

カナダ産未承認遺伝子組換えナタネ(RT73 *B. rapa*)の検査

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。なお、ナタネの穀粒の検体採取及び粉碎に関しては「組換えDNA 技術応用食品の検査方法について」(平成13 年3 月27 日付け食発第110 号、最新改正食安発第0618001 号) 1. 1. 1. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取及び粉碎と同様に行う。

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 並行で DNA を抽出し、各 DNA 試料液を用いて以下のリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。均質に粉碎した試料 200 mg を 2 mL 容チューブに量り取り、GE1 緩衝液^{*1}800 μ L、Proteinase K 20 μ L、RNase A 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℃で 15 分間静置する。GE2-K 緩衝液^{*3} ^{*4}100 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで混合する。13,000 $\times$ g 以上、4℃の条件で 5 分間遠心^{*5}する。次いでその上清^{*6}350 μ L を 1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液 130 μ L 及びイソプロパノール 130 μ L を添加した後、10～12 回転倒混合する^{*7}。混合液 610 μ L(全量)を spin column に負荷した後、13,000 $\times$ g 以上、4℃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℃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、水 50 μ L を加え室温で 3 分間静置した後、13,000 $\times$ 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 使用するローター及び 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 試料原液を水で 10 ng/μL に調製し、DNA 試料液とする。

1.2 リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

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

1.2.1. B. rapa識別試験

B. rapa識別用プライマー対及びプローブ

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及びプローブは以下の通りである。

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'

Brapa-ACCg8: 5'-VIC-CTA TGT CTG AGG AAT TAT AA-NFQ-MGB-3'

BnC1 検出用プライマー対及びプローブは以下の通りである。

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-NFQ-MGB-3'

1.2.2. RT73 検出試験

RT73検出用プライマー対及びプローブ

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及びプローブは以下の通りである。

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及びプローブは以下の通りである。

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'

1.2.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法(AB: ABI PRISM™ 7900)

PCR用反応液の調製(ABI PRISM™ 7900)

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) 0.25 µL、対象プローブ溶液(10 µmol/L) 0.5 µL を混合し、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 *³。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、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。1DNA 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、1DNA 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、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

*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。

プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7900)

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、検体の配置と種類及び、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。

PCR (ABI PRISM™ 7900)

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℃、2分間の条件で保持した後、95℃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℃ 15秒、60℃ 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。

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。

1.2.4. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7500)

PCR用反応液の調製 (ABI PRISM™ 7500)

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) 0.25 µL、対象プローブ

溶液(10 µmol/L)0.5 µL を混合し、水で全量 22.5 µL に調製後、DNA 試料液 2.5µL(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 *³。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。1DNA 試料液あたり B. rapa 識別試験と RT73 検出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、1DNA 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*⁵。

*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、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 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 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。

プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7500)

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、検体の配置と種類及び、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、 B. napus Positive Control) 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。

PCR (ABI PRISM™ 7500)

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℃、2分間の条件で保持した後、95℃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℃ 15秒、60℃ 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。

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

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(3サイクルから15サイクル)の 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Th. Line(Threshold line)を選択する*。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値が得られたウェルが1ウェルでもある場合に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。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、そのウェルの測定結果を無効とし、38未満のCt値が得られた抽出液の結果だけで判定する。2つのウェルともにFatA検出用プローブを用いた試験(VIC)で38未満のCt値が得られない場合には、改めて3回目のDNA抽出精製を行い、さらにリアルタイムPCRを用いた定性PCR法以降の操作を実施して、判定を行う。3回目のDNA試料液を用いた場合でも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可能とする。

* 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔRn が変動することから、普遍的な Th. Line の設定の数値を示すことが困難である。従って Amplification plot 上でベースライン(3 サイクルから 15 サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. Line を選択する。参考として ABI PRISM™ 7900 及び ABI PRISM™ 7500 とともに 0.2-0.5 の範囲であると考えられる。

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 のリアルタイム PCR を用いた定性 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 *²500 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 *⁵85 µL を加え、MULTI-BEADS SHOCKER にセットし 1500 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 *⁶400 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 及び 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取り除くため、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、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℃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 分間スピンドアウンすることで、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 μ L、ポアサイズ 0.45 μ L 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

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(3サイクルから15サイクル)の ΔR_n 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Th. Lineを選択する*。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、他の粒の粉碎物のコンタミネーションが起きていると判断し、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、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。

* 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔRn が変動することから、普遍的な Th. Line の設定の数値を示すことが困難である。従って Amplification plot 上でベースライン(3 サイクルから 15 サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. Line を選択する。参考として ABI PRISM™ 7900 及び ABI PRISM™ 7500 とともに 0.2-0.5 の範囲であると考えられる。