



コントロールセットRNA/DNA

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は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)}、②6 領域を認識する 4 種類のプライマー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、Loopamp RNA/DNA 増幅試薬 D (栄研化学株式会社別売品) と組み合わせて使用するコントロール反応キットです。

【内容】

	12 回分
1. Primer mix H1P (PM H1P)	0.72 mL × 1
2. Positive control H1P (PC H1P)	0.16 mL × 1
3. Negative control (NC)	0.16 mL × 1

【使用方法】

1. 必要な器具・器材・試料等

Loopamp RNA/DNA 増幅試薬 D の説明書をご参照ください。

2. 試薬の調製方法 (詳細は Loopamp RNA/DNA 増幅試薬 D の手順に従ってください。)

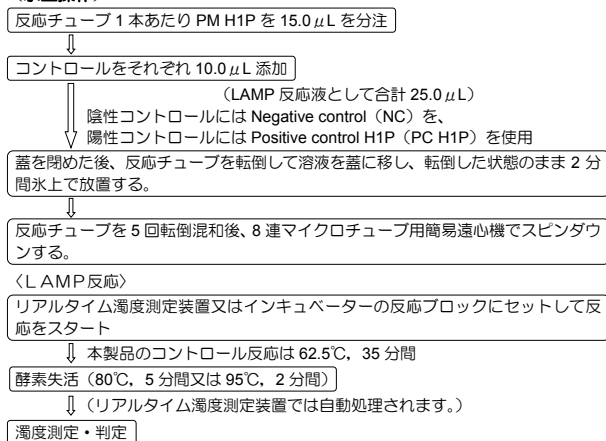
1) 必要本数 (サンプル数+コントロール数) の Dried RNA/DNA Amplification Reagent を取り出し、残りの試薬は直ちに元のアルミパックで密封する。

○ コントロール反応用 (本製品)

< 試薬 >	< 用量 >
Primer mix H1P (PM H1P)	15.0 μL / テスト

2) 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、あるいはボルテックスミキサー 1 秒間×3 回攪拌し、スピンドウン後プライマーミックスとします。
(水上保存)

3. 操作方法 (水上操作)



4. 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等をご参照ください。

B. 蛍光目視検出

判定は、紫外線照射装置を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して、反応チューブ側面より目を眼鏡等で保護した状態で観察して行う。Positive control H1P (PC H1P) が緑色の蛍光を発生し、Negative control (NC) が蛍光を発生しないことを確認したうえで、下記に従い判定する。記録が必要な場合は、判定時にデジタルカメラ等を用いて画像として保存する。

陽性: 緑色の蛍光を発生した場合
陰性: 蛍光を発生しなかった場合

5. 増幅曲線パターン

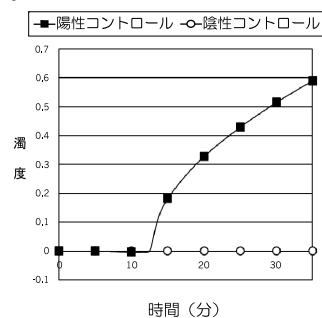


図 1. コントロールの増幅曲線パターン

< 測定にあたっての注意 >

- 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、検体採取及び核酸抽出操作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。
- 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。
- 乾燥試薬の溶解は確実に行ってください。溶解が不十分な場合、感度が低下する等十分な性能が得られないことがあります。特に転倒した状態では 2 分以上放置しないでください。
- サンプル溶液を混合後、反応液の液面に気泡があると誤判定の原因となるので、スピンドウンして、測定前に取り除いてください。
- 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。
- 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】

- 本製品は、体外診断用医薬品ではありません。
- 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。
- Primer mix H1P (PM H1P)、Positive control H1P (PC H1P) 及び Negative control (NC) には、保存剤として微量のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムには毒性があるので、目や口に入らないよう、また皮膚に付着させないように注意してください。
- 試薬が誤って目や口、皮膚に付着したときは、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けてください。

【使用上の注意】

- 本製品は凍結及び温度の急激な変化は避け、指定の貯蔵方法で保管してください。
- Positive control H1P (PC H1P) は、他の試薬と離して保管してください。
- 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。
- 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。
- 本製品は使用期限内に使用してください。
- 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。
- Loopamp RNA/DNA 増幅試薬 D 以外の試薬と組み合わせて使用しないでください。

