

ファイトプラズマユニバーサル検出キット

Phytoplasma Universal Detection Kit

取扱説明書

version 4.0.0

製品コード

NE0151



ニッポン・ジーン

ファイトプラズマユニバーサル検出キット

取扱説明書 version 4.0.0

【はじめにお読みください】

このたびは、ファイトプラズマユニバーサル検出キットをお買い上げいただき、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いて植物検体よりモリキューテス綱に属するファイトプラズマを網羅的に検出するための試薬です。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. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】(2 ページ) に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**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. 本キット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。キット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、検査後サンプルおよびPhytoplasma陽性コントロールの電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。
6. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート (SDS) を公開していますので、ご参照ください。
株式会社ニッポンジーン; <http://nippongene-analysis.com/>
7. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。
8. 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法を用いたファイトプラズマ検出用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

目次

ページ

1. キット説明	1
ファイトプラズマユニバーサル検出キットの概要	
ファイトプラズマ病とその診断	
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法	
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して	
2. キット内容	2
キット内容と保存温度	
3. 必要な器具、機器	3
4. キット使用方法	5
簡易プロトコル	5
検査を行う前の準備および注意事項	7
サンプルの準備	
器具、機器の準備	
検査環境	
詳細な使用方法	9
DNAの抽出	
検査反応	
判定	
5. トラブルシューティング	15
6. 文献・資料	16
7. 付録	17
品質管理	
Phytoplasma陽性コントロールのコピー数	
メモ	

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法によるファイトプラズマの検出技術は、東京大学 植物病院[®]により開発されました。

1. キット説明

【ファイトプラズマユニバーサル検出キットの概要】

本キットはLAMP法を利用してモリキューテス綱に属する植物病原細菌**ファイトプラズマ**を網羅的に検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも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。本キットでは、LAMP法によりファイトプラズマゲノムDNAの一部を増幅し、増幅の有無からファイトプラズマの存在を判定します。

検出に必要な操作は、植物検体より抽出したDNAを検査溶液（**Phytoplasma 検査液**と、**Phytoplasma酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に加えて64℃に60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。**ファイトプラズマが存在する場合**、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってファイトプラズマゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、**ファイトプラズマが存在しない場合**には、DNAの増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する**目視判定法**を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でファイトプラズマゲノムDNAを検出することが可能です。

「国内におけるファイトプラズマによる病害一覧」を弊社ホームページに掲載しておりますので、ご参照ください。

株式会社ニッポンジーン

ファイトプラズマユニバーサル検出キット；

<http://www.nippongene.com/kensa/products/lamp-kit/phytoplasma/phytoplasma-universal.html>

なお、植物およびファイトプラズマの種類によっては、キットを用いても検出されない場合がありますので、ファイトプラズマの感染が疑われる場合には、東京大学 植物病院[®]までご相談ください。

【ファイトプラズマ病とその診断】

ファイトプラズマは、植物の篩部に寄生する植物病原細菌であり、1967年に世界に先駆けて我が国で発見されました。世界中で 700 種類以上、我が国でも約 80 種類の植物に感染し、黄化、萎縮、叢生、突き抜け、葉化、てんぐ巣などの奇形症状を引き起こし、昆虫により伝搬される、農業上きわめて重要な植物病原体です。

ファイトプラズマによる被害拡大を防ぐためには、感染植物の除去等の防除手段を講じる必要があります。そのためには罹病植物の早期発見が不可欠となりますが、ファイトプラズマは難培養微生物であるために簡易的な診断技術が確立されておりました。本キットを用いることにより、ファイトプラズマを網羅的に検出することができます。

【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法の詳細な原理については、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/>

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キット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/>

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

ファイトプラズマユニバーサル検出キット
48テスト用（製品コード：NE0151）

試薬名 (チューブラベル)	頭部ラベル色	内容量	保存温度
		48テスト用	
取扱説明書	-	1部	室温
検査用チューブ	-	50本	室温
Phytoplasma検査液	赤色	1,050 µl	-20°C (遮光)
Phytoplasma酵素液	黄色	50 µl	-20°C (遮光)
蛍光発色液	紫色	50 µl	-20°C (遮光)
Phytoplasma陽性コントロール	灰色	50 µl	-20°C (遮光)
ミネラルオイル	青色	1,000 µl	-20°C (遮光)
Phytoplasma抽出液	-	5,000 µl	-20°C (遮光)

