



ベロ毒素(VT)タイピング試薬キット

【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 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 増幅産物量が大きく、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 法による腸管出血性大腸菌の保持するベロ毒素(verotoxin;以下 VT) 遺伝子 1型(VT1)及び2型(VT2)をタイピングするためのキットで、腸管出血性大腸菌が保持するVT1型及び2型の核酸配列をそれぞれ特異的に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VTをタイピング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、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^{6), 7)}と比較して簡易かつ短時間にVTのタイピングすることができます⁸⁾。

【キット内容】

	24テスト分
(1) Extraction Solution for Foods (EX F) ^{*1}	1.8 mL × 1 tube
(2) Reaction Mix. VT1 (RM V1) ^{*1}	0.5 mL × 1 tube
(3) Reaction Mix. VT2 (RM V2) ^{*1}	0.5 mL × 1 tube
(4) <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{*1}	60 μL × 1 tube
(5) Control DNA VT1 (Cont V1) ^{*1}	0.1 mL × 1 tube
(6) Control DNA VT2 (Cont V2) ^{*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】

食品微生物検査で腸管出血性大腸菌と疑われた菌株の菌希釈液を検体とした VT1、VT2 のタイピング。

【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から分離培養した菌株の DNA をアルカリ熱抽出し、サンプル溶液とします。このサンプル溶液と Reaction Mix. VT1(RM V1)及び *Bst* DNA Polymerase を、また、サンプル溶液と Reaction Mix. VT2 (RM V2) 及び *Bst* DNA Polymerase をそれぞれ混合しインキュベートすると、Primer で認識される VT1 又は VT2 に特異的な遺伝子配列が存在した場合に限り、*Bst* DNA Polymerase の働きでそれぞれのサンプル溶液中の DNA から増幅反応が進行します。核酸増幅の検出は、それぞれの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、VT をタイピングします。

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。

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。)

- 蒸留水
- 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)
- 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
- 検体前処理用減菌チューブ (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 (適応機種 LA-320C, RT-160C, LA-200F)
- 微量簡易遠心機
- ホルテックスミキサー

2. サンプル溶液の調製

食品微生物検査で腸管出血性大腸菌と疑われた菌株の菌希釈液 (3 × 10⁶ CFU/mL) を調製し、検体とする場合。

被検菌株の培養液あるいは寒天培地上のコロニー →

蒸留水に懸濁 (McFarland No.1⁹⁾) → 100倍希釈 → 菌希釈液 (3 × 10⁶ CFU/mL)

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減菌チューブを別途用意し、Extraction Solution for Foods (EX F) 50 μL を分注します。
- (2) 検体 (菌希釈液) 50 μL を添加します。
- (3) キャップを閉め、転倒混和後スピンドダウンし、95℃、5分間加熱処理します。微量簡易遠心機で室温、1分間遠心した後、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冻し、解冻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減菌チューブに1テストあたり Reaction Mix. VT1 (RM V1) 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も含む。) 分注し、これを「VT1用マスターミックス」とします。同様に「VT2用マスターミックス」を調製します。

- (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。) 又は、転倒混和、あるいはホ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、微量簡易遠心機に数秒かけて (以下、スピンドダウンと呼ぶ。) これをマスターミックスとします。ホ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) 「VT1用」及び「VT2用」マスターミックスをそれぞれ別の Loopamp 反応チューブに20 μLずつ分注します。
- (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、ピベティング又はキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドダウンします。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「VT1用」に Control DNA VT1 (Cont V1) 5 μL を、「VT2用」に Control DNA VT2 (Cont V2) 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 (適応機種 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速やかに測定を開始します。
- (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; Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) 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; Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) 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

