

Blue-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 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 rozdiale 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. Blue-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. E1416-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E1416-02 500 reakcji po 25 µl
Blue-LAMP UNG RT Reaction Mix (2x) brązowa probówka (Chronić przed UV)	1300 µl	5 x 1300 µl
Blue-LAMP UNG 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.

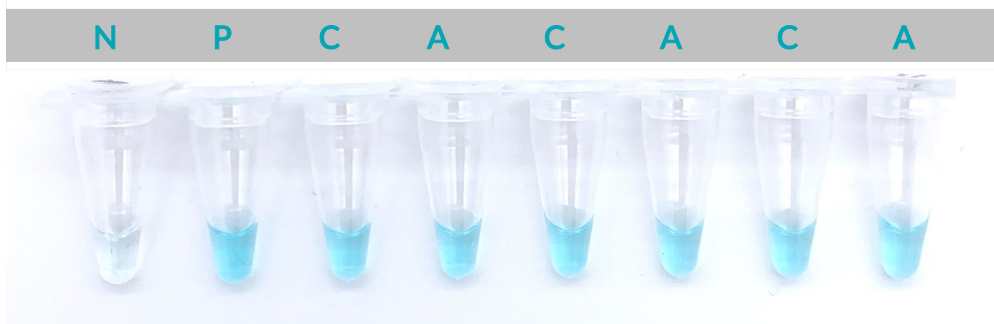
Przygotowanie reakcji:

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 grzejącym nagrzanym do **65°C**. Czas trwania reakcji wynosi 30-40 minut. Blue-LAMP UNG 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.

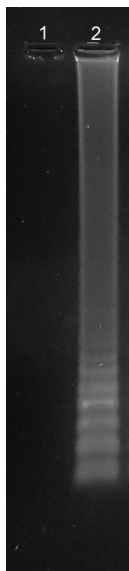
Składnik reakcji Master Mix	Reakcja właściwa C	Kontrola negatywna N	Kontrola pozytywna P Lambda DNA
Blue-LAMP UNG RT Reaction Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
10x Primer Mix	2,5 µl	2,5 µl	-
Blue-LAMP UNG RT Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Lambda Positive Control (10x)	-	-	2,5 µl
Matryca	x µl	-	-
RNase free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

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.