

Flo-LAMP UNG RT KIT

LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) jest metodą szybkiej amplifikacji kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie do techniki PCR, która prowadzona jest w cyklach zmiennych temperatur, reakcja LAMP odbywa się w stałej temperaturze 65°C. W technice LAMP RT wykorzystuje się odwrotną transkryptazę, która przepisuje nić RNA na cDNA oraz polimerazę Opti Bst, która amplifikuje powstały fragment. Dzięki zastosowaniu zestawu 3 par starterów, specyficznych do matrycowego DNA, reakcja jest wyjątkowo szybka i wydajna. W pierwszej fazie powstaje produkt podstawowy zakończony pętlami, następnie dzięki aktywności wymiany nici (ang. strand displacement) i przyłączania się kolejnych starterów powstają coraz dłuższe fragmenty DNA składające się z powtórzeń produktu podstawowego. Uzyskany produkt w rozdiale elektroforetycznym nie jest pojedynczym prążkiem, a stanowi mieszaninę różnej wielkości produktów o powtarzającej się sekwencji. Detekcja odbywa się poprzez fluorescencję, co pozwala na pomiar w czasie rzeczywistym. W trakcie reakcji tworzy się nierozpuszczalny osad pirofosforanu magnezu, który można zaobserwować w postaci zmętnienia. Flo-LAMP UNG RT KIT zawiera dodatkowy nukleotyd uracyl oraz termofilną Uracyl Glikozylazę (UNG). Enzym usuwa matrycę DNA z wbudowanym uracylem pochodzącą z zanieczyszczenia poprzednimi reakcjami.

Zawartość zestawu:

Składnik	Nr kat. E1426-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. 1426-02 500 reakcji po 25 µl
Flo-LAMP UNG RT Reaction Mix (2x) pomarańczowa nakrętka	1300 µl	5 x 1300 µl
Flo-LAMP UNG RT Enzyme Mix żółta nakrętka	110 µl	5 x 110 µl
Flo - fluorescence dye (FAM) brązowa probówka	110 µl	5 x 110 µl
Lambda Positive Control (10x) (mieszanina starterów i DNA Lambda) czarna nakrętka	70 µl	350 µl
RNase free Water przeźroczysta nakrętka	1200 µl	5 x 1200 µl

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze -20°C.

Protokół:

Projektowanie starterów:

Reakcja LAMP w dużej mierze zależy od sekwencji starterów, dlatego zaleca się przetestowanie kilku zestawów starterów dla optymalizacji procesu. Do projektowania starterów zalecamy użycie programu PrimerExplorer dostępnego online.

Rozcieńczenie starterów:

Sporządzić mieszaninę 10x Primer Mix z sześciu starterów rozcieńczonych wodą wolną od RNaz wg. poniższej tabelki. Przygotowany 10x Primer Mix można przechowywać w temp -20°C do następnego użycia.

Uwaga: Startery odsolone przez precypitację mają wystarczającą czystość do przeprowadzenia reakcji. Startery nie muszą być oczyszczane na HPLC.

Rozcieńczanie starterów powinno odbywać się w miejscu, w którym nie pracuje się z matrycą.

Startery	FIP 100 µM	BIP 100 µM	F3 100 µM	B3 100 µM	LF 100 µM	LB 100 µM	RNase free Water
10x Primer Mix Stężenie	16 µM	16 µM	2 µM	2 µM	4 µM	4 µM	
Objętość 1000 µl	160 µl	160 µl	20 µl	20 µl	40 µl	40 µl	560 µl

Rozcieńczenie matrycy:

Matryca RNA powinna być rozcieńczona w wodzie wolnej od RNaz lub buforze TE, poza pomieszczeniem do nastawiania czy detekcji reakcji. Typowe stężenie matrycy mieści się w przedziale 500–0,05 ng/reakcję.

Przygotowanie reakcji:

Reakcja LAMP powinna być nastawiana na lodzie lub w bloku chłodzącym, zgodnie z poniższą tabelką. Reakcję należy wymieszać poprzez pipetowanie, zwirować, a następnie umieścić w cyklerze uprzednio nagrzanym do **65°C**. Każdorazowo zaleca się nastawianie kontroli negatywnej (N).

