

製品コード RR385S
RR385A

研究用

Takara

***BcaBEST*[™] Isothermal FluorDetect Kit
(DNA/RNA)**

説明書

本製品は、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による等温核酸増幅および RNA からの逆転写反応を行なうプレミックス LAMP/RT-LAMP 試薬です。

LAMP 法は、特定の領域を増幅するための等温核酸増幅法です。この方法では、鎖置換活性を持つ DNA ポリメラーゼと 4～6 本のターゲット領域特異的プライマーを使用し、微量の核酸から目的の領域を増幅します。さらに、鋳型が RNA の場合は、DNA ポリメラーゼと逆転写酵素によりワンステップ RT-LAMP を行うことができます。

本製品の *Bca*BEST Isothermal Mix (2X) には、*Bca*BEST DNA Polymerase ver.2.0 および PrimeScript™ III Reverse Transcriptase が含まれており、核酸サンプル (DNA または RNA)、プライマー、キット添付の TB Green® Solution (インターカレーター) と混合してリアルタイム PCR 装置などを用いて 63°C 20 分の等温条件で反応させることにより、その増幅産物を蛍光で検出します。また、本試薬には Uracil-*N*-Glycosylase (UNG) が添加されており、増幅産物のキャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防ぐことができます。

I. 内容 [20 回 (RR385S) / 100 回 (RR385A)、25 μ l 反応系]

	製品コード RR385S	RR385A
<i>Bca</i> BEST Isothermal Mix (2X)*1	250 μ l	625 μ l \times 2
TB Green Solution (300 \times)	50 μ l	50 μ l

* 1 : Pyrophosphatase (inorganic) が含まれ、増幅反応で生じるピロリン酸は分解されるため、濁度による検出はできません。

本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

1. リアルタイム PCR 装置など
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. LAMP プライマー*2,3
4. RNase free water
5. マイクロピペットおよびチップ

* 2 : 本製品は、TB Green (インターカレーター) による蛍光で増幅核酸を検出します。FAM フィルターで検出可能です。

* 3 : LAMP 法で一般的に用いられる Primer が使用可能です。なお、LAMP 法は 4 種類の基本プライマー (F3/B3/FIP/BIP) で反応できますが、オプションプライマー (LoopF/LoopB) を使用することで反応効率が大幅に向上します。

II. 保存 - 20°C

III. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. *Bca*BEST Isothermal Mix (2X) は、氷上にて融解後、軽く混合したのちスピンドウンして使用してください。使用後は、直ちに - 20°C に保存してください。
2. TB Green Solution は核酸と結合する性質上、変異原性の可能性のあるものとして取り扱ってください。使用時は必ず手袋を着用してください。
3. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスプレイブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
4. 必要分 + α の反応液 (*Bca*BEST Isothermal Mix (2X)、Primer Mix、TB Green Solution、RNase free water の混合液) を調製すると便利です。組成の均等な反応液を最少回数分注することで、試薬調製のばらつきを最小限に留めることができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
5. 増幅反応後のチューブの開閉やオートクレーブ処理は実験室内で高濃度の核酸汚染が発生する原因となりますのでお控えください。

IV. 操作

まずは以下の標準プロトコールでの反応確認をお勧めします。
至適なプライマー濃度、反応時間・反応温度、TB Green Solution 添加濃度は、ターゲット遺伝子やプライマー配列によって異なりますので、実験条件を適宜調整してください。

【標準プロトコール】

1. 10 × LAMP Primer Mix および 25 × TB Green Solution をあらかじめ調製する。

< 10 × LAMP Primer Mix (1 反応あたり 2.5 μl 使用) >

FIP/BIP primers : 16 μM

F3/B3 primers : 2 μM

LoopF/B primers : 8 μM

< 25 × TB Green Solution (用時調製) (1 反応あたり 1 μl 使用) >

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

2. 下記の反応液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
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	

* : 反応液準備中の非特異反応を避けるため、Template は最後に添加してください。

3. LAMP/RT-LAMP 反応を行う。

- 1) 反応チューブまたはプレートを軽くスピンドウンする。
- 2) 63°C 20 分で反応する。
- 3) 蛍光検出により増幅を確認する。

※ 本製品の増幅産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、反応前に 25°C 10 分のステップを実施してください。UNG の作用によりキャリーオーバーした増幅産物が分解されます。コンタミネーションがない場合は、通常、このステップを入れる必要はありません。

