

Instrukcja

BeST™ LAMP Kit SYBR®

Zestaw do izotermicznej amplifikacji DNA prowadzonej w stałej temperaturze. Zawiera barwnik SYBR® Green.

numer katalogowy	wielkość
1025-100G	100 reakcji w 25 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

SYBR® jest zarejestrowanym znakiem towarowym Molecular Probes, Inc.

Spis treści

Opis	3
Skład	3
Uwagi	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Zalety techniki LAMP	3
Konfiguracja reakcji	4
Mieszanina starterów LAMP	4
Matryca DNA	4
Nastawienie reakcji LAMP	5
Reakcja docelowa	5
Reakcja kontrolna (matryca DNA faga λ)	5
Profil temperaturowo-czasowy	6
Analiza reakcji LAMP	7

Opis

Technika LAMP (Loop Mediated Isothermal **AM**plification) jest techniką izotermicznej amplifikacji DNA.

W przeciwieństwie do techniki PCR składającej się z wielokrotnie powtarzanego cyklu trzech etapów, które zachodzą w różnych temperaturach, reakcję LAMP prowadzi się w stałej temperaturze.

Skład

	1025-100G	przechowywanie
Green BeST™ reaction mix	1 x 1,4 ml	-20 °C
polimeraza BeST™	1 x 120 µl	-20 °C
kontrola pozytywna		
matryca DNA faga λ mieszanina starterów λ	1 x 70 µl	-20 °C
woda ultraczysta	1 x 1,5 ml	-20 °C

Uwagi

- Reakcja LAMP powinna być przygotowywana na lodzie, a próbówki z mieszaniną reakcyjną należy wkładać bezpośrednio do nagrzanego do temp. 65 °C termocyklera.
- Firma A&A Biotechnology nieodpłatnie służy pomocą w zaprojektowaniu starterów do reakcji LAMP oraz pomocą merytoryczną.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Matryca starterów LAMP
- Woda ultraczysta do przygotowania mieszaniny starterów LAMP i zawieszenia matrycy DNA (nr kat. 005-515, 005-1015, 005-2515, 005-5)
- Bufor TE do zawieszenia matrycy DNA (nr kat. K-TE-5, K-TE-100)

Zalety techniki LAMP

1. Umożliwia wydajną i wysoce specyficzną amplifikację dzięki zastosowaniu trzech par starterów komplementarnych do odpowiednich miejsc targetowego DNA, a dodatkowo ze względu na specyficzną ilość starterów ilość amplifikowanego DNA podczas reakcji jest znacznie wyższa niż w przypadku reakcji PCR.
2. Pozwala na szybką amplifikację DNA, a tym samym na łatwą identyfikację patogenów ludzkich, zwierzęcych i roślinnych - **czas detekcji wynosi od 30 min do 1,5 godz. w zależności od jakości i stężenia matrycy.** W przypadku DNA faga lambda w zakresie stężenia pomiędzy 5-50 ng/µl czas amplifikacji fragmentu DNA wynosi poniżej 30 min.
3. Polimeraza DNA wykorzystywana w reakcji LAMP jest zmodyfikowaną wersją polimerazy *Bst* z *Bacillus stearothermophilus* i nie posiada aktywności 5'-3' egzonukleazy (polimeraza BeST™). Polimeraza BeST™ wykazuje wysoką aktywność rozplatania nici DNA (ang. strand displacement activity), co eliminuje konieczność denaturacji matrycy.
4. Powstałe produkty są różnej wielkości konkatamerami, złożonymi z wielokrotnych powtórzeń sekwencji matrycowej, które mogą być wykrywane z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym lub poprzez monitorowanie amplifikacji w czasie rzeczywistym za pomocą barwników fluorescencyjnych wiążących się do podwójnej nici DNA lub barwników wrażliwych na zmianę pH.

