



DNA増幅試薬 D

本製品は研究用試薬です。診断又はその補助を目的としては使用しないでください。
この説明書をよく読んでから使用してください。

【はじめに】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 等温で遺伝子増幅反応が進行する^{1), 2)}、② 6 領域を認識する 4 種類のプライマー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^{3), 4)}、等の特徴を有する遺伝子増幅法です。

本製品は、自ら設計した LAMP 用プライマー、または別売のプライマーセット製品と組み合わせて、LAMP 法により標的遺伝子配列を増幅・検出するためのキットです。乾燥剤型化された DNA 増幅試薬を、プライマー溶液と鋳型 DNA を含むサンプル溶液で溶解し、一定温度に保つだけで標的遺伝子を増幅することができます。

【内容】

	96テスト分
Dried DNA Amplification Reagent	48 tubes ×2

【測定原理】

LAMP 法は、4 種類のプライマーと鎖置換活性を持つ DNA Polymerase を用いて反応を行う等温遺伝子増幅法です。4 種類のプライマーのうち、2 種類の inner primer は、その 3'側と 5'側で標的遺伝子配列中の異なる 2 領域を認識するプライマーで、5'側の配列はその 3'側からの伸長反応で合成した相補鎖鎖領域内にアニールするよう設定します。

増幅反応は、この inner primer により生成するステムループ構造からの自己伸長反応と、ループ部分に新たにアニールした inner primer からの鎖置換合成反応を繰り返すことで進行します。これにより、LAMP 法は用いる酵素が 1 種類であるにも関わらず、等温増幅を実現した方法です。

尚、反応原理の詳細については、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

【使用方法】

1. 必要な器具・器材・試料等

(本製品には含まれていませんので別途用意してください。)

- 1) プライマーミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- 2) マイクロピペット
- 3) フィルター付ピペットチップ (DNase, RNase フリー)
- 4) 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 5) 氷 (クラッシュアイス) 及びアイスボックス
- 6) 微量簡易遠心機
- 7) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- 8) ホルテックスミキサー
- 9) Loopamp コントロールセット DNA (栄研化学株式会社別売品) *1
Primer mix dBP (PM dBP)
Positive control dBP (PC dBP)
Negative control (NC)

A. リアルタイム濁度検出
リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用) *2

- B. 蛍光目視検出
- 1) Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社別売品)
 - 2) リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用) *2、又はインキュベーター (温度精度が ±0.5°C 以内: ホットボンネット付)
 - 3) ヒートブロック (酵素失活用) *2
 - 4) 紫外線照射装置 (波長 240~260nm, 350~370nm) *2
 - 5) 広幅の眼鏡又は防護面

*1: 本製品と組み合わせて使用するコントロール反応用キットです。

*2: 応答装置、反応停止機能、紫外線照射の条件については、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

2. プライマーの設計

LAMP 法による増幅には適切なプライマー設計が重要なカギとなります。設計にあたっては、LAMP 法専用のプライマー設計支援ソフト「LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer Explorer」を、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) よりご利用いただくことができます。

また、プライマーは精製度が高いほど反応速度は速くなり、反応自体も安定します。

したがって、プライマーの一次スクリーニングを目的として合成する場合は簡易カラム精製グレード以上、プライマーを決定する際及び決定後は、少なくとも FIP, BIP については HPLC 精製グレードによる合成を推奨します。

3. 試薬の調製方法

1) 必要本数 (サンプル数+コントロール数) の Dried DNA Amplification Reagent を取り出します。反応チューブを切断する場合は、引きちぎる等の方法で切断せず、乾燥試薬に衝撃を与えないようにはさみ等で切断してください。残りの反応チューブは直ちに元のアルミパックで密封して保存します。

2) プライマーミックスの調製 (水上操作)

別途用意したプライマーミックス調製用滅菌チューブに各プライマーを必要なテスト数分、下表の割合 (1 テストあたり) で調製します。LAMP 反応液として合計 25.0 μL となるよう、プライマーミックスとサンプル溶液の容量を調整してください。

尚、別売のプライマーセットと組み合わせて使用する場合は、各プライマーセットの使用説明書に従ってください。

○ サンプル反応用 (例)

<試薬>	<用量>
Distilled Water (DW)	X μL (適量)
プライマー: FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
LF*3	20 pmol
LB*3	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
合計	15.0 μL / テスト

*3: 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⁵⁾。

○ 本製品のコントロール反応用 (Loopamp コントロールセット DNA)

