

ニホンジカ・カモシカ識別キット

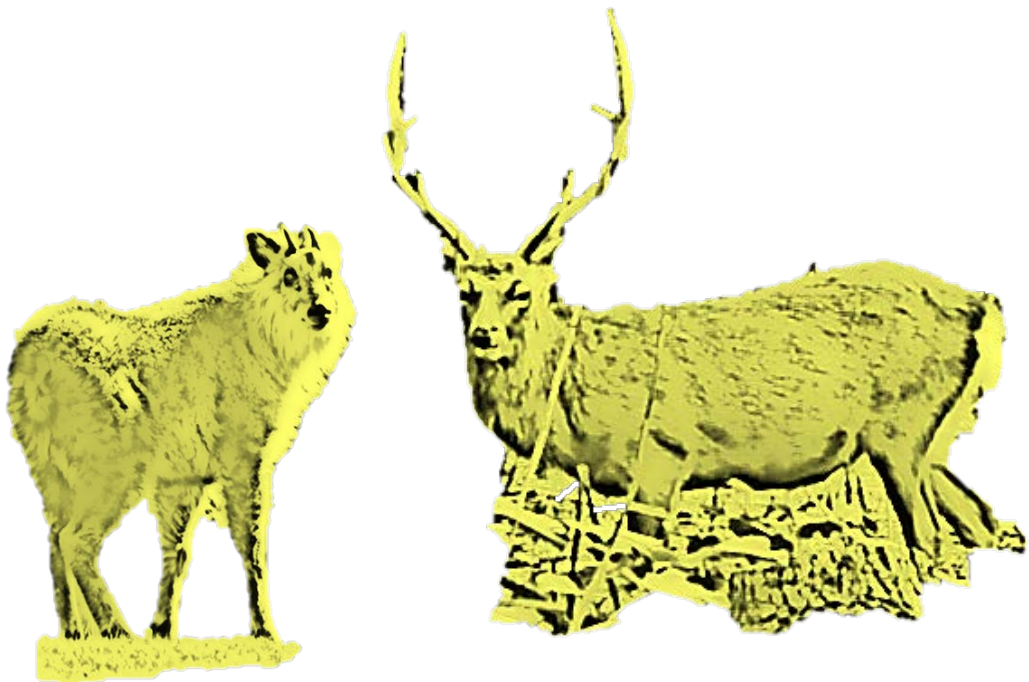
Sika Deer and Japanese Serow Discrimination Kit

取扱説明書

Version 9.0.0

製品コード

NE0181



ニッポン・ジーン

ニホンジカ・カモシカ識別キット

取扱説明書 Version 9.0.0

【はじめにお読みください】

このたびは、**ニホンジカ・カモシカ識別キット**をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてニホンジカあるいはカモシカの糞あるいは食痕から動物種を判別するための試薬です。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. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】(2 ページ)に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、1 年以内を目安に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。一度開封した試薬はキャップが緩んでいないことを確認の上、再度適切に保存してください。
3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**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. 本キット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。キット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、検査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. 本キット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、本キット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。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート (SDS) を公開していますので、ご参照ください。
株式会社ニッポンジーン ; <http://nippongene-analysis.com/>
7. 本キット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は、LAMP 法を用いたニホンジカ・カモシカ識別用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

目次

ページ

1. キット説明	1
ニホンジカ・カモシカ識別キットの概要	
ニホンジカとカモシカの識別	
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法	
2. キット内容	2
キット内容と保存温度	
3. 必要な器具、機器	3
4. キット使用方法	5
簡易プロトコル	5
検査を行う前の準備および注意事項	7
サンプルの準備	
器具、機器の準備	
検査環境	
詳細な使用方法	9
DNA の抽出	
検査反応	
判定	
5. トラブルシューティング	17
6. 文献・資料	18
7. 付録	18
品質管理	

本キットに含まれている LAMP プライマーセットおよびこの LAMP プライマーセットを用いた LAMP 法によるニホンジカ・カモシカ識別の技術は、国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所によって開発されました。

1. キット説明

【ニホンジカ・カモシカ識別キットの概要】

本キットは LAMP 法を利用してニホンジカとカモシカを識別するキットです。LAMP 法はインフルエンザウイルス感染の診断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ます。本キットでは、LAMP 法によりニホンジカおよびカモシカの DNA の一部をそれぞれ増幅し、増幅の有無から動物種を判定します。