【廃棄上の注意】

- 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プ処理は行わないでください。**
- 構成試薬チューブはポリプロピレン (PP)、キットケースは紙を主な材質としています。
- 未使用及び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™ コントロールセット RNA/DNA	2~8°C	1年間	12回分	LMP248

【主要文献】

- Notomi T. et al.; Nucleic Acids Research, **28** (12): e63, 2000.
- Nagamine K. et al.; Clin. Chem, **47** (9): 1742-1743, 2001.
- Mori Y. et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun, **289** (1): 150-154, 2001.
- Tomita N. et al.; Nat Protoc, **3** (5): 877-882, 2008.
- Nagamine K. et al.; Molecular and Cellular Probes, **16** (3): 223-229, 2002.

【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



For research use only



Control Set RNA/DNA

This product is a reagent for research purpose. Do not use this product for making or supporting a diagnosis. Read this explanatory leaflet carefully before use.

【Introduction】

The LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method is a gene amplification technique characterized by (1) isothermal gene amplification reaction^{1),2)}, (2) high specificity due to the use of 4 primers recognizing 6 regions, (3) high amplification efficiency resulting in amplification in a short time, (4) a large amount of amplification product facilitating simple detection^{3),4)}.

This product is a control reaction kit to be combined with Loopamp RNA/DNA Amplification Reagent D (separately provided by Eiken Chemical).

【Contents】

	For 12 tests
1. Primer mix H1P (PM H1P)	0.72 mL × 1
2. Positive control H1P (PC H1P)	0.16 mL × 1
3. Negative control (NC)	0.16 mL × 1

【Instructions for use】

1. Essential apparatus, equipment, and reagents, etc.

Refer to the instruction manual of Loopamp RNA/DNA Amplification Reagent D.

2. Reagent preparation method (follow the procedure of Loopamp RNA/DNA Amplification Reagent D for details).

1) Take a necessary number (total number of samples and controls) of the Dried RNA/DNA Amplification Reagent. Immediately return the remaining reagent to the original aluminum pack and seal it.

○ For control reaction (this product)

<Reagent>	<Dose>
Primer mix H1P (PM H1P)	15.0 μL/test

2) Mix the reagent (PM H1P) by inverting, tapping or using a vortex mixer for 1 second 3 times and spin down before using as the primer mix (Operation on ice).

3. Operating procedure (Operation on ice)

Dispense 15.0 μL of PM H1P to each reaction tube.

Add 10.0 μL of the control to each tube.

(25.0 μL in total as the LAMP reaction solution)

Use negative control (NC) for the negative control and positive control H1P (PC H1P) for positive control.

After closing the cap, invert the reaction tube to transfer the solution onto the cap, and allow it to stand on ice for 2 minutes.

Repeat the inversion 5 times and spin down the reaction mixture using an 8-microtube simple centrifuge.

<LAMP reaction>

Set it in the real-time turbidimeter or incubator reaction block to start reaction.

↓ The control reaction of this product occurs at 62.5°C for 35 minutes.

Enzyme deactivation (80°C for 5 minutes or 95°C for 2 minutes)

↓ (will be automatically processed in the real-time turbidimeter)

Turbidity measurement/evaluation

4. Detection

A. Real-time turbidity detection

The target gene can be detected in real time using the real-time turbidimeter (designed for the LAMP method). Refer to the package insert or operation manual, etc. for the detailed operating procedure.

B. Fluorescent/visual detection

Judgment is made by emitting ultraviolet ray to the reaction tube from the bottom using the ultraviolet irradiation device and observing the reaction tube from the side with the eyes protected by eyeglasses, etc. Evaluate the reaction tube according to the following criteria after confirming that the positive control (PC H1P) produces green fluorescence and the negative control (NC) produces no fluorescence. Take the picture of the reaction tube using a digital camera, etc. for documentation purposes, if required.

Positive: Produces green fluorescence.

Negative: Produces no fluorescence.