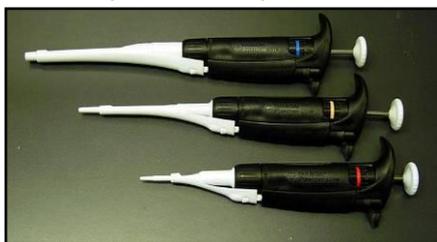
取り扱い上の注意

- ◆ 本キットでは、49テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、48テスト分の検査反応を行うことが可能です。検査溶液の調製を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。
- ◆ 検査用チューブに水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。
- ◆ 取扱説明書および検査用チューブ以外の試薬は-20°Cで遮光して保存し、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°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。
- ◆ Phytoplasma酵素液を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。
- ◆ Phytoplasma陽性コントロールは、ファイトプラズマのゲノムDNAに特徴的な配列を含むDNA溶液です。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。
- ◆ ミネラルオイルに関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずSDSを参照の上、使用してください。

3. 必要な器具、機器

【必ずご準備いただく器具、機器】

- マイクロピペット*
(0.5-10 μ l、10-100 μ l、200-1,000 μ l)



- フィルター付マイクロチップ (滅菌済)*



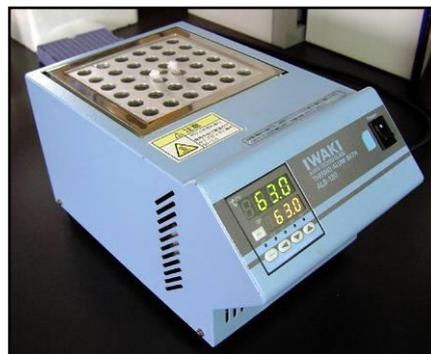
- マイクロチューブ*
(1.5 ml あるいは 2.0 ml)



- 使い捨て手袋



- インキュベーター (恒温器)
ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、64°C を保持する機器が必要です。

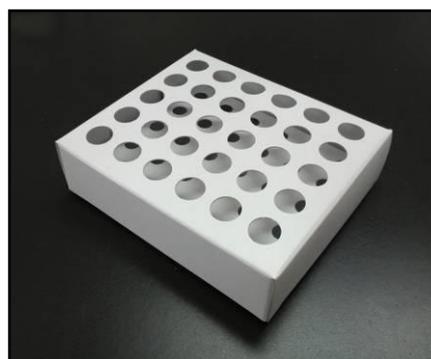


- 剃刀
- ペーパータオル
- ピンセット
- 氷 (クラッシュアイス)

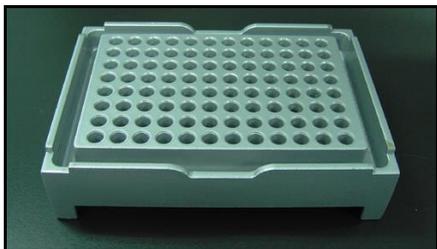
【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- 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)



- 簡易遠心機 (0.2 ml チューブ用)



- フロートプレート*

ウォーターバスで保温する際に使用します。

- UV 照射装置*

蛍光発色液による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。



- 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

- DNA 抽出キット

* マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子検査ツールボックス** (製品コード: NE4111) も販売しております

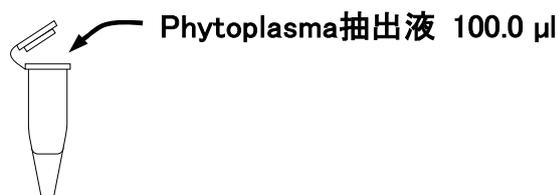
4. キット使用方法

【簡易プロトコル】 ここではアジサイ検体からファイトプラズマを検出する一例を示しています。

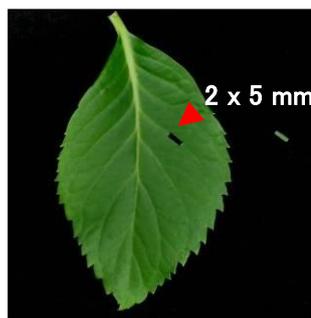
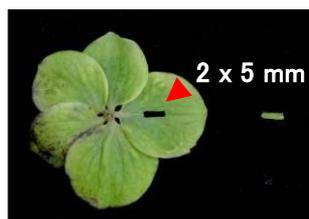
本キットの詳細な使用方法は7ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル（アジサイ検体の例）