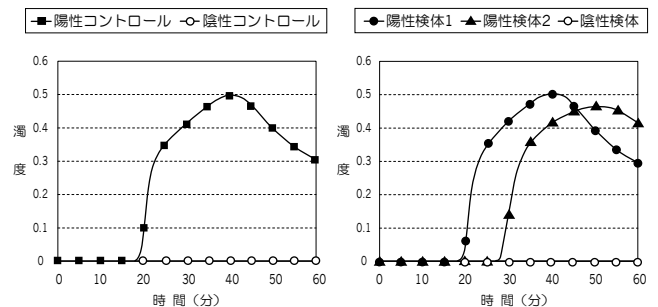


図1. コントロールの増幅曲線パターン

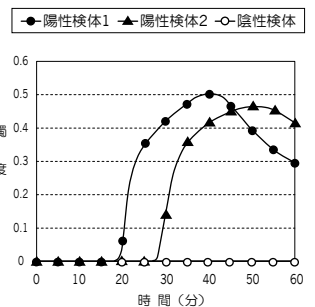


図2. 検体の増幅曲線パターン*2

*2: 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

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。

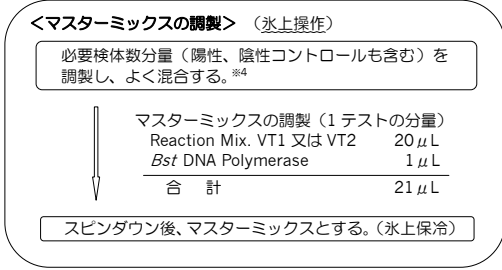
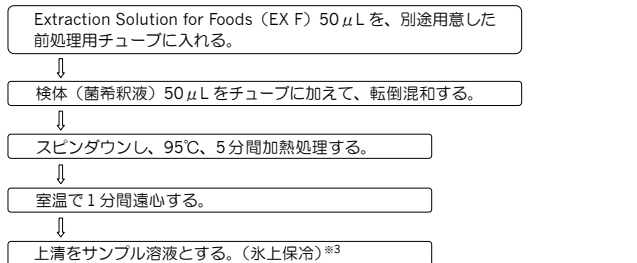
2. 試薬の取扱い

- (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) 試薬の解冻は室温で行い、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、一旦スピンドダ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ダ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。

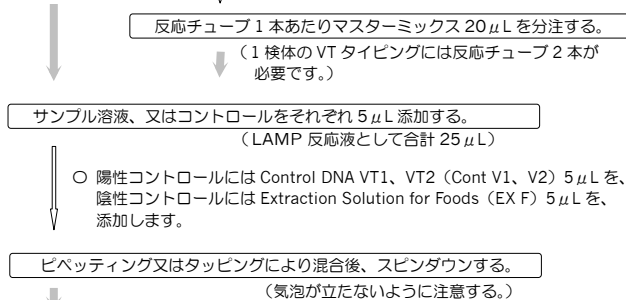
- 4) Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) は高コピー数です。Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) から他のサンプル、試薬へのコンタミネーションを避けるため、取扱う際にはキャップを開ける前に必ずチューブをスピンドウンし、キャップを開けている時間も必要最小限となるようにしてください。また、反応チューブへの添加は、最後に行ってください。このとき、反応チューブのキャップ（陽性コントロール用反応チューブ以外）はすべて閉まっていることを確認してください。さらに、検査環境へのコンタミネーションを避けるため Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) は本説明書に記載の操作方法以外での使用（希釈や検体などへの添加等）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

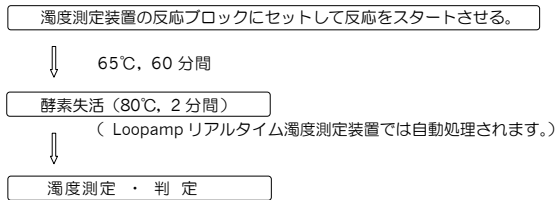
< 検体の前処理；DNA 抽出液の調製 > (氷上操作)



< 操作法 > (氷上操作)



< LAMP 反応 >



※3：サンプル溶液は 0～4℃で 4 時間まで保存可能です。
 ※4：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。

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・ヒビ等がな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（適応機種 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、Control DNA VT1 (Cont V1)、Control DNA VT2 (Cont V2) 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 20 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

【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. レバー類の食品検査の場合は、その成分によって LAMP 反応が影響を受けますのでご使用になれません。
3. 増菌用培地などの取扱いについてはそれぞれの製品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。
4. 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。
5. 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。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。
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。
7. 本キットは従来の食品微生物検査法の培養法とは異なり遺伝子検出法ですので、自主検査の一環としてご使用ください。
8. 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。
9. 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。
10. 外箱に表示の使用期限 (Exp.Date) 内に使用してください。
- * 11. 試薬チューブは PP、キットケースは紙を主な材質としています。廃棄の際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® パロ毒素 (VT) タイピング試薬キット	24 テスト分	-20℃	1 年間	LMP641

【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) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課監修：食品衛生検査指針微生物編, 日本食品衛生協会, 東京 (1990), 追補 I (1993), 追補 II (1996)
- 7) 平成 9 年 7 月 4 日通知, 衛食第 207 号, 衛乳第 199 号「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」
- 8) 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 p40 (2002)
- 9) Manual of Clinical Microbiology, fourth edition, p1095, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1985)
- 10) 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**, 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