



# EasyAmp *Kudoa septempunctata* Detection Kit

## Code No. 391-5210

### I 製品説明

本製品は、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いてクドア・セプテンプンクタータを検出するための遺伝子検査キットです。本製品の 2xLAMP Master Mixは、等温遺伝子増幅に必要な耐熱性鎖置換型DNAポリメラーゼ、耐熱性無機ピロホスファターゼ、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、至適化されたBuffer、二本鎖DNA結合性蛍光色素を含んでおり、増幅したDNAを蛍光検出装置によって検出することが可能です。

#### [ 使用上の注意 ]

1. 本製品は、クドア・セプテンプンクタータを検出するためのキットです。その他の目的にはご使用になれません。
2. 試薬についての基礎的な知識のある方以外は、取り扱わないでください。
3. 本製品の使用にあたっては、取扱説明書の記載内容どおりに行ってください。取扱説明書記載の内容と異なったお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。
4. 本製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ください。
5. 廃棄方法は、国または地方自治体の条例に従ってください。
6. 試験環境の汚染を防ぐため、LAMP 法反応後の増幅産物の電気泳動等の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。
7. 製品安全データシート (SDS) の記載内容をご一読の上ご使用ください。なお、SDS につきましては、弊社ホームページ (<http://nippongene-analysis.com>) よりダウンロードして入手願います。
8. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。また、株式会社ニッポンジーンは LAMP 法を用いたクドア・セプテンプンクタータ検査キット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。
9. LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置 (栄研化学株式会社) では使用できません。

### II キット内容

包装単位: 50 反応分

	内容	容量	数量
I	2xLAMP Master Mix	640 µL	1 本
II	<i>Kudoa</i> 陽性コントロール	150 µL	1 本
III	<i>Kudoa</i> Primer Mix	375 µL	1 本
IV	取扱説明書 (本紙)	—	1 部

#### 取り扱い上の注意

- ◆ 試薬は-20℃で暗所にて保存し、使用期限内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℃で保存してください。

### III 本キット以外に必要な機器など

- ・ マイクロピペット及びチップ
- ・ 遠心分離機
- ・ マイクロチューブ及びラック
- ・ ヒートブロック
- ・ DNA 抽出用試薬  
推奨: EasyPrep DNA Extraction Reagent (ニッポンジーン社製、Code No. 391-4310)
- ・ 温調可能な蛍光検出装置  
例) Genie<sup>®</sup> II、Genie<sup>®</sup> III、リアルタイムPCR装置
- ・ ペッスル
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 氷 (クラッシュアイス)
- ・ 滅菌水



## IV 使用方法

### 1. ヒラメ組織からの DNA 抽出

**重要** 試験環境の汚染を避けるため DNA 抽出は本製品を使用する区域とは隔離された場所で行ってください。

#### 1-1. EasyPrep DNA Extraction Reagent (別売) を使用したプロトコール

- 1) 1.5 mL マイクロチューブにヒラメ組織 50 mg を採取する。
- 2) EasyPrep DNA Extraction Reagent 300  $\mu$ L を添加し、ペッスルで磨り潰した後、ボルテックスミキサーにてよく撹拌する。
- 3) ヒートブロックにて 95°C、10 分間保温する。
- 4) 氷上にて 1 分間氷冷する。
- 5) 15,000xg、5 分間、室温にて遠心する。
- 6) 新たな 1.5 mL マイクロチューブに上清を分取し、滅菌水で 100 倍に希釈する。  
例: 上清 5  $\mu$ L に滅菌水 495  $\mu$ L を加え、よく混合した溶液を鋳型として用いる。

