

Link do produktu: <http://www.novazym.sklep.pl/listeria-monocytogenes-200-p-3971.html>



Listeria monocytogenes 200

Numer katalogowy

AML-Lm-200

Opis produktu

Ampli-LAMP Listeria monocytogenes KIT

Zestaw odczynników do identyfikacji materiału genetycznego bakterii z rodzaju *Listeria monocytogenes* techniką izotermalnej amplifikacji DNA (LAMP).

Przeznaczenie testu:

Pałeczki *Listeria monocytogenes* należą do Gram-dodatnich bakterii wywołujących liczne zakażenia u ludzi oraz zwierząt. Patogeny te są rozpowszechnione w środowisku i bardzo często są przenoszone przez żywność, powodując zatrucia pokarmowe. Bakterie *Listeria monocytogenes* są w stanie rozwijać się w warunkach tlenowych lub beztlenowych. Namnażają się one w temperaturze od 0.4° do 50° C, zasiedlając środowisko o bardzo różnym zakresie pH (4.4-9.4). Niezmiernie problematyczne jest także to, że pałeczki *Listeria monocytogenes* są odporne na małe dawki konserwantów i środków myjących oraz niewystarczający okres pasteryzacji i mrożenia. Dawka zakaźna niezbadana do wywołania objawów chorobowych u ludzi i zwierząt, w zależności od szczepu *Listeria monocytogenes* waha się od 10²-10³ komórek bakteryjnych. Dotychczasowe metody wykrywania tych Gram-dodatnich pałeczek są pracochodne. Nasz test pozwala na skrócenie czasu rozpoznania patogennych bakterii z rodzaju *Listeria monocytogenes*. Opiera się on na jakościowej detekcji DNA tych pałeczek.

W zależności od wielkości, zestaw pozwala na przeprowadzenie 200 i 400 testów.

Zestaw zawiera:

- Isothermal Master Mix fluorescent dye, (bufor reakcyjny, MgCl₂, dNTPs, pirofosfataza, polimeraza GspSSD, barwnik fluorescencyjny 6-FAM)
- primers mix (F3, B3, FIP, BIP, LF, LB każdy w stężeniu [10 μM])
- kontrola pozytywna DNA
- sterylizowana woda do reakcji.

Zasada działania testu:

Test oparty jest na technice LAMP (ang. Loop-mediated Isothermal Amplification) i zapewnia bardzo szybkość oraz wysoce specyficzną identyfikację materiału genetycznego bakterii *Listeria monocytogenes*. Zoptymalizowane mieszaniny i specjalnie zaprojektowane startery umożliwiają specyficzną amplifikację genu kodującego listeriolizynę. Czas potrzebny na przeprowadzenie reakcji to ok. 30 minut w przypadku wykorzystania standardowego termocyklera oraz 10-20 minut w przypadku termocyklera do Real-time PCR lub platformy Genie II. Test oparty o metodę amplifikacji LAMP jest co najmniej dwukrotnie szybszy od testu opartego o standardową amplifikację PCR.

W zależności od urządzenia wykorzystanego do przeprowadzenia testu, różni się sposób analizy wyników testu:

PLATFORMA	SPOSÓB ANALIZY WYNIKÓW
Woda	Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym
Blok grzewczy	Obserwacja fluorescencji w próbce w świetle UV Analiza turbidymetryczna i obserwacja zmętnienia roztworu w próbce po reakcji LAMP
Termocykler do PCR	Analiza przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, na podstawie pomiaru fluorescencji (odczyt przez kanał FAM)
Termocykler do Real-time PCR	Analiza profilu topnienia produktu po reakcji LAMP
Platforma Genie II do LAMP	

Produkt reakcji wybarwiony bromkiem etydy w żelu agarozowym ma postać tzw. drabinki (ang. ladder-pattern structure), ponieważ w wyniku reakcji LAMP powstają różnej długości konkatamery złożone z powtórzonych sekwencji matrycowej. Wynik pozytywny reakcji można również zaobserwować w postaci silnej fluorescencji produktów reakcji w świetle UV lub w postaci zmętnienia roztworu w próbce po reakcji (analiza turbidymetryczna).

Wynik pozytywny reakcji przeprowadzonej w termocyklerze do Real-time PCR oraz na platformie Genie II umożliwia analizę przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (proporcjonalnie do wzrostu emisji fluorescencji, odczytywanej przez kanał FAM).

