Phytophthora colocasiae の LAMP 法による検出

- LAMP プライマーMix・2×Reaction mixture (2×R) の組成
- LAMP 反応液の組成・SYBR Green® I を用いた発色による検出
- LAMP 試薬リスト・試薬作成法
- NARM+タチガレン培地作製法
- 検出法
- 菌体からの DNA 抽出法
- 土壌からの DNA 抽出法

◆ LAMP プライマーMIX の組成

F3 (100 µM)	1.25 µL	2.5 µL
B3 (100 µM)	1.25 µL	2.5 µL
FIP (100 µM)	10 µL	20 µL
BIP (100 µM)	10 µL	20 µL
FLoop (100 µM)	5 µL	10 µL
BLoop (100 µM)	5 µL	10 µL
SDW	67.5 µL	135 µL
Total	**100 µL**	**200 µL**

表1. *P. colocasiae* LAMP プライマーセット

プライマー配列		塩基数	検出感度	反応温度
Col-F3	5'-GGACTTTGTGAGTTTCAG-3'	18	100 fg	**65℃**
Col-FIP	5'-CTAGAGAATACCACCAAGTCATGAAGAGGTCCTGTGAGGT-3'	40		
Col-B3	5'-CCACGGTAGTAGCTGCTAGT-3'	20		
Col-BIP	5'-GTTGTGCCAACTCCCTTGTGAATCGTGCGGAAACGCTC-3'	38		
Col-LB	5'-CTCCTGTAGTGGGACACGG-3'	19		
Col-LF	5'-GCAATCCTGATAGA-3'	14		

◆ 2×Reaction mixture (2×R)

滅菌水	260 µL
1M Tris-HCl (pH 9.0)	40 µL
1M KCl	20 µL
10% Tween20	20 µL
5M betaine	368 µL
100 mM $MgSO_4$	160 µL
1M $(NH_4)_2SO_4$	20 µL
100 mM dNTPs	28 µL×4
Total	**1000 µL**

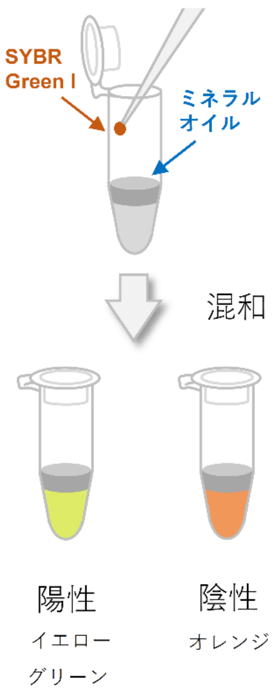
◆ LAMP 反応液の組成（1 サンプルあたり）

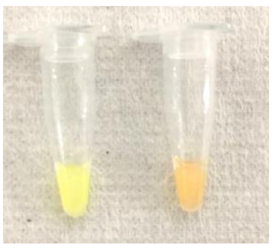
鋳型 DNA	2 µL	
2×R	12.5 µL	
Primer Mixture	4 µL	
Bst DNA Polymerase	1 µL	
滅菌水	5.5 µL	
Total	**25 µL**	
ミネラルオイル	20 µL	(発色による検出を行う場合)

- ✓ 発色による検出を行う場合、<u>反応液分注後</u>各チューブに 20 µL のミネラルオイルを反応液上に重層する。その後、鋳型 DNA を添加する。
- ✓ ポジティブコントロールとして菌体抽出 DNA 100 pg を用いる。
- ✓ 反応液はコンタミを防ぐためクリーンベンチ内で調整する。
- ✓ 酵素の失活を防ぐため低温下で調整する。

◆ SYBR Green® I を用いた発色による検出

65℃で 60 分間反応後、80℃で 5 分間インキュベートし、酵素を失活させる。
蓋を開け、2 µL の SYBR Green® I（×10,000 の試薬を滅菌水で 10 倍希釈し×1,000 に調整）を壁面に滴下し、蓋を閉めてスピンダウン後、タッピングで混和する。





