

For research use only



DNA Amplification Kit

This kit is for research use only. Do not use for diagnosis or its assistance for clinical purpose. Read this instruction carefully before use.

【Characteristics】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a gene amplification method capturing the following characteristics: ① 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, and ④ it produces tremendous amount of amplified products which makes simple detection possible^{3), 4)}.

This kit is for amplifying and detecting target gene sequence by the LAMP method in combination with personally designed primers for LAMP, or primer sets sold separately.

【Contents of the kit】

		48 tests	96 tests	192 tests
1.	2 × Reaction Mix. (RM) ^{※1}	0.6 mL ×1	×2	×4
2.	<i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{※1}	60 μL ×1	×2	×4
3.	Distilled Water (DW) ^{※1}	1.0 mL ×1	×2	×2
4.	Primer Mix. DNA ^{※2} (PM DNA) ^{※1}	25 μL ×1	—	—
5.	Positive Control DNA ^{※2} (PC DNA) ^{※1}	0.1 mL ×1	—	—

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

※2: Primer Mix. DNA and Positive Control DNA are not included in the 96 tests and 192 tests package.

【Principle】

LAMP method is an isothermal nucleic acid amplification method using 4 kinds of primers and DNA polymerase with strand displacement activity. Among 4 kinds of primers, two of them are inner primers, whose 3' end and 5' end are respectively designed to be complementary to two different regions of the target sequence. When the primer-linked strand is replicated, resulting 3' end structure to self-anneals to the complementary region in self-structure, it forms the loop structure at the end.

This stem-loop structure allow the 3' end to initiate self-elongation and another inner primer to anneal to its loop region to synthesize new DNA strand with strand-displacement manner. Through the repetition of these processes, the amplification proceeds, and this enables amplification to continue under isothermal condition with only one kind of enzyme.

For further details of the LAMP method, refer to Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>) .

【How to use】

1. Materials required but not provide

- 1) Sterilized tubes for master mix. preparation (0.5 mL or 1.5 mL)
- 2) Micropipettes
- 3) Pipette tips with filter (DNase, RNase free)
- 4) Loopamp Reaction Tube (sold separately)
- 5) Aluminum rack for cooling tubes
- 6) Ice (crushed ice) and ice box
- 7) Centrifuge for microtube
- 8) Centrifuge for 8-strip tubes
- 9) Vortex mixer

A. For Real-time turbidity detection
Loopamp Realtime Turbidimeter^{※3}

- B. For Visual fluorescence detection
- 1) Loopamp Fluorescent Detection Reagent (sold separately)
 - 2) Loopamp Realtime Turbidimeter^{※3}, or incubator with hot bonnet (temperature accuracy within ±0.5°C)
 - 3) Heat block (for enzyme inactivation)^{※3}
 - 4) UV lamp (wavelength at 240~260nm or 350~370nm)^{※3}
 - 5) Protective goggle or glass board

※3: For the information about applicable instrument, reaction termination function and condition for UV irradiation, refer to Eiken GENOME SITE (URL;<http://loopamp.eiken.co.jp/e/>) .

2. Primer design

Appropriate primer design is essential for amplification by LAMP. For the primer design, exclusive primer designing software, PrimerExplorer is available from Eiken GENOME SITE (URL;<http://loopamp.eiken.co.jp/e/>).

When use the highly purified primers, a rapid gene amplification can be performed and stable reproducibility of the amplification can be obtained. The first screening for appropriate LAMP primers might not necessarily require highly purified primers. However, after the primers are determined, it is recommended to use purified FIP and BIP through HPLC or better purification.

3. Reagents preparation

- 1) Take out the reagents stored at -20°C, and thaw them at room temperature. Once the reagents are thawed, keep them on ice. After thawed, tap the reagent tubes gently -- mixing (tapping) -- or invert the tube, or by vortex mixer at about 3 times for 1 second. After mixing well, centrifuge the tubes for a few seconds.
- 2) Preparation of master mix. (**Operate on ice**) .

The following amount of the component is required for one reaction. When used in combination with Loopamp Primer Set, follow the preparation instructions of each primer set.