検出に必要な操作は、キットに添付されている**DNA抽出液**を用いてニホンジカあるいはカモシカの糞や食痕から抽出したDNAを検査溶液（**ニホンジカ検査液**あるいは**カモシカ検査液**と、**酵素液**、**蛍光発色液 alpha**の混合液）に加えて63°Cに60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。

検体（糞あるいは食痕）がニホンジカ由来である場合は**ニホンジカ検査液**のみで、また、検体がカモシカ由来である場合は**カモシカ検査液**のみで、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによって、各動物種DNAに特徴的な配列が増幅されます。判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液 alpha**の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、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でニホンジカとカモシカを識別することが可能です。

【ニホンジカとカモシカの識別】

近年、急激に増加したニホンジカの食害により、農業・林業の分野では経済的に大きなダメージを受けており、その生息域および被害の拡大が懸念されています。ニホンジカの被害対策を講じる上で、分布域や生息密度を把握することは重要であり、ニホンジカの糞や食痕などの痕跡を使用した調査方法が用いられています。しかしながら、ニホンジカとカモシカの糞・食痕はよく似ており、見た目では区別することが困難であるため、カモシカが多く生息している地域ではそれらの痕跡を利用してニホンジカの生息状況を把握することができません。本キットを用いることにより、糞や食痕に含まれる DNA によってニホンジカとカモシカを簡便かつ迅速に識別することができるため、両種が混在する地域での予防的対策が可能です。

【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法の詳細な原理については、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 ; <http://loopamp.eiken.co.jp/>

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

ニホンジカ・カモシカ識別キット

48 検体用 (96 テスト用 ; 製品コード : NE0181)

試薬名 (チューブラベル)	頭部ラベル色	内容量	保存温度
		48 検体用 (96 テスト用)	
取扱説明書	-	1 部	室温
抽出用チューブ [†] (1 検体あたり 1 本)	-	48 本	室温
検査用チューブ	-	2 x 50 本	室温
DNA 抽出液 (1 検体あたり 100 µl)	-	5,000 µl	-20 °C (遮光)
ニホンジカ検査液	桃色	800 µl	-20 °C (遮光)
カモシカ検査液	黄緑色	800 µl	-20 °C (遮光)
酵素液	黄色	80 µl	-20 °C (遮光)
蛍光発色液 alpha	橙色	80 µl	-20 °C (遮光)
ミネラルオイル	青色	2 x 1,000 µl	-20 °C (遮光)

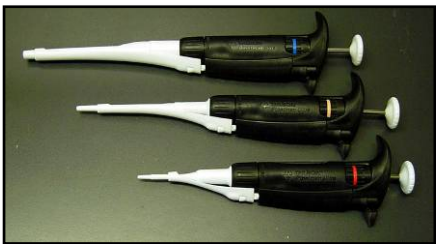
取り扱い上の注意

- ◆ 本キットは、ニホンジカ・カモシカにそれぞれ特異的な遺伝子を検出するための検査液をそれぞれ 48 テスト分ずつ含んでいます (ニホンジカ検査液、カモシカ検査液)。
- ◆ 本キットでは、各検査液に対し 50 テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、48 テスト分の検査反応を行うことが可能です。48 テスト分以下の検査反応を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。
- ◆ 抽出用チューブおよび検査用チューブに水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。
- ◆ 取扱説明書および抽出用チューブ、検査用チューブ以外の試薬は-20 °C で遮光して保存し、納品後 1 年以内を目安に使用してください。
- ◆ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度-20 °C で保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。一度開封した試薬はキャップが緩んでいないことを確認の上、再度適切に保存してください。
- ◆ 酵素液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。酵素の働きが低下する可能性があります。
- ◆ 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。

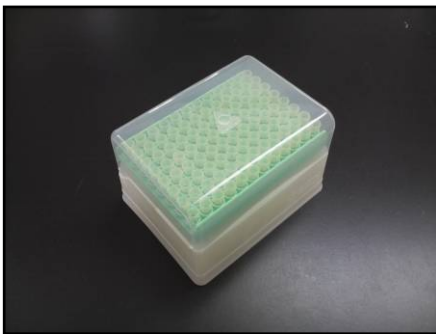
3. 必要な器具、機器

【必ずご準備いただく器具、機器】

- マイクロピペット *
(0.5-10 μ l、10-100 μ l、200-1,000 μ l)



