

研究用

* 2008年1月改訂(第2版)
2007年5月全面改訂



プライマーセット KHV

(Primer Set for Koi herpesvirus)

【特徴】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 1種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する^{1), 2)}、② 6領域を認識する4種類の primer を使用するため特異性が高い、③ 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④ 増幅産物量が多く、簡易検出に適している^{3), 4), 5), 6)}、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本試薬は Loopamp DNA 増幅試薬キットと組み合わせて使用するコイヘルペスウイルス (Koi herpesvirus、以下、KHV) genome DNA⁷⁾ 検出用のプライマーセットです⁸⁾。

【内容】

48 テスト分

- | | |
|---|------------------|
| (1) Extraction Solution F (EX F) ^{*1} | 1.8 mL × 3 tubes |
| (2) 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) ^{*1} | 1.0 mL × 1 tube |
| (3) Primer Mix. KHV (PM KHV) ^{*1} | 0.12 mL × 1 tube |
| (4) Positive Control KHV (PC KHV) ^{*1} | 0.1 mL × 1 tube |

*1 : () 内は、試薬チューブに記載されている表示です。

【使用方法】

1. 必要な器具・装置・試薬

- ホモジナイザーベッセル (1.5 mL チューブ用)
- 検体処理用滅菌チューブ (1.5 mL)
- マスターミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- ピペット (0.5~10 μL, 10~100 μL, 100~1,000 μL)
- フィルター付きチップ
- 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 氷 (クラッシュアイス) 及びアイスボックス
- 微量簡易遠心機
- 8連マイクロチューブ用簡易遠心機
- ボルテックスミキサー
- Loopamp 反応チューブ
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C、RT-160C)、又はインキュベーター
- 簡易抽出処理用 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0 ; ニッポンゼン社製など)
- 市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など)
- Loopamp DNA 増幅試薬キット中の 2 × Reaction Mix. (RM), *Bst* DNA Polymerase (*Bst* DNA Polymerase), Distilled Water (DW)

2. 検体の調製

- 1) 市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など) を用いる場合
 - (1) 抽出方法などは、使用するキットのマニュアルに従ってください。
 - (2) DNA 抽出後、サンプルは 95℃ で 5 分間加熱処理し氷上に保存してください。
- 2) LAMP 法簡易抽出試薬を用いる場合
 - (1) 検体前処理用滅菌チューブに採取した病魚試料 5~10 mg を入れ、TE buffer 100 μL を加えてホモジナイザーベッセルを用いて組織を均一化します。
 - (2) Extraction Solution F (EX F) 100 μL を加えキャップを開けてボルテックスミキサーで混和します (1 秒間 × 3 回)。
 - (3) 微量簡易遠心機で数秒間遠心 (以下、スピンドウン。) し、95℃ で 5 分間加熱処理します。
 - (4) 1M Tris-HCl : pH 7.0 (Tris) 10 μL を加えてボルテックスミキサーで混和します。
 - (5) 混和後、室温で 2,000 × g 以上で 30 秒間遠心し、氷上に移し、上清をサンプル溶液とします。

☆ 簡易抽出法を用いた場合は、市販の DNA 分離試薬を用いた場合に比べて感度が 1 オーダー程度低下する可能性があります。

☆ 検体の採取・取扱いに際しては、KHV の環境への拡散防止及び検体への DNA コンタミネーション防止対策をとってください。

3. 試薬の調製

- 1) -20℃ で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。

2) マスターミックスの調製 (氷上で行ってください。)

別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2 × Reaction Mix. (RM), *Bst* DNA Polymerase, Distilled Water (DW) と、本試薬の Primer Mix. KHV (PM KHV) を次表の割合で分注します。

<試薬>	<用量 : 1 test>	<用量 : 10 tests>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. KHV (PM KHV)	2.5 μL	25 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL	40 μL
合計	20.0 μL	200 μL

☆ 調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

3) 蛍光目視検出する場合

上記マスターミックスの Distilled Water (DW) 4 μL のうち、1 μL を Loopamp 蛍光・目視検出試薬とし、Distilled Water (DW) を 3 μL 加えて合計 20 μL としてください。

4. 操作法 (詳細は Loopamp DNA 増幅試薬キットの手順に従ってください。)

1) マスターミックスとサンプル溶液の混合 (氷上で行ってください。)

- (1) 氷上で Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20 μL を分注します。
- (2) サンプルの DNA、並びに陽性コントロールとして Positive Control KHV (PC KHV) を、陰性コントロールとして Distilled Water (DW) を 5 μL 添加し、全量 25 μL とします。このとき、ピペティング又はキャップを開けた上でのタッピングにより良く混合した後、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンします。

