

研究用

*** 2011 年 3 月改訂 (第 5 版)
* 2009 年 3 月改訂 (第 4 版)



ノロウイルス G I 検出試薬キット

【特徴】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 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。

本製品は LAMP 法による検出キットで、ノロウイルス Genogroup I (以下、G I) genome RNA 内の保存性の高い領域^{(6)・(7)} に設計したプライマーを用いて RT-LAMP 反応を行い、その増幅の有無から特異的にノロウイルス G I 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 (適応機種 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、cDNA の合成から核酸の増幅反応、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、簡易かつ短時間にノロウイルス G I 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. NV1 (RM NV1) ^{※1}	0.6 mL × 1 tube
(2) Primer Mix. NG1 (PM NG1) ^{※1}	0.12 mL × 1 tube
(3) Distilled Water (DW) ^{※1}	1.0 mL × 1 tube
* (4) Enzyme Mix. ^{※2} (EM) ^{※1}	0.50 mL × 1 tube
(5) Positive Control NVG1 (PC NVG1) ^{※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。

※2: Bst DNA Polymerase と AMV reverse transcriptase をミックスしたものです。

【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。

抽出した RNA genome をサンプル溶液とし、2×Reaction Mix. NV1 (RM NV1)、Primer Mix. NG1 (PM NG1)、Distilled Water (DW)、Enzyme Mix. (EM) 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ノロウイルス G I 由来の RNA 配列が存在した場合に限り、AMV reverse transcriptase によりサンプル溶液中の RNA から cDNA が合成され、この cDNA から Bst DNA Polymerase の働きで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、ノロウイルス G I 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 (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 μ L, 10～100 μ L, 100～1,000 μ L)
- フィルター付きチップ
- 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 (適応機種 LA-320C、RT-160C、LA-200F)
- 微量簡易遠心機
- ボルテックスミキサー

2. サンプル溶液の調製

市販のウイルス分離用試薬を使用して抽出サンプル溶液を調製してください。尚、抽出後の DNase 処理はしないでください。

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。)

- *** (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、2×Reaction Mix. NV1 (RM NV1) 12.5 μ L、Primer Mix. NG1 (PM NG1) 2.5 μ L、Distilled Water (DW) 4.0 μ L 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、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。
- (3) 加熱処理後直ちに氷上で 5 分間冷却し、スピンドアウンの後、Enzyme Mix. (EM) を 1 テストあたり 1.0 μ L 添加します。
- (4) (3) のチューブをタッピングか、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うと、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。
- 尚、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 μ L を分注します。

- (2) サンプル溶液 (抽出 RNA genome) 5 μ L を添加し全量 25 μ L とします。このとき、ビベッ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、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 NVG1 (PC NVG1) 5 μ L を、陰性コントロールには Distilled Water (DW) 5 μ L 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 (適応機種 LA-320C、RT-160C、LA-200F) の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
尚、操作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 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 NVG1 (PC NVG1) 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。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は「陽性」、濁度の上昇が認められない場合は「陰性」と判定します。(図 2)
- (6) 尚、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 NVG1 (PC NVG1) 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。

■ 増幅曲線パターン

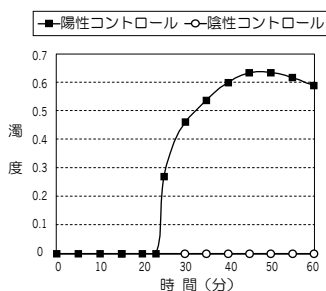


図 1. コントロールの増幅曲線パターン

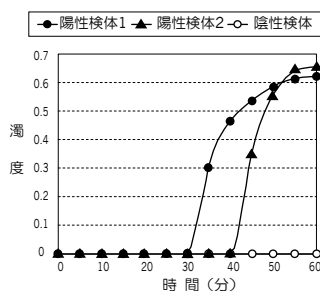


図 2. 検体の増幅曲線パターン^{※3}

※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。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