○ Sample reaction

<Reagents>	<Amount>
Distilled Water (DW)	X μL (ad q.s.)
2×Reaction Mix (RM)	12.5 μL
Primer : FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
LF ^{※4}	20 pmol
LB ^{※4}	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL
Total	23.0 μL/test

※4: Loop primers are not necessarily required. However, the use of loop primers shortens the amplification time by about one-third⁵⁾.

○ Control reaction

<Reagents>	<Amount>
Distilled Water (DW)	7.0 μL
2×Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer Mix. DNA (PM DNA)	2.5 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL
Total	23.0 μL/test

- 3) Gently tap the tubes for a few times (tapping), or mix the solution by repeatedly reversing the tube, or mix by vortex mixer 3 times for 1 second. After mixing well, centrifuge the tubes for a few seconds (**Keep on ice**) .

4. Operation procedure

<Mixing of Reagent and Samples> (**Operate on ice**)

Dispense 23.0 μL of master mix. into each Loopamp Reaction Tube.

Add 2.0 μL of sample solution and control into the tubes.

(The volume of the solution should be 25.0 μL in total.)

Negative control : Distilled Water (DW)

Positive control : Positive control DNA (PC DNA)

Mix the solution well by pipetting, or tapping and spin down

(Be careful not to cause air-bubbles when mixing.)

<Amplification>

Set the reaction tubes to the reaction block of Loopamp Realtime Turbidimeter or incubator with hot bonnet, and start the reaction 60~65°C, 30~60 minutes.^{※5}

Control reaction : 65°C, 60 minutes

Enzyme inactivation (80°C, 5 minutes or 95°C, 2minutes)

(Done by Loopamp Realtime Turbidimeter automatically.)

Turbidity measurement·Judgment

※5: The reaction condition is dependent upon the characteristics of the primer for use, therefore examine the optimum condition beforehand.

5. Detection

- A. For Real-time turbidity detection
Real-time turbidity detection can be carried out with Loopamp Realtime Turbidimeter. For the detailed operation of the equipment, refer to the instruction manual of the equipment.
- B. For Visual fluorescence detection
Visual fluorescence detection can be achieved by using Loopamp Fluorescent Detection Reagent⁴⁾. For more information, refer to the package insert for Loopamp Fluorescent Detection Reagent.

6. Amplification plots

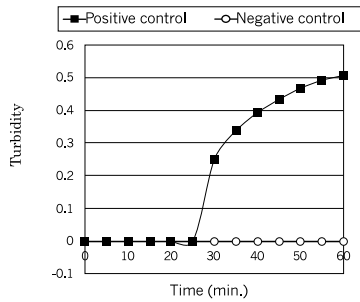


Fig1. The amplification plots for control

【Caution for amplification, detection and judgment】

- LAMP reaction is very sensitive and even the slightest amount of amplified product tainted into the reaction might cause false result. Therefore, avoid this type of contamination and carry out the sample and reagent preparation in different clean benches or separate the area for each operation. In order to prevent contamination, wear gloves and isolation gown, etc. if needed.
- When this kit used, avoid the contamination of a microbe or nuclease (DNase, RNase).
- Notice that too much mixing by vortex mixer might inactivate *Bst* DNA polymerase, and assure that vortexing is conducted 3 times for 1 second. The prepared master mix. should be used as soon as possible.
- Since bubbles in the solution will interfere the turbidity measurement and cause false judgment, try not to cause any bubble when mixing the master mix. and the sample solution. If bubbles are present, spin down to get rid of the bubbles.
- The cap of the used reaction tubes should not be opened. Contamination of amplified products on other samples may not only cause false judgment of the test result but also pollute testing area. In this case, a correct test result may not be obtained unless pollution is completely removed.
- Do not carry out electrophoresis of the amplified product.

【Caution for handling (hazard prevention)】

- The kit is designed for research use only.
- When handling the sample, always abide by the biohazard counter measures⁶⁾.
- When ultraviolet lamp is used for the fluorescence visual judgment, do not stare directly at the UV light. Look at it through glass board or protective goggles.

