

# シャインマスカット LAMP 識別プライマーセット

Code No. NE1501

製品説明書 (第 1 版) 2501ND

本製品は、LAMP 法<sup>\*1</sup>を用いてシャインマスカットを識別するためのプライマーセットです。シャインマスカット識別用 10×LAMP プライマーミックスは、シャインマスカット特異的なレトロトランスポゾン挿入多型を検出することで、主要な 24 品種<sup>\*2</sup>のブドウとシャインマスカットを識別します。また、ブドウ内在性用 10×LAMP プライマーミックスは、ブドウの UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) 遺伝子をインターナルコントロールとして検出することで、反応阻害による偽陰性の有無を判定することが可能です。

- \*1 LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、栄研化学株式会社により開発された日本産の等温遺伝子増幅法です。
- \*2 24 品種: 「シャインマスカット」、「安芸クイーン」、「キャンベルアーリー」、「巨峰」、「クイーンニーナ」、「グロースクローネ」、「甲州」、「コンコード」、「サンヴェルデ」、「翠峰」、「スチューベン」、「赤嶺」、「高尾」、「デラウエア」、「ナイアガラ」、「ナガノパープル」、「ピオーネ」、「藤稔」、「ブラックビート」、「ポートランド」、「マスカット・オブ・アレキサンドリア」、「マスカット・ペーリーA」、「ルビーロマン」、「ロザリオピアンコ」です。シャインマスカット交代品種の識別については、専門家にご相談の上、ゲノム解析など詳細な分析を行ってください。

## 製品内容

保存: 4°C (遮光)

内容	容量 (100 反応用)	保存
ブドウ内在性用 10x LAMP プライマーミックス	250 µL × 1 本	4°C (遮光) 凍結不可
シャインマスカット識別用 10x LAMP プライマーミックス	250 µL × 1 本	4°C (遮光) 凍結不可
シャインマスカット 陽性コントロール	100 µL × 1 本	4°C (遮光)、又は 長期保存-20°C

## 使用上の注意

- 本製品は、シャインマスカットを識別するためのキットです。その他の目的にはご使用になれません。
- 試験環境の汚染を防ぐため、LAMP 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。
- 核酸によって実験台や器具が汚染された場合は、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液を含ませたウェスで汚染箇所をふき取り、その後、水を含ませたウェスで塩素分をふき取ってください。

## 使用方法

検出には、本製品の他に DNA 抽出試薬と、検出方法に合わせて下記の装置及び試薬等が必要です。

### 検出方法 A: LAMP 法用蛍光検出装置 (GENEMAL/FLight Scanner)

- 試薬: LAMP FL Mix (2x)<sup>\*3</sup>
- 反応系: <Simplex>のみ可能

### 検出方法 B: リアルタイム PCR 装置 (LightCycler 96 等)

- 試薬: LAMP FL Mix (2x)<sup>\*3</sup>または 2×LAMP Master Mix<sup>\*4</sup>
- 反応系: <Simplex>、<Duplex>可能<sup>\*5</sup>

### 検出方法 C: TBA 社製核酸クロマトグラフィ

- 試薬: LAMP FL Mix (2x)<sup>\*3</sup>または 2×LAMP Master Mix<sup>\*4</sup>
- 反応系: <Simplex>、<Duplex>可能<sup>\*5</sup>

\*3 LAMP FL Mix (2x)は、「GENEMAL LAMP FL Mix」(Code No.313-09521)もしくは「2×FLight MASTER」(Code No.391-7010)をご使用ください。

\*4 「2×LAMP Master Mix」(Code No.NE6041/NE6043)は、蛍光検出法用の LAMP 法用核酸増幅試薬です。

\*5 2 種類 (ブドウ内在性用とシャインマスカット識別用) の反応を別々の反応液で行う <Simplex>か、同一の反応液で行う <Duplex>のどちらかを選択可能です。本紙では <Duplex> の場合の使用方法を記載しています。

## 1. DNA 溶液の調製

ブドウ果実の果皮からの簡易 DNA 抽出は、「GenCheck® DNA Extraction Reagent」(株式会社ファスマック)を使用する。

- 1.5 mL マイクロチューブにブドウの果皮 10 mg を採取する。
- 200 µL の GenCheck® DNA Extraction Reagent を添加し、ベッスルですり潰す。
- ヒートブロックにて 100°C、10 分間加熱する。
- 加熱処理後、直ちに氷上にて 5 分間氷冷する。
- 13,000×g、5 分間、室温にて遠心する。
- 新たな 1.5 mL マイクロチューブに 150 µL 程の上澄みを回収する。

他の DNA 抽出試薬を使用する場合は、スピニングカラムを用いた DNA 抽出キットの「ISOSPIN Plant DNA」(Code No. 312-08631)を推奨します。

