

(別添)

遺伝子組換え農作物の種子及び苗の検査方法

目次

栽培用イネ種子における遺伝子組換え体の検査方法	1
栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査方法.....	6
栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	12
栽培用ケンタッキーブルーグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	17
栽培用トールフェスク種子における遺伝子組換え体の検査方法	22
栽培用ダイズ種子における遺伝子組換えダイズの検査方法 (MON87701)	27
栽培用トマト種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	32
栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査方法	37
栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1)	44
栽培用パパイヤ苗 (葉) における遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1)	52
栽培用ペチュニア種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	55
栽培用ペポカボチャ種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	60
栽培用ワタ種子における遺伝子組換え体の検査方法	65
リアルタイム PCR アレイ法 分析プロトコル.....	70
検査方法の同等性確認方法.....	74

栽培用イネ種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法はイネの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉砕物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したイネ種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取し、表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は、超純水で10回洗浄後、38℃で18時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に38℃で乾燥後、フードミル（ミルサーIFM-750G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復*¹で実施する。

種子粉砕物 1 g^{*2}をポリエチレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液1.6 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 µL、Proteinase K (20 mg/mL) 40 µL、 α -Amylase (20 mg/mL) 4 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65℃で15分間静置する。GE 2-K 緩衝液200 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。氷上で5分静置後、スイング式遠心分離機又はアングルロータにより4,000×g、室温で10分間遠心分離する。上清 1 mLを1.5mL容チューブに分取し、遠心分離機により13,000×g以上、室温で5分間遠心分離する。上清800 µLを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB 3 緩衝液300 µL及びイソプロピルアルコール 300 µLを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 µLを加え、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。Spin columnを新たな1.5 mL

容チューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え、室温で3分間静置する。遠心分離機により13,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

*¹ 2反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*² 種子粉碎物が1 gに満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A_{260}/A_{280})。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

*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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、 -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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISMTM 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・TiプラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、イネの*phospholipase D*遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「PLD」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」

TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3'
TAMRA

③ イネ内在性遺伝子検知プライマー対・プローブ「PLD」

PLD3959F : 5' - GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT - 3'

PLD4038R : 5' - CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA - 3'

PLD-P : FAM 5' - TGAGTATGAACCTGCAGGTCGC - 3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 µL / ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix*¹12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µmol/L）各0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.5 µL、滅菌蒸留水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する*²。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、専用のシーリング用アプリーケーターを用い、注意深く行う。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。

*¹ TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*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 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-ウェル Reaction Plate（Life Technologies 社）及び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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad（Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50°C で 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。次に、95°C ・ 15 秒間保持後 60°C ・ 1 分間保持を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 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 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 点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合は農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査方法

本検査方法は栽培用のクリーピングベントグラスの種子を対象とする。GenCheck（ファスマック社）を用い、1検体から2反復でDNAを抽出する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマーセット及び組換え体由来遺伝子検出用プライマーセットを用いた蛍光LAMPに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。なお、本検査方法は、遺伝子組換え体のスクリーニング検査であることから、遺伝子組換え体陽性と判定した試料は、既存のリアルタイムPCR法を用いた検査方法により確定診断を行う。

1 種子由来DNAの抽出

1.1 種子の粉砕

収去したクリーピングベントグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に1g（表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は2g）を採取し、表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は、超純水で10回洗浄後、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに65℃で乾燥させる。その後、ビーズ式粉砕器（マルチビーズショッカー MB601（安井器械社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの簡易DNA抽出

種子粉砕物1点につき2反復で実施する。

種子粉砕物40mgを1.5 mLチューブに量り取り、GenCheck 400 µLを加える。試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、100℃で10分間加熱する。加熱後すぐに氷上で1分間冷却し、遠心分離機により15,000×g、室温で5分間遠心分離する。上清を回収し、LAMP鑄型とする。

2 蛍光LAMP法

組換え遺伝子検出用及び内在性遺伝子検出用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。蛍光LAMPにはリアルタイムPCR機（Quantstudio5と同等の性能を有する機種）又は蛍光LAMP専用機（GenieII等）*を使用する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマーセット「P35S」及びアグロバクテリウム・TiプラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマーセット「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、クリーピングベントグラスの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマーセット「18S rRNA」を用いる。プライマーセットの塩基配列は以下のとおりである。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマーセット「P35S」

P35S-F3 : 5' - ATT GCG ATAAAG GAAAGG CTA TCG -3'

P35S-B3 : 5' - ACT TCC TTA TAT AGA GGA AGG GTC -3'

P35S-FIP : 5' - GAA GAC GTG GTT GGA ACG TCT TCT TAG TGG TCC CAA AGA
TGG A -3'

P35S-BIP : 5' - GCA AGT GGA TTG ATG TGA TAT CTC CTT GCG AAG GAT AGT
GGG A -3'

P35S-LoopF : 5' - TTT CCA CGA TGC TCC TCG -3'

P35S-LoopB : 5' - CGT AAG GGA TGA CGC ACA -3'

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマーセット「NOS ter」

TNOS-F3 : 5' - CGC GAT AAT TTA TCC TAG TTT G-3'

TNOS-B3 : 5' - CGT TCAAAC ATT TGG CAA T -3'

TNOS-FIP : 5' - GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT TTT TCG CGC TAT ATT TTG
TTT TCT A -3'

TNOS-BIP : 5' - CAT GCT TAA CGT AAT TCA ACA TTT TTG AAT CCT GTT GCC
GGT C -3'

TNOS-LoopF : 5' - GAT TAG AGT CCC GCA ATT ATA C -3'

TNOS-LoopB : 5' - AAA TTA TAT GAT AAT CAT CGC AA -3'

③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマーセット「18S rRNA」

18SrRNA-F3 : 5' - CTC GGC AAC GGA TAT CTC G -3'

18SrRNA-B3 : 5' - TAC CCG ATG AGG GTG TGG -3'

18SrRNA-FIP : 5' - TGG TTC GCG GGA TTC TGC AAT TTC TCG CAT CGA TGA AGA
ACG -3'

18SrRNA-BIP : 5' - AGT CTT TGA ACG CAA GTT GCG CAG CGT GTT TTG CGT GAC
G -3'

18SrRNA-LoopF : 5' - CAC ACC AGG TAT CGC ATT TCG -3'

18SrRNA-LoopB : 5' - CGA GGC CAT TCG GCT GA -3'

*488nmの励起波長において、520nmの蛍光を検出する機種が使用できる。

2.1 LAMP用反応液の調製

LAMP用反応液は、以下の手順により、25 µL/ウェルになるように調製する。なお、調整は氷上で行う。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、Isothermal Master Mix (OptiGene社) 15 µL、1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 0.25µL、0.1mol/L DTT 0.25µL、F3、B3プライマー (20µmol/L) 各 0.25 µL、FIP、BIPプライマー (20µmol/L) 各2.0µL、LoopF、LoopBプライマー (20 µmol/L) 各1.0 µL、滅菌超純水1.0µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、LAMP用の Pre-mix溶液を作製して、各ウェルに23.0 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.0 µLを添加する。LAMPのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する*。操作終了後、ウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、遠心して気泡を取り除く。

* 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 2.0 µL 添加する。

2.2 測定情報の設定

2.2.1 リアルタイム PCR 機を用いた場合の設定

リアルタイム PCR 機を使用する場合は、測定情報を設定する。設定する項目は、測定の初期設定、蛍光色素の特性並びに検体の配置及び種類である。測定の初期設定については、「Experiment type」を「Standard Curve」、「Run mode」を「Standard」とする。蛍光色素の特性は、Reporter は「FAM」、Quencher は「None」、Passive Reference は「None」と設定する。調整したプレートの配置に対応するように検体の配置及び種類（「N」： Non-Template Control、「U」： DNA 試料液）の設定を行う。「Sample Volume」は 25 µL に設定する。

2.2.2 蛍光LAMP専用機を用いた場合の設定

蛍光LAMP専用機を使用する場合は、520nmの蛍光を検出するように設定する。

2.3 LAMP反応

2.3.1 リアルタイム PCR 機を用いた LAMP 反応

64°Cで 30 秒間を 1 サイクルとして、60 サイクルの増幅反応を行い、その後融解曲線解析*を実施する。RUN が終了して解析画面に切り替わったことを確認し、測定結果を解析する。

* 融解曲線解析は各機器の初期設定でよい。

[リアルタイム PCR 機における LAMP 反応の設定例]

増幅反応 64°C 30 秒 60 サイクル[†]