1. Phytoplasma抽出液を1サンプルあたり100.0 μl ずつ分注する



2. アジサイのがくあるいは葉の葉脈部分を切り取りPhytoplasma抽出液に浸す



3. 95°Cで10分間保温する（DNAサンプルとする）

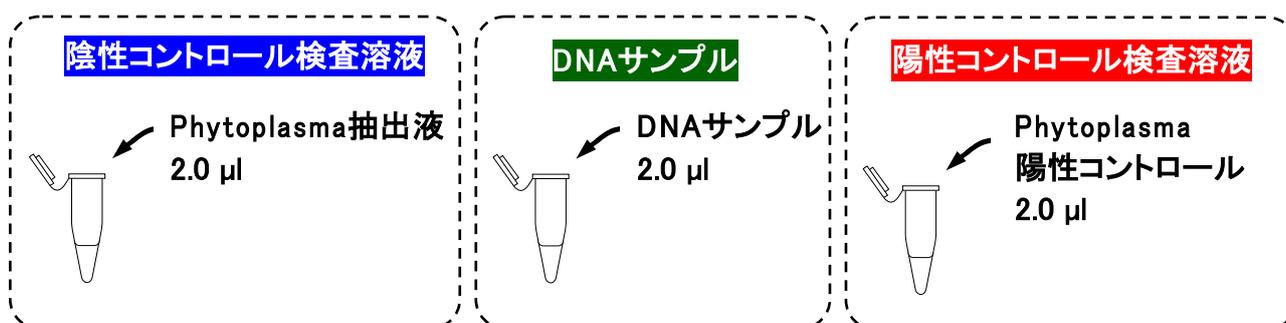
4. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1テストあたり	8+1テスト*	48+1テスト*
Phytoplasma検査液	21.0 μl	189.0 μl	1029.0 μl
蛍光発色液	1.0 μl	9.0 μl	49.0 μl
Phytoplasma酵素液	1.0 μl	9.0 μl	49.0 μl
検査溶液合計	23.0 μl	207.0 μl	1127.0 μl

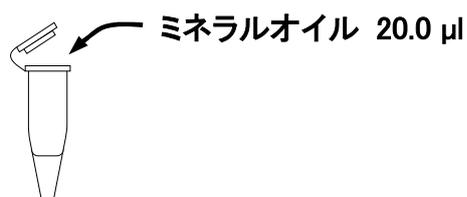
* 分注時の液量の不足を防ぐため、1テスト分多めに作製する。

5. 検査溶液を1テストあたり23.0 μ l ずつ分注する

6. サンプル 2.0 μ l を添加する



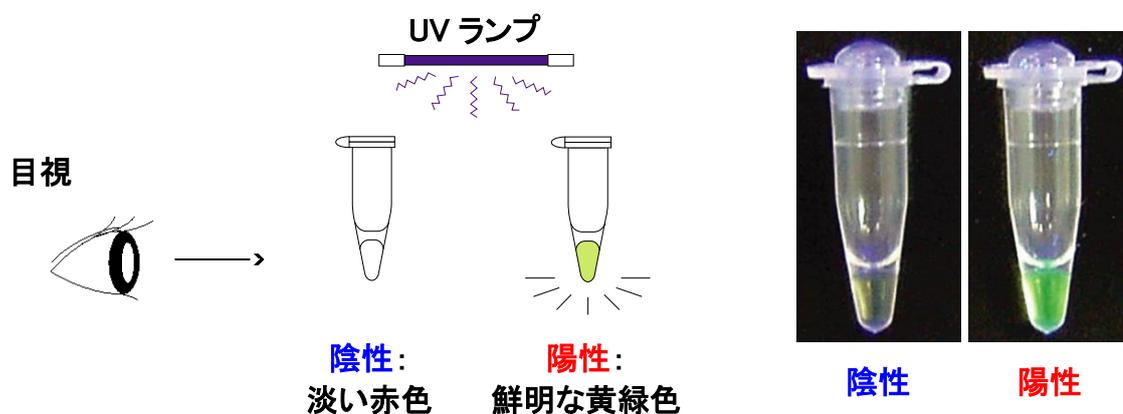
7. ミネラルオイルを入れる



8. 64°C、60 分間

9. 80°C、2 分間

10. 判定



【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■ コントロール

本キットには、検査の成否を確認するためのPhytoplasma陽性コントロールが添付されています。検査の成否を確認するには、Phytoplasma陽性コントロールを添加する「陽性コントロール検査溶液」およびPhytoplasma抽出液を添加する「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■ サンプル準備

検査には植物検体から抽出したDNAを使用します。本キットは、植物の維管束からDNAの簡易抽出を行うための試薬（Phytoplasma抽出液）及び簡易抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前にDNAを準備してください。

