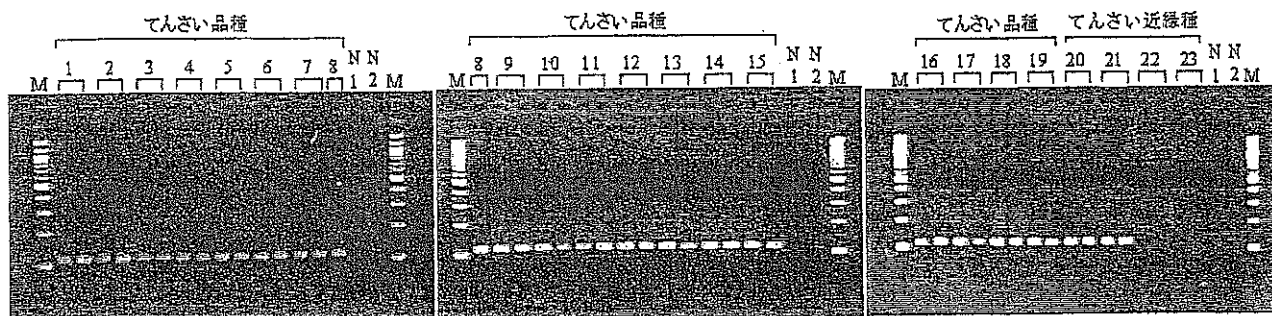
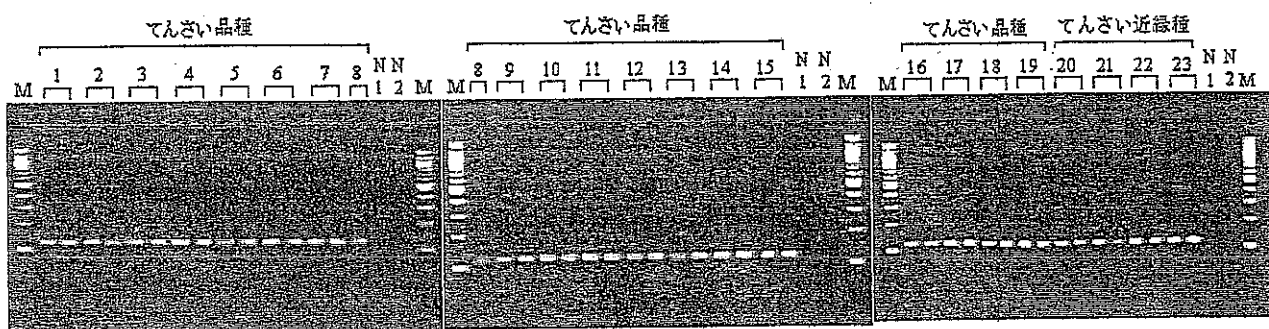


