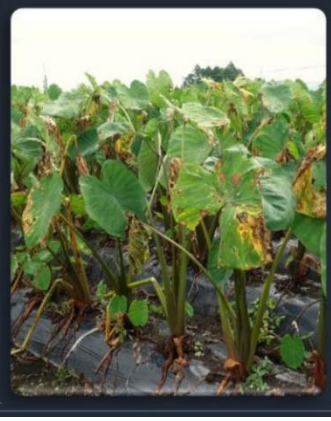
Phytophthora 属菌 検出マニュアル



Phytophthora 属菌 検出マニュアル

目次

1 検出の流れ ····· 2
2 DNA 抽出 ····· 4
2.1 菌体からの DNA 抽出 ····· 4
2.2 植物からの DNA 抽出 ····· 5
2.3 土壌からの DNA 抽出 ····· 7
3 LAMP 法による検出 ····· 9
3.1 LAMP 反応の留意点（共通）····· 9
3.2 LAMP プライマーMix（共通）····· 10
3.3 蛍光 LAMP（シンプレックス･マルチプレックス LAMP）····· 20
3.3.1 液体試薬 Isothermal Mastermix ····· 20
3.3.2 等温増幅蛍光測定装置 Genie® II/III および Genelyzer™ F II/F III による反応手順 ····· 22
3.3.3 StepOne™/StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムによる反応手順 ····· 25
3.4 濁度 LAMP ····· 28
3.4.1 自作試薬 ····· 28
3.4.2 リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA®による反応手順 ····· 29
3.5 目視 LAMP ····· 31
3.5.1 目視 LAMP の反応手順 ····· 31
4 PCR 法による検出 ····· 32
4.1 PCR の留意点（共通）····· 32
4.2 PCR プライマー（共通）····· 33
4.3 PCR（シンプレックス･マルチプレックス PCR）····· 34
4.3.1 試薬 *TaKaRa Taq*™ Hot Start Version（タカラバイオ）····· 34
4.3.2 サーマルサイクラーによる反応および電気泳動による検出手順 ····· 35
5 PCR-RFLP 法による簡易種同定 ····· 37
6 相同性検索（Local BLAST）····· 41
6.1 バーコード領域／遺伝子のシーケンス解析 ····· 41
6.2 基準菌株のデータベースによる相同性検索 ····· 45
7 ストック試薬･培地調製法 ····· 49
8 使用機器および器具 ····· 61
9 文献 ····· 64
10 トラブルシューティング ····· 67

1　検出の流れ

〔疫病菌を分離培養して検出する場合〕

選択倍地（タチガレン添加 NARM 寒天培地）を用いて疫病菌を分離する。

（所要日数 1～5 日）

↓

菌糸先端を V8 ジュース寒天培地に置床し、充分に生育させる。（所要日数 2～7 日）

↓

分離菌株を保存用 CMA スラントへ移植し、残りの培養物から PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて DNA を抽出する。

（所要時間 約 1 時間）

↓

LAMP / PCR で標的種の有無を検定する。

LAMP 検出対象: 重要種（*P. ramorum*、*P. kernoviae*、*P. lateralis*、*P. nicotianae*、*P. phaseoli*）+ 全種

PCR 検出対象: 重要種（*P. nicotianae*）+ 全種　（所要時間 LAMP: 約 60～80 分 / PCR: 約 3 時間）

〔植物組織から DNA を抽出して検出する場合〕

カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2（カネカ）を用いて DNA を抽出する。
必要に応じ、OneStep PCR Inhibitor Removal Kit（Zymo Research）を用いて、
抽出 DNA を追加精製する。　（所要時間 約 30 分+約 10 分）

〔土壌から DNA を抽出して検出する場合〕

Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境）を用いて DNA を抽出する。

（所要時間 約 90 分）

↓

LAMP / PCR で標的種の有無を検定する。

LAMP 検出対象: 重要種（*P. ramorum*、*P. kernoviae*、*P. lateralis*、*P. nicotianae*、*P. phaseoli*）+ 全種

PCR 検出対象: 重要種（*P. nicotianae*）+ 全種　（所要時間 LAMP: 約 60～80 分 / PCR: 約 3 時間）

〔種を網羅的に検出する場合〕

属特異的プライマーによる PCR で標的 DNA を増幅する。　（所要時間 約 2 時間）

↓

増幅産物を制限酵素処理し、電気泳動で RFLP バンドパターンを取得する。

（所要時間 約 5 時間）

↓

バンドパターン検索システムで種を推定する。

PCR-RFLP 検出対象: 全種　（所要時間 約 30 分）

図1　疫病菌検出の全体図

2 DNA 抽出

2.1 菌体からの DNA 抽出

PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent（Thermo Fisher Scientific）

（所要時間 約 30 分）

［手順］

1. （必要な分をまとめて作成する）1 サンプルあたり 50 μL の PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent に等量の滅菌水を混ぜて 1/2 希釈する。

2. 100 μL の 1/2 希釈液を 1.5 mL チューブに分注する。

3. 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 100 μL の 1/2 希釈液に懸濁する。

4. 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）。

5. 2 分間室温で放熱し、遠心機の最大速度（15,000 rpm）で 2 分間遠心する。

6. 約 80 μL の上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し（※）、LAMP または PCR に供試する。

※ このとき菌体ペレットにチップが触れないように注意する。

2.2 植物からの DNA 抽出

カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2（カネカ）
（所要時間 約 30 分）

（準備）ステンレスビーズ(1/4 インチ)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. ステンレスビーズ(1/4 インチ)の入った 2 mL チューブに Solution A を 200 μL 加え、植物組織(※)を回収し、ボルテックスで 5 分間振とう破砕する。

   ※ 葉は 5 mm 角、茎は 5 mm×2 本分を回収する。
   コントロールとして健全な組織からも DNA を抽出する。

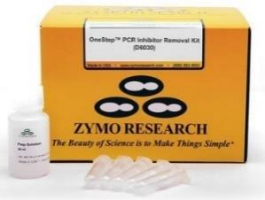
2. ブロックインキュベーターで 98℃、8 分間インキュベートする。

3. 室温で 10 分放置してチューブを冷まし、Solution B を 28 μL 加え、ボルテックスで撹拌する。

4. 卓上遠心機で 3 分間遠心し、新しい 1.5 mL チューブに上清を回収する。もう一度、卓上遠心機で 3 分間遠心し、上清を滅菌水で 20 倍に希釈して(※)、LAMP または PCR に供試する。

   ※ 冷蔵で長期保存する場合は TE buffer で希釈する。
   原液は検定が終わるまで保存し、必要に応じて次項の追加精製に用いる。

【追加精製する場合】
OneStep PCR Inhibitor Removal Kit（Zymo Research）
（所要時間 約 15 分）



（準備）カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 による DNA 抽出液は原液を用いる。

［手順］

1. Collection tube に Zymo-spin III-HRC filter をセットし、
   600 μL の Prep solution を添加して、8,000×*g* で 3 分間遠心する（速度に注意）。

2. Zymo-spin III-HRC filter を新しい 1.5 μL チューブに移し、50～200 μL の抽出液（希釈前の原液）を加え、16,000×*g* で 3 分間遠心する（速度に注意）。

3. 溶出液を LAMP または PCR に供試する。

2.3 土壌からの DNA 抽出

Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄環境）
（所要時間 約 90 分）

必要な器具・機器

・ マグネティックスタンド 1.5 mL 12 本用
推奨製品 MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands
（プロメガ, カタログ番号 Z5342）

・ ビーズ破砕機
推奨製品 ビーズ式細胞破砕装置 Micro Smash™ MS-100（トミーメディコ）

［手順］

1. Bead Tubes（キット付属）に、土壌 0.5 g（液状の場合～500 μL）、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. ビーズ破砕機で 4,200 rpm で 30 秒間、振とう破砕する。

4. 遠心（14,000×g, 5 分間, 4℃）し、上清 600 μL を新しい 1.5 mL チューブに移す。

5. PP Solution 300 μL を添加し、10 回転倒混和する。

6. 遠心（14,000×g, 5 分, 4℃）し、上清 800 μL を新しい 2 mL チューブに移す。

7. MBs Solution 50 μL、 Binding Solution 890 μL を添加し、2 分間転倒混和する。

8. 卓上遠心機でスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットする。1 分以上集磁したのち、上清を除去する（※）。

※ 上清には PCR 阻害物質が含まれているので、できる限り取り除く。磁性粒子には DNA が吸着されているので、除去しないように注意する。

9. Washing Solution 800 μL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で充分に撹拌する。

10. 卓上遠心機でスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットする。1 分以上集磁したのち、上清を除去する。

11. 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)で充分に撹拌する。

12. 11. 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。1 分以上集磁したのち、エタノールを除去する(※)。

※ エタノールはできる限りしっかりと取り除く。エタノールが残っていると DNA が溶出しにくくなり、回収量が低下する。

13. 11.～12. の工程を繰り返す。

14. チューブの蓋をあけたまま、室温で 10 分間程度風乾する(※)。

※ 磁性粒子は風乾してもサラサラにならない。

15. 滅菌水(※)100 μL を添加後、ボルテックスミキサー(低速)で充分に撹拌する。

※ 冷蔵で長期保存する場合は TE buffer を用いる。

16. 65℃のブロックインキュベーターで 5～10 分間加温する。途中で数回撹拌する。

17. 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、溶出液を新しい 1.5 mL チューブに回収して、LAMP または PCR に供試する。

3 LAMP 法による検出

3.1 LAMP 反応の留意点（共通）

〔反応液の調整について〕

- 反応液はクリーンベンチ内で調製し、検体 DNA はクリーンベンチ外で添加する。（増幅された DNA のエアロゾルによるコンタミネーションを防ぐため。）

- ピペットマン、チップ、チューブ、滅菌水を可能な限り、LAMP 反応専用にする。チップはフィルター付チップを用いる。（コンタミネーションを防ぐため。）

- 反応液は氷上またはアイスブロックなどを用いて低温下で調整する。鋳型 DNA 添加後は 5 分以内に反応を開始する。（非特異的な増幅を防ぐため。）

〔反応系について〕

- 陰性コントロールとして鋳型 DNA の替わりに滅菌水を添加したもの、陽性コントロールとして 100 pg（プライマーの特異性検定の濃度）および 1 pg または 100 fg（検出限界の濃度）の菌体 DNA を添加したものを同時に反応させる。菌体 DNA は「菌体からの DNA 抽出（p. 4）」を参照して抽出する。植物の場合、「植物からの DNA 抽出（p. 5）」を参照して健全な組織から抽出した DNA を同時に反応させる。

- 空のウェルがある場合は反応液と等量の滅菌水を入れる。

- 植物および土壌から抽出した DNA は反応系への添加量に注意する。
（一般に鋳型添加量を増やすことで検出感度の向上が期待できるが、増幅反応を阻害する夾雑物が多く含まれる場合は 10～100 倍程度希釈して添加すると反応が改善する場合がある。）

- 2 反復以上の検出を行う。（検出限界に近い微量な DNA を確実に検出するため。）

- （蛍光検出の場合）会合曲線 または 融解曲線のピークが陽性コントロールのピークと一致するかどうか確認する。

〔反応後のチューブの取扱いについて〕

- LAMP 反応後のチューブは蓋を開けずにビニール袋に包んで捨てる。
（目視による検出で蓋を開ける場合は反応前に必ずミネラルオイルを重層する。反応後は、チューブが充分に冷めてから蓋を開ける。）

3.2 LAMP プライマーMix（共通）

LAMP プライマーMix の組成（80 µL = 20 サンプル分）

各特異的プライマー（各プライマーの原液：100 µM）

滅菌水	62.0 µL	63.5 µL※
F3	1.0 µL	0.25 µL※
B3	1.0 µL	0.25 µL※
FIP	8.0 µL	
BIP	8.0 µL	
Total	**80 µL（-20℃保存）**	

※ *P. nicotianae* および *P. phaseoli* プライマーは F3 および B3 プライマーを 各 0.25 µL（1/4 倍濃度）で調整する。

植物プライマー（各プライマーの原液：100 µM）

滅菌水	54.0 µL
F3	1.0 µL
B3	1.0 µL
FIP	4.0 µL
FIP2	4.0 µL
BIP	8.0 µL
Floop	2.0 µL
Floop2	2.0 µL
Bloop	4.0 µL
Total	**80 µL（-20℃保存）**

［注意点］

・ LAMP プライマーMix は必ず滅菌水から調製する。
（プライマーから先に混和した場合、プライマーどうしが高濃度で混ざるためダイマーが生じやすくなる。）

・ 陰性コントロールが増幅し、プライマーダイマーが疑われる場合は、LAMP プライマーMix を 98℃で 5 分間加熱したのち、氷上またはアイスブロックなどを用いて急冷し、一本鎖化するとよい。このとき、冷蔵庫に置くなどしてゆっくり冷却すると二本鎖化するので注意する。それでも改善されない場合は LAMP プライマーMix を再調製する。

表1 LAMP プライマーセット

プライマー配列		鎖長	検出限界	反応温度	反応時間	会合曲線ピーク ※3
P. ramorum 特異的 LAMP プライマー（*cox*1 遺伝子; Hieno et al., 2021）						
Pram_F3	5'-TTACTGCACATGCTTTTATC-3'	20	100 fg	65℃	60 分 /80 分 ※2	82℃
Pram_B3	5'-GAATGTGCTTGTACACTTGA-3'	20				
Pram_FIP	5'-AGGAAATGCCATATCTGGAG-TGCCTGCTTTAATTGGTGGG-3'	40				
Pram_BIP	5'-GGCTTTATTATTATTAGTTT-TAAACTGTCCAACCAGTACC-3'	40				
P. keronviae 特異的 LAMP プライマー（rDNA-ITS 領域; Hieno et al., 2021）						
Pker_F3	5'-GGTAGTGTTGGTTTCGGC-3'	18	100 fg	65℃	60 分	86℃
Pker_B3	5'-CGTGCACACAAAAAATTGTTCC-3'	22				
Pker_FIP	5'-TACACACTACTACGGTACAC-CTGCTTATTGTGTCTTTTTCCTTGC-3'	45				
Pker_BIP	5'-ACTTTGTGTGCGAAGTAGAG-AAAAGGTTTCGTCCCCTCGGC-3'	41				
P. lateralis 特異的 LAMP プライマー（*cox*1 遺伝子; Hieno et al., 2021）						
Plat_F3	5'-TAATGATAGGTGCACCTGAT-3'	20	100 fg ※1	65℃	60 分 /80 分 ※2	82℃
Plat_B3	5'-AATCTACTGAAGGTCCTGAA-3'	20				
Plat_FIP	5'-CGATGAAACTAATAATAATA-TGGCTTTTCCACGTATGAA-3'	39				
Plat_BIP	5'-GGCTATTGTAGAATCTGGTG-GGGCTTGTACACTAGATAAC-3'	40				
P. phaseoli 特異的 LAMP プライマー（*cox*1 遺伝子; Hieno et al., unpublished）						
Ppha_F3	5'-GTTGTTGTTACCGCACATGC-3'	20	100 fg ※1	68℃	60 分 /80 分 ※2	82℃
Ppha_B3	5'-ACTAGATAATGGTGGATAAACT-3'	22				
Ppha_FIP	5'-CGGAGCACCTATCATTAAAG-TTAGTTATGCCTGCTTTAATC-3'	41				
Ppha_BIP	5'-GCCTCCTTCTTTATTATTAT-CCAACCAGTACCAGCCCCA-3'	39				

