

Code No. RR385S

RR385A

研究用

Takara

BcaBEST[®] Isothermal FluorDetect Kit
(DNA/RNA)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	1
● 保 存	1
● 操作注意	1
● 操作方法	2
● Troubleshooting	3
● 参考文献	4
● 关联产品	4

● 制品说明

本制品是采用 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法进行等温核酸扩增以及 RNA 起始的反转录反应的预混 LAMP/RT-LAMP 试剂。

LAMP 法是一种扩增特定区域的等温核酸扩增方法。在该方法中，使用具有链置换活性的 DNA 聚合酶和 4 至 6 个靶区域特异性引物，从微量核酸中扩增目的片段。此外，如果模板是 RNA 时，则可以通过 DNA 聚合酶和反转录酶进行一步法 RT-LAMP。

本制品的 *Bca*BEST Isothermal Mix (2X) 含有 *Bca*BEST DNA Polymerase ver.2.0 以及 PrimeScript™ III Reverse Transcriptase，将其与核酸样品 (DNA 或 RNA)、引物、试剂盒随附的 TB Green® Solution (嵌合荧光染料) 混合，使用 Real Time PCR 仪等，在 63°C 等温条件下反应 20 分钟后，便可用荧光检测其扩增产物。此外，本试剂中添加了 Uracil-N-Glycosylase (UNG)，可防止由于扩增产物残留污染导致的假阳性结果。

● 制品内容【20 次 (RR385S) /100 次 (RR385A)、25 μl 反应体系】

	RR385S	RR385A
<i>Bca</i> BEST Isothermal Mix (2X) *1	250 μl	625 μl × 2
TB Green Solution (300X)	50 μl	50 μl

*1 含有 Pyrophosphatase (inorganic)，扩增反应产生的焦磷酸会被其分解，因此无法通过浊度进行检测。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)
2. 实验专用反应管或反应板
3. LAMP 引物 *2、*3
4. RNase free water
5. 微量移液器和枪头 (已高压灭菌)

*2 本制品通过 TB Green® Solution (嵌合荧光染料) 发出的荧光来检测扩增核酸。可通过 FAM 通道检测。

*3 可使用 LAMP 法中常用的 Primer。此外，LAMP 法可用 4 种基础引物 (F3/B3/FIP/BIP) 进行反应，但如果使用备选引物 (LoopF/LoopB)，可大幅提升反应效率。

● 保存: -20°C

● 操作注意

以下为使用本制品时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. 在冰上融解 *Bca*BEST Isothermal Mix (2X)，轻轻混合，经过瞬时离心集液于管底再使用。使用后，请立即保存至 -20°C 的环境中。
2. 从与核酸结合的性质上，应将 TB Green Solution 视为具有致突变性的物质。使用时，请务必佩戴手套。
3. 反应液的配制、分装请一定使用新的一次性枪头，尽量避免样品间的污染。
4. 建议制备所需组分 + α 的反应预混液 (*Bca*BEST Isothermal Mix (2X)、Primer Mix、TB Green Solution、RNase free water 的混合液)，然后再分装到每个反应管中，可更限度地避免试剂制备过程中的误差。最终，可减少实验数据的误差。
5. 若扩增反应后开闭反应管或进行高压灭菌处理，有可能导致实验室内高浓度的核酸污染，因此请避免此类操作。

● 操作方法

首先，建议使用以下标准操作流程进行反应确认。

最适引物浓度、反应时间、反应温度和 TB Green Solution 添加浓度取决于目的基因和引物序列，因此请相应调整实验条件。

【标准操作流程】

1. 提前制备 10×LAMP Primer Mix 及 25×TB Green Solution。

<10×LAMP Primer Mix (每次反应使用 2.5 μl) >

FIP/BIP primers: 16 μM

F3/B3 primers: 2 μM

LoopF/B primers: 8 μM

<25×TB Green Solution (使用时再制备) (每次反应使用 1 μl) >

试剂	使用量
RNase free water	27.5 μl
TB Green Solution (300×)	2.5 μl
Total	30.0 μl

2. 在冰上制备以下反应液。

<1 个反应>

试剂	使用量	终浓度
BcaBEST Isothermal Mix (2X)	12.5 μl	1×
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl	1×
25×TB Green Solution	1.0 μl	1×
Template (DNA/RNA) *	x μl	
RNase free water	up to 25 μl	