 ↓ Ramp rate 1.6°C/s

融解曲線解析 95°C 15 秒

 ↓ Ramp rate 1.6°C/s

 60°C 1 分

 ↓ Ramp rate 0.15°C/s[†]

 95°C 1 秒

[†] 蛍光データを取得する。

2.3.2 蛍光LAMP専用機を用いたLAMP反応

64°Cで30分間増幅反応を行い、その後会合曲線解析を実施する。RUNが終了していることを確認し、測定結果を解析する。

[蛍光 LAMP 機における LAMP 反応の設定例]

増幅反応 64°C 30 分

 ↓

会合曲線解析 95°C

 ↓ Ramp rate 0.05°C/s

 60°C

3 結果の解析と判定

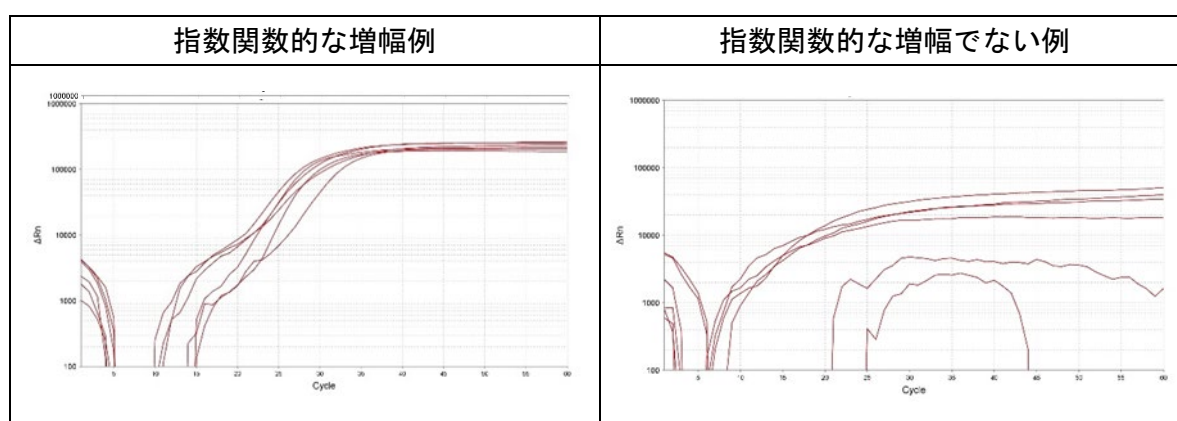
3.1 結果の解析

3.1.1 リアルタイム PCR 機における結果の解析

結果の判定は Amplification plot 上での指数関数的な増幅曲線の確認及び融解曲線解析の結果得られた特異的な増幅反応を示す Tm 値の確認をもって行う。

まず、Amplification Plot において指数関数的な増幅曲線*が認められるかを確認する。指数関数的な増幅が認められた場合、Melting Curve plot において Melting Curve のピーク値 (Tm 値) を確認する。

増幅曲線の指数関数的な増幅が認められた場合において、Tm 値が表の値に近似する場合は特異的な増幅と判定し、近似しない場合は非特異的な増幅と判定する。



3.1.2 蛍光 LAMP 専用機における結果の解析

結果の判定は Amplification 画面での指数関数的な増幅曲線及び Detection Time の確認並びに会合曲線解析の結果得られた特異的な増幅反応を示す Annealing Temperature の確認をもって行う。

まず、Amplification 画面において指数関数的な増幅曲線が認められ、Detection Time が得られるかを確認する。Detection Time が得られた場合、Anneal 画面において Annealing Temperature を確認する。

増幅曲線及び Detection Time により指数関数的な増幅が認められた場合において、Annealing Temperature が表の値に近似する場合は特異的な増幅と判定し、近似しない場合は非特異的な増幅と判定する。

表 Quantstudio5 における Tm 値 (Annealing Temperature) の基準値

検出対象	Tm 値 (Annealing Temperature) *
組換え遺伝子検知「P35S」	87.24°C
組換え遺伝子検知「NOS ter」	80.93°C
内在性遺伝子検知「18SrRNA」	91.25°C

* Tm 値 (Annealing Temperature) は、機種ごとに一定の幅 (±7°C) が存在する。

3.2 結果の判定

内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全てのウェルの結果により、スクリーニング検査方法における遺伝子組換え体検出の結果判定を行う。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認された場合には、当該試料は陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により確定診断を実施する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみ全てのウェルで特異的増幅が確認された場合には、当該試料は擬陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により確定診断を実施する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認されなかった場合（指数関数的増幅が確認されなかった場合及び非特異的増幅と判定した場合）には、当該試料は陰性と判定する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、当該試料は擬陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により確定診断を実施する。
- (5) 内在性遺伝子検知試験について全てのウェルで特異的増幅が得られない場合（指数関数的増幅が確認されなかった場合及び非特異的増幅と判定した場合）は、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により判定する。

栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法は栽培用のクリーピングベントグラスの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したクリーピングベントグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に 1 g (表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は 2 g) を採取し、表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は、超純水で 10 回洗浄後、65 °C で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに 65 °C で乾燥させる。その後、ビーズ式粉砕器 (マルチビーズシヨッカー MB601 (安井器械社) 又はその同等品) 等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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 (改訂第 3 版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの DNA 抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 0.2 g を 2 mL チューブに量り取り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 800 µL と、RNase A 8 µL を加え、試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、65 °C で 10 分間加温する。P3 緩衝液を 260 µL 加え、ボルテックスミキサーにより混合した後、氷上で 5 分間静置する。次に、20,000 × g、室温で 5 分間遠心分離し、上清 550 µL を QIAshredder Mini Spin Column に負荷し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離する。溶出液 450 µL を新しい 1.5 mL チューブに移し、AW1 緩衝液・エタノール混液を 625 µL 加え、ピペットで混合する。混合液 500 µL を DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの工程を繰り返し行う。新しい 2 mL のコレクションチューブ (キット付属) にセットした DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 µL を負荷し、20,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。再度、DNeasy Mini

Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 μ L を負荷し、20,000 \times g、室温で 2 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた滅菌蒸留水 100 μ L を加え、5 分間静置した後、20,000 \times g、室温で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 ng/ μ L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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミド NOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS_{ter}」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、クリーピングベントグラスの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAAATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
 TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
 TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
 TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」
 18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'
 18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'
 18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 µL/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 各0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、滅菌超純水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 (Life Technologies 社)、及び、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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、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、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。次いで、95 $^{\circ}$ C・15秒間、60 $^{\circ}$ C・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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 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。

結果の判定には、1検体から得られた全 DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のいずれかのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOSTer」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知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には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ケンタッキーブルーグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法は栽培用のケンタッキーブルーグラスの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したケンタッキーブルーグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、5 g を無作為に採取し、フードミル（ミルサー 700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの DNA 抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 1 g をポリエチレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液 5 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65 $^{\circ}$ C で 15 分間静置する。GE 2-K 緩衝液 625 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより 4,000 \times g、室温で 10 分間遠心分離する。上清 1 mL を 1.5 mL 容サンプルチューブに分取し、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 5 分間遠心分離する。上清 700 μ L を新たな 2.0 mL 容サンプルチューブに分取し、GB 3 緩衝液 260 μ L 及びイソプロピルアルコール 260 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液 600 μ L を Spin column に負荷した後、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの操作を繰り返す。GW 緩衝液 650 μ L を Spin column に負荷し、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin column を新たな 1.5 mL 容サンプルチューブに移し、滅菌蒸留水 50 μ L を加え、室温で 3 分間静置する。遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 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}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びイネアクチン1遺伝子のイントロン領域を検知するプライマー対・プローブ「AINT」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ケンタッキーブルーグラスの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAAATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (AINT) 検知プライマー対・プローブ「AINT」

AINT-F : 5'- TCG TCA GGC TTA GAT GTG CTA GA -3'

AINT-R : 5'- CTG CAT TTG TCA CAAATC ATG AA -3'

AINT-P : FAM 5'- TTT GTG GGT AGAATT TGAATC CCT CAG C -3' TAMRA

- ③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」
18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'
18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'
18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 µL/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 各0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、滅菌超純水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRの blanks 反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションナーを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 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ナー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、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、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。次いで、95 $^{\circ}$ C・15秒間、60 $^{\circ}$ C・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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 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点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「AINT」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知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には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。

- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用トールフェスク種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法は栽培用のトールフェスクの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したトールフェスク種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、2 g (外穎を含む) を収去試料の複数箇所から無作為に採取し、ビーズ式粉砕器 (マルチビーズショッカー MB601 (安井器械社) 又はその同等品) 等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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 (改訂第3版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 0.4 g を 15 mL チューブに量り取り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 1.6 mL と、RNase A 16 µL を加え、試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、65 °C で 10 分間加温する。P3 緩衝液を 520 µL 加え、ボルテックスミキサーにより混合した後、氷上で 5 分間静置する。次に、4,000 × g、室温で 5 分間遠心操作し、上清 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離する。上清 600 µL を QIAshredder Mini Spin Column に負荷し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離する。溶出液 450 µL を新しい 1.5 mL チューブに移し、AW1 緩衝液・エタノール混液を 625 µL 加え、ピペットで混合する。混合液 500 µL を DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの工程を繰り返し行う。新しい 2 mL のコレクションチューブ (キット付属) にセットした DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 µL を負荷し、20,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。再度、DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 µL を負荷し、20,000 × g、室温で 2 分間遠

心分離し、溶出液を捨てる。DNeasy Mini Spin Columnを新しい1.5 mLチューブに移し、あらかじめ65 °Cに温めておいた滅菌蒸留水100 µLを加え、5分間静置した後、20,000 × g、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/µL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/µLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 µLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 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}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミド NOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS_{ter}」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、トールフェスクの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAAATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
 TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
 TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
 TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」
 18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'
 18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'
 18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 µL/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 各0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、滅菌超純水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 (Life Technologies 社)、及び、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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、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、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。次いで、95 $^{\circ}$ C・15秒間、60 $^{\circ}$ C・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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 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点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知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には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ダイズ種子における遺伝子組換えダイズの検査方法（MON87701）

本検査方法は栽培用のダイズの種子を対象とする。DNeasy Plant Maxi kit 又は Genomic-tip 20/G（どちらも QIAGEN 社）を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したダイズ種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取する。表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65 °C で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに 65 °C で乾燥させる。その後、超遠心粉碎機（ZM100（レッチェ社）又はその同等品）やフードミル（ミルサー 700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復*¹で、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（改訂第 3 版）基本操作編」に従い実施する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g*²を採取し、マニュアル基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g*²を採取し、マニュアル基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

*¹ 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*² 種子粉碎物が 1.0 g または 2.0 g に満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を採り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 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}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、MON87701に特異的な遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「MON87701」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ダイズ内在性遺伝子レクチン遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Le1」を用いる。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。

- ① 組換え遺伝子 (MON87701) 検知プライマー対・プローブ「MON87701」
MON87701 2 (forward) 5' -TGGTGATATGAAGATACATGCTTAGCAT-3'
MON87701 1 (reverse) 5' -CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAA-3'
MON87701 (probe) FAM-TCAGTGTGTTGACACACACACTAAGCGTGCC -TAMRA
- ② 内在性遺伝子検知プライマー対・プローブ「Le1」
Le1n02-5' (forward) 5' -GCCCTCTACTCCACCCCA-3'
Le1n02-3' (reverse) 5' -GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'
Le1-Taq (probe) FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3'

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan 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、25 μ mol/L）各0.5 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.5 μ L、滅菌蒸留水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。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。

*1 TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*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2.5 μ L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（Life Technologies社）及び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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad（Life Technologies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。Applied Biosystems 7500及びQuantStudio 5では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50 °Cで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。次に、95 °C・15秒間保持後60 °C・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。

まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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。

結果の判定には、1検体から得られた全 DNA 試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで43未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで43未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が

試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用トマト種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法はトマトの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブは、カリフラワーモザイクウイルス 35S 検知用、アグロバクテリウム・Ti プラスミド NOS ter 検知用及びカナマイシン抵抗性 NPT II 検知用を用いる。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉砕物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したトマト種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取し、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65°C で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に 65°C で乾燥後、フードミル (ミルサー 700G (イワタニ社) 又はその同等品) 等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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 (改訂第 3 版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの DNA 抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復*1 で実施する。

種子粉砕物 1 g*2 をポリエチレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、GE 1 緩衝液 4 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 µL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 µL を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65°C で 15 分間静置する。GE 2-K 緩衝液 500 µL を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより 4,000 × g、室温で 10 分間遠心分離する。上清 1 mL を 1.5 mL 容チューブに分取し、遠心分離機により 13,000 × g 以上、室温で 5 分間遠心分離する。上清 400 µL を新たな 1.5 mL 容チューブに分取し、GB 3 緩衝液 150 µL 及びイソプロピルアルコール 150 µL を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液全量を Spin column に負荷した後、遠心分離機により 13,000 × g 以上、室温で 1 分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column に GW 緩衝液 650 µL を加え、遠心分離機により 13,000 × g 以上、室温で 1 分間遠心分離す

る。Spin columnを新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え、室温で3分間静置する。遠心分離機により13,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

*¹ 2反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*² 種子粉碎物が1gに満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する(A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

*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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」、アグロバクテリウム・TiプラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」及びカナマイシン抵抗性NPT II遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NPT II」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、トマトのLAT52遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Lat1、Lat2及びLP」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3'
TAMRA
- ③ 組換え遺伝子 (NPT II) 検知プライマー対・プローブ「NPT II」
NPT II -F : 5' - GAC AGG TCG GTC TTG ACAAAAAG -3'
NPT II -R : 5' - GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC -3'
NPT II -P : FAM 5' - CCC TGC GCT GAC AGC CGG A -3' TAMRA
- ④ トマト内在性遺伝子 (LAT52) 検知プライマー対・プローブ
「Lat1、Lat2 及び LP」
Lat1 (F) : 5'- AGA CCA CGA GAA CGA TAT TTG C -3'
Lat2 (R) : 5'- TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA -3'
LP (P) : FAM 5'- CTC TTT GCA GTC CTC CCT TGG GCT -3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 µL / ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µmol/L）各0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.5 µL、滅菌蒸留水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 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アケーター

MicroAmp Optical 96-ウェル Reaction Plate (Life Technologies 社)及び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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μL に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50°Cで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。次に、95°C・30秒間保持後60°C・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 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点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及

び組換え遺伝子検知試験の結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、各組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、下表により当該試料の判定を行う。

表：組換え遺伝子検知試験の結果による判定基準

判定	陽性	陽性	要協議	陽性	要協議	要協議	要協議	陰性
P35S	+	+	+	-	-	-	+	-
NOS ter	+	+	-	-	+	+	-	-
NPT II	+	-	+	+	+	-	-	-

+: Ct 値 43 未満 -: Ct 値 43 以上 要協議：農産安全管理課と協議

- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」、「NOS ter」及び「NPT II」の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」、「NOS ter」及び「NPT II」の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合は農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査方法

本検査方法はパパイヤの種子を対象とする。GM quicker2 (NIPPON GENE 社) を用い、1検体から2反復でDNAを抽出する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマーセット及び組換え体由来遺伝子検出用プライマーセットを用いたLAMP法に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。なお、本検査方法は、遺伝子組換え体のスクリーニング検査であることから、遺伝子組換え体陽性と判定した試料は、既存のリアルタイムPCR法を用いた検査方法により確定診断を行う。

1 種子由来DNAの抽出・精製

種子の粉碎については、「栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体の検査方法」の「1 種子由来DNAの抽出・精製」に従う。得られた種子粉碎物からのDNA抽出・精製法については、以下の通り行う。

種子粉碎物 100 mg を量り採った 1.5 mL 容チューブへ、GE1 緩衝液^{※1} 800 μ L、RNase A^{※1} 10 μ L、Proteinase K^{※1} 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65 $^{\circ}$ C で 15 分間静置する。GE2-K 緩衝液^{※1} 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 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心分離する。上清 550 μ L^{※2} を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心分離する。

上清 500 μ L^{※3} を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液^{※1} 185 μ L 及びイソプロパノール 185 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。

混合液 650 μ L を Spin column^{※1} に負荷した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 30 秒間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液全量を負荷するまでこの操作を繰り返す。

次いで GW 緩衝液^{※1} 650 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 1 分間遠心分離し、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 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

※1 GE1 緩衝液、RNase A、Proteinase K、GE2-K 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、Spin column は、GM quicker2 (NIPPON GENE 社) に付属のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

※2 上清 550 μ L 以上を得ることが難しい場合、可能な限り多くを回収する。多少の沈殿物や浮遊物が混ざっていても問題は無い。

※3 上清が 500 μ L に満たない場合、以降の GB3 とイソプロパノールは (回収量 \times 0.37) μ L を添加することとする。

2 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

2.1 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認

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^{※4}し、200~320 nm の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm 及び 280 nm の吸光度を記録する。次いで 260 nm の吸光度 1.0 を 50 ng/μL DNA として、DNA 濃度を算出する。また 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比を計算する (A260/A280)。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。

