

# 高温性ピシウム属菌プライマーセット 2

## -ピシウム ミリオタイラム-

製品コード: NE1021

### 【はじめにお読みください】

このたびは、**高温性ピシウム属菌プライマーセット 2 -ピシウム ミリオタイラム-**をお買い上げ頂き、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 法を用いて高温性ピシウム属菌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ヵ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 LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 B-(製品コード: NE6031) と組み合わせて使用します。Loopamp<sup>®</sup> DNA 増幅試薬キットとは組み合わせて使用することはできません。
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。

本製品を用いた測定には LAMP 法専用濁度測定装置を使用します。

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

## 【高温性ピシウム属菌プライマーセットの概要】

本製品は LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 B-と組み合わせて使用する、高温性ピシウム属菌 *Pythium myriotylum* (ピシウム ミリオタイラム) 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ィルス感染の診断及びノロウィルス、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。本製品に含まれる LAMP 法用プライマーは、高温性ピシウム属菌 DNA の特異的な遺伝子領域内に設計されているため、LAMP 法による DNA の増幅の有無から検体中に標的の高温性ピシウム属菌が存在するかを判定します。

本製品では、DNA 増幅法として LAMP 法を用いているため、DNA 増幅に必要な時間が短時間であり、サンプル由来の阻害物等の影響も受け難いです。

また、エンドポイント濁度測定装置 LT-16 などの LAMP 法専用の濁度測定装置や LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 B-に付属する検出液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、短時間で高温性ピシウム属菌の検出を行うことが可能です。

## 【高温性ピシウム属菌とその検出について】

近年、ピシウム属菌は土壌栽培や養液栽培において植物の苗立枯れや根腐れを引き起こす病原菌として防除の対象となっています。ピシウム属菌の中でも 38℃程度の高温条件下で生育できるピシウム属菌は高温性ピシウム属菌と呼ばれ、養液栽培において水媒伝染病害の原因として大きな問題となっています。従来、高温性ピシウム属菌が原因となる病害の診断には検査対象からの高温性ピシウム属菌の分離・培養を行った後、形態による同定が必要であり、判定に専門知識や 4~5 日間の期間を必要とします。

## 【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、方法と比較して特異性に優れ、またその高い DNA 増幅効率から、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/>

## 【本品に含まれる合成オリゴヌクレオチドについて】

本品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/>

本キットに含まれる 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 法による高温性ピシウム属菌の検出技術は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性 診断マニュアルの策定」により開発されました。

## II 製品内容

### 【製品内容】

高温性ピシウム属菌プライマーセット 2-ピシウム ミリオタイラム-  
48 テスト用

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
ピシウムプライマー液 2-ミリオタイラム-	赤色	125 µl	-20°C (遮光)
ピシウム陽性コントロール DNA 2-ミリオタイラム-	灰色	100 µl	-20°C (遮光)

マニュアル (本紙)一部

### 取り扱い上の注意

- ◆ 試薬は-20°Cで暗所に保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。
- ◆ **陽性コントロール DNA** には高温性ピシウム属菌 DNA に特徴的な配列が含まれています。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きマイクロチップが他の器具や試薬に接触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、フィルター付きマイクロチップは 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

- LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 B- (製品コード: NE6031)
- 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 µL、10-100 µL、100-1,000 µL)
- フィルター付マイクロチップ (滅菌済み)
- 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)

# IV 使用方法

## コントロールの準備

### ■ コントロール

本品には、陽性コントロール DNA が添付されています。検査の成否を確認するためには、陽性コントロールおよび陰性コントロールの作製が重要となります。

陽性コントロール DNA 5.0  $\mu$ L を鑄型として 25.0  $\mu$ L (1 テスト分) の容量で LAMP 法を行い、65°C、60 分間で反応が起動することを確認しています。

## 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。

## 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、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、試薬類の取り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. DNA サンプルの調製

あらかじめ、市販の DNA 抽出キット、又は、国立大学法人岐阜大学流域圏科学研究センターより発行されている「養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性診断マニュアル」に従い、ピシウム属菌の検査を行う検体から DNA を調製してください。しかし、1 mM を超える EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 等のキレート化合物を含むと、誤判定の原因となりますので、抽出を行った際の DNA を溶解させる最適な溶媒としては核酸フリー水、あるいは 10 mM Tri-HCl (pH 8.0) を推奨しています。

