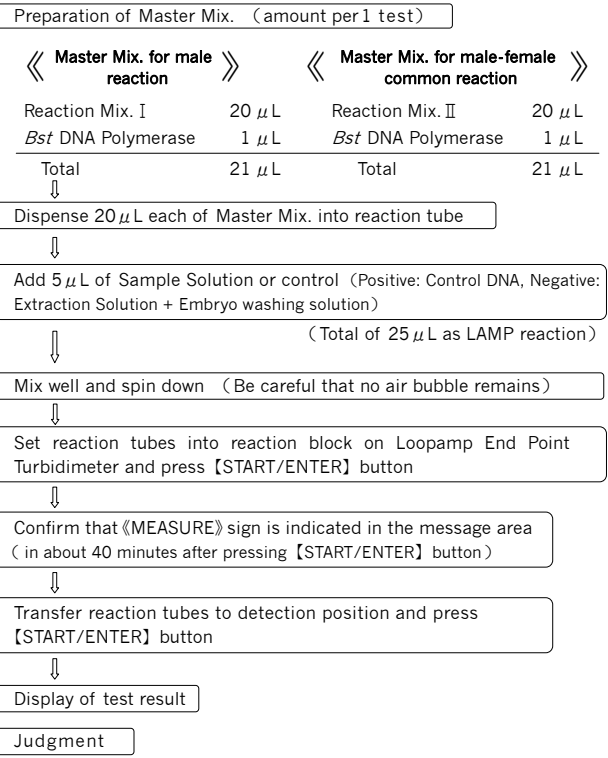


## < Procedure >



## 【Judgment】

### 1. Judgment of amplification by control reactions

Check that the result of positive control (Control DNA) is [+] and that of negative control (1：1 mixture of Extraction Solution and the embryo washing solution (or the biopsy buffer)) is [-]. If not, conduct the LAMP reaction again as amplification reaction might not proceed properly.

### 2. Judgment of sex

	Reaction Mix. I ( male specific primers )	Reaction Mix. II ( male-female common primers )	Judgment
Result	+	+	Male
	-	+	Female
	+	-	Re-test
	-	-	

## 【Caution for use】

### 1. Storage condition

This reagent kit should be stored at −20℃. To avoid inactivation of reagent components, put the reagent tubes onto ice when reagents are taken out from freezer. Gently spin down reagent if any liquid stays on the wall or cover of its container. Mix thoroughly all reagents prior to use except *Bst* DNA Polymerase. Store reaction tubes in the box provided in order to prevent them from cracking and scratching, which cause false judgment of test result. Store Extraction Solution with its cap tightly closed.

### 2. How to avoid contamination

As the LAMP reaction is extremely sensitive, any contamination of bovine genomic DNA other than the object or amplified product of other specimen causes wrong interpretation of the test result. To avoid such possible contamination, it is strongly recommended to prepare reagents and samples in a specially designated separate room or in a clean bench. Especially, contamination of amplified product of other specimen not only causes false judgment of test result but also pollutes testing environment, and in this case, correct test result may not be obtained unless pollution is completely removed. To avoid this type of contamination, throw away used reaction tube without opening the cap.

### 3. Result

It is recommended to use this test kit under the direction of specialist aboutgenetic testing, as person without such knowledge may misinterpret test result. In any event Eiken Chemical Co., Ltd. shall not be liable for any direct, indirect, special or consequential damages arising out of or in any way connected with the judgment of test results if judgment is done based on the test result that does not originate in the performance of the kit.