P. nicotianae 特異的 LAMP プライマー（rDNA-ITS 領域; Hieno et al., 2019）						
Pnic_F3	5'-CGGTGGAGGAGATGTCAGAT-3'	20	100 fg ※1	65℃	60 分	87℃
Pnic_B3	5'-GTTCAGCCGAAGCCAACC-3'	18				
Pnic_FIP	5'-TCAGTTTAGTACATTTAAAA-TGAAGTGTCTTGCGATTGGT-3'	40				
Pnic_BIP	5'-AAGGCTGCTATTGTGGCAAA-ACACTCTTCCATTAACGCCG-3'	40				
Phytophthora 属特異的 LAMP プライマー（rDNA-ITS 領域; Hieno et al., 2020）						
Physp_F3	5'-TCTGCTTTTAACTAGATAGC-3'	20	100 fg ※1	68℃	60 分 /80 分 ※2	85 ～ 88℃
Physp_B3	5'-CACCACTTTTCGAGCAAAGA-3'	20				
Physp_FIP	5'-GCATACTTCCAGGACTAACC-GTAATGCGAATTGCAGGA-3'	38				
Physp_BIP	5'-CCTGTATCAGTGTCCGTACA-TCTCCTCCACCGACTACACG-3'	40				
P. nicotianae 特異的 QProbe（rDNA-ITS 領域; Hieno et al., 2020）…属特異的プライマーと合わせて使用する						
PnicQP (QProbe-3G)	5'-CCGTACATTAAACTTGACTTTCTTCC-3'	26	100 fg ※1	-	-	53℃
植物 LAMP プライマー（cytochrome oxidase I 遺伝子; Hieno et al., 2021） …マルチプレックスの場合、反応温度および時間は各特異的プライマーに合わせる						
COX_F3	5'-TATGGGAGCCGTTTTTGC-3'	18	-	65℃	60 分	85℃ ±2℃ 前後
COX_B3G	5'-AACTGCTAAGGGCATTCC-3'	18				
COX_FIPA	5'-ATGGATTTGACCTAAAGTTTCAGG-GCAGGATTTCACTATTGGGT-3'	44				
COX_FIP2	5'-ATGGATTTGACCTAAAGTTTCGG-TCGCAGGATTTTACTTTCGGG-3'	44				
COX_BIPA	5'-TGCATTTCTTAGGGCTTTCGG-ATCCAGCGTAAGCATCTG-3'	39				
COX_F-Loop	5'-ATGTCCGACCAAAGATTTTACC-3'	22				
COX_Floop2	5'-ATGTTCGACCAGAGATTTTACC-3'	22				
COX_B-Loop	5'-GTATGCCACGTCGCATTCC-3'	19				

※1　濁度 LAMP では検出感度が 10 倍下がる。

※2　濁度 LAMP では反応時間を 20 分延長し、80 分間とする。

※3　会合曲線または融解曲線のピーク温度は、使用機器、シンプレックスかマルチプレックスか、QProbe の有無および濃度などによって変化するため、陽性コントロールを同時に反応させて比較する。

表2 植物プライマーで増幅可能／不可能を検定した植物リスト

目	科	属	一般名	組織	簡易抽出	追加精製
アウストロバイレヤ目	マツブサ科	シキミ属	シキミ	葉	+	NT
アオイ目	アオイ科	フヨウ属	ムクゲ	葉	+	NT
アブラナ目	アブラナ科	アブラナ属	ハクサイ	葉	+	NT
イソマツ目	イソマツ科	イソマツ属	スターチス	葉	+	NT
イチョウ目	イチョウ科	イチョウ属	イチョウ	葉	+	NT
イネ目	イネ科	メヒシバ属	メヒシバ	葉	−	+
	ガマ科	ガマ属	ガマ	葉	−	+
	カヤツリグサ科	カヤツリグサ属	カヤツリグサ	葉	−	−
	パイナップル科	アナナス属	パイナップル	葉	+	NT
		ハナアナナス属	ストリクタ	葉	+	NT
			ハリシー	葉	+	NT
イラクサ目	クワ科	イチジク属	インドゴムノキ	葉	+	NT
ウマノスズクサ目	ウマノスズクサ科	カンアオイ属	カンアオイ	葉	+	NT
ウラボシ目	イワデンダ科	メシダ属	イヌワラビ	葉	−	−
	ウラボシ科	ノキシノブ属	ノキシノブ	葉	−	−
	シノブ科	キクシノブ属	トキワシノブ	葉	−	−
ウリ目	ウリ科	カボチャ属	カボチャ	果実	+	NT
		キュウリ属	キュウリ	果実	+	NT
オモダカ目	サトイモ科	オランダカイウ属	オランダカイウ（カラー）	葉	+	NT
		サトイモ属	サトイモ	葉	+	NT
	トチカガミ科	オオカナダモ属	オオカナダモ	葉	−	−
カタバミ目	カタバミ科	カタバミ属	カタバミ	葉	−	+
ガリア目	ガリア科	アオキ属	アオキ	葉	+	NT
キキョウ目	キキョウ科	イソトマ属	イソトマ	葉	+	NT

キク目	キク科	ガザニア属	ガザニア	葉	+	NT
		キク属	キク（イエギク）	葉	+	NT
		ムカシヨモギ属	ハルジオン	葉	+	NT
		ヒャクニチソウ属	ヒャクニチソウ	葉	+	NT
		ベニバナ属	ベニバナ	葉	+	NT
キジカクシ目	アヤメ科	アヤメ属	アヤメ	葉	+	NT
		グラジオラス属	グラジオラス	葉	+	NT
	キジカクシ科	クサスギカズラ属	アスパラガス	芽	+	NT
		チトセラン属	サンセベリア	葉	−	−
		ヤブラン属	ヤブラン	葉	+	NT
	ヒガンバナ科	ネギ属	ネギ	葉	+	NT
		ヒガンバナ属	ヒガンバナ	茎	+	NT
	ラン科	シラン属	シラン	葉	+	NT
キントラノオ目	コミカンソウ科	コミカンソウ属	コミカンソウ	葉	+	NT
	スミレ科	スミレ属	パンジー	葉	+	NT
	トウダイグサ科	アカメガシワ属	アカメガシワ	葉	+	NT
		ニシキソウ属	コニシキソウ	葉	+	NT
	トケイソウ科	トケイソウ属	トケイソウ	葉	+	NT
			パッションフルーツ	葉	+	NT
	ヤナギ科	ヤナギ属	シダレヤナギ	葉	+	NT
			ジャヤナギ	葉	−	+
キンポウゲ目	アケビ科	アケビ属	アケビ	葉	+	NT
	ケシ科	ケシ属	ヒナゲシ（ポピー）	葉	−	−
	メギ科	ナンテン属	オタフクナンテン（ゴシキナンテン）	葉	+	NT

			ナンテン	葉	+	NT
		メギ属	ヒイラギナンテン	葉	+	NT
			ホソバヒイラギナンテン	葉	+	NT
クスノキ目	クスノキ科	ニッケイ属	クスノキ	葉	+	NT
	ロウバイ科	ロウバイ属	ロウバイ	葉	+	NT
コショウ目	コショウ科	サダソウ属	ペペロミア・オブツシフォリア	葉	+	NT
	ドクダミ科	ドクダミ属	ドクダミ	葉	+	NT
シソ目	アゼナ科	ツルウリクサ属	トレニア	茎	+	NT
	オオバコ科	オオバコ属	オオバコ	葉	−	−
		キンギョソウ属	キンギョソウ	葉	+	NT
	キリ科	キリ属	キリ	葉	+	NT
	ゴマ科	ゴマ属	ゴマ（金ごま）	種	+	NT
	シソ科	マンネンロウ属	ローズマリー	茎	+	NT
		ムラサキシキブ属	ムラサキシキブ	葉	+	NT
		ラヴァンドラ属	ラベンダー	葉	+	NT
	モクセイ科	イボタノキ属	トウネズミモチ	葉	+	NT
		オリーブ属	オリーブ	葉	+	NT
		モクセイ属	キンモクセイ	葉	+	NT
ショウガ目	ショウガ科	ショウガ属	ショウガ	葉/根茎	+/−	NT/−
			ミョウガ	葉/花芽	+/−	NT/+
セリ目	ウコギ科	キヅタ属	オカメヅタ	葉	+	NT
			セイヨウキヅタ	葉	+	NT
		フカノキ属	ヤドリフカノキ	葉	+	NT
	セリ科	オランダミツバ属	セロリ	葉	+	NT
	トベラ科	トベラ属	トベラ	葉	−	+
センリョウ目	センリョウ科	センリョウ属	センリョウ	葉	+	NT

ソテツ目	ソテツ科	ソテツ属	ソテツ	葉	+	NT
ツゲ目	ツゲ科	ツゲ属	ツゲ	葉	+	NT
ツツジ目	カキノキ科	カキノキ属	カキノキ	葉	+	NT
	サクラソウ科	ヤブコウジ属	マンリョウ	葉	+	NT
	ツツジ科	アセビ属	アセビ	葉	+	NT
		スノキ属	ブルーベリー	葉	−	+
		ツツジ属	サツキ	葉	+	NT
			シャクナゲ	葉	+	NT
			ヒラドツツジ	葉	+	NT
	ツバキ科	ツバキ属	ツバキ	葉	+	NT
	マタタビ科	マタタビ属	キウイフルーツ	葉	+	NT
	モッコク科	サカキ属	サカキ	葉	+	NT
ツユクサ目	ツユクサ科	ツユクサ属	ツユクサ	葉	+	NT
トクサ目	トクサ科	トクサ属	トクサ	葉	−	−
ナス目	ナス科	タバコ属	タバコ	葉	+	NT
		ナス属	トマト	果実	+	NT
			ナス	葉	+	NT
	ヒルガオ科	サツマイモ属	アサガオ	葉	+	NT
			サツマイモ（紅はるか）	葉	+	NT
ナデシコ目	オシロイバナ科	オシロイバナ属	オシロイバナ	葉	−	+
	サボテン科	ステノケレウス属	サボテン	茎	−	−
	スベリヒユ科	スベリヒユ属	マツバボタン	葉	−	+
	タデ科	イヌタデ属	イヌタデ	葉	+	NT
	ナデシコ科	カスミソウ属	カスミソウ	葉	−	−
		ナデシコ属	カーネーション	葉	−	−
			ナデシコ	葉	−	−
	ハマミズナ科	マツバギク属	マツバギク	葉	+	NT
	ヒユ科	ホウレンソウ属	ホウレンソウ	葉	+	NT

	ヤマゴボウ科	ヤマゴボウ属	ヨウシュヤマゴボウ	葉	+	NT
ニシキギ目	ニシキギ科	ニシキギ属	ニシキギ	葉	+	NT
	モチノキ科	モチノキ属	セイヨウヒイラギ	葉	+	NT
			モチノキ	葉	+	NT
バラ目	アサ科	ムクノキ属	ムクノキ	葉	−	+
	グミ科	グミ属	ナワシログミ	葉	+	NT
	クワ科	クワ属	マグワ	葉	+	NT
	ニレ科	ケヤキ属	ケヤキ	葉	−	+
	バラ科	カナメモチ属	ベニカナメモチ	葉	−	−
		バラ属	ミニバラオドラータ	葉	+	NT
フウロソウ目	ツリフネソウ科	ツリフネソウ属	ホウセンカ	葉	+	NT
フサシダ目	フサシダ科	カニクサ属	カニクサ	葉	−	−
ブドウ目	ブドウ科	ノブドウ属	ノブドウ	葉	+	NT
フトモモ目	ジンチョウゲ科	ジンチョウゲ属	ジンチョウゲ	葉	+	NT
	ミソハギ科	ザクロ属	ザクロ	葉	+	NT
		サルスベリ属	サルスベリ	葉	+	NT
ブナ目	カバノキ科	カバノキ属	シラカンバ	葉	+	NT
	ブナ科	コナラ属	コナラ	葉	+	NT
	ブナ科	コナラ属	ミズナラ	葉	+	NT
	ブナ科	シイ属	ツブラジイ	葉	+	NT
	ブナ科	マテバシイ属	マテバシイ	葉	+	NT
	ヤマモモ科	ヤマモモ属	ヤマモモ	葉	+	NT
マツムシソウ目	スイカズラ科	タニウツギ属	タニウツギ	葉	+	NT
		リンネソウ属	アベリア	葉	+	NT
マツ目	イチイ科	イチイ属	イチイ	葉	+	NT
		カヤ属	カヤノキ	葉	−	−

	ヒノキ科	イトスギ属	モントレーイトスギ（ゴールドクレスト）	葉	+	NT
		コウヨウザン属	コウヨウザン	葉	−	+
		スギ属	スギ	葉	+	+
		ヒノキ属	ヒノキ	葉	+	NT
		ビャクシン属	ハイネズ	葉	+	NT
			カイヅカイブキ	葉	+	NT
			フィツェリアナビャクシン	葉	+	NT
		メタセコイア属	メタセコイア	葉	+	NT
	マキ科	マキ属	イヌマキ	葉	−	−
	マツ科	ヒマラヤスギ属	ヒマラヤスギ	葉	−	−
		マツ属	クロマツ	葉	+	+
			ハイマツ	葉	+	NT
マメ目	マメ科	アカシア属	ギンヨウアカシア	葉	+	NT
		エンジュ属	エンジュ	葉	+	NT
		ネムノキ属	ネムノキ	葉	+	NT
		ヒヨコマメ属	ヒヨコマメ	葉	+	NT
		ハリエンジュ属	ニセアカシア	葉	+	NT
ミズキ目	アジサイ科	アジサイ属	アジサイ	葉	+	NT
	ミズキ科	ミズキ属	ハナミズキ	葉	+	NT
ムクロジ目	ウルシ科	ヌルデ属	ヌルデ	葉	+	NT
	センダン科	センダン属	センダン	葉	+	NT
	ニガキ科	ニワウルシ属	シンジュ（ニワウルシ）	葉	+	NT
	ムクロジ科	カエデ属	カエデ	葉	+	NT
		トチノキ属	トチノキ	葉	+	NT
モクレン目	モクレン科	モクレン属	タイサンボク	葉	+	NT
		モクレン属	ホオノキ	葉	+	NT
		ユリノキ属	ユリノキ	葉	+	NT
モチノキ目	モチノキ科	モチノキ属	クロガネモチ	葉	+	NT