「養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性診断マニュアル」

<http://www.green.gifu-u.ac.jp/~kageyamalab/pdf/diagnosis.pdf>

### 2. 検査反応

#### 2-1. 試薬の融解

本品 (プライマー液、陽性コントロール DNA) と LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 B-の 10x 反応バッファー B、5x 反応添加液、dNTPs Mixture、ddWater を室温で完全に融解します。判定方法が濁度測定ではなく目視検出の場合は、検出液も同様に室温で完全に融解させてください。ただし、増幅酵素は -20°C 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  $\mu$ L です。

	1 テスト分	例) 8+1 テスト分の場合
10x 反応バッファー B	2.5 $\mu$ L	22.5 $\mu$ L
プライマー液	2.5 $\mu$ L	22.5 $\mu$ L
dNTPs Mixture	1.4 $\mu$ L	12.6 $\mu$ L
5x 反応添加液	5.0 $\mu$ L	45.0 $\mu$ L
検査液 (濁度測定の場合は不要)	1.0 $\mu$ L	9.0 $\mu$ L
増幅酵素	1.0 $\mu$ L	9.0 $\mu$ L
ddWater	6.6 $\mu$ L	59.4 $\mu$ L
マスターミックス合計	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L

#### 2-4. マスターミックスの分注

Loopamp 反应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、マスターミックスを 20  $\mu$ L ずつ分注します (Loopamp 反应用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

まず、陰性コントロール用のチューブに ddWater を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じます。次にサンプル反応チューブに 1 で調製した DNA サンプルを 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じます。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 DNA を 5.0  $\mu$ L 添加してキャップを閉じます。

## 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、スピンドアウンを行い、濁度測定装置あるいはインキュベーターにセットして 65°C で 60 分間の測定を開始します。ピペッ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°C 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. 検査の成否の判定

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。

#### 3-2. サンプルの判定

コントロールの判定においてその検査が有効と判断された場合、次にサンプルの判定を行います。判定はコントロールと同様に濁度上昇の有無を確認してください。陽性のサンプルに関しては  $T_t$  値を確認してください。濁度上昇が認められる場合、サンプル中に標的の高温性ピシウム属菌が存在する可能性があります。

