

LAMP 法用プライマーセット Measles Virus

製品コード: NE2021

【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 Measles Virus 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 法を用いて麻疹ウイルス (Measles Virus) 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 法反応後の増幅産物 (サンプルおよび Positive Control Measles) 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 法を用いた麻疹ウイルス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。

本製品を用いた測定には LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置を使用します。
LoopampEXIA[®]、LA-320C、RT-160C (栄研化学株式会社) 各装置の測定用パラメータの設定に関しては、株式会社ニッポンジーンまでお電話もしくは WEB フォームよりお問い合わせください。

株式会社ニッポンジーン
TEL 076-451-6548
URL <http://nippongene-analysis.com/>

I 製品説明

【LAMP 法用プライマーセット Measles Virus の概要】

本品は Loopamp RNA 増幅試薬キットと組み合わせて麻疹ウイルス (Measles Virus) 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。

本品では、逆転写酵素を用いて cDNA 合成と DNA 増幅を同一反応チューブ内で行う RT-LAMP 法により麻疹ウイルスゲノム RNA の一部を増幅し、増幅の有無から麻疹ウイルスの存在を判定します。

本品は麻疹ウイルスを高感度、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麻疹ウイルスの遺伝子領域内に 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、cDNA合成からDNA増幅反応、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、短時間で麻疹ウイルスを検出することが可能です。

【麻疹ウイルスとその検出】

麻疹ウイルスの検出においては、RT-PCR 法、ウイルス分離に並行して麻疹ウイルス特異的 IgM 抗体価の測定が用いられています。IgM 抗体価測定においては、数ヶ月以内のワクチン接種による陽性例あるいは発疹出現直後での陰性例が認められています。また、伝染性紅斑（リンゴ病）のパルボウイルス B19 と交差反応が認められ、麻疹ウイルス IgM 抗体が偽陽性を示すことも知られています。

確定検査として RT-PCR 法が実施されており、またウイルス分離の重要性も示唆されています。RT-PCR 法が遺伝子検査法として一般的に使用されていますが、その工程が煩雑かつ時間を要するため、麻疹ウイルスの検出にはより迅速な技術が望まれていました。

【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。また、増幅する対象の遺伝子がRNAである場合には、逆転写酵素を用いることにより、cDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うことが可能です (RT-LAMP法)。

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 Measles Virus
48 テスト用（製品コード：NE2021）

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
Primer Mix Measles (PM Measles)	赤色	125 μ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Positive Control Measles (PC Measles)	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 Measles には、麻疹ウイルスゲノム RNA 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 RNA 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）
- ウイルス RNA 抽出キット
MagExtractorTM - Viral RNA -（東洋紡株式会社）
- 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）
リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA[®]
リアルタイム濁度測定装置 LA-320C
リアルタイム濁度測定装置 RT-160C
- 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 Loopamp 反応チューブ用）
- 滅菌水（RNase-free）

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 Measles 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 Measles 5.0 μ L を鑄型として 25.0 μ L (1 テスト分) の容量で RT-LAMP 法を行い、63°C、40 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 (LoopampEXIA[®]、LA-320C、RT-160C)

操作の詳細は各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、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、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 Measles 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 Measles) 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 Measles** 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 Measles** 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、0.5%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、0.5%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 5,000 ppm (0.5%) 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、5 分間そのまま放置します。
- iv) 5 分間の処理が終了したら塩素成分をペーパータオルで拭き取り、その後、蒸留水等核酸の混入がない水を含ませたペーパータオルで確実に塩素成分を除去します。

【プロトコル】

1. RNA サンプルの調製

1-1. RNA サンプルの調製

MagExtractor™ - *Viral RNA* - (東洋紡株式会社) を使用して咽頭拭い液、血液またはリンパ球、尿、分離株、ワクチン株よりRNAサンプルを調製し、滅菌水 (RNase-free) に溶解してください。

重要

MagExtractor™ - *Viral RNA* - を使用して RNA サンプルを調製する場合、必ず製品の取扱説明書に記載のマニュアル法プロトコルに従ってください。

ただし、RNA の溶離の際に添加する滅菌水 (RNase-free) の液量は 55.0 μ L とされておりますが、本品を使用する場合には液量を 25.0 μ L に変更してください。25.0 μ L より液量が多い場合あるいは少なかった場合、本品の性能を確保できませんのでご注意ください。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

