

食安発1116第4号
平成24年11月16日

各 検疫所長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長
(公印省略)

安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について

組換えDNA技術応用食品の検査方法については、平成13年3月27日付け食発第110号厚生労働省医薬食品局食品保健部長通知(最終改正:平成20年6月18日。以下「旧通知」という。)によって通知しているところですが、食品表示規制業務が消費者庁に移管されたことに伴い、食品表示規制に係る安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法については消費者庁より通知されることから、これまでの関係通知についても、一つの通知に取りまとめることとしました。

このため、安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について、別添のとおり定め、旧通知及び別紙に掲げる通知を廃止します。

(別紙)

- 安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について
(平成 19 年1月 26 日付食安監発第 0126006 号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、最終改正:平成 24 年 5 月 28 日)
- 安全性未審査の遺伝子組換えナタネ(RT73 *B.rapa*)の暫定検査法について
(平成 21 年6月 26 日付食安監発第 0626008 号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、最終改正:平成 21 年 9 月 14 日)
- 安全性未審査の遺伝子組換え亜麻(FP967)の暫定検査法について
(平成 21 年 10 月 27 日付食安監発 1027 第3号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知)
- 安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)の暫定検査法について
(平成 23 年2月 22 日付食安監発 0222 第4号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知)

(別添)

安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法

目次

I. 検体採取方法

II. 個別検査方法

- ・ 亜麻 (FP967) の検査方法
- ・ コメ (63Bt、NNBt、CpTI) の検査方法
- ・ コメ (LL601) の検査方法
- ・ トウモロコシ (Bt10) の検査方法
- ・ トウモロコシ (CBH351) の検査方法
- ・ トウモロコシ (DAS59132) の検査方法
- ・ ナタネ (RT73 *B. rapa*) の検査方法
- ・ パパイヤ (PRSV-YK) の検査方法

I . 検体採取方法

1. 亜麻、コメ、トウモロコシ、ナタネの検体採取

1.1. 亜麻、コメ、トウモロコシ、ナタネの穀粒の検体採取

組換えDNA技術応用食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用する。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な一定量を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

ナタネの穀粒に関しては、1 検体（検体採取量 1 kg）のうち500 gを粉砕して用いる。残りの500 gは穀粒の状態でも保管する。粒検査の時にはこれを用いる。

1.1.1. 袋積みの場合

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (kg)	検体数
≦ 15	2	1	1
16 ~ 25	3	1	1
26 ~ 90	5	1	1
91 ~ 150	8	1	1
151 ~ 280	13	1	1
281 ~ 500	20	1	1
501 ~ 1,200	32	1	1
1,201 ~ 3,200	50	1	1
3,201 ~ 10,000	80	1	1
10,001 ~ 35,000	125	1	1
35,001 ~ 150,000	200	1	1
150,001 ~ 500,000	315	1	1
≧ 500,001	500	1	1

1.1.2. ばら積みの場合

1.1.2.1. サイロ搬入時

サイロに搬入する際に 1 サイロを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15 回、計10 kg以上を検体採取したものを縮分してサイロ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

既にサイロに搬入したものについては、他のサイロに移動させる時点で同様に検体採取を行う。

1.1.2.2. はしけ搬入時

はしけ（内航船を含む。）に搬入する際に1 はしけを1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15回計10 kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

1.1.2.3. はしけにおける検体採取

すでにはしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1 はしけを1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各5カ所、計15カ所から、計10 kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

1.2. トウモロコシ加工食品の検体採取

加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行う。

1.2.1. トウモロコシの粉砕加工品（コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、穀粒を粉砕したもの）

検体採取については、1.1.1.の袋積みの場合に従う。

1.2.2. それ以外の加工食品

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (g)	検体数
≦ 15	2	120	1
16 ~ 50	3	120	1
51 ~ 150	5	120	1
151 ~ 500	8	120	1
501 ~ 3,200	13	120	1
3,201 ~ 35,000	20	120	1
35,001 ~ 500,000	32	120	1
≧ 500,001	50	120	1

2. パパイヤの検体採取

2.1. 生鮮パパイヤの検体採取

生鮮パパイヤの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量（個）
≦ 50	2	2
51 ~ 500	3	3
501 ~ 35,000	5	5
≧ 35,001	8	8

2.2. パパイヤ加工食品の検体採取

パパイヤ加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて 1.2.2.の表に従い検体採取を行う。なお、果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を 480 g とする。また、パパイヤの含有量が少ない加工品について実施する場合は、製品分類ごとに複数回の前処理試行が可能となるよう適宜検体採取量を増やして採取すること。

検査原則

当検査は、生鮮パパイヤおよび種々の加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・ 検査対象検体は、一検体数を一単位とする。
- ・ 検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。（生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分）
- ・ 試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉砕器等^{*}で十分に破碎し、均質混和して調製試料とする。
- ・ 検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。
- ・ 試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐよう実施する。
- ・ 微量測定のため、粉砕用器具^{*1}容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行う。

* レッチェGM200(レッチェ社製)、Millser(Iwatani社製)、磁製乳鉢・乳棒および同等の結果が得られるものを用いる。

3. その他

市販の亜麻、コメ、ナタネに関しては、検体採取量は検査を繰り返し行うのに十分な量とする。

Ⅱ. 個別検査方法

亜麻（FP967）の検査方法

本検査法では亜麻穀粒を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下の陰イオン交換樹脂タイプキット法（QIAGEN社製Genomic-tip 20/G）を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出し、各抽出DNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

1. DNA抽出精製

1.1. イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット法（QIAGEN Genomic-tip）

粉碎試料 0.5 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、イオン交換樹脂タイプのDNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）を用いて以下のように DNA を抽出精製する。試料に、G2 緩衝液^{*1} 7.5 mL と α -Amylase^{*2} 20 μ Lを加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、37°Cで 1 時間保温する。さらにG2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K^{*3} 200 μ L、および、RNaseA^{*4} 20 μ Lを加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで攪拌し、50 °Cで1 時間保温する。その間、2 ～3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、5,000 \times g、4 °Cで15 分間遠心分離し、得られた上清を2 mLずつ2 mL容チューブ5 本（計10 mL）に移し^{*5}、20,000 \times g、4 °Cで15 分間遠心分離する。あらかじめQBT 緩衝液^{*1} 1 mLで平衡化したQIAGEN Genomic-tip 20/G に、各2 mL 容チューブから上清を1 mLずつ採取し^{*5} 負荷する（計5 mL）。次いで、チップをQC 緩衝液^{*1} で2 mLずつ3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ50 °Cに加熱したQF 緩衝液^{*1} 500 μ Lを負荷し、DNAを溶出する（溶出 1）。チップを新しい遠沈管に移し、さらにQF 緩衝液^{*1} 500 μ LでDNAを溶出する（溶出 2）。

次いで、溶出液と等量のイソプロパノールを溶出 1と溶出 2にそれぞれ添加し、ゆっくり10 回転倒混和した後、5 分間室温で静置する。12,000 \times g、4 °Cで15 分間遠心し、上清を廃棄した後に70 % エタノール500 μ Lを添加し、10 回転倒混和する。12,000 \times g、4 °Cで3 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿を適度に乾燥させる。溶出 2 の遠沈管にあらかじめ60 °Cに加熱した滅菌蒸留水50 μ L を加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を溶出 1の遠沈管に移し入れ、よく混合し^{*6}、抽出DNA試料液とする。抽出DNA試料液は分光光度計を用いてDNA濃度測定を行う。

^{*1} G2緩衝液、QBT緩衝液、QC緩衝液、および、QF緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

^{*2} α -Amylase（高濃度品）はニッポンジーン社製のもの、又は、同等の活性を持つものを用いる。

^{*3} Proteinase Kはキアゲン社製（20 mg/mL）または同等の効力をもつものを用いる。

^{*4} RNaseAはキアゲン社製（100 mg/mL）または同等の効力をもつものを用いる。

^{*5} 沈殿物や上層の膜状の部位を取らないように注意する。

^{*6} 沈殿物（DNA）が溶解しない場合は、65 °Cで15分間振とう溶解する。それでも完全に溶解できず、不溶物が認められる場合は、12,000 \times g、4 °Cで3 分間遠心して得られた上清を新しい遠沈管に移し、これを抽出DNA試料液とする。

1.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈し^{*1}、200～320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7～2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す^{*3}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 50 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 15 μ L ごとにマイクロ遠沈管に分注し、-20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

^{*2} A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

^{*3} A_{260}/A_{280} の比が 1.7～2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2. 定性リアルタイムPCR法 (ABI PRISMTM 7900または7500)

FP967の検出はFP967検知用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRと亜麻陽性対照用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRの2 試験を行い判定する。

FP967検知用として、NOSターミネーターとスペクチノマイシン耐性遺伝子の境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。また、亜麻陽性対照用としてstearoyl-acyl carrier protein desaturase 2 (SAD) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー対、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

FP967検知用プライマー対、プローブ

NOST-Spec F: 5'- AGC GCG CAA ACT AGG ATA AA-3'

NOST-Spec R: 5'- ACC TTC CGG CTC GAT GTC TA-3'

NOST-Spec probe: 5'-FAM- CGC GCG CGG TGT CAT CTA TG-BHQ1-3'

亜麻陽性対照用プライマー対、プローブ

SAD F: 5'- GCT CAA CCC AGT CAC CAC CT -3'

SAD R: 5'- TGC GAG GAG ATC TGG AGG AG -3'

SAD probe: 5'-FAM- TGT TGA GGG AGC GTG TTG AAG GGA-BHQ1-3'

2.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 µL/well として調製する。組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*1} 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 µmol/L）各 0.4 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.25 µLを混合し、滅菌蒸留水で全量 22.5 µL に調製後、50 ng/µL DNA試料液 2.5 µL（125 ng）を添加する。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製する^{*2}。分注操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。各DNA試料液あたりFP967検知用リアルタイムPCRと亜麻陽性対照用リアルタイムPCRをそれぞれ2 ウェル並行して行うものとする。

^{*1} Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC にはDNA 試料液の代わりに水をウェルに2.5 µL 添加する。

^{*3} 96 ウェルプレート、シール、および、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate、およびABI PRISM Optical Adhesive Cover（Life Technologies社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*4} MicroAmp Optical Cover Compression Pad（ABI PRISMTM 7900の場合、Life Technologies社）

ABI PRISMTM 7500では使用しない。

2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類、および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、NOST-Spec、SADともにReporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」となるように設定する。また、Passive Reference は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は9600 emulation モードを選択する。

2.3. PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 °C、2 分間の条件で保持した後、95 °Cで10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 °Cで15 秒間、60 °Cで1 分間を1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3. 結果の解析と判定 (図1参照)

FP967検知用試験および亜麻陽性対照用試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、および、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

まず目視でAmplification plot上にNOST-Specの指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、FP967陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3サイクルから15サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

2併行抽出より得られたDNA試料液 (1抽出あたり2ウェル並行で測定) の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

- (1) 亜麻陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつFP967検知用試験のすべてのウェルで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。
- (2) 亜麻陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつFP967検知用試験のすべてのウェルにおいて43未満のCt値が得られない場合は陰性と判定する。
- (3) FP967検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られなかった場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2 回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、FP967陰性と判定する。

