

LAMP-FLP 法用プライマー・プローブセット

Human VDR (rs1544410)

製品コード: NE6901

【はじめにお読みください】

このたびは、LAMP-FLP 法用プライマー・プローブセット Human VDR (rs1544410) をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。このマニュアルをよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用してください。

使用上の注意

1. 本品は、LAMP-FLP 法で VDR 遺伝子多型 (rs1544410) の解析を行うための試験研究用試薬です。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. 試薬は-20℃の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。また、試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 本品を用いた測定には等温増幅蛍光測定装置 Genie[®] III (製品コード: NE5011) または LAMP 法用測定装置 LF-8 (製品コード: NE4031) を使用します。本品を使用する際は、このマニュアル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. 本品は、株式会社ニッポンジーンが販売する簡易核酸抽出試薬 (製品コード: NE6981) と LAMP-FLP 法用 DNA 増幅試薬セット (製品コード: NE6991) と組み合わせて使用します。 Loopamp[®] DNA 増幅試薬キットとは組み合わせて使用することはできません。
5. 本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。
6. 検査環境の汚染を防ぐため、LAMP-FLP 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. 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、本品の開発、製造および販売を許諾されています。
8. LAMP-FLP 法は株式会社ニッポンジーンが特許を保有しています。

I 製品説明

【LAMP-FLP 法用プライマー・プローブセットの概要】

本品は、株式会社ニッポンジーンが販売する簡易核酸抽出試薬とLAMP-FLP 法用DNA増幅試薬セットと組み合わせて使用する、VDR 遺伝子多型 (rs1544410) の解析を行うためのプライマー・プローブセットです。DNA サンプルの調製には簡易核酸抽出試薬をご使用ください。本品に含まれるLAMP-FLP 法用プライマー・プローブは、VDR 遺伝子領域内に設計されているため、遺伝子多型領域 (SNPs) を含むDNAを特異的に増幅した後、蛍光プローブを用いた会合曲線解析によって遺伝子多型の検出を行います。

また、等温増幅蛍光測定装置 Genie® III または LAMP 法用測定装置 LF-8 を用いることにより、DNA 増幅から検出までを閉鎖系 (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のリスクがなく、短時間でVDR 遺伝子多型 (rs1544410) の解析を行うことが可能です。

【解析対象について】

VDR 遺伝子領域の遺伝子多型は、骨粗鬆症リスクとの関連が報告されています。

生物種: Human

遺伝子名: VDR

SNP 部位: rs1544410

* rs は reference SNP の略で、NCBI データベース固有のアクセッション番号です。rs1544410 は、12 番染色体のVDR 遺伝子領域にある遺伝子多型を指します。

【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; <http://loopamp.eiken.co.jp/>

【LAMP-FLP 法】

LAMP-FLP 法は、LAMP 法による遺伝子増幅と、蛍光共鳴エネルギー移動現象 (Fluorescence Resonance Energy Transfer) を利用して、遺伝子多型を簡便に検出することが出来る方法です。

LAMP-FLP 法の原理の詳細については、株式会社ニッポンジーンホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン; <http://www.nippongene.com/index.html>

詳細はこちら

http://www.nippongene.com/kensa/products/instruments/lf-8/data1_lf-8.html

【本品に含まれる合成オリゴヌクレオチドについて】

本品に含まれるプライマーは全て「リライアブル&トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル&トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティ完備を特長としています。詳細に関しては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; <http://www.nippongenematerial.com/>

II 製品内容

【製品内容】

LAMP-FLP 法用プライマー・プローブセット Human VDR (rs1544410)
48 テスト用

シリーズ番号	内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
#015	Primer Mix rs1544410	赤色	150 μ l	-20°C (遮光)
#015	Genotyping Probe rs1544410	緑色	150 μ l	-20°C (遮光)

マニュアル (本紙) 一部

取り扱い上の注意

- ◆ 試薬は-20°Cで暗所に保存し、納品後 6 カ月以内に使用してください。
- ◆ 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、フィルター付きマイクロチップは 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