※4 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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

2.2 DNA 試料液の調製及び保存

純度を確認した DNA 試料原液を滅菌蒸留水で希釈して 50 ng/μL に調製し、DNA 試料液とする。

使用前に 95-100°C で 10 分間熱変性し、氷につけて急冷後、スピンドウンしたものを鋳型として用いる。

DNA 試料液は 20 μL ごとにマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が 50 ng/μL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

3 LAMP 反応

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。LAMP 反応にはリアルタイム PCR 機 (QuantStudio® 5 と同等の性能を有する機種) 又は蛍光 LAMP 専用機 (Genie II 等) を使用する。

組換え遺伝子検知用として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター遺伝子由来配列(以下、「P35S」という。)を検知するプライマーセット「P35S」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用として、パパイヤの Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマーセット「Chy」を用いる。プライマーセットの塩基配列は以下のとおりである。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマーセット「P35S」

P35S-F3 : 5'- ATT GCG ATA AAG GAA AGG C(C/T)A TCG -3'

P35S-B3 : 5'- ACT TCC TTA TAT AGA GGA AGG GTC -3'

P35S-FIP : 5'- GAA GAC GTG GTT GGA ACG TCT TCT TAG TGG TCC CAA AGA
TGG A -3'

P35S-BIP : 5'- GCA AGT GGA TTG ATG TGA TAT CTC CTT GCG AAG GAT AGT
GGG A -3'

P35S-LoopF : 5'- TTT CCA CGA TGC TCC TCG -3'

P35S-LoopB : 5'- CGT AAG GGA TGA CGC ACA -3'

② 内在性遺伝子 (Chy) 検知プライマーセット「Chy」

Chy-F3 : 5'- TCT ACA ATC TTG CTA ACC CT -3'

Chy-B3 : 5'- AGT CAT CTT GAG AAT AAC CCA C -3'

Chy-FIP : 5'- TGG ATG AAG GGAAAT GGG AGG AGC AAG TAG AGT GAA TGA
CAA GA -3'

Chy-BIP: 5'- CCA CTC TTG AGA GTT AGC TAG TAT GAG ACA TGT TGC CAA
GAA -3'

Chy-LoopF: 5'- CGC ATG GGT TTA TAT ACT AGC -3'

Chy-LoopB: 5'- ACAATG GCT ACG ATG AGT TCA -3'

3.1 LAMP 用反応液の調製

LAMP 用反応液は、以下の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は表 1 のとおりである。Isothermal Master Mix (OptiGene 社) ^{※5} 15.0 μ L、10 \times プライマーミックス 2.5 μ L に滅菌超純水を加えて 23.0 μ L に調製する。10 \times プライマーミックスは各プライマー100 μ M (100 pmol/ μ L) の溶液を混合して調製する。組成は表 2 および表 3 のとおり、P35S と Chy の FIP および BIP プライマーの濃度が異なるので注意する。

これらを試験点数に応じて必要量混合し、各ウェルに分注後、各 DNA 試料液 2.0 μ L を添加する。LAMP のブランク反応液として DNA 試料液の代わりに TE 溶液^{※7} を 2.0 μ L 添加したものも同時に調製する^{※6}。

分注後のチューブ等については、卓上遠心機等でスピンドウンしてからセットすることが望ましい。

^{※5} Isothermal Master Mix for Genie[®] III として (株) ニッポンジーンより入手可

^{※6} Non-Template Control (NTC)

^{※7} TE 溶液は、GM quicker2 (NIPPON GENE 社) に付属のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

表 1 LAMP反応液組成

	濃度	1テスト容量 (μ L)
Isothermal Master Mix		15.0
10 \times プライマーミックス	10 \times	2.5
DNA試料液	50 ng/ μ L	2.0 (total 100 ng)
滅菌超純水		5.5
Total		25.0

表2 カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (P35S) 用10 X プライマーミックスの組成

	1テスト容量 (μl)	100テスト容量 (μl)
100 μM FIP	0.8	80.0
100 μM BIP	0.8	80.0
100 μM F3	0.05	5.0
100 μM B3	0.05	5.0
100 μM LF	0.2	20.0
100 μM LB	0.2	20.0
H ₂ O	0.35	35.0
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.025	2.5
0.1 M DTT	0.025	2.5
Total	2.5	250.0

表3 Chymopapain (Chy) 遺伝子用10 X プライマーミックスの組成

	1テスト容量 (μl)	100テスト容量 (μl)
100 μM FIP	0.4	40.0
100 μM BIP	0.4	40.0
100 μM F3	0.05	5.0
100 μM B3	0.05	5.0
100 μM LF	0.2	20.0
100 μM LB	0.2	20.0
H ₂ O	1.15	115.0
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.025	2.5
0.1 M DTT	0.025	2.5
Total	2.5	250.0

3.2 測定情報の設定

3.2.1 蛍光 LAMP 専用機を用いた場合の設定

蛍光 LAMP 専用機を使用する場合は、機器のデフォルトの設定で使用する。

3.2.2 リアルタイム PCR 機を用いた場合の設定

リアルタイム PCR 機を使用する場合は、測定情報を設定する。設定する項目は、測定の初期設定、蛍光色素の特性並びに検体の配置及び種類である。

QuantStudio® 5 における測定の初期設定については、「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「Other」、「Run mode」を「Standard」とする。蛍光色素の特性は、Reporter は「FAM」、Quencher は「None」、Passive Reference は「None」と設定する。

調製したプレートの配置に対応するように検体の配置及び種類（「N」：Non-Template Control、「U」：DNA 試料液）の設定を行う。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

3.3 LAMP 増幅

3.3.1 蛍光 LAMP 専用機を用いた LAMP 反応

装置にチューブをセットし、反応を開始する。反応条件は 65 $^{\circ}$ C、30 分間の条件で設定する。LAMP 反応終了後、会合曲線解析を実施する。会合曲線解析が終了し、ヒートブロックの温度が下がっていることを確認し、結果の解析を行う。

〔蛍光 LAMP 機における LAMP 反応の設定例〕

増幅反応 65 $^{\circ}$ C 30 分

↓

会合曲線解析 98 $^{\circ}$ C

↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定

80 $^{\circ}$ C

3.3.2 リアルタイム PCR 機を用いた LAMP 反応

65 $^{\circ}$ Cで 30 分間（機器設定例は 65 $^{\circ}$ Cで 30 秒間を 1 サイクルとして、60 サイクル）の増幅反応を行い、その後融解曲線解析*を実施する。RUN が終了して解析画面に切り替わったことを確認し、測定結果を解析する。

* 融解曲線解析は各機器の初期設定でよい。

〔リアルタイム PCR 機における LAMP 反応の設定例〕

増幅反応 65 $^{\circ}$ C 30 秒 60 サイクル†

↓ Ramp rate 1.6 $^{\circ}$ C/s

融解曲線解析 98 $^{\circ}$ C

↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定

80 $^{\circ}$ C

↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定

98 $^{\circ}$ C

† 蛍光データを取得する。

4 結果の解析と判定

4.1 結果の解析

4.1.1 蛍光 LAMP 専用機における結果の解析

結果の判定は Amplification 画面上での指数関数的な明確な増幅曲線の有無をもって確認する。設定画面の Amplification Rate の Threshold を 0.015 に設定する。Amplification 画面上で「Chy」から増幅があり、さらに「P35S」において、目視で指数関数的な増幅曲線が確認され、Peaks に増幅時間が表示された場合には、遺伝子組換えパパイヤ陽性を疑う。

4.1.2 リアルタイム PCR 機における結果の解析

結果の判定は Amplification plot 上での指数関数的な増幅曲線の確認及び融解曲線解析の結果得られた特異的な増幅反応を示す Tm 値の確認をもって行う。

まず、Amplification Plot において指数関数的な増幅曲線^{※8}が認められるかを確認する。指数関数的な増幅が認められた場合、Melting Curve plot において Melting Curve のピーク値 (Tm 値) を確認する。