陽性　　陰性

◆ LAMP 試薬リスト

Bst DNA Polymerase （1,600 unit)
　　ニッポンジーン： 311-07481 （冷凍保存）　　　¥11,000

dNTP Set, 100 mM Solutions（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）4×25 μmol
　　GE ヘルスケアライフサイエンス： 28406551 （冷凍保存）　　　¥22,400

ベタイン溶液 (Betaine solution 5 M, PCR Reagent）
　　Merck： B0300-5VL （冷蔵保存）　　　¥19,800

ミネラルオイル (Mineral oil for molecular biology, BioReagent, light oil)
　　Merck： M5904-5ML （室温保存）　　　¥ 2,750

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (50 μl×10）
　　タカラバイオ： 5761A （遮光、冷凍保存）　　　¥46,000

◆ 試薬作成法

1M Tris-HCl (pH 9.0)

Tris(hydroxymethyl) aminomethane (M.W.=121.14; 丸石化学薬品工業株式会社）12.11g を蒸留水 80 mL に溶解し、5 N 塩酸で pH 9.0 に調整後、蒸留水で 100 mL とし、120℃ で 20 分間オートクレーブ滅菌する（4℃保存）。

10% Tween20

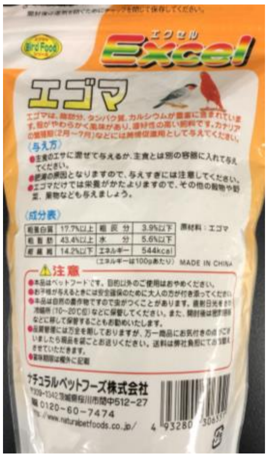
天秤上でスターラーバーをあらかじめ入れておいた 200 mL ビーカーにマイクロピペットを使って Tween20 を 10g 入れ、100g になるまで超純水を添加しよく撹拌する。均一に溶けたことを確認して 0.2 μm フィルターでろ過滅菌する（4℃保存）。

◆ 捕捉法用のエゴマトラップの作成法

エゴマ種子： 小鳥用の餌（ホームセンターで購入）
お茶パック： 95×70 mm 程度のもの

エゴマ種子は電子レンジまたはオートクレーブで滅菌する。 ※ 電子レンジの場合 600W で 5 分くらい

お茶パックに滅菌したエゴマ種子を 30~50 粒入れる。



◆ NARM＋タチガレン培地作製法

i）組成

Cornmeal agar	3.4 g	終濃度
Agar（希釈平板用）	2.0 g	(1.0%)
Agar（一般分離用）	1.0 g	(0.5%)
Nystatin　(10mg / mL)	200 µL	(10 ppm)
Ampicillin (250mg / mL)	200 µL	(250 ppm)
Rifampicin (10mg / mL)	200 µL	(10 ppm)
Miconazole (1mg / mL)	200 µL	(1 ppm)
Hydroxyisoxazole（タチガレン 30%）	166 µL	(250 ppm)
H_2O	200mL	

ii）つくり方

Cornmeal agar	3.4 g
Agar	1.0 g
H_2O	200 mL

↓

オートクレーブ

↓

50℃まで冷ます

↓

｜←Ampicillin (*1000)　200 µL

｜←三種混合（*1000)　200 µL

↓←タチガレン　166 µL

手早く攪拌

10mL / plate　駒込ピペットで分注

iii）ストック（*1000）

Ampicillin	1000 mg
H_2O	4 mL

Nystatin	40 mg
Rifampicin	40 mg
Miconazole	4 mg
DMFA	4 mL

それぞれ 200µl ずつチューブに分注、冷凍保存

iv）試薬

・コーンミールアガー（BBL Corn Meal Agar)	Becton, Dickinson and Company	REF 211132 (500g)	23,520 円
・寒天（Bacto Agar)	Becton, Dickinson and Company	REF 214010 (450g)	31,900 円
・Nystatin	シグマ	N3503-5MU	12,000 円
・Ampicillin Sodium	和光	012-23303 (10g)	5,600 円
・Rifampicin	和光	189-01001 (1g)	4,900 円
・Miconazole Nitrate	和光	134-12661 (1g)	3,000 円
・Dimethylformamide	和光	049-02914 (100 mL)	1,500 円