Konfiguracja reakcji

Przed rozpoczęciem LAMP należy przygotować:

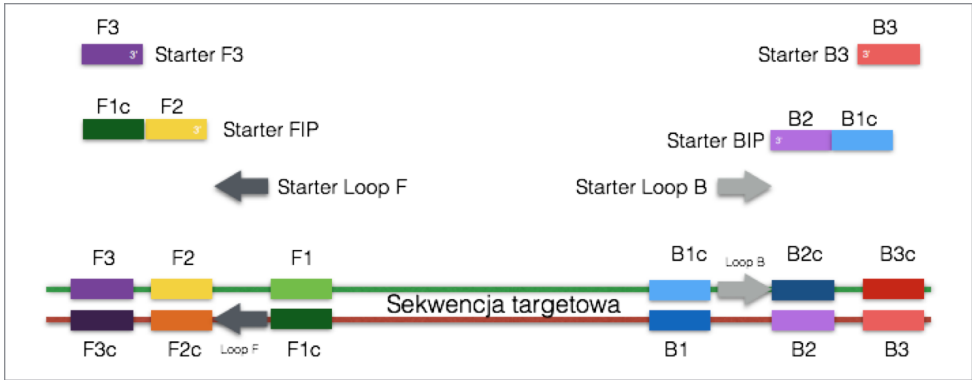
1. Mieszanina starterów LAMP

Sporządzić 10x stężoną mieszaninę starterów LAMP z 6 starterów o końcowych stężeniach:
16 µM FIP, 16 µM BIP, 2 µM F3, 2 µM B3, 4 µM LoopF, 4 µM LoopB - całość zawieszona w wodzie.

W ten sposób przygotowaną mieszaninę starterów LAMP można przechowywać w temp. -20 °C do następnego użycia. Startery odsolone przez precypitację wystarczają do przeprowadzenia reakcji LAMP.

Przykład mieszaniny starterów LAMP dla reakcji w objętości 150 µl:

starter [100 µM]	FIB	BIP	F3	B3	Loop F	Loop B	woda
ilość	24 µl	24 µl	3 µl	3 µl	6 µl	6 µl	84 µl



Rys. 1 Schemat układu starterów w systemie LAMP.

2. Matryca DNA

Matryca DNA powinna zostać zawieszona w wodzie lub w buforze TE, pH 8,0 (nie ma zestawie).

Nastawienie reakcji LAMP

Bardzo ważne!!!

Reakcja LAMP powinna być przygotowywana na lodzie, a próbówki z mieszaniną reakcyjną należy wkładać bezpośrednio do nagrzanego do temp. 65 °C termocyklera.

1. Reakcja docelowa

składnik	ilość
Green BeST™ reaction mix	12,5 µl
matryca [0,01-500 ng]	1 µl
mieszanina starterów LAMP	2,5 µl
polimeraza BeST™	1 µl
woda ultraczysta	dopełnić do końcowej objętości 25 µl

Całość worteksować, następnie zwirować.

2. Reakcja kontrolna (matryca DNA faga λ)

składnik	ilość
Green BeST™ reaction mix	12,5 µl
kontrola pozytywna	4 µl
polimeraza BeST™	1 µl
woda ultraczysta	dopełnić do końcowej objętości 25 µl

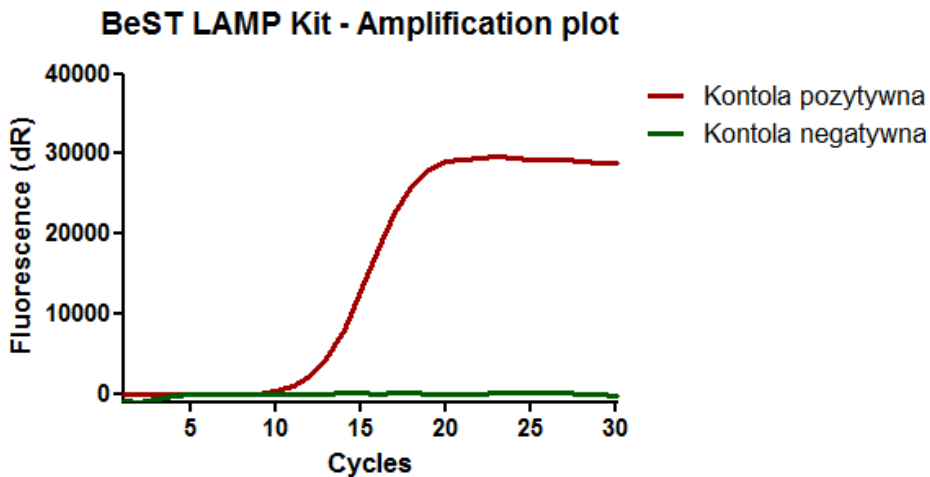
Całość worteksować, następnie zwirować.