増幅曲線の指数関数的な増幅が認められた場合において、Tm 値が表の値に近似する場合は特異的増幅と判定し、近似しない場合は非特異的増幅と判定する。

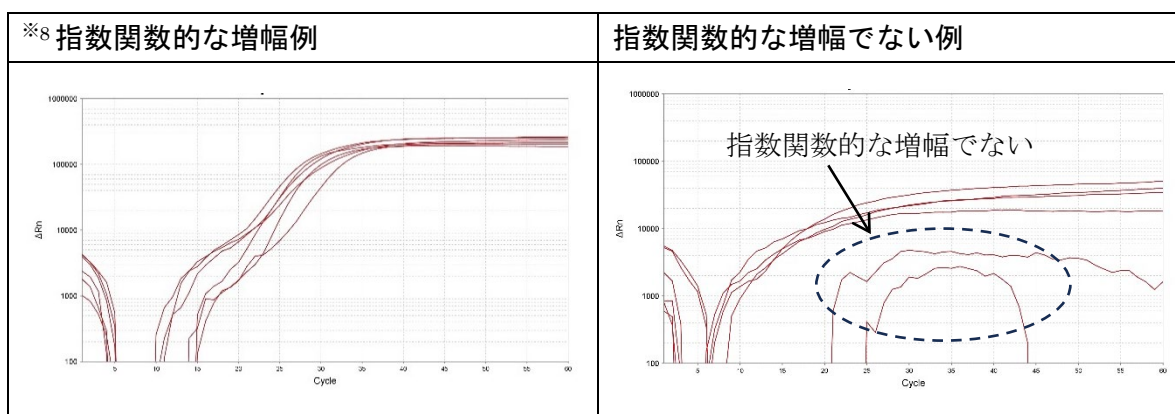


表 QuantStudio® 5 における Tm 値 (Annealing Temperature) の基準値

検出対象	Tm 値 (Annealing Temperature) ^{※9}
組換え遺伝子検知「P35S」	86.14 °C
内在性遺伝子検知「Chy」	83.45 °C

^{※9} Tm 値 (Annealing Temperature) は、機種ごとに一定の幅 (±7 °C) が存在する。

4.2 結果の判定

内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果により、スクリーニング検査方法における遺伝子組換え体検出の結果判定を行う。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数的増幅が確認された場合には、当該試料は陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により確定診断を実施する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認されなかった場合には、当該試料は陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、当該試料は擬陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により確定診断を実施する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について全てのウェルで指数関数的増幅が得られない場合（指数関数的増幅が確認されなかった場合及び非特異的増幅と判定した場合）は、リアルタイム PCR 法を用いた検査方法により判定する。

栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換えパパイヤの検査方法
(PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1)

本検査方法はパパイヤの種子を対象とする。GM quicker2 (NIPPON GENE 社) を用い、種子粉砕物 1 点につき 1 又は 2 点の DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤ系統の含有の有無を判定する。組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブは、カリフラワーモザイクウイルス 35S 検知用に加え、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知用、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知用、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知用及び遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知用を用いる。

なお、栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査方法の判定により、確定診断等を実施する場合は、当該スクリーニング検査方法で得られた DNA 試料原液等を用いて「2.2 DNA 試料液の調製及び保存」より実施してよい。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したパパイヤ種子から、破砕粒や他の混入物を取り除き、表面にゼリー状の皮膜等の付着物がないことを確認し、無作為に必要な粒数の種子を採取し、1%SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に65℃で乾燥する。余った種子は冷蔵保管する。

(1) 種子数が10粒未満の場合

滅菌済みのピンセットを用い、乾燥した種子を3粒ずつ¹、クリーンベンチ内で30分以上UV照射し滅菌した厚手のビニル袋²に入れ、常温で、ビニル袋の上から、乳棒等を用い、平らに押し潰した後、磨砕する。磨り潰した試料にGE1緩衝液800 µLを加え、マイクロピペットを用いて混合し、全量を1.5 mL容チューブに移し、速やかに「1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製」のRNase A 10 µLの添加以降の操作に移行する。

上記により、分析試料は、乾燥後の種子数が1～3粒以下の場合は1点、4～6粒以下の場合は2点、7～9粒の場合は3点得られる。

¹ 分析に供する種子が3粒、6粒又は9粒に満たない場合、非遺伝子組換えパパイヤであることが明らかな種子を補いそれぞれ3粒、6粒又は9粒とすること。

² 試料磨砕用厚手袋 (ヨーポリ袋) 大洋社 アズワン、品番: 6-631-01 (75 mm × 130 mm × 0.1 mm) と同等のものを用いる。

(2) 種子数が10粒以上の場合

滅菌済みのピンセットを用い、乾燥した種子を粉碎容器に移す。種子数が10~100粒の場合は、ステンレスビーズ等とともに、50 mL容チューブに入れ、シェイクマスター (BMS社)¹等を用い、種子を粉碎する。ビーズを取り除いた後、滅菌済の葉さじで壁面についた種子粉碎物を底に集め、ボルテックスミキサーでよく攪拌し分析試料とする。種子数が100粒以上の場合は、シェイクマスターにより複数回に分けて粉碎し混合するか、フードミル (ミルサー700G (イワタニ社) 又はその同等品) 等を用い、種子を粉碎する。

上記により、種子粉碎物が1点得られる。なお、種子粉碎物の全量が100 mgに満たない場合、全量を「1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製」以降の操作に供する。

¹ シェイクマスター (BMS) がいない場合は、乳棒やフードミル (ミルサー700G (イワタニ社) 又はその同等品) 等、同等の粉碎方法を用いること。その際、試料を均質化するため、粉碎した試料を一度、葉包紙の上に取り、50 mL容チューブに入れ、ボルテックスミキサーで混合すること。なお、シェイクマスター (BMS) を使用する場合は、15 mmステンレスビーズ1個を用い、600 rpmで2分間、次いで1,000 rpmで30秒間の処理又は20 mmジルコニアビーズ1個及び10 mmジルコニアビーズ1個を用い、1,000 rpmで1分間の処理により粉碎可能であることを確認している。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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 (改訂第3版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製

1.1 の (1) で得られた種子粉碎物については、RNase A の添加以降の操作に供し、1点につき DNA 抽出物 1 点を得る。

1.1 の (2) で得られた種子粉碎物については、全量が 200 mg 以上の場合は 1 点につき DNA 抽出物 2 点を、200 mg に満たない場合は 1 点につき DNA 抽出物 1 点を得る。

種子粉碎物 100 mg を 1.5 mL 容チューブに量り採り、GE 1 緩衝液 800 μ L、RNase A 10 μ L、Proteinase K 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65 $^{\circ}$ C で 15 分間静置する。GE 2-K 緩衝液 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 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心分離する。上清 550 μ L を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心分離する。上清を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、GB 3 緩衝液 200 μ L 及びイソプロパノール 200 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液 650 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 秒間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液全量を負荷するまでこ

の操作を繰り返す。次いで GW 緩衝液 650 μL を負荷し、13,000 $\times g$ 以上、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 1 分間遠心分離し、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 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液 とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A_{260}/A_{280})。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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μL に調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 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 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

(1) 一次検査

内在性遺伝子検知用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Chy」を、組換え遺伝子検知用として、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

(2) 二次検査

一次検査で遺伝子組換えパパイヤであると判定した場合、二次検査により、遺伝子組換えパパイヤの系統を判定するため、系統特異的な遺伝子を検知する。二次検査で検知対象とする系統は以下の 4 系統及び内在性遺伝子検知用プライマー対・プローブ「Chy」とする。

①組換え遺伝子(PRSV-YK)検知用として、パパイヤリングスポットウイルスYK株の膜タンパク質 (PRSV-cp)の遺伝子配列の境界領域を検知するプライマー対・プローブを 2 種類 (「YK-1」、「YK-2」)、

- ②組換え遺伝子(PRSV-SC)検知用として、パパイヤリングスポットウイルス膜タンパク質 (PRSV-cp)の遺伝子配列の境界領域を検知するプライマー対・プローブ「SC」
- ③組換え遺伝子(PRSV-HN)検知用として、遺伝子組換えパパイヤHuanong No.1に導入されたDNA配列とパパイヤゲノムの境界領域を検知するプライマー対・プローブ「HN」、
- ④承認済み組換え遺伝子 (55-1) 検知用として、パパイヤゲノム配列と遺伝子組換えパパイヤ55-1に導入された遺伝子発現用プラスミド・ベクターの境界領域を検知するプライマー対・プローブ「55-1」、
- を用いる。