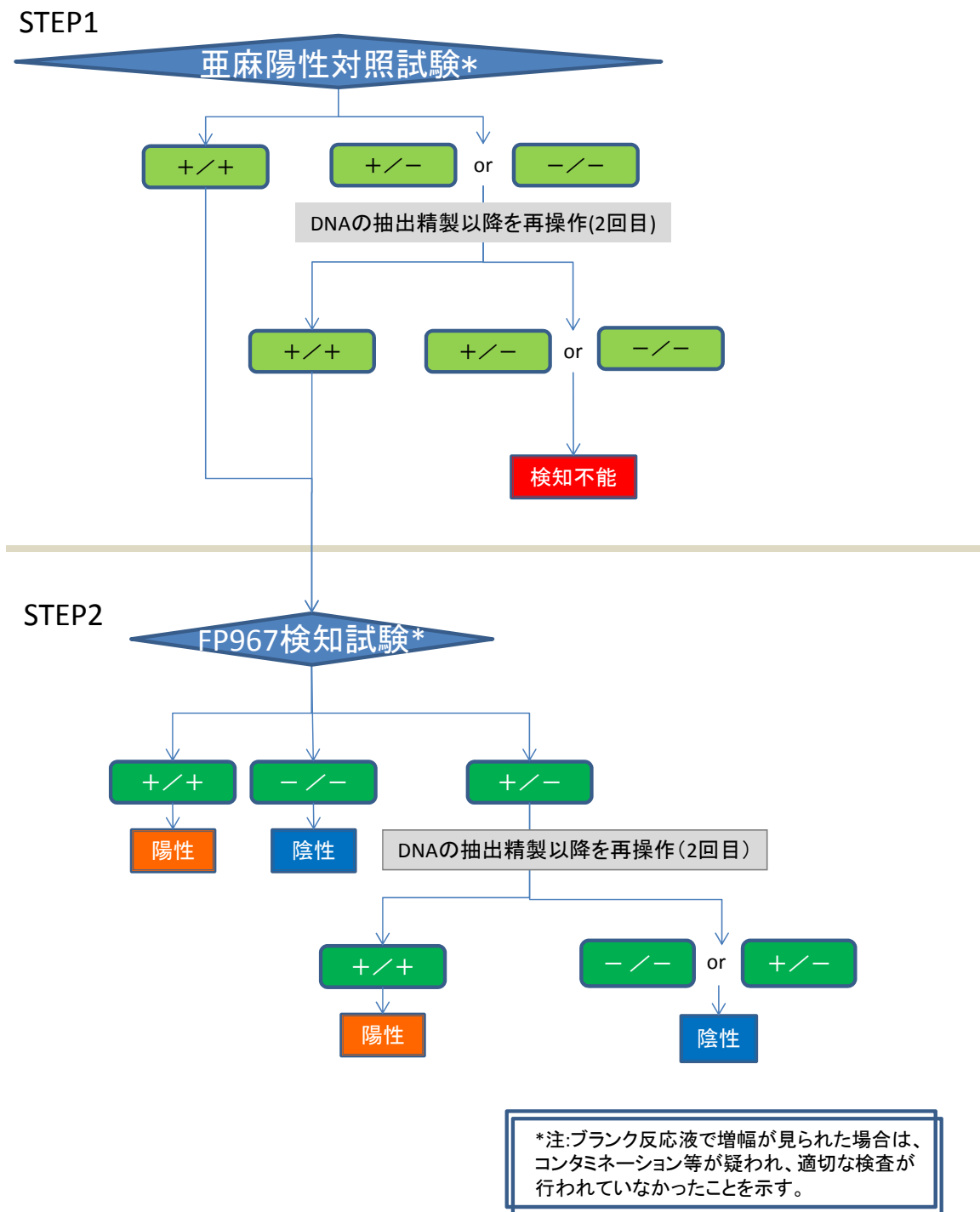
2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液 (各2ウェル) について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液 (合計4ウェル) について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

なお上記判定によりFP967陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視

でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、亜麻陽性対照用試験で2ウェル並行の両方で43未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでも2ウェル並行の両方で43未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム



コメ（63Bt、NNBt、CpTI）の検査方法

本検査法ではコメおよびコメ加工品（コメを主原料とするもので、コメ粉やビーフン等、非加熱又は加工の程度の低いもの）を検査対象とし、DNA 抽出精製は、以下のイオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip 100/G）を使用した DNA の抽出精製法を用いる。別法としてシリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット（NIPPON GENE GM quicker 2）を使用した DNA 抽出精製法をコメおよび非加熱加工品に適用できる。

1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、DNA 試料液を用いて定性リアルタイム PCR 法を実施する。

1. DNA 抽出精製

1.1. イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット法（QIAGEN Genomic-tip）*¹

DNA 収量が十分である検体については、以下の操作を、試料 0.5 g から緩衝液と酵素使用量を半分にして DNA の抽出精製を行うことができる。

均質に*² 細粉碎した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、G2 緩衝液*³ 15 mL を加えて、試料が均質になるまでボルテックスミキサー等で混合し、 α -Amylase*⁴ 12 μ L と RNase A *⁵ 60 μ L を加え 37 °C で 30 分保温する。その間 2 ~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次に、Proteinase K*⁶ 60 μ L を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで攪拌し、65 °C で 30 分保温する。その間 2 ~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。酵素処理終了後、氷中で冷やし、その遠沈管を 3,000 \times g、低温下（4 °C）、15 分間遠心する*⁷。上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に移して、氷中に 60 分間静置後、3,000 \times g、低温下（4 °C）、15 分間遠心する。その間、あらかじめポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液*³ 4 mL を通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する*⁸。この時の溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液*³ で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後*⁹、あらかじめ 50 °C に温めておいた QF 緩衝液*³ 1 mL を負荷し、溶出液は捨てる。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しいポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）上にセットし、再度 50 °C に温めておいた QF 緩衝液*³ 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合する。マイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に混合した溶液を分注し、10,000 \times g 以上で、低温下（4 °C）15 分間遠心し上清を捨てる。この際、上清を極力除去する*¹⁰。次いで、各遠沈管当たり 70%（v/v）エタノールを 1 mL ずつゆっくり加え、さらに 10,000 \times g 以上で、低温下（4 °C）5 分間遠心する。上清を捨て*¹⁰、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5 mL 容）の沈殿を、予め 50 °C に温めた滅菌蒸留水 55 μ L に溶解し、DNA 試料原液とする*¹¹。

- *1 実験を通して、液体を分注するピペットやフィルター付きピペットチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。
- *2 均質に細粉碎しないと抽出 DNA 量に変動があることがあるので、十分細粉碎し、均質化する。
- *3 G2緩衝液、QBT緩衝液、QC緩衝液およびQF緩衝液は、キアゲン社 (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。
- *4 α -Amylase (高純度品) はニッポンジーン社製のもの、又は、同等の活性を持つものを用いる。
- *5 RNase AはQIAGENキアゲン社製 (100 mg/mL, Cat. no. 19101)、又は、同等の効力をもつものを用いる。
- *6 Proteinase Kはキアゲン社製 (20 mg/mL, Cat. no. 19133)、又は、同等の効力をもつものを用いる。
- *7 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。使用するローターおよび 50 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。
- *8 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。
- *9 液体の流速が著しく減少した場合には、カラム上方から 10 mL テルモシリンジ(コード番号: SS-10SZ) のプランジャーなどを用いて穏やかに加圧させ、流速を増加させる。プランジャーを利用する場合には、プランジャーをカラムに 1 cm 程度挿し込んで抜く操作を繰り返す。この際、プランジャーを挿し込む操作は、プランジャー先端のゴム部分とカラム内壁を密着させ、空気が漏れないように行う。一方、プランジャーを抜く操作は、逆流を防ぐために、プランジャーを斜めにしてプランジャー先端のゴム部分とカラム内壁との間に隙間を空け、カラム内へ空気を入れながら行う。
- *10 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去する。
- *11 溶解操作の際には、まず1本のマイクロ遠沈管に55 μ Lの滅菌蒸留水を入れ、沈殿したDNAを溶解する。次いでそのDNA溶液を次のマイクロ遠沈管に入れ、沈殿したDNAを溶解する。この操作を繰り返し、最終的に各検体から得られるDNA溶液を55 μ Lとなるようにする。

1.2. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (NIPPON GENE GM quicker 2) *1 (別法、コメおよび非加熱加工品に適用)

均質に*2細粉碎した試料 500 mg をポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に量り採り、GE1 緩衝液*3 2.1 mL、Proteinase K (20 mg/mL) *3 60 μ L、 α -Amylase (高濃度品) *3 6 μ L、および、RNase A (100 mg/mL) *3 30 μ L を加え、試料塊が無いようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後*4、65 $^{\circ}$ C の条件で 30 分間加温する。GE2-K 緩衝液*3 255 μ L を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後*5、氷上に 10 分間静置する。6,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 15 分間*6遠心する。上清*7を新しいチューブ (2 mL 容) に移し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 5 分間遠心する。次いでその上清*8を新しいチューブ (15 mL 容) に移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液*3 375 μ L およびイソプロパノール 375 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する*9。混合液を 700 μ L ずつ spin column に負荷した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。すべての混合液を負荷するまでこの操作を繰り返す。次いで GW 緩衝液*3 650 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新しいチューブ (1.5 mL 容) に移し、滅菌蒸留水 55 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

- *1 実験を通して、液体を分注するピペットやフィルター付きピペットチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。
- *2 均質に細粉碎しないと抽出 DNA 量に変動があることがあるので、十分細粉碎し、均質化する。
- *3 GE1 緩衝液、GE2-K 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、Proteinase K、 α -Amylase および RNase A はシリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE GM quicker 2) 付属のもの、又は、同等の効力を持つものを用いる。
- *4 攪拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスに対して 15 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに 30~60 秒間攪拌する。
- *5 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2-K 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2-K 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。
- *6 使用するローターおよび 15 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。
- *7 できる限り多くの上清を回収する。
- *8 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。
- *9 GB3 緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。チューブの蓋の部分に液が付着した場合は軽くスピンドウンして全量を spin column に負荷する。

1.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈し^{*1}、200~320 nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す^{*3}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 10 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 55 μ L ごとにマイクロ遠沈管に分注し、-20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

*1 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

*2 A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

*3 A_{260}/A_{280} の比が 1.7~2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2. 定性リアルタイムPCR法 (ABI PRISM™ 7900または7500)

害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3試験においては、63Btコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対および63Btコメ検出用プローブ、NNBtコメ検出用試験としてBtコ

メ検出用のプライマー対およびNNBtコメ検出用プローブ、CpTIコメ検出用試験としてCpTI2検出用プライマー対およびプローブをそれぞれ用い、リアルタイムPCRの3 試験を行い判定する。

また、試験にあたっては、コメ陽性対照用試験としてphospholipase D遺伝子配列を検知するプライマー対およびプローブを用いる。各プライマー*およびプローブ*の塩基配列は以下の通りである。

- コメ陽性対照用試験

コメ陽性対照用プライマー対、プローブ

PLD3959F : 5'-GCT TAG GGA ACA GGG AAG TAA AGT T-3'

PLD4038R : 5'-CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'

PLD-P : FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCG C-TAMRA

- 害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験

63Bt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマー対

T52-SF : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AGA TTC-3'

OsNOS-R2 : 5'- AAG ACC GGC AAC AGG ATT CA-3'

63Bt コメ検出用プローブ

GM63-Taq : FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

NNBt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマーは 63Bt コメ検出用試験のプライマー(T52-SF と OsNOS-R2)と同様である。

NNBt コメ検出用プローブ

NGMr-Taq : FAM-AATGAGAATTCGGTACCCCGACCTGCA-TAMRA

CpTI コメ検出用試験

CpTI2 検出用プライマー対、プローブ

CpTI-2F : 5'- TGC AAG TCC AGG GAT GAA GAT-3'

NOS-1R : 5'- ACC GGC AAC AGG ATT CAA TC-3'

