

# 赤潮原因プランクトン検出キット 2

## -シャットネラ属-

Red tide causative species Detection Kit 2

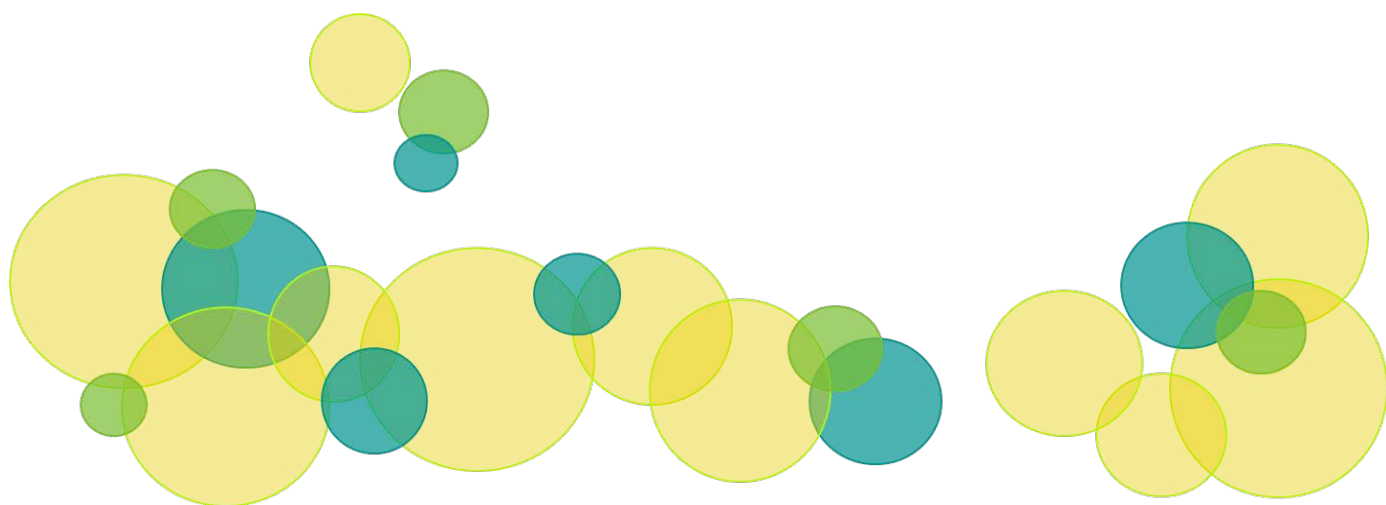
-*Chattonella* spp.-

### 取扱説明書

version 4.0.0

製品コード

NE0171



ニッポン・ジーン

# 赤潮原因プランクトン検出キット 2

## –シャットネラ属–

### 取扱説明書 version 4.0.0

#### 【はじめにお読みください】

このたびは、赤潮原因プランクトン検出キット 2 –シャットネラ属–をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

#### 使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いて海水中に存在する赤潮原因プランクトンの一つであるシャットネラ属 (*Chattonella* spp.) を検出するための試薬です。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. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】(2 ページ) に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 か月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**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. 本キット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。キット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。
5. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび**陽性コントロール (PC)** の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。
6. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート (SDS) を公開していますので、ご参照ください。  
株式会社ニッポンジーン; <http://nippongene-analysis.com/>
7. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。
8. 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、LAMP 法を用いた赤潮原因プランクトン検出キットの開発、製造、および販売を許諾されています。

# 目次

ページ

1. キット説明 .....	1
赤潮原因プランクトン検出キット 2 -シャットネラ属-の概要	
シャットネラ属と赤潮発生予測	
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法	
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して	
2. キット内容 .....	2
キット内容と保存温度	
3. 必要な器具、機器 .....	3
4. キット使用方法 .....	5
簡易プロトコル .....	5
検査を行う前の準備および注意事項 .....	7
サンプルの準備	
器具、機器の準備	
検査環境	
詳細な使用方法 .....	9
DNA の抽出	
検査反応	
判定	
5. トラブルシューティング .....	14
6. 文献・資料 .....	15
7. 付録 .....	16
品質管理	
陽性コントロール (PC) のコピー数	
資料	
メモ	

