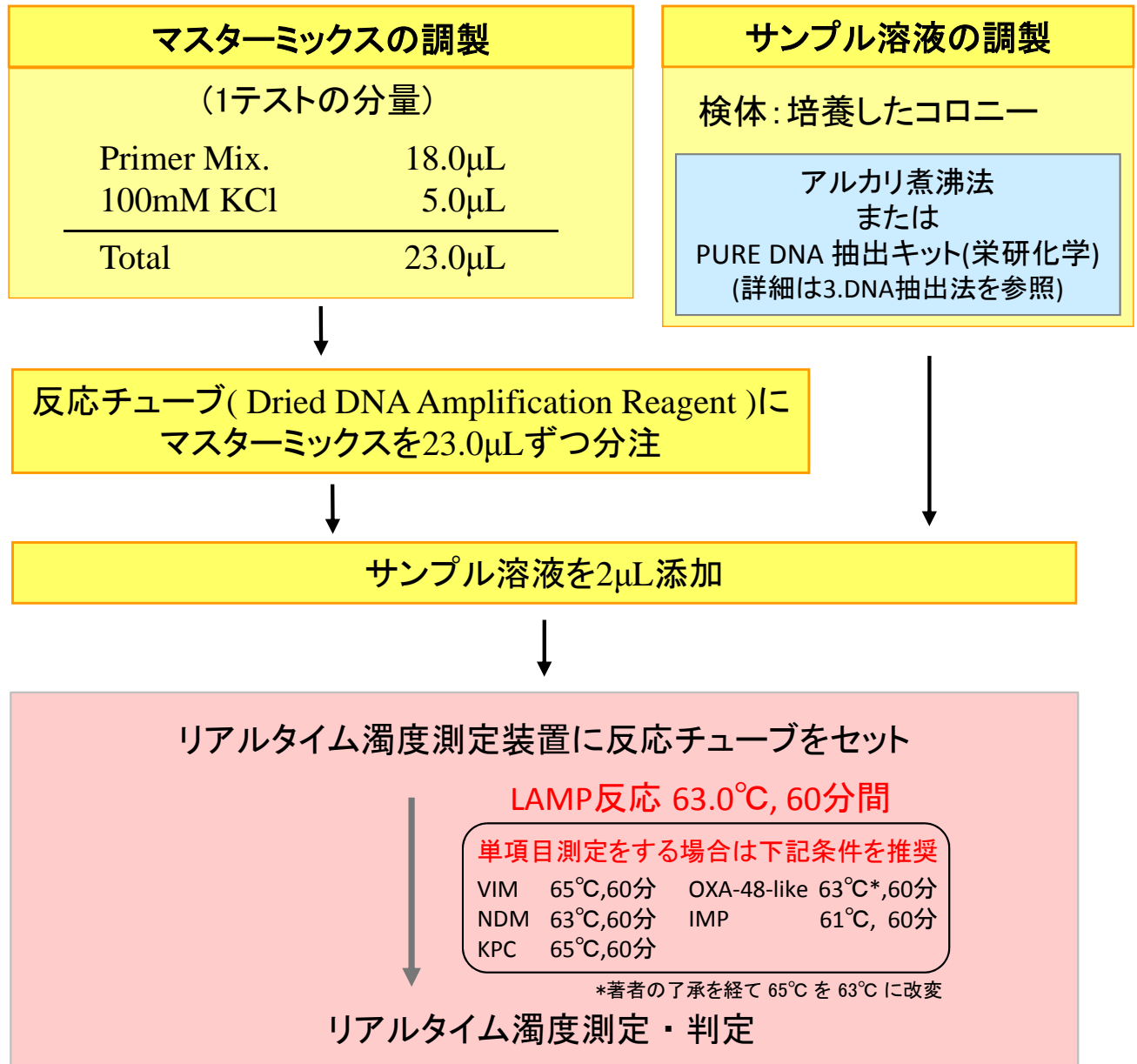


Carbapenemase Gene (VIM、NDM、KPC、OXA-48-like、IMP) 検出用プライマーを用いた使用方法

船島由美子,菅原和行,平田雄哉,加藤匡平,佐藤謙一,佐々木泰治,永沢善三,梅村創:
LAMP法を用いた簡易・迅速なCarbapenemase Big Five Gene分析の試み:
JARMAM Vol.28(2), p.8-14, 2018 に基づき著者の了承を経て一部改変

操作の概要



LoopampEXIA

注: 本検査法は、Carbapenemase Geneを検出するためのものです。
医療行為および人、動物に対する臨床診断等の目的では使用できません。

1. プライマーの調製方法 ※ サンプル冷却用チューブラック等を使用し、必ず氷冷で操作を行ってください

(1) 合成プライマーの調製(各プライマーを100pmol/μLに調製)

Data Sheetに記載の
XXX μLのTE Buffer (TE) をチューブに添加し
100pmol/μLに調製します。

※Data Sheetに記載
For 100 μmolar Solution
(100pmol/μL) dilute in:XXX μL

※ TE buffer (分子生物学用) *
or 10mM Tris buffer or DW

* Tris 10mmol/L, EDTA 1mmol/L (pH7.5)

TE Buffer (TE) XXX μL



終濃度100pmol/μLの
プライマー液が調製されます。

データシートに記載のnmol数 × 10のTE bufferで溶解すると、100pmol/μLになります。
EX. 12.3nmol ⇒ 123μLで溶解します。