本品 (Primer Mix Measles、Positive Control Measles) と Loopamp RNA 増幅試薬キットの 2x Reaction Mix および Distilled Water を室温で完全に融解します。ただし、Enzyme Mix 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 \times 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 \times 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 Measles	2.5 μL	22.5 μL
Enzyme Mix	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 反应用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 反应用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、サンプル反应用的チューブに 1-1. で調製した RNA 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 Measles 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混合します。Loopamp 反应用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 63°C で 40 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. Enzyme Mix 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。

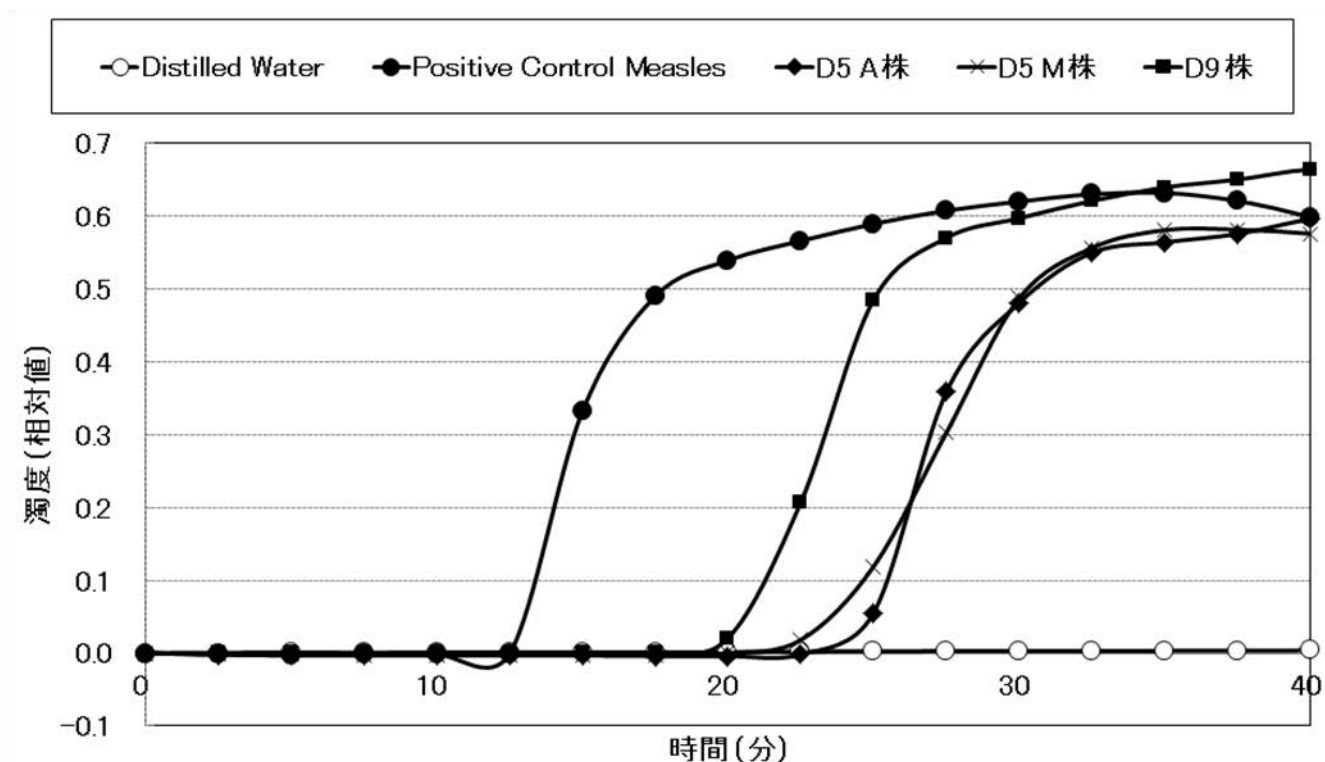
3. 判定

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、サンプル中に麻疹ウイルス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
陰性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇している）	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、0.5%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。 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。
陽性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇しない）	A. Positive Control Measles の添加量が過剰である。 Positive Control Measles の添加量が過剰であるとマスターミックスが希釈され検査反応の効率が低下する場合がありますので、添加量はマニュアルの指示に従ってください。 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。
試薬が不足する	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。 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。

VI 参考文献・資料

1. Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. (2005) A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Med Virol.* **76** (3): 406
2. 中山 哲夫 (2008) 麻疹:現状と新たな展開 *モダンメディア* **54** (3): 87
3. 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
4. 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。