

- (3) After the enzyme inactivation, irradiate the reaction tube with UV lamp (wavelength at 240~260nm or 350~370nm) from the bottom and observe the fluorescence light from the side of the tube wearing protective goggles that can efficiently block ultraviolet light. When green fluorescence similar to positive control is observed, the sample is judged as positive. When no fluorescence like negative control is observed, the sample is judged as negative. The copy number does not necessarily correlate with the fluorescence intensity.

★ **For examples of detection cases using this reagent, refer to the products introduction page in Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>).**

#### 【Caution for use】

##### 1. Handling the reagent

- This reagent kit should be stored at −20℃. To prevent the reagent from deterioration, only take it out from the freezer before use.
- Keep the reagent on ice for reagents preparation and later use. Before use, spin down the tubes to recollect the solution on the tube wall or on the cap, well mix the solution and spin down again.
- Read cautions for handling each reagent carefully before use.

##### 2. Caution for the sample preparation

For the preparation of the sample solution, do not use buffers containing the chelating reagents such as TE buffer. If chelating reagent is added to the reaction solution, manganese ion binding with Calcein will be chelated and the fluorescence light is released even when no amplification takes place. Also, a sample containing a large amount of Ca, Zn or Fe ion might cause false positive test result.

##### 3. Handling reaction tubes

- Only use the specified Loopamp Reaction Tube for fluorescence detection. Other reaction tubes might have different optical transparency and cause misjudgment.
- Take full care when handling reaction tubes since they are vulnerable to scratches or damages.
- Check carefully to see if reaction tubes have any crack or scratch before use. Crack or scratch on the tube might not only cause false judgment but also contaminate the equipment. If the tubes are broken inside the reaction block of the Loopamp Turbidimeter (Realtime or End Point), the reaction solution can spill inside the equipment and cause unrecoverable contamination and malfunctioning.
- By comparing the solution volume in all tubes, check visually if proper amount of sample solution/master mix. has been dispensed into the reaction tube.

##### 4. Caution for the detection

- Carry out the fluorescence visual detection after the amplification reaction and successive inactivation of the enzyme. If the inactivation procedure failed, it might cause false judgment. If necessary, save the detection result as picture format using digital camera.
- Never irradiate the reaction tube with UV light for long period or it might causes false judgment due to the increasing of the fluorescence background or the quenching of the fluorescence light.

##### 5. Handling reaction tubes after use

- The caps of the used reaction tubes should not be opened. Contamination of amplified products on other samples may not only cause false judgment of the test result but also pollute testing area. In this case, a correct test result may not be obtained unless pollution is completely removed.
- Keep the cap of the used tube completely closed and dispose it, according the relevant regulations or instructions, by incineration or after double bagging it with sealable vinyl bag. To prevent the amplified products from dispersing, do not conduct autoclave sterilization treatment for disposal.

#### 【Caution for Handling】

- LAMP reaction is very sensitive and even the slightest amount of amplified product tainted into the reaction might cause false result. Therefore, avoid this type of contamination and carry out the sample and reagent preparation in different clean benches.
- When ultraviolet lamp is used for the fluorescence visual judgment, do not stare directly at the UV light. Since UV light is harmful to the eyes, even watching for a short period would irritate eyes and cause symptoms similar to conjunctivitis. Look at it through glass board or protective goggles.
- When handling the sample, always abide by the biohazard counter measures<sup>9)</sup>.

- Do not expose the Loopamp Reaction Tube, master mix. preparation tubes to UV light. Change in color or degeneration in these materials caused by ultraviolet lamp sometimes results in misjudgment.
- This kit is designed for research use only.
- If the operator does not have the experience or knowledge in the field of nucleic acid testing, there is a possibility of false judgment. Therefore, make sure that the kit is used under the supervision of the experienced and knowledgeable technicians.
- Eiken Chemical Co., Ltd. does not bear any responsibility for false judgment or any consequential damage derived from the false judgment caused by non-capability problems such as operation error.
- Use the kit before the expiration date, which is labeled on the outer box (Exp.Date) .
- The reagent tube is made of polypropylene and the main material for kit case is paper. The institution disposing the reagent tube and case should bear the responsibility and abide by the clinical waste disposal regulations, water pollution prevention law, and any other regulation related.

