

ニッポンジーン 植物病院®シリーズ

植物病検査用 LAMP プライマーセットシリーズ

PepMV

製品コード: NE1081

【はじめにお読みください】

このたびは、植物病検査用 LAMP プライマーセットシリーズ PepMV 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 *Pepino mosaic virus* を検出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. 試薬は-20℃ の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。また、試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 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、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. 本品は、植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬（製品コード: NE6051）と組合せて使用します。
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、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。
6. 検査環境の汚染を防ぐため、LAMP 法反応後の増幅産物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。株式会社ニッポンジーンは、本品の製造および販売を許諾されています。

エンドポイント濁度測定装置 LT-16（製品コード: NE4011）の測定用パラメータの設定に関しては、株式会社ニッポンジーンまでお電話もしくは WEB フォームよりお問い合わせください。

株式会社ニッポンジーン

TEL 076-451-6548

URL <http://nippongene-analysis.com/>

I 製品説明

【植物病検査用 LAMP プライマーセットシリーズ PepMV の概要】

本品は株式会社ニッポンジーンが販売するニッポンジーン 植物病院[®]シリーズの植物病検査用LAMP プライマーセット専用RNA増幅試薬と組合せて使用する *Pepino mosaic virus* (PepMV) 検出用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及びノロウイルス、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ています。本品では、逆転写酵素を用いてcDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うRT-LAMP法によりPepMVゲノムRNAの一部を増幅し、増幅の有無からPepMVの存在を判定します。

また、エンドポイント濁度測定装置 LT-16 (製品コード: NE4011) などの LAMP 法用の濁度測定装置や植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬に付属する蛍光発色液 alpha 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のリスクがなく、短時間で PepMV の検出を行うことが可能です。

【PepMV とその検出について】

PepMV はトマト、ジャガイモ、ペピーノ等の主にナス科植物に感染が報告されているポティウイルスに分類される植物ウイルスです。トマトに感染した場合、果実へのモザイク症状、成熟の遅延等が見られ、トマトの品質低下に繋がります。感染経路としては、汚染種子による種子伝搬や農作業等による接触伝搬が報告されています。

PepMVは検疫有害植物に指定されており、国内に持ち込まれた場合、トマト栽培において多大な被害をもたらすとされるきわめて重要な植物病原体です。本品に含まれるLAMPプライマーセットおよびLAMPプライマーセットを用いたLAMP法によるPepMV検出技術は東京大学 植物病院[®]により開発されました。

【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。また、増幅する対象の遺伝子がRNAである場合には、逆転写酵素を用いることにより、cDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うことが可能です (RT-LAMP法)。

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/>

【ニッポンジーン 植物病院[®]シリーズ】

本品は東京大学 植物病院[®]による最新の研究成果をいち早くお届けするために企画された製品です。本品および植物病検査用LAMPプライマーセット専用RNA増幅試薬を用いたRT-LAMP法による植物病害菌およびウイルスの検出技術は、東京大学 植物病院[®]により開発されました。検出技術の詳細については、東京大学 植物病院[®]にお問い合わせください。

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@todayagri.jp

II 製品内容

【製品内容】

植物病検査用 LAMP プライマーセットシリーズ PepMV
48 テスト用 (製品コード: NE1081)

内容	頭部ラベル色	内容量	本数	保存温度
PepMV プライマー液	赤色	125 μ L	1 本	-20°C (遮光)

マニュアル (本紙) 1 部

取り扱い上の注意

- ◆ 試薬は-20°C で暗所にて保存し、納品後 6 カ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。
- ◆ 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

- 植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬 (製品コード: NE6051)
- Loopamp 反応チューブ (栄研化学株式会社)
- マイクロピペット (0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ 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)
- ヒートブロック
- LAMP 法専用濁度測定装置
エンドポイント濁度測定装置 LT-16 (製品コード: NE4011) など
- 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 チューブ用及び Loopamp 反応チューブ用)
- UV 照射装置 (240-260 nm あるいは 350-370 nm の範囲の波長を出力するもの)
- 爪楊枝

