

---

---

**-LAMP 法乾燥試薬-**  
**根こぶ病菌検出キット**

製品説明書（第2版）

---

---

Nippon Gene Material Co., Ltd.

# -LAMP 法乾燥試薬- 根こぶ病菌検出キット

## 【はじめにお読みください】

このたびは、-LAMP 法乾燥試薬- 根こぶ病菌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。この製品説明書をよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用してください。

## 使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いて土壤中の根こぶ病菌を検出・定量解析を行う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. 本キットの保存方法は、【製品内容】(2 ページ)に記載していますのでご確認ください。各試薬は適切な条件下にて保存し、製品ラベルに記載された有効期限 (Exp. date) 内に使用してください。
3. 本キットを使用する際は、この製品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 マテリアル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. 本キットは、株式会社ニッポンジーンが販売する ISOSPIN Fecal DNA (製品コード: 315-08621) とエンドポイント濁度測定装置 LT-16 (製品コード: 313-09261) と組み合わせて使用します。上記組合せ以外の解析を行う場合には、別途お問い合わせください。
5. 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。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 マテリアル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、検査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. 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 マテリアルは、本キットの開発、製造および販売を許諾されています。

# 目次

1. 製品説明 .....	1
根こぶ病菌検出キットの概要	
根こぶ病菌とは	
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法	
2. 製品内容 .....	2
製品内容	
3. 必要な器具、機器、試薬 .....	3
4. 製品使用方法 .....	4
検査の流れ .....	4
検査を行う前の準備および注意事項 .....	5
器具の準備	
検査環境	
作業区域	
核酸除去操作	
詳細な使用方法 .....	6
1. 土壌検体調製	
2. DNA 抽出	
3. 検査反応	
4. 解析	
5. トラブルシューティング .....	12
6. 参考文献・資料 .....	12

# I 製品説明

## 【根こぶ病菌検出キットの概要】

本キットは、「根こぶ病菌密度測定サービス」で用いている、LAMP 法による根こぶ病菌密度測定技術をお客様でもご利用いただけるようにキット化した製品となります。なお、根こぶ病菌の測定（定量）を行うためには、株式会社ニッポンジーンが販売する ISOSPIN Fecal DNA と濁度測定装置が必要となりますので、別途ご準備ください。

DNA サンプルの調製には、ISOSPIN Fecal DNA をご使用ください。なお、株式会社ニッポンジーン ISOIL シリーズや他社から販売されている土壌検体からの DNA 抽出キットは本キット使用において推奨いたしておりませんので、ご注意ください。

LAMP 法による根こぶ病菌の測定（定量）には、濁度測定装置（株式会社ニッポンジーンや栄研化学株式会社より販売）をご使用ください。

濁度測定装置の例：エンドポイント濁度測定装置 LT-16（株式会社ニッポンジーン）

本キットに含まれる根こぶ病菌定量用乾燥試薬には、定量解析に必要な反応試薬が既にミックスされた状態になっておりますので、土壌から ISOSPIN Fecal DNA を用いて精製された DNA と脱イオン蒸留水を加えて、濁度測定装置で反応（65°C、50 分間）するだけで、検査をすることができます。反応後には、濁度検出時間と換算式から根こぶ病菌密度を算出します。

また、濁度測定装置を用いることにより、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、短時間で根こぶ病菌の測定解析を行うことが可能です。

## 【根こぶ病とは】

根こぶ病は、アブラナ科植物に特有の病害であり、一旦発病すると防除が困難な土壌伝染性病害です。本病に感染すると、根に大小さまざまなこぶが多数できます。土壌中からの水分や養分の吸収が妨げられ、晴天の日中に茎や葉が萎れるようになります。生育が遅れて葉色は褪せ、収穫物の品質も低下します。

病原菌 (*Plasmodiophora brassicae*) はカビの一種であり、根こぶの中に多数存在します。こぶが腐ると土壌中に分散し、宿主植物が無くても 4 年以上、ときには 10 年以上も生き残ります。そのため、一度発生した圃場では、長期間にわたって被害が発生する可能性があります。また、農作業にともなう土の移動や降雨などによって、発生圃場から周辺へ広がることが多いです。

## 【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/>

## II 製品内容

### 【製品内容】

-LAMP 法乾燥試薬- 根こぶ病菌検出キット  
48 テスト用

試薬名（頭部ラベル表記）	頭部ラベル色	内容量	本数	保存温度
根こぶ病菌定量用乾燥試薬	-	8 well	6 本	室温
乾燥陽性コントロール （陽性コントロール）	灰色	-	1 本	室温 ※溶解後は-20℃保存
脱イオン蒸留水 （脱イオン蒸留水）	水色	1.2 mL	3 本	室温

