

Mastermix LAMP

Color



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Mastermix LAMP Color

Cat. no. EA32

Presentaciones

Contenidos	EA3201	EA3202
	25 µl × 100 reac	25 µl × 500 reac
Mastermix LAMP Color 2x	1,25 ml	5 × 1,25 ml
Agua ultrapura – Libre de Nucleasas	1,5 ml	5 × 1,5 ml
Enhancer 10x	1,5 ml	1,5 ml
Manual	1	1

Almacenamiento

El kit de Mastermix LAMP Color debe ser almacenado a -20 °C. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelado/descongelado.

Introducción

El kit Mastermix LAMP Color es una mezcla de reacción optimizada que contiene la enzima Bfo ADN polimerasa termoestable, y todos los reactivos necesarios para la amplificación de ADN. Ha sido diseñada especialmente para la amplificación isotérmica de ADN mediada por *loops* (*Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP*). Este sistema incorpora un reactivo colorimétrico que permite la detección rápida y sencilla de la amplificación mediante un cambio de color: (Rosa, reacción sin amplificación. Amarillo reacción con amplificación de ADN). El cambio de color (Figura 1) permite identificar al ojo desnudo si la reacción de amplificación es negativa o positiva, prescindiendo de equipos PCR en tiempo real o electroforesis en gel de agarosa

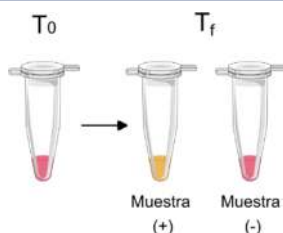


Figura 1. Representación gráfica del cambio de color para reacciones de amplificación de ADN positivas (+)

La técnica de LAMP utiliza de 4 a 6 *primers* que reconocen entre 6 y 8 regiones específicas del ADN blanco, lo que confiere alta especificidad a la reacción. La enzima Bfo ADN polimerasa está ingenierizada y contiene una fuerte actividad de desplazamiento de cadena 5'-3' que permite la síntesis de nuevas hebras de ADN. La misma fue modificada genéticamente para optimizar su funcionamiento en reacciones de LAMP. Los productos resultantes conforman concatémeros muy largos (>20 kb), compuestos por múltiples repeticiones de la secuencia blanco (80–250 pb).

La Mastermix LAMP Color puede ser utilizada con moldes de ADN obtenidos en agua o en buffer TE. Este último, suele ser el buffer de elución de los kits comerciales de purificación de ADN.

La Mastermix LAMP Color es compatible con la detección fluorescente mediante intercalantes como SyBR Green, EvaGreen, Syto-9 entre otros.

Notas Importantes

1. Para la preparación de los *primers*, se sugiere resuspender los mismos en agua libre de nucleasas (H₂O grado biología molecular), y no en TE u otras soluciones *buffer*.
2. La Mastermix LAMP Color 2x contiene MgSO₄.
3. El volumen de reacción estándar es de 25 µl, sin embargo, el mismo puede ser ajustado manteniendo las proporciones.
4. Se recomienda utilizar como molde de la reacción muestras de ADN resuspendidas en agua (1 – 5 µl). En estos casos es

necesario agregar a la mezcla de reacción el Enhancer 10X a una concentración final 1X.

5. En el caso de que el ADN molde este resuspendido en *buffer* TE o similar, no superar el 10% del volumen final ($\leq 2,5 \mu\text{l}$ en reacciones de $25 \mu\text{l}$) e incluir en el control NTC (*No Template Control*) el mismo volumen del *buffer* utilizado.
6. Evitar la exposición prolongada de la Mastermix LAMP Color 2x al aire, cerrando el tubo inmediatamente luego de su uso. En caso de anticipar el uso reiterado del producto, se sugiere fraccionar el mismo, para evitar los ciclos de apertura y cierre del tubo.
7. El color inicial de la reacción debe ser rosa antes de la amplificación. Un cambio previo a naranja/amarillo indica pérdida de capacidad de detección colorimétrica.
8. Evitar la contaminación cruzada durante el armado de las reacciones, asignando lugares físicos separados para el armado de la reacción y la incorporación del molde a la misma.
9. En equipos de PCR en tiempo real, es posible incluir una molécula intercalante para realizar la visualización de la reacción. Se recomienda utilizar Syto-9, EvaGreen o SYBR Green en una concentración 0,25x_f o 0,25 μM _f para Syto-9. Para esto, se sugiere realizar la lectura de fluorescencia cada 1 min, durante ~60 minutos.
10. La incorporación de moléculas intercalantes también permite la realización de una curva de *melting* para diferenciar productos específicos de inespecíficos.
11. Ante una contaminación persistente, reemplazar stocks y descontaminar superficies y micropipetas.

Este producto fue desarrollado únicamente para su uso exclusivo en laboratorios de investigación.

