

DryADD™

RT-LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye)

Code No. DR0701

【はじめにお読みください】

このたびは、DryADD™ RT-LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye) をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。この製品説明書をよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用してください。

使用上の注意

1. 本製品は、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。試験研究用試薬のため、医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。
2. 本製品の保存方法は、【製品内容】(3 ページ) に記載していますのでご確認ください。各試薬は適切な条件下にて保存し、製品ラベルに記載された有効期限 (Exp. date) 内に使用してください。
3. 本製品を使用する際は、この製品説明書の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
4. 本製品による判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。製品性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーン マテリアルでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
5. 検査環境の汚染を防ぐため、LAMP 法反応後サンプルの電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。
6. 本製品に含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本製品に含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本製品の安全データシート (SDS) が必要な場合は、[本製品に関するお問い合わせ先](#) (8 ページ) までお問い合わせください。
7. 本製品は食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。
8. 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 マテリアルは、本製品の開発、製造、および販売を許諾されています。

I 製品説明

【DryADD™とは】

DryADD™とは、ニッポンジーンマテリアルが開発した乾燥化技術を用いた「ライフサイエンス試薬をラボからフィールドに」をコンセプトに開発した試薬です。室温での輸送や保管が可能であるため、長距離の輸送にも保冷剤やドライアイスが不要で、電力供給が不安定な地域でもライフサイエンス試薬が利用可能となります。

※ 本製品には、富山県平成 28 年度産学官連携推進事業に採択された「植物病害遺伝子診断キットの長期室温保存を可能とする乾燥試薬の開発」における東京大学植物病理学研究室との共同研究の成果が活用されています。

【RT-LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye) 製品の概要】

本製品は 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 法はインフルエンザウイルス感染およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長としています。

本製品では、LAMP 法に必要な耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、逆転写酵素 (AMV Reverse Transcriptase)、Mg²⁺、dNTPs、バッファーなどがあらかじめプレミックスされた乾燥試薬となっているため、RT-LAMP Master Mix (T/V) にプライマーと鋳型 RNA を添加するだけで、cDNA 合成と DNA 増幅を同一反応チューブ内で行うことができます。

判定には核酸増幅の有無を蛍光発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、核酸増幅反応から検出までを完全閉鎖系 (同一反応チューブ内) で行うため、検査のコンタミネーションリスクが少なく、安全に短時間で RNA の検出を行うことが可能です。

【LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の原理の詳細については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社

Eiken GENOME SITE; <https://loopamp.eiken.co.jp/>

【鋳型 RNA および LAMP プライマーの準備と反応条件の至適化について】

本製品に核酸抽出試薬は含まれておりませんので、検体からの RNA 抽出には市販のキット等をご用意ください。

また、検体由来 RNA を増幅するための LAMP プライマーもご用意ください。

設計したプライマーによって最適な反応条件が異なります。LTV Dissolve Solution の添加量、Primer 濃度、反応温度、反応時間などの検討が必要な場合がございます。詳しくは【使用方法】(6 ページ)に記載していますのでご確認ください。

反応条件の至適化を詳細に実施される場合には、濁度測定装置のご使用を推奨いたします。

II 製品内容

【製品内容】

DryADD™ RT-LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye)

192 テスト用

試薬名 (頭部ラベル表記)	頭部ラベル色	内容量	本数	保存温度
RT-LAMP Master Mix (T/V)	-	192 チューブ	8 well x 6 本 x 4 袋	室温 (20-25°C)
LTV Dissolve Solution (LTV Dissolve Solu)	橙色	1.2 mL	2 本	
ddWater (ddWater)	白色	1.2 mL	4 本	
Mineral Oil (Mineral Oil)	青色	1.2 mL	4 本	

