

LAMP 法用プライマーセット *L. londiniensis*

製品コード: NE2011

【はじめにお読みください】

このたびは、LAMP 法用プライマーセット *L. londiniensis* をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。このマニュアルをよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用してください。

使用上の注意

1. 本品は、LAMP 法を用いて *Legionella londiniensis* を検出するための試験研究用試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。
2. 試薬は -20°C の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 カ月以内に使用してください。また、試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 本品を使用する際は、このマニュアルの記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
4. 本品による判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。製品性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
5. 検査環境の汚染を防ぐため、LAMP 反応後の増幅産物（サンプルおよび **Positive Control Llon**）の電気泳動等の操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。
6. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP 法を用いた *Legionella londiniensis* 検出用プライマーの製造および販売を許諾されています。

I 製品説明

【LAMP 法用プライマーセット *L. londiniensis* の概要】

本品は Loopamp DNA 増幅試薬キットと組み合わせて *Legionella londiniensis* を LAMP 法により検出するためのプライマーセットです。

LAMP 法はインフルエンザウイルス感染の診断等に用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。

本品は *Legionella londiniensis* を高感度、迅速、簡便に検出する試薬であり、本品に含まれるプライマーセットは *Legionella londiniensis* の遺伝子領域内に LAMP 法用のプライマーを設計し開発されています。

また、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、DNA増幅反応から検出までを閉鎖系（同一反応チューブ内）で行うため、検査のコンタミネーションリスクがなく、短時間で *Legionella londiniensis* を検出することが可能です。

【*Legionella londiniensis* とその検出】

遺伝子検査を用いたレジオネラ属菌の迅速検査法（以下迅速検査法）は培養試験法に比べて短時間で結果が得られることから期待が寄せられていますが、迅速検査法と培養試験法の結果との不一致が生じ、判定が困難となる場合があります。特に培養試験法で陽性、迅速検査法で陰性となった場合、理由として阻害による偽陰性や迅速検査法で検出できない菌種の存在が予想されます。特に既存の市販キットを用いた迅速検査法では *Legionella londiniensis* は検出されないことが明らかになっています。

【LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。

LAMP法の原理の詳細については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社

Eiken GENOME SITE; <http://loopamp.eiken.co.jp/>

【本品に含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本品に含まれるプライマーは、全て「リライアブル & トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル & トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティ完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアル ホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; <http://www.nippongenematerial.com/>

II 製品内容

【製品内容】

LAMP 法用プライマーセット *L. londiniensis*
48 テスト用（製品コード：NE2011）

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
Primer Mix Llon (PM Llon)	赤色	125 μ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Positive Control Llon (PC Llon)	灰色	100 μ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
マニュアル（本紙）	1 部		

取り扱い上の注意

- ◆ 試薬は-20 $^{\circ}$ C で暗所にて保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。
- ◆ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度-20 $^{\circ}$ C で保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。
- ◆ Positive Control Llon には、*Legionella londiniensis* ゲノム DNA に特徴的な配列が含まれています。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触しないようご注意ください。
- ◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

III 必要な器具、機器、試薬

- Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学株式会社）
- Loopamp 反応チューブ（栄研化学株式会社）
- マイクロピペット（0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L）
- フィルター付マイクロチップ（滅菌済）
- TE Buffer (pH 8.0; 株式会社ニッポンジーン等から市販されている)
- 0.2 mL チューブ
- マスターミックス調製用チューブ（1.5 mL あるいは 2.0 mL）
- ヒートブロック
- LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置（栄研化学株式会社）
- 氷（クラッシュアイス）
- ピンセット（核酸の汚染がないもの）
- チューブラック
- アルミラック（あるいはプレートラック）
- ボルテックスミキサー
- 簡易遠心機（1.5 mL チューブ用および 0.2 mL チューブ、Loopamp 反応チューブ用）

IV 使用方法

【検査を行う前の準備および注意】

コントロールの準備

■ コントロール

本品には、Positive Control Llon が添付されています。検査の成否を確認するためには、陽性コントロールおよび陰性コントロールの作製が重要となります。

Positive Control Llon 5.0 μ L を鑄型として 25.0 μ L (1 テスト分) の容量で DNA 増幅反応を行い、65°C、60 分間で反応が起動することを確認しています。