<試薬>	<用量>
Primer mix dBP (PM dBP)	15.0 μL / テスト

3) チューブを軽く叩いて混合する (タッピング) か、又は転倒混和、あるいはホルテックスミキサー 1 秒間×3 回攪拌し、スピンドダウン後プライマーミックスとします。
(水上保存)

4. 操作方法

(水上操作)

反応チューブ 1 本あたりプライマーミックス 15.0 μL を分注

↓ コントロール反応用には PM dBP を 15.0 μL を分注

サンプル溶液、またはコントロールをそれぞれ 10.0 μL 添加

(LAMP 反応液として合計 25.0 μL)

↓ 陰性コントロールには Negative control (NC) を、
陽性コントロールには Positive control dBP (PC dBP) を使用

蓋を閉めた後、反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒した状態のまま 2 分間氷上で放置する。

↓
反応チューブを 5 回転倒混和後、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドダウンする。

↓
<LAMP 反応>

リアルタイム濁度測定装置又はインキュベーターの

反応ブロックにセットして反応をスタート

↓
60~67°C, 30~60 分間*4
本製品のコントロール反応は 66°C, 40 分間

↓
酵素失活 (80°C, 5 分間又は 95°C, 2 分間)

(リアルタイム濁度測定装置では自動処理されます。)

↓
濁度測定・判定

*4: 設計したプライマーによって至適条件が異なるので、条件検討が必要になります。

5. 検出

- A. リアルタイム濁度検出
リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用) を用いることで、リアルタイム検出ができます。操作の詳細は装置の添付文書及び取扱説明書をご参照ください。
- B. 蛍光目視検出
別売の Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いることで目視判定が可能⁴⁾。詳細は蛍光・目視検出試薬の使用説明書をご参照ください。
- C. 市販の蛍光色素を用いた検出
市販の蛍光色素を用いて、蛍光測定装置での検出も可能です。
- D. RNA からの増幅
cDNA 合成反応後の検体を用いれば、RNA からの増幅も可能です。

6. 増幅曲線パターン

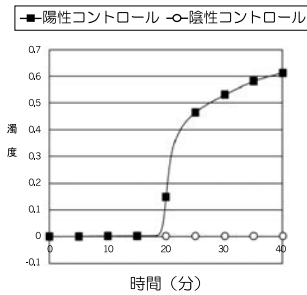


図1. コントロールの増幅曲線パターン

<測定にあたっての注意>

- LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、標的遺伝子や増幅産物が極微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となるおそれがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、検体採取及び核酸抽出操作は本製品を使用する部屋とは別の部屋で実施するか、あるいは検査区域を分割して別のエリアで行ってください。必要に応じて、クリーンベンチの使用又は手袋やアイソレーションガウンの着用等でコンタミネーションを防ぐ措置をとってください。
- 本製品を取り扱う際には、微生物や核酸分解酵素（DNase, RNase）のコンタミネーションを避けてください。
- 乾燥試薬の溶解は確実に行ってください。溶解が不十分な場合、感度が低下する等十分な性能が得られないことがあります。特に転倒した状態では2分以上放置しないでください。
- サンプル溶液を混合後、反応液の液面に気泡があると誤判定の原因となるので、スピンドウンして、測定前に取り除いてください。
- 反応後のチューブの蓋は決して開けないでください。特に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蓋が開かないよう、慎重に取り出してください。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、測定環境そのものを汚染し、汚染を完全に除去しない限り、以後正しい結果が得られなくなる可能性があります。
- 電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。

【取扱い上（危険防止）の注意】

- 本製品は、体外診断用医薬品ではありません。
- 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策を実施してください⁶⁾。
- 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）は有害なので、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。
- 試薬が誤って目や口、皮膚に付着したときは、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けてください。

【使用上の注意】

- 検体によっては、その成分により LAMP 反応を阻害し正しく測定されない場合があります。
- 本製品は凍結及び温度の急激な変化は避け、指定の貯蔵方法で保管してください。
- 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・ヒビ等があると正しく測定できないばかりか、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。リアルタイム濁度測定装置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。
- 反応チューブの蓋（リップの内側）に検出試薬が乾燥・保持されていますので、蓋に過度の衝撃を加えないように注意してください。また、蓋の内側を直接手で触らないように注意してください。
- 余った反応チューブは直ちに元のアルミパックに戻し、きちんと密閉されていることを確認し、指定の貯蔵方法で保管してください。
- Positive control dBP (PC dBP) 及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して保管してください。
- 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、本製品の使用にあ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もとで検査を実施してください。
- 本製品の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、弊社は一切の責任を負いません。
0. 本製品は使用期限内に使用してください。
1. 本製品の容器、付属品等を再利用又は他の目的に転用しないでください。