ヤシ目	ヤシ科	シュロ属	シュロ（ワジュロ）	葉	−	−
ヤマノイモ目	ヤマノイモ科	ヤマノイモ属	ヤマノイモ（自然薯）	葉	+	NT
			ヤマノイモ（ツクネイモ）	葉	+	NT
ヤマモガシ目	スズカケノキ科	スズカケノキ属	モミジバスズカケノキ	葉	+	NT
	ハス科	ハス属	ハス	葉	+	NT
ユキノシタ目	カツラ科	カツラ属	カツラ	葉	+	NT
	フウ科	フウ属	モミジバフウ	葉	+	NT
	ベンケイソウ科	カランコエ属	月兎耳（つきとじ）	葉	+	NT
	ボタン科	ボタン属	ボタン	葉	+	NT
	マンサク科	マンサク属	マンサク	葉	+	NT
ユリ目	ユリズイセン科	アルストロメリア属	アルストロメリア	葉	+	+
	ユリ科	チューリップ属	チューリップ	葉	−	−
		ユリ属	カサブランカ	葉	−	−
			タカサゴユリ	葉	−	−
			テッポウユリ	葉	−	−
リンドウ目	アカネ科	クチナシ属	クチナシ	葉	+	NT
	キョウチクトウ科	キョウチクトウ属	キョウチクトウ	葉	+	NT
		テイカカズラ属	テイカカズラ（ハツユキカズラ）	葉	+	NT
		ニチニチソウ属	ニチニチソウ	茎	+	NT
	リンドウ科	リンドウ属	リンドウ	葉	+	NT

※1 カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 で抽出した植物 DNA を蛍光 LAMP（液体試薬）で検出した結果。植物プライマーMix（0.32 μL/25 μL 反応液中）、65℃で 60 分間反応し、検出ありを"+"、検出なしを"-"で示した。

※2 カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 で抽出した植物 DNA の希釈前の原液を OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research)で追加精製し、蛍光 LAMP（液体試薬）で検出した結果。植物プライマーMix（0.32 μL/25 μL 反応液中）、65℃で 60 分間反応し、検出ありを"+"、検出なしを"-"、未試験を"NT"で示した。

3.3 蛍光 LAMP（シンプレックス・マルチプレックス LAMP）

3.3.1 液体試薬 Isothermal Master Mix

キヤノンメディカルシステムズ
Isothermal Master Mix
写真は ISO-001
（専用チューブ※ **別売**）

ニッポンジーン
Isothermal Master Mix
（専用チューブ※ **付属**）

※Genie® II/III および Genelyzer™ F II/F III 専用 8 連チューブ

LAMP 反応液の組成（1 サンプルあたり）

シンプレックス LAMP

滅菌水	2.5 µL※2
BSA（ストック液 40 mg/mL）※1	2.5 µL
LAMP プライマーMix	4.0 µL
Isothermal Master Mix	15.0 µL
鋳型 DNA	1.0 µL※2
Total	**25 µL**

※1 LAMP では BSA のストック溶液の濃度が PCR の 10 倍であることに注意。

※2 植物から抽出した DNA の場合は鋳型を 2 µL 添加する。

マルチプレックス LAMP（各種特異的プライマー＋植物プライマー）

滅菌水	2.18 µL※2, 3	1.9 µL※2, 3
BSA（ストック液 40 mg/mL）※1	2.5 µL	
種特異的プライマーMix	4.0 µL	
植物プライマーMix	0.32 µL※3	0.6 µL※3
Isothermal Master Mix	15.0 µL	
鋳型 DNA	1.0 µL※2	
Total	**25 µL**	

※1 LAMP では BSA のストック溶液の濃度が PCR の 10 倍であることに注意。

※2 植物から抽出した DNA の場合は鋳型を 2 µL 添加する。

※3 *P. phaseoli* プライマー（反応温度 68℃）は植物プライマーの添加量を 0.6 µL にする。

マルチプレックス LAMP（属プライマー＋植物プライマー＋*P. nicotianae* QProbe）

滅菌水	1.65 μL※2, 3	1.775 μL※2, 3
BSA（ストック液 40 mg/mL）※1	2.5 μL	
属プライマーMix	4.0 μL	
植物プライマーMix	0.6 μL	
Isothermal Master Mix	15.0 μL	
QProbe（原液：100 μM）	0.25 μL※3, 4	0.125 μL※3, 4
鋳型 DNA	1.0 μL※2	
Total	**25 μL**	

※1 LAMP では BSA のストック溶液の濃度が PCR の 10 倍であることに注意。

※2 植物から抽出した DNA の場合は鋳型を 2 μL 添加する。

※3 QProbe の添加量は Genie® II/III および Genelyzer™ FII/FIII で検出する場合は 0.25 μL（終濃度 1 μM）、リアルタイム PCR システム StepOnePlus™ および QuantStudio® 3 で検出する場合は 0.125 μL（終濃度 0.5 μM）。

※4 属プライマー＋植物プライマーのマルチプレックス LAMP の場合は QProbe を滅菌水に置き換える。

3.3.2 等温増幅蛍光測定装置 Genie® II/III および Genelyzer™ F II/F III による反応手順

Genie® II（OptiGene）

Genelyzer™ F II
（キヤノンメディカルシステムズ）

Genie® III（OptiGene）

Genelyzer™ F III
（キヤノンメディカルシステムズ）

以下、機器操作に関する説明は主に Genie® II の場合を例として記載し、Genelyzer™ F II で異なる操作を補足として追記した。詳細は各機器のマニュアルを参照する。

（準備）機器本体で「Run タブ→New ボタン」（Genelyzer™ F II の場合「Other ボタン→ ボタン」）で以下のとおりに反応プログラムを入力し、保存する。
（記載していないパラメーターはデフォルトの値とする。）

[Preheat] **65** または **68℃** で **5 分**
[Isothermal] **65** または **68℃** で **60 分** または **80 分**（※）
[Anneal] Ramp Rate **0.05℃/Sec**
Start Temperature **98℃**－End Temperature **80℃** [QProbe を用いない場合]
Start Temperature **98℃**－End Temperature **45℃** [QProbe を用いる場合]

［手順］

1. （クリーンベンチ内で作業する）鋳型 DNA 以外の反応液を、あらかじめ複数サンプル分調整したもの（マスターミックス）を作成する（※）。

※ マスターミックスは 1 サンプル分追加で調整し（例えば 8 サンプルの場合 9 サンプル分のマスターミックスを作成する）ゆっくり分注する。このとき試薬がチップ壁面に付着して失われるのでチップをマスターミックスに深く入れすぎないようにする。

2. （クリーンベンチ内で作業する）マスターミックスを反応チューブに分注する。反応開始まで氷上またはアイスブロック上で低温に保つ（※）。

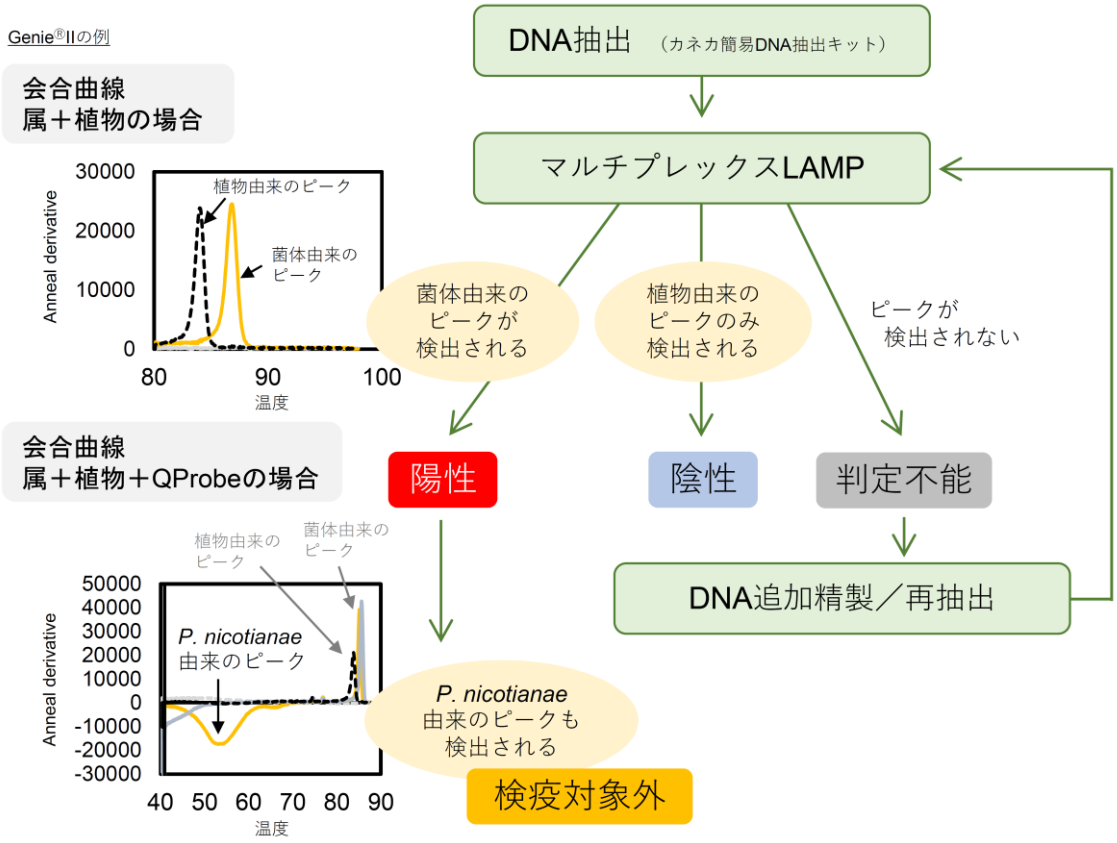
3. 「Run タブ→反応プログラムを選択→Load ボタン→Start ボタン→測定ブロックを A、B、Both から選択」（Genelyzer™ F II の場合「Other ボタン→反応プログラムを選択→ ✓ ボタン→測定ブロックを A、B、Both から選択」）で（準備）で作成した反応プログラムを開始する。

4. （クリーンベンチ外で作業する）[Preheat] の 5 分間で鋳型 DNA を添加し（※）、チューブを反応ブロックにセットする（反応液にチップ先端を突き刺して鋳型 DNA を添加し、気泡が壊れるように軽いタッピングで混和したのち、スピンダウンしてセットする）。

※ [Preheat] 中に機器の蓋を開けるとアラームが鳴るが、検出に影響はない。非特異的な増幅を抑えるために、鋳型 DNA の添加後はすみやかに反応を開始することが望ましいので、[Preheat] 中に鋳型 DNA の添加を終了する。

5. 検出結果：測定直後の増幅曲線は「Active タブ→Amplification タブ」で確認できる。目的の増幅産物かどうかは「Active タブ→会合曲線（Anneal）タブ」のピーク温度（※）で判定する。過去の測定結果は「View タブ→LOG」から測定年月日、測定ファイル名を選択し、「Open ボタン」で表示できる。
（Genelyzer™ F II の場合「左下の ボタン→LOG→ ✓ ボタン」から測定年月日、測定ファイル名を選択し、「 ✓ ボタン」で表示できる。 ボタンで戻る）

※ 会合曲線のピーク温度は、使用機器、シンプレックスかマルチプレックスか、QProbe の有無および濃度などによって変化するため、陽性コントロールを同時に反応させて比較する。



マルチプレックス PCR の結果の判定法（植物からの検出）

3.3.3 StepOne™/StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムによる反応手順

※QuantStudio® 3 リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems）も同様

StepOne™/StepOnePlus™

（Applied Biosystems）

QuantStudio® 3

（Applied Biosystems）

リアルタイム PCR 用の蛍光測定機器はサンプルのセットから反応開始までの時間が長く、蓋の昇温～ブロックの昇温に約 5 分を要する。LAMP 反応の場合、偽陽性を抑えるため、鋳型 DNA の添加後は速やかに至適温度にしなければならない。以下の手順では、目的の反応の前に仮運転をすることによって、あらかじめブロックを温めておき、時間短縮を図る。鋳型 DNA は直前まで反応液と混和せず壁面へつけておき、スピンダウンしたのち、ただちにセットする。

（準備） PC で Experiment を開き、以下のとおりにプログラムを入力し、保存する。

（記載していないパラメーターはデフォルトの値とする。サンプル名などは反応開始後に設定することもできる。）

[Experiment 1] 仮運転用

70℃で 1 分

[Experiment 2] 目的の反応用

等温増幅反応：

65 または **68℃で 60 分（1 分×60 サイクル）**（サイクル毎に測定する。）

融解曲線（melting curve）解析：

Step and Hold

98℃ 10 秒－<u>80℃</u> 30 秒－（0.3℃/s）－98℃ 10 秒 [QProbe を用いない場合]

または

98℃ 10 秒－<u>45℃</u> 30 秒－（0.3℃/s）－98℃ 10 秒 [QProbe を用いる場合]

反応液量： **25 μL**

［手順］

1. PC で [Experiment 1] および [Experiment 2] のファイルをあらかじめ開いておく。仮運転用の空のプレートと目的の反応用のサンプルプレートを用意する。

2. （クリーンベンチ内で作業する）鋳型 DNA 以外の反応液を、あらかじめ複数サンプル分調整したもの（マスターミックス）を作成する（※）。

※ マスターミックスは 16 サンプルごとに 1 サンプル分追加で調整し、ゆっくり分注する。このとき、試薬がチップ壁面に付着して失われるので、チップをマスターミックスに深く入れすぎないようにする。

3. （クリーンベンチ内で作業する）マスターミックスを反応用のサンプルプレートに分注する。反応開始まで氷上またはアイスブロック上で低温に保つ。

4. （クリーンベンチ外で作業する）鋳型 DNA を壁面につけておく（※）。

※ 鋳型 DNA は直前まで反応液と混和せず壁面へつけておき、スピンダウンしたのち、ただちにセットする（後述）。

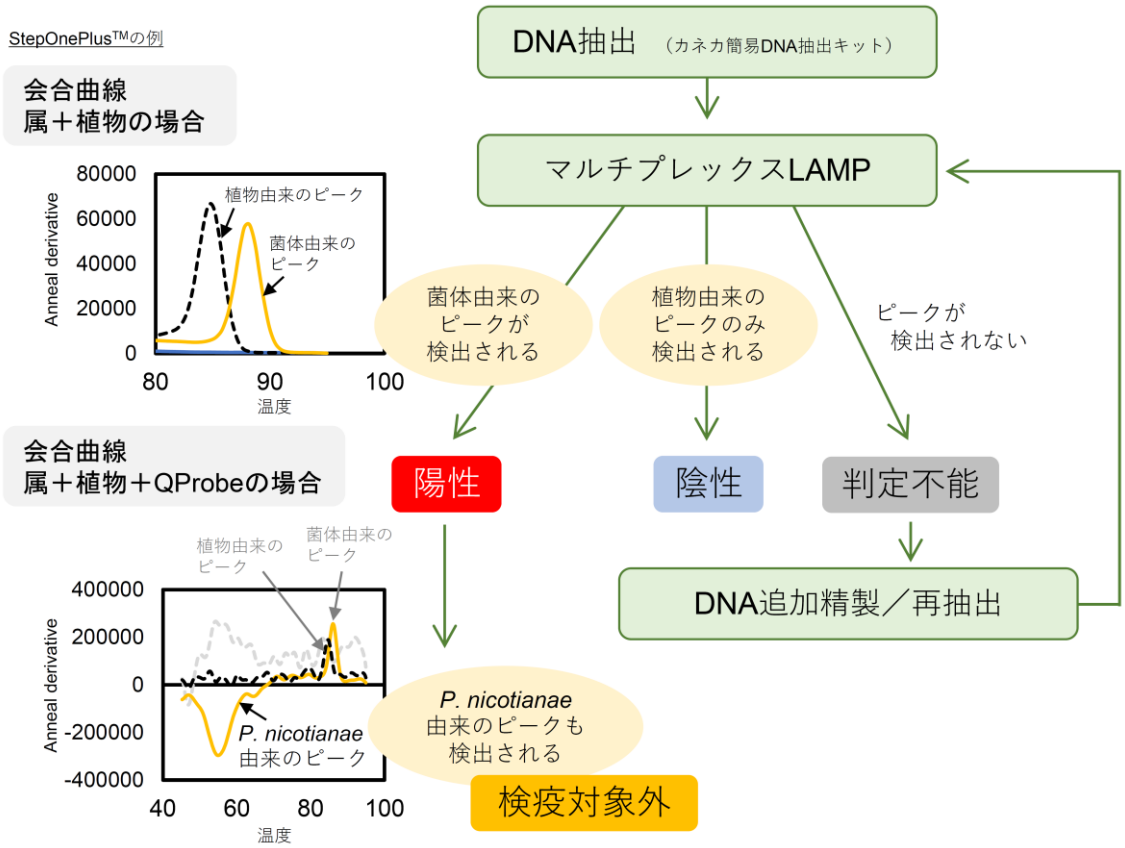
5. 仮運転用の空のプレートをセットして（準備）で作成した[Experiment 1] の反応を開始する。

