



L.monocytogenes 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)}、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本キットは LAMP 法による検出キットで、*Listeria monocytogenes* (以下、*L. monocytogenes*) の保持する侵入性関連遺伝子 iap^{6), 7)} 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 *L. monocytogenes* 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、LA-200F) 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 *L. monocytogenes* を検出することができます^{8), 9)}。

【キット内容】

	48 テスト分
(1) Extraction Solution for Foods (EX F) ^{*1}	1.8 mL × 3 tubes
(2) 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) ^{*1}	1.0 mL × 1 tube
(3) Reaction Mix. Lis (RM Lis) ^{*1}	1.0 mL × 1 tube
(4) <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{*1}	60 μL × 1 tube
(5) Positive Control Lis (PC Lis) ^{*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】

食品又は環境由来検体中の、*L. monocytogenes* の検出

【測定原理】

本キットは、LAMP 法を測定原理として利用しています。

はじめに検査対象の食品等を増菌培養し、DNA をアルカリ熱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 Reaction mix. Lis (RM Lis)、*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 *L. monocytogenes* の保持する侵入性関連遺伝子 iap⁶⁾ 配列が存在した場合に限り、*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、*L. monocytogenes* の有無を判定します。

LAMP 反応の原理については、Eiken GENOME SITE (URL : <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご参照ください。

なお、本キット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 (キットに含まれていませんので、別途用意してください。)

- 培地 (前増菌培養用、増菌培養用)
- フィルター付きストマックバッグ
- 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
- 検体前処理用滅菌チューブ (0.5 mL)
- ヒートブロック (95℃で使用)
- 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)
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適用機種 LA-320C、RT-160C、LA-200F)
- 微量簡易遠心機
- 高速遠心機 (2,000×G 以上であれば微量簡易遠心機でも可)
- ボルテックスミキサー

2. サンプル溶液の調製

食品中の *L. monocytogenes* 検査を目的とした前増菌培養液を検体とする場合。

食品 25g+ハーフ・フレザー培地^{*2} (Half-Fraser) 又は UVM 培地^{*2}, EB 培地^{*2} 225mL

→ ストマッカー処理 → (30℃、24 時間) → 前増菌培養液

なお、より確実な結果を得るためには、前増菌培養後、さらに増菌培養したサンプルを用いた試験の実施もお勧めします。

^{*2} : 食品に合わせて使い分けてください。

1) 検体の前処理 (サンプル溶液の調製)

- (1) 検体数分の検体前処理用滅菌チューブを別途用意し、各チューブに検体である前増菌培養液又は増菌培養液 50 μL を採取します。
- (2) キャップを開け、2,000×G、5 分間遠心し、沈殿物を吸い取りしないよう可能な限り上清をピペットで除去します。なお、沈殿物がない場合には上清を約 40 μL 除去します。
- (3) Extraction Solution for Foods (EX F) 80 μL を添加します。
- (4) キャップを開け、ボルテックスミキサーで混和し、微量簡易遠心機で数秒間遠心し (以下、スピンドアウンと呼ぶ。)、95℃、5 分間加熱処理します。
- (5) 1M Tris-HCl : pH 7.0 (Tris) 10 μL を添加します。
- (6) キャップを開け、ボルテックスミキサーで混和し、室温で 2,000×G、30 秒間遠心後、氷上に移し、上清をサンプル溶液とします (0 ~ 4℃で 4 時間保存可能)。

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。)

- (1) 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに、1 テストあたり、Reaction Mix. Lis (RM Lis) 20 μL、*Bst* DNA Polymerase 1 μL を、それぞれ必要なテスト数分 (陽性、陰性コントロール分を含む。) 分注します。
 - (2) 分注後、チューブを軽く数回叩いて混合する (以下、タッピングと呼ぶ。) か、又は転倒混和、あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の攪拌により十分混合した後、スピンドアウンし、これをマスターミックスとします。ボルテックスミキサーでの攪拌は過剰に行くと、酵素が失活する可能性があります。したがって、1 秒間×3 回を厳守してください。
- 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。

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、ビベッティング又はキャップを開けた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドアウンします。また、混合の際は気泡が立たないように注意します。
- (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 Lis (PC Lis) 5 μL を、陰性コントロールには Extraction Solution for Foods (EX F) 5 μL を用います。

