

炭疽病菌検出用プライマーの使用法

1. 炭疽病菌検出用プライマー^{*1}の調製

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(pH8.0) 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、バイエルクロップサイエンス株式会社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「10× 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 Colletotrichum-FIP	0.40 μL	40 μL
100 μM Colletotrichum-BIP	0.40 μL	40 μL
100 μM Colletotrichum-F3	0.05 μL	5 μL
100 μM Colletotrichum-B3	0.05 μL	5 μL
100 μM Colletotrichum-LF	0.20 μL	20 μL
ddWater	1.40 μL	140 μL
Total Volume	2.50 μL	250 μL

以下は、DryAdd™ LAMP Master Mix(Turbidity/Visible Dye)を用いた使用法を記載します。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 μL 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)。

LTV Dissolve Solution の量は下記の量を調製ください(DryAdd™ LAMP Master Mix 添付書類とは異なる量になっています)。

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト
10× Primer Mix	2.5 μL	22.5 μL
LTV Dissolve Solution	6.3 μL	56.7 μL
ddWater	14.2 μL	127.8 μL
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(DNA 抽出は市販キットをご利用ください)

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 66°C で 60 分間、保温します。

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。

