

## LAMP法を用いたコイヘルペスウイルス(KHV)検査の準備と手順

### 【準備するもの】

#### 1. 採取した魚病試料

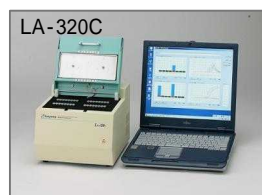
#### 2. LAMP 法使用機器および試薬

- ・ ホモジナイザーペッスル
- ・ 検体処理用及び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  $\mu$ L, 10 ~ 100  $\mu$ L, 100 ~ 1,000  $\mu$ L)
- ・ 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
- ・ 簡易抽出処理用TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)
- ・ 市販のDNA 分離試薬(DNeasy Tissue Kit; Qiagen 社製など)
- ・ Loopamp プライマーセットKHV
  - ・ Extraction Solution F (EX F)
  - ・ 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris)
  - ・ Primer Mix. KHV (PM KHV)
  - ・ Positive Control KHV (PC KHV)
- ・ Loopamp DNA 増幅試薬キット中の
  - ・ 2  $\times$  Reaction Mix. (RM)
  - ・ *Bst* DNA Polymerase (*Bst* DNA Polymerase)
  - ・ Distilled Water (DW)



#### <リアルタイム濁度検出を行う場合>

- ・ Loopamp リアルタイム濁度測定装置(LA-320C, RT-160C)



#### <蛍光目視検出を行う場合>

- ・ 紫外線照射装置(波長240 ~ 260nm, 350 ~ 370nm)
- ・ 広幅の眼鏡又は防護面
- ・ Loopamp 蛍光・目視検出試薬
- ・ Loopamp リアルタイム濁度測定装置(LA-320C, RT-160C)又はインキュベーター(温度精度が $\pm 0.5$  以内:ホットボンネット付)



インキュベーターを使用の場合は、別途、反応停止用ヒートブロックが必要です。

## 【手順】

### 1. 検体の調製(検体中のDNA抽出)

#### < 市販のDNA 分離試薬(DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など)を用いる場合 >

- ・ 使用するキットのマニュアルに従い、抽出する。
- ・ DNA 抽出サンプルは、95 ℃ で5 分間加熱処理し、氷上で保存する。

#### < LAMP 法簡易抽出試薬を用いる場合 >

- ・ 検体前処理用滅菌チューブに採取した魚病試料5～10mg を入れ、TE buffer 100 μ L を加えて、ホモジナイザーペッスルを用いて組織を均一化する。



- ・ EX F 100 μ L を加え、キャップを閉めてボルテックスミキサーで混和する(1 秒間×3 回)。



- ・ 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 分間加熱処理する。



- ・ 1M Tris-HCl:pH 7.0 10 μ L を加えて、ボルテックスミキサーで混和する。
- ・ 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する。

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。

## 2. マスターミックスの調製

- ・ -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する。
- ・ 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに、試薬を下表の割合で分注する。
  - ・ Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2 × Reaction Mix. (RM)、Bst DNA Polymerase、Distilled Water (DW)
  - ・ Loopamp プライマーセットKHV の Primer Mix. KHV (PM KHV)

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

- ・ ピペティング又はキャップを閉めた上で軽く数回叩くこと (以下、タッピング。)により良く混合した後、スピンドウンする。



調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

### < 蛍光目視検出の場合 >

- ・ 上記マスターミックスのDistilled Water (DW) 4.0 μL のうち、1.0 μL をLoopamp蛍光・目視検出試薬とし、Distilled Water (DW) を3.0 μL 加えて合計20.0 μL とする。

## 3. サンプルの混合

- ・ 氷上に置いたLoopamp 反応チューブにマスターミックス20 μL を分注する。
- ・ サンプルのDNA、並びに陰性コントロールとしてDistilled Water (DW) を、陽性コントロールとしてPositive Control KHV (PC KHV) を5 μL 添加し、全量25 μLとする。
- ・ ピペティング又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、8連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンする。

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。

#### 4. 増幅反応及び検出

- ・ Loopamp リアルタイム濁度測定装置、又はインキュベーター(温度精度が $\pm 0.5$  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する。
- ・ 分注済みの反応チューブをセットし、65 で60 分間インキュベートする。
- ・ 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る。

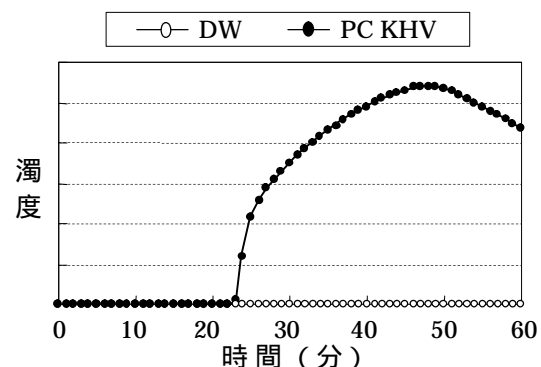
リアルタイム濁度測定装置の場合、酵素失活は自動処理されます。インキュベーターを用いる場合は、別途必ず酵素失活操作を行ってください。

##### < Loopamp リアルタイム濁度装置による検出 >

- ・ 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する。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る(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る。
- ・ 次に、各検体の判定を行う。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」とする。

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 (使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置)



##### < 蛍光目視による検出 >

- ・ 判定は、紫外線照射装置(波長240~260nm, 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ければ陰性と判定する。
- ・ 観察は、目を眼鏡等で保護した状態で行う。
- ・ 記録する場合は、電気泳動撮影用カメラ等を用いる。

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るが、蛍光の強さと検体のコピー数の間に相関はありません。

紫外線照射装置を用いた判定が明確でない場合は、市販のブラックライトを反応チューブ底面にあてて、チューブ側面より観察する(下図A)、蛍光灯下で肉眼観察する(下図C)、電気泳動撮影用カメラで撮影し観察する(下図D)。などの方法を適宜用いてください。



図. 観察例

A	B
C	D

- A ; ブラックライト検出
- B ; 簡易蛍光装置
- C ; 蛍光灯下目視
- D ; 電気泳動用カメラ撮影