製品説明書（本紙）1 部

### 重要

DNA 抽出キット（ISOSPIN Fecal DNA）はキットに含まれておりませんので、別途ご用意ください。

### 取扱い上の注意

- ◆ 本キットは室温（20-25℃）で安定に保存できます。
- ◆ 根こぶ病菌定量用乾燥試薬は、吸湿による劣化を防止するために、同封の乾燥剤と共に元のアルミパックに入れ、チャックを完全に閉じて保管し、製品ラベルに記載された有効期限（Exp. date）内に使用してください。
- ◆ 溶解後の乾燥陽性コントロールは、他の試薬と隔離して、-20℃で保存してください。
- ◆ 誤判定を防ぐため、溶解後の根こぶ病菌定量用乾燥試薬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。
- ◆ 乾燥陽性コントロールは、根こぶ病菌のゲノム DNA に特徴的な配列を含む DNA 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。

### III 必要な器具、機器、試薬

---

本キット以外に下記の器具、機器、試薬をご準備ください。

#### <土壌検体調製>

- 篩 (2 mm 目)
- 篩受け (新聞紙などで代用可)
- はかり (0.1 g 以下を計量可能なもの)

#### <DNA 抽出>

- ISOSPIN Fecal DNA (製品コード: 315-08621)
- 20% (w/v) スキムミルク溶液
- イソプロパノール
- マイクロピペット (10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L)
- ピペットチップ
- 1.5 mL マイクロチューブ
- 遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- インキュベーター (恒温器)

