

Loopamp SARS コロナウイルス検出試薬キット (栄研化学)

原理 LAMP は、標的遺伝子の 6 ヲ所の領域に対して 4 種類のプライマーを設定して、鎖置換反応を利用し一定温度で反応させることを特徴とする。反応はプライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質などを一緒に、一定温度 (60~65°C) で保温することにより、検出までを 1 ステップの工程で行うことができる。はじめに増幅する DNA 遺伝子両端にループが形成され、この DNA を鋳型として増幅が繰り返され、ループ構造をもった様々なサイズの遺伝子産物が得られる。特徴として、① DNA を 2 本鎖から 1 本鎖への変性を必要としない、② 増幅反応はすべて等温で連続的に進行する (サーマルサイクラーは不要)、③ 増幅効率が高い (DNA を 15 分から 1 時間で 10^9 から 10^{10} に増幅)、④ 4 つのプライマーが 6 ヲ所を認識するため、特異性が高い、⑤ DNA 酵素として 1 種の酵素しか必要とせず、安価である、⑥ 鋳型が RNA でも、逆転写酵素を添加するだけで、DNA と同様に増幅が可能である。検体は糞便を用いる。鼻腔咽頭拭い液も可能であるが、血液ではその有効性は確認されていない。

実施 ① 検体からの RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社製) を使用、必ず安全キャビネット内で実施する。

② 試薬の調製は、コンタミネーションを防止するため、クリーンベンチを使用し、作業中は手袋を着用し、ピペットなどは専用のものを使用する。-20°C で保存していたキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存する。1.5 ml マスターミックス調製用滅菌チューブにリアクションミックス SARS、蛍光・目視検出用試薬、エンザイムミックスを分注し、十分混合し、マスターミックスとする。調製したマスターミックスは速やかに使用する。ただし、エンザイムミックスはボルテックスにより失活することがあるため、ピペッティングあるいはタッピングにより攪拌する。攪拌後は軽くスピンドウンし、特に気泡が生じた場合は遠心操作で気泡を取り除く。

③ 試薬調製用クリーンベンチでマスターミックスを各反応チューブに分注し、別のクリーンベンチで抽出した RNA、陰性コントロール (蒸留水)、陽性コントロールを添加する。キャップを閉め、タッピング後スピンドウンする。なお、陽性コントロールはコンタミネーションを避けるため、最後に添加する。

④ Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C にセットし、65°C、45 分間、LAMP 反応を行い、停止する。

⑤ LA-320C によりリアルタイムに濁度変化を検出する。
検出感度は 10 コピー/チューブである。