

ミネラルオイル重層法による検体の前処理および採取操作手順

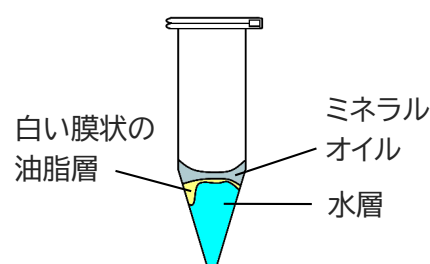
生クリームを検体とする場合に、増幅カーブのベースラインが下降し増幅の有無を正しく判定できないことがあります。これは生クリーム中の成分がLAMP反応に影響を与えていると考えられます。

このような現象が見られる場合、栄研化学株式会社が開発したミネラルオイル重層法による抽出を行うことで、判定しやすくなります。

前処理

- 0.5 mLまたは1.5 mLのチューブに、ミネラルオイル*50 μ L、Extraction Solution for Foods (EX F) を80 μ Lずつ分注する。
- 検体(前増菌培養液)10 μ Lを添加する。
- キャップを閉め、転倒混和後、スピンドウンし、95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱処理する。
- スピンドウン後、1M Trisを10 μ Lを添加する。
- 微量簡易遠心機で、室温にて1分間遠心した後、氷上に移す。
- このときチューブ内の液体は、上からミネラルオイル層(■)、白い膜状の油脂層(■)、水層(■)の3層に分かれている。検体として用いるのは最下層の水層部分(図1)。

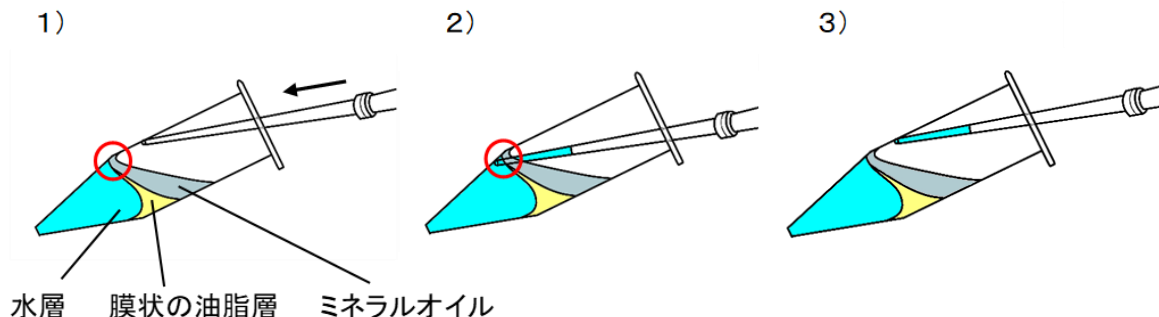
図1



採取

- チューブを持ち、静かに傾けて5秒程度待つと膜状の油脂層が下がり、ミネラルオイル層と水層が直に接する箇所が上部に生じる(○印部分)。そこから、チップ先端をチューブ内壁伝いにゆっくりと挿入する(図2-1)。
- チップ先端が水層に到達したら、チップ先端部に膜状油脂層の巻き込みがないことを確認した上で、水層の液を5 μ Lゆっくりと吸い上げる(図2-2)。
- チップ先端をチューブ内壁伝いにゆっくりと引き上げる(図2-3)。チップ外壁に油脂の付着がないことを確認してマスターミックスの入ったチューブに添加する。