Składnik reakcji Master Mix	Reakcja właściwa C	Kontrola negatywna N	Kontrola pozytywna P Lambda DNA
Flo-LAMP UNG RT Reaction Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
10x Primer Mix	2,5 µl	2,5 µl	-
Flo-LAMP UNG RT Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Flo - fluorescence dye (FAM)	1 µl	1 µl	1 µl
Lambda Positive Control (10x)	-	-	2,5 µl
Matryca	x µl	-	-
RNase free Water	8 µl – x µl	8 µl	8 µl
Objętość Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl

Przy detekcji z barwnikiem fluorescencyjnym zalecane jest ustawienie 40 cykli jednoczynowych z pomiarem w kanale 1 (FAM) lub (SYBR) według poniższej tabelki. Jeżeli w badanej próbce ilość kopi matrycy jest mniejsza niż 200 zaleca się wydłużenie czasu reakcji do 50 minut.

Schemat reakcji	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Flo-LAMP UNG RT reaction mix	65-68°C	1 min**	30-50*
	85°C	5 min	1

* ilość cykli zależy od optymalizacji reakcji oraz ilości kopi matrycy badanej próbce

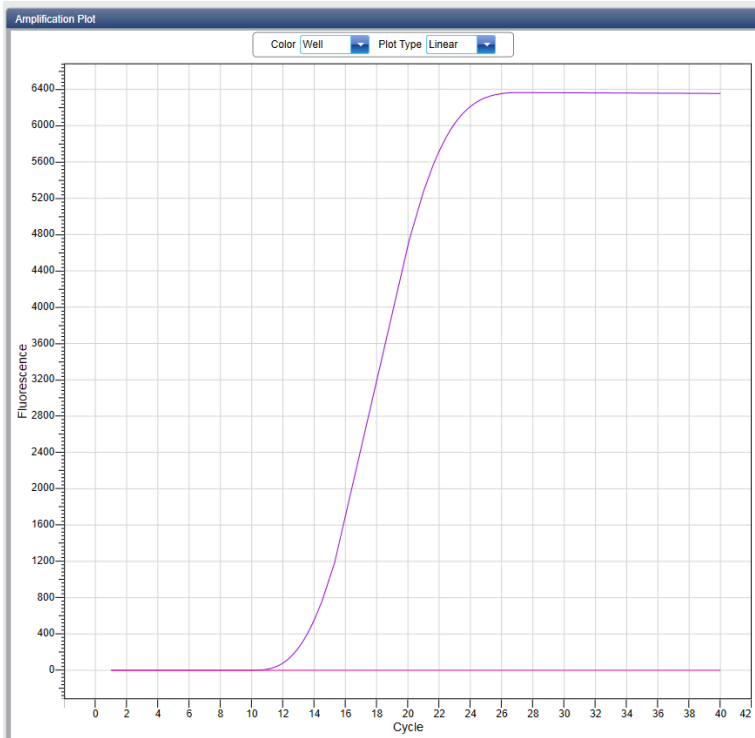
** odczyt fluorescencji po każdej minucie

Informacje dodatkowe:

W przypadku wystąpienia amplifikacji w kontrolach bez matrycy, należy podjąć odpowiednie kroki:

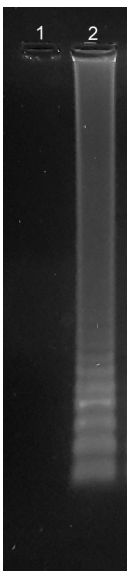
- Zaleca się zastąpienie używanych odczynników i enzymów na nowe.
- W miarę możliwości rozdzielić proces nastawiania reakcji od detekcji.
- Unikanie otwierania reakcji po amplifikacji.
- W celu rozróżnienia czy amplifikowany fragment jest wynikiem reakcji z matrycą, zaleca się wykonanie krzywej topnienia. W przypadku amplifikacji bez matrycy krzywa topnienia będzie różna od krzywej kontroli pozytywnej.

Analiza wyników:



Pomiar w czasie rzeczywistym przy użyciu barwnika fluorescencyjnego.

Cykl 1 min, łącznie 40 cykli, kanał FAM, fioletowy—kontrola pozytywna (P), różowy—kontrola negatywna (N)



Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym.

1% agarosa w 1xTBE , 1—kontrola negatywna (N); 2—kontrola pozytywna (P)

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23