本キットに含まれているLAMPプライマーセットおよびこのLAMPプライマーセットを用いたLAMP法によるシャットネラ属の検出技術\*は、国立研究開発法人 水産研究・教育機構により開発されました。

\* 本成果の一部は水産庁委託「赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業」の中で得られたものです。

# 1. キット説明

## 【赤潮原因プランクトン検出キット 2 -シャットネラ属-の概要】

本キットは LAMP 法を利用して赤潮原因プランクトンの一つであるシャットネラ属 (*Chattonella* spp.) を検出するキットです。シャットネラ マリーナ (*Chattonella marina*) をはじめとし、その変種であるシャットネラ アンティーカ (*Chattonella marina* var. *antiqua*) およびシャットネラ オバータ (*Chattonella marina* var. *ovata*) を検出できます。LAMP 法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP 法によりシャットネラ属のゲノム DNA の一部を増幅し、増幅の有無からシャットネラ属の存在を判定します。

検出に必要な操作は、海水中より抽出したDNAを検査溶液（検査液A、Bと、酵素液、蛍光発色液の混合液）に加えて66℃に60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。シャットネラ属が存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってシャットネラ属ゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、シャットネラ属が存在しない場合には、DNAの増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を蛍光発色液の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でシャットネラ属ゲノムDNAを検出することが可能です。

## 【シャットネラ属と赤潮発生予測】

シャットネラ属はラフィド藻の一種である植物プランクトンで、時に大増殖して赤潮を引き起こします。日本の海域に生息する植物プランクトンは数百種類あると言われていますが、このうち、水産業に深刻な被害をもたらす有害種は20種類あまりです。シャットネラ属はこの有害種に含まれており、少ない個体数であっても魚介類の斃死を引き起こす危険性があります。水産業への大きな被害を防ぐためには、赤潮の発生を早期にモニタリングし、生け簀の移動や餌止めといった対策を取ることが肝心です。

これまでは主に顕微鏡観察によって有害種の同定や細胞密度の測定が行われてきましたが、この方法は高度な知識と、場合によっては長時間の作業が必要でした。

この度、水産研究・教育機構により LAMP 法を用いたシャットネラ属検出プライマーおよび検出・同定手法が開発され、簡便・高感度・短時間で特に有害な赤潮原因プランクトンであるシャットネラ属を検出できる本キットが生まれました。

## 【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増幅反応効率から、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法の詳細な原理については、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/>

## 【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キット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。詳細に関しましては、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/>

## 2. キット内容

### 【キット内容と保存温度】

赤潮原因プランクトン検出キット 2 -シャットネラ属-  
24 テスト用 (製品コード: NE0171)

試薬名 (チューブラベル)	頭部ラベル色	内容量	保存温度
		24 テスト用	
取扱説明書	-	1 部	室温
抽出用チューブ	-	24 本	室温
検査用チューブ	-	24 本	室温
検査液 A	赤色	500 $\mu$ l	-20°C (遮光)
検査液 B	緑色	25 $\mu$ l	-20°C (遮光)
酵素液	黄色	25 $\mu$ l	-20°C (遮光)
蛍光発色液	紫色	25 $\mu$ l	-20°C (遮光)
陽性コントロール (PC)	灰色	25 $\mu$ l	-20°C (遮光)
ミネラルオイル	青色	500 $\mu$ l	-20°C (遮光)
抽出液	-	5,000 $\mu$ l	-20°C (遮光)

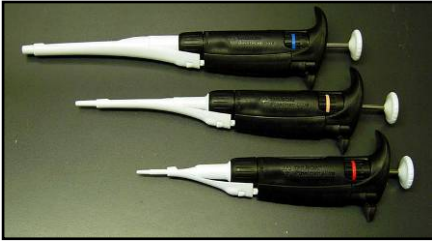
### 取り扱い上の注意

- ◆ 本キットでは、25テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、24テスト分の検査反応を行うことが可能です。検査溶液の調製を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。
- ◆ 抽出用チューブおよび検査用チューブに水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。
- ◆ 取扱説明書、抽出用チューブおよび検査用チューブ以外の試薬は-20°C で遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以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°C で保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。
- ◆ 酵素液を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。
- ◆ 陽性コントロール (PC) は、シャットネラ属のゲノム DNA に特徴的な配列を含む DNA 溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。
- ◆ 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。