KDEL-P : FAM- ATG AGA AAG ATG AAC TCT AG-MGB

* 各プライマー、プローブは水に溶解する。

2.1. PCR 用反応液の調製

各試験のPCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*1} 12.5 μ L、各対象プライマー (各50 μ mol/L) 各0.4 μ L、各対象プローブ (各10 μ mol/L) 各0.25 μ Lを混合し、滅菌蒸留水で全量20 μ Lに調製後、DNA試料液 5 μ L (10 ng/ μ L) を添加する。分注操作終了後、真上からシール^{*2} し、完全にウェルを密

閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*3} を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

各試験は、各DNA試料液あたり2 ウェル並行で行うものとし、リアルタイムPCRのブランク反応液として、DNA試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの 1 ウェル分についても同時に調製する。

*1 Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず転倒混和した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリケーションャター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate および MicroAmp Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*3 MicroAmp Optical Cover Compression Pad

MicroAmp Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。ABI PRISMTM 7500 では使用しない。

2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、コメ陽性対照用試験、63Bt コメ検出用試験および NNB コメ検出用試験の場合には Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように、また CpTI コメ検出用試験の場合で Reporter が「FAM」、Quencher が「None」となるように設定する。なお、コメ陽性対照用、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験各 3 試験のいずれとも、Passive Reference を「ROX」と設定する。

2.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95 °Cで 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。その後、95 °C 20 秒、60 °C で 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3. 結果の解析と判定 (図1参照)

コメ陽性対照用試験および害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 試験の各試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、および、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 試験において目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3 サイクルから15 サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。

2併行抽出より得られたDNA試料液 (1抽出あたり2ウェル並行で測定) の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

- (1) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 試験のいずれかの試験において、すべてのウェルで48未満のCt値が得られた場合に、当該試料は害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性と判定する。
- (2) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験の3 試験のいずれかの試験において、すべてのウェルで48未満のCt値が得られない場合は、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。
- (3) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3試験のいずれかの試験においてすべてのウェルの結果が一致しない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2 回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液 (各2ウェル) について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液 (合計4ウェル) について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

陽性検体のパターン	陽性対照用PLD	63Bt	NNBt	CpTI
抽出DNA試料液-①	(+/+)	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液-②	(+/+)	(+/+)	(+/+)	(+/+)
		↓	↓	↓
		63Bt コメ陽性	NNBt コメ陽性	CpTI コメ陽性

なお上記判定により害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性が判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROX の蛍光強度の明確な降下や FAM の蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、コメ陽性対照用試験のすべてのウェルで 48 未満の Ct 値が得られない DNA 試料については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて 2 回目の DNA 抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイム PCR 法」以降の操作を行い、それでもコメ陽性対照用試験のすべてのウェルで 48 未満の Ct 値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

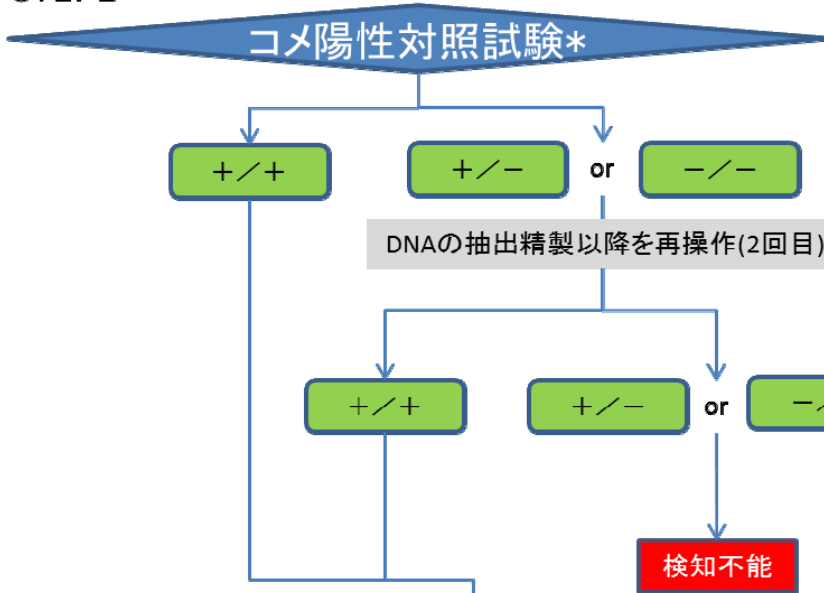
ABI PRISM™ 7900 または 7500 以外のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM™ 7700、7000 等が適用可能である。使用するリアルタイム PCR 機器によって感度が異なるので、標準プラスミド DNA 溶液（下記参考）を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する。

（参考）

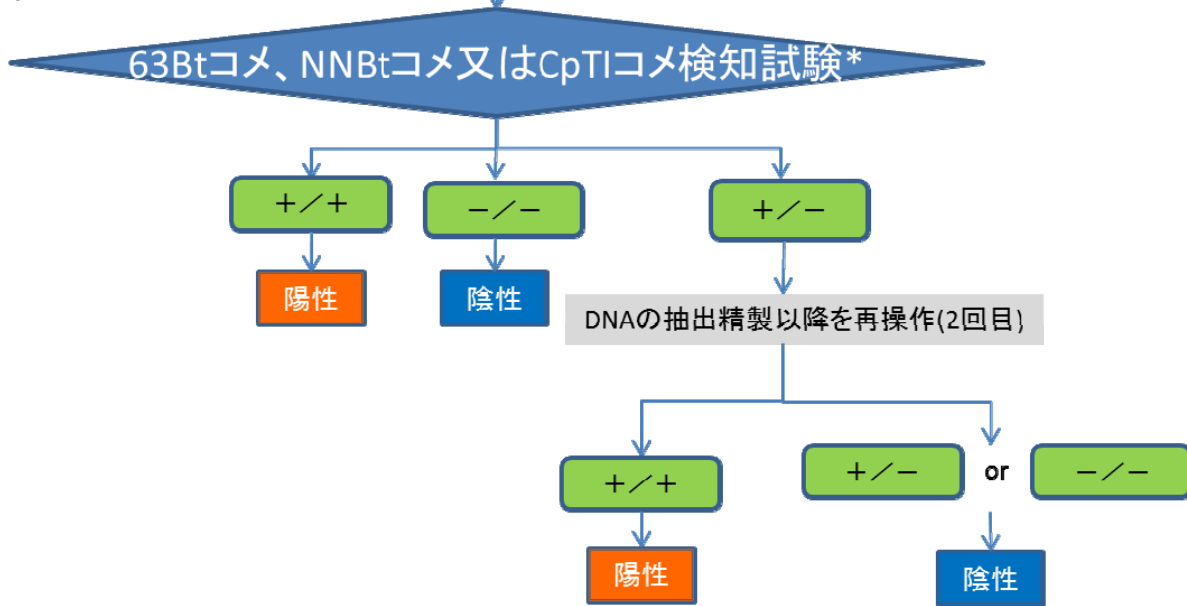
- （1）イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）は、キアゲン（〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 FOREFRONT TOWER II. Tel. 03-6890-7300 Fax. 03-5547-0818）から購入可能である。シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法）の NIPPON GENE GM quicker 2 キットは、ニッポンジーン（〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel.076-451-6548 Fax. 076-451-6547）から購入可能である。
- （2）コメの検査法に用いるプライマー対、プローブ（CpTI コメ検出用プローブ（KDEL-P）を除く。）およびリアルタイム PCR 法用標準プラスミド（GM コメ害虫抵抗性コメ検査用陽性コントロールプラスミド）は、ニッポンジーン（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）又はファスマック（〒243-0041 厚木市緑ヶ丘 5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738）から購入可能である。
- （3）コメの検査法に用いるプローブのうち、CpTI コメ検出用プローブ（KDEL-P）についてはライフ テクノロジーズ社（〒108-0023 港区芝浦 4-2-8 住友不動産三田ツインビル東館 Tel. 03-6832-9300）から購入可能である。

図1 結果判定スキーム

STEP1



STEP2



*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。

コメ（LL601）の検査方法

本検査法ではコメおよびコメ加工品（コメを主原料とするもので、非加熱加工品に限る。）を対象とし、DNA抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2）を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出精製し、各抽出DNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

1. DNA 抽出精製

1.1. シリカゲル膜タイプのDNA抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2）

均質に粉砕した試料500 mgをポリプロピレン製遠沈管（2 mL容）に量り採り、GE1 緩衝液^{*1} 700 μ L、Proteinase K（20 mg/mL）20 μ L、 α -Amylase（高濃度品）2 μ LおよびRNase A（100 mg/mL）10 μ Lを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30 秒間混合した後^{*2}、65 $^{\circ}$ Cの条件で15 分間加温する。GE2-K 緩衝液^{*3} 85 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後^{*4}、氷上に10 分間静置する。13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で5 分間遠心^{*5}する。次いでその上清^{*6} 400 μ Lを1.5 mLチューブに移し、GB3 緩衝液 150 μ Lおよびイソプロパノール（100%）150 μ Lを添加した後、10 ～12 回転倒混和する^{*7}。混合液700 μ Lをspin columnに負荷した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いでGW 緩衝液650 μ Lを負荷し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnを新たな1.5 mL容チューブに移し、TE緩衝液 30 μ Lを加え3 分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で1 分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

*1 GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker2）付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して2 mL容チューブを垂直にあて、そのまま30 秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30～60 秒間攪拌する。

*3 GE2-K緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker2）付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けてGE2-K緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加したGE2-K緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

*5 使用するローターおよび2 mL容チューブの特性を考慮したうえで、gが最大となるように遠心条件を設定する。

*6 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。

*7 GB3緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

1.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈し^{*1}、200～320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7～2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す^{*3}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 40 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 50 μ L ごとにマイクロ遠沈管に分注し、-20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

^{*2} A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

^{*3} A_{260}/A_{280} の比が 1.7～2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2. 定性リアルタイムPCR法 (ABI PRISMTM 7900または7500)

LL601 の検出はGM コメ検出用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCR とコメ陽性対照用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCR の2 試験を行い判定する。

また、試験にあたっては、コメ陽性対照用試験としてphospholipase D 遺伝子配列を検知するプライマー対およびプローブを用いる。各プライマーおよびプローブの塩基配列は以下の通りである。

・コメ陽性対照用試験

コメ陽性対照用プライマー対、プローブ

F-primer (KVM159) : 5'-TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT-3'

R-primer (KVM160) : 5'-CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C-3'

KVM-P: VIC-TGT TGT GCT GCC AAT GTG GCC TG-TAMRA

・LL601コメ検出用試験

LL601検出用プライマー対、プローブ

F-primer (MDB498) : 5'-TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC-3'

R-primer (DPA143) : 5'-ATG TCG GCC GGG CGT CGT TCT G-3'

LL601-P : FAM-TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT T-MGB

2.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal

PCR Master Mix^{*1} 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、10 µmol/L）1 µL^{*2}、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.5 µL、滅菌蒸留水5 µL、40 ng/µL DNA試料液^{*3}5.0 µL。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

^{*2} 対象プライマー対溶液量

コメ陽性対象用の各プライマーを用いる場合には0.5 µLを加えること。

^{*3} DNA試料原液の濃度が規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*4} MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISMTM 7900の場合、Life Technologies社)

ABI PRISMTM 7500では使用しない。

2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「UNKN」：DNA試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、コメ陽性対象用の場合には、Reporterが「VIC」、Quencherが「TAMRA」となるように、またLL601検出用の場合には、Reporterが「FAM」、Quencherが「MGB」となるように、設定する。なお、コメ陽性対象用、LL601検出用ともに、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

2.3. PCR増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 °C、2 分間の条件で保持した後、95 °Cで10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 °Cで15 秒、60°Cで1 分を1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3. 結果の解析と判定（図1参照）

