

2×LAMP MASTER

マニュアル(第1版)202005cn

濁度検出用「LAMP MASTER for Turbidity」(Code No. 311-08961)

蛍光検出用「LAMP MASTER for Fluorescence」(Code No. 317-08941)

目視判別用「LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)」(Code No. 314-08951)

I 製品説明

「LAMP MASTER for Turbidity」(2×LAMP MASTER)は、LAMP 法による等温核酸増幅のためのマスターミックス試薬です。LAMP 法に必要な耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、Mg²⁺、dNTPs、至適化されたバッファーなどを含むため、2×LAMP MASTER にプライマーと鑄型核酸を添加するだけで LAMP 法による DNA 増幅を行うことができます。また、DNA 増幅を蛍光検出用装置で検出するための試薬をセットにした「LAMP MASTER for Fluorescence」や、目視判別用試薬をセットにした「LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)」もあり、検出方法に合わせてお選びいただけます。

<使用上の注意>

- 本品は試験研究用ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないで下さい。
- 本品の取り扱いマニュアル記載内容通りに行ってください。マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは本品の製造及び販売を栄研化学株式会社より許諾されています。

II 製品内容

本品 (−20℃保存)

LAMP MASTER for Turbidity	
2×LAMP MASTER ^{*1)}	625 μl × 6 本

セット品 (−20℃遮光保存)

LAMP MASTER for Fluorescence	
本品 (2×LAMP MASTER)	625 μl × 6 本
10× Intercalation Mix ^{*2)}	750 μl × 1 本
LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)	
本品 (2×LAMP MASTER)	625 μl × 6 本
25× Visible Dye ^{*2)}	300 μl × 1 本

*1) 本品のラベルに使用期限が表示されております。使用期限を守ってご使用下さい。

*2) 遮光保存して下さい。

III プロトコール

反応液の調製方法

① 本品、鑄型核酸^{*3)}、プライマー^{*4)}等、使用する試薬を室温で完全に融解する。

*3) 対象ごとに適した方法を用いて鑄型核酸を調製して下さい。

重要 試験環境の汚染を避けるため鑄型核酸の調製は本品を使用する区域とは区別して行って下さい。

*4) あらかじめ標的遺伝子に対する6種類(または4種類)のLAMPプライマーの混合液を調製して下さい。

例) 10×LAMP Primer Mix:

16 μM FIP, 16 μM BIP, 2 μM F3 Primer, 2 μM B3 Primer,
8 μM Loop Primer F, 8 μM Loop Primer B,
10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT

② 各試薬をボルテックスミキサーにて1秒間×3回混合して均一にした後、スピンドウンを行い、氷上に静置する。

③ 1.5 ml あるいは 2.0 ml チューブに下記の反応例を参考に鑄型核酸以外の試薬を必要反応分ずつ分注し、ボルテックスミキサーにて1秒間×3回混合した後、スピンドウンを行う。これをマスターミックスとし、氷上に静置する。

参考 RT-LAMP 法において AMV Reverse Transcriptase を使用する場合は、25 μl の反応系あたり 0.2 units を添加して下さい。

④ 使用する装置の推奨チューブに1反応分ずつマスターミックスを分注する。

⑤ 鋳型核酸またはコントロールを～5 μl 添加し全量 25 μl とする。まず、陰性コントロール（ddWater 等）を添加してキャップを閉じる。次に、鋳型核酸を添加してキャップを閉じる。最後に、陽性コントロールを添加してキャップを閉じる。このとき、ピペティングまた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、スピンドウンする。また、混合の際は気泡が立たないように注意する。

⑥ 検出装置にチューブをセットし、60～68°C^{*5)} で 30～60 分間^{*6)} の LAMP 反応を行う。

*5) 設計したプライマーによって最適な温度が異なるので、あらかじめ条件検討を行ってから反応温度を決定する。

*6) 反応時間は、下記の反応例を参考にする。

LAMP MASTER for Turbidity 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鋳型核酸	～5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60～68°C、60 分間（LAMP 反応）	

<濁度測定>

LAMP 法による DNA の増幅によって反応副産物であるピロリン酸マグネシウムが蓄積されて反応液が白濁する。この濁度を濁度測定装置で測定することにより、増幅の有無を判定できる。（濁度測定装置の設定方法は、使用する装置の取扱説明書に従う。）

LAMP MASTER for Fluorescence 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
10×Intercalation Mix	2.5 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鋳型核酸	～5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60～68°C、30 分間（LAMP 反応）	
↓	
会合曲線解析もしくは融解曲線解析	

<蛍光測定>

二本鎖 DNA に結合して蛍光を発するインターカレーターを反応系に添加し、DNA 増幅に伴う蛍光を検出する。蛍光検出用装置として、リアルタイム PCR 装置を使用する場合は、蛍光波長の設定を ResoLight Dye もしくは SYBR® Green I を測定する波長に設定する（蛍光検出装置の設定方法は、使用する装置の取扱説明書に従う。）

注意 10×Intercalation Mix は蛍光検出用試薬のため、濁度測定装置には使用できません。

LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye) 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
25×Visible Dye	1.0 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鋳型核酸	～5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60～68°C、40 分間（LAMP 反応）	
↓	
80°C、5 分間（反応停止）	
↓	
目視判定	

<目視判定>

可視光下で、陰性では淡い赤色を呈し、陽性では鮮やかな黄緑色を呈する。この発色は蛍光に由来しているため、紫外線照射下ではより正確な判定が可能である。

重要 目視判定の場合、必ず陰性コントロールと陽性コントロールを同時に反応させ、コントロール液の発色の有無を確認してから、検体の判定を行う（60 分間まで反応時間を長くすることも可能だが、その場合、陰性コントロールで非特異反応がないことを確認する。）

注意 LAMP 反応液を長時間放置すると、反応の進行に関わらず、蛍光の発色あるいは消光が起こり誤判定の原因となるため、反応停止後、速やかに目視判定を行う。また、反応液を調製する際、EDTA 等の金属キレート化合物を含む TE 等を用いない。

製品安全データシートや、実験例などは、ニッポンジーン Web サイトをご覧ください。

本品は、試薬(試験研究用)として販売しているものです。
医薬品の用途には使用しないでください。