



LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法

腸管出血性大腸菌検出試薬キット (外因性コントロール入り)

Verotoxin-producing *Escherichia coli* Detection Kit
(Included external control)

本製品は食品・環境分析を目的とした検査にのみ使用してください。
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】

本製品は LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による腸管出血性大腸菌の検出キットで、腸管出血性大腸菌が保持するペロ毒素 (verotoxin ; VT) 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食品又は環境由来検体中の腸管出血性大腸菌を検出することができます。本キットには、外因性コントロール (external control) 試薬が含まれており、腸管出血性大腸菌検出試薬と同時に測定することで、検体由来物質による反応阻害の確認が可能です。

LAMP 法専用のリアルタイム濁度測定装置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、従来の食品微生物検査法¹⁾と比較して簡易かつ短時間に腸管出血性大腸菌を検出することができます^{2), 3)}。

* 尚、本製品は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長より通知された腸管出血性大腸菌の検査法に記載されています⁴⁾。

【内容】

	48 テスト分
1. Extraction Solution for Foods (EX F) ^{*1}	1.8 mL × 3 ^{*2}
2. 1M Tris-HCl:pH7.0 (Tris) ^{*1}	1.0 mL × 1 ^{*2}
3. Reaction Mix. VT (RM VT) ^{*1}	1.0 mL × 1
4. Reaction Mix. eCT (RM eCT) ^{*1, 3}	1.0 mL × 1
5. <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{*1}	60 μL × 2
6. Control DNA VT (Cont VT) ^{*1}	0.1 mL × 1
7. Positive Control eCT (PC eCT) ^{*1, 4}	0.18 mL × 1

*1 : () 内は試薬チューブに記載されている表示です。

*2 : 通知⁴⁾に記載の DNA 抽出法の詳細な操作方法については Eiken GENOME SITE (URL ; <http://www.loopamp.eiken.co.jp/products/colon2/index.html>) をご参照ください。

*3 : Reaction Mix. eCT (RM eCT) は赤色に着色されています。

*4 : Positive Control eCT (PC eCT) は黄色に着色されています。

【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。

LAMP 法は、① 等温で遺伝子増幅反応が進行する^{5), 6)}、② 6 領域を認識する 4 種類の Primer 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^{7), 8)}、等の特徴を有する遺伝子増幅法です。

はじめに検査対象の食品等を増菌培養し、Positive Control eCT (PC eCT) を添加した抽出試薬にてアルカリ熱抽出した DNA 溶液をサンプル溶液とします。このサンプル溶液と Reaction Mix. VT (RM VT)、*Bst* DNA Polymerase を混合してインキュベートすると、Primer で認識されるペロ毒素 (verotoxin ; VT) 遺伝子配列が存在した場合に限り、増幅反応が進行します。更に、サンプル溶液と Reaction Mix. eCT (RM eCT)、*Bst* DNA Polymerase を混合してインキュベートすると、抽出試薬中の鑄型が回収され、サンプル溶液の阻害が起こっていない場合に限り外因性コントロールの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ます。外因性コントロールの増幅でサンプル由来の阻害の有無を確認した上で、腸管出血性大腸菌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。

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・試料等 (本製品に含まれていませんので、別途用意してください。)

- 1) 培地 (増菌用)
- 2) 抽出試薬調製用減菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- 3) 検体前処理用減菌チューブ (0.5 mL)
- 4) 高速遠心機
- 5) ヒートブロック (100°C で使用)
- 6) マスターミックス調製用減菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- 7) マイクロピペット
- 8) フィルター付きピペットチップ (DNase, RNase フリー)
- 9) Loopamp 反応チューブ (栄研化学株式会社別売品)
- 10) 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 11) 氷 (クラッシュアイス) 及びアイスボックス
- 12) リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用)

- 13) 微量簡易遠心機
- 14) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- 15) ボルテックスミキサー

