

LAMP MASTER シリーズ

I 製品説明

本品（2×LAMP MASTER）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です。LAMP 法に必要な耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、Mg²⁺、dNTPs、至適化されたバッファーなどを含むため、2×LAMP MASTER 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、本品と蛍光試薬のセット品もあり、DNA 増幅の検出方法に合わせてお選びいただけます。

<使用上の注意>

- 本品は試験研究用ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になりません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱い扱わないで下さい。
- 本品の取扱いはマニュアル記載内容通りに行ってください。マニュアル記載内容と異なった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。
- LAMP 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。

II 製品内容

本品（Code No. 311-08961） 濁度検出用

LAMP MASTER for Turbidity		
2×LAMP MASTER ^{*1)}	625 μl×6本	-20℃

*1) 本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下さい。

セット品（Code No. 317-08941） 蛍光検出用

LAMP MASTER for Fluorescence		
本品（2×LAMP MASTER） ^{*1)}	625 μl×6本	-20℃
10×Intercalation Mix ^{*2)}	750 μl×1本	-20℃遮光

*2) 遮光保存して下さい。溶解時も遮光を推奨します。

セット品（Code No. 314-08951） 目視判別用

LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)		
本品（2×LAMP MASTER） ^{*1)}	625 μl×6本	-20℃
25×Visible Dye ^{*2)}	300 μl×1本	-20℃遮光

*2) 遮光保存して下さい。溶解時も遮光を推奨します。

III プロトコール

試薬の調製方法

- 対象ごとに適した方法を用いて鋳型核酸を調製する。
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下さい。
- 標的遺伝子に対して6種類（または4種類）のLAMPプライマーを混合して、10×LAMP Primer Mix を調製する。
例）10×LAMP Primer Mix: 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
- 2×LAMP MASTER、鋳型核酸、プライマー等、使用する試薬^{*3)}を室温で溶解する。各試薬をボルテックスミキサーにて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する。
^{*3)} 10×Intercalation Mix または 25×Visible Dye は、アルミ袋内で溶解する、もしくはアルミホイル等でチューブを覆うなど、できる限り遮光して下さい。

反応液の調製方法

- 1.5 ml あるいは 2.0 ml チューブに次ページの反応例を参考に鋳型核酸以外の試薬を必要反応分ずつ分注し、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、これをマスターミックスとし、氷上に静置する。
参考 RT-LAMP 法において AMV Reverse Transcriptase を使用する場合は、25 μl の反応系あたり 0.2 units を添加して下さい。
- 使用する装置の推奨チューブに1反応分ずつマスターミックスを分注し、鋳型核酸またはコントロール^{*4)}を~5 μl 添加し全量 25 μl とする。
^{*4)} まず、陰性コントロール（ddWater 等）を調製する。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る。このとき、ピペティングまたはキャップを閉めた上

でのタッピングでよく混合した後、スピンドウンして下さい。また、混合の際は気泡が立たないように注意する。

- ⑥ 検出装置にチューブをセットし、60~68℃^{*5)} で30~60分間^{*6)} のLAMP反応を行う。

*5) 設計したプライマーによって最適な温度が異なるので、あらかじめ条件検討を行ってから反応温度を決定する。

*6) 反応時間は、下記の反応例を参考にする。

LAMP MASTER for Turbidity 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鑄型核酸	~5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60~68℃、60分間 (LAMP 反応)	

<濁度測定>

LAMP法によるDNAの増幅によって反応副産物であるピロリン酸マグネシウムが蓄積されて反応液が白濁する。この濁度を濁度測定装置で測定することにより、増幅の有無を判定できる。

LAMP MASTER for Fluorescence 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
10×Intercalation Mix	2.5 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鑄型核酸	~5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60~68℃、30分間 (LAMP 反応)	
↓	
会合曲線解析もしくは融解曲線解析	

<蛍光測定>

二本鎖DNAに結合して蛍光を発するインターカレーターを反応系に添加し、DNA増幅に伴う蛍光を検出する。

蛍光検出用装置として、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。

注意 10×Intercalation Mixは蛍光検出用試薬のため、濁度測定装置には使用できません。

LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye) 反応例

2×LAMP MASTER	12.5 μl
25×Visible Dye	1.0 μl
10×LAMP Primer Mix	2.5 μl
鑄型核酸	~5 μl
ddWater	up to 25 μl
↓	
60~68℃、40分間 (LAMP 反応)	
80℃、5分間 (反応停止)	
↓	
目視判定	

<目視判定>

可視光下で、陰性では淡い赤色を呈し、陽性では鮮明な黄緑色を呈する。この発色は蛍光に由来しているため、紫外線照射下ではより正確な判定が可能である。

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、コントロール液の発色の有無を確認してから、検体の判定を行う(60分間まで反応時間を長くすることも可能だが、その場合、陰性コントロールで非特異反応がないことを確認する。)

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るため、反応停止後、速やかに目視判定を行う。また、反応液を調製する際、EDTA等の金属キレート化合物を含むTE等を用いない。

<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下さい。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下さい。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下さい。



OK (ヒンジに指をかける)



NG (つばに指をかける)

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。