(3) プライマー対・プローブの塩基配列

(1)、(2) で利用するプライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおり。

- ① 組換え遺伝子(PRSV-YK)検知用プライマー対・プローブ
- ア 「YK-1」
- YK-1F : 5'-GAT CCC CGG GTG GTC AGT -3'
- YK-1R : 5'-CCG GTA TCC ACA GCT TCA TTT T -3'
- YK-P : 5'-FAM- AGA CGC CAT GGA AGG-MGB-3'
- イ 「YK-2」
- 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'
- ② 遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-SC)検知用プライマー対・プローブ「SC」
- SC-F : 5' -CAT TTC ATT TGG AGA GAA CAC G -3'
- SC-R : 5' -ACC AGC ATC CAC AGC TTC -3'
- SC-P : 5' -FAM- ACT CTA GAG GAT CCA TGT CCA A-TAMRA-3'
- ③ 組換え遺伝子(PRSV-HN)検知用プライマー対・プローブ「HN」
- HN-F : 5'-GAC GAG TAC AAG GAG ACG CC-3'
- HN-R : 5'-GTT GTC ACT GAA GCG GGA AG-3'
- HN-P : 5'-FAM-TGG CTG CTA TTG GGC GAA TCA ACT AC-BHQ1-3'
- ④ 遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用プライマー対及びプローブ
- PRSV-cp F: 5'-CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3'
- PRSV-cp R: 5'-TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3'
- PRSV-cp P: 5'-FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCAACAAT-TAMRA-3'
- ⑤ 組換え遺伝子 (CaM) 検知用プライマー対・プローブ「CaM」
- 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
- ⑥ 内在性遺伝子検知用プライマー対・プローブ「Chy」
- 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(new): 5'-FAM-TTC CCT TCA TCC ATT CCC ACT CTT GAG A-TAMRA-3'

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 µL/ウェルになるように調製する。1ウェル当たりの試薬の分量は次のとおりである。TaqMan Gene Expression 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、滅菌蒸留水8.95 µL。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCRの遺伝子組換えパパイヤ陽性対照反応液として陽性コントロールプラスミド^{*3}を加えたものを1ウェル分同時に調製する。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、専用のシーリング用アプリーケーターを用い、注意深く行う。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。

^{*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。不十分であれば、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、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 2.5 µL 添加する。

^{*3} GM パパイヤ系統別 DNA PRSV HN 陽性コントロールプラスミド（ニッポンジーン社）等を使用する。

^{*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（Life Technologies 社）及び 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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad（Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」を「FAM」に設定する。「Quencher」については、「YK-1」及び「HN」は「Non Fluorescent」、その他のプローブは「TAMRA」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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。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 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用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。

組換え遺伝子検知用について目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1又はそれ以外)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Threshold line (Th. line)を選択する*¹。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

ただし、NTCについて何れかのウェルでCt値が得られた場合、又は、陽性対照反応液について何れかのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、再度、定性PCRに供する。

*¹ 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔR_n 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。特段の問題がない限り、Th.lineは0.2を指定し、必要に応じ変更する。

判定の手順は以下のとおり。

(1) 一次検査

- ①内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子 (CaM) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定し、(2) 二次検査を実施する。
- ②内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子 (CaM) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陰性と判定する。
- ③内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子 (CaM) 検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合は農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- ④内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、農産安全管理課に報告する。

(2) 二次検査 (系統判定)

(1) 一次検査で遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定された場合は、二次検査を行い、以下の手順で系統を判定する。

- ①内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は PRSV-YK 陽性と判定する。
- ②内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は PRSV-SC 陽性と判定する。
- ③内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は PRSV-HN 陽性と判定する。
- ④内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は 55-1 陽性と判定する。

- ⑤内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 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、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知試験、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知試験および遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN 及び 55-1) 以外の遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- ⑥内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、かつ、各系統の検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、農産安全管理課に報告する。

栽培用パパイヤ苗（葉）における遺伝子組換えパパイヤの検査方法
（PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1）

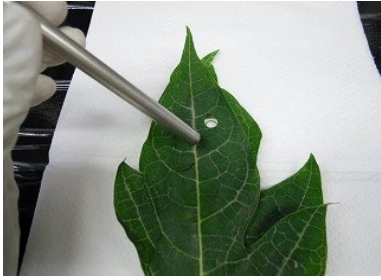
本検査方法はパパイヤの葉を対象とする。1検体から葉粉碎物1点調製し、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社）を用い、葉粉碎物1点につき1～3点、DNAを抽出・精製する。1検体の葉粉碎物が、150 mg 以上の場合は50 mgを3点、150mg未満100 mg 以上の場合は50 mgを2点、100 mg未満50 mg 以上の場合は50 mgを1点、50 mg未満の場合は全量を1点得る。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイムPCRに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤの含有の有無を判定する。

1 葉由来 DNA の抽出・精製

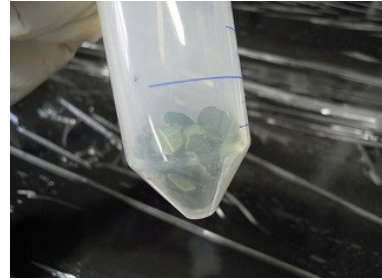
1.1 試料の粉碎

収去したパパイヤ葉から、口径（外径）12.5 mm のコルクボーラーでくりぬいた切片を分析試料とする。分析試料は、滅菌蒸留水を満たした50 mL容チューブに入れ、ボルテックスミキサーを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。試料をキムタオル上に均一に広げ、65℃に設定した乾燥機で3時間乾燥させる。試料が粉状になるまで乳棒又は粉碎機^{*1}でよく粉碎する。粉碎した試料50 mgを2 mL容チューブに1～3点量り採り、あらかじめ65℃に温めておいたAP1緩衝液500 µLを加え、1.2の「DNA抽出」に供する。残った試料については、-20℃以下で保存する。なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

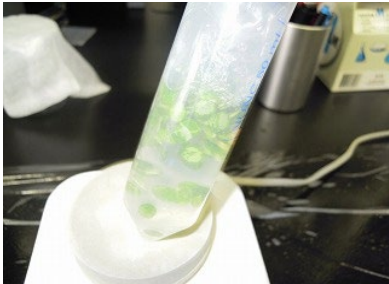
^{*1}シェイクマスター（BMS）を使用する場合は、15 mm ステンレスビーズ1個を用い800 rpmで1分間の処理又は10 mm ジルコニアビーズ3個を用い1,000 rpmで1分間の処理により粉碎可能であることを確認している。



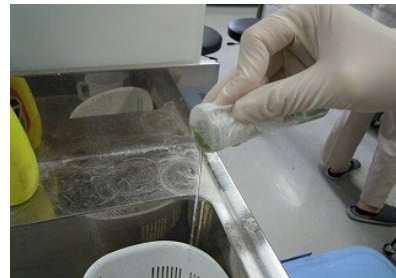
①コルクボーラーで葉をくり抜く



②50 mL 容チューブに入れ滅菌蒸留水で洗浄



③ボルテックスミキサーでよく洗浄する



④ガーゼ・水切りネット等を利用し滅菌蒸留水を捨て、3回洗浄する



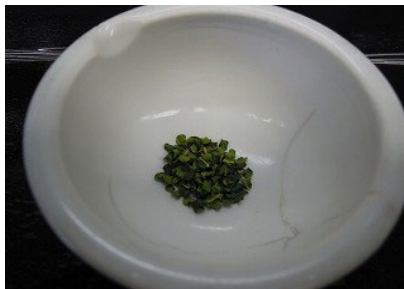
⑤65°Cで3時間乾燥させる



⑥3時間後の葉の様子



⑦粉碎机又は乳鉢を用いて粉碎・混合する



⑧粉碎物を薬包紙に移す



⑨50 mg を 2.0 mL 容チューブに量り採る

1.2 DNA 抽出

1.1 の「試料の粉砕」において AP1 緩衝液を 500 μL 加えられた粉砕試料に、RNase A を 5 μL 加え、ボルテックスミキサーで激しく混合し、65 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分加温する。P3 緩衝液 162 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌する。氷上に 15 分間静置後、10,000 $\times g$ 以上、15 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 10 分間遠心分離する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 4 分間遠心分離後、溶出液を 1.5 mL 容チューブに移す。その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液エタノール混液を加える。混合液 600 μL を DNeasy Mini spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次に AW2 緩衝液エタノール混液 500 μL を負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、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、DNeasy Mini spin column を乾燥させるため、10,000 $\times g$ 以上で 20 分間遠心分離する。DNeasy Mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65 $^{\circ}\text{C}$ に温めておいた滅菌蒸留水 50 μL を加え 5 分間静置した後、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液 とする。DNA 試料原液は -20°C 以下で冷凍保存する。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

以降の操作は、「栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN、55-1)」を、「種子」と記載されている部分を「葉」に読み替えた上でこれに従う。