2. 増菌培養液の調製

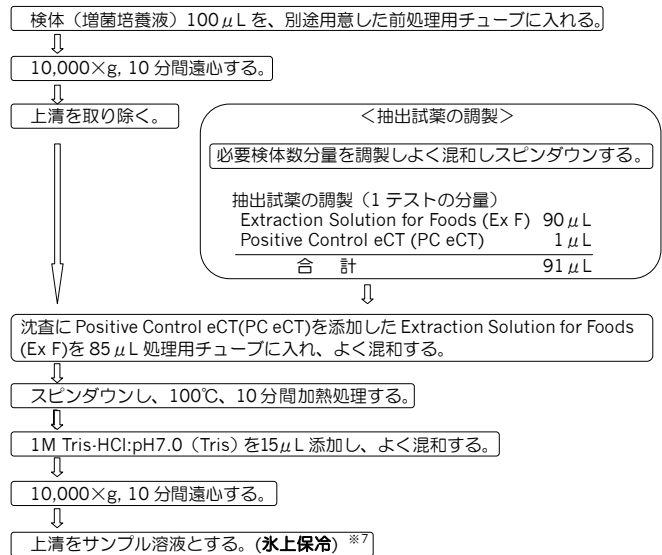
食品中の腸管出血性大腸菌検査を目的とした増菌培養液を検体とする場合。

食品 25g + mEC 225 mL → ストマッカー処理 →
(42°C、20~24 時間) → 増菌培養液^{*5}

*5 : 増菌培養液は、冷蔵にて保存し 24 時間以内に抽出・測定してください。

3. 操作方法

< 検体の前処理 ; DNA 抽出液の調製^{*6} > (氷上操作)

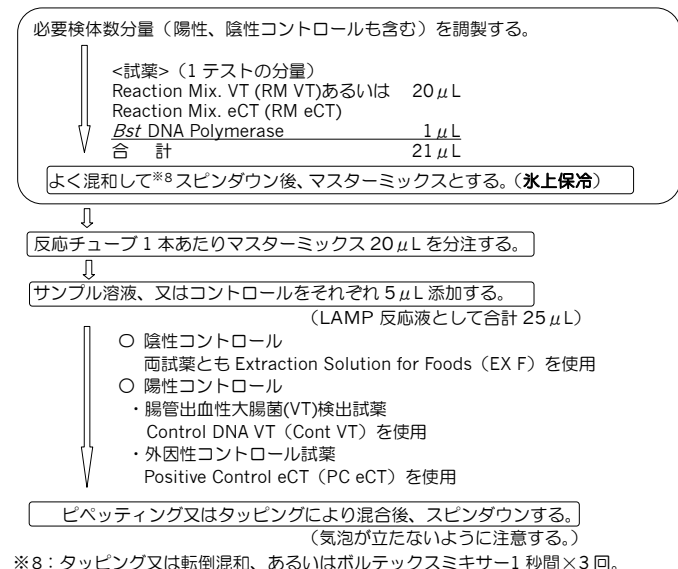


*6 : 通知⁴⁾に記載の DNA 抽出法については、Eiken GENOME SITE (URL ; <http://www.loopamp.eiken.co.jp/products/colon2/index.html>) をご参照ください。Extraction Solution for Foods (EX F) の代わりに 50mM NaOH を使用できます。

*7 : 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。なお、0~4°C で保存する場合は 4 時間以内に使用してください。長期に保存する場合は -80°C 以下に保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。

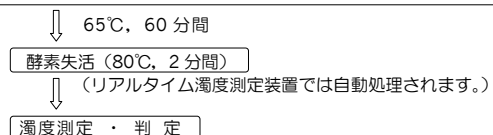
< 反応溶液の調製 > (氷上操作)

-20°C 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。各試薬は、チューブを軽く叩いて混合する (タッピング) 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、スピンドウしてからご使用ください。



< LAMP 反応 >

リアルタイム濁度測定装置^{*9}の反応ブロックにセットして反応をスタートさせる。



*9 : 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。

4. 判定

- 1) 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：Control DNA VT (Cont VT)、Positive Control eCT (PC eCT) 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、反応溶液の調製から再検査を実施してください。(図 1)
- 2) 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かった場合を「陰性」と判定します。
- 3) 腸管出血性大腸菌 (VT) の検出結果が「陽性」と判定された場合は「VT 遺伝子陽性」と判定します。腸管出血性大腸菌 (VT) の検出結果が「陰性」と判定された場合には判定結果表 (表 1) に従って、外因性コントロール (eCT) の検出結果と併せて判定します。
- 4) 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：Control DNA VT (Cont VT)、Positive Control eCT (PC eCT) と異なる場合があります。
- 5) 酵素失活処理 (80℃, 2 分間) (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。

表 1: 判定結果表

		外因性コントロール (eCT)	
		陽性	陰性
腸管出血性大腸菌 (VT)	陽性	VT 遺伝子陽性 ^{*10}	VT 遺伝子陽性 ^{*10}
	陰性	VT 遺伝子陰性	判定不能 ^{*11}

