

3) Detection

★ **In order to prevent contamination, the following procedure (1) or (2) is recommended for detection and data recording, which enables the detection in a closed tube.**

- (1) Real-time turbidity detection
Real-time turbidity detection can be carried out with the Loopamp Realtime Turbidimeter. For information about the equipment, visit the Eiken GENOME SITE（URL：http://loopamp.eiken.co.jp/e/）. For the detailed operation of the equipment, refer to the instruction manual of the equipment.
- (2) End-point turbidity detection
End-point turbidity detection can be conducted with the Loopamp EndPoint Turbidimeter. For more information, refer to the instruction manual. Notice；There is no relationship between the end-point turbidity values and the initial amount of the template.
- (3) Visual florescence detection
Visual florescence detection can be achieved by using the Loopamp Fluorescent Detection Reagent (available for sale separately)[®]. UV lamp (wavelength at 240～260nm or 350～370nm), protective goggle or glass board are required for florescence detection .
When UV lamp of wavelength around 230nm is used, negative sample may look like radiating fluorescence. Judgment should be done by comparing fluorescence of sample with that of positive and negative controls.
When output of UV lamp is too strong, negative control may look like radiating fluorescence. In such a case, take the UV lamp away from the reaction tube or change the angle of the reaction tube so that the difference between positive and negative controls becomes observable.
The incubation can be carried out in the Loopamp Turbidimeters (Realtime or End Point) or in the commercially available incubators (required temperature accuracy within±0.5℃：with hot bonnet.) .
Turbidity detection is also compatible with visual florescence detection using fluorescent reagents. For more information, refer to the package insert for Loopamp Fluorescent Detection Reagent.
- (4) Electrophoresis
In order to avoid contamination, extra care should be taken when handling the amplification products during electrophoresis process.
 - ・ 0.5～2μL of the reaction solution is applied for electrophoresis with the 2 % agarose gel.
 - ・ The gel is stained with ethidium bromide (EtBr) or SYBR Green I .
 - ・ A ladder pattern can be observed in electrophoresis, since the amplified products consist of various size of inverted repeats of the target sequence on the same strands.

【Caution for use】

1. Handling the kit

- 1) This reagent kit should be stored at —20℃. To prevent the reagents from deterioration, only take out the necessary amount of reagents from the freezer before use (No decline was observed in the kit performance even after repeated freezing and thawing for 20 times in the quality control testing. But, in order to maintain the reagents performance, keep off unnecessary freezing and thawing.) .
- 2) Thaw the reagents at room temperature and keep them on ice for reagents preparation and later use. Before use, spin down the tubes to drop down the solution staying on the tube wall or on the cap, mix well the solution and spin down again. Notice that fierce mixing should be avoided as it can inactivate the Enzyme Mix. (EM) .

2. Caution for visual florescence detection

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

3. Handling reaction tubes

- 1) Only use the specified Loopamp Reaction Tube for turbidity or florescence detection. Other reaction tubes might have different optical transparency and can cause misjudgment.
- 2) Take full care when handling reaction tubes, as they are vulnerable to scratches or damages.
- 3) Check carefully to see if the 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.
- 4) 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 amplification reaction

Since bubbles in the solution will interfere the turbidity measurement and cause false judgment, try not to cause any bubble when mixing the master mix. and the sample solution. If bubbles are present, spin down to get rid of the bubbles.

5. Handling reaction tubes after use

- 1) 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.
- 2) Keep the cap of the used tube completely closed and dispose it, according to the relevant regulations and 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】