- フィルター付マイクロチップ (滅菌済) *



- マイクロチューブ (1.5 ml あるいは 2.0 ml) *



- 使い捨て手袋



- 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等、60°C、63°C、90°C (90-100°C 程度)
それぞれを保持する機器が必要です。



- 採取器具

爪楊枝： 糞を検査する場合

綿棒： 複数の食痕をまとめて検査する場合

はさみ： 食痕を1つずつ検査する場合

ピンセット (上記の方法に共通)

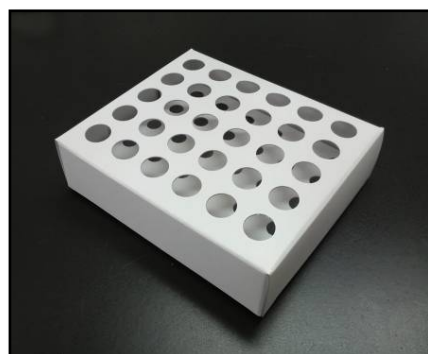
- 氷 (クラッシュアイス)

- エタノール

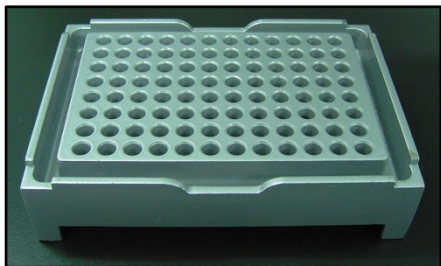
【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック *



- アルミラ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)



- 簡易遠心機 (0.2 ml チューブ用)



- フロートプレート *
- ウォーターバスで保温する際に使用します。

- UV 照射装置 *
- 蛍光発色液 alpha** による検出の際に使用します。240-260 nm あるいは 350-370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。



- 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

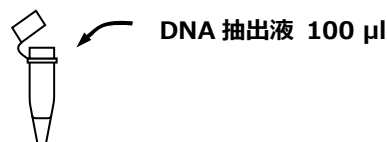
* マイクロピペット、フィルター付マイクロチップ (滅菌済)、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子検査ツールボックス** (製品コード: NE4111) も販売しております。

4. キット使用方法

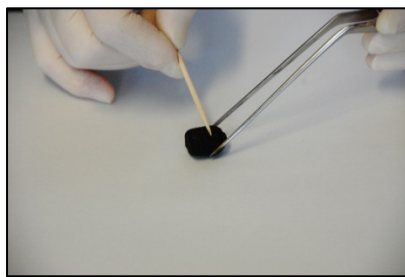
簡易プロトコル

詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください

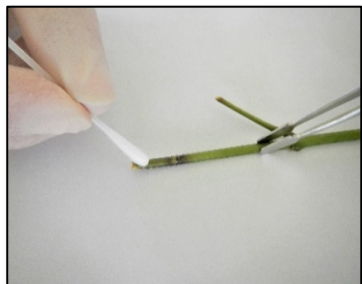
1. DNA 抽出液を 1 検体分あたり 100 μ l ずつ分注する



2-1. 糞の場合：糞の表面を爪楊枝の先端で軽くこすった後、その先端を DNA 抽出液に浸しかき混ぜ、その後爪楊枝は抜き取る



2-2. 食痕の場合：植物の食痕部位をこすった綿棒の先端を切り落とし、DNA 抽出液に浸す



重要

糞も食痕も時間の経過とともに DNA の抽出効率は低下します。できる限り新鮮な検体を用いて検査を行ってください。糞でうまく結果が得られない場合は、市販の糞から DNA を抽出する試薬、あるいはキットなどを用いて抽出・精製を施してください。食痕の場合は、複数検体を 1 本の綿棒でまとめてこすることで多くの DNA を回収することができます。また、綿棒を使わずに食痕から直接 DNA を抽出する方法もあります（10、11 ページ参照）。