#### 【Unit, Storage, Expiration, Code No.】

| Product Name                                       | Unit    | Storage | Expiration | Code No. |
|--|---------|---------|------------|----------|
| Loopamp <sup>®</sup> Fluorescent Detection Reagent | 96tests | −20℃    | 1 year     | LMP221   |

#### 【References】

- Notomi T. *et al.* : Nucleic Acids Research **28**, No.12, e 63 (2000)
- Nagamine K. *et al.* : Clin. Chem. **47**, No. **9**, 1742-1743 (2001)
- Mori Y. *et al.* : Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1,150-154 (2001)
- Tomita N. *et al.* Abstract for The 73rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (2000)
- Mori Y. *et al.* Abstract for the 23rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2000)
- Tomita N. *et al.* Abstract for the 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2003)
- Nagamine K. *et al.* : Molecular and Cellular Probes **16**,No.3,223-229 (2002)
- The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology):Japanese Journal of Bacteriology **54**,No.3,667-715 (1999)

3LP2219-D この説明書をよく読んでから使用してください。

研究用 \*\* 2008年1月改訂(第4版)  
\* 2006年4月改訂(第3版)



#### 【特徴】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 1 種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する<sup>1), 2)</sup>、② 6 領域を認識する4 種類の primer を使用するため特異性が高い、③ 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④ 増幅産物量が多く、簡易検出に適している<sup>3), 4), 5), 6)</sup>、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本試薬は、Loopamp DNA 増幅試薬キット又は Loopamp RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) を用いた核酸増幅反応時に予め添加しておくだけで、紫外線照射装置を用いることにより目視での検出（以下、蛍光目視検出と呼ぶ。）を可能にします。

|  |                 |
|--|-----------------|
| <b>【キット内容】</b>                                   | 96テスト分          |
| Fluorescent Detection Reagent (FD) <sup>※1</sup> | 0.1 mL × 1 tube |
| ※1：（ ）内は、試薬チューブに記載されている表示です。                     |                 |

#### 【測定原理】

LAMP法は極めて多量の核酸が合成され、副産物であるピロリン酸イオンも多量に生成するという特徴を有する遺伝子増幅法です。本試薬に含まれているカルセインは、はじめマンガンイオンと結合して消光していますが、LAMP 反応が進行すると生成するピロリン酸イオンにマンガンイオンを奪われ蛍光を発し、さらに反応液中のマグネシウムイオンと結合することで蛍光が増強されます<sup>6)</sup>。この原理により LAMP 反応の有無を容易に蛍光目視検出することができます。

#### 【使用法】

##### 1. 必要な器具・装置・試薬

- Loopamp DNA 増幅試薬キット、又は Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP)
- マスターミックス調製用滅菌チューブ（0.5 mL 又は 1.5 mL）
- ピペット（0.5～10μL, 10～100μL, 100～1,000μL）
- フィルター付きチップ
- Loopamp 反応チューブ
- 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 氷（クラッシュアイス）及びアイスボックス
- 微量簡易遠心機
- 8連マイクロチューブ用簡易遠心機
- ホルテックスミキサー
- Loopamp 濁度測定装置（リアルタイム、エンドポイント）<sup>※2,3</sup>、又はインキュベーター（温度精度が±0.5℃以内：ホットボンネット付）
- ヒートブロック（反応停止用）<sup>※2</sup>
- 紫外線照射装置（波長 240～260nm, 350～370nm）<sup>※2</sup>
- 広幅の眼鏡又は防護面

- ※2：適応装置、反応停止機能、紫外線照射装置の条件については、Eiken GENOME SITE (URL : <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。  
※3：蛍光目視検出の場合、Loopamp 濁度測定装置（リアルタイム、エンドポイント）はインキュベーターとして利用します。検出に際しては別途、紫外線照射装置が必要です。

#### 2. 試薬の調製

- 蛍光・目視検出試薬は−20℃で凍結しませので、そのまま氷上で保存してください。なお、Loopamp DNA 増幅試薬キット、Loopamp RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) の試薬は室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存してください。

- マスターミックスの調製（**氷上で行ってください。**）

- 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに、Loopamp DNA 増幅試薬キット又は Loopamp RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) の各試薬と Fluorescent Detection Reagent (FD) を、必要なテスト数分、次表の割合（1 テストあたり）で分注します。

