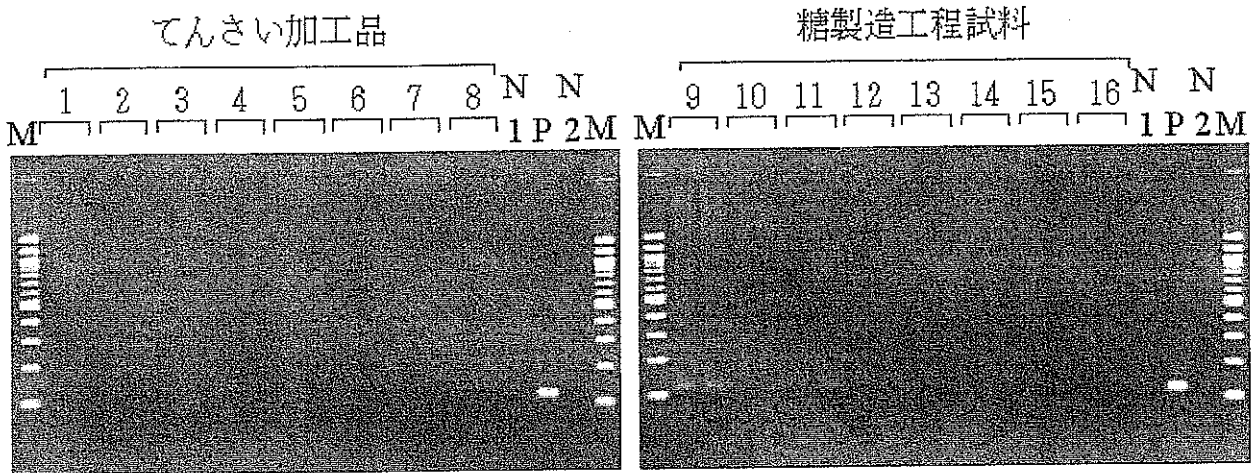


3. 3. 電気泳動写真 (3%ゲル)

3. 3. 1. プライマー対3



M: 100 bp ラダーマーカー

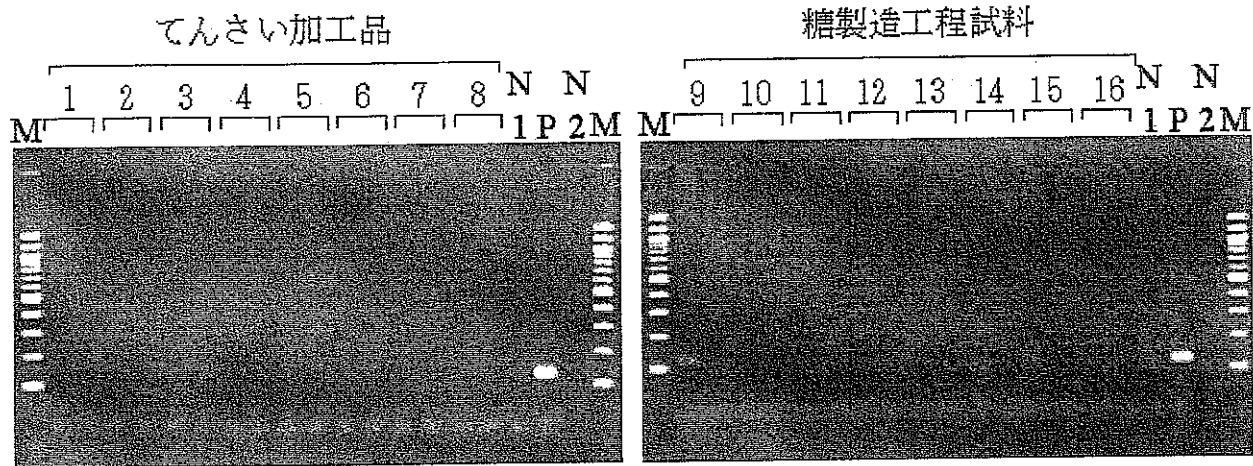
1 ~ 16: 試料番号

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)

