

ヒートアクト ランプマスター（蛍光検出用）

# HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence

マニュアル（第1版）CN2604

## I 製品説明

本品は、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（2×HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence）です。LAMP 法に必要な耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、至適化されたバッファーなどを含むため、本品にプライマーと鋳型核酸を混合して等温で反応させるだけで DNA を増幅することができます。また、本品はインターカレーター（二本鎖 DNA 結合性蛍光色素）と耐熱性ピロホスファターゼを含むため、増幅した DNA を蛍光検出装置\*によって検出することができます。

また、DNA ポリメラーゼに特異的に結合するアプタマーによって室温～50℃付近における酵素活性を効果的に抑制しています。これにより、反応液調製時の非特異的増幅やプライマーダイマー形成が最小限に抑えられ、反応温度（60℃～68℃）に達するとアプタマーが解離し、酵素が活性化されるため、高感度かつ特異性の高い安定した等温増幅が可能になります。

さらに、本品はドデシル硫酸ナトリウム（SDS）に対する耐性をもつため、SDS を含む簡易抽出液から得られた粗精製核酸を鋳型として用いた場合でも、DNA の増幅が期待できます。

\*リアルタイム PCR 装置、または LAMP 法用蛍光検出装置「GENEMAL」（Code No. 319-09481）が使用できます。なお、濁度測定装置では使用できません。

### 使用上の注意：

- ・ 使い捨て手袋を着用して作業を行い、核酸による汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
- ・ 核酸によって作業台や器具が汚染された場合は、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液を含ませたペーパータオルで汚染箇所をふき取り、続けて、水を含ませたペーパータオルで塩素分をふき取ってください（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、迅速にふき取る等の対応が必要です）。洗浄可能な器具は、大量の水道水でよくすすいで乾燥させ、常に清潔を保ってください。

## II 製品内容

本品（Code No. 311-09821） 蛍光検出用

構成品	容量（300 反応用）
① 2×HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence	625 μL × 6 本

保存：-20℃ 保存（遮光）

### 使用期限：

本品のラベルに使用期限が表示されています。  
使用期限を守ってご使用ください。

## III プロトコール

1. 対象ごとに適した方法を用いて鋳型核酸を調製します。

**重要** 試験環境の汚染を避けるため、鋳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ください。

例 1) 「Template Prepper for DNA」（別売）を使用する場合：

「Template Prepper for DNA」（Code No.316-08911）を使用する場合、試料から調製した DNA 溶液（上清）をそのまま LAMP 反応に使用できます。詳細は製品マニュアルを参照してください。

例 2) 「SDS を含む簡易抽出液」（別途調製）を使用する場合：

簡易抽出液 [参考組成例：10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM DTT] を試料に添加\*し、ボルテックスで混合後、必要に応じて遠心分離し、上清を回収します。

\* 簡易抽出液の添加量の目安：血液 2 μL に対して簡易抽出液 50 μL  
植物葉 10 mg に対して簡易抽出液 100 μL

2. 標的遺伝子に対して 4～6 種類の LAMP プライマーを混合して、10×LAMP Primer Mix を調製\*します。

\* 10×LAMP Primer Mix（6 種類）の調製例：  
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. 本品を室温で融解し、ボルテックスミキサーで1秒間×3回混合して均一にした後、スピンドウンして氷上に静置します。

**重要** このとき、HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence は、アルミ袋内で融解するか、あるいはチューブをアルミホイル等で覆うなど、可能な限り遮光してください。

4. 使用する装置に対応した反応系で反応液を調製します。

**参考** RNAを鋳型にしたRT-LAMPを行う場合は、必ず逆転写酵素を添加してください（本品に逆転写活性はありません）。

- ・ AMV Reverse Transcriptase  $\geq 0.2$  units / 25  $\mu$ L 反応系
- ・ M-MLV Reverse Transcriptase 10~20 units / 25  $\mu$ L 反応系

**例) 25  $\mu$ L 反応系の場合:**

2× HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence	12.5 $\mu$ L
10× LAMP Primer Mix	2.5 $\mu$ L
Template *	~5.0 $\mu$ L
d.d.Water	up to 25.0 $\mu$ L

\* Templateとして、まず、陰性コントロール（d.d.Waterなど）を添加して、次に、鋳型核酸を添加し、最後に、陽性コントロールを添加してキャップを閉じます。このとき、ピペッティング、またはキャップを閉めた上でタッピングしてよく混合した後、スピンドウンしてください。また、混合の際は気泡が生じないように注意してください。

5. 蛍光検出装置に反応チューブをセットし、LAMP反応を行います。

**例) リアルタイム PCR 装置を使用する場合:**

ステップ	サイクル数	反応温度	反応時間	蛍光 <sup>*1)</sup>
LAMP 反応	1	60~68°C <sup>*2)</sup>	30~60分 <sup>*3)</sup>	ON
→ 融解曲線解析 <sup>*4)</sup>				

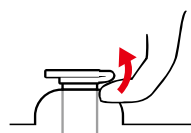
\*1) 蛍光波長の設定はSYBR™ Green I、FAMまたはResoLight Dyeを選択してください。LAMP 法用蛍光検出装置 GENEMAL を使用する場合は、蛍光波長の設定は不要です。

\*2) プライマーの設計等により反応の至適温度が異なります。プライマー毎に反応温度（60~68°C）の検討を行ってください。

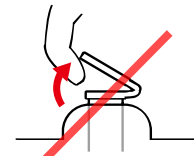
\*3) プライマーの増幅効率や必要な感度等の条件に応じて反応時間を設定してください。

\*4) リアルタイム PCR 装置の場合、融解曲線解析を実施できませんが、LAMP 法用蛍光検出装置「GENEMAL」は対応しておりません。

**重要** 増幅産物による汚染を防ぐため、反応後のチューブのキャップは開けず、ジップ袋等に密閉した上で廃棄してください。蒸気により増幅産物が拡散するおそれがあるため、廃棄の際はオートクレーブを行わないでください。特に反応チューブを装置から取り出すときにチューブのキャップが開かないよう注意してください。



**OK** (ヒンジに指をかける)



**NG** (つばに指をかける)

**IV 関連製品**

・ LAMP 法用蛍光検出装置

製品名	Code No.	包装単位
GENEMAL	319-09481	1台

・ 逆転写酵素

製品名	Code No.	包装単位
AMV Reverse Transcriptase	311-07501	500 units
M-MLV Reverse Transcriptase	313-08161	10,000 units

・ 簡易核酸抽出用試薬

製品名	Code No.	包装単位
Template Prepper for DNA	316-08911	1 set
Template Prepper for Cell RNA	318-09451	100 回用

・ LAMP 法用試薬関連製品

製品名	Code No.	包装単位
HeatAct LAMP MASTER for Turbidity	318-09831	300 反応用
HeatAct LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)	314-09811	1 セット
10× Intercalation Mix	315-09721	750 $\mu$ L

備考: LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、栄研化学株式会社により開発された日本産の等温遺伝子増幅法です。

製品安全データシートや、実験例など詳細は、ニッポン・ジーンのホームページをご覧ください。

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。