【Caution for handling】

- This kit should be stored at -20°C . To prevent the reagents from deterioration, only take out the necessary amount of reagents from the freezer before use. (No decline was observed in the kit performance even after repeated freezing and thawing for 20 times in the quality control testing. But, in order to maintain the reagents performance, keep off unnecessary freezing and thawing.)
- Only use the specified Loopamp Reaction Tube for turbidity or fluorescence detection. Other reaction tubes might have different optical transparency and can cause misjudgment.
- Take full care when handling reaction tubes, as they are vulnerable to scratches or damages.
- Check carefully to see if the reaction tubes has any crack or scratch before use. Crack or scratch on the tube might not only cause false judgment but also contaminate the equipment. If the tubes are broken inside the reaction block of Loopamp Realtime Turbidimeter, the reaction solution can spill inside the equipment and cause unrecoverable contamination malfunctioning.
- Do not expose Loopamp Reaction Tube, master mix. preparation tubes to UV light. A change in color or degeneration caused by ultraviolet lamp sometimes results in misjudgment.
- 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 kit is used under the supervision of the experienced and knowledgeable technicians.
- EIKEN Chemical Co., Ltd. dose 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 kit before the expiration date, which is labeled on the outer box (Exp. Date) .
- Do not mix different lots.
- Do not use the container of this kit, and accessories to reuse or other purposes.

【Caution for disposal】

- Keep the cap of the used tube completely closed and dispose it, according to the relevant regulations and instructions, by incineration or after double bagging it with sealable vinyl bag. To prevent the amplified products from dispersing, **do not conduct autoclave sterilization treatment for disposal.**
- 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.

【Storage, Expiration, Unit, Code No.】

Product Name	Storage	Expiration	Unit	Code No.
Loopamp DNA Amplification Kit	-20°C	1 year	48tests	LMP204
			96tests	LMP205
			192tests	LMP206

【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.*, : Nat Protoc. **3**, No. 5, 877-882
- Nagamine K. *et al.*, : Molecular and Cellular Probes **16**, No.3, 223-229 (2002)
- The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology): Japanese Journal of Bacteriology **54**, No.3, 667-715 (1999)

Licensed under U.S. Patent #5,814,506.

Manufacturer



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

143 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan

Date of Revision: October 1, 2013 (Ver.5)



DNA増幅試薬キット

本製品は研究用試薬です。診断又はその補助を目的として使用しないでください。
この説明書をよく読んでから使用してください。

【はじめに】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 等温で遺伝子増幅反応が進行する^{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)}、等の特徴を有する遺伝子増幅法です。

本製品は、自ら設計した LAMP 用プライマー、または別売のプライマーセット製品と組み合わせ、LAMP 法により標的遺伝子配列を増幅・検出するためのキットです。

【内容】

	48テスト分	96テスト分	192テスト分
1. 2 × Reaction Mix. (RM) ^{*1}	0.6 mL ×1	×2	×4
2. <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{*1}	60 μL ×1	×2	×4
3. Distilled Water (DW) ^{*1}	1.0 mL ×1	×2	×2
4. Primer Mix. DNA ^{*2} (PM DNA) ^{*1}	25 μL ×1	—	—
5. Positive Control DNA ^{*2} (PC DNA) ^{*1}	0.1 mL ×1	—	—

*1: () 内は、試薬チューブに記載されている表示です。

*2: 96 テスト分と 192 テスト分には Primer Mix. DNA 及び Positive Control DNA は含まれておりません。

【測定原理】

LAMP 法は、4 種類の primer と鎖置換活性を持つ DNA Polymerase を用いて反応を行う等温遺伝子増幅法です。4 種類の primer のうち、2 種類の inner primer は、その 3' 側と 5' 側で標的遺伝子配列中の異なる 2 領域を認識する primer で、5' 側の配列はその 3' 側からの伸長反応で合成した相補鎖領域内にアニールするよう設定します。

増幅反応は、この inner primer により生成するステムループ構造からの自己伸長反応と、ループ部分に新たにアニールした inner primer からの鎖置換合成反応を繰り返すことで進行します。これにより、LAMP 法は用いる酵素が 1 種類であるにも関わらず、等温増幅を実現した方法です。

尚、反応原理の詳細については、Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

【使用方法】

1. 必要な器具・器材・試料等

(本製品には含まれていませんので別途用意してください。)

