

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 *A. acidoterrestris* (Primer Set for *Alicyclobacillus acidoterrestris*)

## 【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<sup>1), 2)</sup>、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<sup>3), 4), 5), 6)</sup>、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、*Alicyclobacillus acidoterrestris* の 16S rDNA 領域内に設計した検出用のプライマーセット<sup>7)</sup>です。

## 【内容】

- |   |                 |
|---|-----------------|
|   | 48テスト分          |
| (1) Primer Mix. AAT (PM AAT) <sup>*1</sup>      | 0.12 mL × 1tube |
| (2) Positive Control AAT (PC AAT) <sup>*1</sup> | 0.1 mL × 1tube  |
- <sup>\*1</sup>: ( ) 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 DNA 増幅試薬キットの説明書をご参照ください。

### 2. 検体の調製

検体からの DNA の抽出には PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems 社) 又はそれに準ずる方法をお使いください。

また、検体の採取・取扱いに際しては、*Alicyclobacillus acidoterrestris* 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

- 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。
- マスターミックスの調製 (氷上で行ってください)  
別用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. AAT (PM AAT) 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. AAT (PM AAT)	2.5 μL	25 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	7.0 μL	70 μL
合計	23.0 μL	230 μL

### 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。)

- Loopamp 反応チューブにマスターミックス 23 μL を分注します。
- サンプルの DNA、並びに陽性コントロールとして Positive Control AAT (PC AAT) を、陰性コントロールとして Distilled Water (DW) を 2 μL 添加し、全量 25 μL とします。このとき、ピPETTING またはキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドアウンします。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

- 65℃, 60分間インキュベートします。
  - 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。

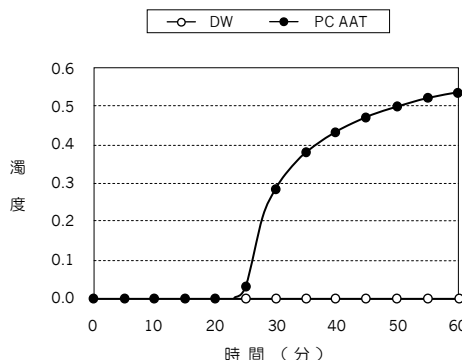


図. Positive Control AAT (PC AAT) の増幅曲線パターン<sup>\*2</sup>  
(使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置)

<sup>\*2</sup>: 本試薬の濁度立ち上がり時間と初期鏡量との間に相関はありません。

## 【使用上又は取扱い上の注意】

- 本試薬は、学術研究目的のみにご使用ください。
- 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。
- 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。
- 外箱に表示の使用期限 (Exp. Date) 内に使用してください。
- Alicyclobacillus acidoterrestris* の類似菌である *Alicyclobacillus acidophilus* 並びに *Alicyclobacillus hesperidum* については、菌濃度が  $1.0 \times 10^7$  cells/mL 以上の場合、交差反応性を示すことがあるので十分注意してください。
- 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 <i>A. acidoterrestris</i>	48テスト分	-20℃	1年間	PM0005

## 【参考文献】

- 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)
- 富田 憲弘, 他: 第73回 日本生化学会大会発表抄録集 (2000)
- 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)
- 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)
- 鳥袋 千恵子, 他: 日本農芸化学会 2004 年度大会発表抄録集 (2004)

## \*\*【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 *Alicyclobacillus acidoterrestris*

### 【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<sup>1),2)</sup>, 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<sup>3), 4), 5), 6)</sup>.

This reagent consists of the primer set for the detection of the 16S rDNA *Alicyclobacillus acidoterrestris*<sup>7)</sup>, which is specifically designed for Loopamp DNA Amplification Kit.

### 【Contents of the kit】

48 tests

- |                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| (1) Primer Mix. AAT (PM AAT) *1      | 0.12 mL × 1 tube |
| (2) Positive Control AAT (PC AAT) *1 | 0.1 mL × 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 DNA Amplification Kit.

#### 2. Preparation of the specimen

Carry out the extraction of DNA from the specimen using a commercially available PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems) or a method equivalent to it.

When handling the sample, adopt appropriate measures to avoid the contamination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* to the environment and samples.

#### 3. Reagents preparation

- Take out the reagents stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and 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. AAT (PM AAT) of this kit, and 2 × Reaction Mix. (RM), *Bst* DNA Polymerase and Distilled Water (DW) of Loopamp DNA Amplification Kit, into sterilized tube for master mix.

<Reagents>	<Amount : 1 test>	<Amount : 10 tests>
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$
Primer Mix. AAT (PM AAT)	2.5 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
Distilled Water (DW)	7.0 $\mu\text{L}$	70 $\mu\text{L}$
Total	23.0 $\mu\text{L}$	230 $\mu\text{L}$

#### 4. Operation procedures (Follow the instruction of Loopamp DNA Amplification Kit) .

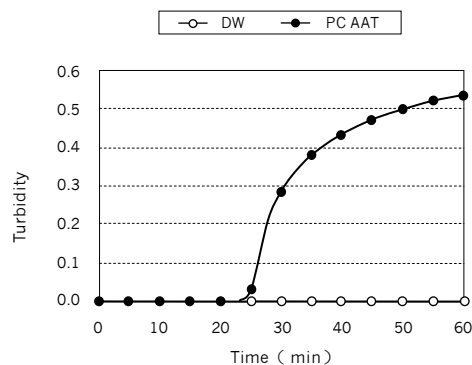
- Mixing master mix. solution and the sample solution (Operate on ice).
  - Dispense 23  $\mu\text{L}$  of the master mix. into each Loopamp Reaction Tube.
  - Add 2  $\mu\text{L}$  of sample DNA, Positive Control AAT (PC AAT) or Negative Control (DW) into the master mix., and the volume of the solution should be 25  $\mu\text{L}$  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.

#### 2) Amplification and detection

- Incubate at  $65^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes.
- After the amplification reaction, use a heat block to inactivate the polymerase and terminate the reaction (5 minutes at  $80^{\circ}\text{C}$  or 2 minutes at  $95^{\circ}\text{C}$ ).

☆ 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 AAT (PC AAT) \*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.
- If the operator does not have the experience or knowledge in the field of the 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).
- If a sample contains more than  $1.0 \times 10^7$  cells/mL of *Alicyclobacillus acidophilus* or *Alicyclobacillus hesperidum*, which are homologous to *Alicyclobacillus acidoterrestris*, it may show cross reaction.
- 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 <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	48 tests	$-20^{\circ}\text{C}$	1 year	PM0005

### 【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)
- Shimabukuro C. *et al.* : Abstract for the Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2004 (2004)