2. 反応チューブ、プライマーマックス調製用滅菌チューブは紫外線照射しないでください。紫外線照射による変色・変質等で誤った結果をもたらす場合があります。

【廃棄上の注意】

1. 反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニールの袋を二重に施し適切に処理してください。増幅産物の飛散防止のため、**廃棄の際にオートクレープ処理は行わないでください。**
2. 反応チューブはポリプロピレン（PP）、反応チューブ用トレイはPET、アルミパックはアルミ、キットケースは紙を主な材質としています。
3. 未使用及び使用後の本品や容器及び器具類は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律や水質汚濁防止法等に従い、各施設の責任において処理してください。

【貯蔵方法・有効期間・包装単位・製品コード】

製品名	貯蔵方法	有効期間	包装単位	製品コード
Loopamp™ DNA 増幅試薬 D	1~30℃	1年間	96テスト分	LMP207

【主要文献】

- 1) Notomi T. et al.,: Nucleic Acids Research, **28** (12) : e63, 2000.
- 2) Nagamine K. et al.,: Clin. Chem, **47** (9) : 1742-1743, 2001.
- 3) Mori Y. et al.,: Biochem. Biophys. Res. Commun, **289** (1) : 150-154, 2001.
- 4) Tomita N. et al.,: Nat Protoc, **3** (5) : 877-882, 2008.
- 5) Nagamine K. et al.,: Molecular and Cellular Probes, **16** (3) : 223-229, 2002.
- 6) 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** (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



DNA Amplification Reagent D

This product is a reagent for research purpose. Do not use this product for making or supporting a diagnosis. Read this explanatory leaflet carefully before use.

Introduction

The LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a gene amplification technique characterized by (1) isothermal gene amplification reaction^{1), 2)}, (2) high specificity due to the use of 4 primers recognizing 6 regions, (3) high amplification efficiency resulting in amplification in a short time, (4) a large amount of amplification product facilitating simple detection^{3), 4)}.

This product is designed for amplifying and detecting the target gene sequence with the LAMP method by combining with an originally designed LAMP primer or a separately provided primer set product. This product is a dry formulated DNA amplification reagent and allows the amplification of the target gene only by dissolving the amplification reagent in a primer solution and a sample solution containing template DNA and keeping the reagent at a constant temperature.

Contents

	For 96 tests
Dried DNA Amplification Reagent	48 tubes × 2

Measurement Principle

The LAMP method is an isothermal gene amplification technique using 4 primers and a DNA polymerase with strand displacement activity to cause a reaction. Of the 4 primers, 2 inner primers recognize 2 different regions in the target gene sequence on their 3' and 5' sides. The sequence on the 5' side is set so that it will be annealed in the complementary strand region synthesized by the elongation reaction from the 3' side.

This amplification reaction proceeds by alternating the self-elongation from the stem loop structure generated from the inner primer and strand displacement synthesis from the inner primer annealed to the loop part. This process of the LAMP method allows isothermal amplification using only 1 enzyme.

For more information on the reaction principle, please visit the Eiken GENOME SITE (URL; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>).

Instructions for use

1. Essential apparatus, equipment, and reagents, etc.

(Not included in the product. Prepare them separately)

- 1) Sterilized tube for preparing primer mix (0.5 mL or 1.5 mL)
 - 2) Micropipette
 - 3) Pipette tip with filter (DNase, RNase-free)
 - 4) Aluminum rack for cooling reaction tubes
 - 5) Ice (crushed ice) and ice box
 - 6) Simple microvolume centrifuge
 - 7) 8-microtube simple centrifuge
 - 8) Vortex mixer
 - 9) Loopamp control set DNA (separately provided by Eiken Chemical) ※1
 - Primer mix dBP (PM dBP)
 - Positive control dBP (PC dBP)
 - Negative control (NC)
- A. Real-time turbidity detection
Real-time Turbidimeter (designed for LAMP method) ※2
- B. Fluorescent/visual detection
- 1) Loopamp fluorescent/visual detection reagent (separately provided by Eiken Chemical)
 - 2) Real-time Turbidimeter (designed for LAMP method) ※2 or incubator (with a temperature precision of within $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; with hot bonnet)
 - 3) Heat block (for enzyme deactivation) ※2
 - 4) Ultraviolet irradiating equipment (wavelength: 240 to 260 nm and 350 to 370 nm) ※2
 - 5) Wide eyeglasses or shield

※1 : Control set to be used with this product

※2 : For more information on compatible equipment, deactivation (or inactivation), and ultraviolet irradiation conditions, please visit the Eiken GENOME SITE (URL; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>).