◆ 検出法

1．植物体－LAMP（病斑から直接水抽出）

罹病植物体からビーズ破砕処理および熱処理によって DNA を抽出し、LAMP 反応に用いる。

（準備）

1/4 インチステンレスビーズを 2 mL チューブに 1 個入れ、蓋をゆるく締めてオートクレーブ滅菌する。

［手順］

1. 適量の罹病植物組織（葉　約 5 mm 角、茎　約 5 mm×2 本）をステンレスビーズ入り 2 mL チューブに回収する。

2. 滅菌水を 300 µL 加え、約 1 分間ヴォルテックスする。

3. ヒートブロックなどにて 98℃、8 分間処理する。

4. 2 mL チューブが冷めた後 4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。再度 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。

5. 2 µL を鋳型 DNA として LAMP に供試する。

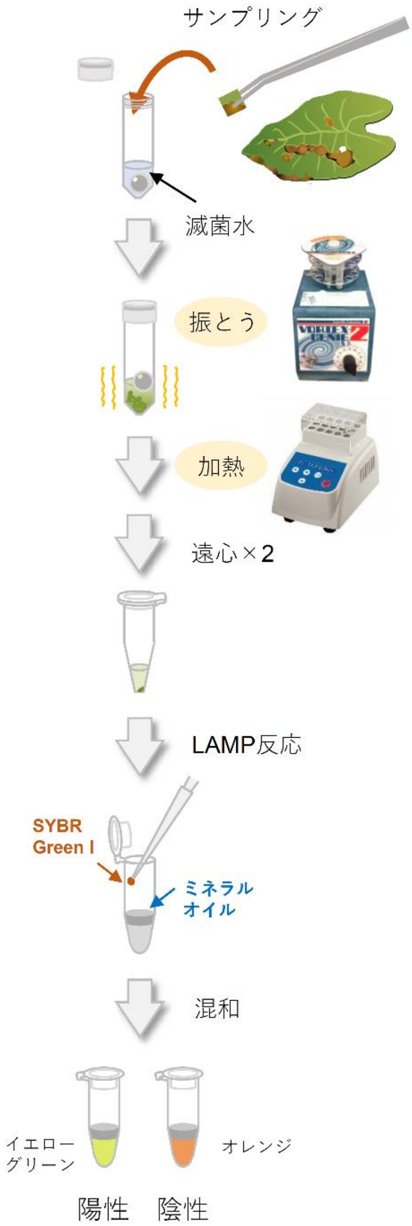


図 1.　植物体－LAMP による検出

2. 植物体－培養－LAMP（分離培養し含菌寒天から水抽出）

選択培地で分離培養した菌体（含菌寒天）からビーズ破砕処理および熱処理によって DNA を抽出し、LAMP 反応に用いる。

（準備）

1/4 インチステンレスビーズを 2 mL チューブに 1 個入れ、蓋をゆるく締めてオートクレーブ滅菌する。

［手順］

1. 病斑を NARM＋タチガレン培地に置床し、25℃で 1～5 日間培養する。
2. 伸びてきた菌糸を含む培地約 3 mm 角×6 個をステンレスビーズ入り 2 mL チューブに回収する。
3. 滅菌水を 300 µL 加え、約 1 分間ヴォルテックスする。
4. ヒートブロックなどにて 98℃、8 分間処理する。
5. チューブが冷めた後 4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。
6. 2 µL を鋳型 DNA として LAMP に供試する。