### 4. Caution 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.

## 【Unit, Storage, Expiration, Code No.】

Product Name	Unit	Storage	Expiration	Code No.
Loopamp® Bovine Embryo Sexing Kit	24tests	−20℃	1 year	LMP001

## 【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)
- Kageyama S. *et al.* : Japanese Journal of Embryo Transfer **25**, No.**3**, 136–140 (2003)
- Hirayama H. *et al.* : Theriogenology **62**, 887–896 (2004)

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

3LP0019-G この説明書をよく読んでから使用してください。

\*\* 2010年9月改訂 (第6版)  
\* 2008年1月改訂 (第5版)



# 牛胚性判別試薬キット

本キットは、LAMP 法を利用して、牛の受精卵の一部を用いて性判別するためのキットです。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。

<b>【キット内容】</b>	24 テスト分
(1) Extraction Solution (EX)*	1.5 mL×1 tube
<b>**</b> (2) Reaction Mix. I：dNTPs, buffer, male specific primers (RM I)*	0.5 mL×1 tube
<b>**</b> (3) Reaction Mix. II：dNTPs, buffer, male-female common primers (RM II)*	0.5 mL×1 tube
(4) <i>Bst</i> DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)*	60 μL×1 tube
(5) Control DNA (Cont DNA)*	0.1 mL×1 tube
	※：( ) 内は、試薬チューブに記載されている表示です。

## 【測定原理】

LAMP法により牛胚細胞中に存在する雄特異的核酸配列を認識するプライマー（male specific primers）と雌雄共通核酸配列を認識するプライマー（male-female common primers）を用いて核酸の増幅反応を行い、その増幅の有無から性判別を行います。増幅の有無は、専用の「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」を用いて、増幅反応副産物であるピロリン酸マグネシウムの白沈の濁度を測定することによって検出します。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。

## 【特徴】

LAMP法の原理を応用して開発された試薬キットで、LAMP反応・検出用が開発された「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」を用いることにより、検出に電気泳動等を必要とせず、核酸増幅反応から検出までを閉鎖系（同一反応チューブ内）で行うことができます。増幅の有無は機械的に測定され、装置上の「+」（プラス）、「-」（マイナス）表示（+：陽性，-：陰性の意味）により牛胚細胞の雌雄判別ができ、従来法に比べて簡易かつ短時間で性判別の結果が得られます<sup>7), 8)</sup>。増幅反応に雄特異的プライマー（male specific primers）と雌雄共通プライマー（male-female common primers）を用いることで、誤判定の可能性を技術的に可能な限り排除しています。また、各試薬チューブは取り間違えないようにチューブとキャップに試薬名を記載し、試薬ごとに最も適したチューブを使用しています。

## 【使用方法】

### 1. 必要な器具・装置（キットに含まれていませんので、別途用意してください。）

- マイクロニピュレーションに必要な器具
- Loopamp エンドポイント濁度測定装置（テラメックス社製）
- ピペット(0.5～10μL, 10～100μL, 100～1,000μL)
- フィルター付きチップ
- Loopamp 反応チューブ
- 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
- 検体前処理用滅菌チューブ
- マスターミックス調製用滅菌チューブ
- 微量簡易遠心機
- 8連反応チューブ用簡易遠心機

### 2. 操作法

#### 1) 前処理

- 検体数分の前処理用滅菌チューブを別途用意し、バイオプシーした牛胚細胞塊を含むバイオプシーサンプル液 6 μL をチューブに入れる。
- ここに Extraction Solution 6 μL を分注し懸濁する。
- 室温で5分間以上放置し、攪拌後スピンドアウンしてサンプル溶液とする。

#### 2) マスターミックスの調製（試薬の調製は、氷上で行ってください。）

- 雄反応用マスターミックス

別途用意した滅菌チューブに、1検体あたりの分量を Reaction Mix. I＝20 μL、*Bst* DNA Polymerase＝1 μLとして、検体数分を注入してよく混合する。
- 雌雄共通反応用マスターミックス

別途用意した滅菌チューブに、1検体あたりの分量を Reaction Mix. II＝20 μL、*Bst* DNA Polymerase＝1 μLとして、検体数分を注入してよく混合する。