- 1) 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)
- 2) マイクロピペット
- 3) フィルター付ピペットチップ (DNase, RNase フリー)
- 4) Loopamp 反応チューブ (栄研化学株式会社別売品)
- 5) 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 6) 氷 (クラッシュアイス) 及びアイスボックス
- 7) 微量簡易遠心機
- 8) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- 9) ホルテックスミキサー

A. リアルタイム濁度検出

リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用)^{*3}

B. 蛍光目視検出

- 1) Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社別売品)
- 2) リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用)^{*3}、又はインキュベーター (温度精度が ±0.5°C 以内: ホットボンネット付)
- 3) ヒートブロック (酵素失活用)^{*3}
- 4) 紫外線照射装置 (波長 240~260nm, 350~370nm)^{*3}
- 5) 広幅の眼鏡又は防護面

*3: 応答装置、反応停止機能、紫外線照射の条件については、Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

2. Primer の設計

LAMP 法による増幅には適切な primer 設計が重要なカギとなります。設計にあたっては、LAMP 法専用の primer 設計支援ソフト「LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer Explorer」を、Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/>) よりご利用いただくことができます。

また、primer 合成のグレードについては、primer の精製度が高いほど反応速度は速くなり、反応自体も安定します。したがって、primer の一次スクリーニングを目的として合成する場合は簡易カラム精製グレード以上、primer を決定する際及び決定後は、少なくとも FIP, BIP については HPLC 精製グレードによる合成を推奨します。

3. 試薬の調製方法

1) -20°C 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。各試薬は、チューブを軽く叩いて混合する (タッピング) か、又は転倒混和、あるいはホルテックスミキサー 1 秒間 × 3 回攪拌し、スピンドウンしてからご使用ください。

2) マスターミックスの調製 (氷上操作)

別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに各試薬を必要なテスト数分、下表の割合 (1 テストあたり) で分注します。

尚、プライマーセットと組み合わせて使用する場合は、各プライマーセットの使用説明書に従ってください。

○ サンプル反応用

<試薬>	<用量>
Distilled Water (DW)	X μL (適量)
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer : FIP	40 pmol
BIP	40 pmol
LF ^{*4}	20 pmol
LB ^{*4}	20 pmol
F3	5 pmol
B3	5 pmol
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL
合計	23.0 μL / テスト

*4: 必ずしも必要ありませんが、Loop primer を入れることで増幅時間が約 1/3 に短縮されます⁵⁾。

○ 本製品のコントロール反応用

<試薬>	<用量>
Distilled Water (DW)	7.0 μL
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer Mix. DNA (PM DNA)	2.5 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL
合計	23.0 μL / テスト

3) チューブを軽く叩いて混合する (タッピング) か、又は転倒混和、あるいはホルテックスミキサー 1 秒間 × 3 回攪拌し、スピンドウン後マスターミックスとします。(氷上保存)

4. 操作方法

<マスターミックスの分注> (氷上操作)

反応チューブ 1 本あたりマスターミックス 23.0 μL を分注



サンプル溶液又はコントロールをそれぞれ 2.0 μL 添加

(LAMP 反応液として合計 25.0 μL)



陰性コントロールには Distilled Water (DW) を、
陽性コントロールには Positive Control DNA (PC DNA) を使用

ピペティング又はタッピングにより混合後スピンドウン

(気泡が立たないように注意します。)



<LAMP 反応>

リアルタイム濁度測定装置又はインキュベーターの
反応ブロックにセットして反応をスタート

60~65°C, 30~60 分間^{*5}

本製品のコントロール反応は 65°C, 60 分間



酵素失活 (80°C, 5 分間又は 95°C, 2 分間)

(リアルタイム濁度測定装置では自動処理されます。)



濁度測定・判定

*5: 設計した primer によって至適条件が異なるので、条件検討が必要になります。

5. 検出

A. リアルタイム濁度検出

リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用) を用いることで、リアルタイム検出ができます。操作の詳細は装置の添付文書及び取扱説明書をご参照ください。

B. 蛍光目視検出

別売の Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いることで目視判定が可能です⁴⁾。詳細は蛍光・目視検出試薬の使用説明書をご参照ください。