図 2.　植物体－培養－LAMP による検出

3. 植物体抽出 DNA からの検出（DNA 抽出キット利用）　<u>（推奨）</u>

カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 で罹病植物体から DNA を抽出し、LAMP 反応に用いる。

（準備）

1/4 インチステンレスビーズを 2 mL チューブに 1 個入れ、蓋をゆるく締めてオートクレーブ滅菌する。

カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2

［手順］

1. 適量の罹病植物組織（葉　約 5 mm 角、茎　約 5 mm×2 本）をステンレスビーズ入り 2 mL チューブに回収し、Solution A を 100 μL 添加する。1 分間ヴォルテックスし、よく攪拌する。
2. ヒートブロックなどにて 98℃、8 分間処理する。
3. チューブが冷めた後、Solution B を 14 μL 添加し、ヴォルテックスでよく攪拌する。
4. 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。再度 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。
5. TE buffer で 20 倍に希釈する。
6. 2 μL を鋳型 DNA として LAMP に供試する。

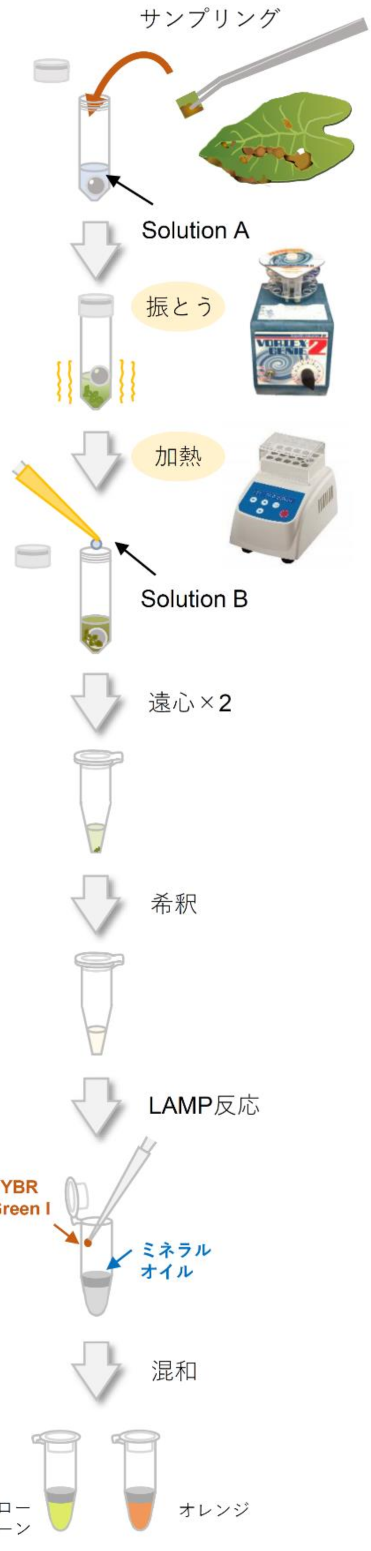


図 3.　植物体抽出 DNA からの検出

4. 水からの検出（メンブレン-培養-LAMP による検出）

水をメンブレンフィルターによってろ過し、選択培地によって分離培養した菌体（含菌寒天）からビーズ破砕処理および熱処理によって DNA を抽出し、LAMP 反応に用いる。

（準備）

1/4 インチステンレスビーズを 2 mL チューブに 1 個入れ、蓋をゆるく締めてオートクレーブ滅菌する。
メンブレンフィルターをオートクレーブ滅菌する。

［手順］

1. 約 4 L の水をメンブレン（Durapore® Membrane Filter、親水性 PVDF、ポアサイズ 5 µm）を通して吸引ろ過する。
2. メンブレンを裏返して NARM＋タチガレン培地に置床し、25℃で 1～5 日間培養する。
3. 伸びてきた菌糸を含む培地約 3 mm 角×6 個をステンレスビーズ入り 2 mL チューブに回収する。
4. 滅菌水を 300 µL 加え、約 1 分間ヴォルテックスする。
5. ヒートブロックなどにて 98℃、8 分間処理する。
6. チューブが冷めた後 4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。
7. 2 µL を鋳型 DNA として LAMP に供試する。