3. 3. 2. プライマー対4



M: 100 bp ラダーマーカー

1 ~ 16: 試料番号

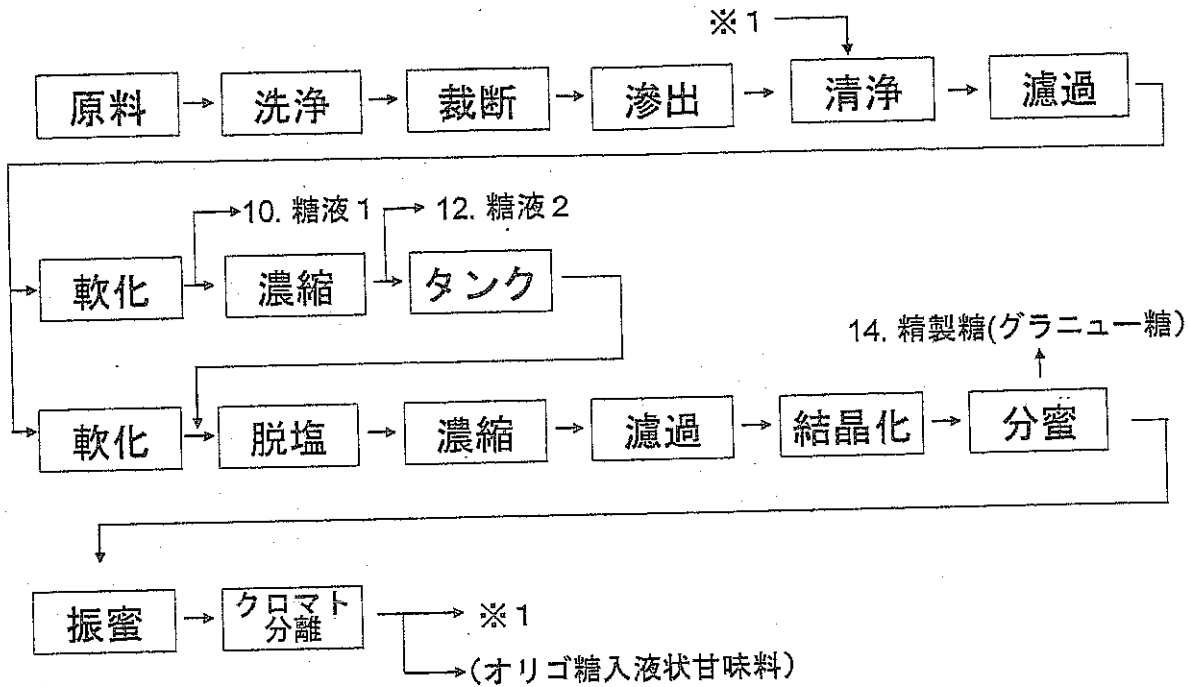
N1: ネガティブコントロール1 (No DNA)

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)

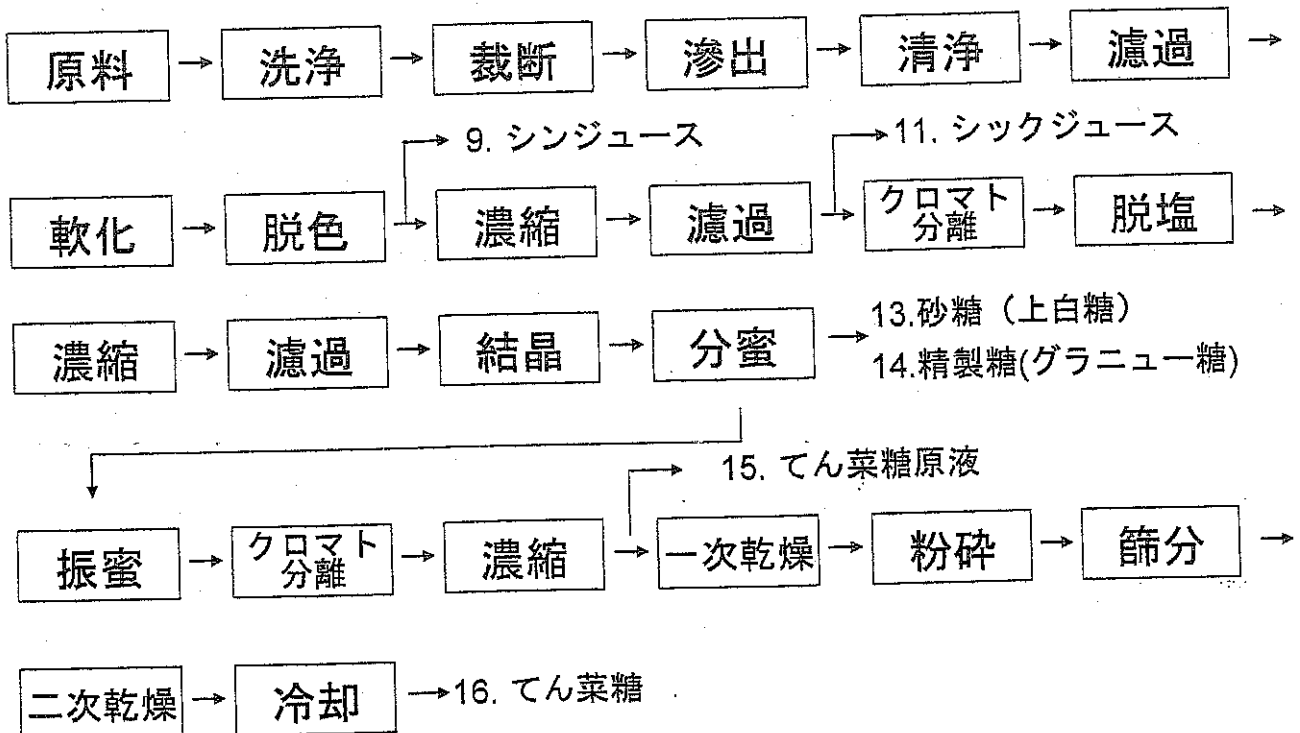
N2: ネガティブコントロール2 (No primer)