### 3. 必要な器具、機器

#### 【必ずご準備いただく器具、機器】

- マイクロピペット\*  
(0.5-10  $\mu$ l、10-100  $\mu$ l、200-1,000  $\mu$ l)



- フィルター付マイクロチップ (滅菌済)\*



- マイクロチューブ\*  
(1.5 ml あるいは 2.0 ml)



- 使い捨て手袋



- シリンジ (20-50 ml)、ルアーロック式のを推奨



- フィルター (下記のどちらかを推奨) :

- ・ニュークリポアメンブレン

(PC MB 25 mm 1.0  $\mu$ m)

コード番号 110610

GE ヘルスケア・ジャパン株式会社

- ・アイソポアメンブレン

(ポリカーボネート、親水性、1.2  $\mu$ m 25 mm)

製品型番 RTTP02500

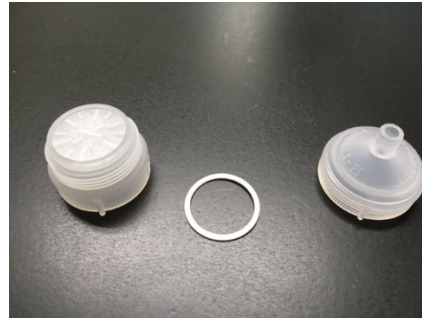
メルクミリポア株式会社

- フィルターホルダー

推奨: Swinnex (フィルターホルダー 25 mm)

カタログ番号 SX0002500

メルクミリポア株式会社



- ろ紙、ペーパータオル

- ピンセット

- 氷 (クラッシュアイス)

- インキュベーター (恒温器)

ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアークューベーター等、95 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、66 $^{\circ}$ Cを保持する機器が必要です。





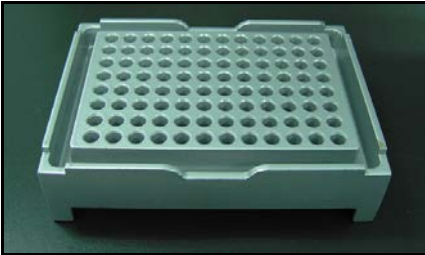
## 【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

### ● チューブラック\*



### ● アルミラックあるいはプレートラック



### ● ボルテックスミキサー



### ● 簡易遠心機



↑ 1.5 ml チューブ用



↑ 0.2 ml チューブ用

### ● フロートプレート\*

ウォーターバスで保温する際に使用します。

### ● UV照射装置\*

蛍光発色液による検出の際に使用します。  
240-260 nm あるいは 350-370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。



LED タイプのブラックライトも使用可能 ↑

### ● UV 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

### ● 0.2 ml または 0.5 ml PCR チューブ

サーマルサイクラーを使用して、海水から DNA 抽出を行う場合にご用意ください。

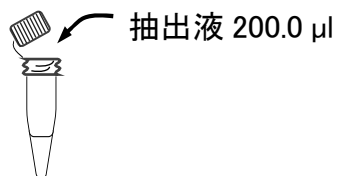
\* マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子検査ツールボックス**（製品コード：NE4111）も販売しております。