製品説明書 (本紙) 1 部

重要: 本製品に核酸抽出試薬は含まれておりません。
検出対象からのRNA抽出に適した市販のキット等をご用意ください。

重要: 本製品にLAMPプライマーは含まれておりません。
検体由来RNAを増幅するためのLAMPプライマーをご用意ください。

取り扱い上の注意

- ◆ 本製品は室温 (20-25°C) で安定に保存できます。
- ◆ 試薬は元のアルミパックに入れて保管し、製品ラベルに記載された有効期限 (Exp. date) 内に使用してください。特に、RT-LAMP Master Mix (T/V) は吸湿による劣化を防止するために、同封の乾燥剤と共に元のアルミパックに入れ、チャックを完全に閉じてください。
- ◆ RT-LAMP Master Mix (T/V) は 8 連チューブに分注されていますので、反応数に応じて乾燥試薬に衝撃を与えない様、はさみ等を用いて切り分けてご使用ください
- ◆ 誤判定を防ぐため、溶解後の RT-LAMP Master Mix (T/V) を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。
- ◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

III 必要な器具、機器、試薬

- 核酸抽出用試薬
- LAMP プライマー溶液
- ピンセット（核酸の汚染がないもの）
- マイクロピペット（0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L）
- マイクロチューブ（1.5 mL あるいは 2.0 mL）
- フィルター付マイクロチップ（滅菌済）
- チューブラック
- アルミブロック（あるいはプレートラック）
- ボルテックスミキサー
- 簡易遠心機（1.5 mL チューブ用および PCR 用 0.2 mL 反応チューブ用）
- UV 照射装置（240-260 nm あるいは 350-370 nm の範囲の波長を出力するもの）
- インキュベーター（恒温器）
※ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、60-68°C を保持する機器
- 保護ゴーグル
- 使い捨て手袋
- 氷（クラッシュアイス）
- 濁度測定装置（推奨）

IV 使用方法

【検査を行う前の準備および注意】

器具の準備

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、検査環境に LAMP 反応後の増幅産物等、鑄型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、LAMP 反応後の増幅産物の電気泳動等による操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、乾燥試薬溶解液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では LAMP 法において鑄型となる核酸を含む溶液、試薬類の扱いは行わないでください。サンプル添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

<詳細な核酸除去方法>

- i) 使い捨て手袋を装着します。
- ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm (1%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
- iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、5 分間そのまま放置します。
- iv) 5 分間の処理が終了したら塩素成分をペーパータオルで拭き取り、その後、蒸留水等核酸の混入がない水を含ませたペーパータオルで確実に塩素成分を除去します。

【使用方法】

※必要に応じて、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」をご用意ください。

試薬の準備

- ① 対象ごとに適した方法を用いて「鑄型 RNA」を調製します。

重要: 試験環境の汚染を避けるため鑄型 RNA の調製は、RT-LAMP Master Mix (T/V) を使用する部屋とは別の部屋で実施してください。

「検体採取部位」と「RNA 抽出方法 (植物 RNA 抽出製品、等)」は、対象の植物体に適した方法を検討してください。

- ② LAMP Primer Mix を調製します。

凍結保管された LAMP Primer Mix を使用する場合、室温で完全に融解し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌により混合し均一にした後、スピンドウンを行います。
※あらかじめ標的遺伝子に対する 6 種類 (または 4 種類) のプライマーを含む LAMP Primer Mix を調製してください。

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

- ③ LTV Dissolve Solution、ddWater を取り出します。タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌により混合し均一にした後、スピンドウンを行います。

- ④ マイクロチューブ (1.5 mL あるいは 2.0 mL) に下記の反応例を参考にして、鑄型 RNA 以外の試薬を必要反応数分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌により混合し均一にした後、スピンドウンを行います。これを「乾燥試薬溶解液」とします。

<容量> 鑄型 DNA 添加量 2 μL の場合

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト
10×LAMP Primer Mix	2.5 μL	22.5 μL
LTV Dissolve Solution	5.0 μL	45.0 μL
ddWater	15.5 μL	139.5 μL
乾燥試薬溶解液合計	23.0 μL	207.0 μL

重要: 乾燥試薬溶解液の調製には、1 テストあたり必ず LTV Dissolve Solution 5 μL をご使用ください。他の溶媒では十分な性能が得られないことがあります。