栽培用ペチュニア種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法はペチュニアの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたりアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したペチュニア種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がなことを確認した後、無作為に0.5 g (表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は 1 g) を採取し、表面に種子コーティング又は薬剤処理が施されている場合は、超純水で10回洗浄後、38°Cで18時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に38°Cで乾燥後、ビーズ式粉碎器 (マルチビーズショッカー MB601 (安井器械社) 又はその同等品) 等を用い、粉碎する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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 (改訂第3版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉碎物0.05 gを1.5 mLチューブに量り採り、あらかじめ65 °Cに温めておいたAP1緩衝液400 μ LとRNase A溶液4 μ Lを加え、試料液中に塊がなくなるまで混合し、65 °Cで10分間加温する。加温後、P3緩衝液を130 μ L加えて混合し、氷上に5分間静置する。次に20,000 \times g、室温で5分間遠心した後、沈殿物や浮遊物を避けつつ上清を分取し、QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) に負荷し、20,000 \times gで2分間遠心する。ペレット化した細胞破片が剥がれないようにして、コレクションチューブ内の溶出液450 μ Lを新しい1.5 mLチューブに取った後、得られた溶出液にAW1緩衝液・エタノール混合液675 μ Lを加え、ピペットで混合する。混合液500 μ LをDNeasy Mini Spin Columnに移し、6,000 \times gで1分間遠心した後、溶出液を捨てる。1.5mLチューブ内の溶出液が全て無くなるまでこの工程を繰り返し行う。次に、新しい2 mLコレクションチューブ (キット添付) にセットしたDNeasy Mini Spin ColumnにAW2緩衝液・エタノール

混合液500 μ Lを負荷し、20,000 \times gで1分間遠心し、溶出液を捨てる。再度AW2 緩衝液・エタノール混合液500 μ Lを負荷した後、20,000 \times gで2分間遠心し、DNeasy Mini Spin Columnのメンブレンを乾燥させる。DNeasy Mini Spin Columnを新しい1.5 mLチューブに移し、予め65 $^{\circ}$ Cに温めておいた滅菌蒸留水100 μ Lを加え、5分間静置した後、20,000 \times gで1分間遠心する。得られた溶出液（約100 μ L）をDNA試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する（A₂₆₀/A₂₈₀）。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

^{*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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。

3 リアルタイムPCR（ABI PRISM™ 7900HT*）を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びカナマイシン抵抗性NPTⅡ遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NPTⅡ」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ペチュニアのブラシノステロイド受容体BRI1遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「BRI1」を用いる。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。

① 組換え遺伝子（P35S）検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NPTⅡ) 検知プライマー対・プローブ「NPTⅡ」
 NPTⅡ-F : 5'- GAC AGG TCG GTC TTG ACA AAAAG -3'
 NPTⅡ-R : 5'- GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC -3'
 NPTⅡ-P : FAM 5'-CCC TGC GCT GAC AGC CGG A -3' TAMRA
- ③ ペチュニア内在性遺伝子 (BRI1) 検知プライマー対・プローブ「BRI1」
 BRI1-F : 5'- GGTGTCACCTTGATCTCAGCTTTAATT -3'
 BRI1-R : 5'- TTGACAATGACCCCAAGCTAGA - 3'
 BRI1-P : FAM 5'- TTTGACTGAGAGAATACC -3' MGB

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μL/ ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μmol/L) 各0.5 μL、対象プローブ溶液 (10 μmol/L) 0.5 μL、滅菌蒸留水8.5 μLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 μLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリーケーターを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 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-ウェル Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び 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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、組換え遺伝子の検知については、「Reporter」を「FAM」、「Quencher」を「TAMRA」に設定し、内在性遺伝子の検知については「Reporter」を「FAM」、「Quencher」を「Non Fluorescent」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50°C で 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。次に、95°C・15 秒間保持後 60°C・1 分間保持を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 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 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 点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NPT II」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ペポカボチャ種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法はペポカボチャ（ズッキーニ、スクワッシュ又はバターナッツカボチャを含む）の種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したペポカボチャ種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取し、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65 °C で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に 65 °C で乾燥後、-80 °C で 4 時間以上冷却し、フードミル（ミルサー 700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。

【参考】ペポカボチャの種子について

ペポカボチャの種子重量については、これまでの調査で、100 粒重の最大値は 37.3 g であることがわかっている。種子の粉碎器を選定する際は、この値を基に使用する機器を選択する。また、ペポカボチャは種子自体に油が多く、長時間の粉碎により、粉碎物がペースト状になるとの報告がある。このことについて粉碎時間を検証する際に注意する。

均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復*1 で実施する。

種子粉碎物 2 g*2 をポリエチレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、GE1 緩衝液 10 mL を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合する。

スイング式遠心分離機又はアングルロータにより、室温、5,000 × g で 20 分間遠心分離を行い、沈殿物を吸わないよう、上清 700 μL を新しい 2.0 mL 容チューブに移す。RNase A (100 mg/mL) 10 μL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μL 及び α-アミラーゼ 2 μL を加え、ポ

ルテックスミキサーで30秒間混合した後、60℃で15分間静置する。GE2-K 緩衝液85 μLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。遠心分離機により13,000×g以上、室温で5分間遠心分離する。沈殿物を吸わないよう、上清400 μLを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB3 緩衝液150 μL及びイソプロピルアルコール 150 μLを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 μLを加え、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離し、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分間静置する。遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

*1 2反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*2 種子粉碎物が2gに満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する(A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

*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及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して10 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20℃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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びカナマイシン抵抗性NPTⅡ遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NPTⅡ」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ペポカボチャのactin遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「actin」を用いる。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。

- ① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」
P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'
P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'
P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA
- ② 組換え遺伝子 (NPT II) 検知プライマー対・プローブ「NPT II」
NPT II -F : 5'- GAC AGG TCG GTC TTG ACA AAA AG -3'
NPT II -R : 5'- GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC -3'
NPT II -P : FAM 5'- CCC TGC GCT GAC AGC CGG A -3' TAMRA
- ③ ペポカボチャ内在性遺伝子 (actin) 検知プライマー対・プローブ「actin」
actin-F: 5'- CCT CTC AAT CCC AAA GCT AAC AG -3'
actin-R: 5'- CGG CCT GGA TAG CAA CAT ACA -3'
actin-P: FAM 5'- TGA CAC AAA TCA TGT TTG AAA CTT TTA ATG TAC CTG C -
3' TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 µL / ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µmol/L）各0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.5 µL、滅菌蒸留水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。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、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 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アケータ

MicroAmp Optical 96-ウェル Reaction Plate (Life Technologies 社)及び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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 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。Applied Biosystems 7500 及び QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

*QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50°Cで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。次に、95°C・30秒間保持後58°C・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知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、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 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点並行で抽出した DNA 試料液 1点につき、2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NPTⅡ」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ワタ種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査方法はワタの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したワタ種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要量採取する。1%SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に65℃で乾燥後、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製

種子粉碎物1点につき2反復*¹で実施する。

種子粉碎物1g²を遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液4 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 µL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65℃で15分間静置する。GE 2-K 緩衝液500 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより4,000×g、室温で10分間遠心分離する。上清1 mLを1.5 mL容チューブに分取し、遠心分離機により13,000×g以上、室温で5分間遠心分離する。上清400 µLを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB 3 緩衝液150 µL及びイソプロピルアルコール 150 µLを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 µLを加え、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。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分間静置する。遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液とする。

*1 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*2 種子粉碎物が 1 g に満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 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 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミド NOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ワタのIVS of the putative Sinapis Arabidopsis Homolog 7 protein (SAH7)遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Sah7」を用いる。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。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」

TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'

TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'

TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3'

TAMRA

③ ワタ内在性遺伝子 (SAH7) 検知プライマー対・プローブ「Sah7」

Sah7-uni-f1: 5'- AGT TTG TAG GTT TTG ATG TTA CAT TGA G -3'

Sah7-uni-r1: 5'- GCA TCT TTG AAC CGC CTA CTG -3'

Sah7-uni-s1: FAM 5'- AAA CAT AAA ATA ATG GGA ACA ACC ATG ACA TGT -3'

TAMRA

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 µL/ ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 各0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、滅菌蒸留水8.5 µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作製して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCRの陽性対照反応液として陽性コントロールプラスミド^{*3}を加えたものを1ウェル分同時に調製する。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、専用のシーリング用アプリケーションナーを用い、注意深く行う。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。

^{*1} TaqMan 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。不十分であれば、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、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*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 2.5 µL 添加する。

^{*3} GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド (ニッポンジーン社) 等を使用する。

^{*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ナー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び 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} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies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。Applied Biosystems 7500及びQuantStudio 5では使用しない。

3.2 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、検体の配置や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、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。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。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50 $^{\circ}$ C で 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。次に、95 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒間保持後 60 $^{\circ}$ C \cdot 1 分間保持を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知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 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。