### 2. LAMP 反応液の調製

#### 2-1. 試薬の準備

本製品に含まれる試薬を室温で完全に融解し、ボルテックスミキサーにて混合して均一にした後、スピンドウンを行い、試薬を氷上に静置する。

#### 2-2. LAMP 反応液の調製

- 1) 下記の通りプレミックスを調製する。

試薬	1 テスト分	8+1 テスト分
<b>2xLAMP Master Mix</b>	12.5 $\mu$ L	112.5 $\mu$ L
<b>Kudoa Primer Mix</b>	7.5 $\mu$ L	67.5 $\mu$ L
プレミックス合計	20.0 $\mu$ L	180.0 $\mu$ L

- 2) プレミックスの分注を 20.0  $\mu$ L ずつ分注する。
- 3) DNA 溶液の添加

まず、陰性コントロール用のチューブに陰性コントロール(滅菌蒸留水等)を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じる。次に、検査対象用のチューブに 1-1.で調製した DNA 溶液を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じる。最後に、陽性コントロール用のウェルに **Kudoa 陽性コントロール**を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じる。

### 3. LAMP 反応と測定

LAMP 反応液を転倒混和により混合した後、スピンドウンを行い、温調可能な蛍光検出装置にセットして測定(遺伝子増幅モニタリング及び会合曲線解析もしくは融解曲線解析)を開始する。

蛍光検出装置の詳細な設定方法は、各蛍光検出装置のマニュアルに従う。主要な装置に関しては、弊社ホームページ (<http://nippongene-analysis.com>) の設定方法例を参考にする。

#### 3-1. LAMP 反応

63°C、30 分間 LAMP 反応を行った後、会合曲線解析もしくは融解曲線解析を行う。

#### 3-2. 測定方法

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。

### 4. 結果の判定

以下の全ての要件を満たす場合に検査が成立したとする。

- ・ 陰性コントロールで増幅が認められない。
- ・ **Kudoa** 陽性コントロールで増幅が認められる。

以下の全ての要件を満たす場合に検査陽性と判定する。

- ・ 増幅が認められる。
- ・ 会合曲線もしくは融解曲線解析の結果が **Kudoa** 陽性コントロールの結果に対し $\pm 1^{\circ}$ C の範囲である。

## V 参考文献・資料

1. Onishi T, Lim B, Nojima N, Ogasawara K, Inagaki S, Makitsuru K, Sasaki M, Nakane K, Tsuchioka H, Horikawa K, Kawabe M, Minegishi Y, Miyazaki N, Sugita-Konishi Y: Inter-laboratory study to validate new rapid screening methods for *Kudoa septempunctata*. *Biocontrol Science*, **21**, 135-138 (2016)



# EasyAmp *Kudoa septempunctata* Detection Kit

## Code No. 391-5210

### I Product Description

This product is a DNA test kit to detect *Kudoa septempunctata* by using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. 2xLAMP Master Mix contains isothermally amplifiable strand displacement DNA polymerase, inorganic pyrophosphatase, Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, optimum buffer, and fluorescent dye that binds to the double-stranded DNA and allows detection of amplified DNA by fluorescence device.

#### [Precaution]

1. This product is a kit to detect *Kudoa septempunctata* and cannot be used for other purpose.
2. This product should be handled only by persons having a basic knowledge about reagents.
3. This product should be handled in accordance with the descriptions in the manual. We are not responsible for problems caused if this product is not handled in accordance with the manual.
4. Expire date is printed on the label.
5. Follow the instructions from your region to discard this product.
6. Do not electrophorese and autoclave amplification product by LAMP to prevent contamination of test environment.
7. Read SDS before use. SDS can be downloaded from our web site (<http://nippongene-analysis.com>).
8. LAMP is patented by Eiken Chemical Company. Nippon Gene Co., Ltd. is licensed to manufacture and sell this kit using LAMP by Eiken Chemical Company.
9. Turbidity measuring Real-time device for LAMP (Eiken Chemical Company) cannot be used for this kit.

### II Contents

For 50 reactions

	Contents	Volume	Qty
I	2xLAMP Master Mix	640 μL	1
II	<i>Kudoa</i> Positive Control	150 μL	1
III	<i>Kudoa</i> Primer Mix	375 μL	1
IV	Manual	—	1

#### Storage

- ◆ Store at -20°C and dark place.  
Use before expire date.  
Residual reagent should be stored at -20°C again.

