

ヒートアクト ランプマスター（濁度検出用）

## HeatAct LAMP MASTER for Turbidity

ヒートアクト ランプマスター（目視判定用）

## HeatAct LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)

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 Turbidity）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、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。

本品で増幅した DNA は濁度測定装置で測定することができます。また、セット品「HeatAct LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)」の場合、付属の目視判定試薬（25×Visible Dye）を添加することにより、増幅を目視で確認することもできます。

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。

#### 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. 318-09831） 濁度検出用

#### HeatAct LAMP MASTER for Turbidity

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

保存：－20℃ 保存

セット品（Code No. 314-09811） 目視判定用

#### HeatAct LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)

構成品	容量（300 反応用）
① 2×HeatAct LAMP MASTER for Turbidity	625 μL × 6 本
② 25×Visible Dye	300 μL × 1 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。

**注意** 目視判定の場合、EDTA を除いた組成で簡易抽出液を調製してください。

\* 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、25×Visible Dyeは、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、装置に反応チューブをセットし、LAMP反応を行います。

**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 μL 反応系
- ・ M-MLV Reverse Transcriptase 10~20 units / 25 μL 反応系

**重要** プライマー設計によって至適温度や反応時間が異なるため、プライマーごとにあらかじめ条件検討を行ってください。

#### 例) 濁度測定の場合 (25 μL 反応系):

2×HeatAct LAMP MASTER for Turbidity	12.5 μL
10×LAMP Primer Mix	2.5 μL
Template* <sup>1)</sup>	~5.0 μL
d.d.Water	up to 25.0 μL
↓	
60~68°Cで30~60分間 (LAMP反応)	

#### 例) 目視判定の場合 (25 μL 反応系):

2×HeatAct LAMP MASTER for Turbidity	12.5 μL
25×Visible	1.0 μL
10×LAMP Primer Mix	2.5 μL
Template* <sup>1)</sup>	~5.0 μL
d.d.Water	up to 25.0 μL
↓	
60~68°Cで30~40分間* <sup>2)</sup> (LAMP反応)	
↓	
80°Cで5分間の反応停止処理を実施し、直ちに目視で判定* <sup>3)</sup> してください。	

\*1) 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。

\*2) 目視判定の場合、反応時間を40分間より長くする場合は、陰性コントロールで非特異反応がないことを必ず確認してください。

**重要** 目視判定の場合、必ず陰性コントロールと陽性コントロールを同時に反応させ、コントロール液の色を確認してから、検体の判定を行ってください。

\*3) 可視光下では、陰性は淡い赤色、陽性は鮮やかな黄緑色を呈します。この発色は蛍光に由来しているため、紫外線照射下(240~260 nmあるいは350~370 nmの波長)では、より正確な判定が可能です。なお、320 nm付近の紫外線を照射した場合、一部の蛍光色素が励起され、陰性でも蛍光を発して見える可能性がありますのでご注意ください。

**注意** LAMP反応液を長時間放置すると、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。反応終了後は、速やかに目視判定を行ってください。また、反応液を調製する際には、EDTA等の金属キレート化合物を含むTE緩衝液等を使用しないでください。

**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可能性があるため、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

製品名	Code No.	包装単位
HeatAct LAMP MASTER for Fluorescence	311-09821	300 反応用
10×Intercalation Mix	315-09721	750 μL
AMV Reverse Transcriptase	311-07501	500 units
M-MLV Reverse Transcriptase	313-08161	10,000 units
Template Prepper for DNA	316-08911	1 set
Template Prepper for Cell RNA	318-09451	100 回用
GENEMAL	319-09481	1 台

**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。