図2



注意) 膜状油脂層は壊れやすく、長時間の放置や、同じチップを何度も出し入れすると油脂層と水層が混ざり合ってしまう。従って、以下の点に注意する必要がある。

- 遠心から水層の液を採取するまでの時間をできるだけ短くする。
- 採取時は1回ごとにチップを取り替える(3~4回程度まで採取可能)。

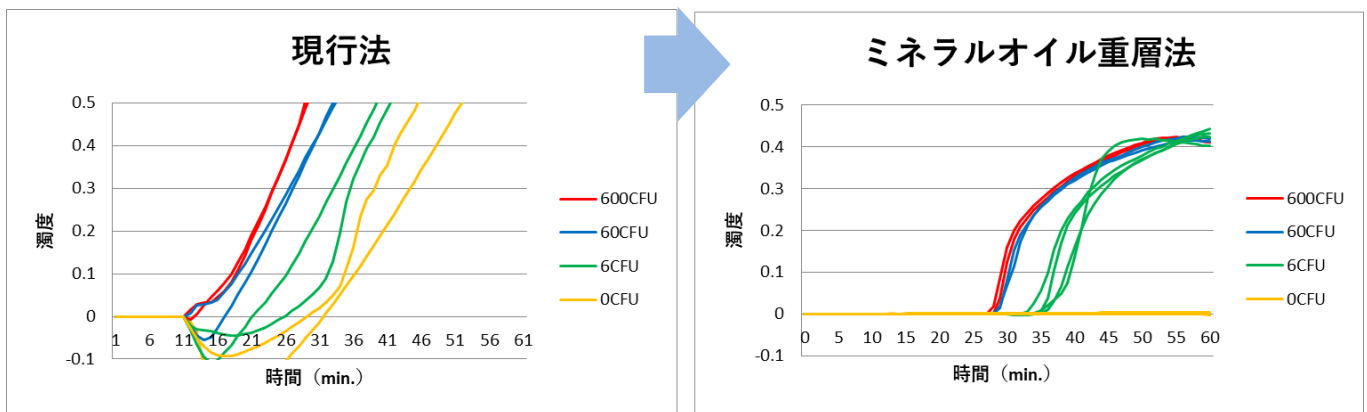
*使用するミネラルオイルは分子生物学用の製品を使用すること。

生クリームを検体とする場合のミネラルオイル重層法の効果

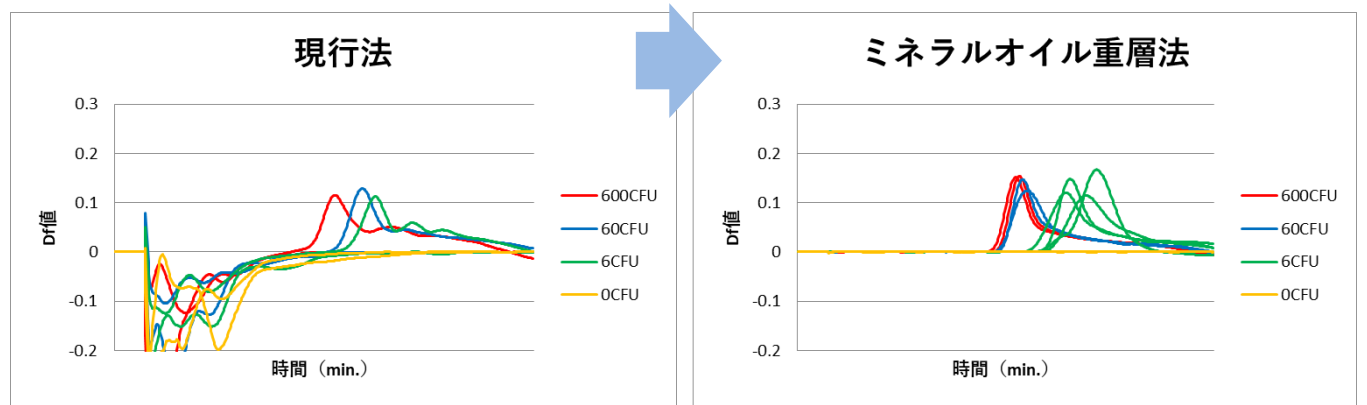
検出例

Salmonella enterica 培養菌

増幅グラフ



微分グラフ



(社内データ：LoopampEXIAにて測定)

抽出方法をミネラルオイル重層法に変更することで、6 CFU/testまで生クリームの影響を受けずに増幅曲線を確認することができた。

※6 CFU/testは参考データとなります

各製品の使用上又は取扱い上の注意については、使用説明書をご参照ください。