6. 5. の [Experiment 1] が行われている間に 4. を遠心して、鋳型 DNA を反応液に混和する。

7. 仮運転用の空のプレートを取り出し、サンプルプレートを機器にセットして 1. で作成した [Experiment 2] の反応を開始する。

8. 検出結果：増幅曲線は Multicomponent Plot で確認できる。反応サイクル数（横軸）を 60 サイクル（60 分）に指定すると視認しやすい。目的の増幅産物かどうかは融解曲線（melting curve）のピーク温度（※）で判定する。

※ 融解曲線のピーク温度は、使用機器、シンプレックスかマルチプレックスか、QProbe の有無および濃度などによって変化するため、陽性コントロールを同時に反応させて比較する。



マルチプレックス LAMP の結果の判定法（植物からの検出）

3.4 濁度 LAMP

3.4.1 自作試薬

2×Reaction mixture（2×R）の組成

滅菌水	308 μL
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	40 μL
1 M KCl	20 μL
10% Tween20	20 μL
5 M Betaine	320 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）

滅菌水	4.0 μL※2
BSA（ストック液 40 mg/mL）※1	2.5 μL
2×R	12.5 μL
LAMP プライマーMix	4.0 μL
Bst DNA Polymerase	1.0 μL
鋳型 DNA	1.0 μL※2
Total	**25 μL**

※1 LAMP では BSA のストック溶液の濃度が PCR の 10 倍であることに注意。

※2 植物から抽出した DNA の場合は鋳型を 2 μL 添加する。

［注意点］

- 2×R は 1.5 mL チューブなどに分注して-20℃で保存する。

- 濁度 LAMP は蛍光 LAMP（液体試薬）よりも検出が 10 分ほど遅れるため、対象とする種により反応時間が異なる（表1）。

- 各プライマーの至適温度で 60 分間反応した後、ただちに 80℃で 5 分間インキュベートし、酵素を失活させる。

3.4.2 リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA®による反応手順

LoopampEXIA®
（栄研化学）

（準備） 機器本体の「メンテナンスタブ→パラメータ登録」で以下のとおりに反応プログラムを入力し、保存する。

（記載していないパラメーターはデフォルトの値とする。ユニット内の A、B ブロックは同じプログラムを設定する。）

[設定 1]

測定条件： **65** または **68℃** で **60 分** または **80 分**

酵素失活条件： **80℃** で **5 分**

スケール： **自動**

[設定 2]

ベースライン補正： **OFF**

（簡易抽出 DNA のようにタンパクが含まれているものを測定する場合は、ベースライン補正をかけることで測定値が変わる可能性がある。測定後に変更することができないので、あらかじめ OFF にしておく。）

［手順］

1. 「メインタブ→設定（または一括設定）」でパラメーター（測定しないブロックは********）を選択し、必要な情報（任意）を入力したのち、「完了」ボタンを押す。

2. （クリーンベンチ内で作業する） 鋳型 DNA 以外の反応液を、あらかじめ複数サンプル分調整したもの （マスターミックス） を作成する（※）。

※ マスターミックスは 1 サンプル分追加で調整し（例えば 8 サンプルの場合 9 サンプル分のマスターミックスを作成する）ゆっくり分注する。このとき試薬がチップ壁面に付着して失われるのでチップをマスターミックスに深く入れすぎないようにする。

3. （クリーンベンチ内で作業する） マスターミックスを反応チューブに分注する。反応開始まで氷上またはアイスブロック上で低温に保つ。

4. 設定温度まで昇温したことをメイン画面の“待機中”表示とブロックの READY ランプで確認する。

5. （クリーンベンチ外で作業する）鋳型 DNA を添加し、機器にセットする。2 分後に START ボタンを押して測定を開始する（※）。測定が開始されたことをメイン画面の“測定中”表示とブロックの MEAS.ランプで確認する。

※ セットしてから少し時間を置くことによってチューブのくもりが取れ、ベースラインが安定する。

6. 検出結果：増幅曲線は「測定タブ」またはメイン画面の各ユニットの温度値あたりを押すと表示される。「◄ ►」でユニットを切り替えることができる。「結果詳細」ボタンで増幅曲線の立ち上がり時間が確認できる。必要に応じて「グラフ表示→画面印刷」で本体にセットされた用紙に印刷可能。

3.5　目視 LAMP

3.5.1　目視 LAMP による反応手順

蛍光 LAMP および濁度 LAMP のいずれの試薬を用いても目視による検出を行うことができる。サーマルサイクラーおよびブロックインキュベーター等で反応を行う。

［手順］

1. （クリーンベンチ内で作業する）鋳型 DNA 以外の反応液を、あらかじめ複数サンプル分調整したもの（マスターミックス）を作成する(※)。

※ マスターミックスは 16 サンプルごとに 1 サンプル分追加で調整し、ゆっくり分注する。このとき、試薬がチップ壁面に付着して失われるので、チップをマスターミックスに深く入れすぎないようにする。

2. （クリーンベンチ内で作業する）マスターミックスを反応チューブに分注する。コンタミネーションを抑えるため、20 μL のミネラルオイルを添加し、スピンダウンする。反応開始まで氷上またはアイスブロック上で低温に保つ。

3. （クリーンベンチ外で作業する）鋳型 DNA をミネラルオイル層の下にある反応液層までチップを突き刺して添加し、軽くタッピングで混ぜて、スピンダウンする。

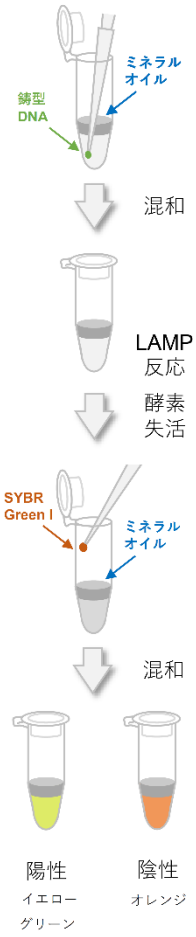
4. 各プライマーの至適温度および時間で反応させる。反応後、ただちに 80℃で 5 分間インキュベートし、酵素を失活させる。

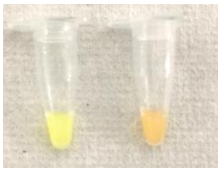
5. チューブを充分に冷まし、スピンダウンしてから蓋を開け、2 μL の SYBR Green® I（※）をミネラルオイル層の上の壁面に滴下する。

※ ×10,000 の試薬を滅菌水で 10 倍に希釈して×1,000 濃度で用いる（-20℃遮光保存）。

6. チューブの蓋を閉めてスピンダウンし、タッピングで混和する。

7. 目視による判定を行う（写真参照）。





陽性　　陰性

4 PCR 法による検出

4.1 PCR の留意点（共通）

〔反応液の調整について〕

- ピペットマン、チップ、チューブ、滅菌水を可能な限り、PCR 専用にする。チップはフィルター付チップを用いる。（コンタミネーションを防ぐため。）

- 反応液は氷上またはアイスブロックなどを用いて低温下で調整する。

〔反応系について〕

- 陰性コントロールとして鋳型 DNA の替わりに滅菌水を添加したもの、陽性コントロールとして 100 pg（プライマーの特異性検定の濃度）の菌体 DNA を添加したものを同時に反応させる。菌体 DNA は「菌体からの DNA 抽出（p. 4）」を参照して抽出する。植物の場合、「植物からの DNA 抽出（p. 5）」を参照して健全な組織から抽出した DNA を同時に反応させる。

- 植物および土壌から抽出した DNA は反応系への添加量に注意する。
（一般に鋳型添加量を増やすことで検出感度の向上が期待できるが、増幅反応を阻害する夾雑物が多く含まれる場合は 2～10 倍程度希釈して添加すると反応が改善する場合がある。）

- 2 反復以上の検出を行う。（検出限界に近い微量な DNA を確実に検出するため。）

4.2 PCR プライマー（共通）

新しい 1.5 mL チューブを用意し、表2に示すプライマーの原液（100 μM）を滅菌水で 10 倍希釈して、10 μM の溶液を作成する。使用するまで-20℃で保存する。

表3 PCR プライマー

プライマー配列		鎖長	検出限界	アニール温度/時間 (x^1 / x^2)	増幅産物
Phytophthora 属特異的 PCR プライマー（*Ypt*1 遺伝子; Bi et al., 2018）					
Yph1F_mod2	5'-CGACCATKGGTGTGGACTTTG-3'	21	100 fg※1	62℃/45 秒	≈ 470 bp※2
Yph2R_mod2	5'-ACGTTCTCRCAGGCGTATCTG-3'	21			
P. nicotianae 特異的 PCR プライマー（rDNA-ITS 領域; Li et al., 2011） …マルチプレックスの場合はアニール温度および時間を属特異的プライマーに合わせる					
Nic-F1	5'-CCTATCAAAAACAAGGCGAACG-3'	22	100 fg※1	66℃/30 秒	267 bp
Nic-R1	5'-TGGCATACTTCCAGGACTAACC-3'	22			
植物 PCR プライマー（cytochrome oxidase I 遺伝子; Martin et al., 2004） …マルチプレックスの場合はアニール温度および時間を属特異的プライマーに合わせる					
FMPl-2b	5'-GCGTGGACCTGGAATGACTA-3'	20	-	60℃/30 秒	143 bp
FMPl-3b	5'-AGGTTGTATTAAAGTTTCGATCG-3'	23			

※1 マルチプレックス PCR（属プライマー＋*P. nicotianae* プライマー＋植物プライマー）の検出限界を示す。

※2 属プライマーの増幅産物は種によってサイズが異なるため、必ず健全な組織から抽出した DNA を同時に反応して陰性コントロールとし、バンドの有無を判定する。

4.3 PCR（シンプレックス・マルチプレックス PCR）

4.3.1 試薬 *TaKaRa Taq*™ Hot Start Version（タカラバイオ）

※ 各種の試薬を試した結果、本試薬が最適。

PCR 反応液の組成 （1 サンプルあたり）

シンプレックス PCR

滅菌水	13.5	μL※2	
BSA（ストック液 4 mg/mL）※1	2.5	μL	
10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus)	2.5	μL	Mg^{2+} は
$MgCl_2$ (25 mM)	1.0	μL	合計 2.5 mM（終濃度）
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	2.0	μL	
Fw プライマー (10 μM)	1.25	μL	
Rv プライマー(10 μM)	1.25	μL	
TaKaRa Taq™ HS (5 U/μL)	0.125	μL	
鋳型 DNA	1.0	μL※2	
Total	**25 μL**		

マルチプレックス PCR（属プライマー＋*P. nicotianae* プライマー＋植物プライマー）

滅菌水	12.875	μL※2	
BSA（ストック液 4 mg/mL）※1	2.5	μL	
10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus)	2.5	μL	Mg^{2+} は
$MgCl_2$ (25 mM)	1.0	μL	合計 2.5 mM（終濃度）
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	2.0	μL	
Yph1F_mod2 (10 μM)	1.25	μL	
Yph2R_mod2 (10 μM)	1.25	μL	
Nic-F1 (10 μM)	0.125	μL	
Nic-R1 (10 μM)	0.125	μL	
FMPl-2b (10 μM)	0.125	μL	
FMPl-3b (10 μM)	0.125	μL	
TaKaRa Taq™ HS (5 U/μL)	0.125	μL	
鋳型 DNA	1.0	μL※2	
Total	**25 μL**		

※1 PCR では BSA のストック溶液の濃度が LAMP の 1/10 倍であることに注意。

※2 土壌から抽出した DNA の場合は鋳型を 5 μL 添加する。

4.3.2 サーマルサイクラーによる反応および電気泳動による検出手順

（準備） サーマルサイクラーに以下のとおりに反応プログラムを入力し、保存する。

[変性]	95℃	2 min	
[変性]	94℃	30 sec	40 cycles
[アニール]	x_1 ℃※	x_2 sec※	
[伸長]	72℃	30 sec	
[伸長]	72℃	10 min	

※ シンプレックスの場合、アニール温度および時間はプライマーによって異なる（表３）。マルチプレックスの場合は属特異的プライマーに合わせる。

［手順］

1. 鋳型 DNA 以外の反応液を、あらかじめ複数サンプル分調整したもの（マスターミックス）を作成する（※）。

※ マスターミックスは 16 サンプルごとに 1 サンプル分追加で調整し、分注する。

2. マスターミックスを反応チューブに分注する。反応開始まで氷上またはアイスブロック上で低温に保つ。

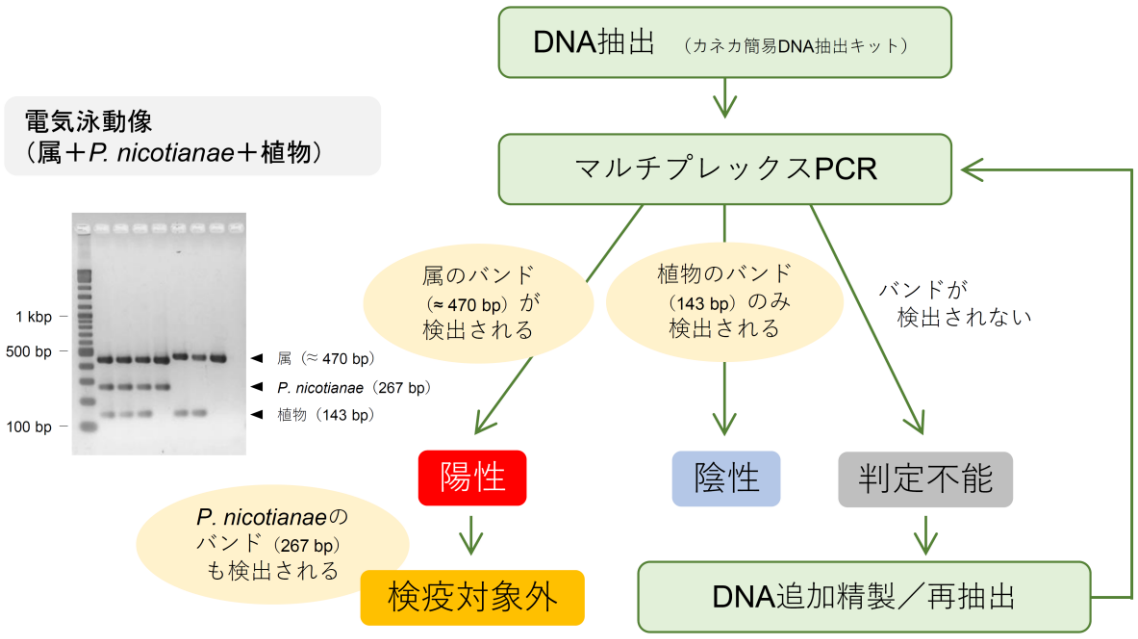
3. 鋳型 DNA を添加し、サーマルサイクラーにセットして PCR を開始する。

