



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

БиоМастер RT-LAMP SYBR (2*)

Кат. номер RM07-80, RM07-400

Описание

Набор предназначен для проведения обратной транскрипции (RT) и петлевой изотермической амплификации (LAMP) в одной пробирке, в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I. Набор БиоМастер RT-LAMP SYBR (2*) содержит 2× буфер для RT-LAMP с SYBR, 25× БиоМастер RT-LAMP-микс и Воду, обработанную ДЭПК. В состав 2× буфер для RT-LAMP с SYBR входят все необходимые компоненты реакции (исключая ферменты, ДНК-матрицу и праймеры): буферный компонент; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов; ионы Mg^{2+} (6 мМ); интеркалирующий краситель SYBR Green I; инертный краситель.

В состав набора 25× БиоМастер RT-LAMP-микс входит ревертаза RNAscribe RT и LF *Bst* ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

RNAscribe RT – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность и проявляет оптимальную активность при 55 °С (активна до 65 °С). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 9 т.о. и включать модифицированные основания. Его быстрая скорость реакции позволяет выполнять синтез всего за 15 минут, а высокая рабочая температура фермента (до 65 °С) обеспечивает высокий выход и специфичность реакции.

LF *Bst* ДНК-полимеразы представляет собой большой фрагмент *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) полимеразы (полипептид 67 кДа), выделенный из штамма *E.coli*, несущего модифицированный клонированный ген. Фермент обладает 5'→3' - полимеразной активностью, но не обладает 5'→3' и 3'→5'-экзонуклеазной активностью, что позволяет использовать его для проведения изотермальной амплификации, в том числе петлевой изотермальной амплификации (LAMP – Loop-Mediated Isothermal Amplification). LF *Bst* ДНК-полимеразы обладает высокой ДНК-цепь вытесняющей активностью и может применяться для изотермической амплификации ДНК. Наибольшую активность фермент проявляет в температурном диапазоне 60–65 °С.

2× буфер для RT-LAMP с SYBR оптимизирован для эффективного протекания как RT, так и LAMP в режиме реального времени. Добавки и усилители, входящие в него, позволяют проводить эффективную RT-LAMP со сложных и GC-богатых

матриц. Инертный краситель в составе 2× буфера для RT-LAMP с SYBR окрашивает его в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

Представленная форма набора для проведения RT-LAMP экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования. Инертный краситель в составе БиоМастер RT-LAMP SYBR (2×) окрашивает её в голубой цвет и упрощает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для RT-LAMP с SYBR	25× БиоМастер RT-LAMP-микс	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
RM07-80	2 × 0,5 мл	1 × 80 мкл	2 × 0,5 мл	80
RM07-400	4 × 1,25 мл	1 × 400 мкл	3 × 1,8 мл	400

Состав БиоМастер RT-LAMP SYBR (2×)

100 мМ Трис-НСl, рН 8,9, 20 мМ КСl, 2 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 12 мМ MgCl₂, 0,06 ед. акт./мкл Bst LF ДНК-полимеразы, 0,5% Tween 20, стабилизаторы Bst LF ДНК-полимеразы, SYBR Green I, инертный краситель.

Состав БиоМастер RT-LAMP-микс

50 мМ Трис-НСl, рН 8,0 (при 25 °С), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0,1 % (v/v) NP-40, ингибитор РНКаз, ревертаза RNAscribe RT и LF Bst ДНК-полимераза.

Область применения

- одношаговая обратная транскрипция (RT) и петлевая изотермическая амплификация (LAMP) в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I;
- петлевая изотермическая амплификация в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I;
- петлевая изотермическая амплификация с детекцией по конечной точке.

SYBR Green I

SYBR Green I - флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции ПЦП-продуктов в ходе ПЦП в режиме реального времени. В ходе амплификации краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦП-продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал. Максимумы поглощения и испускания SYBR Green I 494 нм и 521 нм, соответственно, что позволяет использовать его со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦП в режиме реального времени.

Инертный краситель

Инертный краситель в составе БиоМастер RT-LAMP SYBR (2×) не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубой краски соответствует 615 нм.

Преимущества использования

- высокая чувствительность (10пг – 1 мкг РНК);
- смесь окрашена для облегчения раскапывания;
- сокращается время на подготовку реакции;
- снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов реакции;
- стандартизируются условия постановки однотипных реакций.

Протокол проведения амплификации

1. Разморозить необходимые реактивы и тщательно перемешать. Рекомендуем использовать лёд или охлажденный термостатив для постановки реакции.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
2× буфера для RT-LAMP с SYBR	12,5	1×
25× БиоМастер RT-LAMP-микс	1	1×
Смесь праймеров	переменный	1– 2 мкМ
РНК-матрица	переменный	100 пг – 1 мкг
Вода, обработанная ДЭПК	до 25 мкл	

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.
4. Реакцию проводить при температуре 65 °С. Для мониторинга в режиме реального времени можно использовать соответствующий амплификатор с программой: 65 °С – 50 сек и снятием сигнала при каждом цикле, длительностью 30–40 циклов.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 недели; при -20 °С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.