### III Necessities in addition to this product

- Micropipette and tip
- Centrifuge
- Micro tube and rack
- Heat block
- DNA extraction reagent  
Recommend: EasyPrep DNA Extraction Reagent (NIPPON GENE, Code No. 391-4310)
- fluorescence detecting device  
example) **Genie**<sup>®</sup> II, **Genie**<sup>®</sup> III, Real-time PCR device
- Pestle
- Vortex
- Crush ice
- Sterilized water

## IV Protocol

### 1. Extraction of DNA from flounder muscle

**important** To prevent the contamination of test environment, please extract DNA in isolated place from the place this product is used.

#### 1-1. Protocol using EasyPrep DNA Extraction Reagent (separately sold)

- 1) Weigh 50 mg of flounder muscle to 1.5 mL tube
- 2) Add 300  $\mu$ L of EasyPrep DNA Extraction Reagent and grind and mix with pestle, and then vortex well.
- 3) Incubate for 10 min at 95°C.
- 4) Incubate for 1 min on ice.
- 5) Centrifuge at 15,000xg for 5 min at room temperature.
- 6) To prepare template DNA, transfer supernatant into a new 1.5 mL tube and dilute to 100 times by sterilized water.  
example: Transfer 5  $\mu$ L of supernatant into a new 1.5 mL tube contained 495  $\mu$ L of sterilized water.

### 2. Preparation of LAMP reaction solution

#### 2-1. Preparation of reagents

Melt the reagents completely at room temperature. Vortex the reagents to dissolve uniformly and then spin down and leave them to stand on ice.

#### 2-2. Preparation of LAMP reaction solution

- 1) Prepare Pre Mix .

Reagents	1 reaction	8+1 reactions
<b>2xLAMP Master Mix</b>	12.5 $\mu$ L	112.5 $\mu$ L
<b>Kudoa Primer Mix</b>	7.5 $\mu$ L	67.5 $\mu$ L
Total	20.0 $\mu$ L	180.0 $\mu$ L

- 2) Dispense the 20  $\mu$ L of Pre Mix.
- 3) Add template DNA to the Pre Mix.  
Add 5  $\mu$ L of negative control (sterilized water) and close the cap of the tube. Same as negative control add 5  $\mu$ L of template DNA (see 1-1) and close the cap of the tube. At last, add 5  $\mu$ L of positive control and close the cap of the tube.

### 3. LAMP reaction and measuring

Mix the LAMP reaction solution by inverting and spin down. Set to the fluorescence detecting device. Start measuring (DNA amplification monitoring and Annealing curve analysis or Melting curve analysis). Follow the setting method of the device's manual.

#### 3-1. LAMP reaction

63°C for 30 min → Annealing curve analysis or Melting curve analysis

#### 3-2. Measuring method

Set Fluorescent wavelength to ResoLight Dye or SYBR<sup>®</sup> Green I when using Real-time PCR device.

### 4. Determination result

Test for detection of *Kudoa septempunctata* is accepted when all of the following requirements are satisfied.

- Amplification of negative control is not detected.
- Amplification of positive control is detected.

The result is determined positive when all of the following requirements are satisfied.

- Amplification of template DNA is detected.
- In Annealing curve analysis or Melting curve analysis, the temperature of template DNA is within  $\pm 1^\circ\text{C}$  of the temperature of positive control.

## V Reference

1. Onishi T, Lim B, Nojima N, Ogasawara K, Inagaki S, Makitsuru K, Sasaki M, Nakane K, Tsuchioka H, Horikawa K, Kawabe M, Minegishi Y, Miyazaki N, Sugita-Konishi Y: Inter-laboratory study to validate new rapid screening methods for *Kudoa septempunctata*. *Biocontrol Science*, **21**, 135-138 (2016)