器具、機器の準備

■ LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置

操作の詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ (滅菌済)	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、 <u>連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性があります</u> ので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、検査環境に Positive Control Llon や LAMP 反応後の増幅産物等、鑄型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、LAMP 反応後の増幅産物 (サンプルおよび Positive Control Llon) の電気泳動等による操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■ 作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、マスターミックスは試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では Positive Control Llon および LAMP 法において鑄型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いを行わないでください。

マスターミックスへのサンプルおよび Positive Control Llon の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

<詳細な核酸除去方法>

- i) 使い捨て手袋を装着します。
- ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm (1%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
- iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭きます。
- iv) 余分な塩素成分は、核酸の混入がない 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。

【プロトコル】

1. サンプルの調製

1-1. サンプルの希釈

寒天平板培地に形成された菌のコロニー（検体）を用意します。次に、コロニーを TE Buffer に懸濁し、濁度標準液を用いた比濁法等により懸濁液の菌数を算定します。

算定結果に基づいて懸濁液を TE Buffer を用いて希釈し、100 CFU/5 μ L、10 CFU/5 μ L のサンプル溶液をそれぞれ調製します。

1-2. サンプルの熱処理

前記のサンプル溶液 100 μ L を 0.2 mL チューブに分注し、95°C で 5 分間の熱処理後、氷上に 5 分間静置します。簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンドアウン）、上清をサンプルとします。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

本品 (Primer Mix Llon、Positive Control Llon) と Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2x Reaction Mix と Distilled Water を室温で完全に融解します。ただし、*Bst* DNA Polymerase は -20°C では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出してください。

2-2. 混合とスピンドウン

各試薬をボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合して均一にした後、スピンドウンを行い、試薬を氷上に静置します。

2-3. マスターミックスの作製

マスターミックス調製用チューブ (1.5 mL あるいは 2.0 mL) に下表の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、ボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合した後、スピンドウンを行います。これをマスターミックスとし、氷上に静置します。

試薬	1 テスト分	例) 8+1 テスト分の場合
2x Reaction Mix	12.5 μL	112.5 μL
Primer Mix Llon	2.5 μL	22.5 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL	9.0 μL
Distilled Water	4.0 μL	36.0 μL
マスターミックス合計	20.0 μL	180.0 μL

2-4. マスターミックスの分注

Loopamp 反応チューブを袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、マスターミックスを 20.0 μL ずつ分注します (Loopamp 反応チューブを袋から取り出す際には、核酸の汚染がないピンセットを準備し、使用してください)。

2-5. サンプルの添加

まず、陰性コントロール用のチューブに Distilled Water を 5.0 μL 添加してキャップを閉じます。次に、サンプル反應用のチューブに 1-2. で調製したサンプルを 5.0 μL 添加してキャップを閉じます。最後に、陽性コントロール用のチューブに Positive Control Llon を 5.0 μL 添加してキャップを閉じます。

2-6. 検査反応

検査反応の前にサンプルとマスターミックスをよく混合します。Loopamp 反応チューブの全てのキャップを閉じた状態で タッピング (チューブの腹を指で数回叩く) により混合した後、スピンドウンを行い、LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置にセットして 65°C で 60 分間の測定を開始します。