なお、Fluorescent Detection Reagent (FD) を添加した時点で、ホルテックスミキサーにより十分に混和した後、*Bst* DNA Polymerase 又は Enzyme Mix. (EM) を添加するようにしてください。

|                                    |      |         |
|------------------------------------|------|---------|
| <Loopamp DNA 増幅試薬キット使用の場合>         |      |         |
| 2 × Reaction Mix. (RM)             | 12.5 | μL      |
| Primer <span> </span> : FIP        | 40   | pmol    |
| BIP                                | 40   | pmol    |
| Loop-F <sup>※4</sup>               | 20   | pmol    |
| Loop-B <sup>※4</sup>               | 20   | pmol    |
| F3                                 | 5    | pmol    |
| B3                                 | 5    | pmol    |
| Fluorescent Detection Reagent (FD) | 1.0  | μL      |
| <i>Bst</i> DNA Polymerase          | 1.0  | μL      |
| Distilled Water (DW)               | X    | μL (適量) |
| 合 計                                | 23.0 | μL/テスト  |

|                                       |      |         |
|---------------------------------------|------|---------|
| <Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) 使用の場合> |      |         |
| 2 × Reaction Mix. (RM)                | 12.5 | μL      |
| Primer <span> </span> : FIP           | 40   | pmol    |
| BIP                                   | 40   | pmol    |
| Loop-F <sup>※4</sup>                  | 20   | pmol    |
| Loop-B <sup>※4</sup>                  | 20   | pmol    |
| F3                                    | 5    | pmol    |
| B3                                    | 5    | pmol    |
| Fluorescent Detection Reagent (FD)    | 1.0  | μL      |
| Enzyme Mix. (EM)                      | 1.0  | μL      |
| Distilled Water (DW)                  | X    | μL (適量) |
| 合 計                                   | 20.0 | μL/テスト  |

※4：必ずしも必要ありませんが、Loop primer を入れることで増幅時間が約 1/3 に短縮されます<sup>7)</sup>。

- 分注後、チューブを軽く数回叩いて混合する（以下、タッピングと呼ぶ。）か、転倒混和、あるいはホルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の攪拌により十分混合した後、微量簡易遠心機に数秒かけて（以下、スピンドアウンと呼ぶ。）、これをマスターミックスとします。ホルテックスミキサーでの攪拌は過剰に行うと、酵素が失活する可能性がありますので、1 秒間×3 回を厳守してください。なお、調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

★ **サンプル溶液の調製には、EDTA 等の金属キレート化合物を含有する buffer (TE buffer 等) は用いないでください。詳細は【操作上の留意事項】をご参照ください。**

\* **★プライマーセットと組み合わせて使用する場合、マスターミックスの調製は各プライマーセットの調製に従ってください。**

- 操作法**（Loopamp DNA 増幅試薬キット又は Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) の手順に従ってください。）

\* **1) マスターミックスとサンプル溶液の混合（氷上で行ってください。）**

- 使用試薬キットに応じて、Loopamp 反応チューブにマスターミックスを分注し、サンプル溶液を添加して全量 25 μL とします。

|             | マスターミックス分注量 | サンプル溶液添加量 |
|-------------|-------------|-----------|
| DNA 増幅試薬キット | 23 μL       | 2 μL      |
| RNA 増幅試薬キット | 20 μL       | 5 μL      |

- ピベッティング又はキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドアウンします。また、混合の際は気泡が立たないように注意します。

#### 2) 増幅反応及び検出

- Loopamp 濁度測定装置（リアルタイム、エンドポイント）又はインキュベーター（温度精度が±0.5℃以内：ホットボンネット付）に調製、分注済みの反応チューブをセットし、60～65℃（63℃推奨）で 30～60 分間インキュベートします。（設計した primer によって条件が異なるので、あらかじめ条件検討が必要です。）
- 増幅反応後にヒートブロックを用いて酵素失活操作を行い、反応を停止させます。（**酵素の失活操作は必ず行ってください。**）

なお、酵素失活条件は使用キットにより異なります。

|  |
|--|
| DNA 増幅試薬キットの場合、80℃, 2min 又は 95℃, 2min<br>RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) の場合、80℃, 5min 又は 95℃, 2min |
|--|