重要

市販の植物 DNA 抽出キットあるいは CTAB 法を用いて DNA の抽出を行う場合、DNA サンプルの濃度は 5 ng/μl 以下にならないようにしてください。

器具、機器の準備

■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、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	各区域専用とし、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Phytoplasma陽性コントロールや検査後サンプル等、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、検査後サンプルおよびPhytoplasma陽性コントロールの電気泳動法等による操作や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、検査溶液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Phytoplasma陽性コントロールおよびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の扱いは行わないでください。

検査溶液へのサンプルおよびPhytoplasma陽性コントロール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すすぐことにより、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、1%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、1%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。

<方法>

- i) 使い捨て手袋を装着します。
- ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm (1%) 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、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
- iv) 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、よくすすいで乾燥します。
- v) 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。

【詳細な使用方法】

DNA の抽出（アジサイ葉化病ファイトプラズマ DNA 調製の例）

重要

本キットは、アジサイの**がく**あるいは**葉の維管束**よりアジサイ葉化病ファイトプラズマDNAの簡易抽出を行うためのPhytoplasma抽出液および抽出プロトコルを備えています。

市販の植物 DNA 抽出キットあるいは CTAB 法を用いて DNA の抽出を行う場合、DNA サンプルの濃度は 5 ng/μl 以下にならないようにしてください。

試薬の融解

Phytoplasma抽出液を取り出し、室温で完全に融解します。容器のキャップを閉じた状態で容器を10回上下に反転させて混合し、均一にした後、マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に 100.0 μl を分注します。

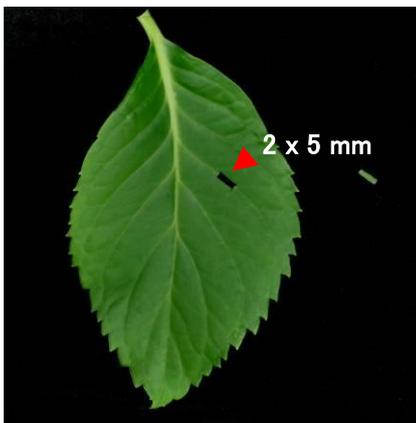


がくの場合

植物の準備

対象とするアジサイ樹木から**がく**あるいは**葉**を採取します。清潔なポリエチレン袋等に樹木ごとに分けて採取し、以降の取り扱いはピンセットを使用してください。ピンセットは使用ごとにアルコールランプあるいはガスバーナーの炎を用いて先端を数秒間加熱するか、エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ってください。

清潔な剃刀を使用してアジサイの**がく**あるいは**葉の葉脈部分**を 2 x 5 mm の大きさに切り取ってください（左図参照）。



葉の場合

DNA の抽出

上記のマイクロチューブのPhytoplasma抽出液に切り取ったアジサイの**がく**あるいは**葉の葉脈部分**が完全に浸るように入れ、マイクロチューブを 95°C で 10 分間保温します。得られた溶液をアジサイ葉化病ファイトプラズマDNA（以下 DNA サンプル）とします。葉脈部分の除去、攪拌は必要ありませんので、そのまま使用してください。

重要

ファイトプラズマは**篩部**に局在する傾向がありますので、維管束を含む部分を採取してください。

Phytoplasma抽出液に汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になりますので、ご注意ください。未使用のPhytoplasma抽出液をマイクロチューブに分注してから保管する場合には、1テスト分（100.0 μl）ずつを分注した後、-20°C にて遮光して保管してください。

検査反応

試薬の融解

Phytoplasma検査液、Phytoplasma陽性コントロール、ミネラルオイルを取り出し、室温で完全に融解します。Phytoplasma酵素液および蛍光発色液は-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ます。

混合とスピンドウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて1秒間 x 3回の攪拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンドウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製



マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 × 3 回の攪拌により混合した後、スピンドウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

<容量>

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	48+1 テスト*
Phytoplasma検査液	21.0 μ l	189.0 μ l	1029.0 μ l
蛍光発色液	1.0 μ l	9.0 μ l	49.0 μ l
Phytoplasma酵素液	1.0 μ l	9.0 μ l	49.0 μ l
検査溶液合計	23.0 μ l	207.0 μ l	1127.0 μ l

* 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

重要

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 回ごとに使い捨てとして使用してください。

Phytoplasma酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンドウンを行ってください。

検査溶液の分注



核酸の汚染がないピンセットを用いて検査用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、検査溶液を 23.0 μ l ずつ分注します。

