



クリプトスポリジウム検出試薬キット

【特徴】

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^{1)、2)}、② 6 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)、5)、6)}、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本製品は LAMP 法による検出キットで、*Cryptosporidium* 属の保持する 18S rRNA をコードする遺伝子の核酸配列を認識するプライマーを用いて核酸の増幅反応を行い、その増幅の有無から特異的に *Cryptosporidium* 属を検出することができます。

専用の Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適用機種: LA-320C、RT-160C) を用いることにより、検出に電気泳動を必要とせず、核酸の増幅反応から検出までを閉鎖系 (同一反応チューブ内) で行うことが可能で、簡易かつ短時間に *Cryptosporidium* 属を検出することができます。

【キット内容】

	48 テスト分
(1) 2×Reaction Mix. (RM) ^{※1}	0.6 mL × 1 tube
(2) Primer Mix. Cry (PM Cry) ^{※1}	0.12 mL × 1 tube
(3) <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{※1}	60 μL × 1 tube
(4) Distilled Water (DW) ^{※1}	1.0 mL × 1 tube
(5) Positive Control Cry (PC Cry) ^{※1}	0.1 mL × 1 tube

※1: () 内は試薬チューブに記載されている表示です。

【使用目的】

環境由来検体中の *Cryptosporidium* 属の検出

【測定原理】

本製品は、LAMP 法を測定原理として利用しています。

検査対象の検水を濃縮、DNA 抽出した溶液をサンプル溶液とします。このサンプル溶液と 2×Reaction Mix. (RM)、Primer Mix. Cry (PM Cry)、Distilled Water (DW)、*Bst* DNA Polymerase を混合してインキュベートすると、プライマーで認識される *Cryptosporidium* 属の保持する 18S rRNA をコードする遺伝子の核酸配列が存在した場合に、*Bst* DNA Polymerase の働きでサンプル溶液中の DNA から増幅反応が進行します。核酸増幅の検出は、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物質) の濁度の変化によって行い、*Cryptosporidium* 属の有無を判定します。

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。

尚、本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではありません。

【使用方法】

1. 必要な器具・装置・試薬 (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 μL, 10 ~ 100 μL, 100 ~ 1,000 μL)
- フィルター付きチップ
- ヒートブロック (95℃ で使用)
- 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
- 超音波洗浄器
- Loopamp 反応チューブ
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適用機種 LA-320C、RT-160C)
- Proteinase K 溶液^{※2}

※2: 調製方法につきましては、別途「Loopamp クリプトスポリジウム/ジアルジア操作マニュアル」をご参照のうえ、用時調製してください。尚、マニュアルの最新版については、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

2. 検体の調製

- 1) 免疫磁気ビーズ濃縮法によるビーズ/オーシスト・シスト複合体 (磁気ビーズと結合し塩酸解離前の状態) を用意します⁷⁾。
- 2) DNA 抽出操作⁸⁾
DNA 抽出方法につきましては、別途「Loopamp クリプトスポリジウム/ジアルジア操作マニュアル」をご参照のうえ、用時調製してください。尚、マニュアルの最新版については、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。
- 3) 抽出したサンプル溶液は、測定前にヒートブロックを用いて 95℃、5 分間加熱後、氷上で急冷しそのまま 5 分間以上静置して使用してください。

3. 試薬の調製

- 1) -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します。
- 2) マスターミックスの調製 (氷上で行ってください)
別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに 2×Reaction Mix. (RM)、Primer Mix. Cry (PM Cry)、*Bst* DNA Polymerase 及び Distilled Water (DW) を、次表の割合で分注します。

＜試薬＞	＜用量: 1 test＞	＜用量: 10 tests＞
2×Reaction Mix. (RM)	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. Cry (PM Cry)	2.5 μL	25 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL	40 μL
合 計	20.0 μL	200 μL

- ☆ 調製したマスターミックスはすぐに使用してください。
- ☆ 必要なテスト数より 1 テスト分程度多めに調製することをお勧めします。

4. 操作法

1) マスターミックスとサンプル溶液の混合 (氷上で行ってください)

