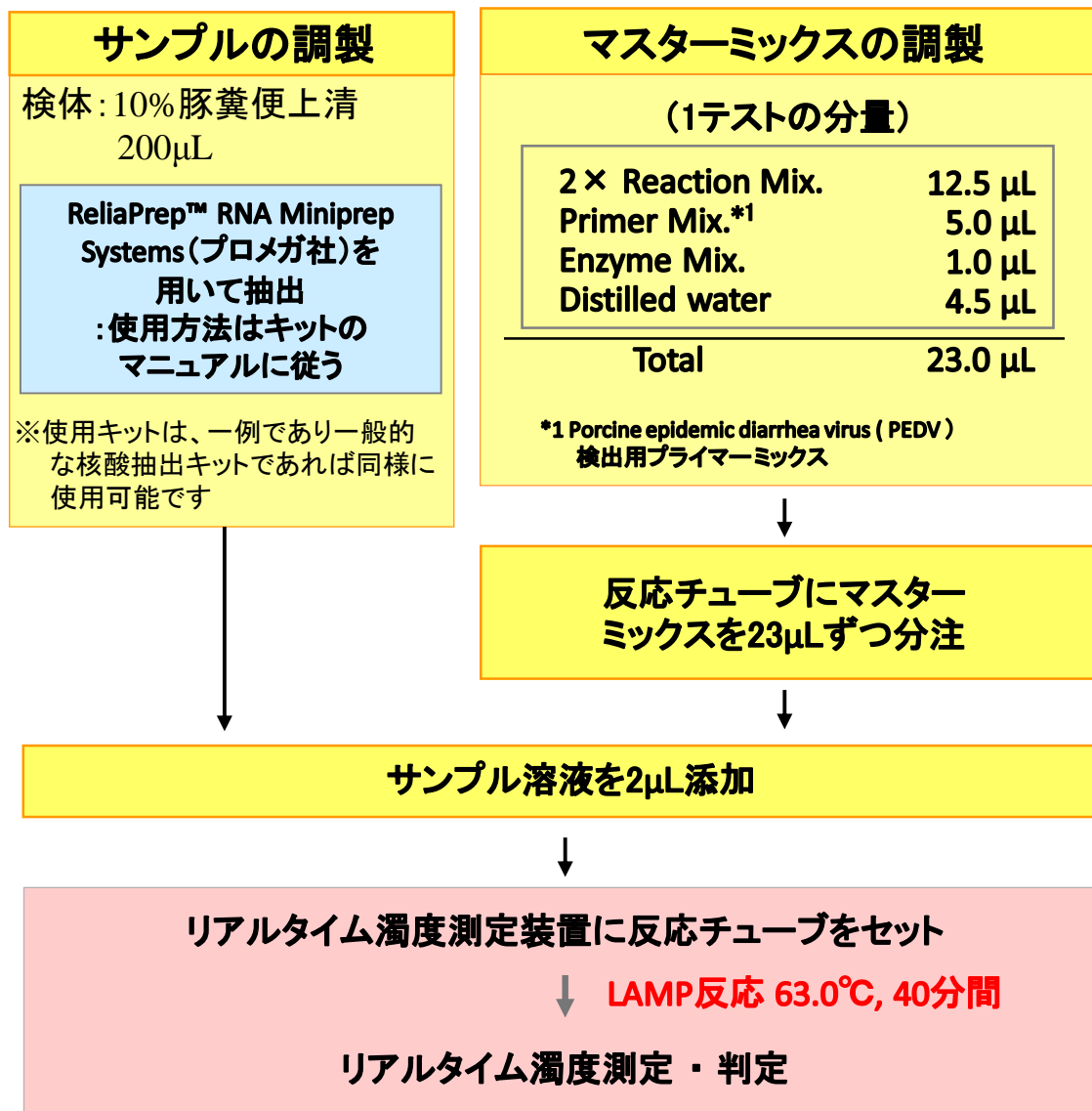


豚流行性下痢ウイルス(Porcine epidemic diarrhea virus : PEDV) 検出用プライマーを用いた使用方法

Mai TN, Nguyen VD, Yamazaki W, Okabayashi T, Mitoma S, Notsu K, Sakai Y, Yamaguchi R, Norimine J, Sekiguchi S. :
Development of pooled testing system for porcine epidemic diarrhoea using real-time fluorescent reverse-transcription loopmediated
isothermal amplification assay. BMC Veterinary Research. 2018; 14:172
に基づき著者の了承を経て一部改変



