

バナナ萎凋病菌検出用 LAMP プライマー・ポジティブコントロールの使用法

1. バナナ萎凋病菌検出用 LAMP プライマー^{*1}・ポジティブコントロール調製

1.1 プライマー液の調製 (各プライマーを 100 μM に調製)

Data Sheet 記載の 100 μM に調製する際に必要な液量分の 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) Buffer^{*2} をプライマーチューブに添加します。ボルテックス後、スピンドウンします。

*1：本品は、国立大学法人 東京農工大学との共同開発品です。

*2：分子生物学グレードをご使用ください。

1.2 Primer Mix の調製

滅菌マイクロチューブに 1.1 で調製した各 100 μM のプライマー液を以下の容量で加え、ボルテックス後、スピンドウンします。調製した溶液を「**10x Primer Mix**」とします。調製後は、冷凍保存 (-20°C) してください。

	1 テスト	100 テスト
100 μM FIP	0.40 μL	40 μL
100 μM BIP	0.40 μL	40 μL
100 μM F3	0.05 μL	5 μL
100 μM B3	0.05 μL	5 μL
100 μM LF	0.20 μL	20 μL
100 μM LB	0.20 μL	20 μL
ddWater	1.20 μL	120 μL
Total Volume	2.50 μL	250 μL

1.3 ポジティブコントロールの調製

陽性コントロール溶解液 10 μL を添加し、スピンドウンした後、室温に 5 分間静置してください。再度ボルテックスし、スピンドウンして「**ポジティブコントロール**」としてご利用ください。ポジティブコントロールのチューブには、*Foc* プライマーの各標的 DNA 断片が 5×10^8 copies ずつ含まれています。調製後は、冷凍保存 (-20°C) してください。

1.4 バナナ検体の処理

市販キットを用いて DNA を抽出してください。植物体からの簡易抽出プロトコルについては、株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

以下は、DryADD™ LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye) を用いた使用方法を記載します。詳細は、使用説明書をご参照ください。

2. 検査反応液調製

2.1 マスターミックスの調製

試薬調製用チューブに各試薬を必要なテスト数分調製し、DryADD™ LAMP Master Mix に 23 μ L ずつ分注します（以下の操作は必ず氷上で行ってください）。

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト
10x Primer Mix	2.5 μ L	22.5 μ L
LTV Dissolve Solution	5.0 μ L	45.0 μ L
ddWater	15.5 μ L	139.5 μ L
乾燥試薬溶解液合計	23.0 μL	207.0 μL

2.2 乾燥試薬の溶解

分注後、キャップを閉じ、2 分間静置して、乾燥試薬を溶解させます。

2.3 鋳型 DNA の添加

鋳型 DNA を 2.0 μ L 添加してキャップを閉じます。添加後、キャップを閉じ、転倒混和、スピンドウンを行います（混合の際は気泡が立たないように注意してください）。

蒸発による反応液の濃縮が起こると反応効率が著しく低下しますので、Mineral Oil を 20.0 μ L 添加してください。ホットボンネット機能を有するサーマルサイ클ラーを使用する場合には Mineral Oil の添加は不要です。

注意：

Mineral Oil を添加する場合、必ず乾燥試薬の溶解を確認した後に実施してください。溶解前の乾燥試薬に Mineral Oil が触れた場合、乾燥試薬が不溶化することがあります。

3. 検査反応

3.1 LAMP 反応の実施

上記で調製したチューブをインキュベーターもしくは濁度測定装置を用いて各プライマーに指定の温度で 60 分間、保温します。

反応温度 (°C)	
<i>Foc Ce15</i>	64.5
<i>Foc SIX8</i>	64.5
<i>Foc SIX7</i>	64.5
<i>Foc SIX6</i>	64.0

3.2 LAMP 反応停止

80°Cで 2 分間の熱処理により、検査反応を停止させます。

4. 結果判定

反応液の色の変化の有無を確認してください。陽性の場合には反応液が鮮明な黄緑色に変化し、陰性の場合には淡い赤色のまま変化しません。

5. レース判定

各プライマーによる判定結果が示す各病原菌レースの遺伝子保持パターンに基づいてレースを判定します。

バナナ萎凋病菌 f. sp. <i>cubense</i>	<i>Foc Ce15</i> プライマー	<i>Foc SIX6</i> プライマー	<i>Foc SIX7</i> プライマー	<i>Foc SIX8</i> プライマー
レース 1	+	-	-	-
レース SR4	+	-	+	+
レース TR4	+	+	-	+
その他の分化型菌	-	±	±	±