3. 抽出用チューブのキャップを閉じ、55-65 °C（推奨 60 °C）で 10 分間保温する（DNA の抽出）

4. 90 °C 以上で 5 分間保温する（DNA 溶液とする）

5. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1テストあたり	24+1テスト*	48+2テスト*
ニホンジカ検査液あるいはカモシカ検査液	16.4 μ l	410 μ l	820 μ l
蛍光発色液 alpha	0.8 μ l	20 μ l	40 μ l
酵素液	0.8 μ l	20 μ l	40 μ l
検査溶液合計	18.0 μ l	450 μ l	900 μ l

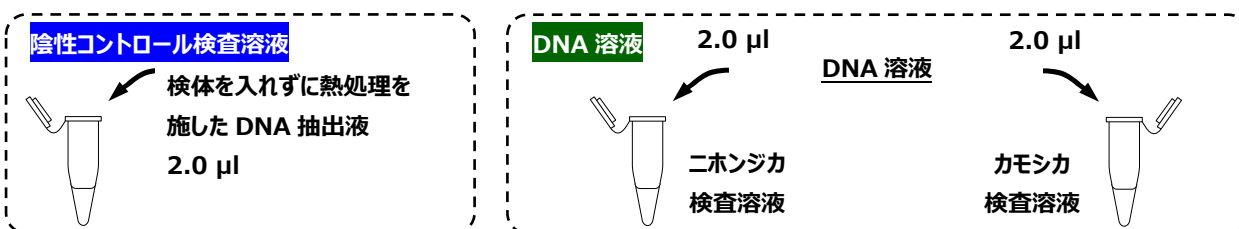
* 分注時の液量の不足を防ぐため、1 から 2 テスト分多めに作製する。

重要

1 検体ごとにニホンジカ検査液の検査溶液 (ニホンジカ検査溶液) とカモシカ検査液の検査溶液 (カモシカ検査溶液) の両方を必ず作製してください。どちらか一方の検査溶液のみでの判定はできません。

6. 検査溶液を 1 テストあたり 18.0 μ l ずつ分注する

7. 下記のサンプルあるいは DNA 溶液 2.0 μ l を添加する



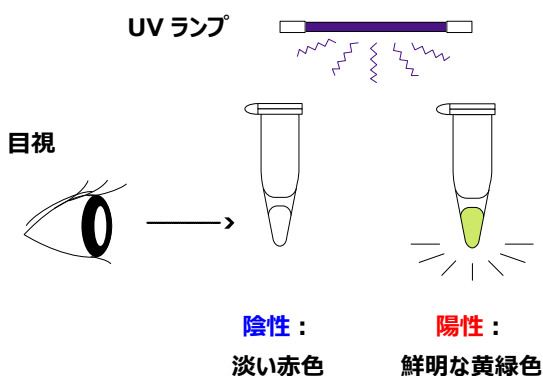
8. 必要な場合はミネラルオイルを 20.0 μ l 添加する

* 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、必要な場合は本キットに添付のミネラルオイルを 20.0 μ l 程度重層してください。

9. 63°C で 60 分間保温 (保温温度は 55-65°C の範囲に収まるように設定する)

10. 80°C、5 分間 (検査反応終了後、速やかに判定を行う場合、この操作を行う必要はありません)

11. 判定



発色パターン	I	II
ニホンジカ検査溶液	陽性 	陰性
カモシカ検査溶液	陰性 	陽性
判定	ニホンジカ	カモシカ

【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■ 陰性コントロール

検査の成否を確認するには、糞や食痕などの検体を入れずに熱処理を施した **DNA 抽出液**を添加する 2 つの「陰性コントロール検査溶液（ニホンジカ検査溶液、カモシカ検査溶液）」の作製が重要です。

■ DNA サンプル準備

検査には糞あるいは食痕から抽出した DNA を使用します。本キットは、糞や食痕から DNA を簡易抽出するための試薬（**DNA 抽出液**）、および簡易抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前にニホンジカあるいはカモシカのものと思われる糞あるいは食痕を検体として準備してください。

肉片を検体として用いる場合は、別途、株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

器具、機器の準備

■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、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	各区域専用とし、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、検査環境に二本鎖 DNA あるいはカモシカの DNA や検査後サンプル等、鋳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、検査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。

■ 作業区域

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、検査溶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 法において鋳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。

