

LAMP 法用プライマーセット ヨーネ菌

製品コード: NE3011

【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 ヨーネ菌をお買い上げ頂き、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 法を用いてヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) 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℃の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヶ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 Map**）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 法を用いたヨーネ菌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 ヨーネ菌の概要】

本品は Loopamp® DNA 増幅試薬キットと組み合わせてヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) 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。

本品はヨーネ菌を高感度、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ヨーネ菌の遺伝子領域内に 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あるいはFluorescent Detection Reagent Mapによる蛍光目視検出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、短時間でヨーネ菌を検出することが可能です。

【ヨーネ菌とその検出】

ヨーネ病はウシなどの反芻（すう）動物に間欠性的の下痢や乳量の低下などを引き起こす慢性感染症であり、家畜法定伝染病に指定されています。

法定検査法のうち、糞便からの分離培養法は信頼性の高い手法とされています。分離培養法において寒天培地に出現したコロニーについては DNA を抽出して PCR 法またはリアルタイム PCR 法により、検出、同定が行われています。

一般的にはヨーネ菌に特徴的な DNA 配列である *IS900* が遺伝子検査に用いられますが、類似菌の *st2333* 株等への交差性が課題とされます。また PCR 法またはリアルタイム PCR 法が高感度であるとして一般的に使用されていますが、前者はその工程が煩雑であり、コンタミネーションの危険性が高く、また後者は高価な機器や時間を要するため、ヨーネ菌の検出にはより簡便、迅速で精度の高い手法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。

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/>

本キットに含まれている LAMP プライマーセットおよびこの LAMP プライマーセットを用いた LAMP 法によるヨーネ菌の検出技術は、地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 農業研究本部 畜産試験場と栄研化学株式会社等による共同研究によって開発されました。

また、本成果の一部は、国立研究開発法人 科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム フィージビリティスタディ ステージ探索タイプ (JST A-step 【FS】)「現場で使える牛ヨーネ病の目視判定法の開発」の支援を受けて行われました。

II 製品内容

【製品内容】

LAMP 法用プライマーセット ヨーネ菌
48 テスト用（製品コード：NE3011）

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
Primer Mix Map (PM Map)	赤色	125 μ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Fluorescent Detection Reagent Map (FD Map)	紫色	50 μ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Positive Control Map (PC Map)	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 Map** には、ヨーネ菌ゲノム 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）
本品には、その他のチューブは使用できません。
- 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）
- UV 照射装置
Fluorescent Detection Reagent Map による蛍光目視検出の際に使用します。
240-260 nm あるいは 350-370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。
- 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）
- ヒートブロックあるいはサーマルサイクラー（インキュベーター）
細菌コロニーからの DNA 調製および **Fluorescent Detection Reagent Map** による蛍光目視検出の際に使用します。
温度精度が $\pm 0.5^{\circ}$ C 以内で、ホットボンネット（カバー部加温機構）を搭載したものを準備してください。
- インキュベーター
- 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 Map** 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 Map 5.0 μL を鑄型として 25.0 μL (1 テスト分) の容量で LAMP 法を行い、66°C、45 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 Map** 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 Map**) 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 Map** および LAMP 法において鑄型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いには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 Map** 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 >

- 使い捨て手袋を装着します。
- 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。
- 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。
- 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. DNA サンプルの調製

1-1. DNA サンプルの調製

あらかじめ、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所が公開しているヨ
ーネ病検査マニュアルに従い、細菌コロニーからDNAを調製してください。

https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH_yone_kensahou_160401.pdf

重要

検査環境の汚染を避けるため DNA 調製は本品を使用する区域とは区別して行ってください。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

本品 (Primer Mix Map、Positive Control Map) と Loopamp® DNA 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、*Bst* DNA Polymerase および Fluorescent Detection Reagent Map は-20℃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。

■ リアルタイム濁度測定の場合

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 Map	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

■ 蛍光目視検出の場合

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 Map	2.5 µL	22.5 µL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 µL	9.0 µL
Fluorescent Detection Reagent Map	1.0 µL	9.0 µL
Distilled Water	3.0 µL	27.0 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、サンプル反応用のチューブに 1-1.で調製した DNA 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 Map 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あるいはインキュベーターにセットして66°Cで45分間の測定を開始します。