4. 新しい 0.5×TAE で 1.5%のアガロースゲル（スタンダードな Agarose S など）を作成する。0.5×TAE の入った泳動層にゲルをセットする。

5. PCR 産物（陰性および陽性コントロールを含む）5 μL を 6×Loading dye 1 μL と混和する。最初のレーンに 2～5 μL の DNA 分子量マーカー（Quick-Load 1 kb Plus DNA Ladder, NEB）をアプライし、次のレーンから Loading dye と混和した PCR 産物を全量（6 μL）アプライする。

6. 100 V でマーカーがゲルの下端から 1.5 cm 内側に到達するまで（約 25 分間）電気泳動する。

7. ゲル蛍光染色液に約 20 分間浸漬したのち、染色液を脱イオン水で軽く洗い流して、トランスイルミネーターで標的のサイズのバンドの有無を確認する。



マルチプレックス PCR の結果の判定法（植物からの検出）

5 PCR-RFLP 法による簡易種同定

Phytophthora 属特異的プライマーを用いたシンプレックス PCR の増幅産物を用いて RFLP 解析を行い、シーケンス解析よりも短い時間で種を簡易同定できる。

（準備） PCR 法による検出（p. 34～）に従って、*Phytophthora* 属特異的プライマーを用いたシンプレックス PCR を行う（*P. nicotianae* の菌体 DNA を同時に PCR し、以降の操作の陽性コントロールとする）。PCR 産物が一本の濃いバンドであることを電気泳動で確認しておく。

制限酵素反応液の組成 （1 サンプルあたり）

PCR 産物	3.0 μL
10× FastDigest **Green** Buffer または 10× FastDigest Buffer（※）	1.5 μL
制限酵素	0.5 μL
滅菌水	10 μL
Total	**15 μL**

※ 添付バッファーは 2 種類ある。「10× FastDigest **Green** Buffer」は Loading dye を混和せずそのまま電気泳動できる。

［手順］

1. サーマルサイクラーまたはヒートブロックを 37℃（15 分間）→65℃（5 分間）に設定する。

2. PCR 産物以外の反応液をあらかじめ複数サンプル分調整したもの（マスターミックス）を作成する（※）。

※ マスターミックスは 16 サンプルごとに 1 サンプル分追加で調整し、分注する。

3. PCR 産物を添加し、サーマルサイクラーまたはヒートブロックにセットして、1. のプログラムでインキュベートする（制限酵素反応→酵素失活）。

4. 新しい 1×TBE※で 4.0%のアガロースゲル（高濃度でも溶解しやすい SFR など）を作成する。1×TBE※の入った泳動層にゲルをセットする。

※ PCR-RFLP では 50 bp 付近のバンドを識別する必要があるため、TAE よりも低分子領域の分離能が高い **TBE** バッファーを用いる。

5. 最初のレーンに 2～5 μL の DNA 分子量マーカー（50 bp DNA Ladder RTU, GeneDireX）をアプライし、次のレーンから制限酵素反応産物 2 μL をアプライする。

6. 100 V で約 30 分間電気泳動する。

7. ゲル蛍光染色液に約 20 分間浸漬したのち、染色液を脱イオン水で軽く洗い流し、トランスイルミネーターでバンドパターン（サイズおよび本数）を確認する。

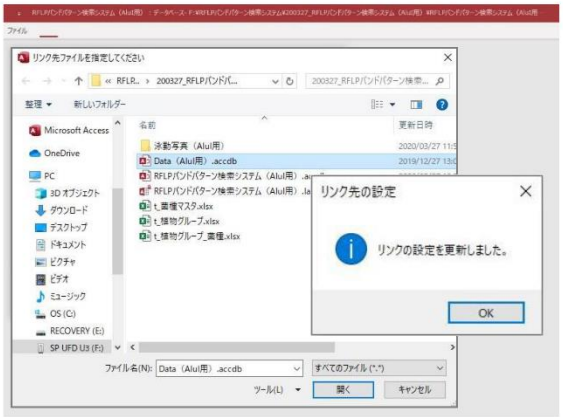
8. バンドパターン検索システムに宿主およびバンドサイズを入力し、検索結果から候補となる種を推定する。

RFLP バンドパターン検索システム使用方法

「RFLPバンドパターン検索システム」のフォルダを開き、以下のファイルをクリックする

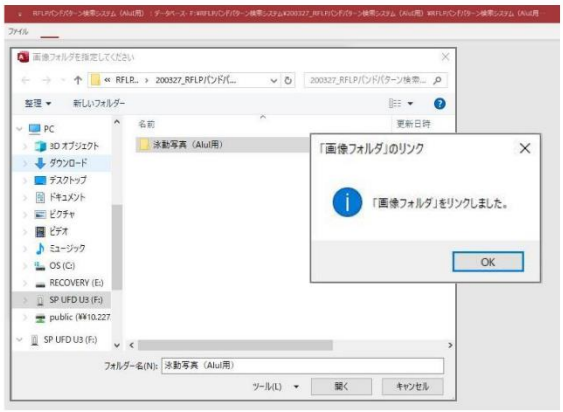
AluI で切断した場合 → RFLPバンドパターン検索システム（AluI用）.accdb

*HhaI*で切断した場合 → RFLPバンドパターン検索システム（HhaI用）.accdb



最初の起動時にリンク先を2つ聞かれるので以下の通り指定する

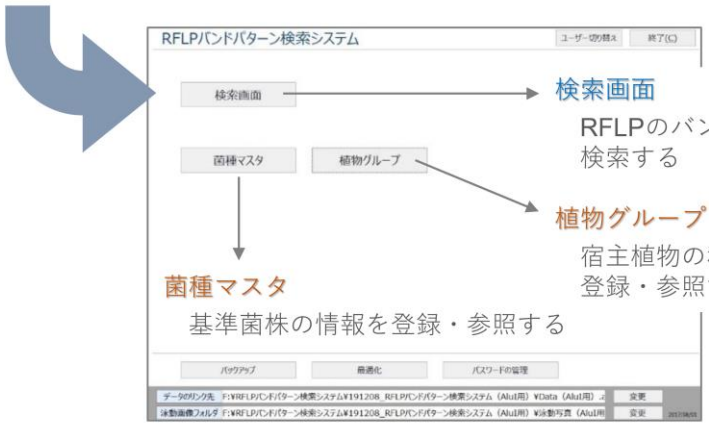
1つめ 「Data（AluI用）.accdb」または「Data（HhaI用）.accdb」ファイル



2つめ 「泳動写真（AluI用）」または「泳動写真（HhaI用）」フォルダ

管理者またはユーザーを選択してログインする

初期パスワードは「admin」
管理者は登録データおよびパスワードの編集ができる



検索画面

RFLPのバンドパターンなどから菌種を検索する

植物グループ

宿主植物の科と感染する菌種の組合せを登録・参照する

菌種マスタ

基準菌株の情報を登録・参照する

バンドパターンを検索するとき

検索画面

→ **宿主植物**の科を選択する

→ **バンドサイズ**を大きい順に5つまで入力する

バンドサイズを合計して470 bp前後になることを確認する。合計が足りない場合はバンドが重なっていることを想定し、泳動像でバンドの太さを確認・判断する。重なるバンドは値を連続して入力する。例：150-150-70-50-50

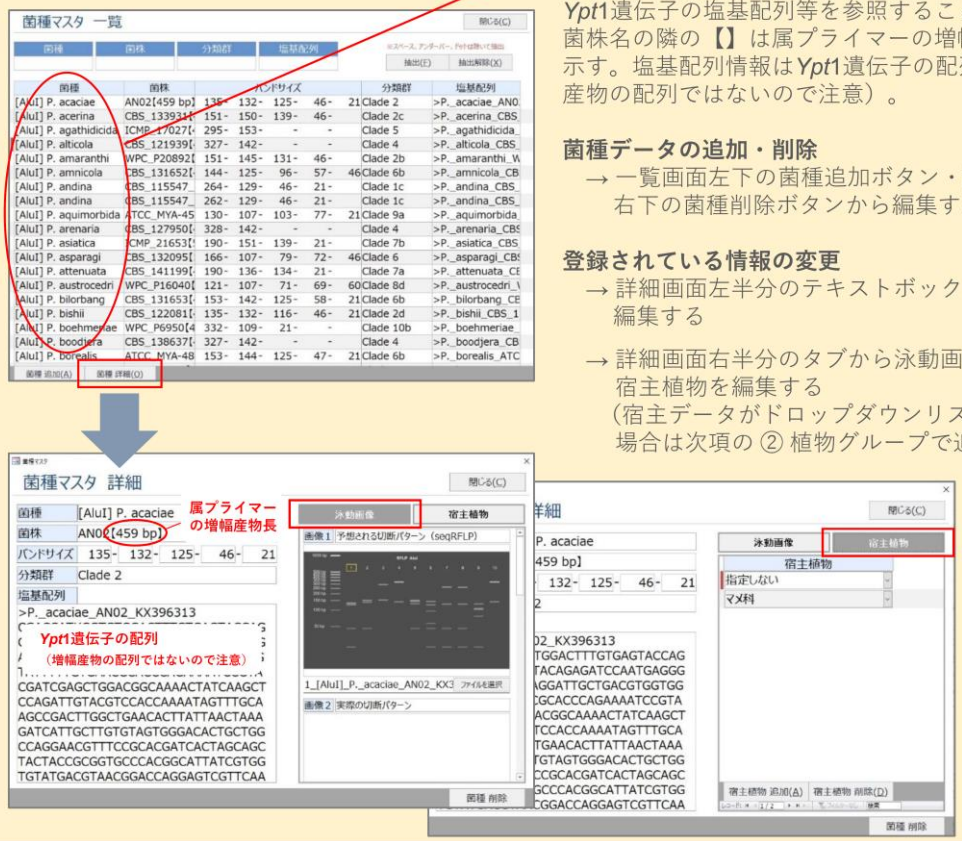
→ **許容幅**にバンドの前後何 bpまで検索するか指定する

→ **抽出**ボタンで検索すると、バンドパターンの類似度が高い順に表示される

※特定の菌株を調べたい場合は**菌株**に名前を入力して**抽出**ボタンで検索する

登録データを編集するとき

① 菌種マスタ



菌種を選択してダブルクリックまたは菌種詳細ボタンを押すと基準菌株のバンドパターンおよび*Ypt1*遺伝子の塩基配列等を参照することができる。菌株名の隣の【】は属プライマーの増幅産物長を示す。塩基配列情報は*Ypt1*遺伝子の配列（増幅産物の配列ではないので注意）。

菌種データの追加・削除

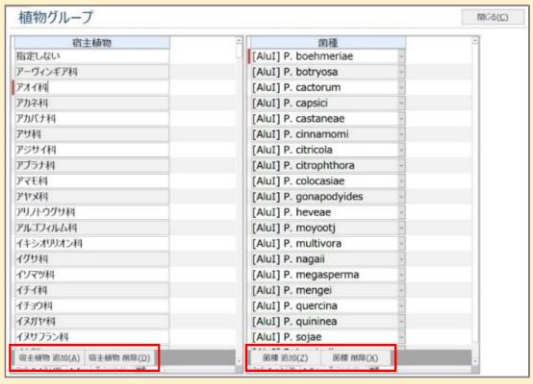
→ 一覧画面左下の菌種追加ボタン・詳細画面右下の菌種削除ボタンから編集する

登録されている情報の変更

→ 詳細画面左半分のテキストボックスを直接編集する

→ 詳細画面右半分のタブから泳動画像および宿主植物を編集する
（宿主データがドロップダウンリストにない場合は次項の ② 植物グループで追加する）

② 植物グループ



宿主データの追加・削除

→ 画面左下の宿主植物の追加・削除ボタンから編集する

宿主と菌種の関連付け

→ 画面右下の菌種の追加・削除ボタンから編集する
（② 菌種マスタ の詳細画面右半分の宿主植物タブから編集することもできる）

6 相同性検索（Local BLAST）

6.1 バーコード領域／遺伝子のシーケンス解析

検疫で検出された菌株のシーケンス解析および基準菌株の塩基配列を収集したデータベースの相同性検索（Local BLAST）を行い、既知種または新種であることを明らかにする。

データベースに登録されているバーコード領域／遺伝子

核 DNA

- rDNA-ITS 領域（= internal transcribed spacers）
- rDNA-LSU 遺伝子（= 28S ribosomal DNA）
- β-tubulin 遺伝子
- *Ypt*1 遺伝子（= Ras-like protein）
- *tigA* 遺伝子（= triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）

ミトコンドリア DNA

- *cox*1 遺伝子（= cytochrome *c* oxidase subunit 1）
- *cox*2 遺伝子（= cytochrome *c* oxidase subunit 2）

（準備） バーコード領域／遺伝子のシーケンス解析を行い、FASTA 形式で保存する。

反応条件

[変性]	94℃	3 min	
[変性]	94℃	30 sec	40 cycles
[アニール]	x_1 ℃※	x_2 sec※	
[伸長]	72℃	x_3 min※	
[伸長]	72℃	10 min	

表4 シーケンス解析用プライマー

プライマー配列		鎖長	位置	アニール温度 (x1)/アニール時間 (x2)/伸長時間 (x3)	プライマー終濃度	増幅産物長
rDNA-ITS 領域（White et al., 1990）						
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	22	-	55℃/30 秒/1 分	0.2 μM	≈ 800 bp
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	20				
rDNA-LSU 遺伝子（Blair et al., 2008）						
LROR-O	5'-ACCCGCTGAACTYAAGC-3'	17	25-41	53℃/30 秒/2 分	1 μM	1342 bp
LSUFint※1	5'-CKTTGACGAAATGGAGCGAT-3'	20	798-817			
LSURint※1	5'-TTTCCACACCCTAACACTTGC-3'	21	880-860			
LR6-O	5'-CGCCAGACGAGCTTACC-3'	17	1366-1350			
β-tubulin 遺伝子（Btub_F2, Btub_R1: Blair et al., 2008; Btub9A, Btub11B, Btub7, Btub13, Btub10: Li et al., 2021）						
Btub9A	5'-TAGTTCACATCCAAGGTGGC-3'	20	11-30	52℃/1 分/2 分	0.2 μM	1331 bp
Btub_F2※2	5'-CGGTAACAACTGGGCCAAGG-3'	20	291-310			
Btub11B※1	5'-CACATCACTTCATCGGCGTT-3'	20	602-583			
Btub7	5'-TTCATGATTGGTTTCGCGCC-3'	20	796-815			
Btub13A	5'-CGGCGCACATCATGTTCTT-3'	19	907-889			
Btub_R1※2	5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3'	21	1278-1259			
Btub10	5'-CTACATCATTTCGTCCATTTCTTC-3'	24	1341-1318			