Protocolo

1. Descongelar la de Mastermix LAMP Color 2x, el molde, los *primers*, y el Agua ultrapura. Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente, homogenizar por inversión y centrifugar brevemente antes del uso. Evitar la generación de burbujas.
2. Preparar la reacción de acuerdo a las siguientes tablas (según el solvente utilizado para resuspender/diluir el molde de ADN. Se sugiere realizar los pasos de armado manteniendo los tubos en hielo.

Componentes	25 µl	Concentración final
Mastermix LAMP Color2x	12,5 µl	1×
Mezcla de <i>primers</i> 10x* ¹	2,5 µl	1×
Molde (Buffer TE)* ²	≤ 2,5 µl	
ddH ₂ O libre de RNasas	c.s.p. 25 µl	-

Componentes	25 µl	Concentración final
Mastermix LAMP Color2x	12,5 µl	1×
Mezcla de <i>primers</i> 10x* ¹	2,5 µl	1×
Enhancer 10x	2,5 µl	1x
Molde (Agua)* ³	1-5 µl	
ddH ₂ O libre de RNasas	c.s.p. 25 µl	-

*¹ La mezcla de *primers* para reacciones estándar de LAMP suele incluir las siguientes concentraciones:

<i>Primer</i>	Concentración stock 10x	Concentración final (1x)
FIP	16 µM	1.6 µM
BIP	16 µM	1.6 µM
F3	2 µM	0.2 µM
B3	2 µM	0.2 µM
LF	4 µM	0.4 µM
LB	4 µM	0.4 µM

Se sugiere el armado de mezclas de *primers* 10X, para facilitar la preparación de la reacción.

*2 Para moldes de ADN obtenidos en Buffer TE.

*3 Para moldes de ADN obtenidos en agua, incorporar el Enhancer 10x en la mezcla de reacción.

3. Homogeneizar la mezcla de reacción mediante vórtex y centrifugar brevemente para recoger el contenido.
4. Dispensar 20-24 µl de mezcla por reacción en los microtubos correspondientes, preparar los controles NTC y cerrar la tapa de los mismos.
5. En un lugar físico separado del anterior, añadir 1-5 µl de muestra.
6. Cerrar los tubos, mezclar y centrifugar si es necesario para recoger el líquido. Verificar que el color de la reacción sea rosa.
7. Incubar a 60-65 °C durante 60 minutos. En este paso se recomienda utilizar baños térmicos (o termocicladores) con tapa termoestabilizada para evitar la condensación en la tapa de microtubo, lo que puede afectar el resultado de la reacción.
8. Una vez concluida la incubación, retirar los tubos y examinar visualmente. Las reacciones positivas se tornarán amarillas, mientras que los controles negativos deben permanecer rosados. El color es visible inmediatamente al retirar de la incubación, pero puede intensificarse dejando enfriar la reacción a temperatura ambiente.

Troubleshooting

Problema observado	Causas Probables	Posibles soluciones
No hay cambio de color (reacción negativa aunque debería ser positiva)	Baja concentración de ADN objetivo	Verificar cantidad y calidad del ADN (usar control positivo conocido)
	Inhibidores en la muestra (ej. proteínas, detergentes, etanol)	Repetir extracción, asegurando eliminación de inhibidores
	Desnaturalización incompleta del ADN	Realizar una desnaturalización inicial del molde antes de ser incorporado a la mezcla de reacción
	Temperatura de incubación incorrecta	Realizar la puesta a punto de la temperatura óptima de reacción
Cambio de color en la reacción negativa (falsos positivos)	Contaminación de los reactivos (<i>carry-over</i>)	Preparar reacciones en cabina limpia y libre de ADN
	Ambiente de trabajo sin separación de áreas	
	Pipetas o tips contaminados	- Usar puntas con filtro
	Formación de productos inespecíficos	Evaluar el diseño de los <i>primers</i> , y comprobar la formación de dímeros Es posible comprobar la formación de dímeros mediante la realización de una curva de <i>melting</i>
Color inicial anormal (naranja/amarillo)	Mezcla que sufrió múltiples ciclos de contacto con el aire	Fraccionar la Mastermix LAMP Color 2X
	Solución de resuspensión de ADN con pH ácido	Utilizar ADN resuspendido en agua grado molecular
Cambio de color muy débil o difícil de distinguir	Baja concentración inicial de ADN	Asegurar que el ADN está en rango de detección
	Tiempo de incubación insuficiente	Aumentar el tiempo de incubación

Problema observado	Causas Probables	Posibles soluciones
Variabilidad entre réplicas	Error de pipeteo	Verificar la precisión de micropipetas
	Mezcla no homogeneizada antes del fraccionamiento	Homogeneizar la mezcla antes de repartir la misma en los tubos de reacción
	Diferencias en la temperatura de incubación	Usar incubador con buena uniformidad térmica