LoopampEXIA

注: 本検査法は、豚流行性下痢ウイルスを検出するためのものです。
医療行為および人、動物に対する臨床診断等の目的では使用できません。

1. PEDV検出用プライマーの調製方法

※ 必ず氷上で行ってください

(1) 合成プライマーの調製(各プライマーを100pmol/μLに調製)

Data Sheetに記載の

XXX μLのTE Buffer (TE) をチューブに添加し
100pmol/μLに調製します。

TE Buffer (TE) XXX μL



終濃度100pmol/μLの
プライマー液が調製されます。

※Data Sheetに記載
For 100 μmolar Solution
(100pmol/μL) dilute in: XXX μL

※ TE buffer (分子生物学用) *
or 10mM Tris buffer or DW

* Tris 10mmol/L, EDTA 1mmol/L (pH7.5)

データシートに記載のnmol数 × 10の
TE bufferで溶解すると、100pmol/μLになります。
EX. 12.3nmol ⇒ 123μLで溶解します。

(2) Primer Mixの調製(調製後は、冷凍保存)

滅菌マイクロチューブに1-(1)で調製した各プライマー(100pmol/μLで調製した場合)を以下の容量
で加え、転倒混和した後、スピンドウンする。

※冷凍保存した場合、室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。

	1テスト分	100テスト分
PEDV-FIP (40pmol)	0.4μL	40μL
PEDV-BIP (40pmol)	0.4μL	40μL
PEDV-FL (20pmol)	0.2μL	20μL
PEDV-BL (20pmol)	0.2μL	20μL
PEDV-F3 (5pmol)	0.05μL	5μL
PEDV-B3 (5pmol)	0.05μL	5μL
Distilled Water	3.7μL	370μL
Total volume	5.0μL	500μL

以下に、RNA増幅試薬キットを用いた使用方法を記載します。
詳細は、使用説明書をご参照ください。

2. マスターミックスの調製 ※必ず氷上で行ってください

(1) 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。

	1テスト分	10テスト分
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5μL	125μL
Primer Mix.	5.0μL	50μL
Enzyme Mix.	1.0μL	10μL
Distilled Water (DW)	4.5μL	45μL
Total volume	23μL	230μL

※ 蛍光目視検出試薬を使用する場合は、Fluorescent Detection Reagent(FD) 1μL/テストを用い、Distilled Water(DW)を3.5μL/テストで調製してください。

(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。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。

3. マスターミックスとサンプル溶液の混合 ※必ず氷上で行ってください

(1) Loopamp 反応チューブに、サンプル反応用のマスターミックス23μLを分注します。

(2) サンプル溶液2μLを添加し全量25μLとします。このとき、ピペ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。

4. LAMP反応

※ LAMP反応は、Loopampリアルタイム濁度測定装置(LoopampEXIA、LA-320C:販売終了、RT-160C:販売終了)をご使用ください。

(1) Loopampリアルタイム濁度測定装置の反応条件は、以下の通りです。

<LAMP反応条件>

63.0℃、40分

<酵素失活条件>

80℃、5分間又は95℃、2分間

(2) Loopamp反応チューブの蓋が確実に閉まっていることを確認した後、装置にセットし、反応を開始します。

(3) LAMP反応終了後、80℃、5分間又は、95℃、2分間の酵素失活を行い反応を停止させます(Loopampリアルタイム濁度測定装置の場合は、自動的に移行します。)

(4) 判定は、自動的に行われます。

※ 蛍光目視による検出の場合、紫外線照射装置(波長240~260nm、又は350~370nm)を用いて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観察し、陽性対照と同様に緑色の強い蛍光を発すれば陽性、陰性対照と同様に蛍光を発しなれば陰性と判定します。

※ 注意事項

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。