

ToBRFV 検出用プライマーの使用方法

1. ToBRFV 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 μ M に調製)

Data Sheet 記載の 100 μ M 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、東京大学 植物病院[®]により開発されました。

*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 μ M 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 μ M ToBRFV-FIP	0.40 μ L	40 μ L
100 μ M ToBRFV-BIP	0.40 μ L	40 μ L
100 μ M ToBRFV-F3	0.05 μ L	5 μ L
100 μ M ToBRFV-B3	0.05 μ L	5 μ L
100 μ M ToBRFV-LF	0.20 μ L	20 μ L
100 μ M ToBRFV-LB	0.20 μ L	20 μ L
ddWater	1.20 μ L	120 μ L
Total Volume	2.50 μL	250 μL

2. 検査反応液調製

上記で作成した 10× Primer Mix と植物病検査用 LAMP Primer セット専用 RNA 増幅試薬(NE6051)を組み合わせをご使用ください。使用方法については、植物病検査用 LAMP Primer セット専用 RNA 増幅試薬の取り扱い説明書をご参照ください。

植物病検査用 LAMP Primer セット専用 RNA 増幅試薬付属の反応添加液(ラベル：白色)は一反応あたり 5 μ L をご使用ください。

2.1 反応液の調製

試薬調製用チューブに下表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。

試薬	1 テスト分	例) 8+1 テスト分の場合
ddWater	9.6 μ L	86.4 μ L
10x RT-LAMP バッファー	2.5 μ L	22.5 μ L
反応添加液	5.0 μ L	45.0 μ L
dNTPs Mixture	1.4 μ L	12.6 μ L
10x Primer Mix	2.5 μ L	22.5 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
マスターミックス合計	23.0 μ L	207.0 μ L

2.2 マスターミックスの分注

反応用チューブを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 23.0 μ L ずつ分注します。

2.3 鋳型 RNA の添加 (RNA 抽出は市販キットをご利用ください)

鋳型 RNA 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、スピンドアウンを行います (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れると反応効率が著しく低下しますので、ミネラルオイルを 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クラーを使用する場合にはミネラルオイルの添加は不要です。

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 60°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。