6. 増幅曲線パターン

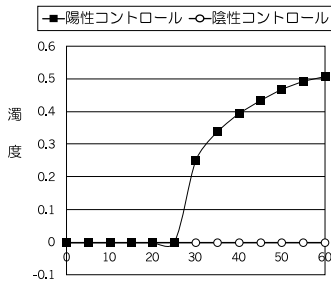


図 1. コントロールの増幅曲線パターン

<測定にあたっての注意>

1. LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、標的遺伝子や増幅産物が極微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となるおそれがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で実施するか、あるいは検査区域を分割して別のエリアで行ってください。必要に応じて、クリーンベンチの使用又は手袋やアイソレーションガウンの着用等でコンタミネーションを防ぐ措置をとってください。
2. 本製品を取り扱う際には、微生物や核酸分解酵素 (DNase, RNase) のコンタミネーションを避けてください。
3. *Bst* DNA Polymerase は失活するおそれがありますので、マスターミックス調製の際には激しく撪拌しないでください。ポルテックスミキサーで撪拌を行う場合は、1 秒間×3 回を厳守してください。尚、調製したマスターミックスはすぐに使用してください。
4. マスターミックスとサンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度測定の支障となり誤判定の原因となりますので、気泡が生じないように注意してください。気泡が残っている場合には、スピンドウンして気泡を取り除いてください。
5. 反応後のチューブの蓋は決して開けないでください。特に反応後のチューブを装置から取り出すときにチューブの蓋が開かないよう、慎重に取り出してください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、測定環境そのものを汚染し、汚染を完全に除去しない限り、以後正しい結果が得られなくなる可能性があります。
6. 電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。

【取扱い上 (危険防止) の注意】

1. 本製品は、体外診断用医薬品ではありません。
2. 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策を実施してください⁶⁾。
3. 蛍光目視判定時に紫外線照射装置を使用する場合、ランプより放射される紫外線 (殺菌線) は有害なので、紫外線を直接目に入れることは避けてください。また点灯中のランプを見る必要があるときは、必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけて判定してください。

【使用上の注意】

1. 本製品は必ず -20℃ で保存してください。試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけを箱から取り出してご使用ください。(凍結融解を 20 回繰り返した結果では、試薬の劣化はほとんど認められておりませんが、無用な凍結融解は品質維持のために避けてください。)
2. 反応チューブは必ず専用の Loopamp 反応チューブをご使用ください。指定以外の反応チューブを使用した場合、光透過性の違いにより誤判定を招く可能性があります。
3. 反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
4. 反応チューブは用いる前にキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認してください。反応チューブにキズ・ヒビ等があると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。リアルタイム濁度測定装置又はインキュベーターの反応ブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体へ漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。
5. 反応チューブ、マスターミックス調製用滅菌チューブには紫外線照射しないでください。紫外線照射による変色・変質等で誤った結果をもたらす場合があります。
6. 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、本製品の使用にあ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もとで検査を実施してください。
7. 本製品の性能に由来しない事由 (操作方法を誤った場合等) による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、弊社は一切の責任を負いません。
8. 本製品は使用期限内に使用してください。
9. キット内の試薬は十分な性能が得られるように組み合わせるので、製造番号の異なる試薬を組み合わせないでください。
10. 本製品の容器、付属品等を再利用又は他の目的に転用しないでください。

【廃棄上の注意】

1. 反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニールの袋を二重に施し適切に処理してください。増幅産物の飛散防止のため、**廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。**
2. 試薬チューブは P.P、キットケースは紙を主な材質としています。
3. 使用後の本品や容器及び器具類は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律や水質汚濁防止法等に従い、各施設の責任において処理してください。

【貯蔵方法・有効期間・包装単位・製品コード】

製品名	貯蔵方法	有効期間	包装単位	製品コード
Loopamp DNA 増幅試薬キット	-20℃	1年間	48テスト分	LMP204
			96テスト分	LMP205
			192テスト分	LMP206

【主要文献】

- 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) Tomita N. et al.,: Nat. Protoc. **3**, No.5, 877-882
- 5) Nagamine K. et al.,: Molecular and Cellular Probes **16**, No.3, 223-229 (2002)
- 6) 日本細菌学会バイオセーフティー委員会: 日本細菌学雑誌, **54**, No.3, 667-715 (1999)

【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