プライマー対 3



プライマー対 4

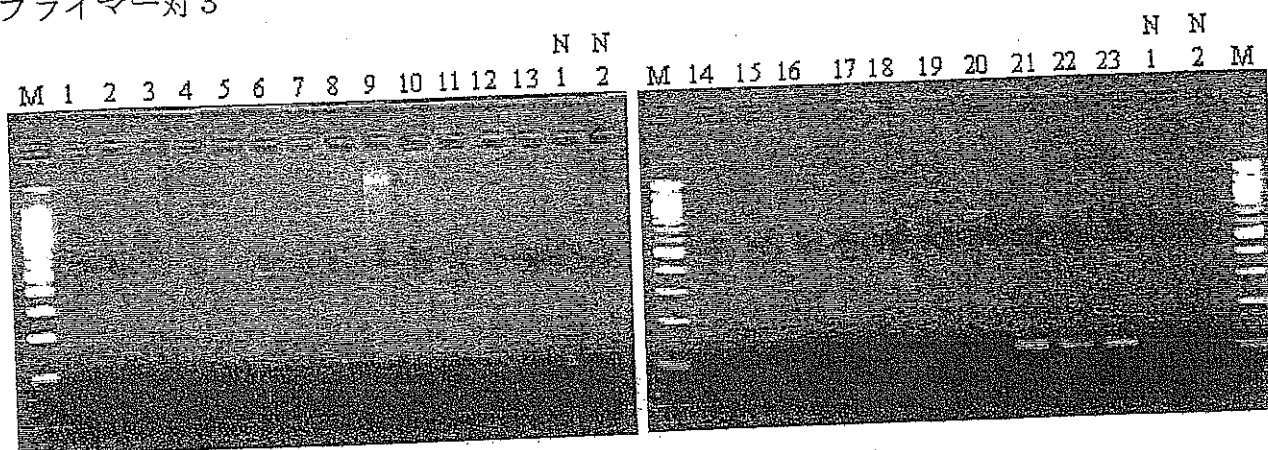


M: 100 bp ラダーマーカ、1: モノミドリ, 2: モノヒカリ, 3: モノパール, 4: モノホワイト, 5: モノホマレ, 6: ホッカイマイティ, 7: シュベルト, 8: カプトマル, 9: ユキヒノデ, 10: きたまさり, 11: えとぴりか, 12: のぞみ, 13: スコーネ, 14: フルーデンR, 15: NK-150, 16: C-110, 17: Amono, 18: Hinderupgaard, 19: Detroit Dark Red, 20: FK-02-09 (フダンソウ), 21: FK-02-34 (フダンソウ), 22: C.amaranticolor (アカザ), 23: C.quinoa (シロザ), N1: ネガティブコントロール 1 (No DNA), N2: ネガティブコントロール 2 (No primer)

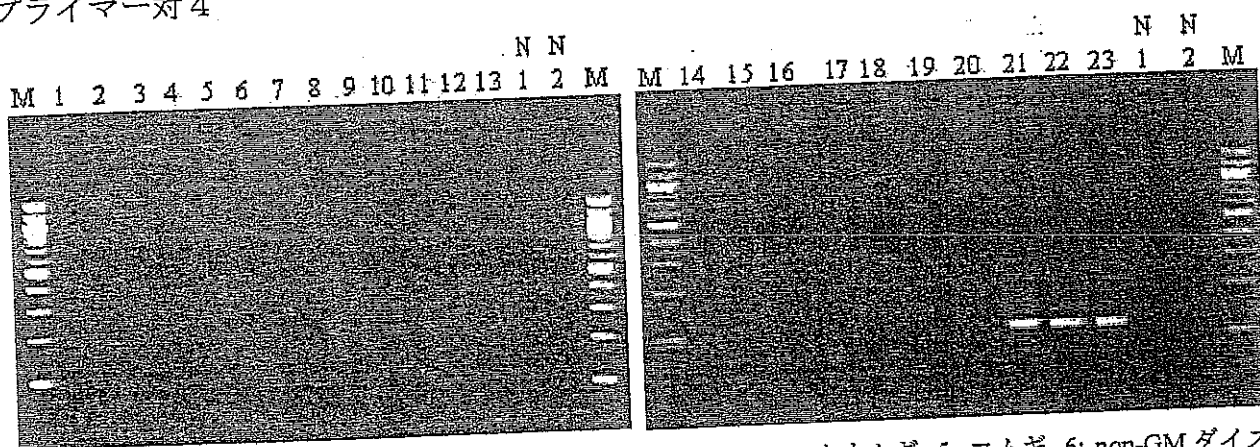
1. 3. 主要作物に対する特異性

てんさい内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 及びプライマー対 4 について、入手した主要作物（国産イネ、中国産イネ、ワタ、オオムギ、コムギ、non-GM ダイズ、GM ダイズ (Roundup Ready Soy)、non-GM トウモロコシ、GM トウモロコシ (Bt11, Event 176, MON810, GA21, MON863, NK603, T25, TC1507)、デュラムコムギ、ナタネ、アルファルファ及びジャガイモ）を用いて特異性を確認した結果、両プライマーともに目的長のバンドは増幅されず、これらの主要作物に対しては特異性があることが確認された。

プライマー対3



プライマー対4



M: 100 bp ラダーマーカー, 1: 国産イネ, 2: 中国産イネ, 3: ワタ, 4: オオムギ, 5: コムギ, 6: non-GM ダイズ, 7: GM ダイズ (Roundup Ready Soy), 8: non-GM トウモロコシ, GM トウモロコシ (9: Bt11, 10: Event 176, 11: MON810, 12: GA21, 13: MON863, 14: NK603, 15: T25, 16: TC1507), 17: デュラムコムギ, 18: ナタネ, 19: アルファルファ, 20: ジャガイモ, 21: ホッカイマイティ (テンサイ), 22: シュベルト (テンサイ), 23: FK-02-09 (フダンソウ), N1: ネガティブコントロール1 (No DNA), N2: ネガティブコントロール2 (No primer)