*Ypt*1 遺伝子（Bi et al., 2018）						
Yph1F _mod2	5'-CGACCATKGGTGTGGACTTTG-3'	21	-	62℃/ 45 秒/ 30 秒	0.5 μM	≈ 470 bp
Yph2R _mod2	5'-ACGTTCTCRCAGGCGTATCTG-3'	21				
tigA 遺伝子（Tig_FY, G3PDH_rev, Tig_rev: Blair et al., 2008; Tig_Fw, Tig_Rv, Tig_Rv2: unpublished）						
Tig_FY	5'-TCGTGGGCGGYAAYTGGAA-3'	19	26-44	※3	1 μM	1694 bp
Tig_Rv2※1	5'-ATSACNACRTBGGTCCAGTC-3'	20	488-469			
TigFw※1	5'-AGCTGACGGGCATGTCNTTC-3'	20	1442-1461			
Tig_Rv※1	5'-CMGTVGGMACACGGAACGAC-3'	20	1474-1455			
G3PDH_rev	5'-GCCCCACTCRTTGTCRTACCAC-3'	22	1719-1698			
*cox*1 遺伝子（Robideau et al., 2011）						
OomCoxI Levup	5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3'	23	28-50	55℃/ 1 分/ 1 分	0.5 μM	727 bp
Fm85mod	5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAAA-3'	24	754-731			
*cox*2 遺伝子※4（Cox2-F: Hudspeth, 2000; FM78: Martin and Tooley, 2003; FMPhy-10b: Martin et al., 2004）						
Cox2-F	5'-GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC-3'	22	(-35)-(-14) (*cox*2)	52℃/ 1 分/ 1 分	1 μM	1282 bp
FM78※1	5'-ACAAATTTCACTACATTGTCC-3'	21	582-562 (*cox*2)			
FMPhy-10b	5'-GCAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA-3'	26	98-73 (*cox*1)			

※1　シーケンス反応にのみ使用するプライマー。

※2　β-tubulin 遺伝子は複数のバンドが出やすいため、ゲル片から PCR 産物の精製を行うとともに、いくつかのプライマーの組み合わせを試す必要がある。全長は 9A および 10 プライマー＋11B および 7 インナープライマーの組み合わせで増幅する。もしうまく増幅できない場合は、前半と後半に分割して増幅する。すなわち、前半は

9A および 13A プライマー＋11B インナープライマー、後半は 7 および 10 プライマー（インナープライマーなし）で増幅する。全長を必要とせず、簡易に種を同定するためのシーケンス解析であれば、Btub_F2 および Btub_R1 プライマーの組み合わせで得られる部分配列（～969 bp）を用いて相同性検索を行う。

※3　*tigA* 遺伝子はタッチダウン PCR で増幅する（以下参照）。

[変性]	94℃	2 min	
[変性]	94℃	30 sec	10 cycles（-1℃ / cycle to 56℃）
[アニール]	65℃	30 sec	
[伸長]	72℃	2 min	
[変性]	94℃	30 sec	30 cycles
[アニール]	56℃	30 sec	
[伸長]	72℃	2 min	
[伸長]	72℃	5 min	

※4　*cox*2 遺伝子は「*cox*2 全長 ～スペーサー領域 ～ *cox*1 遺伝子の一部まで」をシーケンス解析の範囲とする。

6.2 基準菌株のデータベースによる相同性検索

（準備）

- ファイル名の拡張子を表示するため、Windows のエクスプローラーの表示タブにある「ファイル名拡張子」のチェックボックスにチェックを入れる（Windows10 の場合）。

- フリーソフト BioEdit（http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html）からインストーラをダウンロードする。setup.exe をダブルクリックしてインストーラを起動し、指示に従ってインストールする（※）。

※ 通常は C ドライブ直下にインストールされる。USB にインストールすれば別の PC でも使用可能。

（注意事項）

ファイル名およびフォルダ名は半角英数字にする。アンダーバー以外の記号およびスペースは避ける。長い名前を付けるとエラーが出る場合がある。

相同性検索

（最初に相同性検索を行う場合は次項を参照してデータベースを登録する。）

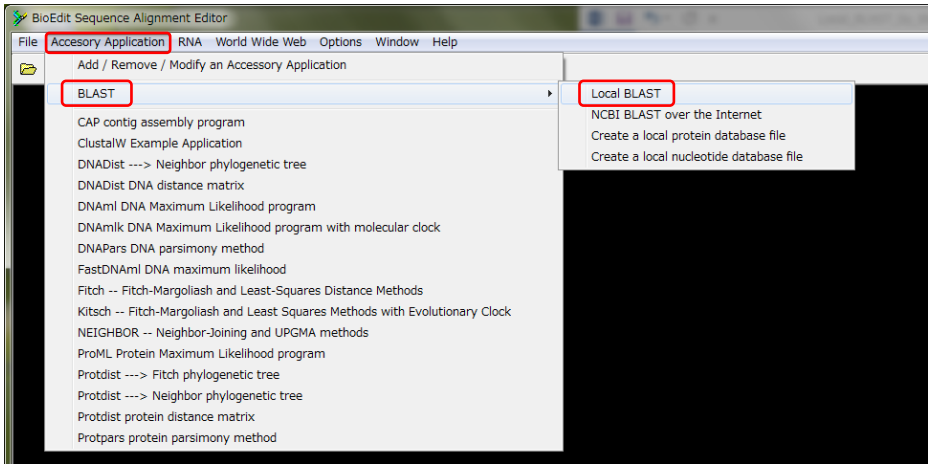
［手順］

1. 調査したい菌株の塩基配列が分かったら、以下のような FASTA 形式のファイル（.fas）を作成する。ここではファイル名を isolate.fas とする（複数の菌株を一つのファイルにまとめてもかまわない）。

```
>isolateA
GACTTTGTCAGTGACCTCTCTCTCTCT
TGCTGACGAGGGGATCGTGTTCTAACA
ATACTTATGCTGATTTATTTAGAAAATC
TGGACGGCAAGACCATCA
>isolateB
CCCCCCCCACTTTCCGTGGGTGAGTTTCCTTTAGCAACGA
CATGCAGCTAAGATCTATATTTTACTCTTCTAGTCGCAGAC
```

>菌株名 A [改行]
塩基配列 A [改行]
>菌株名 B [改行]
塩基配列 B [改行] …
※配列の途中に改行が含まれていてもよい。

2. インストールした BioEdit フォルダ内の BioEdit.exe をダブルクリックして起動し、メニューバーの【Accessory Application】から【BLAST】－【Local BLAST】をクリックして【NCBI Local BLAST】の解析ウィンドウを開く。



3. 【NCBI Local BLAST】の解析ウィンドウで以下の設定を行う。

Program：

塩基配列対塩基配列を検索： blastn

アミノ酸配列対アミノ酸配列を検索： tblastx

（入力した DNA とデータベースの DNA を翻訳して検索する。）

Nucleotide Database：

ドロップダウンリストから解析に用いるデータベースを選択する。

（作成したデータベースが見つからない場合は BioEdit を再起動する。それでも見つからない場合は database フォルダ内のファイル名を編集する。このとき編集前と同じ名前をつけてもよい。

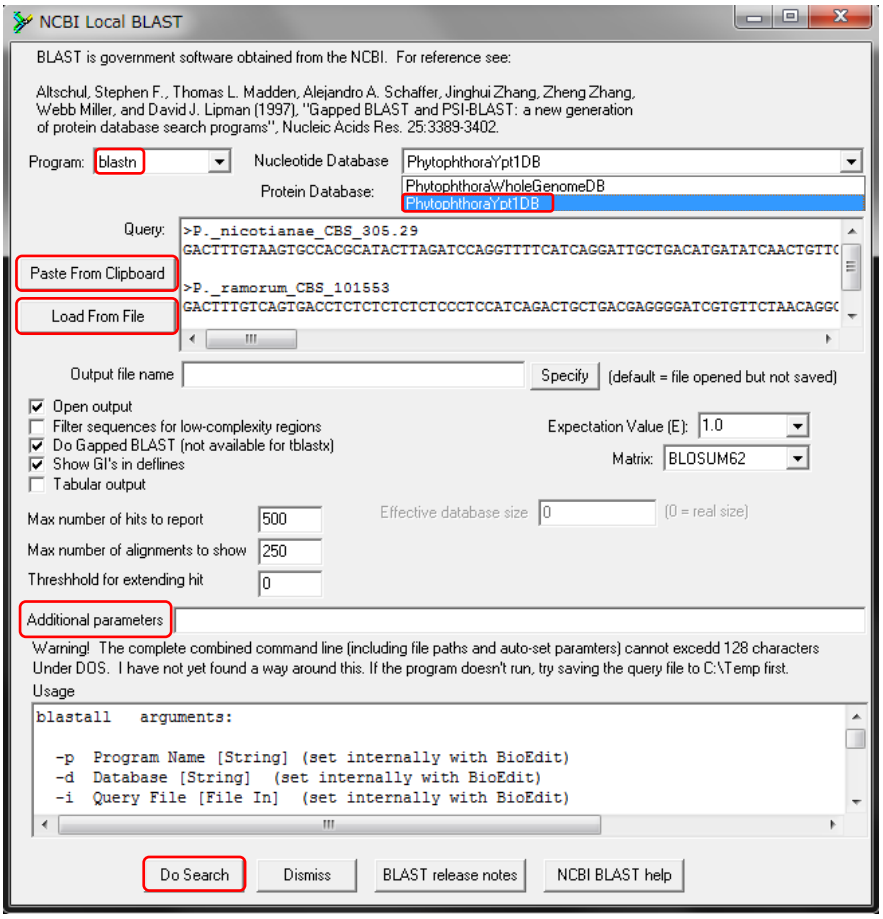
Query：

調べたい配列（isolate.fas）をメモ帳で開いてコピーし、【Paste From Clipboard】ボタンをクリックして（または Ctrl＋C ボタンで）テキストボックスにペーストする。または、【Load From File】ボタンをクリックして調べたい配列のファイル（isolate.fas）をアップロードする。

Additional Parameters：

相同性の低い配列を含む検索をしたい場合などに設定する。

例えば、-q （penalty for a nucleotide mismatch）、-r （reward for a nucleotide match）の初期値は「-q-3 -r1」なので、ボックスに「-q-2 -r3」と入力すると相同性の低い配列が得られる。詳細は最下段のテキストボックスを参照する。



4. 【Do Search】ボタンをクリックして BLAST 検索を実行する。

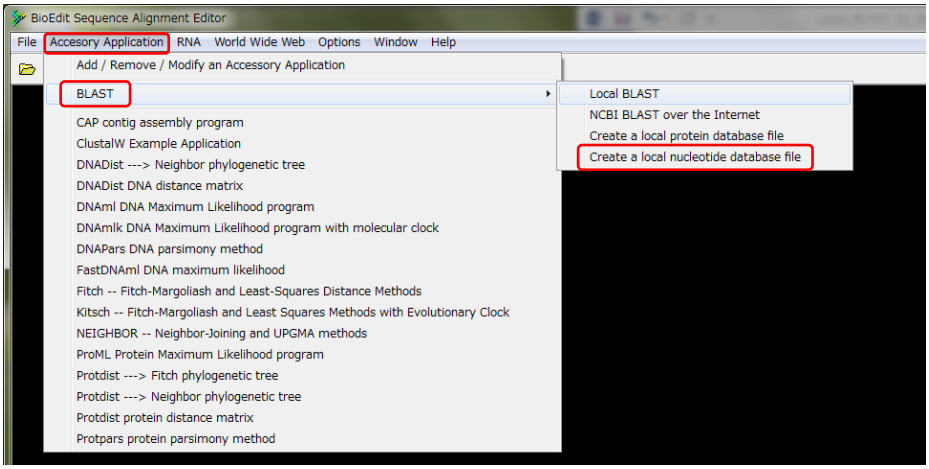
※ 検索結果のレイアウトが崩れる場合はキーボードで Ctrl+A を押して全選択し、「Courier new」などの等幅フォントに変更する。

データベースへの追加データ登録方法

［手順］

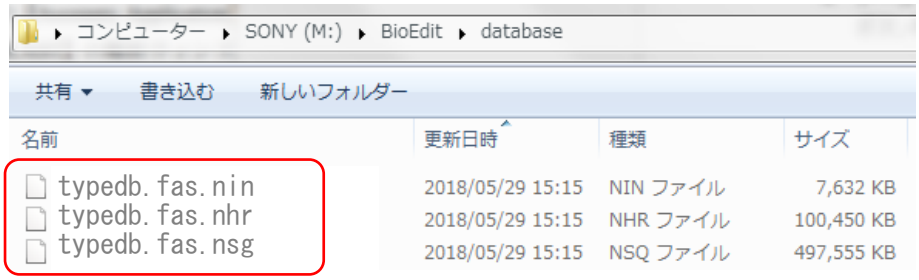
1. 基準菌株の塩基配列をまとめた FASTA ファイルが BioEdit プログラムと同じフォルダに保存されている。このファイルに新規のデータ（シーケンス結果など）を追加した FASTA ファイルを作成する。ここではファイル名を仮に typedb.fas とする。

2. インストールした BioEdit フォルダ内の BioEdit.exe をダブルクリックして起動し、メニューバーの【Accessory Application】から【BLAST】－【Create a local **nucleotide** database file】をクリックする。



3. 先に作成してある塩基配列をまとめた FASTA ファイル typedb.fas（仮名）を選択して【開く】ボタンをクリックすると、BioEdit の database フォルダ内にデータベース（拡張子の違う 3 つのファイル）が作成される（下図参照）。

※ データベース名（ファイル名）は変更可能。ただし、拡張子の違う 3 つのファイルには同じ名前をつける。データベースを消去したい場合は、これらのファイルを database フォルダから別の場所に移動、または削除する。



［基準菌株の塩基配列データベース（登録済み）］

- **All_typedb** ： すべての塩基配列情報
- **ITS_typedb** ： rDNA-ITS 領域の塩基配列情報
- **LSU_typedb** ： rDNA-LSU 遺伝子の塩基配列情報
- **cox1_typedb** ： *cox*1 遺伝子の塩基配列情報
- **cox2_typedb** ： *cox*2 遺伝子の塩基配列情報
- **btub_typedb** ： β-tubulin 遺伝子の塩基配列情報
- **Ypt1_typedb** ： *Ypt*1 遺伝子の塩基配列情報
- **tigA_typedb** ： *tigA* の塩基配列情報

7 ストック試薬・培地調製法

［核酸抽出関連試薬］

・ **カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2** （50 テスト分）
カネカ カタログ番号: KN-T110005 8,980 円

・ **OneStep PCR Inhibitor Removal Kits** （50 テスト分）
Zymo Research カタログ番号: D6030 20,000 円

・ **Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2** （50 テスト分）
日鉄住金環境 カタログ番号: 212-006 40,000 円

・ **PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent** （100 テスト分）
Thermo Fisher Scientific カタログ番号: 4318930 18,000 円