1. 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. Conduct the detection of the amplification using turbidimeter (for end-point or real-time detection) with which the detection as well as the reaction can be accomplished in a tube with its cap closed. Also, to avoid the possible contamination from the amplified product when the product is taken out from the tube for the electrophoresis detection. Conduct electrophoresis in a room different from that for sample and reagent preparation.
2. 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.
3. When handling the sample, always abide by the biohazard counter measures[®].
4. Since RNA is vulnerable to RNase, handle with care. There is possible contamination of RNase from such as sample specimens (blood and urine, etc.), tissues, experimental tools, reagents, water, the operator’s saliva or perspiration. RNase is stable against heat and might maintain its activity even after autoclave sterilization. In order to avoid RNase contamination, the following points should be concerned.
 - ・ Designate exclusive operation area and tool for RNA treatment.
 - ・ Use sterilized disposable tubes and pipette tips.
 - ・ Use RNase free water (for example, DEPC treated water) .
 - ・ The operator must wear gloves and masks to prevent RNase contamination to the specimen from his or her saliva and perspiration.
5. Do not expose the Loopamp Reaction Tube, master mix, preparation tubes to UV light. A change in color or degeneration caused by ultraviolet lamp sometimes results in misjudgment.
6. This kit is designed for research use only.
7. 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.
8. 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.
9. Use the kit before the expiration date, which is labeled on the outer box (Exp.Date) .
10. 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 [®] RNA Amplification Kit (RT-LAMP)	48tests	—20℃	1 year	LMP244
	96tests			LMP245
	192tests			LMP246

【References】

- 1) Notomi T. *et al.* : Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K. *et al.* : Clin. Chem. **47**, No. **9**, 1742-1743 (2001)
- 3) Mori Y. *et al.* : Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1,150-154 (2001)
- 4) Tomita N. *et al.* Abstract for The 73rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (2000)
- 5) Mori Y. *et al.* Abstract for the 23rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2000)
- 6) Tomita N. *et al.* Abstract for the 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2003)
- 7) Nagamine K. *et al.* : Molecular and Cellular Probes **16**,No.3,223-229 (2002)
- 8) 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)

Licensed under U.S. Patent #5,814,506.

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

3LP2419-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）

Loopamp[®] LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) Ⅱ RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP)

【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^{1), 2)}、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^{3), 4), 5), 6)}、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本キットは、LAMP 法を用いて RNA を鋳型に核酸を増幅する RT-LAMP 反応のための簡易試薬キットです。逆転写酵素と DNA 合成酵素を混合した Enzyme Mix.を用いることにより、サンプルと試薬を一定温度（60～65℃、通常は 63℃）、一定時間（標準で 1 時間）の 1 ステップで RT-LAMP 反応を行うことができます。

【キット内容】

		48ﾌﾏﾄ分	96ﾌﾏﾄ分	192ﾌﾏﾄ分
(1)	2 × Reaction Mix. ^{※2} (RM) ^{※1}	0.6 mL	1 tube	2 tubes
(2)	Enzyme Mix. ^{※3} (EM) ^{※1}	50 μL	1 tube	2 tubes
(3)	Distilled Water (DW) ^{※1}	1.0 mL	1 tube	2 tubes
(4)	Primer Mix.RNA ^{※4} (PM RNA) ^{※1}	30 μL	1 tube	—
(5)	Positive Control RNA ^{※4} (PC RNA) ^{※1}	60 μL	1 tube	—

- ※1：（ ）内は、試薬チューブに記載されている表示です。
- ※2：組成（2 ×）
- | | |
|---|-------------|
| Tris-HCl (pH8.8) | 40 mM |
| KCl | 20 mM |
| MgSO ₄ | 16 mM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 mM |
| Tween20 | 0.2 % |
| Betaine | 1.6 M |
| dNTPs | 2.8 mM each |
- ※3：Bst DNA Polymerase と AMV reverse transcriptase をミックスしたものです。
- ※4：96 テスト分と 192 テスト分には Primer Mix. RNA 及び Positive Control RNA は含まれておりません。

【測定原理】

LAMP 法は、4 種類の primer と鎖置換活性を持つ DNA Polymerase を用いて反応を行う新規な等温核酸増幅法です。4 種類の primer のうち、2 種類の inner primer は、その 3’側と 5’側で標的核酸配列中の異なる 2 領域を認識する primer 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。また RNA を鋳型とした場合も、あらかじめ逆転写酵素を加えるだけで、cDNA の合成から核酸の増幅まで（RT-LAMP 反応）を 1 ステップで行うことができます。
なお、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。

【使用法】

1. 必要な器具・装置・試薬（キットに含まれていませんので、別途用意してください。）
 - 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）
 - ビベット（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
 - ボルテックスミキサー