\* (3) 増幅反応終了後、紫外線照射装置（波長 240～260nm, 350～370nm）を用い、反応チューブ底面より紫外線を照射して反応チューブの側面より目を眼鏡等で保護した状態で観察します。陽性コントロールと同様に緑色の蛍光を発すれば陽性、陰性コントロールと同様に蛍光を発しなければ陰性と判定します。

なお、蛍光の強さとサンプルのコピー数の間に相関はありません。

Manufacturer  **EIKEN CHEMICAL CO.,LTD.**  
143 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi, Japan

Read this instruction carefully before use

For research use only

Rev. January 2008 (Ver.4)



# Fluorescent Detection Reagent

## 【Characteristics】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a novel gene amplification method capturing the following characteristics: ① Only one enzyme is required and the amplification reaction proceeds under isothermal condition<sup>1),2)</sup>., ② It has extremely high specificity because of the use of 4 primers recognizing 6 distinct regions on the target., ③ It has high amplification efficiency and enables amplification within a shorter time., ④ It produces tremendous amount of amplified products which makes simple detection possible<sup>3),4),5),6)</sup>.

This reagent allows the amplification reaction to be visually detected, using the ultraviolet (UV) lamp, by adding this reagent to the amplification reagent of Loopamp DNA Amplification Kit or Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP) before use.

## 【Contents of the kit】

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| Fluorescent Detection Reagent (FD)*1 | 96 tests      |
| Fluorescent Detection Reagent (FD)*1 | 0.1 mL×1 tube |

\*1：The notation on reagent tube is shown in ( ) .

## 【Principle】

LAMP method can produce large amount of DNA amplification product as well as its by-product, pyrophosphate. Calcein included in the kit initially binds with manganese ion and thus remain quenched. When the amplification reaction proceeds, the manganese ion is deprived of Calcein by the generated pyrophosphate, which results in the emission of fluorescence. The free Calcein is apt to bind to magnesium ion in the reaction mixture so that it strengthens the fluorescence emission<sup>6)</sup>. This principle is applied in fluorescence detection of the LAMP reaction.

## 【How to use】

### 1. Materials required but not provided

- Loopamp DNA Amplification Kit or Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP)
- Sterilized tubes for master mix. preparation (0.5 mL, 1.5 mL)
- Micropipettes (0.5~10μL, 10~100μL, 100~1,000μL)
- Pipette tips with filter
- Loopamp Reaction Tube
- Aluminum rack for cooling tubes
- Ice (crushed ice) and ice box
- Centrifuge for micro-tubes
- Centrifuge for 8-connected tubes
- Vortex mixer
- Loopamp Realtime Turbidimeter, Loopamp End Point Turbidimeter\*2,3, or incubator with hot bonnet (temperature accuracy within±0.5℃)
- Heat block (for termination of the reaction)\*2
- UV lamp (wavelength at 240~260nm or 350~370nm)\*2
- Protective goggle or glass board

\*2：For the information about applicable instrument, reaction termination function and condition for UV irradiation, refer to Eiken GENOME SITE (URL：http://loopamp.eiken.co.jp/e/).

\*3：For the fluorescence visual detection, Loopamp Turbidimeter (Realtime or End Point) is used as an incubator. As for the detection, a UV irradiator is required.

## 2. Reagents preparation

- Take out the Fluorescent Detection Reagent stored at −20℃ (not frozen) and place the reagent directly on ice. Loopamp DNA Amplification Kit and Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP) should be thawed at room temperature before use and also kept them on ice.
- Preparation of master mix. (Operate on ice) .
  - Dispense the necessary amount of Fluorescent Detection Reagent (FD) and Loopamp DNA amplification reagents or Loopamp RNA amplification reagents into the master mix. preparation tube according to the table indicated below. Mix Fluorescent Detection Reagent (FD) , 2×Reaction Mix. (RM) , Primers and Distilled Water (DW) using vortex mixer, then add *Bst* DNA Polymerase or Enzyme Mix. (EM) .