図 4.　メンブレン-培養-LAMP
による水からの検出

5. 捕捉法による土壌からの検出（サトイモ葉およびエゴマ種子で捕捉して検出）

サトイモ葉およびエゴマ種子を用いた捕捉法によって土壌より分離培養した菌体（含菌寒天）からビーズ破砕処理および熱処理によって DNA を抽出し、LAMP 反応に用いる。

（準備）

1/4 インチステンレスビーズを 2 mL チューブに 1 個入れ、蓋をゆるく締めてオートクレーブ滅菌する。
エゴマ種子を電子レンジまたはオートクレーブで滅菌する（電子レンジの場合 600W で約 5 分）。

[手順]

1. 3 L 容のタッパーウエアに土壌 200g を入れ、その上から蒸留水を加える。浮いてくる残渣をペーパータオルで取り除き、一晩静置しておく。翌日、浮いてきた残渣を再度取り除く（※）。

   サトイモ葉の場合： 葉の表面が水につくように裏返して浮かべる。病斑ができてきたら約 5 mm 角に切り出し、NARM＋タチガレン培地に置床する。25℃で 1～5 日間培養する。

   エゴマ種子の場合：滅菌した種（30～50 粒）をお茶パックに入れて浮かべる。1 週間後に取り出し、NARM＋タチガレン培地に置床する。25℃で 1～5 日間培養する。

2. 伸びてきた菌糸を含む培地約 3 mm 角×6 個をステンレスビーズ入り 2 mL チューブに回収し、 滅菌水を 300 μL 加え、約 1 分間ヴォルテックスする。