2. Primer design

Appropriate primer design is an important factor to the amplification by the LAMP method. Primer design-support software dedicated for the LAMP method, "LAMP Method Primer Design Support Software, Primer Explorer," is available for designing primers on the following website: Eiken GENOME SITE (URL; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>).

To select appropriate grade for purification of primer, please note that the rate of reaction is increased and reaction becomes more stable as the degree of refining for a primer is increased. Therefore, simple column refining or higher grade is recommended for synthesizing primers for primary screening. HPLC refining grade is recommended for deciding a primer or after decision for at least FIP and BIP.

3. Reagent preparation method

- 1) Take a necessary number (total number of samples and controls) of the Dried DNA Amplification Reagent. To cut a bridge of reaction tube, use scissors to avoid any impact on the dried reagent (do not tear the tube). Restore the remaining reaction tube to the original aluminum pack and seal it for storage.

- 2) Preparation of primer mix (**operation on ice**)

Prepare a necessary number of each primer for the test in a separately prepared sterilized tube for preparing primer mix according to the ratio in the following table (per test). Adjust the volume of the primer mix and sample solution so that the total volume of the LAMP reaction solution will be 25.0 μL .

If a separately provided primer set is combined, follow the instruction manual of the primer set.

- For sample reaction (example)

<Reagent>	<Dose>
Distilled Water (DW)	X μL (Appropriate amount)
Primer : FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
LF ^{※3}	20 pmol
LB ^{※3}	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
Total	15.0 $\mu\text{L}/\text{test}$

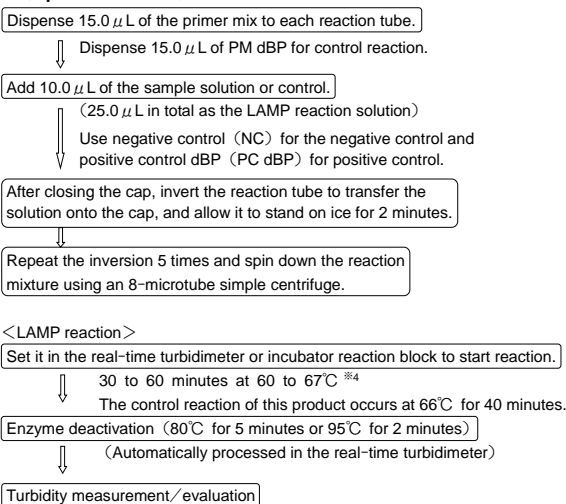
※3 : The use of Loop primer, which is not essential, reduces amplification time to approximately one third⁵⁾.

- For control reaction of this product (Loopamp control set DNA)

<Reagent>	<Dose>
Primer mix dBP (PM dBP)	15.0 $\mu\text{L}/\text{test}$

- 3) Mix by tapping or inverting the tube or using a vortex mixer for 1 second 3 times and spin down before using as the primer mix. (**Operation on ice**).

4. Operating procedure (Operation on ice)



※4 : The optimum condition for the designed primer varies and has to be individually examined.

5. Detection

A. Real-time turbidity detection

The target gene can be detected in real time using the real-time turbidimeter (designed for the LAMP method). Refer to the package insert or operation manual, etc. for the detailed operating procedure.

B. Fluorescent/visual detection

The target gene can be visually evaluated using the separately provided Loopamp fluorescent/visual detection reagent⁴⁾. Refer to the instruction manual of the fluorescent/visual detection reagent for details.

- C. Detection with commercially available fluorescent pigment
The target gene can also be detected using a commercially available fluorescent pigment and fluorescence measuring device.
- D. Amplification from RNA
The target gene can be amplified from RNA using the specimen after the cDNA synthesis reaction.

