

受託事業実施報告書

ブナシメジDNA品種識別技術の妥当性の確認

平成 27 年 3 月 13 日

特定非営利活動法人 DNA 鑑定学会

目 次

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要	3
DNA分析によるブナシメジの品種識別手法の 妥当性確認方法の決定	5
「DNA分析によるブナシメジ品種の識別手法」の妥当性確認試験 .	9

添付資料

1. DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則
2. SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル
3. ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）
4. 品種判定結果一覧
5. 品種毎のマーカー一致率
6. ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）
7. 許容範囲毎の品種内多型検査結果

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要

1. 目的

H26 年度の品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業におけるDNA品種識別技術の妥当性の検証事業（以下「本事業」という。）は、ホクト株式会社きこ総合研究所が作成した「SSRマーカーによるブナシメジのDNA品種識別マニュアル」について、一部の品種に対するマーカーと識別手法の一部の妥当性の検証を行うことを目的とする。

2. 事業内容

1) DNA品種識別手法における妥当性確認方法等の決定

ブナシメジの品種識別マニュアルに記載されているマーカーと識別手法の一部につき、平成19年度農業・食品産業競争力強化支援事業により独立行政法人種苗管理センターが作成した「DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」（<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>、以下「妥当性ガイドライン」という。）に基づいて一部の品種について妥当性の検討を行い、マーカーと識別手法の妥当性を検証する。

2) 妥当性検証試験・試験結果のとりまとめおよび技術の妥当性の検証

ブナシメジの品種識別について、妥当性検証試験を実施してその結果のとりまとめを行い、技術の妥当性について検証する。

3. 報告書の内容

本事業の報告書においては、下記の3項目に分けて報告する。

- 1) 「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要
- 2) DNA分析によるブナシメジの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるブナシメジ品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるバナシメジの 品種識別手法の妥当性確認方法の決定

1. 妥当性確認方法の概要

妥当性確認事業は、DNA鑑定学会の認証規則に基づいて実施した。すなわち、各工程における主な問題点を洗い出し、是正の参考となるように配慮して実施した。

1) 委員会の設置

本学会員で委員会を構成し、妥当性確認試験結果の検討・確認を行った。

2) 認証規則

平成21年度に当学会で設定し、その後漸次改訂した、「DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則」（添付資料1）を、認証のガイドラインとした。

3) 実施内容

- (1) バナシメジの DNA 品種識別手法における妥当性確認方法の決定
- (2) バナシメジの DNA 品種識別における識別マーカーの妥当性確認試験

2. 実施形態

1) 委員会の設置

妥当性確認事業を当学会の認証規則に従って推進するにあたり、下記「表1 妥当性検討委員会の委員」に記載した委員からなる妥当性検討委員会を設置して、報告書の評価を行った。

表1 妥当性検討委員会の委員

役職	氏名	所属
委員長	矢野 博	(独)農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業センター
	久原 哲	九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門
	辻本 敦美	日本ソフトウェアマネジメント株式会社
	萩原 久	日本電気株式会社 第二官公ソリューション事業部
	橋谷田 真樹	関西医科大学 医学部 法医学講座
	正岡 哲治	(独)水産総合研究センター 増養殖研究所

2) 妥当性確認試験の手順

妥当性確認試験は、品種識別マニュアルに記載されている内容について検査を行い、マーカーおよび識別手法の妥当性を検証するものである。検証は以下の手順で実施した。

(1) 品種識別マニュアルの受入れ

依頼元にマニュアルの提示を求め、内容について検討を行い、適宜修正を求めると共に、マニュアル完成時の自己検査をどの程度実施したかを確認し、これによりマニュアルの信頼度をチェックした。

(2) サンプル収集

依頼元より、一部の品種の品種識別検査および品種内多型検査を実施するために必要な量の、基準DNAサンプルおよび検査用サンプルの提供を受けた。

(3) 検証機関の選定と検査の実施

品種識別の検査を実施する機関を決定した。妥当性を考慮し、また、依頼元の課題提案書に従って、複数機関として3機関を選定した。依頼元より提供されたサンプルをこれらの機関に配布し、検証機関毎に妥当性確認のための検査を実施した。