3. Profil temperaturowo-czasowy

segment	temperatura	czas	ilość cykli
* reakcja LAMP - odczyt fluorescencji po każdej minucie (rys. 2)	65 °C	1 min	30
** przykładowy program dla krzywej topnienia (rys.3)	95 °C	1 min	
	gradient 60-95 °C		
	95 °C	30 s	

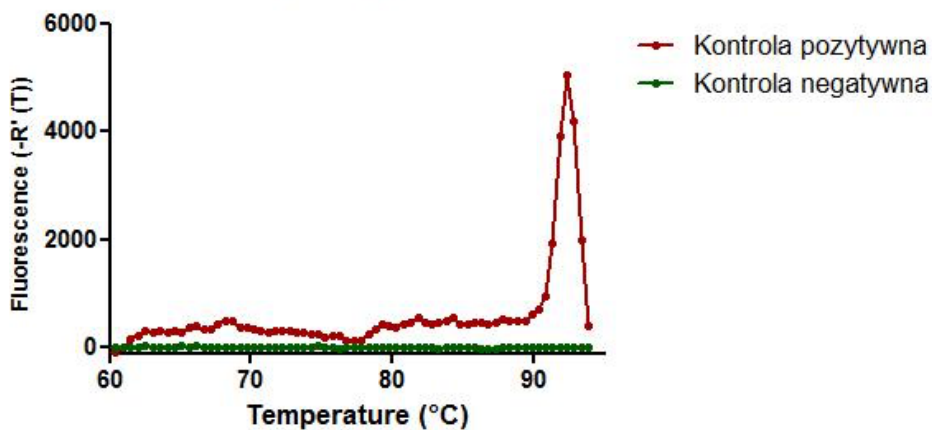
* W przypadku pierwszorazowego korzystania z zestawu zaleca się optymalizację reakcji poprzez przedłużenie pierwszego etapu do 60 cykli.

** Dodatkowo do reakcji można ustawić pomiar krzywej topnienia, aby upewnić się, czy nie występują niespecyficzne produkty reakcji LAMP. Analiza krzywej topnienia polega na stopniowym podnoszeniu temperatury mieszaniny, aż do momentu denaturacji DNA i pomiarze fluorescencji co 0,5 °C. W momencie osiągnięcia temperatury topnienia produktu następuje bardzo gwałtowna denaturacja i ostry spadek fluorescencji. Jeżeli obecny jest tylko jeden specyficzny produkt to występuje jeden pik, ponieważ każdy dwuniciowy odcinek DNA ma charakterystyczną dla siebie temp. topnienia (rys. 3).



Rys. 2 Krzywa amplifikacji reakcji LAMP.
kontrola pozytywna - reakcja LAMP na matrycy DNA faga λ
kontrola negatywna - reakcja LAMP bez matrycy DNA

Krzywa topnienia



Rys. 3 Krzywa topnienia reakcji LAMP.
kontrola pozytywna - reakcja LAMP na matrycy DNA faga λ
kontrola negatywna - reakcja LAMP bez matrycy DNA

Analiza reakcji LAMP

Analizę DNA po reakcji LAMP należy wykonać za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Zalecany rozdział elektroforetyczny na 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny do uzyskania rozdziału wskazanego na rys. 4.

K+ K-



Rys. 2 Żel po reakcji LAMP
K+ reakcja LAMP na matrycy DNA faga λ
K- reakcja LAMP bez matrycy DNA



A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2025-1