(別添1)

てんさい糖製造フロー (A工場)



てんさい糖製造フロー (B工場)



てんさい加工品からの DNA 抽出法 (改変法)

- (1) 試料 1 g を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、100 μ L の QIAGEN Proteinase K 及び 10 μ L の RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (3) 50 $^{\circ}$ C の恒温水槽中で 2 時間保温する (15 分ごとに 7 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離 (3,000 \times g) する。
- (5) 15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。
- (6) チューブをフラッシュ遠心する。
- (7) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (8) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (9) tip に、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。
- (10) (9) のカラムの洗浄操作を、さらに 2 回行う。
- (11) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1 mL の QF 緩衝液 (50 $^{\circ}$ C) を加え、DNA を溶出する (溶出 1)。
- (12) tip を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1 mL の QF 緩衝液 (50 $^{\circ}$ C) を加え、DNA を溶出する (溶出 2)。
- (13) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、サンプルの 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムとエタ沈メイト (DNA キャリアー) 2 μ L を添加後、攪拌し、等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (14) 遠心分離器 (アングルローター) を使用し、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離 (12,000 \times g) 後、200-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (15) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、500 μ L の 70 % エタノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。
- (16) 遠心分離器 (アングルローター) を使用し、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離 (12,000 \times g) し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (17) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブに 40 μ L の DW (滅菌水) を加え、沈殿物を 65 $^{\circ}$ C で 15 分間放置する (振とうしない)。
- (18) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブの液量を全量、溶

出1のチューブに入れ、DNAを65℃で15分間振とう溶解する。

(19) 指先でチューブをはじき、(12-24時間)冷蔵庫に静置する。

(20) 目視で不溶物がないことを確認し、これをDNA抽出溶液とする。24時間かけても不溶物が認められる場合は、4℃で3分間遠心分離(12,000 × g)して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA溶出溶液とする。なお、沈殿も、-20℃以下で保存すること。

てんさい内在性 DNA 配列検知用プライマー対について

1. 安定性及び特異性

1. 1. てんさいについて

てんさいは、アカザ科フダンソウ属の多年草植物であり、種名は *Beta vulgaris* である。植物学上は飼料用ビート、テーブルビート、フダンソウと同一種であり、ビートの砂糖用品種群がてんさいと呼ばれている。*B. vulgaris* のアカザ科近縁種としては *Chenopodium amaranticolor*、*Chenopodium quinoa* などがある。

1. 2. 各種てんさい品種を含む *B. vulgaris* に対する安定性及びてんさい近縁種、*B. vulgaris* 近縁種に対する特異性

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センターより分譲を受けた 19 種類の *B. vulgaris* の種子 (14 品種のてんさい種子 (モノミドリ、モノヒカリ、モノパール、モノホワイト、モノホマレ、ホツカイマイティ、シュベルト、カプトマル、ユキヒノデ、きたまさり、えとびりか、のぞみ、スコーネ、フルーデンR)、てんさい近縁種の種子 (NK-150、C-110)、飼料用ビート種子 (Amono、Hinderupgaard)、及びテーブルビート種子 (Detroit Dark Red)、フダンソウ (FK-02-09、FK-02-34)) を用いて、*B. vulgaris* に特異的な内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 (SNP F 1-5' & 3', 増幅長: 116 bp) 及びプライマー対 4 (SNP B 2-5' & 3', 増幅長: 121 bp) の安定性を確認した結果、両プライマー対で全てのてんさい品種を含む *B. vulgaris* から目的長のバンドが増幅したことからこれらのプライマーを利用することで、安定的にてんさい DNA 配列を検知できると考えられた。

しかし、*B. vulgaris* 近縁種に対する両プライマー対の特異性を、独立行政法人種苗管理センターより入手した *C. amaranticolor* 及び *C. quinoa* を用いて検討したところ、プライマー対 4 ではアカザ及びシロザにおいて目的長のバンドが増幅したことからプライマー対 3 は、*B. vulgaris* 特異的、プライマー対 4 はアカザ科特異的な増幅産物が得られるプライマーであると判断された。