



Mastermix LAMP

Fluorescente



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

www.pb-l.com.ar

Mastermix LAMP Fluo

Cat. no. EA33

Presentaciones

Contenidos	EA3301	EA3302
	25 µl × 100 reac	25 µl × 500 reac
Mastermix LAMP 2x	1,25 ml	5 × 1,25 ml
Agua ultrapura – Libre de Nucleasas	1,5 ml	1,5 ml
Fluorescent Dye 50x	60 µl	300 µl
Manual	1	1

Almacenamiento

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

Introducción

El kit Mastermix LAMP Fluorescente incluye una mezcla de reacción optimizada que contiene la enzima Bfo ADN polimerasa termoestable, y un agente intercalante para la detección fluorescente. Ha sido diseñado especialmente para la amplificación isotérmica de ADN mediada por *loops* (*Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP*). El agente intercalante permite el seguimiento de la amplificación en tiempo real en equipos de PCR en tiempo real o fluorímetros isotérmicos, así como la lectura por punto final sobre un transiluminador de luz azul (470–490 nm) o UV. Las reacciones positivas emiten fluorescencia verde intensa, mientras que las negativas permanecen oscuras (Figura 1), lo que permite interpretar el resultado prescindiendo de la electroforesis en gel de agarosa.

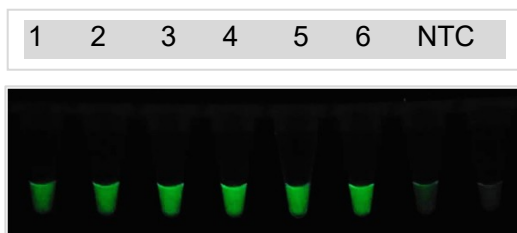


Figura 1. Revelado fluorescente por punto final sobre transiluminador de luz azul. Las reacciones positivas (1, 2, 3, 4, 5, 6) emiten fluorescencia verde; los controles negativos (NTC) permanecen oscuros.

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 Fluorescente 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.

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 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 o buffer TE (1 – 5 µl).
5. La detección puede realizarse en tiempo real, mediante equipos de PCR en tiempo real o fluorímetros isotérmicos, o por punto final, observando los tubos sobre un transiluminador de luz azul (470–490 nm) o UV. En este último caso, se recomienda ajustar la apertura del obturador de la cámara que captura la imagen para evitar la saturación de la misma, tomando como referencia la fluorescencia basal del control NTC.
6. Para lecturas en equipos de medición de fluorescencia (real time PCR, fluorómetros) utilizar una concentración de intercalante menor (0,25x) para no saturar la señal.
7. 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.
8. El agente intercalante incluido en el kit se detecta en el canal FAM/SYBR (excitación ~490 nm, emisión ~520 nm). Se sugiere realizar la lectura de fluorescencia cada 1 min, durante ~60 minutos. No incorporar colorantes o intercalantes adicionales.
9. El reactivo fluorescente incluido en el kit permite la realización de una curva de *melting* para diferenciar productos específicos de inespecíficos, en aquellos equipos que dispongan de esta función.
10. 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 Mastermix LAMP 2x, el Fluorescent Dye 50x, 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 la siguiente tabla. Se sugiere realizar los pasos de armado manteniendo los tubos en hielo.

Componentes	25 µl	Concentración final
Mastermix LAMP 2x	12,5 µl	1x
Mezcla de <i>primers</i> 10x* ¹	2,5 µl	1x
Fluorescent Dye 50x* ²	0,5 µl	1x
Molde	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

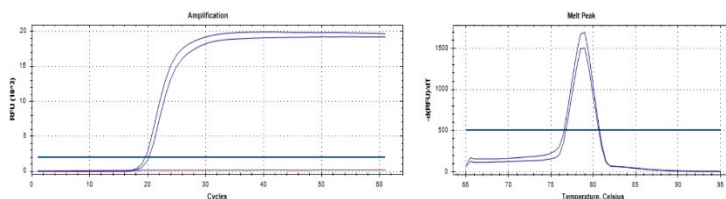
Se sugiere el armado de mezclas de *primers* 10X, para facilitar la preparación de la reacción.

*² Ajustar el volumen según la concentración final deseada.

- Homogeneizar la mezcla de reacción mediante vórtex y centrifugar brevemente para recoger el contenido.
- Dispensar 20-24 µl de mezcla por reacción en los microtubos correspondientes, preparar los controles NTC.
- En un lugar físico separado del anterior, añadir 1-5 µl de muestra.
- Cerrar los tubos, mezclar y centrifugar si es necesario para recoger el líquido. Mantener las reacciones protegidas de la luz hasta el momento de la incubación.
- Incubar a 60-65 °C durante 60 minutos. Si se utiliza un equipo de PCR en tiempo real o un fluorometro isotermico, programar la lectura de fluorescencia en el canal FAM/SYBR cada 1 minuto,

y la temperatura de la tapa 10°C superior a la de reacción. En caso de utilizar baños térmicos (o termocicladores), se recomienda que contengan tapa termostatzada. Para evitar la condensación en la tapa del microtubo, que afecta el resultado de la reacción.

8. Una vez concluida la incubación, analizar el resultado. En tiempo real, las reacciones positivas presentan una curva de amplificación sigmoidea con incremento de fluorescencia, mientras que los controles NTC deben permanecer en la línea de base. Para el revelado por punto final, retirar los tubos y observarlos sobre un transiluminador de luz azul (470–490 nm) o UV: las reacciones positivas emiten fluorescencia verde intensa y los controles negativos permanecen oscuros.



Troubleshooting

Problema observado	Causas Probables	Posibles soluciones
No se observa incremento de fluorescencia (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

Problema observado	Causas Probables	Posibles soluciones
	Temperatura de incubación incorrecta	Realizar la puesta a punto de la temperatura óptima de reacción (60-65 °C)
Señal de fluorescencia en los controles negativos (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>
Señal fluorescente débil	Baja concentración inicial de ADN	Asegurar que el ADN se encuentre en el rango de detección del ensayo
	Tiempo de incubación insuficiente	Aumentar el tiempo de incubación hasta 75-90 minutos
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 y verificar la limpieza del bloque óptico