- (1) Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20 μL を分注します。
- (2) サンプル溶液 5 μL を添加し全量 25 μL とします。このとき、ビベティング又はキャップを開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ダウンします。
- (3) また、コントロール反応用として、サンプル溶液の代わりに陽性コントロールには Positive Control Cry (PC Cry) を、陰性コントロールには Distilled Water (DW) 5 μL を用います。

- ☆ 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。

2) リアルタイム濁度検出による増幅反応及び判定

- (1) Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適用機種 LA-320C、RT-160C) を使用する約 20 分前までに立ち上げて、測定条件を本製品用に合わせます。
設定は次のとおりです。
〔温度〕: 反応ブロック: 63℃、ホットボンネット: 73℃
〔測定時間〕: 60 分
〔酵素失活処理〕: 80℃、5 分間
- (2) 表示温度が 63℃ に達していることを確認します。
- (3) 調製、分注済みの反応チューブをセットして測定を開始します。
- (4) 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します。陽性コントロール: Positive Control Cry (PC Cry) 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、LAMP 反応は正常に進行しています (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してください。
- (5) 各検体の判定を行います。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」、濁度の上昇が認められない場合を「陰性」と判定します。
- (6) 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 Cry (PC Cry) と異なる場合があります。
- (7) 酵素失活処理 (80℃、5 分間) (Loopamp リアルタイム濁度測定装置では自動処理されます。) が終了していることを確認した後、装置から使用済み反応チューブを取り出して、そのままキャップを開けずに廃棄してください。

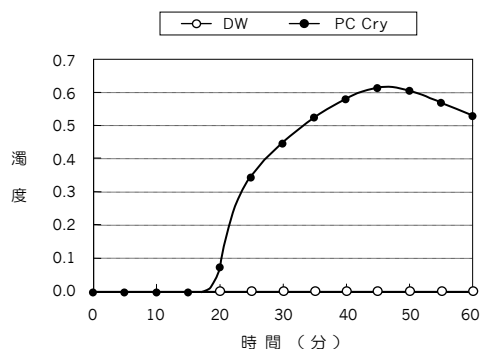
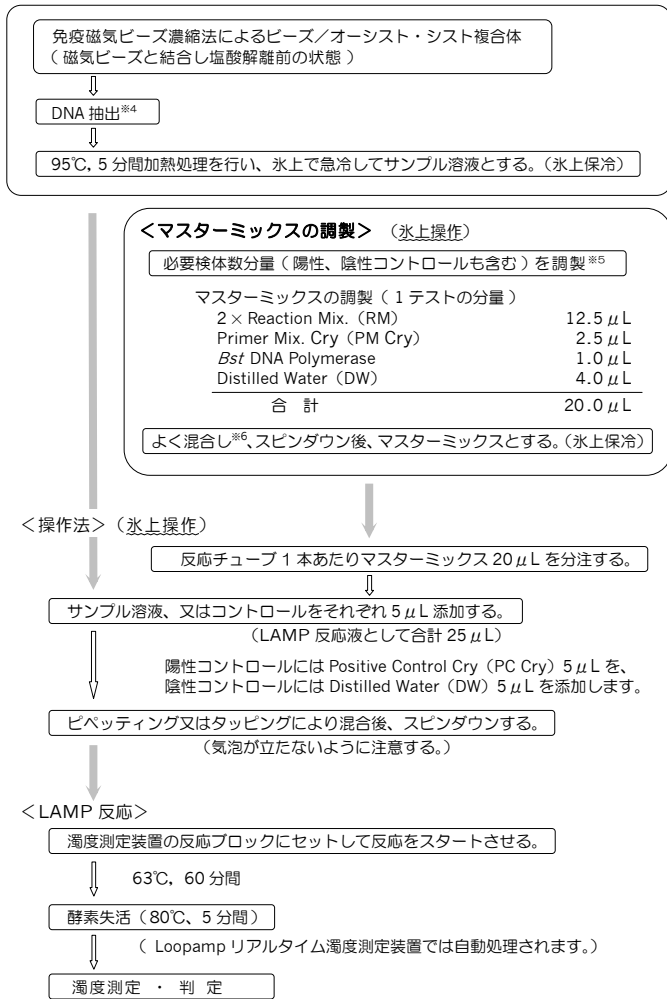


図. Positive Control Cry (PC Cry) の増幅曲線パターン^{※3}
(使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C)