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

- 本品には、陽性コントロールDNAおよびRNAが添付されておきませんので、陽性コントロールが必要な方は東京大学 植物病院®までお問い合わせください。

器具、機器の準備

■ LAMP 法専用濁度測定装置

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、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 LAMP 反応後の増幅産物等、鑄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。

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 LAMP 法において鑄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。マスターミックスへのサンプル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. サンプルの準備

PepMV の感染が疑われる植物体の一部（トマトの場合は葉）を採取してください。次に、堅い台の上にラップを敷き、植物体をラップの上に置いて植物体を爪楊枝で軽く突いてください。サンプルの採取においては必ず使い捨て手袋を着用し、もし爪楊枝の先端に手指が接触した場合は手袋を交換してください。この爪楊枝の先端にはサンプルが付着しており、直接検査に用いることが可能です。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

本品と植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬の 10x RT-LAMP バッファー、反応添加液、dNTPs Mixture、ddWater を室温で完全に融解します。

ただし、RNA 増幅酵素および蛍光発色液 alpha 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）に下記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。標準反応スケールは 25 μ L です。

	1 テスト分	例) 8+1 テスト分の場合
10x RT-LAMP バッファー	2.5 μ L	22.5 μ L
PepMV プライマー液	2.5 μ L	22.5 μ L
dNTPs Mixture	1.4 μ L	12.6 μ L
反応添加液	5.0 μ L	45.0 μ L
蛍光発色液 alpha	1.0 μ L	9.0 μ L
RNA 増幅酵素	1.0 μ L	9.0 μ L
ddWater	11.6 μ L	104.4 μ L
マスターミックス合計	25.0 μ L	225.0 μ L

2-4. マスターミックスの分注

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 25 μ 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. サンプルの添加

サンプルが付着した爪楊枝をマスターミックスに浸して反応チューブの底に軽くこすり付けます。その後、爪楊枝は速やかに取り出し、ビニール袋等にまとめて廃棄します。陽性コントロールを使用される場合は、まず、陰性コントロール用のチューブのキャップを閉じます。次にサンプル反応チューブにサンプルを添加してキャップを閉じ、最後に、陽性コントロール用のチューブに陽性コントロールを 2.0 μ L 添加して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、必要に応じて植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬に添付のミネラルオイルを 20.0 μ L 添加してください。

2-6.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、濁度測定装置あるいはインキュベーターにセットして 62℃ で 60 分間の測定を開始します。

ピペティングによる混合をする場合は、2-5 のサンプル添加ごとに行ってください。

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。

2-7.増幅酵素の失活

測定終了後には、80℃ で 5 分間の熱処理により反応を停止し、判定を行います。

3. 判定

■ 濁度測定の場合

3-1.サンプルの判定

濁度上昇の有無を確認してください。濁度上昇が確認される場合、サンプル中に PepMV が存在する可能性があります。陽性のサンプルに関しては Tt 値を確認してください。

コントロールを使用されている場合は、最初に陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロール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、原因を追究してください。

■ 目視検出の場合

3-2.サンプルの判定

色の変化の有無を確認してください。陽性の場合検査溶液が鮮明な黄緑色に変化し、陰性の場合淡い赤色のまま変化しません。色の変化が認められる場合、サンプル中に PepMV が存在する可能性があります。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（波長: 240-260 nm あるいは 350-370 nm）及びゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。

コントロールを使用されている場合は、最初に陽性コントロール検査溶液が鮮明な黄緑色に変化し、陰性コントロール検査溶液は淡い赤色のまま変化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、原因を追究してください。

重要

本品の判定結果に関わらず、PepMV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。

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
蛍光発色液 alpha が変色した	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 alpha 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には本マニュアルの指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	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、反応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。植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 RNA 増幅試薬に添付のミネラルオイルを必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	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。
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

- ・ 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2018年6月現在のものです。最新のマニュアル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。
- ・ 「Loopamp」は、栄研化学株式会社の登録商標です。
- ・ 「植物病院」は、日本植物医科学協会の登録商標です。
- ・ 「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、製品名等の固有名称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。

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。

Copyright © 2018 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.