## 4. キット使用方法

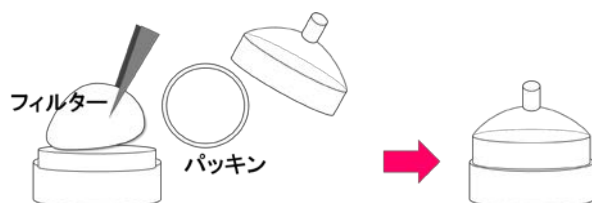
本キットの詳細な使用方法は7ページ以降を参照してください。

### 簡易プロトコル

1. 抽出液をサンプルあたり 200.0  $\mu\text{l}$  ずつ、抽出用チューブに分注する

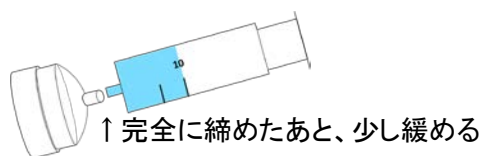


2. フィルター、パッキンの順にピンセットで置きふたを閉め、フィルターホルダーをセットする



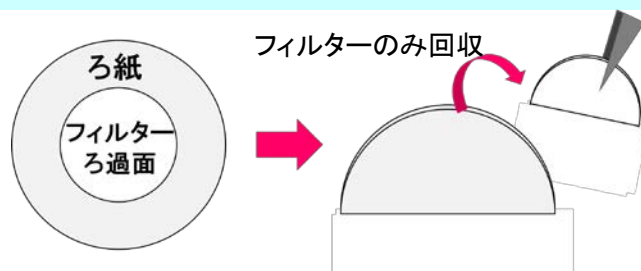
3. 海水をシリンジで 10 ml 採る

4. フィルターホルダーとシリンジを連結する

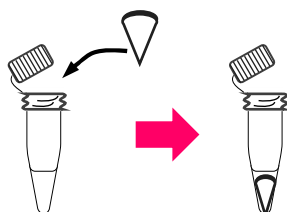


5. 海水をフィルターでろ過する

6. フィルターのろ過面を上にしてろ紙の上に置き、折りたたんだ後、フィルターを回収する



7. 折りたたんだフィルターを抽出液に完全に浸す





8. 95°C で 15 分間保温する (DNAサンプルとする)

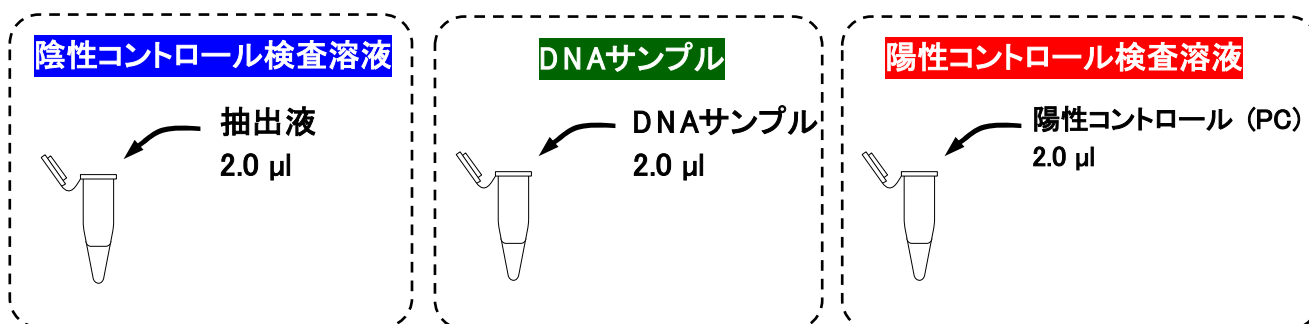
9. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1テスト*
検査液 A	20.0 $\mu$ l	180.0 $\mu$ l	500.0 $\mu$ l
検査液 B	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
蛍光発色液	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
酵素液	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
検査溶液合計	23.0 $\mu$ l	207.0 $\mu$ l	575.0 $\mu$ l

\* 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

10. 検査溶液を 1 テストあたり 23.0  $\mu$ l ずつ分注する

11. サンプル 2.0  $\mu$ l を添加する

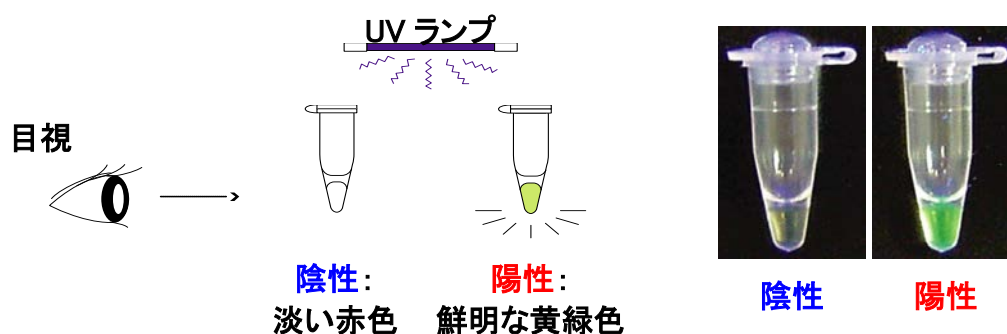


12. ミネラルオイルを 20.0  $\mu$ l 入れる

13. 66°C、60 分間 (検査反応)