・ **1 M Tris-HCl（pH 8.0）** 4℃保存

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol（M.W. = 121.14）（Tris）
富士フイルム和光純薬 カタログ番号: 204-07885 500 g 8,950 円

5 N 塩酸 HCl（M.W. = 36.46）
ナカライテスク カタログ番号: 37345-15 500 mL 1,700 円

Tris 60.55 g を超純水 400 mL に溶解し、5 N 塩酸で pH 8.0 に調整した後、超純水で 500 mL にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ **0.5 M EDTA（pH 8.0）** 4℃保存

EDTA・2Na（Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate）（M.W.=372.24）
富士フイルム和光純薬 カタログ番号: 345-01865 500 g 7,000 円

水酸化ナトリウム 顆粒状 NaOH（M.W. = 40.00）
富士フイルム和光純薬 カタログ番号: 193-16495 500 g 1,300 円

EDTA・2Na 93.06 g を超純水 350 mL に溶解し、水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整する（pH が低いうちは完全に溶解しない。顆粒の水酸化ナトリウムで大まかに pH を上げ、液体の水酸

化ナトリウムで微調整するとよい。）超純水で 500 mL にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ **TE Buffer（10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA, pH 8.0）** 4℃保存

1M Tris-HCl（pH 8.0）1 mL、0.5 M EDTA（pH 8.0）200 μL に超純水を加え 100 mL にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

［LAMP 関連試薬］

・ 液体蛍光試薬 **Isothermal Master Mix** （400 テスト分）
キヤノンメディカルシステムズ（専用チューブ※**別売**）
カタログ番号： ISO-001 89,000 円

・ 液体蛍光試薬 **Isothermal Master Mix** （100 テスト分）
ニッポンジーン（専用チューブ※**付属**）
カタログ番号： 313-81103 32,000 円

※Genie® II/III および Genelyzer™ F II/F III 専用 8 連チューブ

・ ウシ血清アルブミン（**Bovine Serum Albumin: BSA**）
メルク カタログ番号： A2153-10G 10 g 16,900 円

・ ***Bst* DNA Polymerase**（濁度検出）
ニッポンジーン （8 U / μL, 1,600 U）
カタログ番号： 311-07481 11,000 円

・ **1 M Tris-HCl（pH 8.8）** 4℃保存（濁度検出）

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol（M.W. = 121.14）（Tris）
富士フイルム和光純薬 カタログ番号： 204-07885 500 g 8,950 円

5 N 塩酸 HCl（M.W. = 36.46）
ナカライテスク カタログ番号： 37345-15 500 mL 1,700 円

Tris 60.55 g を超純水 400 mL に溶解し、5 N 塩酸で pH 8.8 に調整した後、超純水で 500 mL にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ **1 M KCl** 4℃保存（濁度検出）

KCl（M.W. = 74.55）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 163-03545　500 g　1,350 円

KCl 7.46 g に超純水を加えて溶解し、100 mL にメスアップして、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ **10% Tween20** 4℃保存（濁度検出）

Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate（M.W. = 74.55）（Tween20）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 166-21213　100 g　3,000 円

超純水で 10%溶液（w/v）を作成し、フィルター滅菌する。

・ **100 mM $MgSO_4$** 4℃保存（濁度検出）

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（M.W. = 246.47）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 131-00405　500 g　1,100 円

KCl 4.93 g に超純水を加えて溶解し、200 mL にメスアップして、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ **1M $(NH_4)_2SO_4$** 4℃保存（濁度検出）

$(NH_4)_2SO_4$（M.W. = 132.14）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 019-03435　500 g　1,300 円

$(NH_4)_2SO_4$ 13.21 g に超純水を加えて溶解し、100 mL にメスアップして、フィルター滅菌する。

・ **5 M ベタイン溶液**（濁度検出）

メルク　　カタログ番号: B0300-5VL 5 VIAL 19,800 円

・ **100 mM dNTPs**（濁度検出）

dNTP Set, 100 mM Solutions（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）4×100 μmol

GE ヘルスケア ライフサイエンス／グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン

カタログ番号: 28406552　　69,800 円

・ ミネラルオイル（目視検出）

メルク　　カタログ番号: M5904-5ML 5 mL 2,700 円

・ **DNA 検出試薬**（目視検出）

SYBR Green® I（×10,000）-20℃遮光保存

タカラバイオ　　カタログ番号: 5761A 50 μL×10 44,400 円

SYBR（×10,000）を滅菌水で 10 倍に希釈し（×1,000）、1.5 mL チューブに分注して-20℃で遮光保存する。

[PCR および PCR-RFLP 関連試薬]

・ **DNA 増幅酵素 *TaKaRa Taq*™ Hot Start Version**（5 U / μL, 250 U）
タカラバイオ　カタログ番号: R007A　29,000 円

・ **ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin: BSA）**
メルク　カタログ番号: A2153-10G　10 g 16,900 円

・ **ローディングバッファー 6× Loading Buffer**
タカラバイオ　カタログ番号: 9156　1 mL×10 12,000 円

・ **DNA 分子量マーカー（PCR 用、PCR-RFLP 用）**
Quick-Load 1 kb Plus DNA Ladder (0.1-10.0 kb)
New England Biolabs　カタログ番号: N0469S　1.25 mL 12,000 円

50bp DNA Ladder RTU (Ready-to-Use)
GeneDireX　カタログ番号: BC-DM012-R500
（販売代理店: バイオメディカルサイエンス）　500 μL 10,000 円

・ **制限酵素（*Alu*I、*Hha*I）**
FastDigest *Alu*I
Thermo Fisher Scientific　カタログ番号: FD0014　100 reactions 15,800 円

FastDigest *Hha*I
Thermo Fisher Scientific　カタログ番号: FD1854　200 reactions 13,600 円

・ **0.5 M EDTA（pH 8.0）** 4℃保存
EDTA・2Na（Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate）（M.W.=372.24）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 345-01865　500 g　7,000 円

水酸化ナトリウム 顆粒状 NaOH（M.W. = 40.00）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 193-16495　500 g　1,300 円

EDTA・2Na 93.06 g を超純水 350 mL に溶解し、水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整する（pH が低いうちは完全に溶解しない。顆粒の水酸化ナトリウムで大まかに pH を上げ、液体の水酸

化ナトリウムで微調整するとよい。）超純水で 500 mL にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ 電気泳動用バッファー

50× TAE（EDTA 入り 2 M トリス酢酸バッファー pH 8.0） 常温保存

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol（M.W. = 121.14）（Tris）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号：204-07885　500 g　8,950 円

酢酸 CH_3COOH（M.W. = 60.05）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号：017-00256　500 mL 1,000 円

Tris 242 g、酢酸 57.1 mL、0.5 M EDTA（pH 8.0）100 mL に脱イオン水を加え 1 L にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

5× TBE（EDTA 入り 0.5 M トリスホウ酸バッファー pH 8.2） 常温保存

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol（M.W. = 121.14）（Tris）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号：204-07885　500 g　8,950 円

ホウ酸 HCl（M.W. = 61.83）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号：021-02195　500 g　1,180 円

Tris 60.55 g、ホウ酸 30 g、0.5 M EDTA（pH 8.0）40 mL に脱イオン水を加え 1 L にメスアップし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

・ ゲル蛍光染色液（**GelRed**）

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water 常温遮光保存
Biotium　カタログ番号：41003　0.5 mL　23,200 円

塩化ナトリウム NaCl（M.W. = 58.44）
富士フイルム和光純薬　カタログ番号：191-01665　500 g　930 円

GelRed (×10,000) は滅菌水で 10 倍に希釈し (×1,000)、1.5 mL チューブに分注して常温で遮光保存しておく。GelRed (×1,000) 400 μL および塩化ナトリウム 2.34 g を脱イオン水 400 mL に溶解し、染色液として用いる（常温で遮光保存）。繰り返し使用可能だが、蛍光が弱まるので定期的に取り換える。

- 電気泳動用ゲル

Agarose S（スタンダード）
ニッポンジーン　カタログ番号: 312-01193　100 g　15,200 円

Agarose SFR（低分子量用の低融点アガロース、高濃度でも融解しやすい）
Amresco　カタログ番号: J234-25G　25 g　19,000 円

[疫病菌分離用選択培地（タチガレン添加 NARM 寒天培地）関連試薬]

- コーンミールアガー　BBL Corn Meal Agar
  Becton, Dickman and Company
  カタログ番号: 211132　500 g　23,520 円

- 寒天　STAR Agar L-grade 01
  理科研　カタログ番号: RSU-AL01-500G　500 g　8,500 円

- アンピシリン　Ampicillin Sodium（M.W. = 100.09）
  富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 012-23303　10 g　5,600 円

- ナイスタチン　Nystatin（M.W.=926.1）
  メルク　カタログ番号: N3503-5MU　-　15,700 円

- リファンピシン　Rifampicin（M.W. = 822.94）
  富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 189-01001　1 g　5,000 円

- ミコナゾール　Miconazole Nitrate（M.W. = 479.14）
  富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 134-12661　1 g　3,000 円

- DMFA（N,N-Dimethylformamide）（M.W. = 73.09）
  富士フイルム和光純薬　カタログ番号: 049-02914　100 mL　1,500 円

・ タチガレン液剤（ヒドロキシイソオキサゾール液剤） 農林水産省登録第10331号
三井化学アグロ カタログ番号： - 100 mL 670 円

タチガレン添加 NARM 寒天培地の組成

		添加量	終濃度	
Cornmeal agar		3.4 g	（Agar 1.5%）	Agar は合計 2.5%
寒天		1.0 g	（1.0%）	
Nystatin	(10 mg/mL)	ストック溶液（後述）各 200 µL	（10 ppm）	
Ampicillin	(250 mg/mL)		（250 ppm）	
Rifampicin	(10 mg/mL)		（10 ppm）	
Miconazole	(1 mg/mL)		（1 ppm）	
Hydroxyisoxazole		166 µL	（250 ppm）	

（タチガレン：ヒドロキシイソオキサゾールカリウム塩 41.52%、ヒドロキシイソオキサゾールとして 30.0%）

Total **200 mL**（シャーレに分注して 4℃保存）

タチガレン添加 NARM 寒天培地の作成手順

（準備） 抗生物質ストック溶液（※）

（1）水に溶解させるもの： アンピシリン

組成

Ampicillin	1000 mg
滅菌水でメスアップ	**4 mL**（チューブに分注して-20℃保存）

（2）DMFA に溶解させるもの： ナイスタチン、リファンピシン、ミコナゾール

組成

Nystatin	40 mg
Rifampicin	40 mg
Miconazole	4 mg
DMFA でメスアップ	**4 mL**（チューブに分注して-20℃保存）

※ 抗生物質ストック溶液は 1.5 mL チューブに 200 µL ずつ分注しておく。

1. 300 mL の三角フラスコに Cornmeal agar 3.4 g、寒天 1.0 g、脱イオン水 200 mL を量り入れ、121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。

2. オートクレーブした培地を 60℃まで冷ましてから、アンピシリンストック溶液（1）200 μL、ナイスタチン-リファンピシン-ミコナゾールストック溶液（2）200 μL および タチガレン液剤 166 μL を添加し、ゆるやかに攪拌する。

3. （クリーンベンチ内で作業する） 滅菌した駒込ピペットで、9 cm シャーレに 10 mL ずつ分注する。

4. （クリーンベンチ内で作業する） シャーレの蓋を半分開けてくもりがとれるまで乾燥させてから使用する。余ったシャーレは 4℃で保存する。

[DNA 抽出用疫病菌培養培地（V8 ジュース寒天培地）関連試薬]

- V8 ベジタブルジュース
  キャンベル　-　163 mL×6 缶　514 円

- 寒天　STAR Agar L-grade 01
  理科研　カタログ番号：RSU-AL01-500G
  500 g　8,500 円

- 炭酸カルシウム　$CaCO_3$ （M.W. = 100.09）
  富士フイルム和光純薬　カタログ番号：030-00385　500 g　2,650 円

V8 ジュース寒天培地の組成

組成		終濃度
V8 ジュース（163 mL）	1 缶	-
炭酸カルシウム	2.5 g	-
寒天	20 g	（2.0%）
脱イオン水でメスアップ	**1000 mL**	（プレートに分注して 4℃保存）

V8 ジュース寒天培地の作成手順

1. 300 mL のビーカーに V8 ジュース（163 mL）1 缶と炭酸カルシウム 2.5 g（pH を調製するため）を量り入れ、マグネチックスターラーで 30 分間攪拌する。

2. 50 mL の遠沈管 4 本に分注し、4,000 rpm、10 分間、室温で遠心する。

3. 上清をメスシリンダーに移し、脱イオン水で 1 L にメスアップして、混和する。

4. 300 mL の三角フラスコ 4 本に寒天を 5 g ずつ量り入れ、3. で調整した上清を 200 mL ずつ分注し、よく攪拌する。

5. 121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する（分注用の駒込ピペットも滅菌する）。

6. （クリーンベンチ内で作業する）滅菌した 10 mL 駒込ピペットで、9 cm シャーレに 10 mL ずつ分注する。

7. （クリーンベンチ内で作業する）シャーレの蓋を半分開け、くもりがとれるまで乾燥させてから蓋をする。余ったシャーレは 4℃で保存する。

[疫病菌保存用スラント（CMA スラント）関連試薬]

- メイズ（乾燥とうもろこし）
  ぴよっちゅ ※ 乾燥したトウモロコシのみの鳥の餌
  朝日商事　500 g×2　326 円

- 寒天　STAR Agar L-grade 01
  理科研　カタログ番号：RSU-AL01-500G
  500 g　8,500 円

CMA スラントの組成

組成		終濃度
トウモロコシの煮汁	x mL	-
寒天	20 g	(2.0%)
脱イオン水でメスアップ	**1000 mL**	（スラントに分注して 4℃保存）

CMA スラントの作成手順

1. 脱イオン水でメスシリンダーを共洗いし、1 L 用意する。

2. 乾燥トウモロコシを 20 g 量り取り、ミキサーで大きい粒がなくなるまで粉砕する。

3. 2 L の三角フラスコに粉砕したトウモロコシを入れ、1. で用意した 1 L の脱イオン水を、フラスコの壁面を洗うように少しずつ加える。

4. 充分な大きさの鍋に、アルミホイルで蓋をした 3. の三角フラスコを置き、周りにフラスコ内の液面と同じ高さになるまで水道水を満たし、IH ヒーター（設定は“中 180”）で加温する。沸騰したら 10 分ごとに攪拌しながら 60 分間湯煎する（以降の手順で再び湯煎するのでお湯は残しておく）。

5. 2 L のメスシリンダーに漏斗をセットし、漏斗に 2 重にしたガーゼ（または手ぬぐい）を敷き、脱イオン水で湿らせて、クリップで固定する。

6. 4. のトウモロコシ煎汁を、5. のガーゼ付き漏斗でろ過し、ろ液を脱イオン水で 1 L までメスアップする（ガーゼおよび三角フラスコに残った残渣は破棄する）。

