Mix 含有 1%蔗糖, 1.5%甘露醇, 0.32U/μl 的 HotStart Bst dU5.0 聚合酶。该制品中不含热敏 UDG。10xGuHCl 为 500 mM 浓度。
- (3) 制品中含有荧光染料 (SYBR Green 荧光通道), 需避光保存。

典型的 LAMP 反应

1. 10xLAMP Primer Mix 的配制

	10xPrimer Mix	1x 下浓度
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

5xBst dU5.0 Fluo Mix	4 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 65~70°C 反应 (优选 70°C), 20~40min, 30s 收集一次信号。

特别说明:

(1) 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。通常情况下在 70°C 反应时, GuHCl 增强扩增效应显著。

(2) 在防污染的实验中, 建议的热敏 UDG 的使用浓度 1x 下为 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。由于 Oligo 区均为 dNTP 合成产物, 所以该区域的污染或 Dimer 产物均不能消除。无论如何, 存在污染物的情况下, 加入 UDG 后通常可延缓污染反应 8~12min, 这已经满足终点参数的判读设置。