1. 4. 安定性及び特異性のまとめ

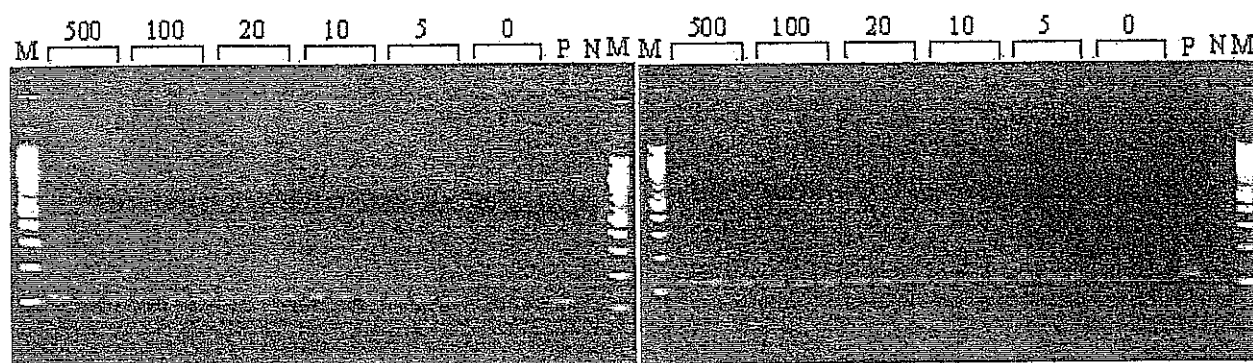
てんさい内在性 DNA 配列検知用プライマー対3及びプライマー対4は、各種てんさい品種を含む *B.vulgaris* に対し安定的に増幅し、主要作物に対しては増幅しなかった。しかし、プライマー対4は *B.vulgaris* 近縁種においても増幅産物が得られた。しかしながら、一般に用途が異なる飼料用ビートやテーブルビートがてんさいに混入することは極めて低いと考えられ、また、同種であるフダンソウは野菜であり、根部の肥大が余り起きないことから、混入することは想定できない。このため、今回開発した2つのプライマー対は本調査に使用可能であると判断した。

2. 検知下限

てんさい内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 及びプライマー対 4 の検知下限をてんさいの C-value (一倍体ゲノムあたりの DNA 量) をもとに抽出 DNA 溶液を段階希釈して確認した結果、両プライマー対ともに、ゲノム DNA として 5 コピーまで検知可能であった。

プライマー対 3

プライマー対 4



M: 100 bp ラダーマーカー

数字はてんさい (品種: スコーネ) ゲノム DNA 添加量 (単位はコピーで、てんさいゲノム量 (C-value) から計算した)。

P: ポジティブコントロール (てんさい (品種: スコーネ) の葉から抽出した DNA), N: ネガティブコントロール (No DNA)

