

研究用

** 2008年1月改訂(第3版)
* 2006年11月改訂(第2版)



プライマーセット Avian Flu H7

(Primer Set for Avian Flu H7)

【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 RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) と組み合わせて使用する H7 型鳥インフルエンザウイルス (Avian Influenza Virus Subtype H7: Avian Flu H7) genome RNA の Hemagglutinin 領域内に設計した検出用のプライマーセットです。

【内容】

- 48 テスト分
- (1) Primer Mix. Flu H7 (PM FLUH7)^{*1} 0.12 mL × 1 tube
- (2) Positive Control Flu (PC FLU)^{*1} 60 μL × 1 tube

*1: () 内は、試薬チューブに記載されている表示です。

【使用法】

1. 必要な器具・装置・試薬

Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) の説明書をご参照ください。

2. 検体の調製

検体からの RNA の抽出にはウイルス分離用試薬 (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen 社など) をお使いください。

また、検体の採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策⁷⁾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 RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) の 2 × Reaction Mix. (RM), Enzyme Mix. (EM), Distilled Water (DW) と、本試薬の Primer Mix. Flu H7 (PM FLUH7) を下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. Flu H7 (PM FLUH7)	2.5 μL	25 μL
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL	40 μL
合計	20.0 μL	200 μL

4. 操作法 (詳細は Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-LAMP) 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) 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 RNA、並びに陽性コントロールとして Positive Control Flu (PC FLU) 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、ピペッ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、スピンドウンします。また、混合の際は気泡が立たないように注意します。

2) 増幅反応及び検出

(1) 62.5℃, 35分間インキュベートします。

(2) 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。

☆ 蛍光目視検出や電気泳動等、増幅反応後に別途検出操作を行う場合は、必ず酵素の失活操作を行ってください。また、蛍光目視検出については、Loopamp 蛍光目視検出試薬の説明書をご参照ください。

☆ 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。

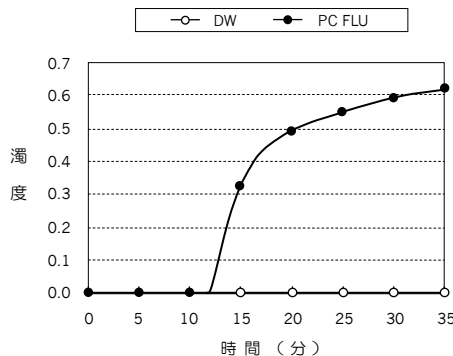


図. Positive Control Flu (PC FLU) の増幅曲線パターン^{*2}
(使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置)

*2: 本試薬の濁度立ち上がり時間と初期錫型量に相関はありません。

【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. 本試薬は 1999 年以降ユーラシア大陸で分離された H7 型鳥インフルエンザウイルスの配列をもとに設計されたものです。従って 1998 年以前の分離株や、他の地域で分離された株は検出できない可能性があります。
3. 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。
4. 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。
5. 外箱に表示の使用期限 (Exp.Date) 内に使用してください。
- * 6. 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 Avian Flu H7	48テスト分	-20℃	1年間	PM0004

【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) 国立感染症研究所 病原体等安全管理規程

**【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



Primer Set for Avian Flu H7

【Characteristics】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a novel gene amplification method capturing the following characteristics : ① Only one enzyme is required and the amplification reaction proceeds under isothermal condition^{1), 2)}, ② It has extremely high specificity because of the use of 4 primers recognizing 6 distinct regions on the target., ③ It has high amplification efficiency and enables amplification within a shorter time., ④ It produces tremendous amount of amplified products which makes simple detection possible^{3), 4), 5), 6)}.

This reagent consists of the primer set for the detection of the genomic RNA encoding Hemagglutinin of Avian Influenza Virus Subtype H7 (Avian Flu H7), which is specifically designed for Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP).

【Contents of the kit】

48 tests

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| (1) Primer Mix. Flu H7 (PM FLUH7)*1 | 0.12 mL × 1 tube |
| (2) Positive Control Flu (PC FLU)*1 | 60 μL × 1 tube |

*1 : The notation on each reagent tube is shown in ().

【How to use】

1. Materials required but not provided

Refer to the package insert for Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP).

2. Preparation of the specimen

Carry out the extraction of RNA from the specimen using a commercially available virus genome isolation reagent (for example, QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen). When handling the sample, always abide by the biohazard counter measures⁷⁾.

