

Bst DNA Polymerase Large Fragment

M102

产品简介

Bst DNA Polymerase Large Fragment 是 *Bacillus stearothermophilus* DNA 聚合酶的一部分，具有 5'→3' DNA 聚合酶活性，以及很强的链置换(strand displacement)活性，但缺失 5'→3' 核酸外切酶活性。Bst DNA Polymerase 可用于等温扩增反应，如 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), RCA (Rolling-circle amplification)等。

产品组成

组 分	M102 (1,000 U)	M102 (10,000 U)
10 × Bst Buffer	250 µl	2×1.25 ml
Bst DNA Polymerase Large Fragment (8 U/µl)	125 µl	1.25 ml

储存条件

-20°C保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

单位定义

65°C、30 分钟内使 10 nmol 的 dNTP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量，定义为 1 个活性单位 (U)。

反应条件

1 ×Bst Buffer 中，65°C反应。反应温度可在 60-70°C之间调整，但不要超过 70°C。80°C 20 分钟可失活。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 µg λ-Hind III 在 74°C下孵育 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 µl 反应体系，10 U 本品和 1 µg λDNA，37°C温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20U 本品和 1 µg Hela 细胞总 RNA 在 37°C下孵育 30min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：50 µl 体系中，以本品为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

实验流程

1. PCR 管中配制引物混合液 primer Mix

Primer FIP (100 μ M)	16 μ l
Primer BIP (100 μ M)	16 μ l
Primer F3 (100 μ M)	2 μ l
Primer B3 (100 μ M)	2 μ l
Primer LOOP F (100 μ M)	4 μ l
Primer LOOP R (100 μ M)	4 μ l
ddH ₂ O	Up to 100 μ l

2. 反应管中配置如下混合液

Bst DNA Polymerase Large Fragment (8 U/ μ l)	2 μ l
10 \times Bst Buffer	5 μ l
dNTP (10 mM)	7 μ l
MgSO ₄ (200 mM)	2 μ l
Primer Mix ^a	5 μ l
Template DNA ^b	X μ l
ddH ₂ O	Up to 50 μ l

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 一般来说该反应体系中各引物终浓度为 1.6 μ M FIP/BIP primers, 0.4 μ M LF/LB primers, 0.2 μ M F3/B3 primers。
- 该反应体系灵敏度极高, 建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中, 这样可以有效提高实验的重复性。如模板类型为未稀释 RNA 原液, 使用体积不应超过反应总体积的 1/10。

3. LAMP 反应: 60-65 $^{\circ}$ C, 20-30min

常见问题与解决方案

反应结束无扩增

反应时间不够: 一般设置 30 min 左右, 但需要注意的是扩增时间过长会增过多的背景信号, 降低反应可信度。

确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性, 以排除其降解的可能。

模板浓度太低: 减少稀释度重复实验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解: 重新制备模板, 重复实验。