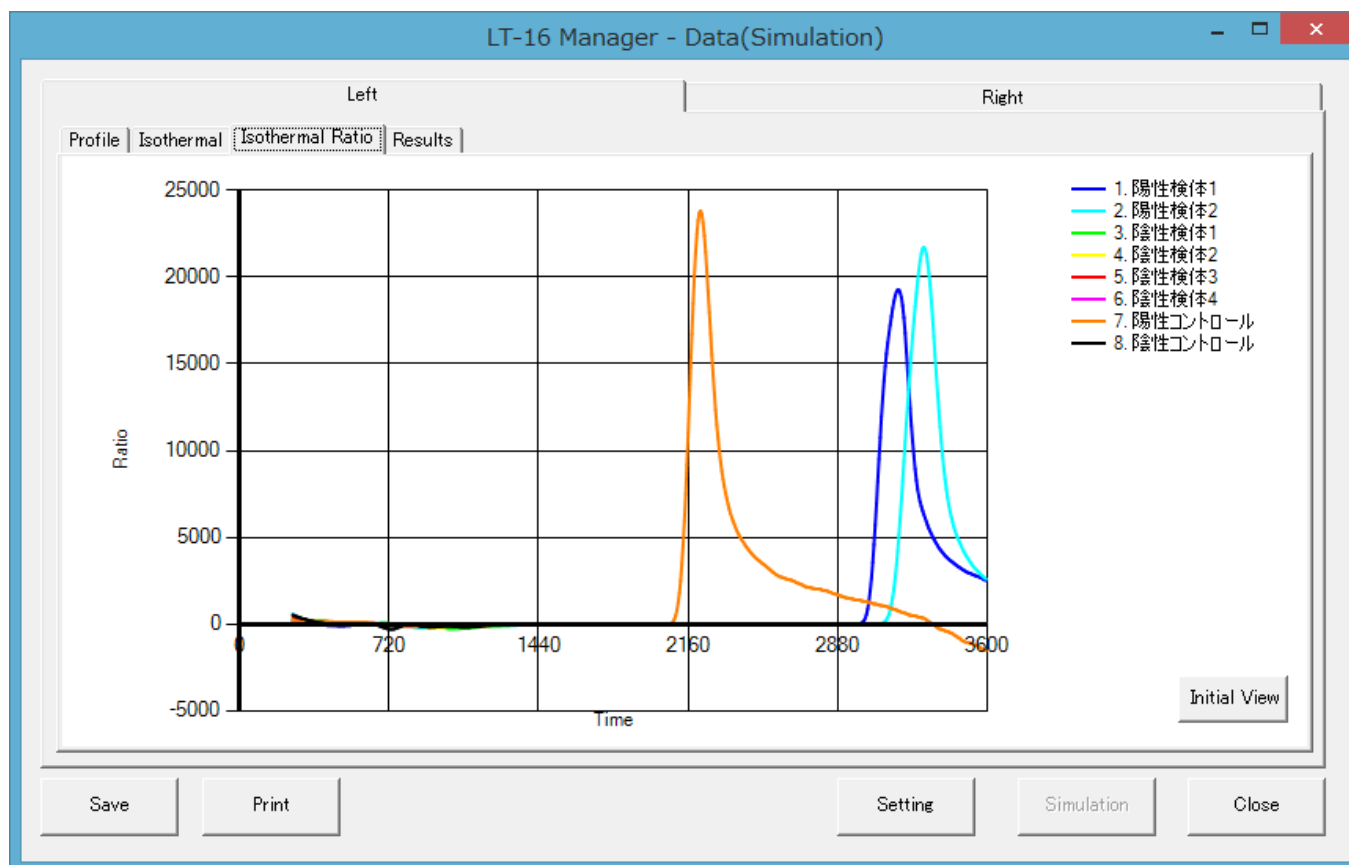


図 1: 本品を用いたエンドポイント濁度測定装置 LT - 16 での濁度測定結果（陽性検体の検出）

■ 目視検出の場合

3-3. 検査の成否の判定

最初に、陽性コントロール検査溶液が空色に変化し、陰性コントロール検査溶液は青紫色のまま変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、原因を追究してください。

3-4. サンプルの判定

コントロール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色の変化の有無を確認してください。色の変化が認められる場合、サンプル中に標的の高温性ピシウム属菌が存在する可能性があります。







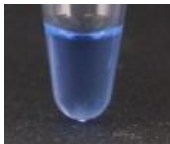
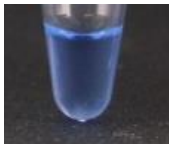

	<i>P.helicoides</i>	<i>P.myriotylum</i>	<i>P.aphanidermatum</i>
高温性ピシウム属菌プライマーセット 1 - ピシウム ヘリコイデス-	陽性 	陰性 	陰性 
高温性ピシウム属菌プライマーセット 2 - ピシウム ミリオタイラム-	陰性 	陽性 	陰性 
高温性ピシウム属菌プライマーセット 3 - ピシウム アファニデルマトム-	陰性 	陰性 	陽性 

図 2 目視検出結果（他種との交差性検証）

## 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。その他のご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
陰性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇している、色が変わっている）	<b>A. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。</b> 陰性コントロールで増幅が起こっている場合、鋳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、0.5%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。 <b>B. 反応温度、操作手順に誤りがある。</b> 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。
陽性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇してない、色が変わっていない）	<b>A. 陽性コントロールの添加量が過剰である。</b> 陽性コントロールの添加量が過剰であるとマスターミックスが希釈され検査反応の効率が低下する場合がありますので、添加量はマニュアルの指示に従ってください。 <b>B. 反応温度、操作手順に誤りがある。</b> 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。
試薬が不足する	<b>A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。</b> 使用前にスピンドウンを行ってください。 <b>B. 保存中に試薬が蒸発している。</b> 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5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。
- ・「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、製品名等の固有名詞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
<b>株式会社ニッポンジーン</b>
TEL 076-451-6548
URL <a href="http://nippongene-analysis.com">http://nippongene-analysis.com</a>
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。