(4) 実施報告書の作成

各検査機関で実施した検査結果を当学会で集計・解析し、報告書原案を作成した。

3. 実施内容

1) 妥当性確認試験の受入れ

妥当性確認試験を受け入れる際に、以下の条件を設けて受入を実施した。

(1) 品種識別手順のマニュアル化

ブナシメジの品種識別マニュアルを提出してもらい、標準操作マニュアル(Standard Operation Procedure)として、妥当性確認試験の受入を実施した。目次や記載内容は、当学会の「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」(添付資料1)の「品種識別マニュアルの書き方」に準じた変更を要請した。

(2) マーカー開発元の最終的な自己検証

自己検証は、品種識別試験についてはマニュアル掲載の30品種を8種のマーカーで3回反復試験を行った結果、基準品種識別率は100%とのことであった。また、品種内多型については、基準品種の30株を用いて8種のマーカーで3回反復試験を行った結果、一律は100%とのことであった。

(3) サンプル収集

品種識別検査を実用的なものとするため、基準株サンプル、生産者株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルの三種類を収集した。基準株サンプルはマニュアル作成元がDNA抽出を行い、これを基準DNAとして生産者株サンプルについて識別検査を実施した。また、同じ基準DNAを用いて、同一品種内における多型頻度の調査を行った。

(4) 検証機関の選定

品種識別の検査を実施する機関を決定した。信頼性を考慮して3機関を選定した。

① 検証機関選定の手順

機関数：ホクト株式会社きのこ総合研究所が農林水産省に提出した課題提案書に従い、3機関とした。

選定条件：ISO9001 または ISO17025 を取得している機関。

- ② 選定した検証機関：機関名および各機関の取得認証は、下記「表2 検証機関の一覧」の通りである。

表2 検証機関の一覧

項番	機関名	ISO 認証項目
1	株式会社 LSI メディエンス	● 食品検査センター：ISO9001 ● 臨床検査：ISO15189, ISO14001, CAP (米国臨床病理医協会) ● ドーピング検査：ISO17025, WADA (世界アンチドーピング機構)
2	ビジョンバイオ株式会社	ISO17025
3	株式会社ファスマック	ISO9001

(5) 検査の実施

収集した生産者サンプルに、検証機関にとってはブラインド・テストとなるように、DNA 鑑定学会にて新たにサンプル番号を付与した。それらのサンプルを各検証機関に送付して、検証実験を行った。同時に、品種内多型調査用サンプルも、各検証機関に送付して、検証実験を行った。

(6) 実施報告書

各機関で実施した検査結果のデータを DNA 鑑定学会に送付してもらい、それらを集計・解析して、報告書を作成した。

「DNA 分析によるブナシメジ品種の識別手法」の妥当性確認試験

1. 妥当性確認試験の受入れ

1) 検証依頼を受けた品種識別手順のマニュアル (添付資料2)

題名 : S S R マーカーによるブナシメジのDNA品種識別マニュアル

作成元 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

2) サンプル収集

下記「表3 サンプル一覧表」記載の提供元より、ブナシメジの基準株サンプル 1 品種の DNA および生産者株サンプル 12 品種各 5 株、および品種内多型調査用サンプル 1 品種 30 株の凍結菌糸の分与を受けた。基準株サンプルの DNA は、ホクト株式会社きのこ総合研究所より、(500+2000)ng 毎に 3 分されて DNA 鑑定学会に送付された。この DNA を基準マーカーDNA として、生産者株サンプル 12 品種の品種識別マーカーの検証、および、基準株 1 品種の品種内多型調査を行った。生産者株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルは、いずれもホクト株式会社きのこ総合研究所より、チューブ入りの菌糸を冷凍した状態で、DNA 鑑定学会に送付された。