5. Amplification curve pattern

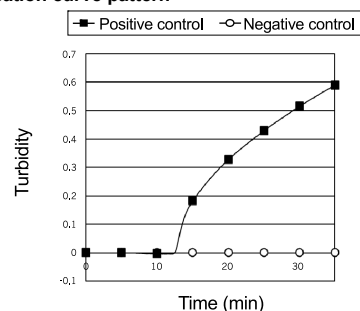


Figure 1. Control amplification curve pattern

<Precautions for measurement>

1. Because the LAMP reaction is very sensitive, any contamination with extremely minimum of the target gene or amplification product may result in an incorrect result. To avoid such contamination, the use of this product and specimen collection/nucleic acid extraction procedure should be performed in separate rooms or in different areas by partitioning the laboratory area. Take appropriate measures to prevent contamination including the use of clean benches, gloves, and isolation gowns, as required.
2. Avoid the contamination by microorganisms or nucleic acid degrading enzymes (such as DNase and RNase) in handling this product.
3. Completely dissolve the dry reagent. Incomplete dissolution may result in poor performance including low sensitivity. Do not leave more than 2 minutes in state of inverting reaction tubes.
4. Air bubbles may appear on the liquid level of the reaction solution after mixing the sample solution. Remove them to prevent measurement errors by spinning down the reaction mixture.
5. Never open the tube cap after reaction. Particularly, carefully remove the tube from the equipment so as not to open the cap after reaction. The contamination with amplification products not only results in an erroneous decision, but also causes the contamination of the measurement environment. Such contamination may persistently inhibit correct measurement unless it is completely eliminated.
6. Avoid handling amplification products using electrophoresis.

【Precautions for handling (hazard prevention)】

1. This product is not designed as an in vitro diagnostic (IVD).
2. Take care not to directly gaze at the ultraviolet ray (sterilizing ray) from the lamp of the ultraviolet irradiation device for fluorescent/visual evaluation because it is dangerous. When it is necessary to gaze at the lamp that is on, make sure to do that through a glass plate or using wide eyeglasses or shield.
3. A minute amount of sodium azide is contained as a preservative in the primer mix H1P (PM H1P), positive control H1P (PC H1P), and negative control (NC). Take care to prevent sodium azide from entering the eyes or mouth or attaching to skin because it is toxic.
4. If the reagent accidentally enters the eyes or mouth or attaches to skin, immediately rinse it off with a large amount of water and seek medical treatment, if needed.

【Precautions】

1. This product should be stored as specified while avoiding **freezing** or sudden change in temperature.
2. Keep the positive control H1P (PC H1P) away from other reagents.
3. Perform gene test with this product only under the supervision of experts with the knowledge and experience of gene test because the lack of knowledge or experience may result in incorrect judgment of the test result.
4. 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.
5. Use this product within the expiration date.
6. Do not recycle the containers or accessories of this product or use them for other purposes.
7. Do not use it in combination other reagents with the Loopamp RNA/DNA Amplification Reagent D.

【Precautions for disposal】

1. Appropriately dispose of tubes after reaction with the cap closed by putting them in double plastic bags that can be incinerated or sealed. To prevent dispersion of amplification products, **do not autoclave tubes before disposal**.
2. The constituent reagent tube is mainly made of polypropylene (PP). The kit case is mainly made of paper.
3. Dispose of this product, containers, and materials before or after use on the responsibility of the laboratories in compliance with applicable laws on waste disposal and cleaning and water pollution prevention law.

【Storage method, shelf life, packaging unit, and product code】

Product name	Storage method	Shelf life	Package unit	Product code
Loopamp™ Control Set RNA/DNA	2-8°C	1 year	For 12 tests	LMP248

【References】

- 1) Notomi T. et al.; Nucleic Acids Research, **28** (12) : e63, 2000.
- 2) Nagamine K. et al.; Clin. Chem, **47** (9) : 1742-1743, 2001.
- 3) Mori Y. et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun, **289** (1) : 150-154, 2001.
- 4) Tomita N. et al.; Nat Protoc, **3** (5) : 877-882, 2008.
- 5) Nagamine K. et al.; Molecular and Cellular Probes, **16** (3) : 223-229, 2002.

Manufacturer



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

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