ピペ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分間の熱処理により反応を停止し、判定を行います。

3. 判定

■ リアルタイム濁度測定の場合

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、サンプル中にヨーネ菌が存在する可能性があります。

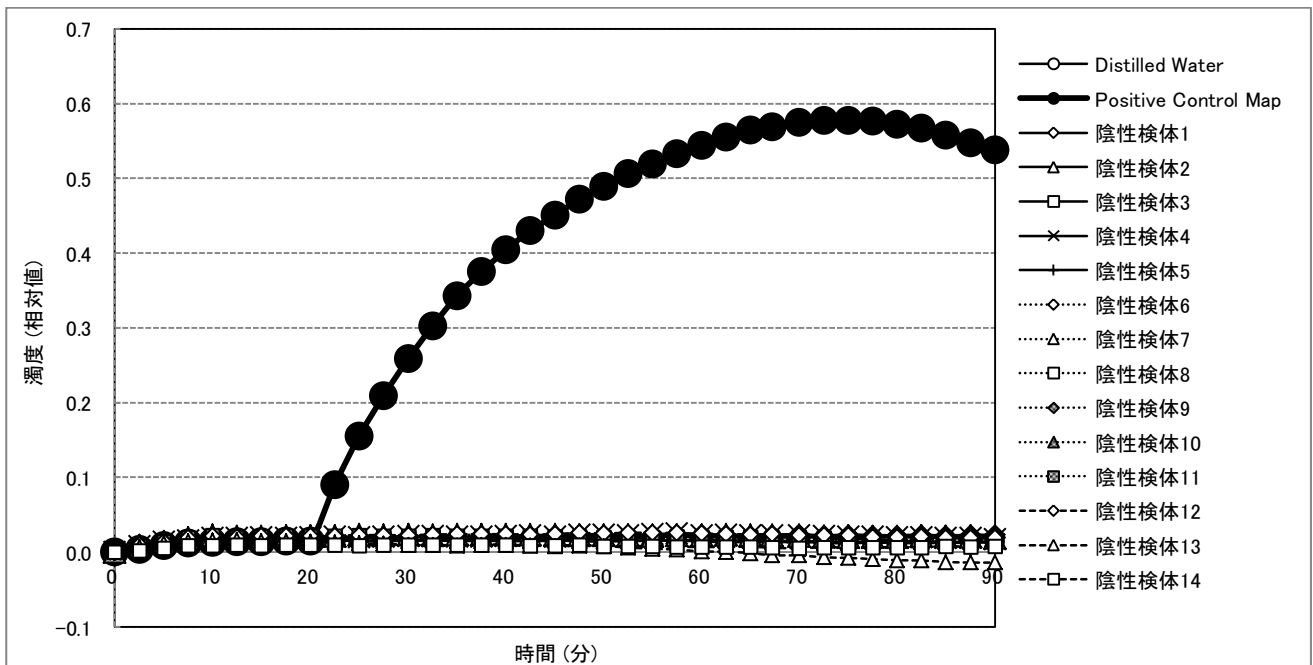


図 1: 本品を用いたリアルタイム濁度測定の結果（陰性検体との交差性検証）*

* 本品を用いた場合の反応起動時間と初期鑄型量との間に相関はありません。

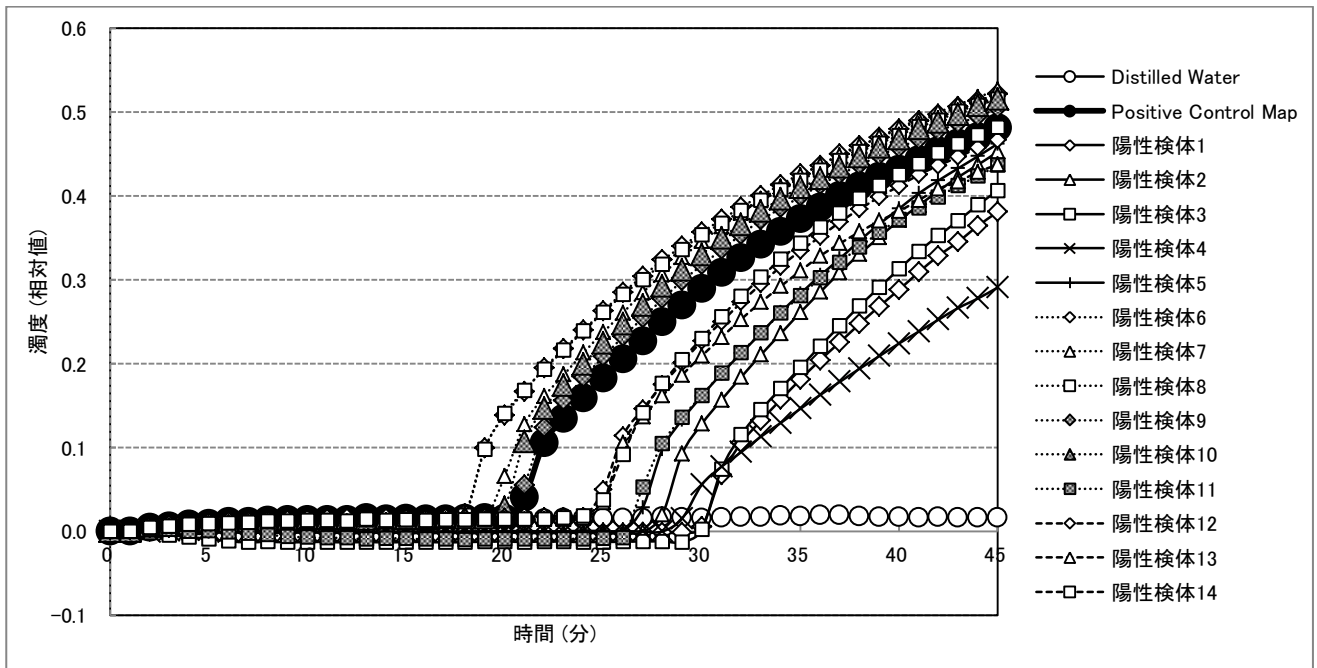


図 2: 本品を用いたリアルタイム濁度測定の結果 (陽性検体の検出)*
 * 本品を用いた場合の反応起動時間と初期鑄型量に相関はありません。

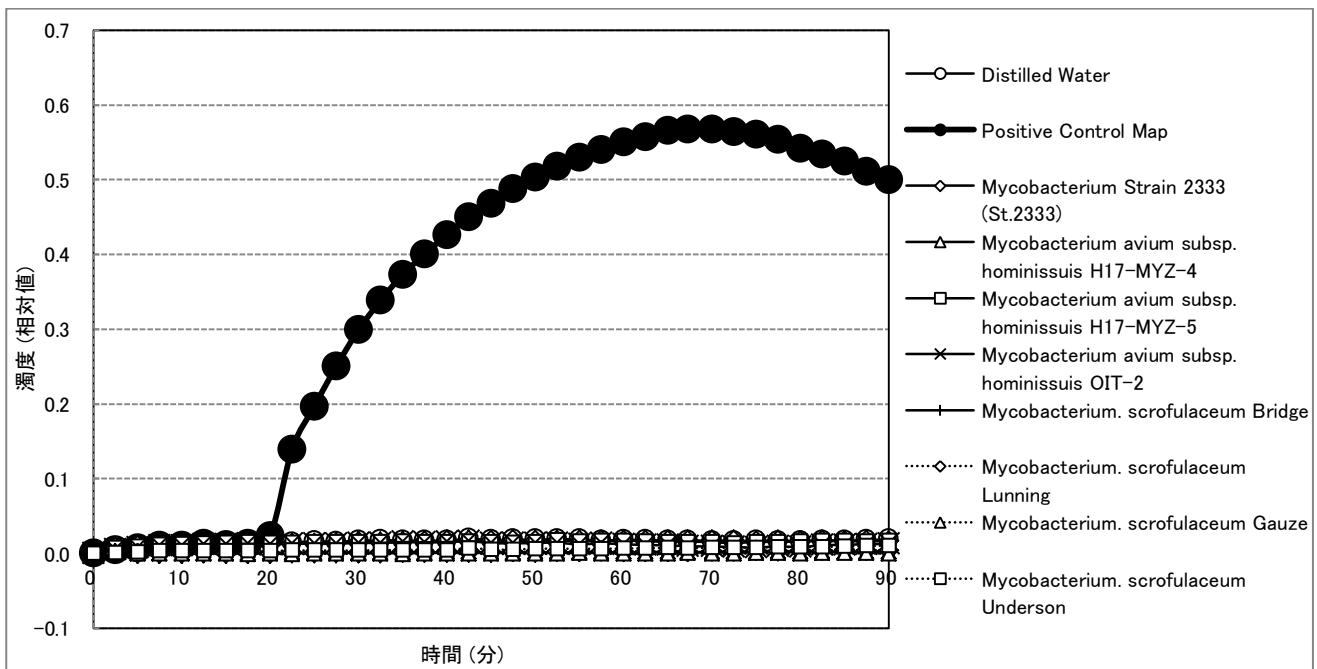


図 3: 本品を用いたリアルタイム濁度測定の結果 (類似菌株との交差性検証)*
 * 本品を用いた場合の反応起動時間と初期鑄型量に相関はありません。

■ 蛍光目視検出の場合

3-1. 検査の成否の判定

最初に、陽性コントロール検査溶液で蛍光が発色し、陰性コントロール検査溶液で蛍光が発色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検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にヨーネ菌が存在する可能性があります。

重要

本品では、検査結果の判定は 45 分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

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、蛍光が発色している）	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、蛍光が発色しない）	A. Positive Control Map の添加量が過剰である。 Positive Control Map 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。 使用前にスピンドダ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. 内藤 学、陰山 聡一、藤井 貴志、福田 茂夫、平山 博樹、南橋 昭、鈴木 渉 (2012) 牛糞便培養により分離されたコロニーの LAMP 法によるヨーネ菌同定 家畜感染症学会誌 1 (3): 133
2. 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
3. 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。