組換え遺伝子検知用について目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 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 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。

結果の判定には、1 検体から得られた全 DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

ただし、NTC について何れかのウェルで Ct 値が得られた場合、又は、陽性対照反応液について何れかのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、定性 PCR に供する。

判定の手順は、以下の通り。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査方法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

リアルタイム PCR アレイ法 分析プロトコル

リアルタイム PCR アレイ法は、遺伝子組換え作物に導入されている組換え DNA 配列等を1枚の PCR プレート上で一斉に検出する手法である。この方法により、分析試料に含まれる遺伝子組換え作物を網羅的に検知することができる。本検査方法は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所(現、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門)において開発、妥当性確認がなされたものである^{*1,2}。

本プロトコルは、PCR アレイプレート ワタ検査バージョン1の使用を想定したものである。ワタ検査バージョン1の検知対象及びプレートの配置は別表1、別表2に示す。PCR アレイプレートはあらかじめ調製し、 -20°C 以下で冷凍保管する。本プロトコルでは、一般的な DNA 抽出法によって PCR に適した純度の DNA 試料($20\text{ ng}/\mu\text{L}$)^{*3}を準備する。リアルタイム PCR 装置については、Applied Biosystems 社 ABI PRISM 7900HT system 又は ABI 7500 system の使用を想定しているが、同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

リアルタイム PCR アレイ法は様々な標的 DNA 配列を一度に検出する手法であることから、コンタミネーションの影響を受けやすい。このため、各 DNA 試料が混ざらないようにするなど、コンタミネーションの防止を心がける。

*1 Mano et al. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(1), 26–37.

*2 Mano et al. J. AOAC Intl., 2012, 95(2), 508–516.

*3 DNA 試料原液の濃度が $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

1. PCR アレイプレートの作製

別表1のプライマー及びプローブを用意する。プローブは5'、3'末端が蛍光色素 FAM 及び TAMRA で標識されたものを使用する。ただし、CaMV-MGB については、5'末端が FAM で標識された TaqMan MGB プローブ(Thermo Fischer Scientific 社)を購入して使用する。反応ごとにプライマー各 $2.5\ \mu\text{M}$ 、プローブ $1\ \mu\text{M}$ を含むプライマープローブミックスを調製する。IPC 用プライマープローブミックスについては、プライマープローブのほかに IPC 用の鋳型 DNA (Internal Positive Control, NIPPON GENE 社)を用意し、プライマープローブミックスに約5コピー/ μL となるよう添加する。ネガティブコントロール(NC)については、プライマープローブミックスの代わりに滅菌蒸留水を使用する。

別表1に従い、各プライマープローブミックスを 96 ウェルプレートの各ウェルに $2\ \mu\text{L}$ ずつ添加する。8連ピペット又は自動分注装置を用いる。プライマープローブミックスの添加が完了後、Fast Gene 圧着シール(FastGene 社、FG-DM100HC) 又は同等のものをプレート上面に貼付する。1検体分に相当する縦3列でシールを剥がすことができるよう、カッターナイフ等を用いてシールに切れ目を入れる。各ウェルの底面にプライマープローブミックスが添加されていることを目視で確認する。底面以外にプライマープローブミックスが付着している場合は、遠心を行う。すぐに分析に使用しない場合は、 -20°C 以下の冷凍庫で保存する。

2. 反応液の調製

調製済みの PCR アレイプレートを取凍庫から取り出し、常温に戻す。プレート遠心器を用いて、PCR アレイプレートを $1,000 \times g$ で1分間遠心し、ウェル内の溶液をスピンドアウンする。サンプル DNA 溶液をボルテックスミキサーで均一にした後、スピンドアウンする。TaqMan Universal PCR Master Mix $135 \mu\text{L}$ 、サンプル DNA 溶液 ($20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $27 \mu\text{L}$ 、滅菌蒸留水 $54 \mu\text{L}$ をチューブに添加し、ボルテックスミキサーで10秒以上、攪拌する。これをサンプル混合液とする。1枚の PCR アレイプレートでは4サンプルを同時に分析可能なため、4つのサンプル混合液を調製する。PCR アレイプレート上面のシールの内、左側から縦3列分をピンセットで剥がす。この際、シールの切れ端がプレート上に残らないように留意する。電動ピペット (Gilson社 Pipetman concept C-100 など、 $8 \mu\text{L}$ を連続分注できるもの) で1番目のサンプル混合液を $8 \mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。チップの先端から反応液が落ちない場合は、底面にあるプライマープローブミックスにチップの先端が触れないように留意しながら、側面の内壁に滴を付着させる。電動ピペットがない場合は、手動のピペットで行う。分注後、クロスコンタミネーションを避けるために分注済みのウェルをアルミ箔で覆う。続いて、プレート上面のシールのうち、左側から4~6列目までのシールをピンセットで剥がし、同様にサンプル混合液を分注する。被せたアルミ箔を剥がし、2つのサンプル混合液を添加したウェルを新たなアルミ箔で覆う。上記と同様に3番目、4番目のサンプル混合液を各ウェルに分注する。サンプルを全て分注し終わったら、最後に MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 社) をプレート上面に貼付し、ウェルを密封する。 $1,000 \times g$ で1分間遠心を行った後、プレートを下からのぞき込み、各ウェルの反応液が下側にスピンドアウンされ、大きな気泡が残っていないことを確認する。気泡がある場合は再度遠心を行う。

3. 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、プローブ特性、検体の種類、熱サイクル条件である。新規シートを作成し、使用する Detector として「Reporter が FAM、Quencher が TAMRA のもの」、「Reporter が FAM、Quencher が Non Fluorescent のもの」の2つを設定する。別表 2 に記載の CaMV のウェルについては、「Reporter が FAM、Quencher が Non Fluorescent のもの」を設定する。それ以外は、「Reporter が FAM、Quencher が TAMRA のもの」を使用する。検体の種類については、全てのウェルについて「Unknown」を設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。Sample Volume を $10 \mu\text{L}$ とする。熱サイクル条件は次のとおり設定する。 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ で2分間保持した後、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ で15秒間保持後、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ で1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

4. PCR 増幅と結果の解析

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。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。

反応終了後、Analysis Settings を開き、Manual Ct を 0.256、Manual Baseline を Start 3、End 10 として設定する。Analyze を実行し、Threshold line (0.256) と増幅曲線が交差したウェルを陽性と判定する。

別表1 PCR アレイプレートワタ検査バージョン1で使用する反応とその標的遺伝子配列

検出の種類	反応名	標的とする遺伝子配列
組換え DNA	P35S	Cauliflower mosaic virus 由来 35S プロモーター領域
	TNOS	Rhizobium radiobacter 由来ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター
	PFMV	Figwort mosaic virus 由来 35S プロモーター
	TE9	エンドウマメ由来リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ E9 遺伝子ターミネーター領域
	TPIN	ジャガイモ由来プロテアーゼインヒビターII 遺伝子ターミネーター領域
	AINT	イネ由来アクチン 1 遺伝子イントロン領域
	NPTII	Escherichia coli 由来ネオマイシンホストランスフェラーゼ II 遺伝子
	Cry I Ab/Ac	Bacillus thuringiensis 由来殺虫性結晶タンパク質 CryIAb 及び CryIAc 遺伝子
	PAT	Streptomyces viridochromogenes 由来ホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子
	BAR	Streptomyces coelicolor 由来ホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子
	GOX	Ochromobactrum anthropi 由来グリホサートオキシドレダクターゼ遺伝子
	EPSPS1, EPSPS2	Agrobacterium 属細菌由来 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子及びその改変型
	MON531	系統特定
	MON15985	
	MON1445	
	MON88913	
	LLCotton25	
GHB119		
T304-40		
作物種特異的遺伝子	SAH7	ワタ由来シナビスアラビドプシスホモログ 7 タンパク質遺伝子
組換え DNA 供与生物	CaMV	Cauliflower mosaic virus

別表2 PCR アレイプレートワタ検査バージョン1における各反応の配置(例)

※以下の SSIIb~18SrRNA については、別表1の MON531~SAH7 と置き換える。

	サンプル1			サンプル2			サンプル3			サンプル4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG
B	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7
C	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS
D	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase
E	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA
F	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV
G	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC
H	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC

検査方法の同等性確認方法

DNA 抽出精製方法、リアルタイム PCR 装置及びマスターミックスについて、本検査方法に記載のものと同等のものに変更しようとする場合は、「食品表示基準について(平成 27 年 3 月 30 日消費表第 139 号)」の「別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中「検査方法の同等性確認方法」を参照し必要な確認を行うこと。