また、乾燥試薬溶解液と鑄型 RNA を合わせて 25 μL/reaction となるように調製してください。

※増幅反応が確認されない/非常に遅いもしくは非特異増幅が認められる場合には、

LTV Dissolve Solution 添加量を加減して、至適条件をご検討ください。

検査溶液の作製

- ⑤ ピンセットを用いて RT-LAMP Master Mix (T/V) を必要本数 (検体数+コントロール数) 取り出します。

※チューブ上方に乾燥試薬が付着していた場合には、チューブを軽く振って乾燥試薬を

チューブ底に落としてから、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、氷上に静置します。

注意: 試薬の吸湿を避けるため、残りの試薬は直ちに元のアルミパックで密封してください。

- ⑥ RT-LAMP Master Mix (T/V) のキャップを開け、乾燥試薬溶解液 23.0 μL を添加してキャップを閉じます。

2 分間静置して、乾燥試薬を溶解させます。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

注意: 乾燥試薬と乾燥試薬溶解液の間に気泡が見られる場合には、スピンドウンにより気泡を除去し、乾燥試薬と乾燥試薬溶解液が確実に触れる様にしてください。

鑄型 RNA の添加

- ⑦ 陰性コントロール用チューブに陰性コントロールを 2.0 μL 添加してキャップを閉じます。次に、サンプル反应用チューブに鑄型 RNA を 2.0 μL 添加してキャップを閉じ、最後に、陽性コントロール用チューブに陽性コントロールを 2.0 μL 添加してキャップを閉じます。※蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますので、必要に応じて Mineral Oil を 20.0 μL 添加してください。インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラーを使用する場合には、Mineral Oil の添加は不要です。

重要: Mineral Oil を添加する場合、必ず乾燥試薬の溶解を確認した後に実施してください。溶解前の乾燥試薬に Mineral Oil が触れた場合、乾燥試薬が不溶化することがあります。

検査反応

- ⑧ 全てのキャップを閉じた状態で転倒混和して均一にした後、スピンドウンを行い、インキュベーター（恒温器）もしくは濁度測定装置を用いて 60–68 $^{\circ}\text{C}$ で 30–60 分間、保温します。※反応温度および反応時間は、設計したプライマーによって最適な条件が異なりますので、陽性コントロールを用いた条件検討を必要とする場合がございます。詳細な条件検討をされる場合、濁度測定装置の使用を推奨します。

重要: 混合の際は気泡が発生しないよう、ボルテックスミキサーによる攪拌は行わないでください。

- ⑨ 80 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間の熱処理により、検査反応を停止させます。

判定

色の変化の有無を確認してください。陽性の場合には検査溶液が鮮明な黄緑色に変化し、陰性の場合には淡い赤色のまま変化しません。色の変化が認められる場合、サンプル中に目的の検体が存在する可能性があります。この発色は蛍光に由来しているため、UV を照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途 UV 照射装置（波長: 240–260 nm あるいは 350–370 nm）およびゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。

コントロールを使用されている場合は、最初に陽性コントロール検査溶液が鮮明な黄緑色に変化し、陰性コントロール検査溶液は淡い赤色のまま変化していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を追究してください。

V トラブルシューティング

本製品の使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーン マテリアルまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
検査溶液が正確な発色を示さない	<p>A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。 検査溶液は長時間放置すると検査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、誤判定の原因となりますので、判定は検査反応終了後速やかに行ってください。</p> <p>B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鑄型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。</p> <p>C. 反応温度、操作手順に誤りがある。 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。</p>
検査溶液が蒸発した	<p>A. 反応チューブが均一に加熱されていない。 ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、反応チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本製品に添付の Mineral Oil を必ず添加してください。</p>
蛍光の発色の有無を判断しにくい	<p>A. 励起波長が合っていない。 240 - 260 nm あるいは 350 - 370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。</p>

VI 参考文献・資料

1. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (12): e63
 2. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358
- ・ 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告無しに変更する場合があります。
 - ・ 本製品説明書の記載内容は2023年3月現在のものです。
 - ・ その他、製品名等の固有名称は各社の商標あるいは登録商標です。
 - ・ 記載内容の複製、転載を禁止します。

本製品に関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン マテリアル	
TEL	076-411-0277
FAX	076-452-0399
E-mail	info-kensa@nippongenematerial.com
URL	https://www.nippongenematerial.com

Copyright © 2023 Nippon Gene Material Co., Ltd.