### 3) 反応混液の調製とサンプル溶液の添加

1 検体につき 2 本の反応チューブ（雄反応用、雌雄共通反応用）を用いる。（Loopamp 反応チューブは 8 本が連結しており、一度に 4 検体処理できます。）
一方の反応チューブには雄反応用マスターミックス 20 μL を、もう一方の反応チューブには雌雄共通反応用マスターミックス 20 μL を分注する。
そこへ 1) のサンプル溶液 5 μL をそれぞれ加え全量 25 μL とし、混合後スピンドアウンする。

（なお、陽性コントロールには Control DNA 5 μL を、陰性コントロールには Extraction Solution と胚の洗浄液またはバイオプシーサンプル液を 1：1 で混合した溶液 5 μL をサンプル溶液の代わりに添加してください。）

### 4) LAMP 反応

3) で調製した反応チューブを、「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」の反応ブロックにセットし、【START/ENTER】ボタンを押して反応をスタートさせる。

### 5) 検出

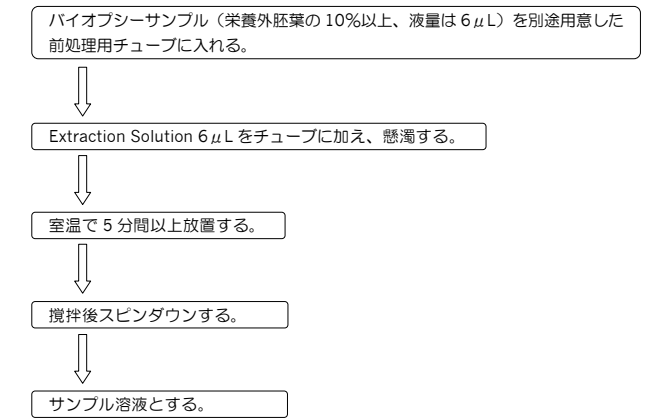
「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」の測定可能サイン《MEASURE》を確認の上、反応チューブを反応ブロックから検出部に移動させ、【START/ENTER】ボタンを押す。（通常、反応をスタートさせてから検出可能となるまでの時間は約 40 分です。）

## 【操作上の留意事項】

- バイオプシーは、栄養外胚葉の 10%以上を採取してください。なお、バイオプシーの方法、バイオプシー後の細胞塊（胚）の洗浄操作方法等は、Eiken GENOME SITE（URL：http://loopamp.eiken.co.jp/）に参考例を掲載しておりますので、ご参照ください。
- バイオプシーサンプルの液量は 6 μL を守ってください。（液量が多い場合は、DNA の抽出率が低下し、場合によっては誤判定の原因となることがあります。）
- 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。反応チューブは、用いる前にキズ等がないことを目視で確認してください。反応チューブにキズがあると正しく測定できず、場合によっては誤判定の原因となります。したがって、反応チューブの取扱いには十分注意してください。
- Extraction Solution, Control DNA には着色が施されているので、調製した全ての反応チューブにサンプルが添加されていることを目視で確認してください。
- Extraction Solution は、空気に触れることで徐々に劣化します。したがって、Extraction Solution の蓋の開閉は最小限に留め、空気に触れる時間をなるべく短くしてください。前処理操作においても、必ずバイオプシーサンプルを先にチューブへ入れ、あとから Extraction Solution を加えてください。また、保存時は小分けによる保存はせず、蓋がしっかりと締まっていることを確認してください。
- 試薬が余った場合、例えばキットのロットが同一であっても他キットへの使い回しは避けてください。
- 装置の取扱いは、必ず「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」の使用方法に従って行ってください。
- LAMP 反応前に、必ず「Loopamp エンドポイント濁度測定装置」の反応ブロックが設定温度（63℃）に達し、液晶パネルに《READY》と表示されていることを確認してください。LAMP 反応時間（35 分）が経過すると、自動的に反応ブロック温度は酵素失活反応温度（80℃）まで上昇、酵素失活反応時間（2分）保持された後に、LAMP 反応温度（63℃）まで冷却します。
- LAMP 反応終了後、液晶パネルに《MEASURE》と測定可能サインが点滅表示されます。すべてのサンプルは測定可能サイン（反応終了後 20 分間《MEASURE》点滅）が出ている間に測定してください。20分を過ぎるとピロリン酸マグネシウムが沈殿し測定が不正確になる可能性があります。