コメ陽性対象用試験およびLL601検出用試験のいずれについても、結果の判定は、Th. LineとPCR産物の増加を示すAmplification plotとの交点（Ct値）が得られるか否かをもって

行う。次いで、ベースラインを（3 サイクルから15 サイクル）設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line（Th. line）として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。Ct値についてはAmplification plot上で目視にて確認するとともに、結果として出力される数値について確認する。

2併行抽出より得られたDNA試料液（1抽出あたり2ウェル並行で測定）の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

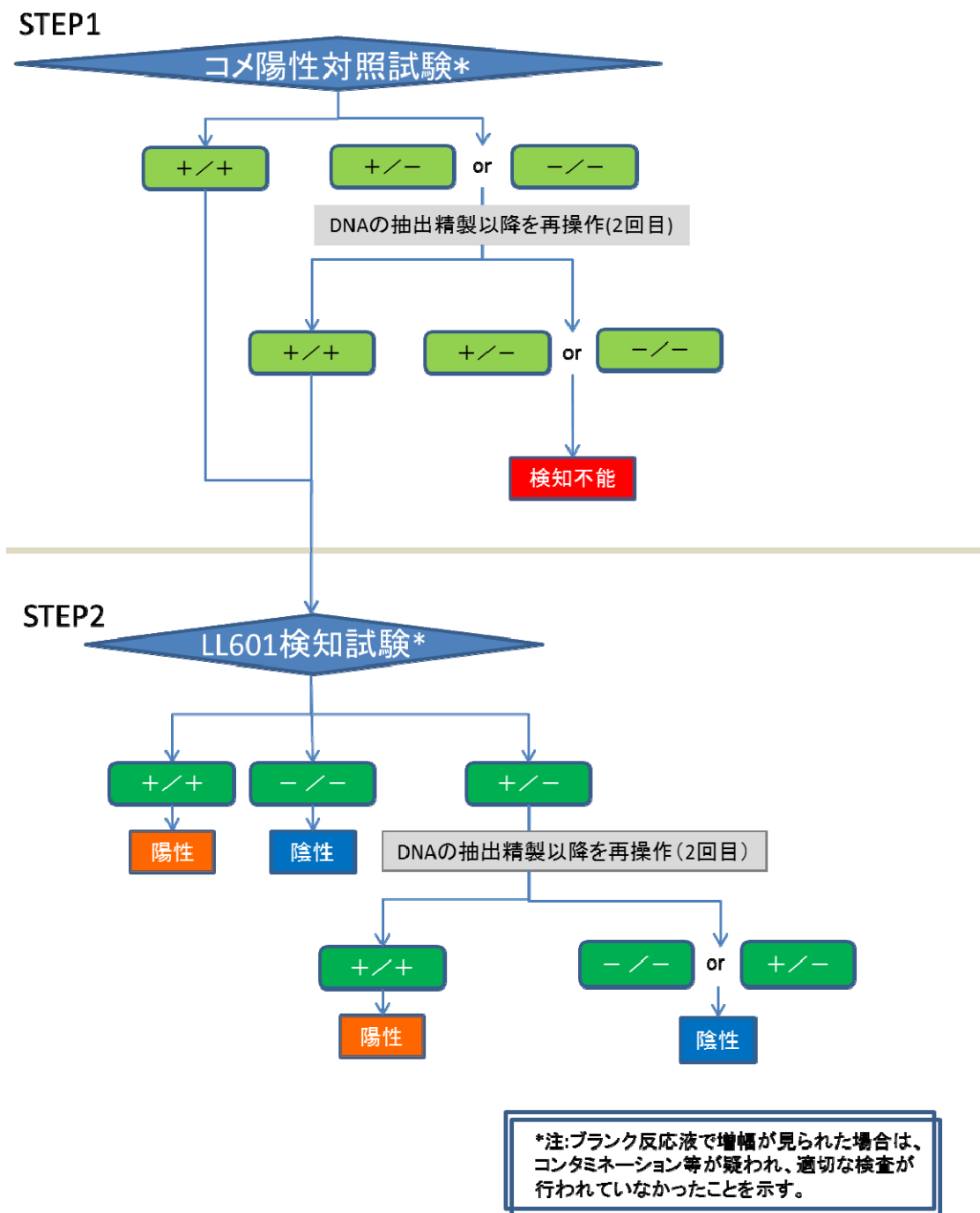
- （1） コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつLL601検知用試験ですべてのウェルで43未満のCt値が得られた場合当該試料は陽性と判定する。
- （2） コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、LL601検知用試験のすべてのウェルで43未満のCt値が得られない場合は陰性と判定する。
- （3） コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、LL601検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、LL601陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液（合計4ウェル）について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

なお上記判定によりLL601陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、コメ陽性対照用試験ですべてのウェルで43未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでもすべてのウェルで43未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム



トウモロコシ (Bt10) の検査方法

トウモロコシ穀粒又はトウモロコシ半製品について、定性 PCR 法で行う。なお、DNA 抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) を用いる。

1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、各抽出 DNA 試料液を用いて定性 PCR 法を実施する。

1. DNA 抽出精製

1.1. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)

均質に粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液^{*1} 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65 °C で 15 分間加温する。その間 2、3 回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液^{*2} 3,250 µL を加え、氷上に 10 分間静置した後、4,000 × g 以上、4 °C の条件で 20 分間遠心する^{*3}。次いでその上清 500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15 mL 容) に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5} を加える。その混合液 500 µL を mini spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6} 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液^{*7} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6} 遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000 × g 以上で 20 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65 °C に温めておいた滅菌蒸留水 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000 × g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*5 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液^{*4} とエタノール (96-100%) を 1:2 で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

*7 AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものを AW 緩衝液とする。

1.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し^{*1}、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

*1 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

*2 A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動により分離した後に、その増幅産物を検知する方法である^{*1*2}。Bt10 の検出は検出用プライマーを用いた定性 PCR と陽性対照用プライマーを用いた定性 PCR の 2 試験を行い判定する。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

・ Bt10 検出用プライマー対

F-primer (JSF5) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG GTT ACT CA-3'

R-primer (JSR5) : 5'-ACA CGG AAA TGT TGA ATA CTC ATA CTC T-3'

・ 陽性対照用のプライマー対

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

*¹ PCR 法では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅産物が検知されうる。したがって、目的外の DNA（特に PCR 増幅産物）の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ/cm まで精製した超純水など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

*² また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

2.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR 緩衝液*¹、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 μmol/L 5'および 3'プライマー並びに 0.8 units Taq DNA ポリメラーゼ*² を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 5.0 μL（DNA として 50 ng）を氷中で加え、全量を 25 μL にする。

*¹ PCR 緩衝液

PCR buffer II（Life Technologies 社、塩化マグネシウムを含まないもの）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*² Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ（Life Technologies 社）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2. PCR 増幅

PCR 用反応試料管を PCR 増幅装置* にセットする。反応条件は次の通りである。94 °C に 10 分間保ち反応を開始させた後、94 °C で 25 秒間、62 °C で 30 秒間、72 °C で 45 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72 °C で 7 分間保った後、4 °C で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。PCR のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないものおよび DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。また、試料から DNA が抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、Bt10 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対を用い、同様に PCR 増幅を行う。

* PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700（Life Technologies 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

2.3.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液^{*1}を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に 100 mL 当たり 5 μ L のエチジウムブロミド溶液^{*2} (10 mg/mL) を加え、ゲルを 50°C 前後まで冷やした後ゲルメーカーに流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する^{*3}。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、目的とする PCR 増幅産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (1.0~4.0%) を決める。

^{*1} TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

^{*2} エチジウムブロミド溶液

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

^{*3} 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.3.3. に従って、ゲルを後染色しても良い。

2.3.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる Bromophenol blue (BPB) がゲルの 1/2 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.3.3. ゲルの染色 (後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30 分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。

2.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的の PCR 増幅バンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

2.5. 結果の判定

陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、Bt10 検出用プライマー対を用いたレーンで 117 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 用反応液を調製し、Bt10 確認用プライマー対^{*1}を用い PCR 増幅を行う^{*2}。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、151 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は Bt10 系統陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において、陽性対照用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも陽性対照用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて 2 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

試料番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出 1	陽性対照用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出 2	陽性対照用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号 9 の例の場合には、2 回目の抽出を行う。

+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

*1 Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt10LS-5') : 5'-GCC ACA ACA CCC TCA ACC TCA -3'

R-primer (Bt10LS-3') : 5'-GAA GTC GTT GCT CTG AAG AAC AT-3'

*2 Bt10 確認用プライマー対を用いる場合の PCR 条件は以下の通りである。94°Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、94 °C で 25 秒間、65 °C で 30 秒間、72 °C で 45 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72 °C で 7 分間保った後、4 °C で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

トウモロコシ (CBH351) の検査方法

トウモロコシの穀粒については、ラテラルフロー法で行う。また、コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、遺伝子組換えにより新たに発現されるタンパク質が物理化学的な変化を受けていない粉砕加工品（以下、「トウモロコシ半製品」という。）についても、ラテラルフロー法で行う。

その他のトウモロコシ加工品については定性 PCR 法で行う。

なお、トウモロコシ半製品については、ラテラルフロー法で行った後、定性 PCR 法による確認試験を行う。

1. トウモロコシ穀粒からの CBH351 トウモロコシの検知

1.1. ラテラルフロー法

市販の Test Kit は、Strategic Diagnostics 社 (SDI) 製 Trait・Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012) を用いる方法である。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。なお、実験室で実験を行う場合には、水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を用いることを推奨する。

1.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ穀粒から無作為に 800 粒を採取し粉砕した後、粉砕物^{*}を 500 mL 容程度の口の広い蓋付きの容器に採り、水 288 mL を加えた後、10～20 秒間、試料が全て濡れるまでよく振とうする。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、少量の水を加え、試料をよく振とうし、振とう後上澄み液が生じたかどうか観察する。振とう後、数 mL 程度の上澄み液が生じるまで水を加える。次に、試料の上澄み液 0.5 mL をキット付属の 1.5 mL 容試料管に移し、その試料管に Trait・Bt9 テストストリップを垂直に立てる。

^{*} 通常 230 g を量り採り粉砕したもの (230 g で 800 粒に満たないときは 800 粒の粉砕物)。

1.1.2. 結果の判定

テストストリップを試料管に立て、5 分経過した時点^{*}で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に 2 本現れれば陽性、コントロールラインだけが現れれば陰性と判定する。また、1 本も現れなければ、その試験は無効と判定する。

^{*} 5 分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので注意が必要。

2. トウモロコシ加工品からの CBH351 トウモロコシの検知

以下の手法に従って、一試料につき 2 回並行で抽出を行い、得られた DNA 溶液を用い、以下の条件で定性 PCR を行う。

2.1. DNA 抽出精製

2.1.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレーク（加熱加工されているものに限る）からの DNA 抽出精製

試料を凍結乾燥した後、ミキサーミル等で粉砕する。次いで粉砕試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）を用い以下のように DNA を抽出精製する。

試料に G2 緩衝液^{*1} 4 mL を加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、さらに G2 緩衝液 4 mL、Proteinase K^{*2} 100 μ L と RNase A 10 μ L を加えて、よく振って混合した後、50 $^{\circ}$ C で 2 時間放置する。その間 2 ~ 3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）15 分遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT 緩衝液^{*1} 1 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に 2 mL ずつ数回に分けて負荷する。次いで、チップを QC 緩衝液^{*1} で 2 mL ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ 50 $^{\circ}$ C に温めておいた QF 緩衝液^{*2} を 1 mL ずつ 2 回加え、DNA を溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）15 分間遠心し、上清を捨てた後、70 %エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）5 分間遠心する。さらに上清を捨て、残った沈殿をアスピレーターを用い乾燥した後、滅菌蒸留水 100 μ L を加え、65 $^{\circ}$ C で 5 分間放置し、ピペッティングにより DNA を溶解させ、DNA 試料原液とする。