(2) Primer Mixの調製例(調製後は、冷凍保存)

滅菌マイクロチューブに1-(1)で調製した各プライマー(100pmol/μLで調製した場合)を以下の容量で
加え、転倒混和した後、スピンドアウンします。

※冷凍保存した場合、室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。

終濃度	VIM-1		NDM		KPC		OXA-48-like		IMP	
	1test	100test	1test	100test	1test	100test	1test	100test	1test	100test
FIP(40pmol)	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL
BIP(40pmol)	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL	0.4μL	40μL
FL(20pmol)	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL
BL(20pmol)	0.2μL	20μL	—	—	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL	0.2μL	20μL
F3(5pmol)	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL
B3(5pmol)	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL	0.05μL	5μL
Distilled Water	16.7μL	1670μL	16.9μL	1690μL	16.7μL	1670μL	16.7μL	1670μL	16.7μL	1670μL
Total volume	18.0μL	1800μL	18.0μL	1800μL	18.0μL	1800μL	18.0μL	1800μL	18.0μL	1800μL

2. 試薬調製 ※ サンプル冷却用チューブラック等を使用し、必ず氷冷で操作を行ってください

(1) 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。

	1テスト分	10テスト分
Primer Mix.	18.0μL	180μL
100mM KCl	5.0μL	50μL
Total volume	23.0μL	230μL

※ 蛍光目視検出試薬を使用する場合は、Fluorescent Detection Reagent 1μL/テストを用い、
1テスト当たりのPrimer Mix量を1μL減らしてください(Primer Mix作成時のDistilled Water量を減
らして調整してください)。

(2) 分注後、チューブを軽く数回叩いて混合(タッピング)するか、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)での攪拌により十分混合した後、微量簡易遠心機でスピンドアウンし、これを
マスターミックスとします。

なお、調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

3. サンプル溶液の調整(DNA抽出)

(1) アルカリ煮沸法

Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) Background (<https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>) に準拠

- トリプチケースソイ5%ヒツジ血液寒天培地にて増菌培養した後のコロニーを検体として使用

操作手順

1. 1.5mL遠心チューブに滅菌精製水を25 μ L加え1 μ L白金耳で採取した菌を懸濁する
2. 各サンプルに0.1N NaOHを25 μ L加え、転倒混和
3. 95~99 $^{\circ}$ Cで10分間加熱
4. 氷上で3~5分間冷却し、0.5M Tris-HCl(pH8.0)を18 μ L加え中和
5. 各チューブに冷却した滅菌精製水を400 μ L加え、転倒混和しタッピングする
6. 16.1 RCF*で3分間遠心した後、上清(約400 μ L)を新しいチューブに移し、サンプル溶液**とする(-20~30 $^{\circ}$ Cで保存)

* 16.1 RCF(16.1 \times g)は、微量簡易遠心機(ローター径:約4cm)で約600rpm、微量高速遠心機(ローター径:約7cm)で約450rpmに相当します。

** DNA以外の夾雑物混入の高い抽出液はTE液で10倍希釈したサンプル溶液を推奨します。

(2) PURE DNA抽出キットの応用例

操作手順

1. 増菌培養後のコロニーを10 μ L白金耳を用い釣菌し1mLの滅菌精製水に懸濁する
2. 懸濁液60 μ LをPURE DNA抽出キットの説明書に従い抽出し、サンプル溶液とする

4. マスターミックスとサンプル溶液の混合

以下に、DNA増幅試薬キットDを用いた使用方法を記載します。詳細は、キットの使用説明書をご参照ください。

- (1) DNA増幅試薬の中から、反応チューブ(Dried DNA Amplification Reagent)を必要本数分用意します。
- (2) 反応チューブに、マスターミックスを23 μ Lずつ分注します。(氷冷)
- (3) サンプル溶液2 μ Lを添加し全量を25 μ Lとします。(氷冷)
- (4) 蓋を閉めた後、反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒状態のまま2分間静置します。(氷冷)
- (5) 反応チューブを5回転倒混和後、8連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンします。

5. LAMP反応

※ LAMP反応は、Loopampリアルタイム濁度測定装置(LoopampEXIA、LA-320C:販売終了、RT-160C:販売終了)をご使用ください。

- (1) Loopampリアルタイム濁度測定装置の反応条件は、以下の通りです。

<LAMP反応条件>
63.0 $^{\circ}$ C、60分

<酵素失活条件>
80 $^{\circ}$ C、5分間又は95 $^{\circ}$ C、2分間

- (2) Loopamp反応チューブの蓋が確実に閉まっていることを確認した後、装置にセットし、反応を開始します。
- (3) LAMP反応終了後、80 $^{\circ}$ C、5分間又は、95 $^{\circ}$ C、2分間の酵素失活を行い反応を停止させます。(Loopampリアルタイム濁度測定装置の場合は、自動的に移行します。)
- (4) 判定は、自動的に行われます。

※ 蛍光目視による検出の場合、紫外線照射装置(波長240~260nm、又は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、陽性対照と同様に緑色の強い蛍光を発すれば陽性、陰性対照と同様に蛍光を発しなければ陰性と判定します。

※ 注意事項

反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。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。