## ■ 牛胚性判別用のLAMP法操作手順プロトコール

## < サンプルの調製 >





# Bovine Embryo Sexing Kit

This reagent test kit is a LAMP-based sexing of bovine embryo using a portion of fertilized egg. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a novel gene amplification having characteristics that ①all reaction can be conducted under isothermal condition using one type of enzyme<sup>1),2)</sup>, ②it has extremely high specificity because of the use of 4 primers recognizing 6 distinct regions on the target, ③it has high amplification efficiency and enables an amplification within a shorter time, and ④it produces extremely large amount of amplified products and is suitable for simple detection<sup>3), 4), 5), 6)</sup>.

#### 【Contents of the kit】

	for 24 tests
(1) Extraction Solution (EX)*	1.5 mL×1 tube
(2) Reaction Mix. I <span> </span> : dNTPs, buffer, male specific primers (RM I)*	0.5 mL×1 tube
(3) Reaction Mix. II <span> </span> : dNTPs, buffer, male-female common primers (RM II)*	0.5 mL×1 tube
(4) <i>Bst</i> DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)*	60 μL×1 tube
(5) Control DNA (Cont DNA)*	0.1 mL×1 tube

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

#### 【Principle】

Amplification of nucleic acids is conducted by the LAMP method using male specific primers recognizing male specific nucleic acid sequence and common primers recognizing male-female common nucleic acid sequence in cells of bovine embryo, and determine sexing by judging whether or not amplification has occurred. Gene amplification is detected using Loopamp End Point Turbidimeter by measuring turbidity of white precipitates of magnesium pyrophosphate, which is a by-product of amplification reaction.

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

#### 【Characteristics】

This is a reagent test kit developed in utilizing principle of the LAMP method, and by using Loopamp End Point Turbidimeter specially developed for the LAMP reaction and detection, all reaction from amplification of nucleic acid to its detection can be conducted in a closed system (in the same reaction tube)without necessity of additional step of detection, such as electrophoresis. As presence or absence of amplification is mechanically judged and display of [+] (positive) or [-] (negative) tells sexing of bovine embryo cell, it gives result of sexing easier and in shorter time compared to conventional methods<sup>7), 8)</sup>. The use of male specific primers and male-female common primers for amplification reaction eliminates possibility of misjudgment as much technically as possible. Name of each reagent is indicated on the cap and body of each reagent container in order to avoid mishandling, and the most suitable tube is used for each reagent.

#### 【How to use】

##### 1. Materials required but not provided

- Tools required for micromanipulation
- Loopamp End Point Turbidimeter (Teramecs, Japan)
- Micropipettes (0.5–10 μL, 10–100 μL, 100–1,000 μL)
- Pipette tips with filter
- Aluminum rack for cooling tubes
- Ice (crushed ice) and ice box
- Loopamp Reaction Tube
- Sterilized tube for pretreatment of specimen
- Sterilized tube for preparation of master mix.
- Centrifuge for micro-tubes
- Centrifuge for 8-connected tubes

##### 2. Procedure

###### 1) Pretreatment of specimen

- Prepare necessary quantity of sterilized tubes for pretreatment of specimen and put 6 μL of the biopsied trophectoderm cells of bovine embryo suspended in the buffer into the tubes.
- Add 6 μL of Extraction Solution in each tube to suspend biopsy sample and mix well.
- Leave it stand at room temperature for at least 5 minutes, and spin down after mixing. This refers to Sample Solution.

###### 2) Preparation of master mix. (Operate on ice.)

- Master mix. for male reaction
Pipette necessary volume of Reaction Mix. I (20 μL per specimen)and *Bst* DNA Polymerase (1 μL per specimen) into a sterilized tube and mix well.