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、LA-200F) の測定条件を本キット用にあわせてください。設定は次のとおりです。
[温度] : 反応ブロック : 65℃、ホットボンネット : 75℃
[測定時間] : 60 分
[酵素失活処理] : 80℃、2 分間
なお、操作方法の補足説明については 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。
- (2) 表示温度が 65℃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 Lis (PC Lis) で濁度が上昇し、陰性コントロール : Extraction Solution for Foods (EX F) 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。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。(図 1)
- (5) 次に、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。(図 2)
- (6) なお、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 Lis (PC Lis) と異なる場合があります。
- (7) 酵素失活処理 (80℃、2 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、そのままキャップを開けずに廃棄してください。

■ 増幅曲線パターン

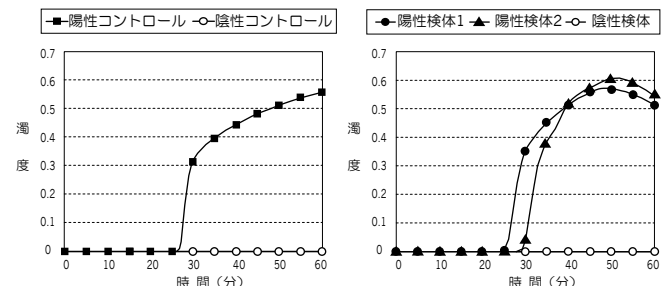


図 1. コントロールの増幅曲線パターン

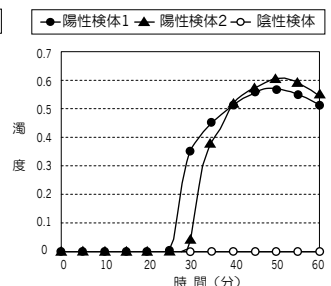


図 2. 検体の増幅曲線パターン^{*3}

^{*3} : 本キット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。したがって、濁度の立ち上がり時間で、コピー数を特定することはできません。

【操作上の留意事項】

1. サンプルの取扱い

- (1) 前増菌培養又は増菌培養を行う際は、必ずフィルター付きのストマックバッグを使用してください。
- (2) 前増菌培養液又は増菌培養液を採取する際は、沈殿物の巻き込みに十分注意して操作してください。
- (3) 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。