Możliwa jest również analiza specyficzności reakcji na podstawie profilu topnienia produktów amplifikacji (ang. melt curve analysis). W analizie Melt Peak widoczny jest jeden specyficzny produkt reakcji, który topnieje w zakresie temp. 86 – 87°C.

UWAGA: Zaleca się prowadzenie analizy wyników testu w układowie zamkniętym (wizualizacja w świetle UV lub na podstawie analizy profilu topnienia produktów reakcji).

Zawartość zestawu Ampli-LAMP *Listeria monocytogenes*

Lp.	Element zestawu	AML-SLM-200	AML-SLM-400
[1]	Isothermal Master Mix	2 szt.	4 szt.
[2]	Ampli-LAMP <i>Listeria monocytogenes</i> Primers Mix	1 szt.	2 szt.
[3]	Ampli-LAMP <i>Listeria monocytogenes</i> Positive Control	1 szt.	1 szt.
[4]	MiliQ Water	1 szt.	1 szt.

Warunki przechowywania

- przechowywanie długoterminowe: -20°C
- przy czystym, rutynowym użyciu: +4°C
- chronić przed światłem
- uniknąć cząsteczek zanieczyszczenia i rozmrażania.

Zalecana procedura przed analizą LAMP

Zalecamy przeprowadzenie 10-12 h hodowli wstępnej na pożywce Half Frazer broth, co znacznie podwyższa czułość analitycznej metody. Po namnażeniu wstępnym konieczne jest prowadzenie ekstrakcji DNA.

PRZEPROWADZENIE TESTU AMPLI-LAMP *Listeria monocytogenes*

Warunki reakcji:

STANDARD PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Amplifikacja	65°C	30 min	1
Chłodzenie	4°C	1 min	

REAL-TIME PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Amplifikacja	65°C	30 sek	70
Pomiar fluorescencyjny ilości produktu amplifikacji po każdym cyklu reakcji, w czasie rzeczywistym			
Topnienie produktu	65 – 98°C	0,5°C / 5 sek	
Pomiar fluorescencji po każdorazowej zmianie temp. o 0,5°C			

Chłodzenie	4°C	30 sek	
------------	-----	--------	--

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

Lp.	Element zestawu	Objętość na 1 reakcję
[1]	Isothermal Master Mix	7,5 µl
[2]	Ampli-LAMP Listeria monocytogenes Primers Mix: Primer F3/B3 [10 µM] 0,5 µl Primer FIP/BIP [10 µM] 2 µl Primer LF/LB [10 µM] 1 µl	3,5 µl
[3]	Ampli-LAMP Listeria monocytogenes Positive Control lub inna matryca DNA	1 µl
[4]	Ampli-LAMP Listeria monocytogenes MiliQ Water	1 µl
	Razem	13 µl

Obligatoryjne kontrole testu Ampli-LAMP Listeria monocytogenes

Dla prawidłowej interpretacji wyników testu należy obok próbek badanych zastosować trzy kontrole reakcji:

- kontrola pozytywna reakcji (Positive Control), która pozwala ocenić poprawność przebiegu amplifikacji docelowego produktu – matryca stanowi próbka zawierająca amplifikowaną sekwencję DNA [3].
- kontrola negatywna reakcji, która pozwala ocenić poprawność przebiegu amplifikacji – matryca stanowi izolat DNA ze zdrowej tkanki zwierzęcej.
- kontrola negatywna reakcji bez matrycy DNA, która pozwala ocenić czystość odczynników używanych do reakcji amplifikacji LAMP – zamiast matrycy, woda MiliQ [4].

Fakultatywnie kontrole testu Ampli-LAMP Listeria monocytogenes

Okresowo zaleca się przeprowadzić:

- kontrola negatywna izolacji DNA – pozwala ocenić czystość odczynników do izolacji. Należy wykonać jedną taką kontrolę w każdej serii izolacji lub okresowo w krótkich odstępach czasu, izolując z wody (zamiast z zainfekowanej tkanki).
- kontrola pozytywna izolacji – pozwala potwierdzić skuteczność procesu izolacji. Należy stosować okresowo np. dla nowej partii odczynników do izolacji DNA (do izolacji należy podać tkankę naturalnie lub sztucznie zainfekowaną bakterią).

Nr kat. produktów:

-AML-Lm-200 (200 reakcji)

-AML-LM-400 (400 reakcji)