- 簡易核酸抽出試薬 (製品コード: NE6981)
- LAMP-FLP 法用 DNA 増幅試薬セット (製品コード: NE6991)
- マイクロピペット (0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L)
- フィルター付マイクロチップ (滅菌済み)
- マスターミックス調製用チューブ (1.5 mL あるいは 2.0 mL)
- 等温増幅蛍光測定装置 Genie[®] III (製品コード: NE5011)
または
LAMP 法用測定装置 LF-8 (製品コード: NE4031)
- 測定装置専用の反応チューブ
Genie[®] III: Genie[®] III Tube Strip (製品コード: NE5201, NE5203)
LF-8: Loopamp[®] 反応チューブ (製品コード: LMP901、LMP905)
- 氷 (クラッシュアイス)
- ピンセット (核酸の汚染がないもの)
- チューブラック
- アルミラック
Genie[®] III Cooling Block (製品コード: NE5301) など
- ボルテックスミキサー
- 簡易遠心機 (1.5 mL チューブ用及び Genie[®] III Tube Strip 用)

IV 使用方法

器具、機器の準備

■ 等温増幅蛍光測定装置

操作の詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。

■ 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、 <u>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</u> 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。

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、マスターミックス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、試薬類の取り扱いは行わないでください。マスターミックスへの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、0.5%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、0.5%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 5,000 ppm (0.5%) 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。

【プロトコル】

測定に Genie[®] III を使用する場合、「3a. 解析反応と解析結果 (Genie[®] III)」をご確認ください。

測定に LF-8 を使用する場合、解析結果の自動判定機能を使用することができますので、「3b. 解析反応と解析結果 (LF-8)」をご確認ください。

「1. DNA サンプルの調製」と「2. 解析反応の準備」は両機器で共通のプロトコルとなります。

1. DNA サンプルの調製

簡易核酸抽出試薬のプロトコルに従って、DNA サンプルを調製します。

2. 解析反応の準備

2-1. 試薬の融解

本品 (Primer Mix、Genotyping Probe) と LAMP-FLP 法用 DNA 増幅試薬セットの 10x 反応バッファー、dNTPs Mixture、ddWater を室温で完全に融解します。

ただし、増幅酵素は-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てください。

2-2. マスターミックスの作製

マスターミックス調製用チューブ (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、ボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合した後、スピンドウンを行います。これをマスターミックスとし、氷上に静置します。標準反応スケールは 25 μL です。

	1 テスト分	例) 8+1 テスト分の場合
ddWater	11.1 μL	99.9 μL
10x 反応バッファー	2.5 μL	22.5 μL
dNTPs Mixture	1.4 μL	12.6 μL
Primer Mix rs1544410	2.5 μL	22.5 μL
Genotyping Probe rs1544410	2.5 μL	22.5 μL
増幅酵素	1.0 μL	9.0 μL
マスターミックス合計	21.0 μL	189.0 μL

2-3. マスターミックスの分注とサンプルの添加

反応チューブ (Genie[®] III: Genie[®] III Tube Strip、LF-8: Loopamp[®] 反応チューブ) を袋から取り出し、アルミラックに立て、マスターミックスを 21 μL ずつ分注します。

次にサンプル反応チューブに 1 で調製した DNA サンプルを 4.0 μL 添加してキャップを閉じます。

反応チューブの全てのキャップを閉じた状態で転倒混和により混合した後、スピンドウンを行います。

3a. 解析反応と解析結果 (Genie® III)

3a-1. 解析反応

Genie® III に下記条件を設定して、速やかに反応を開始します。

LAMP 法反応: 68°C 40 min

酵素失活: 98°C 5 min

会合曲線解析: 98-40°C、0.05°C / sec.