☆ 混合の際には気泡が立たないように注意してください。

☆ 反応チューブにサンプル溶液が添加されていることを目視で確認してください。

2) 増幅反応及び検出

- (1) Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C、RT-160C)、又はインキュベーター (温度精度が ± 0.5℃ 以内 : ホットボンネット付) を 65℃ に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認します。
- (2) 分注済みの反応チューブをセットし、65℃、60 分間インキュベートします。
- (3) 増幅反応後にヒートブロックを用いて酵素失活操作 (80℃、5 分間又は 95℃、2 分間) を行って反応を停止させます。

☆ リアルタイム濁度測定装置の場合、酵素失活は自動処理されます。

☆ インキュベーターを用いる場合は、別途必ず酵素失活操作を行ってください。

< Loopamp リアルタイム濁度装置による検出 >

- (1) Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C、RT-160C) の測定条件を KHV 検出用にあわせませす。
- (2) 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認します。陽性コントロール (Positive Control KHV (PC KHV)) で濁度が上昇し、陰性コントロール (Distilled Water (DW)) で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行しています (下図)。

それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施する必要があります。

- (3) 各検体の判定を行います。増幅反応時間内 (60 分間) に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とします。

☆ 検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール (Positive Control KHV (PC KHV)) と異なる場合があります。

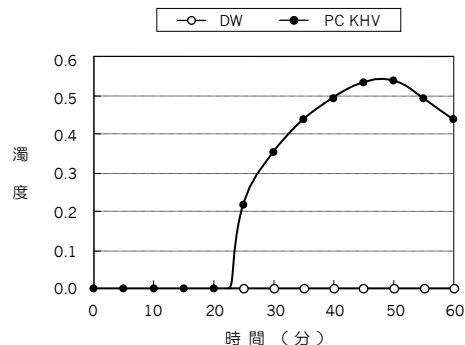


図. Positive Control KHV (PC KHV) の増幅曲線パターン^{*2}
(使用装置 : Loopamp リアルタイム濁度測定装置)

*2 : 本試薬の濁度立ち上がり時間と初期接種量との間に相関はありません。

< 蛍光目視による検出 >

- (1) 判定は、紫外線照射装置（波長 240～260nm、又は 350～370nm）を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して反応チューブの側面より観察し、陽性コントロール（Positive Control KHV（PC KHV））と同様に緑色の強い蛍光を発すれば陽性、陰性コントロール（Distilled Water（DW））と同様に蛍光を発しなれば陰性と判定します。
- (2) 観察は、目を眼鏡等で保護した状態で行ってください。
- (3) 記録する場合は、電気泳動撮影用カメラ等を用います。

- ☆ 検体によって、陽性コントロールよりも強く蛍光を発することがありますが、蛍光の強さと検体のコピー数に相関はありません。
- ☆ 地下水など重金属イオンを多量に含む飼育水で飼育された病魚試料を用いた場合蛍光反応が阻害される可能性があります。
- ☆ 紫外線照射装置を用いた判定が明確でない場合は、①市販のブラックライトを反応チューブ底面よりあてて、チューブ側面より観察します。②蛍光灯下で肉眼観察します。③電気泳動撮影用カメラで撮影し観察します。などの方法を適宜用いてください。
- ☆ 本試薬を用いた検出例は、Eiken GENOME SITE（URL；<http://loopamp.eiken.co.jp/>）内の製品紹介ページをご参照ください。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 本試薬は、学術研究目的のみにご使用ください。
2. 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありますので、本試薬の使用に当たっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。
3. 本試薬の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った結果、判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。
4. 外箱に表示の使用期限（Exp.Date）内に使用してください。
5. 試薬チューブはPP、キットケースは紙を主な材質としています。廃棄の際は医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

製品名	包装単位	貯蔵方法	有効期間	製品コード
Loopamp®プライマーセット KHV	48テスト分	-20℃	1年間	PM0003

【参考文献】

- 1) Notomi T. et al.: Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K. et al.: Clin. Chem. **47**, No.9, 1742-1743 (2001)
- 3) Mori Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150-154 (2001)
- 4) 富田 憲弘, 他: 第73回日本生化学会大会発表抄録集 (2000)
- 5) 森 安義, 他: 第23回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2000)
- 6) 富田 憲弘, 他: 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003)
- 7) Gilad O. et al.: Dis. Aquat. Organ. **11**, No.48, 101-108 (2002)
- 8) 吉野 学, 他: 魚病研究, 第**41**巻第1号, 19-27 (2006)

* 【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口
フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

* 製造販売元



栄研化学株式会社
栃木県下都賀郡野木町野木143番地