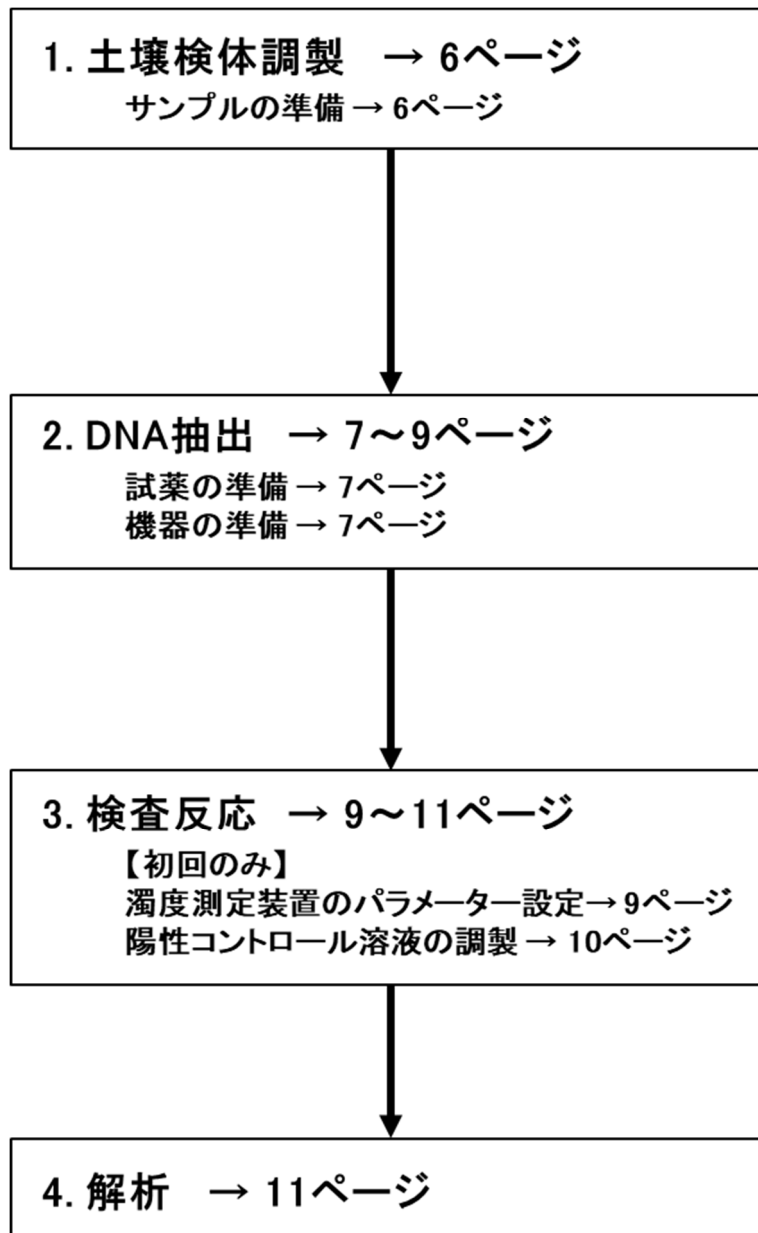
#### <検査反応>

- マイクロピペット (0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L)
- フィルター付マイクロチップ (滅菌済み)
- エンドポイント濁度測定装置 LT-16 (製品コード: 313-09261)
- 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
- 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 0.2 mL チューブ (根こぶ病菌定量用乾燥試薬) 用)

# IV 製品使用方法

---

## 【検査の流れ】



## 【検査を行う前の準備および注意事項】

### 器具の準備

#### ■ 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。



## 【詳細な使用方法】

### 1. 土壌検体調製

#### サンプルの準備

##### ■ 土壌検体採取

##### Step 1. 採取

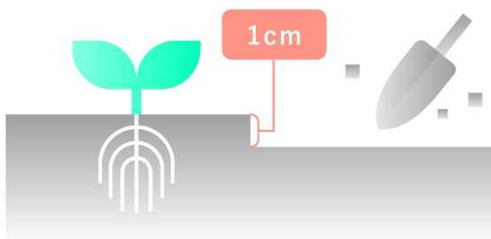


10 a ごとに 1 検体が基本です。  
圃場の 5 ヶ所から土壌 100~200 g を採取し、  
ビニール袋に入れてよく混ぜてください。

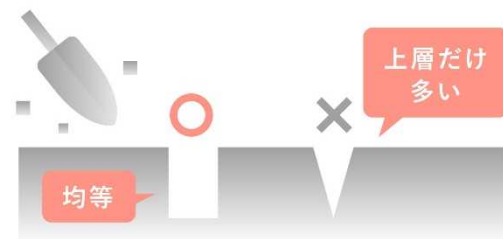


前作に根こぶ病の発生が均一でない場合、  
菌密度が偏っている可能性があります。  
小発生な場所、多発生な場所からそれぞれ  
検体を取ることをお勧めします。

#### 【注意点】



表層 1 cm の土壌は取り除いてください。



土壌はくさび状ではなく、上層と下層が  
均等に取れるように採取してください。

#### ① 土壌検体が篩掛け可能であることを確認します。

注) 以下の場合、新聞紙などの上に広げて、篩にかけることができる程度に  
日陰で数日風乾させてください。

- ・水分を非常に多く含み、にじみ出るような土壌
- ・大きな塊状である

#### ② 篩と篩受けを準備し、土壌検体を入れて、篩掛けします。

注) 同一の篩で異なる土壌検体を処理する場合は、使用ごとに篩を水洗いし、  
水分を完全に拭き取った上で、異なる土壌検体の篩掛けをしてください。

#### ③ 篩下を回収した後、よく攪拌してください。

注) 直ぐに DNA 抽出を行わない場合には、湿気に注意して冷蔵 (4°C) 保管してください。

## 2. DNA 抽出

ISOSPIN Fecal DNA の標準プロトコルでは、土壌検体から DNA 抽出できませんので、ご注意ください。遠心操作は全て室温で行えます。

### 試薬の準備

#### ■ 20% (w/v) スキムミルク溶液

スキムミルク粉末を表記濃度で蒸留水に溶解させた後、オートクレーブ処理（115℃、5 分間）してください。

オートクレーブ後は、小分け分注した後、-20℃で保存してください。

使用前には 60℃程度でインキュベートし、完全に溶解させてからご使用ください。

### 機器の準備

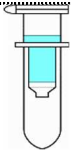
#### ■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、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。

- ① 0.4 g の土壌検体を秤量し、Beads Tube に入れる。
- ② 200  $\mu$ L の 20%スキムミルク溶液と 700  $\mu$ L の FE1 Buffer を添加し、ボルテックスミキサー等で十分に混合する。  
注) 溶液が Beads Tube に入りきらない場合、溶液の一部を添加した後、スピンドウンし、残りの溶液を添加してください。それでも入りきらない場合には、土壌検体量を減らしてください。
- ③ インキュベーター（恒温器）で 60℃、15 分間加温する。  
5 分毎に混和する。  
注) 土壌サンプルと FE1 Buffer の攪拌不十分は低収量の原因となるため、5 分毎にボルテックスミキサー等でよく混合してください。  
混合しても崩れず、懸濁状態にならない場合には、土壌検体量を減らしてください。
- ④ 遠心（20,000  $\times$  g (15,000 rpm) 以上、1 分間）する。
- ⑤ 90  $\mu$ L の FE2 Buffer を添加し、10 回転倒混和した後、4℃に 15 分間静置する。
- ⑥ 遠心（20,000  $\times$  g (15,000 rpm) 以上、15 分間）する。