^{*1} G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液および QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

^{*2} QIAGEN 社のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

2.1.2. 上記以外のトウモロコシ加工品からの DNA 抽出精製

平成 12 年農林水産省告示第 517 号第 3 条に規定する別表 2 の加工食品からの DNA の抽出精製は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 個別品目編」に記載されている方法を準用する。

2.1.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存を行う。

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し^{*1}、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

^{*2} A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2.2. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動により分離した後に、その増幅産物を検知する方法である^{*1*2}。CBH351 の検出は検出用プライマーを用いた定性 PCR と陽性対照用プライマーを用いた定性 PCR の 2 試験を行い判定する。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

- CBH351 検出用プライマー対

F-primer (CaM03-5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3') : 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'

- 陽性対照用のプライマー対

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

^{*1} PCR 法では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅産物が検知されうる。したがって、目的外の DNA (特に PCR 増幅産物) の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 M Ω /cm まで精製した超純水など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

^{*2} また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

2.2.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR 緩衝液^{*1}、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2 μmol/L 5'および3'プライマー並びに 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*2}を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 2.5 μL (DNA として 25 ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にする。

^{*1} PCR 緩衝液

PCR buffer II (Life Technologies 社、塩化マグネシウムを含まないもの) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

^{*2} Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Life Technologies 社) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.2. PCR 増幅

PCR 用反応試料管を PCR 増幅装置^{*}にセットする。反応条件は次の通りである。95°C に 10 分間保ち反応を開始させた後、95 °C で 0.5 分間、60 °C で 0.5 分間、72 °C で 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72 °C で 7 分間保った後、4 °C で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。PCR のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないものおよび DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。また、試料から DNA が抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、CBH351 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対を用い、同様に PCR 増幅を行う。

^{*} PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies 社) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

2.2.3.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液^{*1}を加え、加熱してアガロースを溶解する。ゲルを 50 °C 前後まで冷やした後に、100 mL 当たり 5 μL のエチジウムブロミド溶液^{*2} (10 mg/mL) を加えよく混合して、ゲルメーカーに流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する^{*3}。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、目的とす

る PCR 増幅産物のバンド長にあわせてアガロース濃度（1.0～4.0 %）を決める。

*¹ TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

*² エチジウムブロミド溶液

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

*³ 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.2.3.3. に従って、ゲルを後染色しても良い。

2.2.3.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/2 から 3/2 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.2.3.3. ゲルの染色（後染色）

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド溶液（10 mg/mL）を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30 分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。

2.2.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的の PCR 増幅バンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

2.2.5. 結果の判定

陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 用反応液を調製し、確認用プライマー対^{*}を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、171 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は CBH351 陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において陽性対照用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも陽性対照用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて 2 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

試料番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出 1	陽性対照用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出 2	陽性対照用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号 9 の例の場合には、2 回目の抽出を行う。

+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

^{*}CBH351 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Cry9C-5') : 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3') : 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

3. トウモロコシ半製品(コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等)からの CBH351 トウモロコシの検知

試料について粉砕せず、そのまま 230 g 採る他は 1.1.ラテラルフロー法に従って行う。ラテラルフロー法により陽性の結果が得られた検体については、「2.1. DNA 抽出精製」に従い 2 回並行で DNA を抽出し、DNA 試料液を用いて更に 2.2.の定性 PCR を実施し、どちらかの抽出液由来の PCR 増幅反応液において、陽性対照用プライマー対を用いたレーンで

157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、陽性と判定する。

トウモロコシ (DAS59132) の検査方法

トウモロコシ穀粒について、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) に従って、1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、得られた DNA 試料液を用いて以下の定性リアルタイム PCR 法を実施する。なお、トウモロコシ陽性対照用プライマー対およびプローブは、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を用いる。

1. DNA 抽出精製

1.1. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)

均質に粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液^{*1} 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65 °C で 15 分間加温する。その間 2、3 回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液^{*2} 3,250 µL を加え、氷上に 10 分間静置した後、4,000 × g 以上、4 °C の条件で 20 分間遠心する^{*3}。次いでその上清 500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15 mL 容) に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}を加える。その混合液 500 µL を mini spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液^{*7} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000 × g 以上で 20 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65 °C に温めておいた滅菌蒸留水 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000 × g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したもの

のを用いる。

^{*5} AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液^{*4} とエタノール (96-100%) を 1:2 で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

^{*6} 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

^{*7} AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものを AW 緩衝液とする。

1.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存を行う。

DNA 試料原液の適量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈^{*1}、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

^{*2} A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2. 定性リアルタイム PCR 法 (ABI PRISMTM 7900、7500 または 7700)

2.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10 μ mol/L) 1.0 μ L^{*2}、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L^{*3} を混合し、滅菌蒸留水で全量 20 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50 ng) を添加する。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。分注操作終了後、真上からシール^{*4} し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover

Compression Pad^{*5}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

^{*1} Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

^{*2} 対象プライマー対（各プライマーは水で溶解する。）

DAS59132 検知用プライマー対は以下のとおりである。

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

SSIIb 検知用プライマー対は以下のとおりである。

F-primer (SSIIb 3-5') : 5'-CCA ATC CTT TGA CAT CTG CTC C-3'

R-primer (SSIIb 3-3') : 5'-GAT CAG CTT TGG GTC CGG A-3'

なお、各プライマー濃度 (25 μmol/L) を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

^{*3} 対象プローブ（プローブは水で溶解する。）

DAS59132 検知用プローブは以下のとおりである。

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

SSIIb 検知用プローブ(SSIIb-Taq)は以下のとおりである。

5'-FAM-AGC AAA AAA AGA GCG CTG CAA-TAMRA-3'

^{*4} 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリケーションター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate および ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については、製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*5} MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISMTM7900 の場合, Life Technologies 社)を使用する。

なお、20 回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

2. 3. PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 °C、2 分間の条件で保持した後、95 °C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 °C で 15 秒、60 °C で 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3. 結果の解析と判定 (図 1 参照)

DAS59132検知用試験およびトウモロコシ陽性対照用試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、および、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

まず目視で Amplification plot 上に DAS59132 の指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、DAS59132 陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3 サイクルから 15 サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

2 併行抽出より得られた DNA 試料液 (1 抽出あたり 2 ウェル 並行で測定) の合計 4 ウェルすべてを用いて判定する。

DNA 試料液において

- (1) トウモロコシ陽性対照試験の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験ですべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られた場合当該試料は陽性と判定する。
- (2) トウモロコシ陽性対照試験の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験のすべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られない場合は陰性と判定する。
- (3) トウモロコシ陽性対照試験の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて 2 回目の DNA 抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイム PCR 法」以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、DAS59132 陰性と判定する。

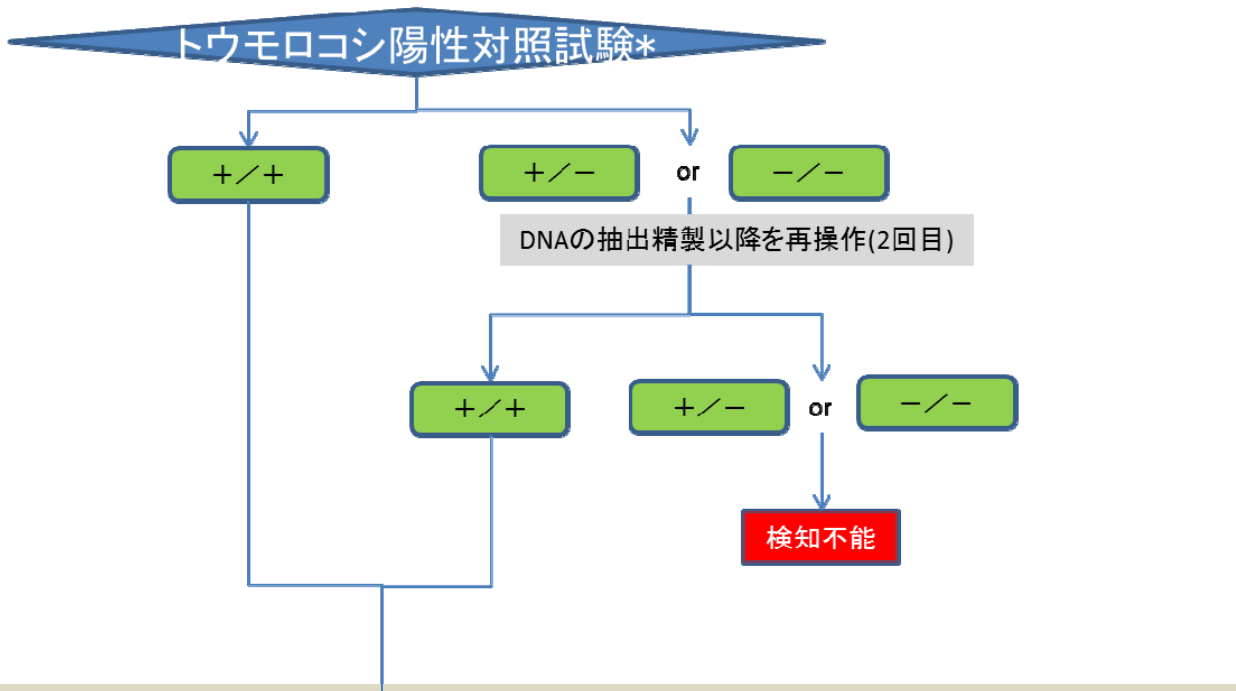
2 併行抽出のそれぞれの抽出 DNA 試料液 (各 2 ウェル) について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出 DNA 試料液 (合計 4 ウェル) について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

なお上記判定によりDAS59132陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

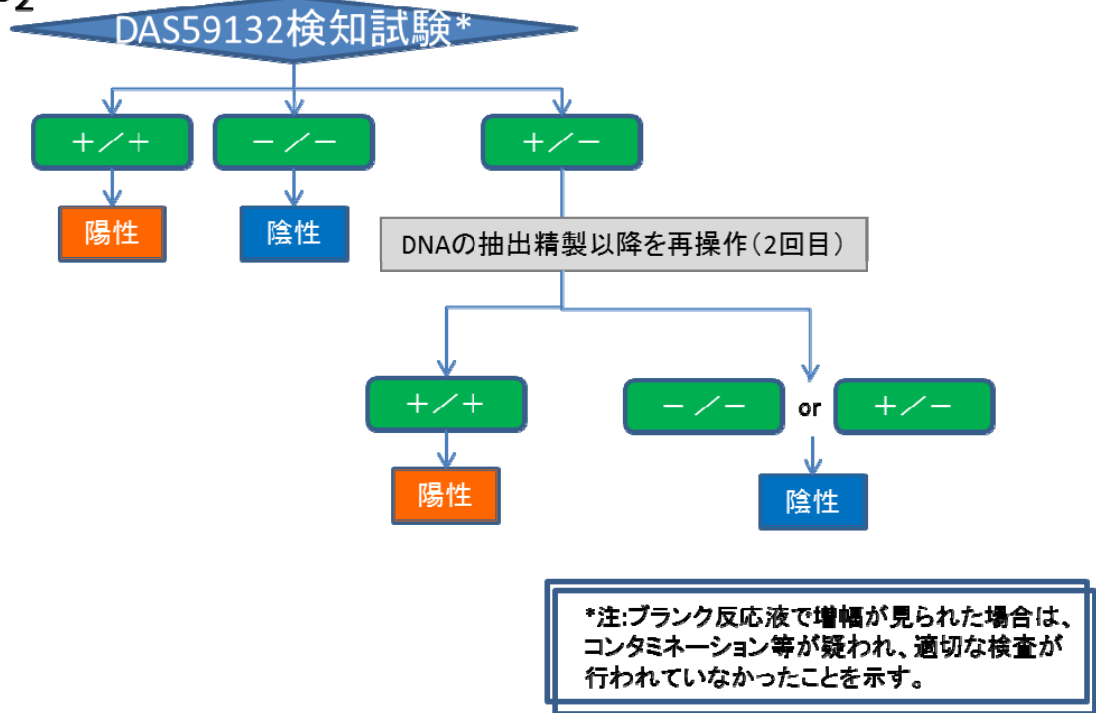
また、トウモロコシ陽性対照用試験ですべてのウェルで38未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでもすべてのウェルで38未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。

