

# API ZYM

## 미생물의 효소 활성 연구를 위한 키트

요약설명 .....	118
원리 .....	118
시약 .....	118
배지와 시약의 성분 .....	118
스트립과 배지의 보관 .....	118
시약의 보관 .....	118
시약의 이용 .....	118
사용상 주의사항 .....	119
실험방법 .....	119
제한점 .....	119
QC .....	120
판독표 .....	120

# API ZYM | 미생물의 효소 활성 연구를 위한 키트

## 요약설명

- API ZYM은 미생물의 효소활성을 검사하기 위해 제작된 키트로서 모든 종류의 검체에 적용할 수 있다. (미생물, 세포, 조직, biological fluid, etc)
- 적은 시료량으로 19가지 효소의 활성을 빠르고 체계적으로 검사할 수 있다.
- 20가지의 작은 well로 구성이 되어있으며 각 well에는 효소반응을 검사할 수 있는 기질과 완충액이 들어있어서 효소와 불용성 기질 사이에 반응을 용이하게 한다.
- 정제되지 않은 혼합시료에서의 효소의 활성을 검사할 수 있도록 제작되었다. 따라서 spectrophotometric이나, electrophoretic 방법을 이용하여 검사할 수 있는 효소들의 스펙트럼을 제공할 수 있는 스크리닝 방법이다.

## 원리

- API ZYM은 20가지 큐플로 구성이 되어있으며 특히 효소반응을 연구하도록 디자인 된 제품이다.
- 스트립의 기질은 섬유조직으로 만들어져 있어서 불용성이더라도 효소와 쉽게 반응할 수 있다.
- 스트립에 균액이 접촉되면 이 균액이 기질을 가용화하고 배양기간 동안 생성된 대사산물이 보조시약의 첨가로 인해 나타나는 색의 변화로 검출된다.
- 반응 결과는 결과 테이블에 따라 판독한다.

## 시약

### Kit 구성(25 테스트)

- API ZYM 25 strips
- 배양용 박스 25개
- 결과지 25장
- Package insert 1부

### 보조 시약(별도구매)

- API Suspension medium, 2ml (ref.70 700)  
또는 NaCl 0.85% Medium, 2ml (ref. 20 070)
- Reagent :ZYM A(ref.70 494)  
ZYM B(ref.70 493)
- McFarland Standard (ref.70 900)  
또는 DENSIMAT (ref.99 234)
- PSIpettes (ref.70 250)

## 필요한 실험기자재

- 35~37°C incubator
- Bunsen burner
- Refrigerator
- Marker pen

## 배지와 시약의 성분

Suspension Medium 2 ml	Demineralized water	
NaCl 0.85% Medium 2 ml	Sodium chloride Demineralized water	8.5 g 1000 ml
ZYM A reagent 8 ml	Tris-hydroxymethyl-aminomethane Hydrochloric acid (37 %) Sodium lauryl sulfate H <sub>2</sub> O	25 g 11 ml 10 g 100 ml
ZYM B reagent 8 ml	Fast Blue BB 2-methoxyethanol	0.35 g 100 ml

## 스트립과 배지의 보관

스트립과 배지는 2-8°C에서 보관하며 포장에 명시된 유효 기간까지 사용할 수 있다.

## 시약의 보관

- 포장에 명시된 유효기간까지 2-8°C의 빛이 차단된 장소에서 보관 한다. (ZYMA는 2-30°C 에서 보관한다.).
- 시약은 개봉 후 한 달 정도 사용할 수 있다. 시약병의 라벨에 개봉한 날 짜를 기입해두는 것이 좋다.
- ZYM B 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고 안에서 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다. ZYM B는 일반적으로 노란색을 띠므로 분홍색으로 변화되면 변질된 것이므로 사용을 중단한다.
- 2-8°C에서 ZYM A는 침전이 생성될 수도 있으나, 이는 시약의 활성에는 영향을 미치지 않으며 실온에 꺼내두면 곧 없어진다.

## 시약의 이용

시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30°C)에 꺼내 둔다.

### 사용상 주의사항

- 이 키트는 오직 효소활성에 대한 연구 목적으로만 제작되었다.
- 감염성이 있는 시약에 대해 주의 사항을 만들고 무균적으로 사용하도록 한다.
- 검체나 시약을 입으로 피아펫팅 하지 않는다.
- 유효기간이 지난 시약은 사용하지 않는다.
- 사용하기 전에 실온에 꺼내 두었다가 사용한다.
- 미생물 실험이 끝난 모든 시약은 감염될 가능성이 있으므로 적절한 조작을 하여야 한다.
- 모든 환자의 검체와 미생물 배양물질은 감염의 가능성이 있으므로 국제적인 주의사항을 따라야 한다.  
“CLSI/NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue; Approved Guideline - Current revision”.
- 추가적인 실험은 “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Latest edition”을 참조하거나 각 나라의 규정에 따라 유의하여 조작한다.
- 실험이 끝나면 실험에 사용된 모든 제품은 완전 멸균 상태로 폐기 처리해야 한다.
- 테스트 결과의 해석은 전문가에 의해서 이루어져야 한다.