## 【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

| 製品名               | 包装単位   | 貯蔵方法 | 有効期間 | 製品コード  |
|-------------------|--------|------|------|--------|
| Loopamp®蛍光・目視検出試薬 | 96テスト分 | −20℃ | 1年間  | LMP221 |

## 【参考文献】

- Notomi T. et al.：Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- Nagamine K. et al.：Clin. Chem. **47**, No.9, 1742–1743 (2001)
- Mori Y. et al.：Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150–154 (2001)
- 富田 憲弘 他：第73回 日本生化学会大会発表抄録集 (2000)
- 森 安義 他：第23回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2000)
- 富田 憲弘 他：第26回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003)
- Nagamine K. et al.：Molecular and Cellular Probes **16**, No.3, 223–229 (2002)
- 日本細菌学会バイオセーフティー委員会：日本細菌学雑誌, **54**, No.3, 667–715 (1999)

## \*\*【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口  
フリーダイヤル ☎0120-308-421

☆本試薬を用いた検出例は、Eiken GENOME SITE (URL：http://loopamp.eiken.co.jp/) 内の製品紹介ページをご参照ください。

## 【操作上の留意事項】

### 1. 試薬の取扱い

- 本試薬は必ず遮光下−20℃で保存してください。試薬の劣化を防止するために、使用時に箱から取り出してご使用ください。
- 試薬の調製、保存は氷上で行ってください。試薬を使用する際には、一旦スピンドウンしてチューブの管壁やキャップに付着している試薬を落とした後、十分混合し再度スピンドウンしてからご使用ください。
- 各試薬の操作上の留意事項をよく読んでご使用ください。

### 2. サンプルの調製に際しての留意点

サンプル溶液の調製には、EDTA 等の金属キレート化合物を含有する buffer (TE buffer 等) を用いないでください。金属キレート化合物が反応液に入るとマンガンイオンがキレートされ、錐型の増幅に関係なく蛍光を發します。またサンプルに Ca, Zn, Fe イオン等の金属イオンを多量に含む場合も誤判定の原因になりますので留意してください。

### 3. 反応チューブの取扱い方法

- 反応チューブは必ず専用の Loopamp 反応チューブをご使用ください。指定以外の反応チューブを使用した場合、光透過性の違いにより誤判定を招く可能性があります。
- 反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
- 反応チューブは用いる前にキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認してください。反応チューブにキズ・ヒビ等があると、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。Loopamp 濁度測定装置 (リアルタイム、エンドポイント) 又はインキュベーターの反応ブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体へ漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。
- 反応チューブにマスターミックス、サンプル溶液が添加されていることを、他のチューブとの液量比較で確認してください。

### 4. 検出に際しての留意点

- 蛍光目視判定は、増幅反応、並びに酵素失活操作後に行ってください。酵素失活操作を怠った場合誤判定となる可能性があります。記録が必要な場合は、判定時にデジタルカメラなどを用いて画像として保存してください。
- 長時間の紫外線照射は避けてください。蛍光バックグラウンドの上昇、あるいは強いUV の長時間照射による消光など誤判定を招く恐れがあります。

### 5. 使用後の反応チューブの取扱い

- 反応後のチューブを装置から取り出すときにチューブのキャップが開かないよう、慎重に取り出してください。他検体の増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、検査環境そのものを汚染し、汚染を除去しない限り、以後の検査で正しい結果が得られなくなる可能性があります。
- 反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。

## 【使用上又は取扱い上の注意】

- LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の DNA がごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となる恐れがあります。このようなコンタミネーションを回避するため、試薬及びサンプルの調製はクリーンベンチ等を使用してください。
- 蛍光目視判定時に紫外線照射装置を使用する場合、ランプより放射される紫外線 (殺菌線) は有害で、点灯中のランプを短時間見つめただけでもあとで目が痛くなり、結膜炎に似た症状を起こしますので、紫外線を直接目に入れることは避けてください。また点灯中のランプを見る必要があるときは、必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけて判定してください。
- 感染性のある検体を扱う場合、その検体採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください<sup>8)</sup>。
- Loopamp 反応チューブ、マスターミックス調製用滅菌チューブにはUV 照射しないでください。UV 照射による変色・変質等で LAMP 反応に影響をもたらす場合があります。
- 本キットは、学術研究目的のみにご使用ください。
- 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありますので、本キットの使用に当たっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。