3. ヒートブロックなどにて 98℃、8 分間処理する。

4. チューブが冷めた後 4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収する。

5. 2 μL を鋳型 DNA として LAMP に供試する。

※ 残渣を丁寧に取り除かないと NARM+タチガレン培地を使っても *Pythium* が分離されてしまいます。

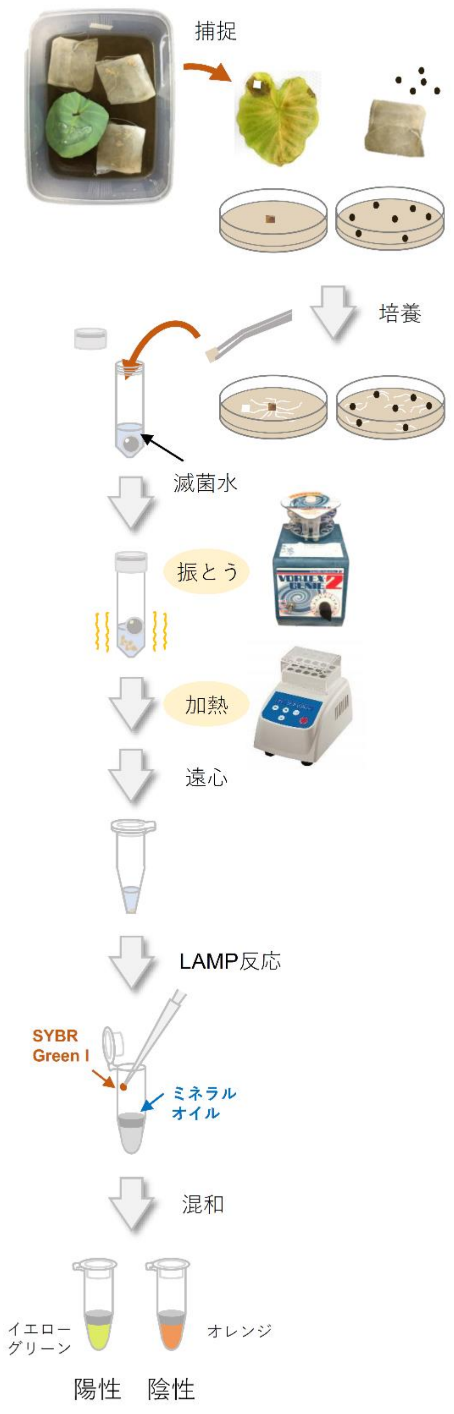


図 5. 捕捉法と LAMP を組み合わせた土壌からの検出

◆ 菌体からの DNA 抽出法

PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent（Thermo Fisher Scientific）

※DNase free のチューブを使用すること
※チップがペレットに触れないように注意

50 µL（／サンプル）の PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent に
等量の滅菌水を混ぜて 1/2 希釈する

↓

100 µL の 1/2 希釈液を 1.5 mL チューブに分注する

↓

白金線でシャーレから菌糸を掻き取り、約 10 mg（耳かき 1 杯の半分ほど）の菌糸塊を 50 µL の 1/2 希釈液に懸濁する

↓

95～100 ℃で 10 分間インキュベートする（インキュベート中に 2～3 回タッピングで混和する）

↓

2 分間室温で放熱し、遠心器の最大速度（～15,000 rpm）で 2 分間遠心分離する

↓

80 µL 程度の上済を新しい 1.5 mL チューブに回収する

↓

濃度を測定し、100 pg/µL に調整して 1 µL（100 pg）を LAMP 反応に供試する

◆ 土壌からのDNA抽出法

Extrap Soil Kit Plus ver.2 （日鉄環境(株)）

※DNase freeのチューブを使用すること
※チップがペレットに触れないように注意

➢ 用意するもの(主なもの)

Extrap Soil Kit Plus ver.2	日鉄住金環境(株)
70%エタノール	
TE buffer (溶出液)	
1.5 mL & 2mL チューブ	
マグネチックスタンド	Magical Trapper, TOYOBO
細胞粉砕装置	Micro Smash MS-100, トミーメディコ
ヒートブロック	
真空乾燥機	

細胞破砕

① Bead Tubes に、土試料 0.5 g、Extraction Buffer 950 μL、Lysis Solution 50 μL を添加する。
② ボルテックスミキサーで 5 秒間撹拌する。
③ ビーズビーティング(4,200 rpm、30 秒間) 後、 遠心 (14,000×*g*, 5 分, 4℃)

タンパク質除去

④ 上清 600 μL を 1.5 mL チューブに移し、PP Solution 300 μL を添加する。
⑤ ④のチューブを 10 回程度転倒混和し、撹拌する。
⑥ 遠心(14,000×*g*, 5 分, 4℃)
⑦ 上清 800 μL を 2 mL チューブに移す。

磁性ビーズによる精製

⑧ ⑦ のチューブに MBs Solution 50 μL、 Binding Solution 890 μL を添加する。
⑨ ⑧のチューブを 2 分間程度転倒混和し、よく撹拌する。
⑩ ⑨のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットする。
⑪ 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
⑫ ⑪のチューブに Washing Solution 800 μL を添加し、ボルテックスミキサー(低速)で十分に撹拌する。
⑬ ⑫ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットして 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。

⑭　70%エタノール溶液 1 mL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で十分に攪拌する。
⑮　⑭ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドで 1 分以上集磁したのち、マイクロピペット を使用してエタノールを除去する。
⑯　⑭～⑮ の工程を再度繰り返す。

DNA 溶出

⑰　10 分間真空乾燥後 100 µL TE バッファーを添加し，ボルテックスミキサー（低速）で十分に攪拌する。65℃で途中攪拌しながら 10 分加温。
⑱　⑰ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにチューブをセットして集磁したのち、磁性ビーズをとらないように注意しながら、すべての溶出液を新しいチューブに移す。