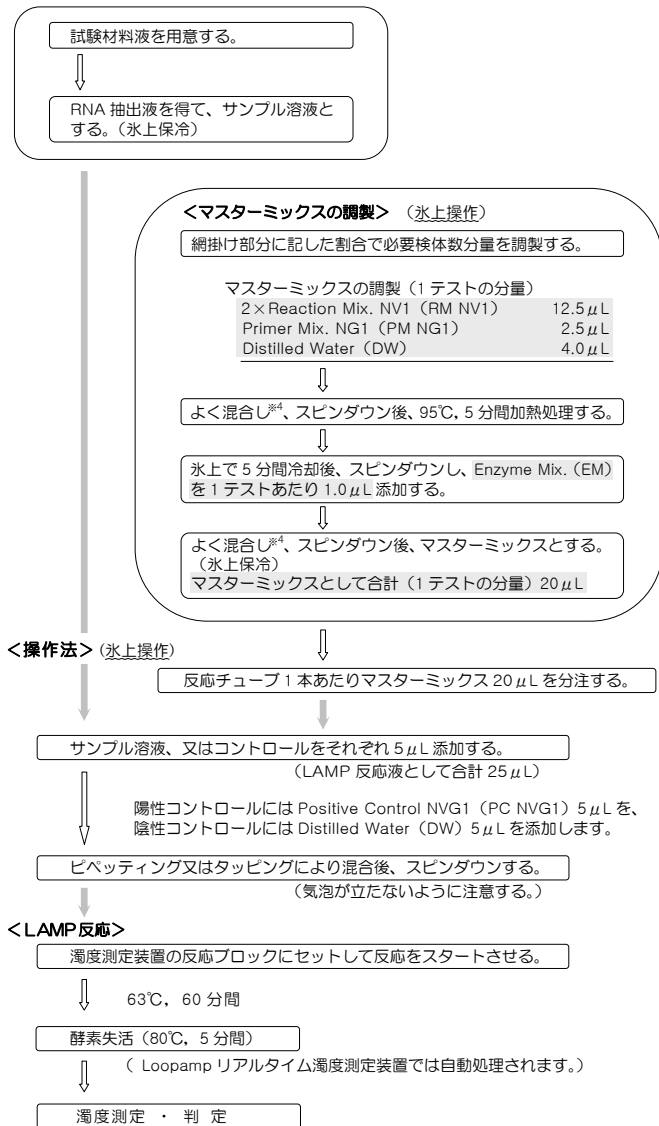
- 1) 抽出した RNA genome は感染の危険性があります。検体を取扱う時には安全キャビネット内で行い、感染防止に最大の注意を払う等必要なバイオハザード対策⁸⁾を実施してください。
- 2) サンプル溶液 (抽出 RNA genome) は原則として直ちに測定してください。また、長期に保存する場合は -80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 3) 抽出液の回収には、核酸低吸着のチューブの使用をお勧めします。

2. 試薬の取扱

- 1) 本製品は必ず -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。尚、Enzyme Mix. (EM) 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) マスターミックス調製時、95℃、5 分間の加熱により濁りが生じ、冷却後、透明に戻りますが、このことによる LAMP 反応及び濁度測定への影響はありません。
- 4) Positive Control NVG1 (PC NVG1) 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アウンし、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: Distilled Water (DW)、サンプル溶液 (抽出 RNA genome) の順に行い、最後に陽性コントロール: Positive Control NVG1 (PC NVG1) 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。更に、検査環境へのコンタミネーションを避けるため Positive Control NVG1 (PC NVG1) 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) キット内の試薬は正確な測定値が得られるように組み合わせられていますので、製造番号の異なる試薬を組み合わせないでください。

**■キット使用操作手順

＜検体の前処理：RNA 抽出液の調製＞



※4：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。

3. 反応チューブの取扱い方法

- 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。
- 反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
- 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。
- 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. 検出、判定に際しての留意点

- 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。
- 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。
- 判定は、Positive Control NVG1 (PC NVG1) 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 23 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うえで行ってください。尚、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

- 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。
- 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 copies/test^{※5, ※6}

※5：G I / 4 型転写 RNA に対する値を示しています。検出感度は genotype により異なります。

※6：食品、環境等ウイルス量が少ない検体の場合、感度不足による偽陰性の可能性があります。

【使用上又は取扱い上の注意】

- 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、RNA 抽出操作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。尚、電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。
- RNA 分子は非常に不安定なため、取扱いには注意が必要です。特に RNA 分解酵素 (RNase) により容易に分解されてしまいます。RNase は材料である検体、検査器具、試薬、水、さらには検査従事者自身の唾液や汗からも混入する恐れがあるうえ、熱に強くオートクレープ処理でも完全に失活させることはできません。このために極力 RNase の混入を防ぐ必要があり、以下の注意が必要です。
 - RNA 検査を行う検査台や検査器具を他と区別する。
 - 検査に使用するチューブ等は、滅菌された使い捨てのものを使用する。
 - 検査に使用する水は、DEPC 処理水等 RNase フリーの水を用いる。
 - 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの RNase の混入を防ぐ。
- RNA 抽出操作についてはそれぞれの抽出キットの製品説明書に従ってください。
- 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。
- 本製品はノロウイルス G I 検出を目的とした研究検査、自主検査のみにご使用ください。医療、臨床診断の目的では使用できません。
- 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、当社は一切の責任を負いません。
- 外箱に表示の使用期限 (Exp. Date) 内に使用してください。
- ※ 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 [®] ノロウイルス G I 検出試薬キット	48 テスト分	−20℃	1 年間	LMP301

【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)
- 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)
- Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150–154 (2001)
- 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)
- Katayama K., et al.: Virology **299**, 225–239 (2002)
- 福田 伸治, 他：第 52 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・講演要旨集 (2004)
- 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