<リアルタイム PCR 装置による検出を行う場合のプログラム設定>

Pattern	2 Step PCR	
Segment	1	2
Temperature(deg)	63.0	63.0
Hold Time(mm:ss)	00:30	00:30
Data Collection	┐	┘
Ramp Rate(deg/sec)	Default	Default
Increment Temp(deg)	0.0	0.0
Increment Time(sec)	0.0	0.0

設定例

2 Step PCR

Cycles : 20

63°C 30 秒

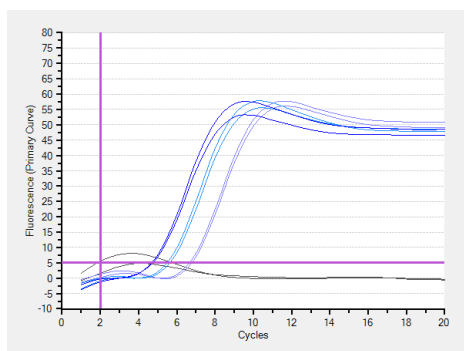
63°C 30 秒 (データ取得 : FAM フィルター)

上記のように設定すると、20 分の増幅反応において 1 分毎の蛍光データの取得が行えます。等温反応後の融解曲線分析は必要に応じて追加してください。

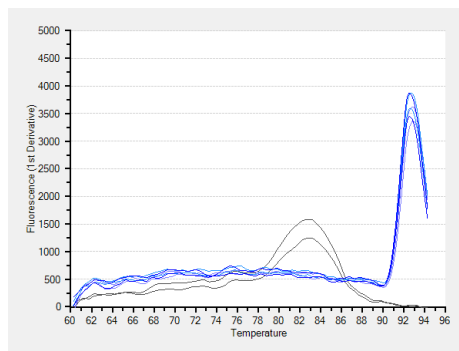
<増幅・検出の例>

※ リアルタイム PCR 装置は Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950) を使用

増幅曲線



融解曲線



増幅曲線の立ち上がりが早く、増幅後の蛍光値が 0 として増幅曲線が表示されている場合、Baseline を Manual 設定で調整してください。Baseline や Threshold を適切に設定することで検出時間を Ct 値として出力することができます。また、融解曲線の形状で増幅産物の類似性・均一性の程度について確認することができます。核酸の Tm 値は種々の要因のうち鎖長、GC 含量に影響されるため、多くの場合に異なる増幅産物を識別することが可能です。

V. トラブルシューティング

【陰性サンプルで増幅が見られる】

現象	想定される原因	対策
陽性サンプルより増幅曲線の立ち上がりが遅い 融解曲線の Tm 値、形状が陽性サンプルとは異なる	非特異的増幅	<ul style="list-style-type: none"> 反応時間を短縮する 反応温度を検討する プライマー濃度を検討する プライマーセットを変更する 反応液調製を氷上で行う
陽性サンプルと同程度の時間で増幅が見られる 融解曲線の Tm 値、形状が陽性サンプルと同じ	キャリアオーバーコンタミネーション	<ul style="list-style-type: none"> 反応前に UNG のステップを追加する 試薬調製と反応後で作業エリアを分ける 作業エリアと装置の清掃を行う

[注意] LAMP 反応は非常に反応性に富むため、鑄型を加えない陰性反応においても増幅が検出されることがあります。
特に、増幅産物のキャリアオーバーコンタミネーション対策には十分ご注意ください。

【陽性サンプルで増幅が見られない、増幅効率が悪い】

現象	想定される原因	対策
まったく増幅が見られない	蛍光検出ができていない 反応が起こっていない	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光データを取得していることを確認する プライマーセットを変更する 鑄型核酸を再精製する
増幅が遅い、立ち上がりが小さい	反応条件が至適でない	<ul style="list-style-type: none"> 使用していない場合は Loop Primer を添加する プライマー濃度を検討する 反応温度を検討する プライマーセットを変更する TB Green Solution 濃度を下げる

VI. 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.

VII. 関連製品

BcaBEST[™] DNA Polymerase ver.2.0 (製品コード RR380A/B)
TB Green[®] Solution (製品コード 9300A)
RNase-free Water (製品コード 9012)

プライマー合成*

- * : DNA 合成・RNA 合成サービスをご利用いただけます。
詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

VIII. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*BcaBEST*、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社