

BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D8011S	BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒	25次
D8011M	BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒(BeyoColor™ Colorimetric LAMP Assay Kit), 是一种通过环介导等温扩增(Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)法扩增DNA并通过反应体系的颜色变化检测样品中是否有目的DNA的试剂盒。本试剂盒采用了dU掺入和UDG酶防止等温扩增产物污染技术, 可快速、有效、高灵敏度地检测样品中的目的DNA, 并且采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。本试剂盒通过自行设计等温扩增引物, 可以用于检测样品中是否存在病原体、微生物等, 例如生物样品中是否存在特定病原体的感染或微生物的污染等。
- 等温扩增技术(Isothermal amplification technology)是核酸体外扩增技术, 其反应过程始终维持在一定的恒定温度下, 通过添加不同活性的酶和各自特异性引物进行核酸的快速扩增[1]。本试剂盒采用的是环介导核酸等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 其特点是针对靶基因的不同区域设计4-6条特异引物, 使用链置换DNA聚合酶(Bst DNA Polymerase)启动DNA的合成, 形成哑铃状互补链, 并进一步通过连续链置换进入循环扩增阶段, 扩增的最后产物是具有不同个茎环结构、多环花椰菜样结构的DNA的混合物。LAMP仅需在等温条件下(如60-65℃)保温30-60分钟, 即可完成核酸扩增反应。与常规PCR相比, LAMP不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程, 具有简单、快速、灵敏度高、特异性强等特点[2]。
- **本试剂盒灵敏度高, 反应时间短。**本试剂盒的灵敏性比传统的PCR方法高2-5个数量级, 通过阳性质粒计算检测下限约为20-200 copies/μl。且仅需1个小时就能完成检测反应。
- **本试剂盒采用可视化变色技术, 无需电泳, 通过肉眼观察颜色变化即可判断结果。**本试剂盒优化了指示剂染料, 样品中的目的DNA片段被快速大量扩增后, 反应管内液体的颜色由紫罗兰或蓝紫色变成天蓝色或深天蓝色即为目的DNA阳性。

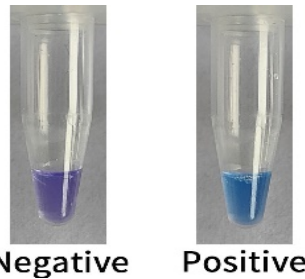


图1. 碧云天BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒(D8011)的检测效果图。左图为阴性样品, 右图为阳性样品。本图仅供参考, 不同批次的产品, 阴性和阳性的颜色可能会与本图略有差异, 实际检测时阳性和阴性相比有明显的颜色变化即可。

- **本试剂盒采用防污染技术, 有效避免污染。**本试剂盒使用了dU和热敏型UDG酶, 可以使扩增产物中掺入dU并且在等温扩增前30℃孵育5-15分钟可有效消除等温扩增过程中带来的产物污染问题。在进行等温扩增时, 热敏型UDG酶会被失活, 从而不会干扰后续的等温扩增检测。
- 本试剂盒含Bst酶、UDG酶、PCR Buffer、dNTP、dUTP、可视化染料, 只需加入适量特异引物、待测样品和水即可检测目的DNA。
- 本试剂盒提供了阳性对照Positive Control, 可用于确定试剂盒是否能正常工作。Positive Control含阳性DNA模板和对应的引物, 检测的目的DNA为GFP, 阳性对照中包含了靶向GFP的相应检测引物和相应的GFP DNA。建议每次检测都设置阳性对照。
- 本产品如果用于常规的20μl反应体系, 小包装可以进行25次检测, 中包装可进行100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D8011S-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	250μl
D8011S-2	Bst DNA Polymerase	25μl
D8011S-3	Positive Control	50μl
D8011S-4	Nuclease-free Water	200μl
D8011S-5	Mineral Oil	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D8011M-1	LAMP Master Mix with UDG (2X)	1ml
D8011M-2	Bst DNA Polymerase	100µl
D8011M-3	Positive Control	200µl
D8011M-4	Nuclease-free Water	1ml
D8011M-5	Mineral Oil	2ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中LAMP Master Mix with UDG (2X)需避光保存。尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 使用前需确保试剂完全融化，上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- 等温扩增是超高灵敏度的检测，请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。等温扩增反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。尽管本试剂盒采用UDG酶防污染技术，但仍请勿打开PCR管盖，等温扩增产物宜密封后按扩增后产物要求处理，以避免超高浓度的扩增产物由于气溶胶等因素污染实验环境。
- 本产品含颜色指示剂，未进行反应前，如果加入样品后颜色和阴性、阳性颜色有明显差异，则需要稀释样品或者使用DNA提取试剂盒处理样品，或者需要适当调整样品的pH至接近中性。
- 本等温扩增体系需要高浓度的二价离子，样品中不能含有高浓度的EDTA等金属离子螯合剂。
- 建议使用带滤芯的吸头配制等温扩增体系，可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂：

- a. 水浴锅或者普通PCR仪。
- b. DNase-free的带滤芯吸头(FTIP631/FTIP635/FTIP638)，0.2ml PCR管(FTUB322/FTUB323)。

