

亜麻(FP967)の暫定検査法

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並行でDNAを抽出し、各抽出DNA試料液を用いてリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施する。なお、亜麻穀粒の検体採取及び粉砕に関しては「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砕と同様に行う。

1. 亜麻穀粒からの DNA の抽出精製

粉砕試料 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℃で 1 時間保温する。さらにG2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K^{*3}200 μ L、及び、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℃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 x g、4℃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 x g、4℃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℃に加温した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 x g、4℃で 15 分間遠心し、上清を廃棄した後 70%エタノール 500 μ Lを添加し、10回転倒混和する。12,000 x g、4℃で 3 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿物を適度に乾燥させる。溶出2の遠沈管にあらかじめ 60℃に加温した水 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、及び、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Nippon Gene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Qiagen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Qiagen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℃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 x g、4℃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。

2.リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

FP967 の検出は GM 亜麻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。

GM 亜麻検知用として、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。各プライマーは水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

GM亜麻検知用プライマー対、及び、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、及び、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 リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7900)

2.1.1 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、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、ABI PRISM 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 GM 亜麻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、及び、シーリングアプリケーションャー

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。

*4 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。

2.1.2 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、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、NOST-Spec、SAD とともに 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。

2.1.3 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℃、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秒間、60℃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。

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

2.2.1 PCR用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.4 μL 、対象プローブ溶液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.25 μL を混合し、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。各DNA 試料液あたり GM 亜麻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、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。

2.2.2 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、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、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。

2.2.3 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℃、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秒間、60℃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

GM亜麻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、及び、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(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Threshold line (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。各DNA試料液において亜麻陽性対照用試験で43未満のCt値が得られ、かつGM亜麻検知用試験で43未満のCt値が得られたウェルがある場合に、FP967陽性と判定する。亜麻陽性対照用試験で43未満のCt値が得られ、GM亜麻検知用試験で43未満のCt値が得られない場合は、FP967陰性と判定する。なお、2つのDNA試料液での結果が異なった場合は陽性と判定する。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43未満のCt値が得られないDNA試料液については、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43未満のCt値が得られない場合には、そのDNA試料液の測定結果を無効とし、43未満のCt値が得られたDNA試料液の結果だけで判定する。2つのDNA試料液ともに亜麻陽性対照用試験で43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亜麻陽性対照用試験で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。

* 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ともに0.2-0.5の範囲であると考えられる。