6. Amplification curve pattern

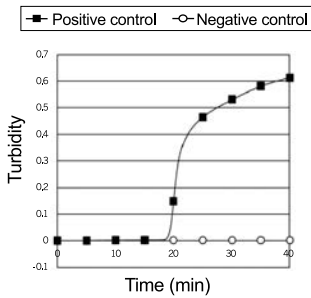


Figure 1. Control amplification curve pattern

<Precautions for measurement>

1. Because the LAMP reaction is very sensitive, any contamination with only a minute amount of the target gene or amplification product may result in an incorrect result. To avoid such contamination, the use of this product and specimen collection/nucleic acid extraction procedure should be performed in separate rooms or in different areas by partitioning the laboratory area. Take appropriate measures to prevent contamination including the use of clean benches, gloves, and isolation gowns, as required.
2. Avoid the contamination by microorganisms or nucleic acid degrading enzymes (such as DNase and RNase) in handling this product.
3. Completely dissolve the dry reagent. Incomplete dissolution may result in poor performance including low sensitivity. Do not leave more than 2 minutes in state of inverting reaction tubes.
4. Air bubbles may appear on the liquid level of the reaction solution after mixing the sample solution. Remove them to prevent measurement errors by spinning down the reaction mixture.
5. Never open the tube cap after reaction. Particularly, carefully remove the tube from the equipment so as not to open the cap after reaction. The contamination with amplification products not only results in an erroneous decision, but also causes the contamination of the measurement environment. Such contamination may persistently inhibit correct measurement unless it is completely eliminated.
6. Avoid handling amplification products using electrophoresis.

[Precautions for handling (hazard prevention)]

1. This product is not designed as an in vitro diagnostic (IVD).
2. Carefully handle specimens as potentially infectious substances and take necessary biohazard prevention measures⁶⁾.
3. Take care not to directly gaze at the ultraviolet ray (sterilizing ray) from the lamp of the ultraviolet irradiation device for fluorescent/visual evaluation because it might cause serious damage. When it is necessary to gaze at the lamp that is on, make sure to do that through a glass plate or using wide eyeglasses or shield.
4. If the reagent accidentally enters the eyes or mouth or attaches to skin, immediately rinse it off with a large amount of water and seek medical treatment, if needed.

[Precautions]

1. Some specimens may inhibit the LAMP reaction and produce incorrect results because of their components.
2. This product should be stored as specified while avoiding **freezing** or sudden change in temperature.
3. Carefully handle reaction tubes because they are fragile.
4. Visually check reaction tubes for flaws or chaps. Flaws or chaps of reaction tubes, if any, may result in incorrect measurements or the contamination of measurement devices. The damage of a tube in the real-time turbidimeter or incubator reaction block may result in the leakage of the reaction solution, causing unrecoverable contamination or breakdown.
5. Take care not to apply excessive impact to the cap of the reaction tube (inside of the rib) because the detection reagent is kept dry and retained in it. Avoid the direct contact between the inside of the cap and hands.
6. Restore the remaining reaction tube to the original aluminum pack. Confirm that it is surely sealed and store it as specified.
7. Keep the positive control dBP (PC dBP) and potentially positive specimens away from other reagents.
8. Perform gene test with this product only under the supervision of experts with the knowledge and experience of gene test because the lack of knowledge or experience may result in incorrect judgment of the test result.
9. 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.
10. Use this product within the expiration date.
11. Do not recycle the containers or accessories of this product or use them for other purposes.

12. Do not expose reaction tubes and tubes for preparing primer mix to UV light. A change in color or degeneration caused by ultraviolet lamp sometimes results in misjudgment.

[Precautions for disposal]

1. Appropriately dispose of tubes after reaction with the cap closed by putting them in double plastic bags that can be incinerated or sealed. To prevent dispersion of amplification products, **do not autoclave tubes before disposal**.
2. Reaction tubes are mainly made of polypropylene (PP). The tray for reaction tubes is mainly made of PET. The aluminum pack is mainly made of aluminum. The case is mainly made of paper.
3. Dispose of this product, containers, and materials before or after use on the responsibility of the laboratories in compliance with applicable laws on waste disposal and cleaning and water pollution prevention law.

[Storage method, shelf life, packaging unit, and product code]

Product name	Storage method	Shelf life	Package unit	Product code
Loopamp™ DNA Amplification Reagent D	1-30°C	1 year	For 96 tests	LMP207

[References]

- 1) Notomi T. et al., : Nucleic Acids Research, **28** (12) :e63, 2000.
- 2) Nagamine K. et al., : Clin. Chem, **47** (9) :1742-1743, 2001.
- 3) Mori Y. et al., : Biochem. Biophys. Res. Commun, **289** (1) :150-154, 2001.
- 4) Tomita N. et al., : Nat Protoc, **3** (5) :877-882, 2008.
- 5) Nagamine K. et al., : Molecular and Cellular Probes, **16** (3) :223-229, 2002.
- 6) The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology) : Japanese Journal of Bacteriology. **54** (3) :667-715, 1999.

Manufacturer



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

143 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan

Date of Revision : April 2015 (Ver.1)