

パパイヤの葉検査法

I. 検査原則

- ・試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない場所で実施する。
- ・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。

II. リアルタイムPCR法を用いた定性PCR法

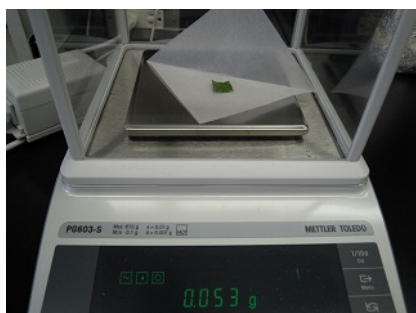
本法ではパパイヤの葉を検査対象とする。葉1枚法では、1 検体から2 反復で DNA を抽出し、DNA 試料液を得る。葉100枚法では、100枚の葉から調製した磨砕試料から3反復で DNA を抽出し、DNA 試料液を得る。その DNA 試料液を用いて2連でリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。

1 葉からのDNAの抽出精製 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit使用)

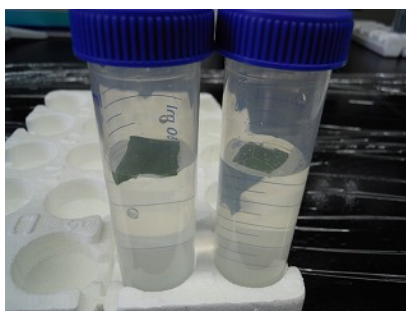
1.2 試料の調製

<葉1枚法>

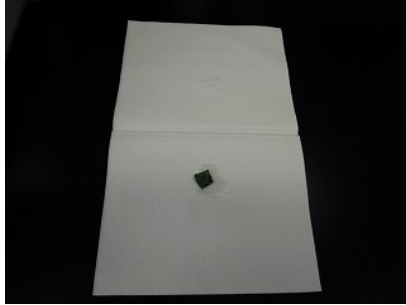
試料 50 mg を量り採る。量り採った試料を滅菌水を満たした 50 ml チューブ内に入れ、ボトルックスを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。洗浄後試料表面の水分をキムタオル等を用いてよく取り除き、5 mm 角に刻んで-80 °Cの冷凍庫に 20 分静置し試料を凍結させる。凍結した試料を-80°Cの冷凍庫で冷却した乳鉢と乳棒を用いて粉状になるまで磨砕する。あらかじめ 65 °Cに温めておいた AP1 緩衝液 500 μL を加え試料を溶かし、2 ml エッペンドルフチューブにできる限り移す。



葉を量り採る



50 ml チューブで洗浄する



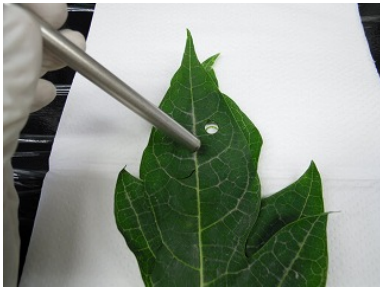
キムタオルで水分を取り、5 mm 角に刻んで-80 °Cの冷蔵庫に 20 分静置



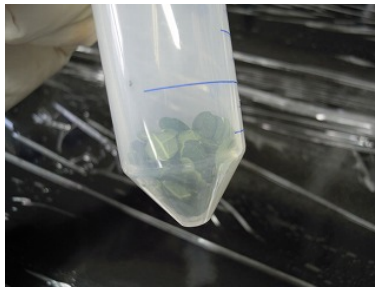
磨砕後、AP1 緩衝液を加えて試料を溶かし、2.0 ml エッペンドルフチューブに移す