＊7. 本キットの性能に由来しない事由 (操作方法を誤った場合等) による誤った結果、判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。

8. 外箱に表示の使用期限 (Exp. Date) 内に使用してください。

＊9. 試薬チューブはPP、キットケースは紙を主な材質としています。廃棄の際は医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

\*\* 製造販売元  **栄研化学株式会社**  
栃木県下都賀郡野木町野木143番地

| <Loopamp DNA Amplification Kit>    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| 2 × Reaction Mix. (RM)             | 12.5 μL              |
| Primer：FIP                         | 40 pmol              |
| BIP                                | 40 pmol              |
| Loop-F *4                          | 20 pmol              |
| Loop-B *4                          | 20 pmol              |
| F3                                 | 5 pmol               |
| B3                                 | 5 pmol               |
| Fluorescent Detection Reagent (FD) | 1.0 μL               |
| <i>Bst</i> DNA Polymerase          | 1.0 μL               |
| Distilled Water (DW)               | X μL (ad q.s.)       |
| <b>Total</b>                       | <b>23.0 μL /test</b> |

| <Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP) > |                      |
|--|----------------------|
| 2 × Reaction Mix. (RM)                     | 12.5 μL              |
| Primer：FIP                                 | 40 pmol              |
| BIP  | 40 pmol              |
| Loop-F *4                                  | 20 pmol              |
| Loop-B *4                                  | 20 pmol              |
| F3   | 5 pmol               |
| B3   | 5 pmol               |
| Fluorescent Detection Reagent (FD)         | 1.0 μL               |
| Enzyme Mix. (EM)                           | 1.0 μL               |
| Distilled Water (DW)                       | X μL (ad q.s.)       |
| <b>Total</b>                               | <b>20.0 μL /test</b> |

\*4：Loop primers are not necessarily required. However, the use of Loop primers shortens the amplification time by about 1/3<sup>7)</sup>.

- After dispensing, gently tap the tubes for a few times (hereinafter referred to as tapping) , or mix the solution by repeatedly inverting the tube, or mix by vortex mixer at about 1 second×3 times. After mixing well, centrifuge the tubes for a few seconds (hereinafter referred to as spin down) . And the mixture can be used as the master mix. for the reaction. Notice that too much mixing with the vortex mixer might inactivate the enzyme, and assure that vortexing is conducted at 1 second×3 times. The prepared master mix. should be used as soon as possible.

★ For the preparation of the sample solution, do not use the buffer containing the chelating reagent such as TE buffer. For details, refer to the 【Caution for use】 .

★ When used in combination with Loopamp Primer Sets, follow the preparation instructions of each primer set to prepare the master mix.

## 3. Operation procedure (Follow the procedure of Loopamp DNA Amplification Kit or Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP) )

1) Mixing of master mix. and sample solution (Operate on ice)

- Dispense necessary amount of master mix. into each Loopamp Reaction Tube according to the reagent to be used as in the following table. Then add sample DNA or RNA to the master mix. and the volume of the solution should be 25 μL in total.

|                                 | Master mix. | Sample solution |
|---------------------------------|-------------|-----------------|
| DNA Amplification Kit           | 23 μL       | 2 μL            |
| RNA Amplification Kit (RT-LAMP) | 20 μL       | 5 μL            |

- Mix the solution well by pipetting or tapping the tube with the cap closed and then spin down. Be careful not to cause air-bubbles when mixing.

2) Amplification reaction and its detection.

- Set the reaction tubes in Loopamp Turbidimeter(Realtime or End Point) or the incubator with hot bonnet (temperature accuracy within±0.5℃), and incubate them at 60~65℃ for 30~60 minutes (The reaction condition is dependent upon the characteristics of the primer used, therefore examine the optimum condition beforehand) .
- After the amplification reaction, terminate the reaction by inactivating the enzyme using the heat-block (Never fail to inactivate the enzyme) . The following different conditions are employed for the inactivation of the enzyme for DNA Amplification Kit and RNA Amplification Kit (RT-LAMP) .

|  |
|--|
| Loopamp DNA Amplification Kit ; at 80℃ for 2min or 95℃, 2min<br>Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP) ; at 80℃ for 5min or 95℃, 2min |
|--|