3. Reagents preparation

- Take out the reagents stored at -20°C , thaw them at room temperature. Once the reagents are thawed, keep them on ice.
- Preparation of master mix. (Operate on ice). Referring to the table below, dispense the necessary amount of Primer Mix. Flu H7 (PM FLUH7) of this kit, and 2×Reaction Mix.(RM), Enzyme Mix. (EM) and Distilled Water (DW) of Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP), into sterilized tube for master mix.

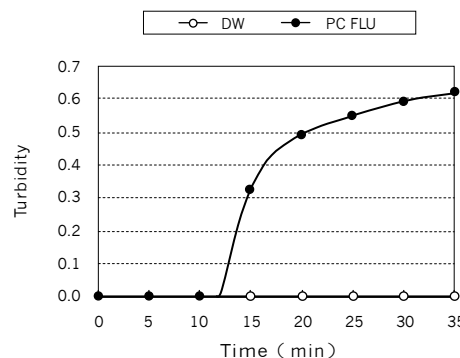
<Reagents>	<Amount : 1 test>	<Amount : 10 tests>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. Flu H7 (PM FLUH7)	2.5 μL	25 μL
Enzyme Mix. (EM)	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL	40 μL
Total	20.0 μL	200 μL

4. Operation procedures (Follow the instruction of Loopamp RNA Amplification Kit (RT-LAMP)).

- Mixing master mix. solution and the sample solution (Operate on ice).
 - Dispense 20 μL of the master mix. into each Loopamp Reaction Tube.
 - Add 5 μL of sample RNA, Positive Control Flu (PC FLU) or Negative Control (DW) into the master mix., and the volume of the solution should be 25 μL in total. Mix the solution well by pipetting or tapping the tube and then spin down. Be careful not to cause air-bubbles when mixing.
- Amplification and detection
 - Incubate at 62.5°C for 35 minutes.
 - After the amplification reaction, use a heat block to inactivate the polymerase and terminate the reaction (5 minutes at 80°C or 2 minutes at 95°C).

☆ If other final judgment procedures such as fluorescence visual detection or electrophoresis is to be taken, be sure that the enzyme is inactivated. For information on fluorescence visual detection, refer to the package insert for Loopamp Fluorescent Detection Reagent.

☆ For examples of detection cases using this reagent, refer to the products introduction page in Eiken GENOME SITE (URL; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>)



The amplification curve of Positive Control Flu (PC FLU)*2 (monitored by Loopamp Realtime Turbidimeter)

*2 : There is no correlation between the initial template number and the turbidity increment time.

【Caution for Handling】

- This reagent is designed for research use only.
- This primer set is designed based on the genomic sequence of Avian Flu H7 strains that had been isolated in Eurasia after 1999. Therefore, this reagent may not be able to detect some strains isolated in other areas or before 1998.
- If the operator does not have the experience or knowledge in the field of nucleic acid testing, there's a possibility of false judgment. Therefore, make sure that the reagent is used under the supervision of the experienced and knowledgeable technicians.
- Eiken Chemical Co., Ltd. does not bear any responsibility for false judgment or any consequential damage derived from the false judgment caused by non-capability problems such as operation error.
- Use the reagent before the expiration date, which is labeled on the outer box (Exp.Date).
- The reagent tube is made of polypropylene and the main material for kit case is paper. The institution disposing the reagent tube and case should bear the responsibility and abide by the clinical waste disposal regulations, water pollution prevention law, and any other regulation related.

【Unit, Storage, Expiration, Code No.】

Product Name	Unit	Storage	Expiration	Code No.
Loopamp® Primer Set for Avian Flu H7	48 tests	-20°C	1 year	PM0004

【References】

- Notomi T. *et al.*: Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- Nagamine K. *et al.*: Clin. Chem. **47**, No.9, 1742-1743 (2001)
- Mori Y. *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150-154 (2001)
- Tomita N. *et al.*: Abstract for the 73rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (2000)
- Mori Y. *et al.*: Abstract for the 23rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2000)
- Tomita N. *et al.*: Abstract for the 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2003)
- Rules on Safety Management of Pathogens of the NIH : National Institute of Infectious Diseases

Manufacturer


EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

143 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi, Japan