ナタネ (RT73 *B. rapa*) の検査方法

本検査法ではナタネ穀粒を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下のシリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE: GM quicker 2) を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出精製し、各抽出DNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

除草剤耐性の遺伝子組換えナタネであるRT73 *Brassica rapa* (RT73 *B.rapa*) は、我が国において安全性審査が終了した除草剤耐性RT73 *Brassica napus* (RT73 *B.napus*) と非遺伝子組換えナタネ (*B.rapa*) が交配し作出された遺伝子組換えナタネである。そのためRT73 *B.rapa* を検知するためには、1つの穀粒において*B.rapa* と*B.napus* の識別検査と遺伝子組換えナタネの特異的領域の検査をする必要がある。従って、以下の1.のスクリーニング検査を行った後、*B. rapa* の混入と遺伝子組換えナタネの特異的領域が検知された場合は、2.の粒確認検査を行って判定する。

1. スクリーニング検査

1.1. DNA 抽出精製法

ナタネからのDNA 抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE: GM quicker 2) を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出精製し、各DNA 試料液を用いて以下の定性リアルタイムPCR法を実施する。均質に粉碎した試料200 mg を2 mL 容チューブに量り採り、GE1 緩衝液^{*1} 800 µL、Proteinase K 20 µL、RNase A 10 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30 秒間混合した後^{*2}、65 °C 15 分間静置する。GE2-K 緩衝液^{*3*4} 100 µLを加え、ボルテックスミキサーで混合する。13,000 × g 以上、4 °Cの条件で5 分間遠心^{*5} する。次いでその上清^{*6} 350 µL を1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液 130 µL およびイソプロパノール 130 µL を添加した後、10~12 回転倒混合する^{*7}。混合液 610 µL (全量) をspin column に負荷した後、13,000 × g以上、4 °Cの条件で30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いでGW 緩衝液 650 µL を負荷し、13,000 × g 以上、4 °Cの条件で1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水 50 µL を加え室温で3 分間静置した後、13,000 × g 以上で1 分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液^{*8} とする。

*1 GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 2) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*2 攪拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスミキサー回転部に対して 2 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま30 秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30~60 秒間攪拌する。

*³ GE2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE: GM quicker 2）付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*⁴ 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けてGE2-K緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加したGE2-K緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

*⁵ 使用するローターおよび2 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*⁶ 上清を回収する際は、可能な限り沈殿や浮遊物等を取らないように注意する。

*⁷ GB3緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混合する。

*⁸ DNA 試料原液を滅菌蒸留水で10 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。

1.2. 定性リアルタイムPCR法（ABI PRISM™ 7900又はABI PRISM™7500）

定性リアルタイムPCR法において用いるプライマー対およびプローブは、以下の通りである。各プライマーは水で溶解し、使用する。

B. rapa 識別試験

B. rapa 識別用プライマー対,プローブ

B. rapa 識別試験は、*B. rapa* acetyl CoA carboxylase（ACCg8）遺伝子配列および *B. napus* cruciferin（BnC1）遺伝子配列を検知するプライマー対とプローブを用いる。

ACCg8 検出用プライマー対,プローブ

B.rapa-ACCg8 F: 5'-GGT TAT ATA CGG CTT TGT GGT TGC-3'

B.rapa-ACCg8 R: 5'-AAC ATC AGG CTG TCC AAG AAA GAT-3'

B.rapa-ACCg8: 5'-VIC-CTA TGT CTG AGG AAT TAT AA-MGB-3'

BnC1 検出用プライマー対,プローブ

B.napus BnC1-969F: 5'- GAA GCT CTC CTT CGT GGC TAA A-3'

B.napus BnC1-1043R: 5'- TCA CGA ATT TGA ATC TCG ATA CTC A-3'

B.napus BnC1-994T: 5'-FAM-ACG TGA ATC TGA TTT TGA-MGB-3'

RT73 検出試験

RT73検出用プライマー,プローブ

RT73 検出試験はRT73 検出用プライマー対とプローブと、ナタネ陽性対照用として acyl-ACP thioesterase（FatA）遺伝子配列を検知するプライマー対とプローブを用いる。

RT73 検出用プライマー対,プローブ

RT73 Primer1: 5'-CCA TAT TGA CCA TCA TAC TCA TTG CT-3'

RT73 Primer2: 5'-GCT TAT ACG AAG GCA AGA AAA GGA-3'

RT73 Probe: 5'-FAM-TTC CCG GAC ATG AAG ATC ATC CTC CTT-TAMRA-3'

FatA 検出用プライマー対,プローブ

FatA Primer1: 5'-GGT CTC TCA GCA AGT GGG TGA T-3'

FatA Primer2: 5'-TCG TCC CGA ACT TCA TCT GTA A-3'

FatA Probe: 5'-VIC-ATG AAC CAA GAC ACA AGG CGG CTT CA-TAMRA-3'

1.2.1. PCR用反応液の調製

PCR 用反応液は25 μL /well として調製する。組成は以下のとおりである。Universal PCR MasterMix^{*1} 12.5 μL 、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 $\mu\text{mol/L}$ ）0.25 μL 、対象プローブ溶液（10 $\mu\text{mol/L}$ ）0.5 μL を混合し、滅菌蒸留水で全量22.5 μL に調製後、DNA 試料液2.5 μL （スクリーニング試験ではDNA 試料液10 ng/ μL を用いる）を添加する^{*2*}。分注操作終了後、真上からシール^{*4} し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリーケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*5} を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。1 DNA 試料液あたり*B. rapa* 識別試験とRT73 検出試験の2 試験を行うものとし、*B. rapa* 識別試験はACCg8 とBnC1の各プライマー対とプローブを混合してリアルタイムPCR を行い、RT73 検出試験はRT73とFatA の各プライマー対とプローブを混合してリアルタイムPCRを行う。スクリーニング試験は、1 DNA 試料液あたり*B. rapa* 識別試験の2 ウェル並行、RT73検出試験の2 ウェル並行で行うものとする^{*6}。

*1 Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 粒検査試験では濃度未調整のDNA 試料原液を2.5 μL 用いる。

*3 検体試料液（測定対象）の他に3 種のControl すなわちNon-Template Control (NTC) 1 ウェル分、*B. rapa* Positive Control 1 ウェル分および*B. napus* Positive Control 2 ウェル分についてもそれぞれ調製する。DNA試料液の添加の際、NTCには水を、*B. rapa* Positive Control には*B. rapa* 標準プラスミドを、*B. napus* Positive Control には *B. napus* 標準プラスミドを、それぞれのウェルに2.5 μL 、DNA試料液の代わりに添加する。

*4 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction PlateおよびABI PRISM Optical Adhesive Cover（Life Technologies社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*5 MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISM 7900の場合、Life Technologies社) を使用する。

ABI PRISM 7500では使用しない。

*6 粒確認試験では*B. rapa* 識別試験、RT73検出試験ともにそれぞれ1 ウェルで行う。

1.2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、ACCg8 検出用はReporter が「VIC」、Quencher が「Non Fluorescent」に、BnC1 はReporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」に、RT73 検出用はReporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」に、FatA 検出用はReporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、*B. rapa* 識別試験、RT73 検出試験ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

1.2.3. PCR増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 °C、2 分間の条件で保持した後、95 °Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 °Cで15秒、60 °Cで1 分30 秒を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。反応終了後、Remaining timeが0分となっていることを確認し、測定結果の解析を行う。

1.2.4. End-point解析（ABI PRISM™ 7900）

B. rapa 識別試験に関してはリアルタイムPCR反応終了後、直ちにEnd-point解析を行う。サンプルはリアルタイムPCR反応が終了したプレートをそのまま用いる。[Marker Manager]ダイアログにおいて、DetectorにはリアルタイムPCRで設定した『ACCg8』、『BnC1』を選択し設定を行う。この設定条件で測定を開始し読み取り終了後、[System Table Pane]に表示されたACCg8、BnC1のRn値をそれぞれの蛍光強度として結果の解析を行う。

1.2.5. End-point解析（ABI PRISM™7500）

B. rapa 識別試験に関してはリアルタイムPCR反応終了後、直ちにEnd-point試験を行う。サンプルはリアルタイムPCR反応が終了したプレートをそのまま用いる。[Select Markers]ダイアログにおいて、DetectorにはリアルタイムPCRで設定した『ACCg8』、『BnC1』を選択し設定を行う。この設定条件で測定を開始し読み取り終了後、[Report]タブに表示されたACCg8、BnC1のRn値をそれぞれの蛍光強度として結果の解析を行う。

1.3. 結果の解析と判定 (図1参照)

2併行抽出より得られたDNA試料液 (1抽出あたり2ウェル並行で測定) の合計4ウェルすべてを用いて判定する。1 DNA 試料液あたり *B. rapa* 識別試験の2 ウェル並行、RT73検出試験の2 ウェル並行で行うものとする。

B. rapa 識別試験についてはEnd-point解析の結果により判定を行い、RT73検出試験については明確な増幅曲線の有無で判定を行う。*B. rapa* の混入が判断され、かつRT73が検出された場合のみ2.の粒確認検査を実施する。

B. rapa 識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料液のACCg8 (VIC) の蛍光強度 (2 ウェルの結果の平均値) と *B.napus* Positive ControlのACCg8 (VIC) の蛍光強度 (2 ウェルの結果の平均値) との比が2.04以上 (ABI PRISM™ 7900) , 1.40以上 (ABI PRISM™ 7500) の場合、*B. rapa* が混入していると判断する。

また、RT73検出試験については、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認およびmulticomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。第一に目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合にRT73陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3サイクルから15サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh.LineからCt値が得られるか否かを解析する。

DNA試料液において、

- (1) FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られ、かつ同時に行ったRT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られた場合にRT73陽性と判定する。
- (2) FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られ、RT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られない場合はRT73陰性と判定する。
- (3) FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られ、RT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験で38未満のCt値がすべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、改めて2 回目のDNA抽出精製を行い、さらに「1.2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液 (各2ウェル) について、結果の判定スキームに従って判定し、*B.rapa*識別試験およびRT73検出試験の両方について陽性と判定された検体を陽性と判断し、さらに、2.の粒確認試験を行う。

なお上記判定によりRT73陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMあるいはVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な

下降やFAMあるいはVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、FatA検出用プローブを用いた試験（VIC）で38未満のCt値が得られないウェルについては、再度、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法以降の操作を行い、それでも38未満のCt値が得られない場合には、本試料からの安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検知は不能とする。

2. 粒確認検査

1.のスクリーニング検査において*B. rapa* の混入とRT73の増幅が確認された場合、当該検体の粒試料から無作為に92粒を採取し、各粒毎にDNA抽出を行い、各DNA試料原液を対象に上記の1.のスクリーニング検査における1.2.の定性リアルタイムPCR法（*B. rapa* 識別試験とRT73検出試験）を行う。