検査溶液へのサンプルの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すすぐことにより、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。

<方法>

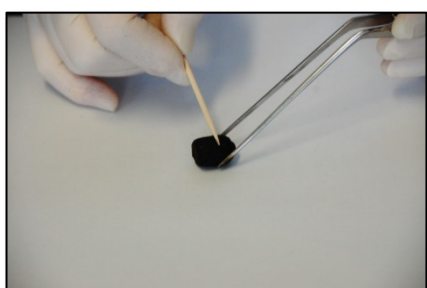
- i) 使い捨て手袋を装着します。
- ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm (1%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
- iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
- iv) 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
- v) 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

糞の採取および DNA の抽出



清潔な器具および容器を使用して、ニホンジカあるいはカモシカのものと思われる糞を採取します。複数の場所で採取した糞同士が混ざらないように、容器は個別にするとともに、糞をつまむピンセット等の使い回しは避けてください。糞を保存する場合は冷凍庫に入れ、検査を行う際には室温で解凍してから使用してください。



DNA 抽出液を取り出し、室温で完全に融解します。容器のキャップを閉じた状態で容器を 10 回上下に反転させて混合し均一にした後**抽出用チューブ**に 100 μ l を分注します。

採取した糞の表面を爪楊枝の先端で軽くこすり、その先端を **DNA 抽出液**に浸します。爪楊枝を **DNA 抽出液**の中で攪拌し、濁ったら爪楊枝は取り出します。

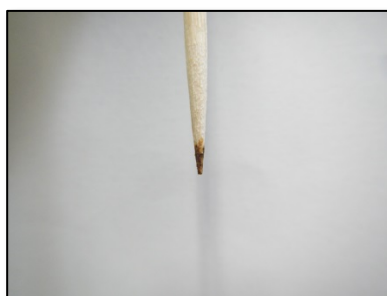
抽出用チューブを 55-65 $^{\circ}$ C 程度 (推奨 60 $^{\circ}$ C) で 10 分間保温した後、90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温します。簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め (以下スピンドウン)、得られた溶液を DNA サンプルとします。



重要

大量の糞を入れると抽出および検査の効率が低下することがあります。

【良い例】



【悪い例】



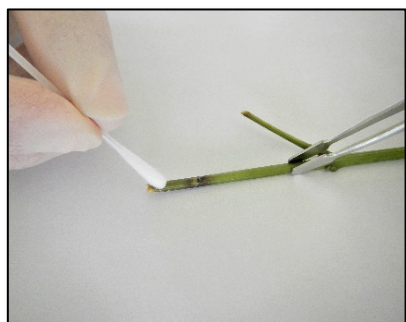
重要

- ・ 本キットに添付の**抽出用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。
- ・ 90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温する工程は、温度が 90 $^{\circ}$ C を下回らないようにご注意ください。
- ・ 糞は野外環境に長時間放置されることで劣化します。もろくなった糞、表面にカビが発生している糞、また、乾燥により極度に硬化した糞などでは DNA の抽出効率が低下するため、上記の簡易抽出プロトコルでは識別できないことがあります。このような場合は、市販の糞から DNA を抽出する試薬、キットなどを用いて DNA を抽出・精製することで、本キットによる識別が可能となります。

食痕の採取および DNA の抽出： その 1 (綿棒抽出法)



ニホンジカあるいはカモシカによって食べられたと思われる植物を切り取り、チャック付きビニール袋等の容器に入れます。検体を保存する場合は冷凍庫に入れ、検査を行う際には室温で解凍してから使用してください。



DNA 抽出液を取り出し、室温で完全に融解します。容器のキャップを閉じた状態で容器を 10 回上下に反転させて混合し、均一にした後、**抽出用チューブ**に 100 μ l を分注します。

径の細い綿棒 (別売、一般市販品) を使います。始めに、綿棒の先端を **DNA 抽出液**に少しだけ浸し軽く湿らせます。次に、その先端で食べられた部位の周辺を何度もこすります。1 つの植物に食痕が複数ある場合は、それらをまとめてこすってください。綿棒 1 本あたり、4-5 食痕が目安です。