表3 サンプル一覧表

植物種類	種類別	品種名	試料形態	量	入手先
ブナシメジ	基準株	ホクト白1号菌	DNA	2,500ng×3検証機関	ホクト株式会社 きのこ総合研究所
	生産者株サンプル （品種識別用）	ホクト白1号菌	凍結菌糸	各5株×3検証機関	
		MH025066			
		MH025012			
		MH025064			
		MH025286			
		MH025288			
		MH025362			
		MH025369			
		MH025397			
		MH025462			
		MH025463			
		MH025528			
	基準株サンプル （多型調査用）	ホクト白1号菌	凍結菌糸	30株×3検証機関	

2. 検証の形態

検証は、下記の物品を検証機関へ配布して実施した。

1) サンプル

(1) 配布内容

3 機関各々に、下記のサンプルを配布した。

- ① ブナシメジの基準株 DNA 溶液 1 種
(基準マーカーDNA 各 2 チューブ
 $5\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ、 $20\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ)
- ② 品種識別用のブナシメジの冷凍菌糸 60 株
(生産者株サンプル 12 品種の冷凍菌糸 各 5 株)
- ③ 品種内多型調査用のブナシメジの冷凍菌糸 30 株
(基準株のホクト白 1 号の冷凍菌糸)

(2) 配布方法

① 基準マーカーDNA

ホクト株式会社きのこ総合研究所から DNA 鑑定学会に送付された 1 品種(ホクト白 1 号)の DNA 水溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 2 チューブ ($5\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ 1 本、 $20\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ 1 本) ずつ送付した。

② 品種識別用の生産者株のサンプル

ホクト株式会社きのこ総合研究所から、12 品種の生産者株の菌糸サンプルが 5 株ずつ計 60 株、冷凍で DNA 鑑定学会に送付された。サンプルは株ごとに三分されて 3 本のエッペンドルフチューブに入れられており、この結果、60 株 $\times$ 3 組 = 180 本のエッペンドルフチューブ入り菌糸サンプルが、冷凍された状態で DNA 鑑定学会に届けられた。

品種識別検査をブラインドで行うため、DNA 鑑定学会において、これらの冷凍菌糸の株ごとにランダムにサンプル番号をふり直した。学会で新たに付与したサンプル番号は下記の「表 4 品種識別用サンプル番号対応表」の通りである。この結果、ホクト株式会社きのこ総合研究所から送付された品種検査用サンプル三組は、DNA 鑑定学会への到着時点とは異なるサンプル番号を持つこととなった。これら三組の各々を、3 箇所の検証機関へ冷凍で送付した。

多型調査用の株のサンプルについては、ホクト株式会社きのこ総合研究所から 1 品種(ホクト白 1 号菌)の多型調査用株のサンプルが、株ごとに菌糸をエッペンドルフチューブに入れた状態で、3 組、冷凍で DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、各組の冷凍菌糸に 1~30 の番号をふり、同一構成の検査用サンプル 3 組を作成して、各組を 3 箇所の検証機関へ冷凍で送付した。

表4 品種識別用サンプル番号対応表

品種	サンプル数	サンプル番号	品種	サンプル数	サンプル番号
ホクト白1号菌	5	52	MH025362	5	28
		35			56
		12			5
		15			13
		22			51
MH025066	5	17	MH025369	5	21
		8			1
		55			49
		23			43
		27			4
MH025012	5	47	MH025397	5	60
		19			37
		39			33
		29			7
		20			30
MH025064	5	31	MH025462	5	59
		34			46
		25			2
		11			18
		58			10
MH025286	5	45	MH025463	5	48
		42			32
		9			14
		50			44
		16			53
MH025288	5	3	MH025528	5	6
		54			57
		41			26
		38			36
		24			40

2) 「SSR マーカーによる冷凍ブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」 (添付資料2)