#### 【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®牛胚性別判別試薬キット	24テスト分	−20℃	1年間	LMP001

#### 【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)
- 陰山 聡一, 平山 博樹 : 日本胚移植学雑誌 第 **25** 巻, 3号, 136–140 (2003)
- Hirayama H. et al. : Theriogenology **62**, 887–896 (2004)

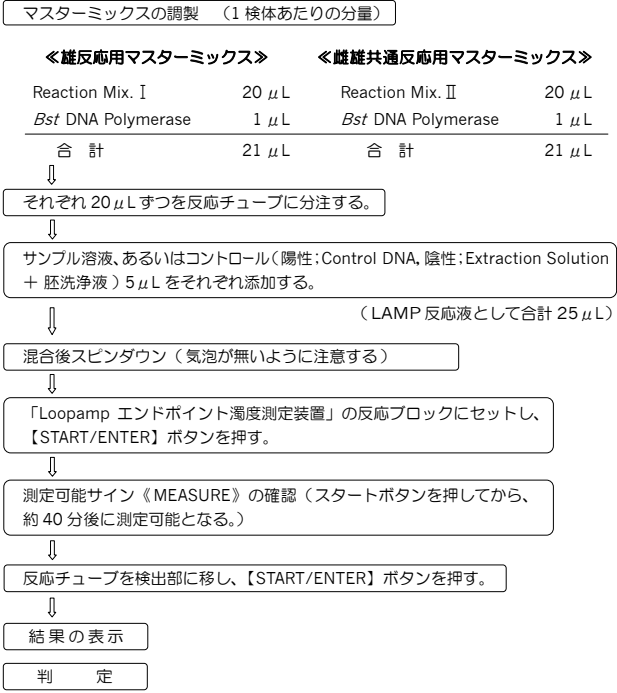
LAMP 反応原理の詳細、本試薬キットの操作方法等については、Eiken GENOME SITE (URL : http://loopamp.eiken.co.jp/) 内の製品紹介ページをご参照ください。

#### \* 【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

#### < 操作法 >



#### 【判 定】

##### 1. コントロールによる増幅の判定

陽性コントロール (Control DNA) の結果が「+」(プラス、かつ陰性コントロール (Extraction Solution と胚の洗浄液またはパイオプシーサンプル液を 1 : 1 で混合した溶液) の結果が「-」(マイナス) であることを確認します。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ので再度 LAMP 反応を実施してください。

##### 2. 雌雄判定

	Reaction Mix. I ( male specific primers )	Reaction Mix. II ( male-female common primers )	判 定
結 果	+	+	雄
	-	+	雌
	+	-	再 検 査
	-	-	

#### 【使用上の注意】

##### 1. 保存条件

本キットは、−20℃で保存してください。−20℃から取り出した試薬は失活を防ぐため氷上に置いてください。また、試薬がチューブの壁面や蓋に付いている場合には、使用前に軽くスピンドダウンしてください。なお、*Bst* DNA Polymerase 以外の試薬は使用する際にはよく攪拌してください。

反応チューブは、キズ等がつくと誤判定の原因となるため保存時は必ず箱に収めてください。また、Extraction Solution は、蓋をきつく締めて保存してください。

##### 2. コンタミネーションの防止について

LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、目的以外のウシゲノムDNA や他検体の増幅産物等がごく微量でも混入すると、誤った結果をもたらす原因となります。このようなコンタミネーションを回避するために、可能な限り試薬及びサンプルの調製は専用の部屋で行うか、クリーンベンチ等を使用して行ってください。

特に、他検体の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、試験環境そのものを汚染し、汚染を除去しない限り正しい結果が得られなくなることがあります。このようなコンタミネーションを回避するため、測定を終了した反応チューブは絶対に蓋を開けずに廃棄してください。

##### 3. 検査結果

遺伝子検査の知識、経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性があるので、十分注意してください。本キットの性能に由来しない検査結果に基づいて判定した場合、あるいは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. 廃棄上の注意

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。

\* 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

- Master mix. for male-female common reaction
Pipette necessary volume of Reaction Mix. II (20 μL per specimen)and *Bst* DNA Polymerase (1 μL per specimen) into a sterilized tube and mix well.