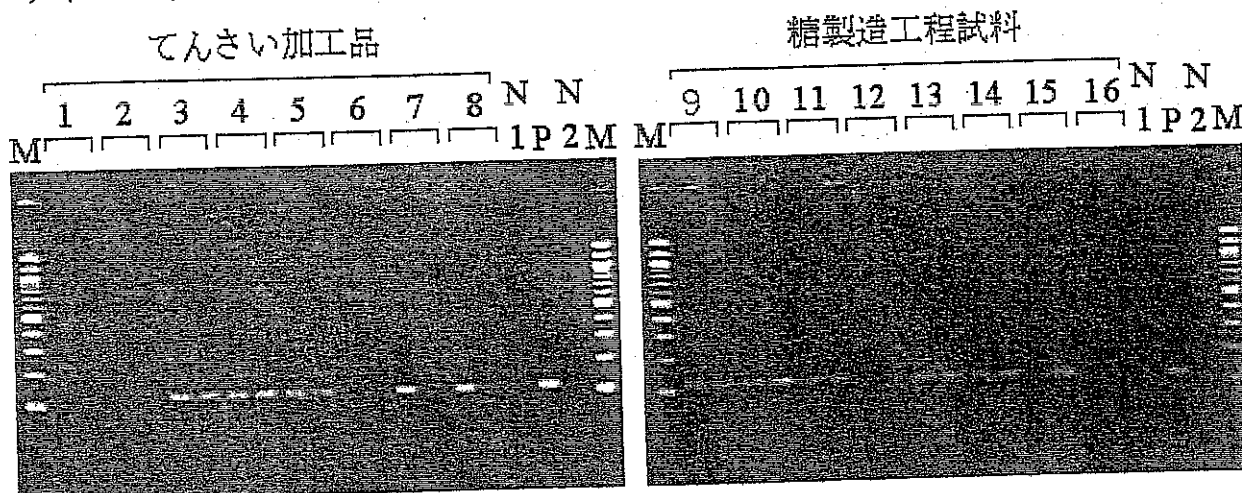
(別添4)

抽出 DNA の PCR における阻害確認試験

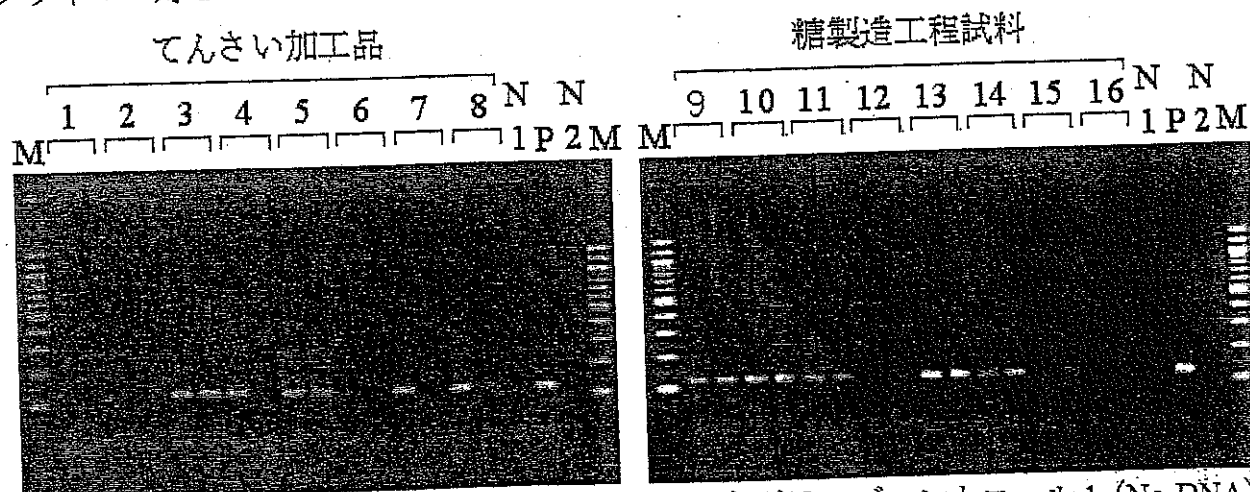
プライマー対3及びプライマー対4による抽出 DNA の PCR における阻害確認試験は、試料 16 点から抽出した DNA に、別途てんさい(スコーネ)の葉から抽出したゲノム DNA を各反応液中に 20 コピー入るように添加することで実施した。なお、添加したゲノムコピー数はてんさいのゲノム量 (C-value) と抽出 DNA の 260nm 吸光度から計算した。

その結果、今回の調査で使用したプライマー3対による PCR では試料 16 点のうち 7 点、プライマー対4では 8 点で PCR の阻害が確認された。阻害が確認された試料の多くは、肉眼で認識できる程度の褐色を帯びているという共通点があったが、この色素が阻害原因かは不明である。また、一部の砂糖においても 2 回繰り返し試験のうちの 1 回で阻害が確認された。

プライマー対3



プライマー対4



M: 100 bp ラダーマーカー, 1 ~ 16: 試料番号, N1: ネガティブコントロール1 (No DNA), P: ポジティブコントロール (てんさい (品種:スコーネ)の葉から抽出した DNA), N2: ネガティブコントロール2 (No primer)