

## Flo-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 DNA, 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 poprzez fluorescencję, co pozwala na pomiar w czasie rzeczywistym. W trakcie reakcji tworzy się nierozpuszczalny osad pirofosforanu magnezu, który można zaobserwować w postaci zmętnienia.

### Zawartość zestawu:

Składnik	Nr kat. E1425-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E1425-02 500 reakcji po 25 µl
Flo-LAMP RT Reaction Mix (2x) pomarańczowa nakrętka	1300 µl	5 x 1300 µl
Flo-LAMP RT Enzyme Mix żółta nakrętka	110 µl	5 x 110 µl
Flo - fluorescence dye (FAM) brązowa probówka	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 starterów 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 Stężenie	16 µM	16 µM	2 µM	2 µM	4 µM	4 µM	
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 lub buforze TE, 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 cyklerze uprzednio nagrzanym do **65°C**. Każdorazowo zaleca się nastawianie kontroli negatywnej (N).

Składnik reakcji Master Mix	Reakcja właściwa C	Kontrola negatywna N	Kontrola pozytywna P Lambda DNA
Flo-LAMP RT Reaction Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
10x Primer Mix	2,5 µl	2,5 µl	-
Flo-LAMP RT Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Flo - fluorescence dye (FAM)	1 µl	1 µl	1 µl
Lambda Positive Control (10x)	-	-	2,5 µl
Matryca	x µl	-	-
RNase free Water	8 µl – x µl	8 µl	8 µl
Objętość Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl

Przy detekcji z barwnikiem fluorescencyjnym zalecane jest ustawienie 40 cykli jednoczynowych z pomiarem w kanale 1 (FAM) lub (SYBR) według poniższej tabelki. Jeżeli w badanej próbce ilość kopi matrycy jest mniejsza niż 200 zaleca się wydłużenie czasu reakcji do 50 minut.

Schemat reakcji	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Flo-LAMP RT reaction mix	65-68°C	1 min**	30-50*
	85°C	5 min	1

\* ilość cykli zależy od optymalizacji reakcji oraz ilości kopi matrycy badanej próbce

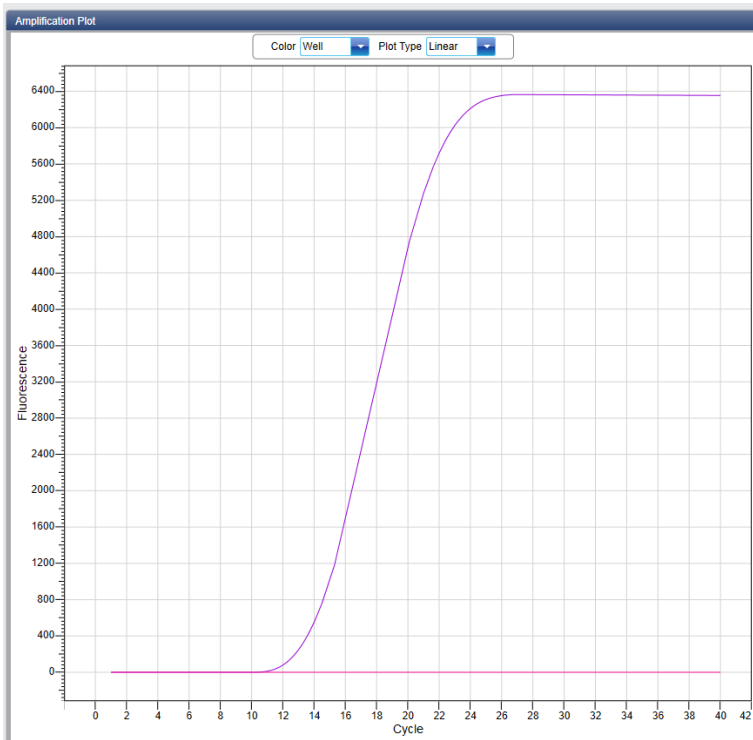
\*\* odczyt fluorescencji po każdej minucie

#### Informacje dodatkowe:

W przypadku wystąpienia amplifikacji w kontrolach bez matrycy, należy podjąć odpowiednie kroki:

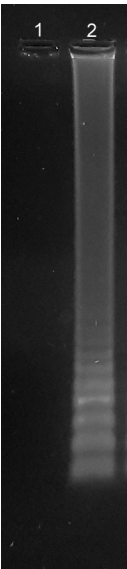
- Zaleca się zastąpienie używanych odczynników i enzymów na nowe.
- W miarę możliwości rozdzielić proces nastawiania reakcji od detekcji.
- Unikanie otwierania reakcji po amplifikacji.
- W celu rozróżnienia czy amplifikowany fragment jest wynikiem reakcji z matrycą, zaleca się wykonanie krzywej topnienia. W przypadku amplifikacji bez matrycy krzywa topnienia będzie różna od krzywej kontroli pozytywnej.

## Analiza wyników:



Pomiar w czasie rzeczywistym przy użyciu barwnika fluorescencyjnego.

Cykl 1 min, łącznie 40 cykli, kanał FAM, fioletowy—kontrola pozytywna (P), różowy—kontrola negatywna (N)



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.

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039  
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23