###### 3) Preparation of reaction mixture and addition of Sample Solution

Use 2 reaction tubes (one for male reaction and the other for male-female common reaction) per specimen. As a single Loopamp Reaction Tube consists of 8 tubes that are connected each other, it can handle four specimens at a time. Dispense 20 μL of Master mix. for male reaction into one reaction tube and 20 μL of Master mix. for male-female common reaction into another tube. Add 5 μL of Sample Solution (total 25 μL) in each tube and spin down after mixing. (Use 5 μL of Control DNA for positive control and 5 μL of 1 : 1 mixture of Extraction Solution and the embryo washing solution (or the biopsy buffer) for negative control instead of Sample Solution.)

###### 4) LAMP reaction

Start the LAMP reaction by setting reaction tubes into the reaction block of Loopamp End Point Turbidimeter and pressing【START/ENTER】button.

###### 5) Detection

Check that 《MEASURE》 sign is shown in the message area on the Loopamp End Point Turbidimeter. Then, transfer reaction tubes from reaction block to detection position and press 【START/ENTER】 button. (Normally, it takes for about 40 minutes from the start of reaction until detection can be done.)

#### 【Caution for operation】

- For biopsy, collect more than 10%(v/v)of trophectoderm. For details of biopsy method and the biopsy washing procedure, refer to the Eiken GENOME SITE (URL: http://loopamp.eiken.co.jp/e/)
- The amount of biopsy sample should be 6 μL. If the volume of the biopsy sample is more than 6 μL, the efficiency of DNA extraction would decrease, which might cause a false judgment.
- Use Loopamp Reaction Tube that is specific for Loopamp End Point Turbidimeter. If other kind of tubes were used as the reaction tube, there would be a possibility for a false judgment due to the optic permeability difference of the measuring light. Check visually if reaction tube has any crack or scratch prior to use. Correct measurement of turbidity cannot be done if a reaction tube has any crack or scratch, and it may cause a false judgment of test result. Take full care when handling reaction tubes.
- Since Extraction Solution and Control DNA are colored, confirm visually if specimen is present in the reaction tube after preparation.
- Extraction Solution gradually deteriorates when exposed to air. Open and close of cap of Extraction Solution should be limited as minimum as possible, and work as quickly as possible, so that the Solution is exposed to air for as short a period time as possible. For the pretreatment of specimen, put the biopsy sample into a tube first, and then add Extraction Solution to it. When storing Extraction Solution, keep its cap tightly closed, and do not aliquot the solution.
- Do not use remaining reagent with other kit even if both kits are the same production lot.
- Handling of the Loopamp End Point Turbidimeter should be conducted according to its operation manual.
- Before starting the LAMP reaction, be sure to check the temperature on the reaction block of Loopamp End Point Turbidimeter is raised to 63° C and that 《READY》sign is indicated on the message area. When the LAMP reaction is over (35 min), the temperature on the reaction block is automatically raised to and maintained at 80° C for 2 min to inactivate DNA polymerase. After the inactivation of the enzyme, the temperature on the heat block is cooled to 63° C.
- When all reactions are over, 《MEASURE》 signal goes on and off in the message area. Take the measurement of the turbidity of the samples while 《MEASURE》 sign is indicated on the message area (for 20 min after all reactions) . Measurement of the turbidity 20 minutes after all reactions may cause false readings, as magnesium pyrophosphate, by-product of amplification reaction, may sediment as precipitates at the bottom of the reaction tube.

#### ■ Protocol for LAMP-based bovine embryo sexing

##### < Preparation of specimen >