2.1. DNA抽出精製法（1粒抽出）

ナタネ粒からのDNA抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE: GM quicker 96ナタネに適用）を用いる。抽出するにあたり事前にナタネを洗浄しておく必要がある、洗浄方法は以下に示す。ナタネの入ったビーカーに10% SDSを加え、スパーテルで攪拌し、SDSを破棄する、この工程を3回行う。次にビーカーに超純水を加えてすすぎ洗いし、超純水を破棄する、この工程も3回行う。洗浄後、粉碎用プレート（RCD-96）の各ウェルにナタネを1粒ずつ入れ、65℃に設定した恒温槽で1時間乾燥させる。十分にナタネが乾燥したら、粉碎用プレートの各ウェルにメタルコーン（MC-96415R）を1つずつ入れCPD-96でフタをした後、MULTI-BEADS SHOCKER（YASUI KIKAI）を用いて1,500 rpmの条件で20秒間粉碎する^{*1}。粉碎後、粉碎用プレートにGE1緩衝液^{*2} 500 µL、Proteinase K 20 µL、RNase A 10 µLを加え、MULTI-BEADS SHOCKERにセットし1,500 rpmの条件で15秒間混合する。プレートごと65℃で15分間静置する^{*3}。GE2-K緩衝液^{*4}^{*5} 85 µLを加え、MULTI-BEADS SHOCKERにセットし1,500 rpmの条件で15秒間混合し、METALFUGE（YASUI KIKAI: MBG 100）で2,900 rpmの条件で5分間遠心する。次いでその上清^{*6} 400 µLを、コレクションプレートをセットしたフィルタープレート^{*7}に添加し、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5分間遠心する。コレクションプレートの各ウェルにGB3緩衝液 150 µL およびイソプロパノール 150 µLを添加した後、ピペッティングして混合する^{*8}。混合液700 µL（全量）を、コレクションプレートをセットしたspin columnプレートに負荷した後、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5分間遠心し、コレクションプレートに溜まった溶出液を捨てる。次いでGW緩衝液650 µLを負荷し、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnプレート内のエタノールを完全に除去するため、METALFUGEで2,900 rpmの条件で20分間遠心する。spin columnプレートを新たなコレクションプレートに移し、滅菌蒸留水 50 µLを加え室温で3分間静置した後、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

- *¹ 粉碎後、METALFUGE (YASUI KIKAI) を用いてプレートごと2900 rpm の条件で1 分間スピンドウンすることで、フタに付着したサンプルを落としコンタミネーションを予防する。
- *² GE1緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 96) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。
- *³ 65 °Cで静置する際、ウェル内の空気が膨張してフタが開きやすくなりコンタミネーションが起こる可能性がある。これを防ぐため、しっかりとフタをし、プレートごとラップで覆うなどする。
- *⁴ GE2緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 96) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。
- *⁵ 泡が他のウェルに混入するのを防ぐため、フタを空ける前にMETALFUGE (YASUI KIKAI) を用いてプレートごと2900 rpm の条件で 1 分間スピンドウンすることで、フタに付着した泡を消しコンタミネーションを予防する。抽出液には粘性が生じているので、添加したGE2-K緩衝液が十分に均一となるよう混合する。
- *⁶ 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。
- *⁷ フィルタープレートはWhatmanの容量800 μL、ポアサイズ0.45 μLのポリプロピレンフィルターを使用する。
- *⁸ GB3緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混合する。

2.2. 結果の解析と判定 (図1参照)

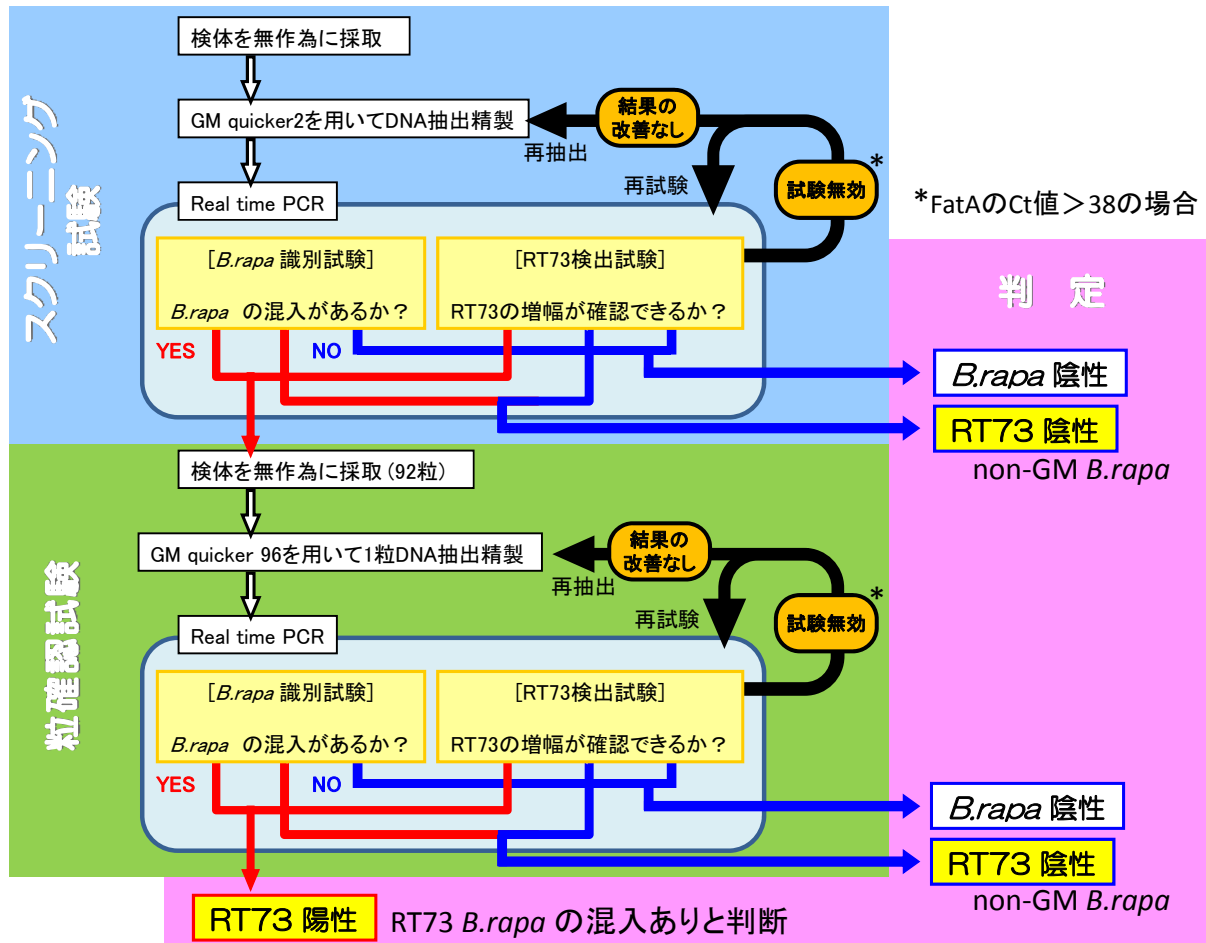
各DNA試料原液における結果の判定は、*B. rapa* 識別試験についてはEnd-point解析の結果により判定を行い、RT73検出試験については明確な増幅曲線の有無で判定を行う。*B. rapa*であると判断され、かつRT73が検出された検体はRT73 *B. rapa*であると判定する。

B. rapa 識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料原液のACCG8 (VIC) の蛍光強度と*B. napus* Positive ControlのACCG8 (VIC) の蛍光強度 (2ウェルの結果の平均値) との比が2.63以上 (ABI PRISM™ 7900) 、1.69以上 (ABI PRISM™ 7500) で、BnC1 (FAM) の蛍光強度と*B. napus* Positive Controlの蛍光強度 (2ウェルの結果の平均値) の比が0.28以下 (ABI PRISM™ 7900) 、0.35以下 (ABI PRISM™ 7500) の場合、そのDNA試料原液は*B. rapa*であると判断し、当該DNA試料原液のRT73の検出を確認する。RT73検出試験については、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認およびmulticomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。第一に目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合にRT73陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3サイクルから15サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. Line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. LineからCt値が得られるか否かを解析する。FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られ、かつ同時に行ったRT73

検出用プローブ (FAM) を用いた試験で、38未満のCt値が得られた場合、RT73陽性と判定する。FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られ、RT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験で38未満のCt値が得られない場合はRT73陰性と判定する。また、FatAの1.3倍以上のCt値がRT73検出用プローブ (FAM) で得られた場合は、他の粒の粉砕物のコンタミネーションが起こっていると判断し、当該DNA試料原液はRT73陰性と判定する。なお上記判定によりRT73陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMあるいはVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMあるいはVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、FatA検出用プローブを用いた試験 (VIC) で38未満のCt値が得られないDNA試料原液については、再度、当該DNA試料原液に対して定性リアルタイムPCR法以降の操作を行い、それでも同様の結果の場合には、そのDNA試料原液での結果を無効とする。92粒のDNA試料原液中で90粒以上のDNA試料原液でFatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られる場合は、本試験は成立する。再度リアルタイムPCRを行い、それでもFatAで38未満のCt値が得られたDNA試料原液が89粒以下の場合、本試験は不成立として、改めて92粒を無作為に採取し、「2.1. DNA抽出 (1粒抽出)」以降から行う。

B. rapa 識別試験において*B. rapa*と判断され、かつRT73検出試験においてRT73陽性と判断されたDNA試料原液が1 検体でもある場合は、当該検体はRT73 *B. rapa*陽性と判定する。

図1. RT73 *B.rapa*検査システムのフロー



パパイヤ (PRSV-YK) の検査方法

本法では生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下の陰イオン交換樹脂タイプキット法(QIAGEN社製Genomic-tip 100/G)を用いる。別法として、シリカゲル膜タイプ法(QIAGEN DNeasy Plant mini)を使用したDNA抽出精製を生鮮パパイヤに適応できる。1検体から2併行でDNAを抽出精製し、DNA試料液を得る。そのDNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

1. 生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工品からのDNA抽出精製

生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品は以下の7種類の製品に細分類し、以下に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従ってDNA抽出精製前の試料調製を行う。

- ① 生鮮および調味漬け製品 (生鮮パパイヤ、缶詰、漬物など乾固されていないある程度パパイヤの原型を保持している試料)
- ② 乾物製品 (乾燥パパイヤ)
- ③ 砂糖漬け乾燥製品 (ドライフルーツ)
- ④ 乾燥製品 (健康食品、お茶など)
- ⑤ 果肉含有ゲル状製品 (ジャム、ピューレなど)
- ⑥ 果汁・飲料製品 (フルーツミックスジュース、ドリンク剤など)
- ⑦ 氷菓等製品 (アイス、シャーベットなど)

1.1. 試料前処理

1.1.1. 生鮮および調味漬け製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し(生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分)、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、よく水分をきり、Millser等で粉砕する(生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉砕する)。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量りとり、G2緩衝液^{*}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.2. 乾物製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、Millser等で粉砕する。粉砕した試料2gをポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量りとり、G2緩衝液^{*}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.3. 砂糖漬け乾燥製品

製品から目視でパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、等重量分の滅菌蒸留水を加え、Millser等で粉砕する。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液30 mL^{*}を加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.4. 乾燥製品

Millser等で粉砕し均質にした試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液30 mL^{*}を加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.5. 果肉含有ゲル状製品