### 실험방법

#### 검체의 준비

- 증류수나 saline 2ml 정도에 검체를 희석한다.
  - For microorganisms :  
Suspension medium (2ml), 증류수 또는 등장액에 균을 풀어 5~6 McFarland로 탁도를 맞춘다. Slant agar나 액체 배양 후 원심분리로 수거한 균체로 균액을 준비한다. 이 방법은 존재하고 있는 효소를 측정하므로 유도생성되는 효소의 검사를 위해서는 배지에 유도제를 첨가해야 한다.
  - For other specimens (Cell suspension, tissues, biological fluids,..):  
기본 원리를 바탕으로 실험 조건과 결과 판독은 실험자가 적절히 결정할 수 있다.

#### 스트립의 준비

- Incubation box를 준비하고 약 5ml의 멸균 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다.
- Tray의 끝에 균주의 정보를 기록한다.
- 스트립을 tray 위에 올려 놓는다.

#### 스트립의 접종

- 피아펫이나 PSIpette을 이용하여 각 cupule에 65 $\mu$ l 씩 분주한다.

#### 스트립의 배양

- 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양한다.
- 배양시간과 온도는 실험하고자 하는 대상에 따라 다양하게 변화될 수 있다.
- 다른 검체와 비교 시에는 배양 시간, 온도, 배지, 접종액의 농도 등 모든 조건이 동일해야 한다.
- 접종된 스트립은 밝은 빛에 노출시키지 않는다.

#### 스트립의 판독

- ZYMA와 ZYMB 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어준다.  
ZYMA가 표면의 활성을 증가시켜 ZYMB의 용해를 돕는다.
- 5분간 기다린 후 결과를 판독한다.
- 가능하다면 큐플 위의 10 cm 위치에 강력한 빛(1000 W bulb)을 10초간 쬐이도록 한다. 이 과정은 반응하지 않고 남아 있는 Fast Blue BB로 인해 발생할 수 있는 노란색을 제거할 수 있다.  
빛을 쬐인 후 음성 반응은 무색이 된다. 햇빛에 몇 분간 노출시키는 것으로도 좋은 결과를 얻을 수 있다.

#### 반응 결과의 기록

- 반응 결과를 읽고 결과지에 기록한다. 색의 변화정도에 따라 0-5까지의 값으로 표시할 수 있다.
- 0은 음성반응, 5는 최대 강도의 반응이고 1, 2, 3, 4는 중간 반응 값이며 3 이상이면 양성으로 판정한다.
- 색깔은 반응 후 몇 시간 동안 유지되며 24시간이 지나면 색이 변화되므로 결과에는 참고하지 않는다.



#### 제한점

- API ZYM은 동정용 제품이 아니라 연구용 제품이므로 임상용으로 사용하지 않는다.
- 모든 실험은 실험자의 권한으로 실행될 수 있다. 따라서 이 제품의 정확성과 사용 방법에 대해서 인정하기 위해서는 자체 규정을 따르도록 한다. 따라서 bioMérieux는 API ZYM의 결과에 대해 어떠한 책임도 지지 않는다.

# API ZYM

## 미생물의 효소 활성 연구를 위한 키트

### QC

- 검사하고자 하는 검체에 적합한 방법인지를 알아보기 위해 본 실험에 들어가기에 앞서 품질 관리가 선행되어야 한다.
- 배지와 스트립 그리고 시약은 각각의 제조 과정의 여러 단계에서 체계적으로 검사된다.
- API ZYM의 품질관리는 특정 세균이나 정제된 효소를 사용하여 수행될 수 있다.

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

(Profile obtained after 18-24 hr. culture on tryptic soy agar. Inoculum adjusted to between 5 and 6 McF using DENSIMAT)

2.  $\beta$ -glucosidase Sigma G0395 (Profile obtained using a concentration of 0.2 g/l)

3.  $\alpha$ -chymotrypsin Sigma C4129 (Profile obtained using a concentration of 1 g/l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 판독표

No.	Enzyme Assayed For	Substrate	pH	Result	
				positive	negative
1	Control			Colorless or color of the sample if it has an intense coloration	
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	8.5	Violet	Colorless  or  Very pale Yellow*
3	Esterase (C4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Violet	
4	Esterase Lipase (C8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Violet	
5	Lipase (C14)	2-naphthyl myristate	7.5	Violet	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	7.5	Orange	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	7.5	Orange	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	7.5	Orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	Orange	
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	Orange	
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Violet	
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	5.4	Blue	
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	5.4	Violet	
14	$\beta$ -glucuronidase	2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	5.4	Violet	
15	$\beta$ -glucosidase	Naphthol-AS-BI- $\beta$ -D-glucuronide	5.4	Blue	
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	5.4	Violet	
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	5.4	Violet	
18	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide	5.4	Brown	
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	5.4	Violet	
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside	5.4	Violet	

\*보조시약의 첨가 후에 강한 빛에 노출시키면 무색이거나 control의 색과 동일하며 빛에 노출시키지 않았을 경우에는 매우 흐린 노란색을 띈다.