



## 腸管出血性大腸菌 O 抗原タイピングプライマーセット

Verotoxin-producing *Escherichia coli* O-antigen Typing Primer Set

製品コード: PM0007

### 【はじめにお読みください】

このたびは、腸管出血性大腸菌 O 抗原タイピングプライマーセットをお買い上げいただき、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 法を用いて腸管出血性大腸菌の O 抗原遺伝子型を識別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. 本品では、ベロ毒素産生性の有無は判定できません。ベロ毒素産生性については、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット、Loopamp ベロ毒素 (VT) タイピング試薬キット (栄研化学株式会社) 等により確認してください。
3. 試薬は $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内に遮光して保存し、使用期限 (Exp.) 内に使用してください。また、必要以上の試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
4. 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、製造元および販売元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. 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、製造元および販売元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。
6. 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 O157) 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。
7. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。
8. 腸管出血性大腸菌 O 抗原タイピングプライマーセットは、栄研化学株式会社より販売しています。また、本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。ご購入および LoopampEXIA<sup>®</sup>、LA-320C、RT-160C、LA-200 (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、栄研化学株式会社までお問い合わせください。

### 【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



## I 製品説明

---

### 【腸管出血性大腸菌 O 抗原タイピングプライマーセットの概要】

本品は Loopamp DNA 増幅試薬キットと組み合わせて腸管出血性大腸菌の O 抗原遺伝子型を LAMP 法により識別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。

本品に含まれるプライマーセットは O26、O103、O111、O121、O145、O157 の各腸管出血性大腸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。

Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学株式会社）により腸管出血性大腸菌の存在が疑われた検体に対し、O26、O103、O111、O121、O145、O157 のいずれの O 抗原遺伝子型に該当するかを識別できます。

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 O 抗原の遺伝子型を識別することが可能です。

### 【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.nippongenmaterial.com/>



## II 製品内容

### 【製品内容】

腸管出血性大腸菌 O 抗原タイピングプライマーセット

48テスト (6検体) 用

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
Negative Control (NC)	Sky Blue	50 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Positive Control O157 (PC O157)	Gray	35 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O26 (PM O26)	Pink	20 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O103 (PM O103)	Green	20 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O111 (PM O111)	Blue	20 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O121 (PM O121)	Purple	20 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O145 (PM O145)	Orange	20 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C (遮光)
Primer Mix O157 (PM O157)	Green Yellow	50 $\mu$ 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、使用期限 (Exp.) 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、必要以上の試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
- ◆ Positive Control O157には、大腸菌 O157 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を他の器具や試薬に接触させたり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  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L)
- フィルター付マイクロチップ (滅菌済)
- 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)
- LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置 (栄研化学株式会社)  
LoopampEXIA<sup>®</sup>、LA-320C、RT-160C、LA-200
- 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

## 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 O157 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 O157 5.0  $\mu$ L を鋳型として 25.0  $\mu$ L (1 テスト分) の容量で LAMP 法を行い、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 (LoopampEXIA<sup>®</sup>、LA-320C、RT-160C、LA-200)

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、 <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ので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。</u>
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 O157 や LAMP 反応後の増幅産物等、鋳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 O157) 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 O157** 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 O157** 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. DNA サンプルの調製

#### 1-1. DNA サンプルの調製

本品では、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット（外因性コントロール入り）（栄研化学株式会社）を用いて調製されたDNA抽出液を検出に用います。検体からのDNA抽出は製品の取扱説明書に従ってください。

厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145及びO157の検査法について」（平成26年11月20日食安監発1120第1号）に記載のDNA抽出法も利用可能です。

**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、融解後はすぐに氷上に静置します。ただし、*Bst* DNA Polymerase 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。

1 検体の測定を行う場合、O 抗原 6 種類 + Negative Control (NC) + Positive Control O157 (PC) として 8 テスト分 (必要に応じて余剰分 1 テストを加えた 9 テスト分) のマスターミックスを準備します。

#### マスターミックス

試薬	1 テスト分	8 テスト分	(9 テスト分)
2x Reaction Mix.	12.5 µL	100.0 µL	112.5 µL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 µL	8.0 µL	9.0 µL
Distilled Water	4.0 µL	32.0 µL	36.0 µL
マスターミックス合計	17.5 µL	140.0 µL	157.5 µL

#### 反応溶液の構成

ウェル	1	2	3	4	5	6	7	8
測定区	検体由来 DNA サンプル						コントロール	
測定対象	O26	O103	O111	O121	O145	O157	NC	PC
マスターミックス	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL	17.5 µL
Primer Mix O26	2.5 µL							
Primer Mix O103		2.5 µL						
Primer Mix O111			2.5 µL					
Primer Mix O121				2.5 µL				
Primer Mix O145					2.5 µL			
Primer Mix O157						2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
検体 (DNA 抽出液)	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL		
Negative Control							5.0 µL	
Positive Control O157								5.0 µL



## 2-4. マスターミックスの分注 (氷上操作)

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 17.5  $\mu$ L 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. Primer Mix の分注 (氷上操作)

2-3.の表に従い、Primer Mix を該当するウェルに 2.5  $\mu$ L ずつ分注します。

## 2-6. サンプルの添加 (氷上操作)

まず、ウェル 7 に **Negative Control** を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じます。次に、検体反应用的ウェル (1-6) に DNA 抽出液を 5.0  $\mu$ L ずつ添加してキャップを閉じます。最後に、ウェル 8 に **Positive Control O157** を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じます。

## 2-7. 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にセットして 65°C で 60 分間の測定を開始します。

**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。

## 2-8. *Bst* DNA Polymerase の失活

測定終了後には、80°C で 2 分間の熱処理により反応を停止します。

## 3. 判定

### 3-1. 検査の成否の判定

最初に、ウェル 8 (PC) で濁度が上昇し、ウェル 7 (NC) 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  $T_t$  値を確認してください。濁度上昇が認められる場合、そのプライマーセットの遺伝子型と識別されます。



## 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栄研化学株式会社までお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
複数のウェルで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。 新たに DNA 抽出を行い、再検査を実施してください。
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 O157 の添加量が過剰である。 Positive Control O157 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. 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
2. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

### 本品に関するお問い合わせ先

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

E-mail [lamp@eiken.co.jp](mailto:lamp@eiken.co.jp)

URL <http://www.eiken.co.jp/>

- ・ 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2017年3月現在のものです。最新のマニュアルは栄研化学株式会社の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、製品名等の固有な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。

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

製造元:



**株式会社ニッポンジーン**

富山県富山市問屋町1丁目8番7号