< リアルタイム濁度検出の場合 >
○ Loopamp リアルタイム濁度測定装置 ^{※5}

< エンドポイント濁度検出の場合 >
○ Loopamp エンドポイント濁度測定装置 ^{※5}

< 蛍光目視検出の場合 >
○ Loopamp 蛍光・目視検出試薬
○ Loopamp リアルタイム濁度測定装置 ^{※5}、Loopamp エンドポイント濁度測定装置 ^{※5}、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）^{※5}
- * ○ 紫外線照射装置（波長 240～260nm, 350～370nm）^{※5}
- 広幅の眼鏡又は防護面

※5：適応装置、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. Primer の設計

LAMP 法による増幅にとって適切な primer 設計が重要なカギとなりますので、設計にあたっては LAMP 法専用の primer 設計支援ソフトをご利用ください。primer 設計支援ソフトは “Net Laboratory” の「LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer Explorer」（http://venus.netlaboratory.com/partner/lamp/）をご参照ください。
また、primer 合成のグレードについては、LAMP 法の場合、primer の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。従って、primer 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であれば検討可能ですが、primer 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

- 1) —20℃で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。
- 2) マスターミックスの調製（氷上で行ってください。）
 - (1) 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに各試薬を必要なテスト数分、下表の割合（1 テストあたり）で分注します。

○ サンプル反応	
<試薬>	<用量>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer： FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
Loop-F ^{※6}	20 pmol
Loop-B ^{※6}	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL
Distilled Water (DW)	X μL（適量）
合 計	20.0 μL／テスト

※6：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⁷⁾。

○ コントロール反応	
<試薬>	<用量>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer Mix. RNA (PM RNA)	2.5 μL
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL
合 計	20.0 μL／テスト

★ 蛍光目視検出の場合は、上記マスターミックスに別売の Loopamp 蛍光・目視検出試薬を 1μL 添加し、トータル 20μL としてください。

* ★ プライマーセットと組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。

- (2) 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、又は転倒混和、あるいはボ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。ボ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。
- #### 4. 操作法
- 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。）
 - (1) Loopamp 反応チューブに、サンプル反応用とコントロール反応用、各々のマスターミックス 20μL を分注します。
 - (2) サンプル溶液 5μL を添加し全量 25μL とします。またコントロール反応用としては、陰性コントロールには Distilled Water (DW) 5μL を、陽性コントロールには Positive Control RNA (PC RNA) 5μL を使用します。このとき、ビベッティング又はキャップを開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

- (1) 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ず。）
- (2) 80℃、5 分間又は 95℃、2 分間インキュベートすることにより、酵素を失活させ反応を停止させます。



RNA Amplification Kit (RT-LAMP)

【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^{1), 2),}, 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^{3), 4), 5), 6)}.

This simple-to-use amplification kit is able to amplify target RNA by the LAMP method (RT-LAMP). By employing the Enzyme Mix (containing reverse transcriptase and DNA polymerase), reverse transcription and DNA amplification can be accomplished at a constant temperature (60~65℃, usually 63℃) in a short time (1 hr. for standard) in one-step.

【Contents of the kit】

	48 tests	96 tests	192 tests
(1) 2 × Reaction Mix. * ² (RM) * ¹	0.6 mL	1 tube	2 tubes
(2) Enzyme Mix. * ³ (EM) * ¹	50 μL	1 tube	2 tubes
(3) Distilled Water (DW) * ¹	1.0 mL	1 tube	2 tubes
(4) Primer Mix.RNA * ⁴ (PM RNA) * ¹	30 μL	1 tube	—
(5) Positive Control RNA * ⁴ (PC RNA) * ¹	60 μL	1 tube	—

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

*² : composition (2 ×)

Tris-HCl (pH8.8)	40 mM
KCl	20 mM
MgSO ₄	16 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
Tween20	0.2 %
Betaine	1.6 M
dNTPs	2.8 mM each

*³ : It is a mixture of *Bsf* DNA Polymerase and AMV reverse transcriptase.

*⁴ : Primer Mix.RNA and Positive Control RNA are not included in the 96 tests and 192 tests package.