ピペッティングにより混合する場合は、2-5. のサンプル添加ごとに行ってください。

重要

混合の際は気泡が発生しないように注意してください。ボルテックスミキサーによる攪拌は行わないでください。

2-7. *Bst* DNA Polymerase の失活

測定終了後には、 80°C で 5 分間あるいは 95°C で 2 分間の熱処理により反応を停止し、判定を行います。

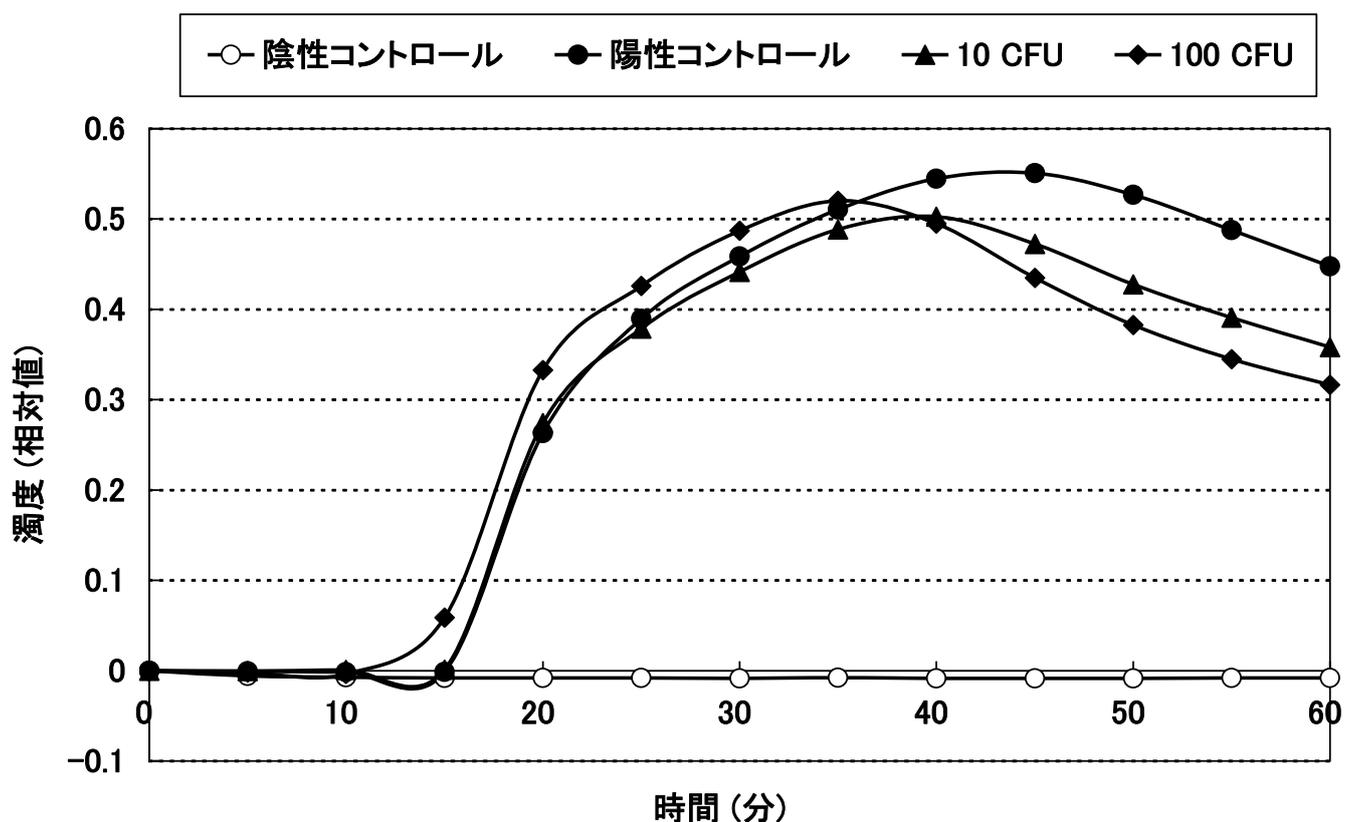
3. 判定

3-1. 検査の成否の判定

最初に、陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

3-2. サンプルの判定

コントロールの判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロールと同様に濁度上昇の有無を確認してください。陽性のサンプルに関しては Tt 値を確認してください。濁度上昇が認められる場合、サンプル中に *Legionella londiniensis* が存在する可能性があります。



図：本品を用いたリアルタイム濁度測定の結果*

* 本品を用いた場合の反応起動時間と初期鑄型量の間に関係はありません。

V トラブルシューティング

本品の使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロールが正確な結果を示さない	<p>A. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 陰性コントロールで増幅が起こっている場合、鑄型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。</p> <p>B. 反応温度、操作手順に誤りがある。 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。</p>
試薬が不足する	<p>A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。 使用前にスピンドウンを行ってください。</p> <p>B. 保存中に試薬が蒸発している。 使用後はキャップを完全に閉じてください。</p>

VI 参考文献・資料

- 倉 文明、遠藤 卓郎、前川 純子 (2008) 専用試薬による *Legionella londiniensis* の迅速検査 厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 健康安全・危機管理対策総合研究「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度分担研究報告書, 65
 - Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (12): e63
 - Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358
- ・ 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告無しに変更する場合があります。
 - ・ 本マニュアルの記載内容は2018年5月現在のものです。最新のマニュアルは株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
 - ・ 「Loopamp」は、栄研化学株式会社の登録商標です。
 - ・ 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
 - ・ その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
 - ・ 記載内容の複製、転載を禁止します。

本品に関するお問い合わせ先
株式会社ニッポンジーン
TEL 076-451-6548
URL http://nippongene-analysis.com
お問い合わせは、お電話もしくはWEBフォームより承っております。