2. 样本和引物准备：

- a. 准备含DNA的样品。如果是含DNA的样品，例如血清、细胞培养液、微量的细胞、病毒、细菌或真菌，很多情况下可以直接检测；也可以是其它纯化后的DNA样品。**注1：**样品加入量一般为反应体系1/10的量或更少。**注2：**如果样品不能及时检测，可以置于-20°C或者-80°C保存，可放置1-2个月。**注3：**含DNA的生物样品如果直接检测效果欠佳，可以尝试纯化DNA样品后再进行检测。
- b. 准备特异的LAMP Primer Mix (10X): 16 µM FIP/BIP, 2 µM F3/B3, 4 µM Loop F/B each(可选)。可以根据目的片段，自行设计或使用专门的LAMP引物设计软件PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/>)、NEB® LAMP (<https://lamp.neb.com/#/>)等设计引物。

3. LAMP反应体系的设置：

- a. 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- b. 参考下表在室温或冰浴上设置LAMP反应体系(以每孔反应体系为20µl为例)。下表中的Template为样品、阴性对照(Negative Control)或阳性对照(Positive Control)。Negative Control可使用溶解DNA样品的溶液或Nuclease-free Water, Positive Control可使用阳性质粒等。如果使用试剂盒中的Positive Control, 由于其中已经包含了特异引物, 不需要再添加LAMP Primer Mix (10X), 需要再添加2µl的Nuclease-free Water。建议每次检测都设置Negative Control和Positive Control。

Reagent	Volume for Sample	Volume for Positive Control
LAMP Master Mix with UDG (2X)	10µl	10µl
Nuclease-free Water	5µl	7µl
LAMP Primer Mix (10X)	2µl	-
Template	2µl	2µl
Bst DNA Polymerase	1µl	1µl
Total Volume	20µl	20µl

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- d. 如果使用含热盖的PCR仪，可直接开始反应；如果使用水浴锅反应，每管需要添加20µl Mineral Oil以防止水份蒸发至管盖，影响反应效果。

4. 反应条件：

- a. 37°C水浴或PCR仪反应5-10分钟，通常就可以有效去除反应体系内可能的本试剂盒等温扩增产物造成的环境污染。**说明：**初次

进行检测时无需进行本步骤；确定从未打开等温扩增反应体系管盖的情况下，也无需进行本步骤；仅当本试剂盒的的扩增产物可能污染检测环境的时候，需要执行本步骤。

- b. 后续如果使用水浴锅反应，应提前使温度上升至61°C，然后放入带浮漂的反应管，水浴60分钟。水浴锅的温度波动需要尽量控制在1°C以内。
- c. 后续如果使用PCR仪反应，按照“61°C，60分钟；4°C，forever；热盖温度，105°C”设定程序。注：引物不同，对应的最适等温扩增温度也略有差异，须进行一定的优化，通常在60-65°C之间。

5. 结果判断：

取出反应管，室温放置，以白色为背景，观察颜色变化。如果显示紫罗兰或蓝紫色，为阴性；如果显示天蓝色或深天蓝色，则为阳性。具体显色效果可参考图1。

注1：如果样品中模板量比较多，在30-60分钟时即可出现颜色变化；如果样品中模板量比较少，需将反应适当延长至总计65-70分钟。如果延长后，仍然没有变色，即为阴性。延长时间过久，阴性也可能会变色，出现假阳性。

注2：反应后，切勿开盖。等温扩增的产物非常多，气溶胶等因素很容易污染实验环境。判断结果后，密封后按实验室废弃物处置要求进行处理。如果确需开盖进行后续的分析检测，建议在相对隔离的其它实验室内操作。

参考文献：

1. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Chem Rev. 2015. 115(22):12491-545.
2. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Nucleic Acids Res. 2000. 28(12):E63.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D8011S	BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒	25次
D8011M	BeyoColor™等温扩增变色检测试剂盒	100次
C0305S	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	25次
C0305M	BeyoColor™支原体等温扩增变色检测试剂盒	100次
FTUB322	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包
FTUB323	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包,10包/箱
D7050S	Bst DNA Polymerase, Large Fragment	800U
D7050M	Bst DNA Polymerase, Large Fragment	4000U
D7053S	phi29 DNA Polymerase	250U
D7053M	phi29 DNA Polymerase	1kU
D7053L	phi29 DNA Polymerase	5kU
D7053XL	phi29 DNA Polymerase	20kU
D7055S	Bsu DNA Polymerase, Large Fragment	200U
D7055M	Bsu DNA Polymerase, Large Fragment	1000U
D7359-250µl	dUTP (100mM)	250µl
D7359-1ml	dUTP (100mM)	1ml
D7360S	Uracil-DNA Glycosylase (E. coli)	1000U
D7360M	Uracil-DNA Glycosylase (E. coli)	5000U
D7362S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	100U
D7362M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	500U
D7364S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	200U
D7364M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	1000U
D7364L	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	5000U
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250µl
D7376-1ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	1ml
D7376-5ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	5ml

Version 2023.03.22