重要

本キットに添付の検査用チューブと容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

DNAサンプルの添加

DNAサンプル 2.0 μ l を検査溶液に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付のミネラルオイルを 20.0 μ l 程度重層し、キャップを閉じます（蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますのでご注意ください）。なお、インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラーを使用する場合には、ミネラルオイルの添加は不要です。

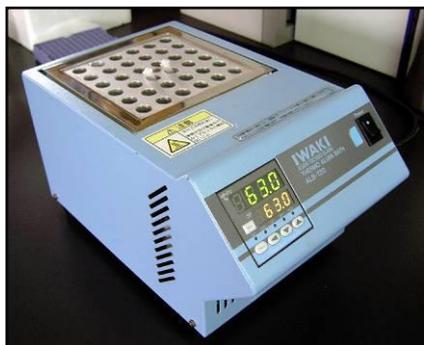
重要

必要に応じて、陰性コントロールと陽性コントロールを作製してください。

この時の注意事項として、サンプルとミネラルオイルの添加は必ず、①陰性コントロールサンプル、②DNA サンプル、③陽性コントロールサンプル、の順に行ってください。また、サンプル添加後は速やかにキャップを閉じてください。

なお、陰性コントロールサンプルには 2.0 μ l のPhytoplasma抽出液を使用し、陽性コントロールサンプルには 2.0 μ l のPhytoplasma陽性コントロールを使用してください。

検査反応



全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の攪拌にて混合した後、スピンドウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアークュベーターなどを用いて 64°C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、検査用チューブが反応中に傾かないようにしてください。



判定

検査の成否の判定



60分間保温した後、80°Cで2分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の蛍光発色液は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240–260 nmあるいは350–370 nmの波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を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。



重要

本キットでは、検査結果の判定は60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。

サンプルの判定

コントロール検査溶液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、サンプル中にファイトプラズマが存在する可能性があります。

<判定のポイント>

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「**ファイトプラズマ陽性**」と判定します。仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、対象とする植物から別の部位を採取して再度検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「**ファイトプラズマ陰性**」と判定します。

ただし、ファイトプラズマは植物体中に不均一に分布している場合があります。病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は再度複数箇所の部位を採取して検査を行ってください。

重要

本キットの判定結果に関わらず、ファイトプラズマの感染が疑われる場合には、東京大学 植物病院®までご相談ください。

東京大学 植物病院®; <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ae-b/hospital/>

住所: 東京都文京区弥生1-1-1

TEL: 03-5841-0567

E-mail: byoin@todaiagri.jp

5. トラブルシューティング

本キット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
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	<p>A. Phytoplasma陽性コントロールの添加量が過剰である。 Phytoplasma陽性コントロールの添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。Phytoplasma陽性コントロールの添加量は取扱説明書の指示に従ってください。</p> <p>B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、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、1%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。</p> <p>C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。 EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。</p> <p>D. 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。</p>
蛍光発色液が変色した	<p>A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。</p>
検査溶液が蒸発した	<p>A. 反応チューブが均一に加熱されていない。 ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付のミネラルオイルを必ず添加してください。</p>
蛍光の発色の有無を判断しにくい	<p>A. 励起波長が合っていない。 240–260 nmあるいは350–370 nmの波長を出力するUV照射装置が必要です。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。</p>
試薬が不足する	<p>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。</p> <p>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。</p>

6. 文献・資料

1. Maejima K, Oshima K, Namba S. (2014) Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol.* **80** (3) : 210
2. 眞山 滋志・難波 成任 編 (2010) 植物病理学 文永堂出版
3. 難波 成任 編 (2008) 植物医科学 養賢堂
4. Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H. (1993) Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology.* **83** 786
5. 日本植物病理学会 編 (2015) 日本植物病名目録 (2015 年版)
6. 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
7. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3) : 358

7. 付録

【品質管理】

キットに添付のPhytoplasma陽性コントロール 2.0 μl を鋳型として 25.0 μl (1 テスト分) の容量でDNA増幅反応を行い、64°C、60 分間で蛍光発色液が発色することを確認しています。

【Phytoplasma陽性コントロールのコピー数】

Phytoplasma陽性コントロールには、2.0 μl あたりおよそ 10^7 コピーの標的配列が含まれています。

【メモ】

【メモ】

【メモ】



ニッポン・ジーン

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2018 年 5 月現在のもので、最新の取扱説明書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。
- 「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、製品名等の固有名称は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、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。