食痕部位をこすった綿棒の先端をはさみで切り落とし、その切り落とした部分がチューブ内の **DNA 抽出液**にしっかり漬かるようにします。**抽出用チューブ**を 55-65 $^{\circ}$ C 程度 (推奨 60 $^{\circ}$ C) で 10 分間保温した後、90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温します。簡易遠心機を用いてスピンドウンした後、得られた溶液を DNA サンプルとします。



重要

- ・ 本キットに添付の**抽出用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。
- ・ 90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温する工程は、温度が 90 $^{\circ}$ C を下回らないようにご注意ください。
- ・ 食べられてから間もない新鮮な食痕を使用してください。
- ・ はさみで切り落とした綿棒の先端全体が、確実に DNA 抽出液に漬かることが重要です。切り落とす部分が大きいと全体が漬からないだけでなく、その部位が抽出液を吸い取ってしまうため、検査に使用できなくなります。
- ・ 他の動物や食葉昆虫に食べられてできた食痕には反応しません。

食痕の採取および DNA の抽出： その 2 (直接抽出法)



ニホンジカあるいはカモシカによって食べられたと思われる植物を切り取り、チャック付きビニール袋等の容器に入れます。検体を保存する場合は冷凍庫に入れ、検査を行う際には室温で解凍してから使用してください。



DNA 抽出液を取り出し、室温で完全に融解します。容器のキャップを閉じた状態で容器を 10 回上下に反転させて混合し、均一にした後、**抽出用チューブ**に 100 μ l を分注します。



採取した食痕部分を切り取り、食べられた側を下にして **DNA 抽出液**に浸します。検体は取り出さずに入れたままにします。**抽出用チューブ**を 55-65 $^{\circ}$ C 程度 (推奨 60 $^{\circ}$ C) で 10 分間保温した後、90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温します。簡易遠心機を用いて**スピンドウン**した後、得られた溶液を **DNA サンプル**とします。



重要

- ・ 本キットに添付の**抽出用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。
- ・ 90 $^{\circ}$ C 以上で 5 分間保温する工程は、温度が 90 $^{\circ}$ C を下回らないようにご注意ください。
- ・ 食べられてから間もない新鮮な食痕を使用してください。
- ・ どの食痕にも均一に DNA が付着している訳ではありません。したがって、同一株に複数の食痕がある場合は、その数だけ抽出を行うか、あるいは「その 1」で示したように複数の食痕を 1 本の綿棒でまとめてこする方法をお勧めします。
- ・ 検体が細い場合は、DNA の濃度を高めるために 2 本あるいは 3 本をまとめて 1 つのチューブに入れることも可能です。ただし、無理やりチューブ内に押し込むようなことはしないでください。
- ・ 他の動物や食葉昆虫に食べられてできた食痕には反応しません。

検査反応

試薬の融解

ニホンジカ検査液、カモシカ検査液、ミネラルオイルを取り出し、室温で完全に融解します。酵素液および蛍光発色液 alpha は-20℃では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンドウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）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、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製



マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、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た後、スピンドウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

<容量>

試薬	1 テストあたり	24+1 テスト*	48+2 テスト*
ニホンジカ検査液あるいはカモシカ検査液	16.4 μ l	410.0 μ l	820.0 μ l
蛍光発色液 alpha	0.8 μ l	20.0 μ l	40.0 μ l
酵素液	0.8 μ l	20.0 μ l	40.0 μ l
検査溶液合計	18.0 μ l	450.0 μ l	900.0 μ l

* 分注時の液量の不足を防ぐため、1 から 2 テスト分多めに作製する。

重要

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 回ごとに使い捨てとして使用してください。

酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンドウンを行ってください。

1 検体ごとにニホンジカ検査液の検査溶液（ニホンジカ検査溶液）とカモシカ検査液の検査溶液（カモシカ検査溶液）の両方を必ず作製してください。どちらか一方の検査溶液のみでの判定はできません。

検査溶液の分注



核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を 18.0 μl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

DNA サンプルの添加

DNA サンプル 2.0 μl を検査溶液に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付の**ミネラルオイル**を 20.0 μl 程度重層し、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ご注意ください）。尚、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、ミネラルオイルの添加は不要です。