<葉100枚法>

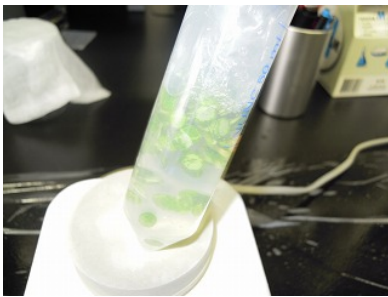
口径(外径)12.5 mm のコルクボーラーでくりぬいた葉を分析試料とする。100枚分の試料を滅菌水を満たした 50 ml チューブ内に入れ、ボルテックスを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。試料をキムタオル上に均一に広げ、65°Cに設定した乾燥機で3時間乾燥させる。試料が粉状になるまで乳棒または粉砕機(シェイクマスターオートの場合 15 mm ビーズを用い 800 rpm で1分間、もしくは 10 mm ジルコニアビーズ3個を用い 1,000 rpm で1分間)でよく磨砕する。磨砕した試料 50 mg を 2 ml エッペンドルフチューブに量り採り^{※1}、あらかじめ 65°Cに温めておいた AP1 緩衝液 500 μ Lを加える。残った試料については、-20°C以下で保存する。



コルクボーラーで葉を 100 枚くり抜く



50ml チューブに入れ滅菌水で洗浄



ボルテックスでよく洗浄する



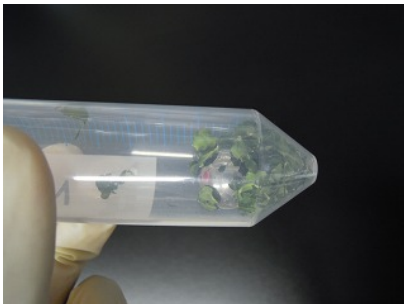
ガーゼ・水切りネット等を利用し水を捨て、3回洗浄する



65°Cで3時間乾燥させる

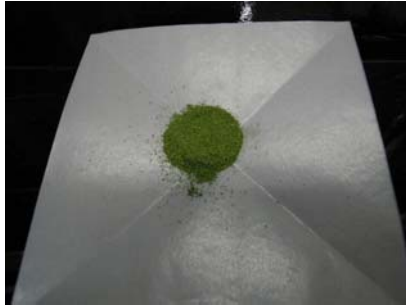


3時間後の葉の様子



粉砕機又は乳鉢を用いて粉砕・混合する





粉碎物を薬包紙に移す



50 mgを 2.0 ml チューブに量り取る

1.3 DNA 抽出

RNase A 5 μL を加え、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。AP2 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 $\times\text{g}$ 以上、15 $^{\circ}\text{C}$ の条件で10分間遠心する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 $\times\text{g}$ 以上で4分間遠心後、溶出液を 1.5 mL チューブに移す。その溶出液の 1.5 倍量の AP3 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 $\times\text{g}$ 以上で1分間遠心し、溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液エタノール混液 500 μL を負荷し、10,000 $\times\text{g}$ 以上で1分間遠心し、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 $\times\text{g}$ 以上で20分間遠心する。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水 50 μL を加え5分間静置した後、10,000 $\times\text{g}$ 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。DNA 試料原液は-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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、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- AGACGCCATGGAAGG-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

④ 「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ケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*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。

3.1.2 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。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。

4. 結果の解析と判定

遺伝子組換えパピイヤ(PRSV-YK)検知及びパピ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、遺伝子組換えパピイヤ(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。2ウェル並行の両方で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ウェル並行のうち片方のwellのみ43未満のCt値が得られた場合は、再度リアルタイムPCRからやり直し、結果が揃うまで行う。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。パピ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、100枚検査法において、同一の磨砕試料から3反復で抽出したDNA試料を、2ウェル並行でリアルタイムPCRにかけたとき、2ウェル並行の各ウェルの結果が異なる場合は、再度リアルタイムPCRからやり直し、2ウェルの結果が揃うまで行う。揃った結果が、3反復で抽出したDNA試料間で一致しない場合は、陽性・陰性の判定を行わず、DNA抽出からやり直す。

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、リアルタイム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葉の予備を用い、第三者機関が検査する)。

*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。