※3: 本試薬の濁度立ち上がり時間と初期接種量との間に相関はありません。

■キット使用操作手順

＜検体の前処理：サンプル溶液の調製＞



※4：DNA 抽出方法につきましては、別途「Loopamp クリプトスポリジウム／ジアルシア操作マニュアル」をご参照のうえ、用時調整してください。尚、マニュアルの最新版については、Eiken GENOME SITE (URL：http://loopamp.eiken.co.jp/) をご参照ください。

※5：必要なテスト数（陽性、陰性コントロール分も含む。）より 1 テスト分程度多めに調製することをお勧めします。

※6：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。

【性能】

検出限界：60 copies/test^{※7}

※7：Cryptosporidium parvum の標的遺伝子領域を挿入したプラスミド DNA を検体として測定した場合。

【操作上の留意事項】

1. サンプル溶液の取扱い

サンプル溶液（DNA 抽出液）は原則として直ちに測定してください。また、長期に保存する場合は－80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。

2. 試薬の取扱い

- 1) 本製品は必ず－20℃で保存し、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) 試薬の解凍は室温で行い、調製と保存は氷上で行ってください。試薬を使用する際には、一旦スピンドウンしてチューブの管壁やキャップに付着している試薬を落とした後、十分混合し再度スピンドウンしてからご使用ください。
尚、Bst DNA Polymerase は失活する恐れがありますので、激しく攪拌しないでください。
- 3) Positive Control Cry (PC Cry) は高コピー数です。他のサンプル、試薬へのコンタミネーションを避けるため、取り扱う際にはキャップを開ける前に必ずチューブをスピンドウンし、キャップを開けている時間も必要最小限となるようにしてください。
- 4) Positive Control Cry (PC Cry) 及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して取り扱ってください。
- 5) 外箱に表示の使用期限 (Exp. Date) 内に使用してください。
- 6) 試薬が余った場合、たとえ同一ロットであっても他キットへの使用はしないでください。

3. 反応チューブの取扱い方法

- 1) 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。

- 2) 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。
- 3) 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。Loopamp リアルタイム濁度測定装置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。
- 4) 反応チューブにマスターミックス、サンプル溶液が添加されていることを、他のチューブとの液量比較で確認してください。

4. 増幅反応に際しての留意点

マスターミックス及びサンプル溶液を混合後、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. 使用後の反応チューブの取扱い

- 1) 反応後のチューブのキャップは決して開けないでください。特に反応チューブを装置から取り出すときにチューブのキャップが開かないよう、慎重に取り出してください。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、検査環境そのものを汚染し、汚染を除去しない限り、以後の検査で正しい結果が得られなくなる可能性があります。
- 2) 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プ処理は行わないでください。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 本製品は環境分析を目的とした検査にのみご使用ください。ヒト、動物由来検体の医療、臨床診断の目的では使用できません。
2. 本製品で陰性判定であっても、Cryptosporidium 属の存在を否定するものではありません。測定結果は、他の検査結果とあわせて総合的に判断してください。
3. 検体の取扱いについては必要なバイオハザード対策⁹⁾をとってください。
4. LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の DNA 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る恐れがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、サンプル溶液と試薬の調製は別々の操作域で行ってください。尚、電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。
5. 反応チューブには UV 照射しないでください。UV 照射による変色等で誤った結果をもたらす場合があります。
6. 反応液中に DNase が混入すると反応が阻害され、実験の信頼性が損なわれることがあります。検査を行う環境、使用する器具や装備等に注意してください。
7. 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、本製品の使用に当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下で検査を実施してください。
8. 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、当社は一切の責任を負いません。
9. 試薬チューブ及び反応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。
10. 使用後の試薬や容器及び器具類は、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。

【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®クリプトスポリジウム 検出試薬キット	48テスト分	－20℃	1 年間	LMP741

【参考文献】

- 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) 富田 憲弘, 他：第 73 回日本生化学会大会発表抄録集 (2000)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 社団法人日本水道協会編：クリプトスポリジウム－解説と試験方法－ (2003)
- 8) 遠藤 卓郎, 他：LAMP-MPN 法の検討・平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）最近の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究（主任研究者：眞柄泰基）より、分担研究報告書
- 9) 国立感染症研究所：国立感染症研究所病原体等安全管理規程（2007）

【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

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