## 2A. LAMP 反応液<Simplex>の調製

別途用意する試薬は、LAMP FL Mix (2x)<sup>\*3</sup>と滅菌水です。

- 下記の通りブドウ内在性用プレミックスを調製する。

試薬	1 テスト分	4+1 テスト分
LAMP FL Mix (2x)	12.5 µL	62.5 µL
ブドウ内在性用 10x LAMP プライマーミックス	2.5 µL	12.5 µL
滅菌水	9.0 µL	45.0 µL
プレミックス合計	24.0 µL	120.0 µL

- シャインマスカット識別用プレミックスを調製する。

試薬	1 テスト分	4+1 テスト分
LAMP FL Mix (2x)	12.5 µL	62.5 µL
シャインマスカット識別用 10x LAMP プライマーミックス	2.5 µL	12.5 µL
滅菌水	9.0 µL	45.0 µL
プレミックス合計	24.0 µL	120.0 µL

- プレミックスを 24.0 µL ずつ分注する。
- DNA 溶液または陰性/陽性コントロールを 1.0 µL ずつ添加して、25.0 µL の反応液を調製する。  
まず、ブドウ内在性用とシャインマスカット識別用の各陰性コントロール用チューブに陰性コントロール (滅菌水など) を添加する。次に、各検査対象用チューブに調製した DNA 溶液を添加する。最後に、各陽性コントロール用チューブにシャインマスカット陽性コントロールを添加する。

## 2B. LAMP 反応液<Duplex>の調製

別途用意する試薬は、LAMP FL Mix (2x)<sup>\*3</sup>または 2×LAMP Master Mix<sup>\*4</sup>と、滅菌水です。

- プレミックスを調製する。

試薬	1 テスト分	8+1 テスト分
LAMP FL Mix (2x)または 2×LAMP Master Mix	12.5 µL	112.5 µL
ブドウ内在性用 10x LAMP プライマーミックス	2.5 µL	22.5 µL
シャインマスカット識別用 10x LAMP プライマーミックス	2.5 µL	22.5 µL
滅菌水	6.5 µL	58.5 µL
プレミックス合計	24.0 µL	216.0 µL

- プレミックスを 24.0 µL ずつ分注する。
- DNA 溶液または陰性/陽性コントロールを 1.0 µL ずつ添加して、25.0 µL の反応液を調製する。  
まず、陰性コントロール用チューブに陰性コントロール (滅菌水な

ど)を添加する。次に、検査対象用チューブに調製した DNA 溶液を添加する。最後に、陽性コントロール用チューブにシャインマスカット陽性コントロールを添加する。

## 【A：GENEMAL/FLight Scanner 装置を使用する場合】

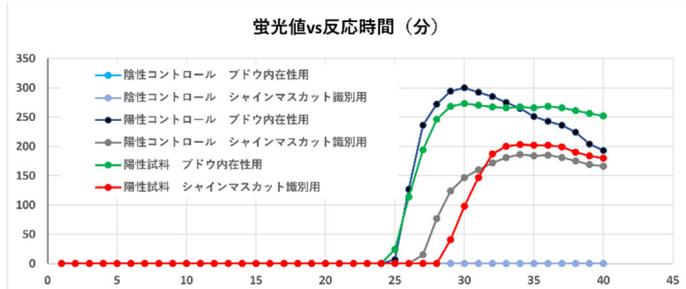
### 3A. LAMP 反応と検出

- 2A.で調製した LAMP 反応液<Simplex>をタッピングにより混合した後、スピンドアウンを行う。
- 装置にセットし 65°C、40 分間 LAMP 反応を行う。

### 4A. 結果の判定

- 以下の要件を満たす場合に試験が成立したとする。
  - ・陰性コントロールで増幅が認められない。・シャインマスカット陽性コントロールでブドウ内在性用とシャインマスカット識別用、それぞれの増幅が認められる。
- 以下の要件を満たす場合にシャインマスカットと判定する。
  - ・シャインマスカット識別用の増幅が認められる。

#### 【結果の例】



## 【B：リアルタイムPCR装置 LightCycler® 96等を使用する場合】

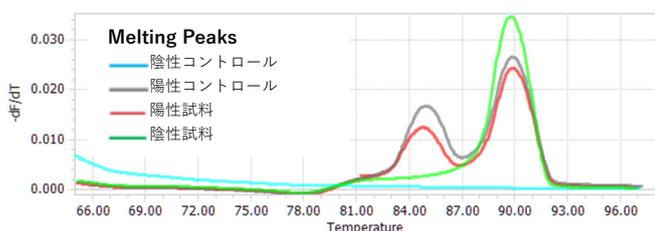
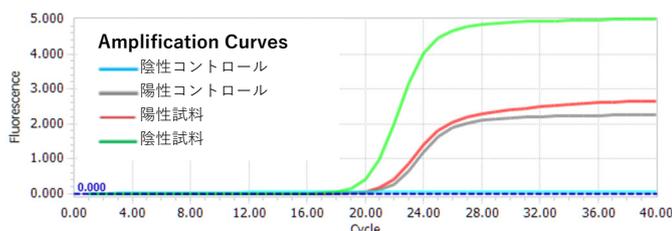
### 3B. LAMP 反応と検出