提供元 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

作成機関 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) ブナシメジの検査項目

各検証機関に配布した検査項目表を改変して表5に示した。

表 5 検査項目（1 検証機関当り）

種類別	品種名	形態	量	実験	実験数
				繰り返し数	
基準品種	ホクト白1号菌	DNA	2,500ng	依頼元が提供	
マーカーの塩基配列	マーカー数:8種	配列情報	配列情報		
生産者株	12品種	凍結菌糸	5株／品種	2回	120
品種内多型調査株	ホクト白1号菌	凍結菌糸	30株	1回	30

仕様書は DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

4) ブナシメジ検査結果票

検証機関が検査結果を記入する表として、DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

2. 検査と結果

1) 検査内容

品種識別マニュアル中の表 2 に記載されている確マーカーのターゲットサイズと同マニュアルの付属文書 2. に記載されている各マーカーのフラグメント長をもとに、DNA 鑑定学会で数値でのサイズ表を作成し直した（表 6 品種識別マーカー）。これをもとに、「表 5 検査項目（1 検証機関当り）」に従って検査を実施した。この検査手法は、キャピラリーシーケンサーを用いる電気泳動において、基準品種のマーカー DNA 断片とサンプルの DNA 断片を比較し、サイズの異同を判断してマーカータイプを決定し、それらと品種毎のマーカータイプの比較を行って品種を識別するものである。

表6 品種識別マーカー

品種名	マーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	133	67/79	145	155	269	130	132	243
MH025014	133	67/87	139/145	161	290	134	92	220
MH025016	115/133	67	127/139	149	281	130	132	220
MH025019	133	67/79	127/145	149	284	138	92/132	220
MH025022	133	67	127/139	161	284	130/138	92/132	220
MH025066	115/133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243
MH025081	133	67/79	127	149	284	130	92/132	220
MH025146	133	67	145	149	269/284	134	132	207
MH025217	115/133	67/79	145	155	269/284	130	132	243
MH025374	115/133	67/79	145	155	269	130	72	243
MH025038	121	67	119/137	161	278/293	134	87	220
MH025045	115	67/71	133/145	155/161	293	130	97	215
MH025046	115/127	59/71	139	149	281	134	92	220/243
MH025054	127	71	127	155	278	126	92	220
MH025070	127/145	71	139	143	278	130	92	207
MH025092	115	67/75	145	149/161	284	134/138	87	220
MH025097	115	67	127/139	161	265/269	134/148	77	209
MH025121	115/127	63	127	167	265/284	130	72	223
MH025160	115/127	63/75	127	167	281	122	84	291
MH025339	115/121	67/71	133	173	284	126/134	92	220
MH025012	115/133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243
MH025064	115/121	67	127/139	155	265/269	134	72	207
MH025286	133	67/79	127/139	155	269/293	130/134	72	243
MH025288	121/133	67	127	149	265/284	142	92	220
MH025362	115/121	67/79	139	161	269	134	72	247
MH025369	115/121	67/71	139	161	269/281	134	72	217/247
MH025397	115	63/79	145	149	269/284	130	72/132	243
MH025462	121	67/71	127/139	161	269	130/134	72	217
MH025463	121	71/79	139	155	269/293	134	72	247
MH025528	133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243

3) ブナシメジの検査結果

検証機関によるブナシメジの検査結果を DNA 鑑定学会が回収し、サンプルのブラインド化情報と突き合わせて、正答率を求めた。

(1) 品種識別結果

詳細なデータは、添付資料3「ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）」参照のこと。

① ホクト白1号菌の識別

検査依頼を受けたマニュアルは、ホクト白1号菌とそれ以外の品種を識別することを目的としている。そこでまずこの目的に沿った各検証機関の品種名の

回答状況を、下記の表 7 に示した。

表 7 品種名回答の分類（ホクト白一号菌か否かの識別）

		回答数			
		B社	F社	L社	全体
回答数	正答数	120	120	120	360
	誤答数	0	0	0	0
	未答数	0	0	0	0
	合計	120	120	120	360
正解率		100%	100%	100%	100%

