



Blue-LAMP 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 cDNA, 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 rozdziale elektroforetycznym nie jest pojedynczym prążkiem a stanowi mieszaninę różnej wielkości produktów o powtarzającej się sekwencji. Detekcja odbywa się kolorymetrycznie poprzez zmianę koloru reakcji. W wyniku amplifikacji DNA roztwór reakcyjny zmienia barwę z bezbarwnego (brak amplifikacji) na niebieską (amplifikacja DNA). Powstające bardzo duże ilości produktu, prowadzą do zmętnienia próbki.

Zawartość zestawu:

Składnik	Nr kat. E1415-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E1415-02 500 reakcji po 25 µl
Blue-LAMP RT Reaction Mix (2x) brązowa probówka (Chronić przed UV)	1300 µl	5 x 1300 µl
Blue-LAMP RT Enzyme Mix żółta nakrętka	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 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	16 µM	16 µM	2 µM	2 µM	4 µM	4 µM	
Stężenie							
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, poza pomieszczeniem do nastawiania czy detekcji reakcji. Typowe stężenie matrycy mieści się w przedziale 500 -0,05 ng/reakcję.

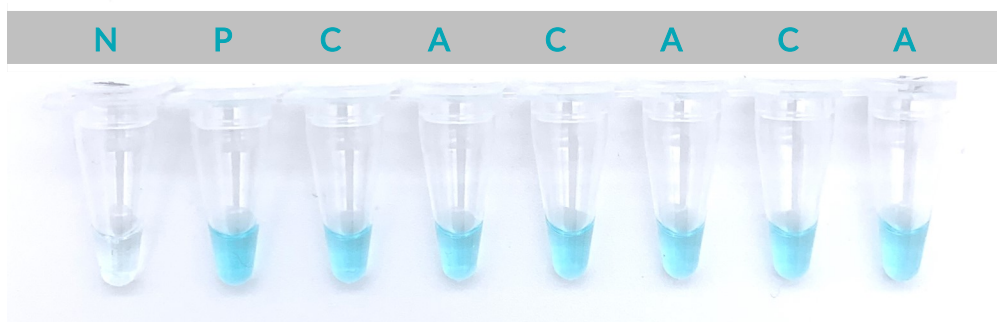
Przygotowanie reakcji:

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 bloku grzejmym nagrzanym do **65°C**. Czas trwania reakcji wynosi 30-40 minut. Blue-LAMP RT jest reakcją kolorymetryczną polegającą na zmianie koloru z bezbarwnego (brak amplifikacji DNA) na niebieski (amplifikacja DNA), dlatego każdorazowo zaleca się nastawianie kontroli negatywnej (N). Jeżeli w badanej próbce ilość kopi matrycy jest mniejsza niż 200 zaleca się wydłużenie czasu reakcji do 50 minut.

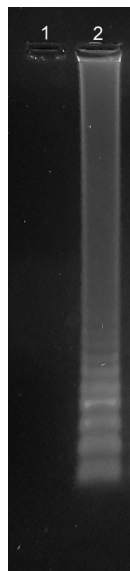
Składnik reakcji Master Mix	Reakcja właściwa C	Kontrola negatywna N	Kontrola pozytywna P Lambda DNA
Blue-LAMP RT Reaction Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
10x Primer Mix	2,5 µl	2,5 µl	-
Blue-LAMP RT Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Lambda Positive Control (10x)	-	-	2,5 µl
Matryca	x µl	-	-
RNase free Water	9 µl-x µl	9 µl	9 µl
Objętość Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl

Analiza wyników:

Detekcja następuje poprzez zmianę barwy reakcji z bezbarwnej (brak amplifikacji DNA—reakcja negatywna) na niebieską (amplifikacja DNA—reakcja pozytywna). Aby odczytać właściwe zabarwienie należy schłodzić próbki do temperatury pokojowej i odczekać 15 min. Odcienie błękitu mogą się różnić w zależności od ilości materiału początkowego, od bardzo jasnego do bardzo ciemnego niebieskiego. W wyniku reakcji amplifikacji DNA powstaje zmętnienie, jest to efekt niezależny od zmiany koloru i występuje we wszystkich próbkach pozytywnych (niebieskich). Kontrola negatywna nie ma efektu zmętnienia i pozostaje bezbarwna. Wyniki można odczytywać przez 24 godziny od zakończenia reakcji. W miarę upływu czasu kolor uzyskuje większą intensywność. Ze względu na wrażliwość barwnika zawartego w buforze reakcyjnym należy unikać bezpośredniej ekspozycji reakcji na światło UV.



Opis: N—kontrola negatywna; P—kontrola pozytywna; A oraz C badane próbki (pozytywne)



Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym.

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

Ze względu na znaczne ilości DNA powstającego w wyniku reakcji LAMP nie zaleca się otwierania próbek po reakcji celem detekcji (np. rozdział elektroforetyczny). Istnieje wysokie ryzyko kontaminacji kolejnych reakcji, co może prowadzić do powstania mało wiarygodnych wyników.

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.