- ※10: 外因性コントロールが陽性/陰性であっても、VT 遺伝子は陽性と判定します。
 ※11: 抽出時あるいは反応時に阻害があった可能性があります。

5. 増幅曲線パターン

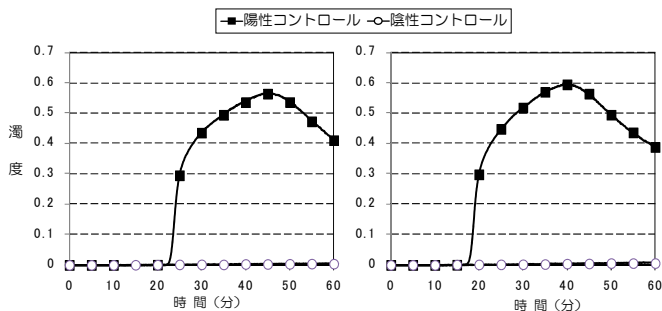


図 1 左. 腸管出血性大腸菌検出試薬コントロールの増幅曲線パターン^{*12}

図 2 右. 外因性コントロール検出試薬コントロールの増幅曲線パターン^{*12}

- ※12: 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。

＜測定にあたっての注意＞

1. サンプルの取扱い
 - 1) レバー類等の食品検査の場合は、その成分によって LAMP 反応に影響を受けますのでご使用できません。
 - 2) 菌培養液を採取する際は、沈殿物の巻き込みにも十分注意して操作してください。
2. 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でコンタミネーションを防ぐ措置をとってください。
3. 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。
4. 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) の注量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。
5. Control DNA VT (Cont VT) および Positive Control eCT (PC eCT) は高コピー数です。Control DNA VT (Cont VT) および Positive Control eCT (PC eCT) から他のサンプル、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。また、反応チューブへの添加は、最後に行ってください。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 Control DNA VT (Cont VT) および Positive Control eCT (PC eCT) は本説明書に記載の操作方法以外での使用 (希釈や検体等への添加等) は、絶対に行わないでください。
6. *Bst* DNA Polymerase は失活するおそれがありますので、マスターミックス調製の際には激しく攪拌しないでください。ホルテックスミキサーで攪拌を行う場合は、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。

7. 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。
8. 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。特に反応後の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。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。
9. 増幅産物を用いての電気泳動等の操作は避けてください。

【性能】

検出限界: 60 CFU (Colony Forming Unit) / test

【取扱い上 (危険防止) の注意】

1. 本製品は食品・環境分析を目的とした検査にのみご使用ください。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. 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策を実施してください⁹⁾。
3. ヒートブロックを使用する際には、十分に注意してください。

【使用上の注意】

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、試薬の劣化はほとんど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. 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。
3. 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。
4. 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。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。
5. 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紫外線照射しないでください。紫外線照射による変色・変質等で誤った結果をもたらす場合があります。
6. 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。
7. 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。
8. 本製品は使用期限内に使用してください。
9. キット内の試薬は十分な性能が得られるように組み合わせられているので、製造番号の異なる試薬を組み合わせないでください。
10. 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。
11. 本製品は従来の腸管出血性大腸菌検査法の培養法とは異なり遺伝子検出法です。腸管出血性大腸菌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。
12. 本製品による判定結果が培養法と異なる場合があります。

【廃棄上の注意】

1. 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。**
2. 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。
3. 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 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (外因性コントロール入り)	-20℃	1 年間	48 テスト分	LMP681

【主要文献】

- 1) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針微生物編, 日本食品衛生協会, 東京, 2004.
- 2) 根本 二郎, 他: 第 23 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 40, 2002.
- 3) Hara-Kudo Y., et al., : J. Med. Microbiol., 56 (3) : 398-406, 2007.
- * 4) 「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長.
- 5) Nagomi T., et al., : Nucleic Acids Research, 28 (12) : e63, 2000.
- 6) Nagamine K., et al., : Clin. Chem., 47 (9) : 1742-1743, 2001.
- 7) Mori Y., et al., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 289 (1) : 150-154, 2001.
- 8) Tomita N., et al., : Nat Protoc., 3 (5) : 877-882, 2008.
- 9) 日本細菌学会バイオセーフティー委員会: 日本細菌学雑誌, 54 (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 (EKN)**
 栃木県下都賀郡野木町野木 1 4 3 番地