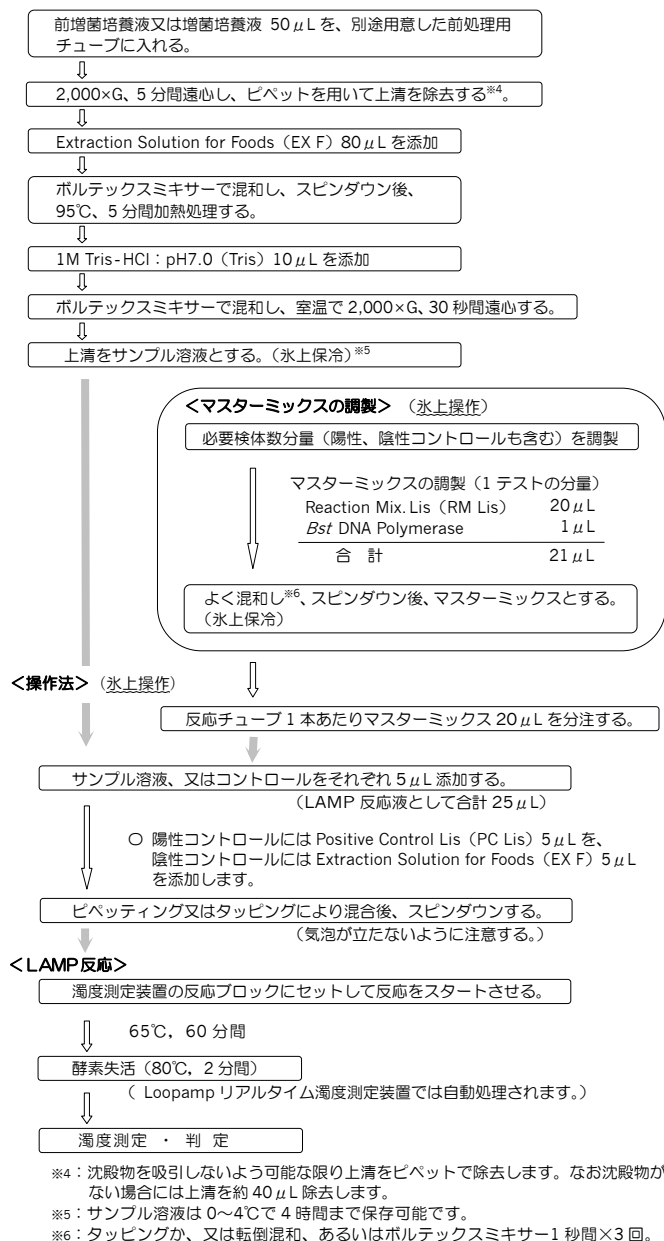
2. 試薬の取扱い

- (1) 本キットは必ず -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、一旦スピンドア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アウンしてからご使用ください。なお、*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) Extraction Solution for Foods (EX F) 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 for Foods (EX F) のキャップ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、Extraction Solution for Foods (EX F) の分注は検体添加の直前に行ってください。また、保存時は小分けによる保存はせず、キャップがしっかりと閉まっていることを確認してください。

- 4) Positive Control Lis (PC Lis) 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。また、反応チューブへの添加は、陰性コントロール: Extraction Solution for Foods (EX F)、サンプル溶液 (DNA 抽出液) の順に行い、最後に陽性コントロール: Positive Control Lis (PC Lis) の添加を行ってください。このとき、反応チューブのキャップ (陽性コントロール用反応チューブ以外) はすべて閉まっていることを確認してください。さらに、検査環境へのコンタミネーションを避けるため Positive Control Lis (PC Lis) は本説明書に記載の操作方法以外での使用 (希釈や検体への添加等) は、絶対に行わないでください。
- 5) 陽性コントロール及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して取扱ってください。
- 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。

■キット使用操作手順

< 検体の前処理: DNA 抽出液の調製 > (氷上操作)



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. 検出、判定に際しての留意点

- 1) 検出には必ず「Loopamp リアルタイム濁度測定装置」(LA-320C、RT-160C、LA-200F) を用いてください。
- 2) Loopamp リアルタイム濁度測定装置は使用する約 20 分前までに立ち上げてください。
- 3) 判定は、Positive Control Lis (PC Lis) の濁度上昇の有無 (核酸の増幅反応が適切に進行している場合、反応開始後 30 分前後から濁度上昇が開始します。) により試薬の反応性を確認した上で行ってください。なお、検体によっては濁度上昇開始時間が陽性コントロールよりも遅れる場合があります。

6. 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。

【性能】

検出限界: 60 CFU (Colony Forming Unit) / test^{※7}

※7: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 に関しては、600CFU/test

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 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クリーンベンチ等を使用して行ってください。なお、電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。
2. 前増菌用又は増菌用培地などの取扱いについてはそれぞれの使用説明書に従ってください。その他、検体の取扱いについては必要なバイオハザード対策¹⁰⁾をとってください。
3. Loopamp 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 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。
4. 本キットは食品・環境分析を目的とした検査にのみご使用ください。人、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。
5. 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、本キット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。
6. 本キットは従来の *L. monocytogenes* 検査法の培養法とは異なり遺伝子検出法ですので、*L. monocytogenes* の生菌のみを検出するものではありません。自主検査の一環としてご使用ください。
7. 本キットによる判定結果が培養法と異なる場合があります。
8. 本キット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. 外箱に表示の使用期限 (Exp. Date) 内に使用してください。
10. 本キットの保存温度は-20 $^{\circ}$ C を厳守してください。-20 $^{\circ}$ C より低い温度で保存・凍結融解を繰り返すことにより 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) チューブに亀裂が入る可能性があります。

【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® <i>L. monocytogenes</i> 検出試薬キット	48 テスト分	-20 $^{\circ}$ C	1 年間	LMP701

【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) 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)
- 4) Mori Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150-154 (2001)
- 5) 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)
- 6) Kohler S. et al.: Infect Immun. **58**, No.6: 1943-50 (1990)
- 7) Wuenschel MD. et al.: J Bacteriol. **175**, No.11, 3491-3501 (1993)
- 8) Yoshino M. et al.: American Society for Microbiology The 104th General Meeting (2004)
- 9) 吉野 学, 他: 第 25 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p22 (2004)
- 10) 日本細菌学会バイオセイフティー委員会: 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

* 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