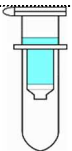
- ⑦ 上清 600  $\mu\text{L}$  を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移す。  
注) 土壌検体の保水能力が非常に高い場合、600  $\mu\text{L}$  の上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑧で添加する試薬の液量比を維持してスケールダウンしてください。

- ⑧ 240  $\mu\text{L}$  の FB Buffer と 240  $\mu\text{L}$  のイソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合する。  
注) FB Buffer とイソプロパノールの添加量は、上清の液量に対して 0.4 倍量です。



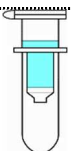
- ⑨ ⑧の混合液を全量 (2 回に分けて) Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 30 秒間) する。  
注) 混合液量が 900  $\mu\text{L}$  より多いため、ステップ⑨~⑩を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加してください。

- ⑩ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。



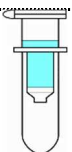
- ⑪ 600  $\mu\text{L}$  の FB Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間) する。

- ⑫ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



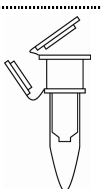
- ⑬ 600  $\mu\text{L}$  の FW Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間) する。

- ⑭ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑮ 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間) する。

- ⑯ ろ液と Collection Tube を捨てる。



- ⑰ Spin Column のカラムを新しい 1.5 mL マイクロチューブの上ののせる。

- ⑱ 50  $\mu\text{L}$  の TE (pH8.0) をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

注) 根こぶ病菌密度の定量結果に影響するため、土壌検体量を減らしたり、ステップ⑦の上清回収液量が少ない場合には、TE (pH 8.0) の添加液量を減らしてください。

例 1) 土壌 0.2g、ステップ⑦上清 600  $\mu\text{L}$   $\Rightarrow$  TE (pH 8.0) 25  $\mu\text{L}$

例 2) 土壌 0.4g、ステップ⑦上清 450  $\mu\text{L}$   $\Rightarrow$  TE (pH 8.0) 37.5  $\mu\text{L}$

⑱ 遠心(13,000×g、1 分間)する。

⑳ DNA 溶液が 1.5 mL マイクロチューブの中に回収される。

注) 直ぐに LAMP 反応を行わない場合には、冷蔵 (4℃) 保管して、1 週間以内に検査を実施してください。

### 3. 検査反応

#### 濁度測定装置の準備

本キットでは濁度測定装置として、エンドポイント濁度測定装置 LT-16 を推奨しております。LT-16 の詳細な使用方法に関しましては、装置の取扱説明書をご確認ください。

① LT-16 起動後のメイン画面から、「MENU」→「PARAM」→「MEAS PARAM」→「BOTH」の順にボタンを押します。

② 測定パラメーター画面が表示されますので、以下のパラメーターを入力します。

- ・ISOTHERMAL TEMPERATURE:  DEGREE
- ・ISOTHERMAL PERIOD:  SECOND
- ・INACTIVATION TEMPERATURE:  DEGREE
- ・INACTIVATION PERIOD:  SECOND
- ・SAMPLING PERIOD:  SECOND
- ・PREHEAT TEMPERATURE:  DEGREE

③ パラメーター入力後、「MEAS PARAM」ボタンを押して、メイン画面に戻ります。

④ メイン画面から、「MENU」→「PARAM」→「CALC PARAM」→「BOTH」の順にボタンを押します。

⑤ 計算パラメーター画面が表示されますので、以下のパラメーターを入力します。

- ・FILTER SIZE OF INTENSITY:
- ・FILTER SIZE OF DIFFERENTIATION:
- ・FILTER SIZE OF SECONDARY DIFFERENTIATION:
- ・DIFFERENTIATION THRESHOLD VALUE:
- ・SECONDARY DIFFERENTIATION THRESHOLD VALUE:

⑥ パラメーター入力後、「CALC PARAM」ボタンを押して、メイン画面に戻ります。

⑦ メイン画面から、「MENU」→「PARAM」→「PARAM SAVE」→「LEFT SIDE」の順にボタンを押して表示されるパラメーター保存画面で、パラメーターに名称を付けて保存します。