14. 80°C、2 分間 (検査反応停止)

15. 判定



## 【検査を行う前の準備および注意事項】

### サンプルの準備

#### ■ コントロール

本キットには、検査の成否を確認するための陽性コントロール (PC) が添付されています。検査の成否を確認するには、陽性コントロール (PC) を添加する「陽性コントロール検査溶液」および抽出液を添加する「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

#### ■ サンプル準備

検査には海水中に存在するシャットネラ属から抽出した DNA を使用します。本キットは、海水中に存在するシャットネラ属 DNA の簡易抽出を行うための抽出液および抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前に DNA を準備してください。

### 器具、機器の準備

#### ■ インキュベーター (恒温器)

インキュベーター (恒温器) の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアークューベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

また、DNA 抽出の際は 95°C での処理が必要です。キット添付の抽出用チューブは蓋が開かないようにきちんと締めて、取り出しの際はやけどにご注意ください。サーマルサイ클ラーをご使用の場合も同様に、十分ご注意ください。

#### ■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、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	各区域専用とし、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、検査環境に陽性コントロール（PC）や検査後サンプル等、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、検査後サンプルおよび陽性コントロール（PC）の電気泳動法等による操作や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、検査溶液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陽性コントロール（PC）および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。

検査溶液へのサンプルおよび陽性コントロール（PC）の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すすぐことにより、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、1%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、1%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。

## <方法>

- i) 使い捨て手袋を装着します。
- ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm (1%) 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、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
- iv) 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、よくすすいで乾燥します。
- v) 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。

## 【詳細な使用方法】

### DNA の抽出

#### 重要

本キットは、海水中に存在するシャットネラ属 DNA の簡易抽出を行うための抽出液および抽出プロトコルを備えています。



#### フィルターろ過の準備

まず、フィルターをフィルターホルダーにセットします。

ピンセットを用いてフィルターを置き、続いてパッキンを置いてください。円錐形の蓋を緩みのないよう装着します（写真 1.）。



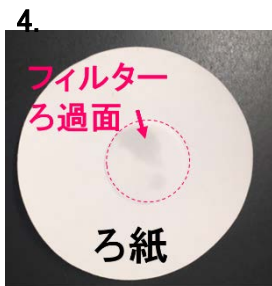
海水をよく混合した後シリンジで 10 ml 採取し、フィルターホルダーと連結させます（写真 2.）。このとき、ルアーロックに完全にねじ込んだ後、少し緩めることがポイントです。



#### フィルターろ過

シリンジをゆっくりと押して、海水をフィルターに通します。

海水を通した後は、フィルターホルダーをシリンジから外し、シリンジに空気を入れてから、再度フィルターホルダーと連結し空気を通してください。海水をろ過した後に、この作業を数回繰り返すことで海水を除去してください（写真 3.）。



#### 抽出液へのフィルター浸漬

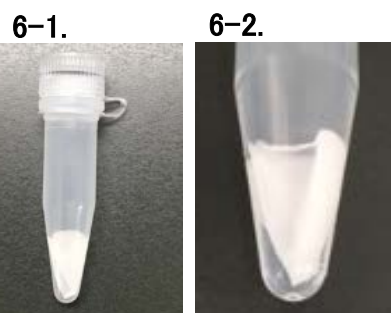
キット添付の抽出用チューブにあらかじめ抽出液を 200.0  $\mu$ l 添加しておきます。

ろ過面に触れないように注意しながら、ろ過後のフィルターをろ紙の上に、ろ過面を上にして置いてください（写真 4.）。



ろ紙ごと、一度半分に折りたたみ、フィルターを回収します（写真 5.）。海水はなるべく除去してください。

抽出液に完全に浸るように、フィルターをチューブに入れてください（写真 6-1.、6-2.）。



海水が多量に混入すると検査結果に影響を及ぼす恐れがあります。抽出液に浸漬するフィルターに海水が残らないようにご注意ください。

## DNA抽出

フィルターを浸漬した抽出用チューブを 95℃で 15 分間保温します。抽出用チューブは蓋が開かないようにきちんと締めて、取り出しの際はやけどにご注意ください。サーマルサイクラーをご使用の場合も同様に、十分ご注意ください。得られた溶液をDNAサンプルとします。フィルターの除去、攪拌は必要ありませんので、そのままご使用ください。

