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

ФармМастер LAMP SYBR (2×)

Кат. номер FMH050-400, FMH050-2040

Описание:

Набор **ФармМастер LAMP SYBR (2×)** разработан для проведения сублимационной сушки (лиофилизации) без дополнительной модификации и предназначен для проведения петлевой изотермической амплификации (LAMP) в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I. В реакционную смесь перед лиофилизацией могут быть добавлены праймеры и зонды для снижения количества шагов пробоподготовки при проведении ПЦР.

Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения и изменить их условия. Хранение ФармМастер LAMP SYBR (2×) после лиофилизации в течение трех месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°C не снижает эффективность ПЦР.

В состав ***ФармМастер LAMP SYBR*** входят все необходимые компоненты реакции (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивный рекомбинантный *большой фрагмент (LF) Bst* ДНК-полимеразы
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов
- буфер
- Mg^{2+} (6 мМ)
- SYBR Green I
- инертный краситель
- криопротекторы
- стабилизаторы.

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой LAMP с в режиме реального времени с образцами геномной, плазмидной и вирусной ДНК. В состав смеси входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность *Bst LF* ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время реакции.

Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования. Инертный краситель в составе Фарм***Мастер LAMP SYBR*** окрашивает её в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

Состав набора:

Каталожный номер	ФармМастер LAMP SYBR (2×)	10× ПЦР-вода	Кол-во реакций по 25 мкл
FMH050-400	4 × 1.25 мл	1 × 1.25 мл	400
FMH050-2040	17 × 1.5 мл	3 × 1.8 мл	2040

Состав ФармМастер LAMP SYBR (2×):

2 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 16 мМ $MgSO_4$, 0.06 ед. акт./мкл *Bst LF* ДНК-полимеразы, 0,5% Tween 20, стабилизаторы *Bst LF* ДНК-полимеразы, SYBR Green I, инертный краситель, криопротекторы.

Состав 10× ПЦР-вода:

120 mM Трис-HCl, pH 8.9, стабилизаторы и консерваны.

Область применения:

- петлевая изотермическая амплификация в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I
- петлевая изотермическая амплификация с детекцией по конечной точке

Свойства полимеразы

LF *Bst* ДНК-полимеразы представляет собой большой фрагмент *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) полимеразы (полипептид 67 кДа), выделеный 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.

SYBR Green I

SYBR Green I - флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени. SYBR В ходе амплификации краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР-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 ПЦР в режиме реального времени.

Инертный краситель

Инертный краситель в составе ***БиоМастер LAMP SYBR*** не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубой краски соответствует 615 нм.

Свойства реакционной смеси

- Может быть лиофилизирована;
- Реакционная смесь оптимизирована для специфичной работы *Bst LF* ДНК-полимеразы;
- Реакционная смесь представлена в лиофилизированной форме и не требует особых температурных условий хранения;
- Не теряет активности при разморозке/заморозке до 30 раз.

Преимущества использования

- Смесь окрашена для облегчения раскапывания;
- Сокращается время на подготовку реакции;
- Снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов ПЦР;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).

Протокол проведения сублимационной сушки (лиофилизации)

Для лиофилизации ФармМастер LAMP SYBR (2×) рекомендуется использовать лиофильные сушилки (сублиматоры) с греющимися полками. Лиофилизацию можно проводить как исходной 2× смеси (по 12,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), так и разведенной до 25% (по 15,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), например, после добавления праймеров. Рекомендуемая программа сублимационной сушки

Шаг программы	Температура полки, °C	Время инкубации, мин	Давление в камере, Па
1	-40	180	100000
2	-40	120	10-15
3	-20	120	10-15
4	-10	120	10-15
5	0	90	10-15
6	10	90	10-15
7	20	180	10-15

После лиофилизации **смесь** может быть легко восстановлена добавлением входящей в состав набора 10× ПЦР-воды и стерильной воды без нуклеаз (Кат. № SP010-05). При ресуспендировании можно менять кратность получаемой смеси объемом добавляемой воды. Лиофилизированную реакционную смесь и 10× ПЦР-воду рекомендовано хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25 °C – до 3 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C - 24 месяца. Условия хранения лиофилизированной реакционной смеси с добавлением праймеров и зондов могут отличаться и требуют подтверждения.

Протокол выполнения амплификации

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте http://biolabmix.ru/catalog

Для проведения реакции ПЦР-РВ с использованием 2× реакционной смеси **ФармМастер** LAMP SYBR (2×) рекомендуем использовать следующий протокол:

1. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
ФармМастер LAMP SYBR (2×)	12,5	1×
10× ПЦР-вода	2,5	
Смесь праймеров	переменный	1– 2 мкМ
ДНК-матрица	переменный	100 пг – 1 мкг
Стерильная вода	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 30 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

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