3a-2. 解析結果

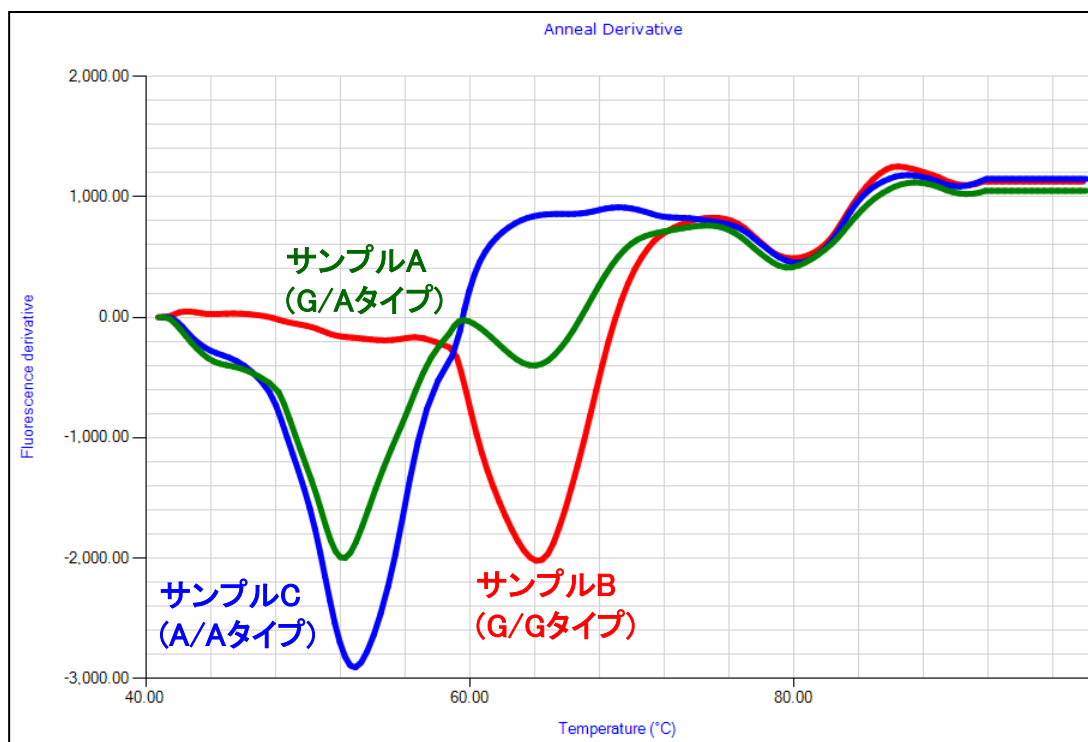


図 1: 本品を用いた等温増幅蛍光測定装置 Genie® III での会合曲線解析結果

図 1 より、サンプル A はヘテロ、サンプル B は G/G ホモ、サンプル C は A/A ホモと判定されます。

3b. 解析反応と解析結果 (LF-8)

LF-8 への反応条件設定に LF-8 Manager、解析データ保存等に LF-8 Analyzer を使用しますので、詳細は取扱説明書をご参照ください。

3b-1. 測定条件の設定

LF-8 Manager を起動して、下記の反応条件を入力した後、LF-8 本体に書き込んでください。

Profile-Isothermal-

Temperature: 68.0

Duration: 2400

Measure Period: 1

Profile-Anneal-

Start Temperature: 98.0

Settling time: 300

Fan Temperature: 100.0

End Temperature: 40.0

Measure Period: 1

Isothermal

Ratio Smoothing: 11

Derivative Smoothing: 11

Second Derivative Smoothing: 11

Derivative Threshold: 1000

Second Derivative Threshold: 20

Anneal

Smoothing Count: 100

-Genotype1-

Lower Temperature: 61.0

Higher Temperature: 67.0

Threshold: -300

-Genotype2-

Lower Temperature: 49.0

Higher Temperature: 55.0

Threshold: -300

Peak Ratio: 50

3b-2. 解析反応

反応チューブをセットした後、LF-8 本体の START ボタンを押して、反応を開始してください。反応終了後、LF-8 Manager を使用して、測定データの保存をしてください。