*: 为避免在反应液制备过程中发生非特异性反应，请最后添加 Template。

3. 进行 LAMP/RT-LAMP 反应。

- 1) 对反应试管或反应板轻轻离心集液。
- 2) 在 63°C 下反应 20 分钟。
- 3) 通过荧光检测确认扩增。

※ 若怀疑本制品的扩增产物导致污染，请在反应前，于 25°C 下进行 10 分钟的 UNG step。
在 UNG 的作用下，残留的扩增产物会被分解。如果没有污染，通常不需要进行此步骤。

<使用 Real Time PCR 仪检测时的程序设置 >

Pattern	2 Step PCR	
Segment	1	2
Temperature(deg)	63.0	63.0
Hold Time(mm:ss)	00:30	00:30
Data Collection	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ramp Rate(deg/sec)	Default	Default
Increment Temp(deg)	0.0	0.0
Increment Time(sec)	0.0	0.0

设置示例

2 step PCR

Cycles: 20

63°C 30 秒

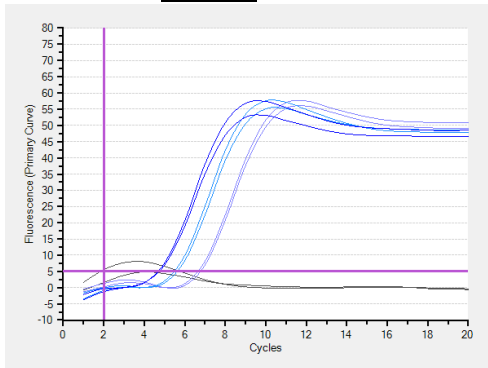
63°C 30 秒 (数据采集: FAM 通道)

采用上述设置，在 20 分钟的扩增反应中，可获取每 1 分钟的荧光数据。可根据具体情况，在等温反应后，追加融解曲线分析。

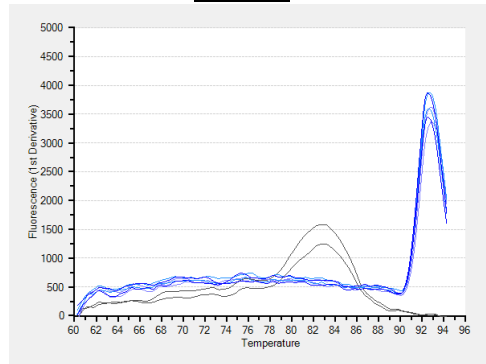
< 扩增/检测示例 >

※ Real TimePCR 仪采用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950)

扩增曲线



融解曲线



如果扩增曲线上升很快，扩增后的荧光值显示为 0，则需要在 Manual 设置中调整 Baseline。通过正确设置 Baseline 或 Threshold，可在检出时间获得 Ct 值。此外，可通过融解曲线的形状来确定扩增产物的相似度和均一度。由于核酸的 Tm 值受多种因素影响，如链长和 GC 含量，因此通常可区分不同的扩增产物。

● Troubleshooting

[在阴性对照样本中观察到扩增]

现象	推测原因	对策
与阳性样品相比扩增曲线的上升速度较慢 融解曲线的 Tm 值和形状与阳性样品的不同。	非特异性扩增	<ul style="list-style-type: none"> · 缩短反应时间 · 研讨反应温度 · 研讨引物浓度 · 更换引物套系 · 在冰上制备反应液
在与阳性样品相同的时间内观察到扩增 融解曲线的 Tm 值和形状与阳性样品的相同	残留污染	<ul style="list-style-type: none"> · 在反应前加入 UNG step · 按反应液制备和样品添加进行分区 · 清洁操作区域和设备

【注意】由于 LAMP 反应非常活跃，因此在阴性反应中也有可能检测到扩增。

尤其要注意采取适当的应对扩增产物残留污染的对策。

[阳性样品未见扩增，扩增效率较差]

现象	推测原因	对策
完全未见扩增	无荧光检出 或未发生反应	· 确认仪器荧光数据读取是否正常 · 更换引物套系 · 重新纯化核酸模板
扩增慢，升幅小	反应条件不理想	· 如未使用 Loop Primer，可添加 Loop Primer · 研讨引物浓度 · 研讨反应温度 · 更换引物套系 · 降低 TB Green Solution 浓度

● 参考文献

- 1) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. (2000) **28**(12): e63.
- 2) Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*. (2002) **16**(3): 223–229.

● 关联产品

BcaBEST® DNA Polymerase ver.2.0 (Code No. RR380A/B)

TB Green® Solution (Code No. 9300A)

RNase-free Water (Code No. 9012)

引物合成*

*：可使用 DNA 合成·RNA 合成服务。

详细情况请参照本公司的网站 (<https://www.takarabiomed.com.cn/>)。

TB Green and BcaBEST are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice and PrimeScript are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202404Da