- 2B.で調製した LAMP 反応液<Duplex>をタッピングにより混合した後、スピンドアウンを行う。
- 装置にセットし 65°C、40 分間 LAMP 反応を行う。
- LAMP 反応後、融解曲線解析を行う。

### 4B. 結果の判定

- 以下の要件を満たす場合に試験が成立したとする。
  - ・陰性コントロールで増幅が認められない。・シャインマスカット陽性コントロールで融解曲線解析の結果、ブドウ内在性用とシャインマスカット識別用の二峰性の融解曲線が認められること。
- 以下の要件を満たす場合にシャインマスカットと判定する。
  - ・融解曲線解析の結果、シャインマスカット陽性コントロールで得られる 2 つの Tm 値のうち、シャインマスカット識別用に由来する低温度側 Tm 値と同等の Tm 値が得られること。

#### 【結果の例】



## 【C：核酸クロマトグラフィを用いる場合】

別途、DNA クロマト検出試薬（株式会社 TBA；C-PAS (F4)、展開液（改）塩濃度 0 mM、展開液（改）塩濃度 300 mM、ラテックス液）と、滅菌水を用意する。

### 3C. LAMP 反応と検出

- 2B.で調製した LAMP 反応液<Duplex>をタッピングにより混合した後、スピンドアウンを行う。
- 温調可能な装置または恒温槽にセットし 65°C、40 分間 LAMP 反応を行う。
- 下記の通り DNA クロマト反応液を調製する。

試薬	1 テスト分	8+1 テスト分
DNA クロマト展開液（改） 塩濃度 0 mM	5.0 μL	45.0 μL
DNA クロマト展開液（改） 塩濃度 300 mM	5.0 μL	45.0 μL
滅菌水	10.0 μL	90.0 μL
DNA クロマト用ラテックス	1.0 μL	9.0 μL
プレミックス合計	21.0 μL	189.0 μL

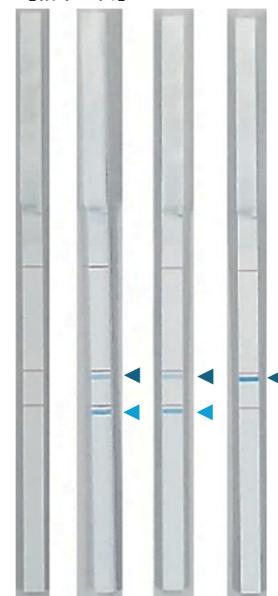
- DNA クロマト反応液を 21.0 μL ずつ、クロマト展開用のキャップ付きチューブに分注する。
- LAMP 反応液を 1.0 μL ずつ添加して、22.0 μL の DNA クロマト反応液を調製する。
 

まず、陰性コントロール用チューブに 陰性コントロール LAMP 反応液を 1.0 μL 添加する。次に、検査対象用チューブに検査対象 LAMP 反応液を 1.0 μL 添加する。最後に、陽性コントロール用チューブに陽性コントロール LAMP 反応液を 1.0 μL 添加する。
- クロマト反応液をタッピングにより混合した後、C-PAS (F4) を 1 本、吸収体を上にしてクロマト反応液が入った展開用チューブに入れ、クロマト反応液に浸し、15 分程度静置する。

### 4C. 結果の判定

- 以下の要件を満たす場合に試験が成立したとする。
  - ・陰性コントロールで青色ラインが認められない。
  - ・シャインマスカット陽性コントロールでブドウ内在性（上◀）とシャインマスカット 識別用（下◀）の二本の青色ラインが認められること。
- 以下の要件を満たす場合にシャインマスカットと判定する。
  - ・シャインマスカット識別用（下◀）の青色ラインが認められること。

#### 【結果の例】



### 備考

- ブドウ品種の確定は専門家にご相談の上、ゲノム解析など詳細な分析を行ってください。
- 本製品は、農林水産省・みどりの食品システム戦略実現技術開発・実証事業（品種識別の開発）の成果によるものです。
- 本製品は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、国立大学法人岡山大学、株式会社ニッポンジーン、株式会社ファスマックが所有する特許のライセンスを受けて製造販売しています。

本製品は、試薬（試験研究用）として販売しているものです。  
医薬品の用途には使用しないでください。