

種子における未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検査法について

本検査法ではパパイヤ種子を検査対象とし、DNA 抽出精製は、以下の GM quicker2 (ニッポン・ジーン社) を用いる。1 検体から 2 反復で DNA を抽出し、各抽出 DNA 試料液を用いてリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。

I. 試料の準備

- ・検査に用いるパパイヤ種子は、破碎粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、表面に他の付着物がないことを確認すること。対象とするパパイヤ種子のロットから無作為に 100 粒を採取し、後述の方法により磨砕したものを使用する。
- ・微量測定のため、磨砕用器具容器、秤量用器具は中性洗剤等で洗浄後、確実に DNA を破壊し、乾燥させる (例: 180 °C、30 分 乾熱殺菌する)。
- ・試料調整を含む検査全般は、空気の流れがなく温度・湿度の変動が少ない場所で実施する。
- ・試料の調製場所と検査場所は、区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐ。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター (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2版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

II. リアルタイムPCR法を用いた定性PCR法

1 種子からのDNAの抽出精製 (ニッポンジーン GM quicker2使用) (多粒検査法)

種子を 1 % SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌水で 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 で乾燥する。乾燥した種子 100 粒を滅菌したピンセットを用い、ステンレスビーズ等とともに 50 mL フアルコンチューブに入れる。シェイクマスター (BMS 社) 等を用い、種子を磨砕する^{*1}。ビーズを取り除いた後、滅菌済の薬さじで壁面についた試料を底に集め、ボルテックスでよく攪拌する。

粉末試料 100 mg を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移す。それぞれ GE1 緩衝液 800 μ L を加え、混合する。それぞれに RNase A 10 μ L、Proteinase K 20 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65 °C で 15 分間静置する。それぞれに GE2-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 °C の条件で 10 分間遠心する。次いでその上清 550 μ L を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、13,000 $\times$ g 以上、4 °C の条件で 10 分間遠心する。その上清を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、GB3 緩衝液 200 μ L 及びエタノール (100 %) 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 ×g以上、4 °Cの条件で30秒間遠心し、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 °Cの条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな1.5 mL 容チューブに移し、滅菌水 50 μL を加え室温で3分間静置した後、13,000 ×g 以上で1分間遠心し、得られた溶出液をDNA 試料原液 とする。

※1 シェイクマスター (BMS) がない場合は、乳鉢・乳棒で磨砕する等、同等の粉砕方法を用いること。その際、試料を均質化するため、粉砕した試料を一度、薬包紙の上に取り、50 mL ファルコンチューブに入れ、ボルテックスで混合すること。なお、シェイクマスターを (BMS) 使用する場合は、次の条件で粉砕可能であることを確認している。

シェイクマスター (BMS) における粉砕条件

15 mm ステンレスビーズ 1 個を入れ、600 rpm 2 分で磨砕後、1,000 rpm 30 秒で磨砕。もしくは、20 mm ジルコニアビーズ 1 個・10 mm ジルコニアビーズ 1 個を入れ、1,000 rpm 1 分で磨砕。

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

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の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度^{*2} (O. D. 260及びO. D. 280) を記録する。次いでO. D. 260の値1.0を50 ng/μL DNAと換算し、DNA濃度を算出する。またO. D. 260/O. D. 280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。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。) 得られたDNA濃度から、DNA試料原液を10 ng/μLに滅菌蒸留水で希釈して調製し、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 °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、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が10 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} 希釈する場合には、滅菌蒸留水を用いる。また、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、適宜とする。

^{*2} O.D.260 が DNA 由来の吸光度、O.D.280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

3 リアルタイムPCR法

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、プローブを2種類(「YK-1」、「YK-2」)、CaMV 35SPを検知するプライマー、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。

遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知用プライマー、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- AGACGCCCATGGAAGG-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'

③ 「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'

パパイヤ陽性対照用プライマー対、及び、プローブ*1

「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'

Q-Chy-Pプローブのクエンチャー(消光物質)は、T-baseのblack-hole quencher 1 (BHQ1)を、YK-Pプローブのクエンチャーは、G-baseのMGBを、YK-2P及び35S-Pプローブのクエンチャーは、TAMRAを使用する。

3.1 リアルタイムPCR法 (Applied Biosystems 7900HT, Applied Biosystems 7500)

3.1.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。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 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各0.4 μ L、対象プローブ溶液(10 μ mol/L)0.25 μ L、滅菌超純水8.95 μ L。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、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注する。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についても同時に調整する^{*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注意し、専用のシーリング用アプリーケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*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。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに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。

^{*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。

3.1.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類、及び、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」:Non-Template Control、「UNKN」:DNA 試料液)の設定を行う。またプローブ特性に関しては、Reporter を「FAM」に設定する。Quencher については、①「YK-1」が「None」、②「YK-2」が「TAMRA」、③「CaM」が「TAMRA」、④「Chy」が「Non Fluorescent」となるように設定する。また、Passive Reference は「ROX」に設定

する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。Sample Volume は 25 μ L に設定する。

3.1.3 PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}$ 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。

III. 結果の解析と判定

遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)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」とも目視で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)陽性を疑う。次いで、ベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line)を選択する^{*1}。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解

析する。両方のDNA試料液で43未満のCt値が得られた場合、当該検知試験の結果を陽性と判断する。なお、2つの試料液で結果が食い違う場合は、結果が揃うまで再試験を実施した上で判断する。また、上記により陽性と判定された結果については、multicomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。パパイヤ陽性対照用試験で43未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、Real-time PCRを用いた定性PCR法以降の操作を行い、それでも43未満のCt値が得られない場合には、そのDNA試料液の測定結果を無効とする。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 陽性・陰性の判定については、下表に従うこととする。なお、同一の磨砕試料を用いて2反復で実施したリアルタイムPCRの結果が食い違った場合には、陽性・陰性の判定を行わず、DNA抽出からやり直すこととする。

パパイヤ内在 遺伝子「Chy」	PRSV 検出用 「YK-1」	PRSV 検出用 「YK-2」	CaMV 35SP検 出用「CaM」	判定・対応
+	+	+	+	陽性
+	+	-	+	再検査
+	-	+	+	再検査
+	-	+	-	再検査
+	+	-	-	再検査
+	+	+	-	再検査
+	-	-	+	再検査
+	-	-	-	陰性

判定・対応に照らし合わせ、再検査となった試料については、Real-time PCRからやり直すこととする。再検査の結果、PRSV-YK陽性・陰性の判定がつかない場合は、各機関で保管している磨砕試料の予備を用い、DNA抽出から再度検査を実施し、それでも、陽性・陰性の判定がつかない場合は、検査発注者に連絡すること（各機関で保管している種子の予備を用い、第三者機関が検査する予定）。

*1 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔRn が変動することから、普遍的なTh. lineの設定の数値を示すことが困難である。従ってAmplification plot上でベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh. lineを選択する。参考としてApplied Biosystems 7900HT、及びApplied Biosystems 7500ともに0.1～0.2の範囲であると考えられる。