Millser等で粉砕し均質にした試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液30 mL^{*}を加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.6. 果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品100 mLをメスシリンダーで量りとり、凍結乾燥用容器（500 mL容量）に移し、傾けた状態で-80°C冷凍庫中で2時間凍結させる。その後、凍結乾燥機にセットし、24時間乾燥後、試料30gを乳鉢に量りとりG2緩衝液^{*}20 mLに乳棒を用いて溶解させる。次いで全量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たにG2緩衝液^{*}10 mLを追加し洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。

1.1.7. 氷菓等製品

試料100gを凍結乾燥用容器に量りとり、24時間凍結乾燥する。その後、試料10gを先にG2緩衝液^{*}30 mLを入れたポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に少しずつ加えながら溶解させ、よく転倒混和して均質にする。

^{*} G2緩衝液はキアゲン社（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

1.2. パパイヤ試料からの DNA 抽出精製

1.2.1. DNA の抽出精製

1.2.1.1. 陰イオン交換樹脂タイプキット法 (QIAGEN 社製 Genomic-tip 100/G)

DNA 抽出用試料に、100 mg/mL RNase A^{*1} 20 µL、cellulase^{*2} 500 µL を加えて (なお、⑤ 果肉含量ゲル状製品のジャム製品に限り、α-Amylase^{*3} 20 µL も同時に加える)、転倒混合し均質化した後、50 °C で 1 時間放置する。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで Proteinase K^{*4} 200 µL を加え 50 °C で 1 時間放置する。その間も 2 ~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、その遠沈管を 3,000×g、低温下 (4 °C)、20 分間遠心し、得られた上清 (約 25~35 mL) を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液^{*5} 4 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する。次いで、100/G を QC 緩衝液^{*5} で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、あらかじめ 50 °C に温めておいた QF 緩衝液^{*5} 1 mL を負荷し、はじめの溶出液は捨てる。新しい遠沈管に移し、再度 50 °C に温めておいた QF 緩衝液^{*5} 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、遠沈管 (1.5 mL もしくは 2.0 mL 容) に移し、10,000 ×g 以上で、低温下 (4 °C) 15 分間遠心する。上清を捨てる。この際、上清を極力除去する^{*6}。70%エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000 ×g 以上で、低温下 (4 °C) 5 分間遠心する。さらに上清を捨て^{*6}、残った沈殿を、乾燥させた後、予め 50 °C に温めた滅菌蒸留水 50 µL に溶解し、DNA 試料原液とする。

*1 キアゲン社 (Cat. no. 1018048) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*2 シグマアルドリッチ社 (Cat. no. C2730-50ML) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 ニッポン・ジーン社 (Cat. no. 312-06671) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*4 プロメガ社 (Cat. no. V3021) 100 mg を滅菌水 5 mL に溶解したもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 QBT 緩衝液、QC 緩衝液および QF 緩衝液はキアゲン社 (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*6 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去する。

1.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN 社製 DNeasy Plant Mini)

採取したパパイヤから種子を除いた果肉部分をおよそ 10 mm 角に切り出し、凍結乾燥を行う。次にミルサー等でこれらを混合し、粉砕する。粉砕試料を用い、以下の方法に従って DNA を抽出精製する。

粉砕試料 80 mg をマイクロ遠沈管 (2 mL 容) に量り採り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 600 µL と RNase A^{*1} 4 µL を加え、試料塊がないよう混合し、65 °C で 15 分間放置する。その間数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。その後 AP2 緩衝液 195 µL を加え、氷上に 5 分放置後、室温下 10,000×g で 5 分間遠心する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、室温下 10,000×g で 2 分間遠心し、溶出液をマイクロ遠沈管 (2mL 容) に移す。遠沈管に 1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、得られた混合液のうち 500 µL を mini spin column に負荷し、室温下 10,000×g で 5 分間遠心し^{*2}、溶出液を捨てる。次いで、残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin

column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで、column に AW 緩衝液 500 μL を加え、室温下 10,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、溶出液を捨てもう一度 AW 緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000 $\times g$ 以上で 15 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 50 $^{\circ}\text{C}$ 温めておいた水 50 μL を加え、5 分間放置した後、10,000 $\times g$ で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同様の操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 キアゲン社 (Cat. no. 1018048) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*2 混合液中に析出物が有る場合columnが詰まりやすくなる。その場合、完全に溶出させるため遠心時間を10分程度まで延ばす。

1.2.2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260および280 nmの吸光度^{*2}(A_{260} および A_{280})を記録する。次いで A_{260} の値 1 を50 ng/ μL DNAと換算し、DNA濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が1.7~2.0になれば、DNAが十分に精製されていることを示す^{*3}。得られたDNA濃度から、DNA試料原液を10 ng/ μL に滅菌蒸留水で希釈して調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は40 μL ごとにマイクロ試料管に分注後、-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が10 ng/ μL に達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

*1 希釈する場合には、滅菌蒸留水を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

*2 A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

*3 A_{260}/A_{280} の比が1.7~2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2. 定性リアルタイムPCR法 (ABI PRISMTM7900 または7500)

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用として、カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター配列と Papaya Ringspot Virus coat protein (PRSV-cp) 遺伝子の境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列 (CaM) 検知試験用として、CaMを検知するプライマー対、および、プローブを用いる。また、パパイヤ陽性対照試験用として、Chymopapain遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用プライマー対、および、プローブ
YK-2F: 5'-ACA CGG GGG ACT CTA GAG -3'

YK-2R: 5'-ACC GGT ATC CAC AGC TTC -3'

YK-2P: 5'-FAM- TCC CTT CCA TGG CGT C-TAMRA-3'

CaM配列検知試験用プライマー対、プローブ

35S-F : 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3'

35S-P : 5'-FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対、プローブ*

Q-Chy-1F2: 5'-CCA TGC GAT CCT CCC A-3'

Q-Chy-2R: 5'-CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'

Q-Chy-P: 5'-FAM-TTC CCT TCA T (BHQ1) CC ATT CCC ACT CTT GAG A-3'

* Q-Chy-Pプローブのクエンチャー（消光物質）は、T-baseのblack-hole quencher 1（BHQ1）を使用する。

2.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。組成は以下のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各0.4 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.25 μ Lを混合し、DNA試料液5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製する。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製する^{*2}。分注操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA試料液あたりパパイヤ陽性対照試験、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験、およびCaM配列検知試験をそれぞれ2 ウェル並行して行うものとする。

*1 TaqMan Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 5 μ L 添加する。

*3 96 ウェルプレート、シール、および、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate（Life Technologies 社）、および、ABI PRISM Optical Adhesive Cover（Life Technologies 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISM™7900 の場合、Life Technologies 社) を使用する。
ABI PRISM™ 7500 では使用しない。

2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類、および、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」:Non-Template Control、「UNKN」:DNA 試料液)の設定を行う。またプローブ特性に関しては、YK-2P、35S-P、Q-Chy-P とともに Reporter が「FAM」、Quencher が YK-2P は「TAMRA」、35S-P は「TAMRA」、Q-Chy-P は「Non Fluorescent」となるように設定する。また、Passive Reference は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。Sample Volume は 25 μ L に設定する。

2.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3. 結果の解析と判定 (図1参照)

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験、CaM配列検知試験およびパパイヤ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、および、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験、および、CaM配列検知試験の両試験とも目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3サイクルから15サイクル) 設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

2併行抽出より得られたDNA試料液 (1抽出あたり2ウェル並行で測定) の合計8ウェルすべてを用いて判定する (YKの2併行4ウェル + CaMの2併行4ウェルの計8ウェル)。

DNA試料液において、

- (1) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで48未満のCt値が得られた場合（STEP 2のパターン①）に、当該試料は陽性と判定する。
- (2) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで48未満のCt値が得られない場合（STEP 2のパターン②）には、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）陰性と判定する。
- (3) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験あるいはCaM配列検知試験の結果の組み合わせがSTEP 2のパターン①又はSTEP 2のパターン②のいずれにも該当しない場合は、粉砕・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液についてPRSV-YKおよびCaMのいずれの試験でも陽性と判定された検体を陽性と判断する。

陽性検体のパターン	陽性対照用Chy	PRSV-YK	CaM
抽出DNA試料液—①	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液—②	(+/+)	(+/+)	(+/+)
		 PRSV-YK 陽性	

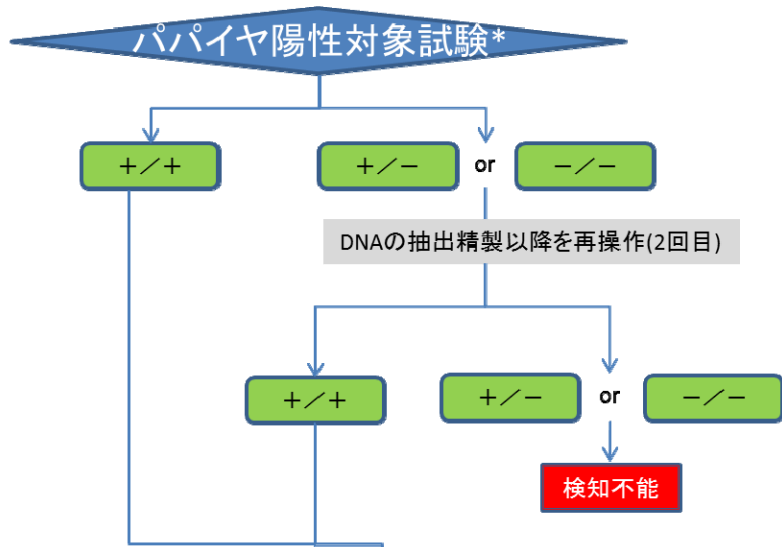
なお上記により陽性と判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、パパイヤ陽性対照試験の すべてのウェルで48未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、粉砕・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を行い、それでもパパイヤ陽性対照試験の すべてのウェルで48未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

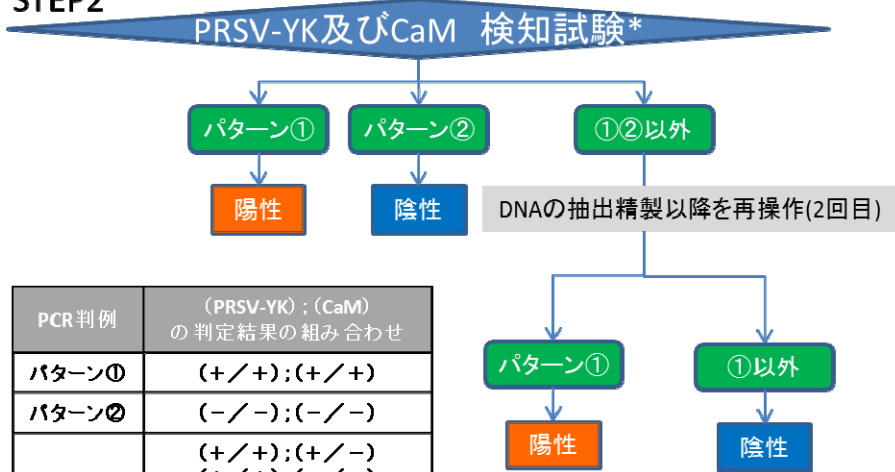
* DNA 抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「1.1. 試料前処理」から実施する。

図1 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



PCR判例	(PRSV-YK) ; (CaM) の判定結果の組み合わせ
パターン①	(+ / +) ; (+ / +)
パターン②	(- / -) ; (- / -)
①②以外	(+ / +) ; (+ / -) (+ / +) ; (- / -) (+ / -) ; (+ / +) (+ / -) ; (+ / -) (+ / -) ; (- / -) (- / -) ; (+ / +) (- / -) ; (+ / -)

*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。