7. 2 L の三角フラスコに寒天 20 g を量り入れ、6. で調整したろ液をフラスコの壁面を洗うように少しずつ加え、よく混和する。

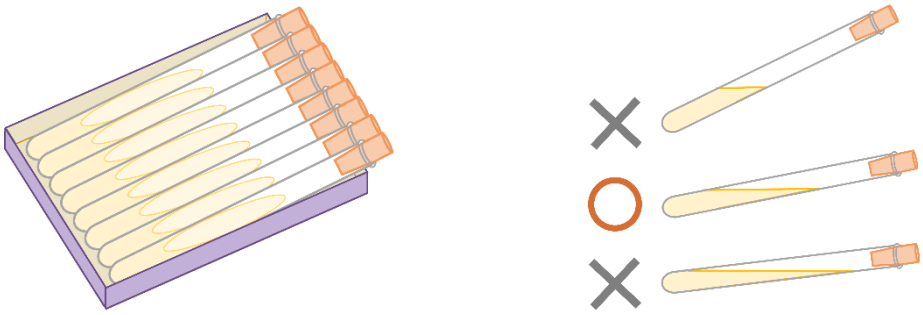
8. 4. と同様に 30 分ほど湯煎し、寒天を溶解させる。

9. オートクレーブ用試験管立てに試験管を 100 本程度用意する。シリコン栓も同じだけ用意する。

10. 大きい試験管は 12 mL、小さい試験管は 8 mL ずつ、8. の湯煎液を培地分注器で分注する。分注の間、三角フラスコはヒーターから下ろし、湯煎したまま、時々攪拌する（冷めて寒天が固まること、寒天が沈んで濃度差ができることを防ぐため）。

11. しわができないように注意して試験管に栓をし、121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する（使い終わった培地分注器は湯煎の熱いお湯で洗浄する）。

12. 培地が固まらない温度（60℃程度）でオートクレーブから取り出し、紙箱の蓋などを使って角度を調整し、室温で固める（角度は下図参照）。固まったらチャック付きのビニール袋に入れ、4℃で保存する。



［機器および器具］

・ マイクロピペット

ピペットマン P2 （0.2～2.0 μL）
ギルソン カタログ番号: F144801 37,000 円
ピペットマン P20 （2.0～20 μL）
ギルソン カタログ番号: F123600 32,000 円
ピペットマン P200（50～200 μL）
ギルソン カタログ番号: F123601 32,000 円

・ ピペットチップ

10 μL フィルターチップ システムラック（PP） 960 本
ワトソン カタログ番号: 124P-10S 10,500 円
20 μL フィルターチップ システムラック（PP） 960 本
ワトソン カタログ番号: 124P-20S 10,500 円
200 μL フィルターチップ システムラック（PP） 960 本
ワトソン カタログ番号: 1252-703CS 12,500 円

・ チューブ

1.5 mL マイクロチューブ ハイシール 平底 1,000 本
ワトソン カタログ番号: 131-815C 1,800 円
2 mL BIO-BIK スクリューキャップチューブ 500 本
イナ・オプティカ カタログ番号: 2220 11,000 円

・ 駒込ピペット

駒込ピペット 10 mL／スポイト 10 mL 用 1 本／1 個
アズワン カタログ番号: 33456613／6-356-04 580 円／227 円

・ 培地分注器

ソコレックス SH（連続式自動分注器）5～20 mL 用
アズワン カタログ番号: 33223276／2-5312-06 34,200 円

・ プラスチックシャーレ

γ 滅菌NEシャーレ ECO 10 枚×50 袋
栄研化学 カタログ番号: AU3200 12,300 円

- マグネティックスタンド

MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands　1.5 mL 12 本用

プロメガ	カタログ番号:	Z5342	24,000 円

- ステンレスビーズ

ステンレス球 SUS-1/4　100 個

アズワン	カタログ番号:	5-3487-03	755,000 円

- ビーズ破砕機

ビーズ式細胞破砕装置 Micro Smash™

トミーメディコ	カタログ番号:	MS-100	755,000 円

- ミニ遠心機

Cubee

アズワン	カタログ番号:	3-6092-01	28,500 円

- 遠心機

マイクロ冷却遠心機 3740

KUBOTA			756,000 円

スイングローター

KUBOTA	カタログ番号:	SF-240	88,000 円

バケット×4 50 mL コニカル管用

KUBOTA	カタログ番号:	053-5010	36,800 円

マイクロローター

KUBOTA	カタログ番号:	AF-2724A	150,000 円

- ブロックインキュベーター

ドライブロックインキュベーター 冷却タイプ

バイオメディカルサイエンス	カタログ番号:	BSR-MiniTC	34,800 円

A-T ブロック 0.2 mL 用

バイオメディカルサイエンス	カタログ番号:	BSR-004-01	12,800 円

C-T ブロック 1.5 mL 用

バイオメディカルサイエンス	カタログ番号:	BSR-004-03	12,000 円

・ **UV トランスイルミネーター／ゲル撮影装置**

2 UV ハイパフォーマンス トランスイルミネーター TFML-20

Analytik Jena　カタログ番号: 95-0431-01　240,000 円

ゲル撮影装置（カメラ付属）

BIO CRAFT　カタログ番号: SK-470　198,000 円

9 文献

［**LAMP**］

・ *P. nicotianae* 特異的プライマーの配列および罹病植物からの簡易 DNA 抽出法
A. Hieno, M. Li, A. Afandi, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama: Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* by simple DNA extraction and real-time loop-mediated isothermal amplification assay. (2019) Journal of Phytopathology 167: 174-184. DOI: 10.1111/jph.12785

・ *Phytophthora* 属特異的プライマー、*P. nicotianae* 特異的 QProbe の配列および StepOnePlus™ を用いた LAMP 反応の手順
A. Hieno, M. Li, A. Afandi, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama: Detection of the genus *Phytophthora* and the species *Phytophthora nicotianae* by LAMP with a QProbe. (2020) Plant Disease 104(9): 2469-2480. DOI: 10.1094/PDIS-12-19-2523-RE

・ *P. ramorum*、*P. keronviae*、*P. lateralis* 特異的プライマー、植物プライマーの配列およびマルチプレックス LAMP の反応条件
A. Hieno, M. Li, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama: Multiplex LAMP detection of the genus *Phytophthora* and four *Phytophthora* species *P. ramorum*, *P. lateralis*, *P. kernoviae*, and *P. nicotianae*, with a plant internal control. (2021) Microbes and Environments 36(2): ME21019. DOI: 10.1264/jsme2.ME21019

［**PCR**］

・ *Phytophthora* 属特異的プライマーの配列
X. Bi, A. Hieno, K. Otsubo, K. Kageyama, G. Liu, M. Li: A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. (2019) Journal of General Plant Pathology 85(1): 12-22. DOI: 10.1007/s10327-018-0822-3

・ *P. nicotianae* 特異的プライマーの配列
M. Li, T. Asano, H. Suga, K. Kageyama. A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. (2011) Plant Disease 95(10):1270-1278. DOI: 10.1094/PDIS-01-11-0076

・ 植物プライマーの配列
F. N. Martin, P. W. Tooley, C. Blomquist: Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of Sudden Oak Death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. (2004) Phytopathology 94(6):621-631. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.621

・ マルチプレックス PCR の反応条件および土壌からの DNA 抽出法
Manuscript in preparation

［PCR-RFLP］

・ PCR-RFLP による簡易種同定
Manuscript in preparation

［シーケンス解析］

・ rDNA-ITS 領域のシーケンスプライマー配列
T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (1990) Academic Press, San Diego 315-322.

・ rDNA-LSU 遺伝子、β-tubulin 遺伝子、*tigA* 遺伝子のシーケンスプライマー配列
J. E. Blair, M. D. Coffey, S. Y. Park, D. M. Geiser, S. Kang: A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. (2008) Fungal Genetics and Biology 45(3): 266-277. DOI: 10.1016/j.fgb.2007.10.010

M. Li, A. Hieno, K. Motohashi, H. Suga, K. Kageyama: *Pythium intermedium*, a species complex consisting of three phylogenetic species found in cool-temperate forest ecosystems. (2021) Fungal Biology 125(12): 1017-1025.
DOI: 10.1016/j.funbio.2021.07.004

・ *cox*1 遺伝子のシーケンスプライマー配列
G. P. Robideau, A. W. De Cock, M. D. Coffey et al.: DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. (2011) Molecular Ecology Resources 11(6): 1002-1011. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x

・ *cox*2 遺伝子のシーケンスプライマー配列
D. S. S. Hudspeth, S. A. Nadler, M. E. S. Hudspeth: A *COX2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. (2000) Mycologia, 92(4): 674-684.
DOI: 10.1080/00275514.2000.12061208

F. N. Martin and P. W. Tooley: Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. (2003) Mycologia, 95(2): 269-284. DOI: 10.1080/15572536.2004.11833112

F. N. Martin, P. W. Tooley, C. Blomquist: Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of Sudden Oak Death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. (2004) Phytopathology 94(6):621-631. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.621

・ *Ypt*1 遺伝子のシーケンスプライマー配列
X. Bi, A. Hieno, K. Otsubo, K. Kageyama, G. Liu, M. Li: A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. (2019) Journal of General Plant Pathology 85(1): 12-22. DOI: 10.1007/s10327-018-0822-3

10 トラブルシューティング

［**LAMP**］

LAMP 反応の留意点（**p. 9**～）を確認する。

1. （蛍光・濁度）測定値のベースラインが高い。

→ 内部の汚れを掃除して、再度測定を試みる。それでも改善しない場合は、業者による部品の清掃・交換が必要になる。
（測定開始前にチューブの蓋を力いっぱい閉めると、ひびが入って測定中に反応液が漏れ出し、内部の汚染に繋がるため、注意する。）

→ StepOne™/StepOnePlus™リアルタイム PCR システムの場合、装置の検出感度が非常に高いため、フリーの QProbe 由来の蛍光によって陰性コントロールのベースラインが高くなる（検出感度および特異性には影響がない）。フリーの QProbe 由来の蛍光は単一のピークにならず、横這いの波形となる。そのため、陽性コントロールのピークと比較することで正確な検出を行うことができる。

2. （蛍光・濁度）分注した反応液が凍る。

→ アイスブロックの代わりに、氷上に置いたアルミラックを用いることで反応液が凍らなくなる。
アイスブロックを用いる場合は、しばらく室温に置く、または最初に一番外側の列にチューブを差して、ラックが温まってきたら 2 列ずつ内側に移動しながら温度を調節する。

3. （蛍光・濁度）増幅曲線の立ち上がりが遅い。

→ 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが遅い場合、または検出限界の菌体 DNA が検出できなくなった場合は、試薬が使用期限内であることを確認する。酵素を新しくすることで改善する場合が多い。

4. （蛍光・濁度）植物 **DNA** 由来の増幅がない。

→ 植物プライマーで増幅可能／不可能な植物リスト（p. 13～）を確認する。増幅不可能とされている科の植物は、植物プライマーのインターナルコントロールを含めずに判定する。

植物抽出 DNA の中に核酸の増幅反応を阻害する物質（多糖類やフェノール化合物など）が多く含まれている場合は、増幅が得られないことがある。その場合は追加精製し（p. 6～）、再試験を行う。
蛍光のマルチプレックス LAMP で植物 DNA を追加精製しても増幅が得られない場合は、シンプレックス LAMP の結果を併せて判断する（マルチプレックス LAMP では菌体 DNA の検出を妨げないように、植物プライマーの濃度を可能な限り低くしているため）。

5. （蛍光）会合曲線・融解曲線が安定しない。

→ 測定の終了間際に増幅が始まった場合は、増幅産物の大半が伸長反応の途中で中断されてしまっている可能性があり、会合曲線・融解曲線が安定しない。しかし、測定時間を延長するとプライマーの特異性に影響が出てしまうため、反復試験によって測定結果の確からしさを確認する。また、マルチプレックス LAMP の場合はシンプレックス LAMP の結果を併せて判断する。

6. （蛍光）会合曲線・融解曲線のピークが重なって判別できない。

→ 植物プライマー由来の増幅産物の会合曲線・融解曲線のピークは様々な値をとるため、*Phytophthora* 属菌のピークと重なる場合がある。植物の検体を扱う場合は健全組織からも DNA を抽出し、陽性コントロールの菌体 DNA の増幅産物とピークが重ならないことを確認する。もし判別できないほど重なっている場合は、植物プライマーを除いて LAMP 反応を行う。

［**PCR**］

PCR の留意点（p. 34～）を確認する。

1. 分注した反応液が凍る。

→ アイスブロックの代わりに、氷上に置いたアルミラックを用いることで反応液が凍らなくなる。
アイスブロックを用いる場合は、しばらく室温に置く、または最初に一番外側の列にチューブを差して、ラックが温まってきたら 2 列ずつ内側に移動しながら温度を調節する。

2. 植物 DNA 由来の増幅がない。

→ 植物抽出 DNA の中に核酸の増幅反応を阻害する物質（多糖類やフェノール化合物など）が多く含まれている場合は、増幅が得られないことがある。その場合は追加精製し（p. 6～）、再試験を行う。

［PCR-RFLP］

PCR の留意点（p. 34～）を確認する。

1. 電気泳動用の 4.0%アガロースゲルが作成しにくい。

→ 通常のアガロースではなく、溶解性に優れた低融点アガロース（Amresco Agarose SFR など）を用いる。溶解中は常に溶液が動くように頻繁に攪拌する。ホットスターラーを用いて溶解してもよい。

2. 泳動像がぼやけている。

→ ゲル蛍光染色液が古い場合は新しく作り直す（p. 55～）。
ゲルを薄く、厚さ 3 mm 程度で作成することによって、鮮明な泳動像を得られる。

3. バンドが分離できない。

→ ゲルの濃度を4.0%程度まで濃くすることによって、低分子量のバンドの分離能を高めることができる。低融点アガロース（Amresco Agarose SFR など）は室温で完全にゲル化した後、泳動前に 4℃で 30 分間静置すると分離能が向上する。

4. バンドパターンに該当する種が複数ある。

→ 宿主の詳細な情報から種を推定する（別添参照）。
シーケンス解析および相同性検索を行う（p. 42～）。

5. バンドパターンに該当する種がない。

→ バンドサイズを合計して 470 bp 前後になることを確認する。合計が足りない場合は 2 本のバンドが重なっていることを想定し、泳動像でバンドの太

さを確認する。バンドが太く、重なっている場合は同じ値を連続して入力する（例：150-150-70-50-50）。また、許容幅を広く指定して検索する。
それでも該当する種がない場合は、シーケンス解析および相同性検索を行う（p. 42～）。

［シーケンス解析］

PCR の留意点（p. 34～）を確認する。

1. PCR でバーコード領域／遺伝子が増幅しない。

→ PCR で目的のバンドが増幅しない場合は以下の条件を変更する。

- アニール温度を下げる。
- DNA の添加量を増やす（～5 μL 程度）。
- DNA の再抽出を行う。

2. PCR で目的以外のバンドが出る。

→ 目的のバンドが濃く、その他のバンドが薄い場合は、PCR 産物を希釈してから純化し、シーケンス反応を行うことでノイズの低い波形が得られる場合がある。
目的以外のバンドが濃い場合は、目的のバンドを含むゲル片を切り取り、そこから PCR 産物の精製・純化を行い、シーケンス反応に用いる。このとき、再度 PCR で増幅するとスメアの多い増幅産物になるため、回収量を増やしたい場合は可能な限り多くの PCR 産物を電気泳動し、精製する。