## 重要

本キットは、10 ml の海水中にシャットネラ属のプランクトンが 1 細胞以上存在する場合、検出できます。海水を大量にろ過して検出感度を上げたい場合は、別途径のサイズが大きなフィルターと、ろ過器をご準備ください。

未使用の抽出液を抽出用チューブに分注してから保管する場合には、1 テスト分 (200.0 μl) ずつ分注した後、-20℃にて遮光して保管してください。

## 検査反応

### 試薬の融解

検査液A、検査液B、陽性コントロール (PC)、ミネラルオイルを取り出し、室温で完全に融解します。酵素液および蛍光発色液は-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ます。

### 混合とスピンドウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンドウン）、試薬を氷上に静置します。

## 検査溶液の作製



マイクロチューブ（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、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて1秒間 × 3回の攪拌により混合した後、スピンドウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

### <容量>

試薬	1テストあたり	8+1テスト*	24+1テスト*
検査液 A	20.0 $\mu$ l	180.0 $\mu$ l	500.0 $\mu$ l
検査液 B	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
蛍光発色液	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
酵素液	1.0 $\mu$ l	9.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
検査溶液合計	23.0 $\mu$ l	207.0 $\mu$ l	575.0 $\mu$ l

\* 分注時の液量の不足を防ぐため、1テスト分多めに作製する。

### 重要

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、フィルター付マイクロチップは1回ごとに使い捨てとして使用してください。

酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンドウンを行ってください。

## 検査溶液の分注



核酸の汚染がないピンセットを用いて検査用チューブを袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を23.0  $\mu$ l ずつ分注します。

### 重要

本キットに添付の検査用チューブと容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。



## DNAサンプルの添加

DNA サンプル 2.0  $\mu$ l を検査溶液に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付のミネラルオイルを 20.0  $\mu$ l 程度重層し、キャップを閉じます（蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますのでご注意ください）。なお、インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラー等を使用する場合には、ミネラルオイルの添加は不要です。

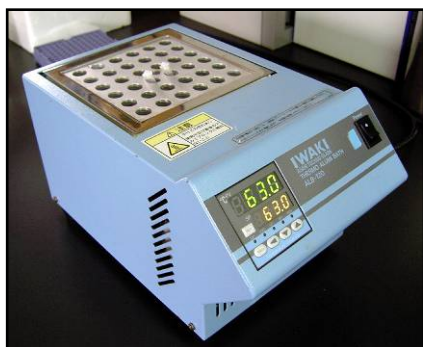
### 重要

陰性コントロールと陽性コントロールを作製してください。

この時の注意事項として、サンプルとミネラルオイルの添加は必ず、①陰性コントロールサンプル、②DNA サンプル、③陽性コントロールサンプル、の順に行ってください。また、サンプル添加後は速やかにキャップを閉じてください。

なお、陰性コントロールサンプルには 2.0  $\mu$ l の抽出液を使用し、陽性コントロールサンプルには 2.0  $\mu$ l の陽性コントロール（PC）を使用してください。

## 検査反応



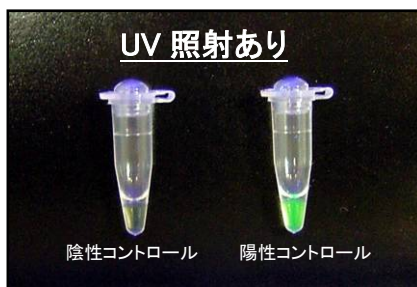
全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌にて混合した後、スピンドウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアークューベーターなどを用いて 66°C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、検査用チューブが反応中に傾かないようにしてください。



## 判定

### 検査の成否の判定



60 分間保温した後、80°C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の蛍光発色液は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240–260 nmあるいは 350–370 nmの波長を出力）およびUV防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が 320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

