

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法

本検査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 点又は 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、パパイヤ種子が台湾産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知用、タイ産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知用、中国産又はベトナム産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知用を用いる。

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、下表に従い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、さらに65℃で乾燥する。

(1)種子数が10粒未満の場合

乾燥した種子を滅菌したピンセットを用い、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、平らに押しつぶした後、磨砕する。磨り潰した試料にGE1緩衝液800 μ Lを加え、マイクロピペットを用いて混合し、全量を1.5 mL容エッペンドルフチューブに移し、速やかに「1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製」のRNase A 10 μ Lの添加以降の操作に以降する。余った種子は未洗浄の種子と同様に冷蔵保管する。

上記により、分析試料は、乾燥後の種子数が3粒以上6粒未満の場合は1点、6粒以上10粒未満の場合は2点得られる。

¹ 収去量が3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3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

乾燥した種子を滅菌したピンセットを用い、100粒を上限として、ステンレスビーズ等とともに50 mLファルコンチューブに入れる。乾燥した種子数が100粒を越える

場合、100粒毎に2本のチューブに入れる。シェイクマスター（BMS社）^{*2}等を用い、種子を粉碎する。ビーズを取り除いた後、滅菌済の薬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。余った種子は未洗浄の種子と同様に冷蔵保管する。

上記により、種子粉碎物は、乾燥後の種子数が10粒以上200粒未満の場合は1点、200粒以上の場合は2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。

^{*2}シェイクマスター（BMS）がない場合は、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、薬包紙の上に取り、50 mLファルコンチューブに入れ、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②20 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、200mg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容エッペンドルフチューブに量り採り、GE1緩衝液800 µL、RNase A 10 µL、Proteinase K 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。GE2-K緩衝液100 µLを加え、ボルテックスミキサーで混合する。13,000×g以上、4℃の条件で10分間遠心分離する。上清550 µLを新たな1.5 mL容エッペンドルフチューブに移し、13,000×g以上、4℃の条件で10分間遠心分離する。上清を新たな1.5 mL容エッペンドルフチューブに移し、GB3緩衝液200 µL及びエタノール（100%）200 µLを添加した後、10～12回転倒混和する。混合液650 µLをSpin columnに負荷した後、13,000×g以上、4℃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×g以上、4℃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。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

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。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。

^{*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試料液の調整及び保存

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/ μ Lに調製し、DNA 試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに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。なお、DNA試料原液の濃度が10 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。

3 リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7900HT, Applied Biosystems 7500) 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。

収去したパパイヤ種子が台湾産の場合、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)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(以下「CaMV 35SP」という。)と*Papaya Ringspot Virus coat protein* (PRSV-cp)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」)、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子がタイ産の場合、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-SC)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と*Papaya Ringspot Virus coat protein* (PRSV-cp)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」、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子が中国産又はベトナム産の場合、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN)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と *Papaya Ringspot Virus coat protein* (PRSV-cp)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「HN」、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子が台湾産、タイ産、中国産又はベトナム産以外の国に由来する場合、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

また、パパイヤ陽性対照用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。

プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

(1) 遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知用プライマー対・プローブ

① 「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 GGAAGG-MGB-3'

② 「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) 遺伝子組換えパパイヤ(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 GGAAG-3'

HN-P: 5'-FAM-TGG CTG CTA TTG GGC GAA TCA ACT AC-BHQ1-3'

(4) カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター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

(5) パパイヤ陽性対照用プライマー対・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: 5'-FAM-TTC CCT TCA T(BHQ1)CC ATT CCC ACT CTT GAG A-3'

又は

Q-Chy-P(new): 5'-FAM-TTC CCT TCA TCC ATT CCC ACT CTT GAG

A-TAMRA-3'

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以下のとおりである。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、滅菌超純水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溶液を作成して、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 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} 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。Applied Biosystems 7500 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」が「None」、「HN」が「BHQ1」、「Chy」のプローブが Q-Chy-P の場合「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。

3.3 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°C、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。その後、95°C 15 秒間、60°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

遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK、PRSV-SC又はPRSV-HN)検知、カリフラワーモザイクウイルス35S検知及びパパイヤ陽性対照検知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。

「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」、「SC」及び「CaM」、「HN」及び「CaM」又は「CaM」のみについて目視で 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。

^{*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。したがって Amplification plot 上でベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) の ΔR_n 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 Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems 7500 とともに 0.1~0.2 の範囲であると考えられる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「CaM」、遺伝子組換えパパイヤ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検知試験に用いたプライマー対・プローブが特異的に検出する遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- (2) パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「CaM」、遺伝子組換えパパイヤ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) パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換え体検知試験「CaM」の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ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 及び PRSV-HN）以外の遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- (4) パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「CaM」、遺伝子組換えパパイヤ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であって、
- 1) 種子粉碎物が 2 点あり、個々の種子粉碎物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 結果が得られた場合、遺伝子組換えパパイヤを含む種子粉碎物と含まない種子粉碎物があつたため PCR 結果が一致しなかったと判断し、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
 - 2) 種子粉碎物が 1 点又は 2 点あり、個々の種子粉碎物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 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。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、本試料からの本検査法による検知は不能とする。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する。

なお、パパイヤ陽性対照試験について、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、本試料からの本検査法による検知は不能とする。