注) LT-16 は電源を落としても直前の設定パラメーターが記憶されています。

別の反応条件が設定されていた場合には、「MENU」→「PARAM」→「PARAM LOAD」で保存したパラメーターを読み込んでから、検査を実施してください。

## 陽性コントロール溶液の調製

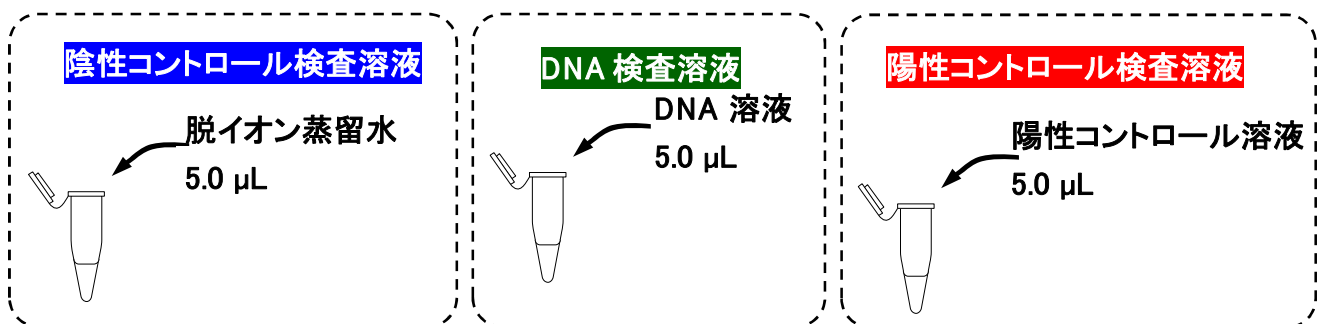
本キットを初めて使用される際、乾燥陽性コントロールから陽性コントロール溶液を調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保管してください。

2 回目以降は、使用前に室温で完全に融解させた後、チューブの腹を指で数回軽く叩く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、スピンドウンを行ってから使用してください。

- ① 乾燥陽性コントロールを取り出します。
- ② 脱イオン蒸留水 100  $\mu\text{L}$  を添加します。  
注) 他の検査試薬へのコンタミネーションを避けるため、ここで用いた脱イオン蒸留水は他の工程で使用しないでください。
- ③ スピンドウンした後、室温に 5 分間静置します。  
注) 乾燥陽性コントロールはチューブの底部に付着しているため、脱イオン蒸留水と確実に接触させてください
- ④ ボルテックスした後、スピンドウンした溶液を陽性コントロール溶液とします。  
注) 溶解後は $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保管してください。

## 検査溶液の調製と LAMP 反応

- ① DNA 溶液の入ったチューブの腹を指で数回軽く叩いて均一にした後、スピンドウンをしてからチューブラックに立てます。  
注) DNA の剪断を避けるため、ボルテックスしないでください。
- ② 脱イオン蒸留水を取り出し、スピンドウンした後、チューブラックに立てます。
- ③ 根こぶ病菌定量用乾燥試薬を必要本数取り出します。  
注) 必要本数 (検体数+コントロール数) のチューブを、氷上 (アルミブロックあるいはプレートラック使用) に立ててください。  
注) 取り出した後、試薬の吸湿を避けるため、残りの試薬は直ちに元のアルミパックで密封してください。  
注) 乾燥試薬がチューブ上方に付着していた場合、チューブを軽く振って、乾燥試薬をチューブ底に落としてからキャップを開ける様にしてください。
- ④ 各チューブに脱イオン蒸留水 20  $\mu\text{L}$  を添加します。
- ⑤ サンプル 5.0  $\mu\text{L}$  を添加した後、キャップを閉じてスピンドウンします。



注) サンプルの添加は必ず、1. 脱イオン蒸留水→2. DNA 溶液→3. 陽性コントロール溶液の順に行ってください

⑥ 2 分間経過後、5 回転倒混和してからスピンドウンしてください。

注) 細かい気泡が生じますが、少しであれば検査反応には影響ありません。  
気泡がたくさん見られるもしくは大きな気泡が見られる場合には、  
チューブの向きを変えて、再度スピンドウンしてください。

⑦ チューブを LT-16 にセットした後、メイン画面の「START」ボタンを押して、反応を開始します。

注) チューブをセットする際、サンプルホルダ温度が少し低下します。  
チューブをセットした後、サンプルホルダ温度が 65°C になったことを確認してから、「START」ボタンを押してください。