【Principle】

LAMP method is a novel isothermal nucleic acid amplification method using 4 kinds of primers and DNA polymerase with strand displacement activity. Among 4 kinds of primers, two of them are inner primers, whose 3' end and 5' end are respectively designed to be complementary to two different regions of the target sequence. When the primer-linked strand is replicated, resulting the 3' end structure to self-anneals to the complementary region in self-structure, it forms the loop structure at the end.

This stem-loop structure will allow the 3' end to initiate self-elongation and another inner primer to anneal to its loop region to synthesize new DNA strand with strand-displacement manner. Through the repetition of these processes, the amplification proceeds, and this enables amplification to continue under isothermal condition with only one kind of enzyme. When RNA is used as template, by initially adding the reverse transcriptase, one-step process from cDNA generation to DNA amplification can be achieved.

For further details of the LAMP method, refer to Eiken GENOME SITE (URL : <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>) .

【How to use】

1. Materials required but not provided

- Sterilized tubes for master mix. preparation (0.5 mL, 1.5 mL)
- Micropipettes (0.5~10 μL, 10~100 μL, 100~1,000 μL)
- 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

< For real-time turbidity detection >
○ Loopamp Realtime Turbidimeter *⁵

< For end-point turbidity detection >
○ Loopamp End Point Turbidimeter *⁵

< For visual fluorescence detection >
○ Loopamp Fluorescent Detection Reagent
○ Loopamp Realtime Turbidimeter, Loopamp EndPoint Turbidimeter, or incubator with hot bonnet (temperature accuracy within±0.5℃)

2) 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可能な限りクリーンベンチ等を使用し、検出はできるだけ閉鎖系の検出系である濁度検出（リアルタイム、エンドポイント）又は蛍光目視検出で行ってください。また、電気泳動等反応チューブの蓋を開けて増幅産物を開放系で扱う場合は、試薬及びサンプル調製とは別の部屋で行ってください。
- 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⁸⁾。
- RNA 分子は非常に不安定なため、取扱いには注意が必要です。特に RNA 分解酵素 (RNase) により容易に分解されてしまいます。RNase は材料である検体（血液又は尿等）や組織等、実験器具、試薬、水、さらには実験者自身の唾液や汗からも混入する恐れがあります。RNase は熱に強くオートクレーブ滅菌でも完全には失活しません。このために極力 RNase の混入を防ぐ必要があり、以下の注意が必要です。
 - ・ RNA 実験を行う実験台や実験器具を他と区別する。
 - ・ 実験に使用するチューブ等は、滅菌された使い捨てのものを使用する。
 - ・ 実験に使用する水は、DEPC 処理水など RNase フリーの水を用いる。
 - ・ 実験者は、手袋、マスクをできるだけ着用し、実験者自身の唾液や汗からの RNase の混入を防ぐ。

- 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・変質等で誤った結果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。

- 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。
- 外箱に表示の使用期限（Exp. Date）内に使用してください。
- 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。

【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 [®] RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP)	48テスト分	-20℃	1 年 間	LMP244
	96テスト分			LMP245
	192テスト分			LMP246

【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



栄研化学株式会社

栃木県下都賀郡野木町野木143番地

③ 検出

★ コンタミネーションを回避するため、閉鎖系で検出、記録のできる (1)、(2) を推奨します。

- リアルタイム濁度検出
Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いることで、リアルタイム検出ができます。なお、適応装置については Eiken GENOME SITE (URL : <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。また、操作の詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。
- エンドポイント濁度検出
Loopamp エンドポイント濁度測定装置を用いることで、エンドポイントでの濁度検出ができます。詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。なお、エンドポイントの濁度値と初期錫型量との間には相関はありません。

- 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です⁹⁾。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。波長が 320nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見えることがありますので、陽性コントロール、陰性コントロールと比較して判定してください。また、紫外線照射装置の出力が強い場合は陰性コントロールも蛍光を発して見えることがありますが、その場合はチューブを紫外線照射装置から離したり、チューブの角度を変えるなどして、陽性コントロールと陰性コントロールの差がはっきりするように工夫してください。