## 重要

本キットでは、検査結果の判定は 60 分間が経過した時点の発色で行います。60 分を超えて反応を行うと誤判定の原因となります。また、必ず 80°C 以上 2 分間の熱処理により反応を停止してから速やかに判定を行ってください。

### サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次にサンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にシャットネラ属が存在する可能性があります。

#### <判定のポイント>

##### 明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「シャットネラ属**陽性**」と判定します。仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、シャットネラ属陽性と判定します。

##### 陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「シャットネラ属**陰性**」と判定します。

## 5. トラブルシューティング

本キット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
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	<p><b>A. 陽性コントロール (PC) の添加量が過剰である。</b> 陽性コントロール (PC) の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。陽性コントロール (PC) の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。</p> <p><b>B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。</b> 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、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、1% 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。</p> <p><b>C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。</b> EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。海水中には金属イオンが含まれています。海水が多量に混入した場合、LAMP 反応を阻害することが確認されておりますので、フィルターについての海水はろ紙などに吸収させなるべく混入させないようにご注意ください。</p> <p><b>D. 反応温度、操作手順に誤りがある。</b> 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。</p>
蛍光発色液が変色した	<p><b>A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。</b> 蛍光発色液は長時間放置すると検査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。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。</p>
検査溶液が蒸発した	<p><b>A. 反応チューブが均一に加熱されていない。</b> ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付のミネラルオイルを必ず添加してください。</p>
蛍光の発色の有無を判断しにくい	<p><b>A. 励起波長が合っていない。</b> 240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。</p>
試薬が不足する	<p><b>A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。</b> 使用前にスピンドウンを行ってください。</p> <p><b>B. 保存中に試薬が蒸発している。</b> 使用後はキャップを完全に閉じてください。</p>

## 6. 文献・資料

---

1. 坂本節子、山口峰生、紫加田知幸 (2012) 新規有害プランクトンに係る発生・増殖機構の解明、モニタリング及び予察技術に関する研究①新規有害プランクトンの簡易モニタリング技術開発、生理・生態の解明. 平成 23 年度漁場環境生物多様性保全総合対策委託事業 赤潮・貧酸素水塊漁業被害漁業防止対策事業報告書、pp.4-11.
2. Sakamoto S, Yamaguchi M, Shikata T. (2012) Development of A Simple and Rapid Detection for Harmful Red Tide Algae by LAMP Method. The 15th International Conference on Harmful Algae Abstract Book, p.111
3. 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
4. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3) : 358

# 7. 付録

## 【品質管理】

キットに添付の陽性コントロール (PC) 2.0  $\mu\text{l}$  を鋳型として 25.0  $\mu\text{l}$  (1 テスト分) の容量で DNA 増幅反応を行い、66°C、60 分間で蛍光発色液が発色することを確認しています。

## 【陽性コントロール (PC) のコピー数】

陽性コントロール (PC) には、2.0  $\mu\text{l}$ あたりおよそ  $4 \times 10^5$  コピーの標的配列が含まれています。

## 【資料】



↑シャットネラ マリーナ  
(スケールは 50  $\mu\text{m}$ )



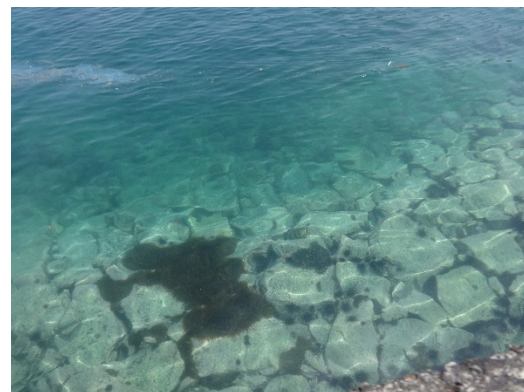
↑シャットネラ アンティーカ



↑シャットネラ オバータ



↑赤潮が発生した海の様子



↑赤潮が発生していない海の様子

【メモ】



【メモ】

【メモ】

【メモ】



# ニッポン・ジーン

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2018 年 6 月現在のもので、最新の取扱説明書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。
- 「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。
- 記載内容および写真の複製、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。