#### 4. 解析

① 反応終了後、LT-16 Manager を使って、データをパソコンに保存します。

注) 測定中は、メイン画面左上の「MEASURE」ランプが緑色に点灯（終了後は消灯）し、  
その横の「PROGRESS TIME」の時間表示も緑文字（終了後は白文字）となっています。  
測定中に「STOP」ボタンを押すもしくは電源 OFF された場合には、  
途中経過も含め、一切のデータが得られませんので、ご注意ください。

注) LT-16 には直近データのみ記録されます。次の反応を開始（START ボタンを押す）すると  
データが消えてしまいますので、必ず、LT-16 Manager でデータをパソコンに保存してください。

②  $T_t$  に表示された検出時間を秒数にしてから、下記の換算式を用いて、秒数を菌密度（log 値）に換算します。

$$Y = aX^b - b$$

(X = 検出時間 (秒))

注) 本換算式は以下の組合せの場合のみ、利用可能です。

DNA 抽出:

根こぶ病菌検査キット:

濁度測定装置:

③ 菌密度（log 値）を根こぶ病菌密度（個/g）に換算します。

$$\text{根こぶ病菌密度 (個/g)} = 10^Y$$

注) 本キットによる測定では「千の位まで有効」となります。そのため、換算された「根こぶ病菌密度」は  
百の位で四捨五入してください。

「根こぶ病菌密度」が 1,000 (個/g) 以下の場合には、切り上げて 1,000 (個/g) としてください。

「根こぶ病菌密度」が 190,000 (個/g) より多い場合には、> 190,000 (個/g) としてください。

例) 検出時間 ( $T_t$ ) が 19:00 の場合

②に従って、X = 1140 (秒) から換算式を用いて菌密度 (log 値) に換算  $\Rightarrow Y \doteq c$

③に従って、根こぶ病菌密度 (個/g) に換算した後、百の位で四捨五入  $\Rightarrow 10^c \doteq d \Rightarrow d$  (個/g)

## V 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。その他のご不明な点については株式会社ニッポンジーン マテリアルまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
正確な結果を示さない（濁度が上昇しているが、解析結果が一致しない）	<p>A. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 陰性コントロールによる反応を実施し、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。</p> <p>B. 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>
正確な結果を示さない（濁度が上昇してない）	<p>A. DNA サンプルの鋳型 DNA 濃度が低い、もしくは抽出されていない。 ISOSPIN Fecal DNA の製品プロトコルでは DNA 抽出できません。7 ページの「2. DNA 抽出」をご確認ください。また、下記のトラブルシューティングもご確認ください。</p> <p>B. 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>
低収量	<p>Spin Column のメンブレンに DNA を吸着させるステップ⑨で、添加する混合液（上清:FB Buffer: イソプロパノール=2.5:1:1）の攪拌が不十分である。 混合液の液量比を守り、よく攪拌してから Spin Column へ添加する。</p> <p>TE (pH 8.0) を Spin Column へ添加するステップ⑩の溶出時間が短い場合、DNA 収量にばらつきが生じる。 室温で3分間静置してから遠心する。</p>
低濃度	<p>溶出液量が多い。 必ず 50 <math>\mu</math>L の TE (pH 8.0) で溶出してください。 また、土壌検体量を減らしたり、ステップ⑦の上清回収液量が少ない場合には、TE (pH 8.0) の添加液量を減らしてください。</p>
低純度	<p>ステップ⑤で、FE2 Buffer の混合が不十分、もしくは FE2 Buffer 後に激しく攪拌した。 温度が高いまま FE2 Buffer を添加すると、析出物が生じ難くなり、夾雑物が残留する原因になるので、遠心 (20,000 <math>\times</math> g (15,000 rpm) 以上, 1分間) してから添加してください。 激しく攪拌した場合、夾雑物の残留が増加する原因となるので、転倒混和十分に混合してください。</p>

## VI 参考文献・資料

- 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
- 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2022年5月現在のものです。最新の製品説明書は株式会社ニッポンジーン マテリアル ホームページからダウンロードしてください。
- ・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。

本キットに関するお問い合わせ先	
<b>株式会社ニッポンジーン マテリアル</b>	
TEL	076-411-0277
FAX	076-452-0399
E-mail	info@nippongenematerial.com
URL	<a href="https://www.nippongenematerial.com">https://www.nippongenematerial.com</a>