インキュベーターは Loopamp 濁度測定装置（リアルタイム、エンドポイント）のほか、市販のインキュベーター（温度精度が±0.5℃以内：ホットボンネット付）を用いることができます。

なお、蛍光・目視検出試薬を用いた場合でも濁度検出は可能です。詳細は Loopamp 蛍光・目視検出試薬の説明書をご参照ください。

- 電気泳動での検出
増幅産物によるコンタミネーションに十分注意の上、操作を行ってください。
 - ・ 反応液 0.5~2.0 μL を用いて 2% 程度のアガロースで電気泳動を行います。
 - ・ エチジウムブロマイド (EtBr)、あるいは SYBR Green I で染色します。増幅された場合は、LAMP 反応による増幅産物が増幅領域の繰り返しからなる様々な長さの断片であることから、電気泳動パターンはラダーパターンを示します。

【操作上の留意事項】

1. 試薬の取扱い

- 本キットは必ず-20℃で保存してください。試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけを箱から取り出してご使用ください。（凍結融解を 20 回繰り返した結果では、試薬の劣化はほとんど認められておりませんが、無用な凍結融解は品質維持のために避けてください。）
- 試薬の解凍は室温で行い、調製と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、十分混合し再度スピンドウンしてからご使用ください。なお、Enzyme Mix. (EM) は失活する恐れがありますので、激しく撹拌しないでください。

2. 蛍光目視検出の場合の留意点

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ニオンがキレートされ、錫型の増幅に関係なく蛍光を発します。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

- 濁度検出、蛍光目視検出の場合は、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。Loopamp 濁度測定装置（リアルタイム、エンドポイント）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. 増幅反応に際しての留意点

マスターミックスとサンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度測定の支障となり誤判定の原因となりますので、気泡が生じないように注意してください。気泡が残っている場合には、スピンドウンして気泡を取り除いてください。

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。

- Heat block (for termination of the reaction) *⁵
- UV lamp (wavelength at 240~260nm or 350~370nm) *⁵
- Protective goggle or glass board

*⁵ : 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/>) .

2. Primer design

Appropriate primer design is essential for amplification by LAMP. Use exclusive primer designing software for the primer design. Refer to LAMP primer designing software, PrimerExplorer at the website: <http://primerexplorer.jp/e/>.

Using the highly purified primers, a rapid gene amplification can be performed and stable reproducibility of the amplification can be obtained. The first screening for appropriate LAMP primers might not necessarily require highly purified primers. However, after the primers are determined, it is recommended to use purified FIP and BIP through HPLC or better purification.

3. Reagents preparation

- Take out the reagents stored at -20℃, and thaw them at room temperature. Once the reagents are thawed, keep them on ice.
- Preparation of master mix. (Operate on ice) .
 - The following amount of the component is required for one reaction.

○ Sample reaction	
<Reagents>	<Amount>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer : FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
Loop-F * ⁶	20 pmol
Loop-B * ⁶	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL
Distilled Water (DW)	X μL (ad q.s.)
Total	20.0 μL/test

*⁶ : Loop primers are not necessarily required. However, the use of Loop primers shortens the amplification time by about 1/3⁷⁾.

○ Control reaction	
<Reagents>	<Amount>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
PrimerMix. RNA (PM RNA)	2.5 μL
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL
Total	20.0 μL/test

★ For visual fluorescence detection, also add 1 μL of the Loopamp Florescent Detection Reagent(available for sale separately) and maintain the total mixture amount at 20 μL.

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

- 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 by 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.

4. Operation procedure

- Mixing of master mix. and sample solution (Operate on ice)
 - Dispense 20 μL of the master mix. into each Loopamp Reaction Tube (available for sale separately) .
 - Add 5 μL of sample RNA to the master mix., and the volume of the solution should be 25 μL in total. For control reactions, use 5 μL of Distilled Water (DW) for negative control, and 5 μL of Positive Control RNA (PC RNA) for positive control. 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.
- Amplification reaction
 - 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) .
 - Inactivate the enzyme and terminate the reaction by incubating the mixture for 5 minutes at 80℃ or 2 minutes at 95℃.