3b-3. 解析結果

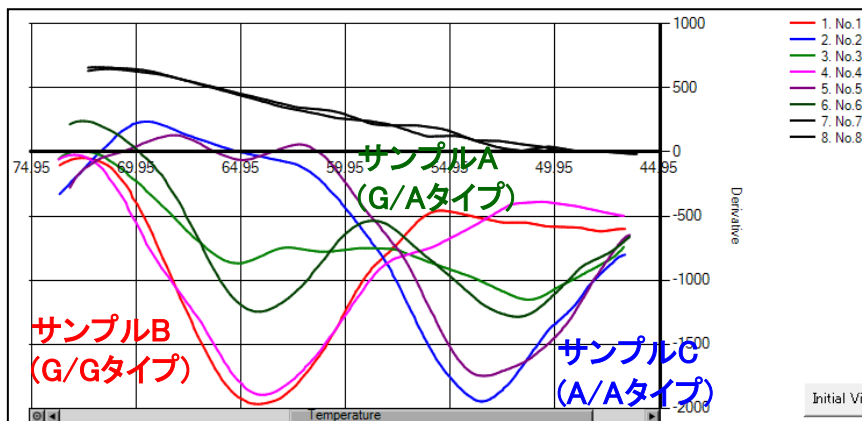


図 2: 本品を用いた LAMP 法用測定装置 LF-8 での会合曲線解析結果

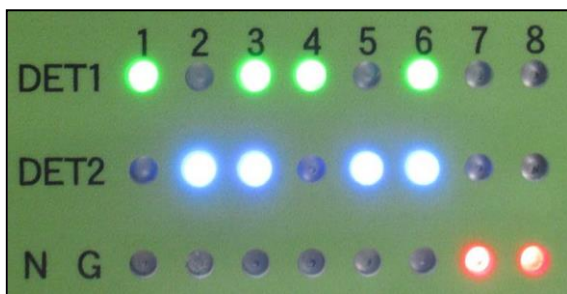


図 3: LF-8 本体の自動判定機能による解析結果

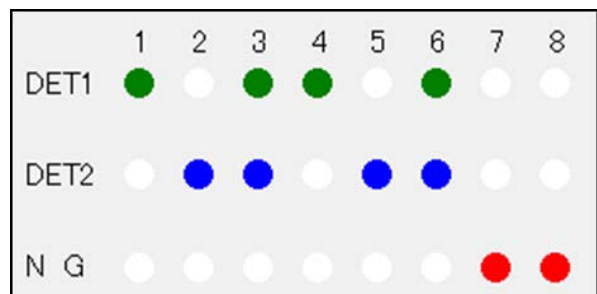


図 4: LF-8 Analyzer による自動判定結果

「3b-1. 測定条件の設定」で設定された条件に従って、図 2 の結果を解析して、図 3 の様に自動判定結果が LF-8 本体に出力されます。

No.1, 4 は G/G ホモであり、Genotype1 設定範囲のみにピークがあるため、DET1 のみが点灯します。

No.2, 5 は A/A ホモであり、Genotype2 設定範囲のみにピークがあるため、DET2 のみが点灯します。

No.3, 6 はヘテロであり、DET1 と DET2 両方が点灯します。

No.7, 8 は陰性コントロールであり、ピークが検出されないため、NG が点灯します。

V トラブルシューティング

本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。その他のご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
正確な結果を示さない（濁度が上昇しているが、解析結果が一致しない）	A. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 陰性コントロールによる反応を実施し、増幅が起こっている場合、鋳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、0.5%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。 B. 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。
正確な結果を示さない（濁度が上昇していない、会合曲線解析でピークが見られない）	A. DNA サンプルの鋳型 DNA 濃度が低い、もしくは抽出されていない。 簡易核酸抽出試薬のマニュアルをご確認ください。 B. 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。
試薬が不足する	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。 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。

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。
- ・本マニュアルの記載内容は2018年5月現在のものです。最新のマニュアル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。
- ・「Loopamp®」は、栄研化学株式会社の登録商標です。
- ・「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。