

Instrukcja

BeST™ LAMP Kit

Zestaw do izotermicznej amplifikacji DNA prowadzonej w stałej temperaturze.

numer katalogowy	wielkość
1025-100	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

Spis treści

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

Opis

Technika LAMP (Loop Mediated Isothermal **AMPlification**) 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

	1025-100	przechowywanie
2x BeST™ reaction mix	1 x 1,40 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 lub barwników wrażliwych na zmianę pH.
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.

Konfiguracja reakcji

Przed rozpoczęciem LAMP należy przygotować:

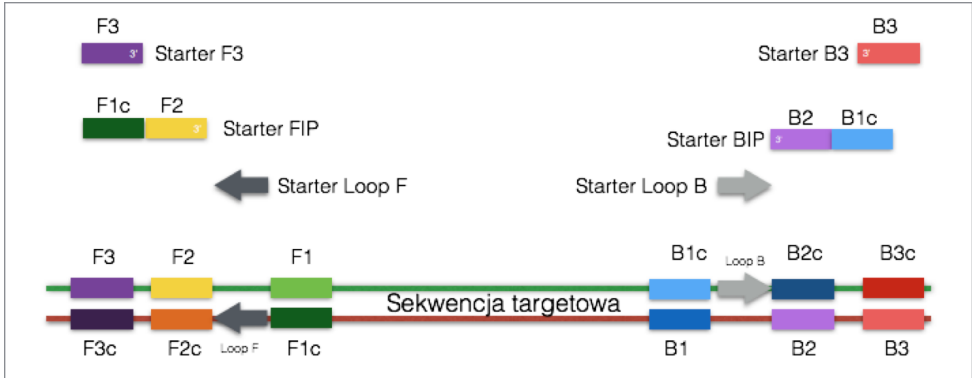
1. Mieszanina starterów LAMP

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.

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.



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

UWAGA: Startery odsolone przez precypitację wystarczają do przeprowadzenia reakcji 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
2x 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
2x 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

temperatura	czas
65 °C	30 min
10 °C	∞

W przypadku pierwszorazowego korzystania z zestawu zaleca się optymalizację reakcji poprzez analizę produktu po 30, 60 i 90 minutach reakcji LAMP.

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. 2 (str. 5).



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