重要

検査を行う際は陰性コントロールを作製してください。陰性コントロールサンプルには糞や食痕を入れずに熱処理を施した**DNA 抽出液**を 2.0 μl 使用します。この時の注意事項として、サンプルとミネラルオイルの添加は必ず、①陰性コントロールサンプル、②DNA サンプルの順に行ってください。また、サンプル添加後は速やかにキャップを閉じてください。

検査反応



ヒートブロック

全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 × 3 回の攪拌にて混合した後、スピンドウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアークューバーなどを用いて 63°C で 60 分間保温します（保温温度は 55-65°C の範囲に収まるように設定してください）。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、検査用チューブが反応中に傾かないようにしてください。



フロートプレート

判定

検査の成否の判定

UV 照射なし



60 分間保温した後、80 °C で 5 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います（検査反応終了後、速やかに判定を行う場合、この操作を行う必要はありません）。

使用前の**蛍光発色液 alpha** は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。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（240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

UV 照射あり



最初に、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色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、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は 60 分間が経過した時点の発色で行います。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。

重要

本キットでは**蛍光発色液 alpha** を用いた目視判定法を採用しておりますので、判定には UV 照射装置の使用を推奨しています。ただし、検査が成功している場合にはきわめて強い発色を示しますので、黒色の紙や台の上に検査後の**検査用チューブ**を静置することによっても、発色を肉眼で確認することが可能です。

UV 照射なし 黒色の紙の上で観察




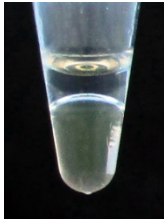
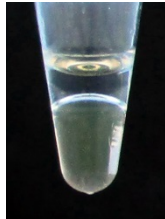

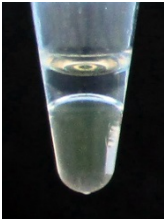

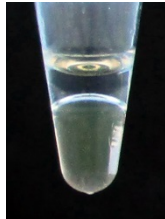

サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。

<判定のポイント>

動物種の判定は、ニホンジカ検査溶液、カモシカ検査溶液の発色パターンの組合せから行います。下図の発色パターン I および II を参照してください。

<発色パターンの例>

発色パターン	I	II	III	IV
ニホンジカ 検査溶液	 陽性	 陰性	 陰性	 陽性
カモシカ 検査溶液	 陰性	 陽性	 陰性	 陽性
判定	ニホンジカと判定	カモシカと判定	その他（下記参照）	

パターン I の場合

検体（糞・食痕）がニホンジカに由来すると判定されます。

パターン II の場合

検体（糞・食痕）がカモシカに由来すると判定されます。

パターン III あるいは IV の場合

再度検査をやり直してください。再検査でも同様の結果が得られる場合は、検体の経時劣化等により DNA がうまく抽出できていないか、あるいは本キットの試薬や検査環境がニホンジカあるいはカモシカの DNA で汚染されている可能性があります。

5. トラブルシューティング

本キット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までお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	<p>A. 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>B. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。 EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液 alpha が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液 alpha の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。</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>
蛍光発色液 alpha が変色した	<p>A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。 蛍光発色液 alpha 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。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。</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、検査用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。本キットに添付のミネラルオイル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>
試薬が不足する	<p>A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。 使用前にスピンドウンを行ってください。</p> <p>B. 保存中に試薬が蒸発している。 使用後はキャップを完全に閉じてください。</p>

6. 文献・資料

1. Aikawa T, Horino S, Ichihara Y. (2015) A novel and rapid diagnostic method for discriminating between feces of sika deer and Japanese serow by loop-mediated isothermal amplification. *Mamm Genome*. **26** (7): 355
2. 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
3. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*. **12** (3): 358
4. 相川拓也・堀野眞一・市原優・高橋裕史 (2018) “ニホンジカ・カモシカ識別キット” – その使い方と使用例 –. *森林防疫* **67**: 15

7. 付録

【品質管理】

ニホンジカあるいはカモシカの DNA 2.0 μ l を鋳型として 20.0 μ l (1 テスト分) の容量で DNA 増幅反応を行い、63 °C、60 分間で**蛍光発色液 alpha** が発色することを確認しています。

【メモ欄】

【メモ欄】



ニッポン・ジーン

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2021 年 9 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本品に関するお問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン

TEL 076-451-6548

URL <http://nippongene-analysis.com>

お問い合わせは、お電話もしくはWEBフォームより
承っております。