各検証機関とも、回答率、正答率ともに 100%であった。この結果、提供されたマニュアルに従って検査を行うことにより、今回提供された 12 品種については、ホクト白 1 号菌かそうでないかを正しく識別することができていた。

② 12 品種間相互の識別

提供されたマニュアルの付属文書 2. 「8 種類の SSR マーカーによる 30 種類のフラグメント長」によれば、今回提供された 12 品種のうち MH025066 と MH025012 は、8 種類のマーカーすべてのフラグメントの数とサイズが完全に同一である。このため、今回のサンプルとしては、ホクトきのこ研究所からは、これら 2 品種はそれぞれの品種名で提供されたが、マニュアルに従った検査では、両者は区別が不可能である。そこで、これら 2 種のサンプル計 10 検体については、MH025066 と MH025012 の両者の同時回答を正解とし、検査全数に対する正答率を品種ごとに集計した結果を、下記の表 8 に示した。

表 8 品種別の品種名正解状況

品種	検査数			回答数		未答数	全体	回答率		未答率	全体
	機関毎検体数	機関毎検査回数	全体検査数	正答数	誤答数			正答率	誤答率		
ホクト白1号菌	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025066 MH025012	10	2	20	20	0	0	20	100%	0%	0%	100%
MH025064	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025286	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025288	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025362	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025369	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025397	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025462	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025463	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025528	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
全体	60	各2	120	120	0	0	120	100%	0%	0%	100%

検証機関から返送された品種識別結果を見ると、該当するサンプルの品種としては、MH025066 と MH025012 が併記されていたため、これを正解とした。

これらを含めた品種名の回答は、すべての検証機関において、60 サンプルのすべての品種が正解であった。（詳細なデータは、添付資料4「品種判定結果一覧」参照のこと。

上記の結果より、提供されたマニュアルは、ホクト白 1 号菌を含む 11 種類の品種（ただしうち 1 種類は 2 品種に当て嵌まる）を、すべて相互に識別することができるといえる。

続いて、マーカー毎の集計を行った。今回検証したマニュアルでは 8 種類の品種識別マーカーを用いており、各マーカーはそれぞれ、2 本または 1 本のフラグメントとそのサイズを識別基準としている。したがって、マーカー毎に、フラグメント本数の正誤およびサイズの正誤の両方について判定が必要である。

まず、総検査数を下記の表 9 で算出したところ、検証機関毎に 1,920 回ずつの判断が必要であった。

表 9 機関毎のマーカーフラグメントの総検査数

検査機関	マーカー数	マーカー毎 検査フラグメント数	検体数	検体毎 検査回数	総検査数
B社	8	2	60	2	1920
F社	8	2	60	2	1920
L社	8	2	60	2	1920
全体	24	6	180	6	5760

これらの数にもとづき、各サンプルについて、マーカーのうちどれだけが正解品種のマーカーと、フラグメント数、サイズともに一致したかを、正解品種毎に集計した。これに際して、上述した 8 種類のマーカーが全て同一である MH025066 と MH025012 については、サンプル提供元のホクトきのこ研究所からはそれぞれ別の品種としてサンプルが提供されているため、これら 2 種類を分けて集計した。また、フラグメントサイズは機器ごとのばらつき等により多少の誤差が生じることを鑑み、サイズを±1 以内、±2 以内、±3 以内と許容範囲を拡げて正解とし、別々に集計を行った。この結果を示したのが、下記の「表 10 許容範囲別の品種毎のマーカー一致率」である。

表 1 O 品種毎のマーカ一致率

A. 許容範囲±1

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12	13.8	7.9	11.2	11.2	75.0%	86.3%	49.4%	70.2%	70.2%
MH025066	16	11	11	7.1	9.7	9.7	68.8%	68.8%	44.4%	60.6%	60.6%
MH025012	16	11	12.8	7	10.3	10.3	68.8%	80.0%	43.8%	64.2%	64.2%
MH025064	16	10	12	7.3	9.8	9.8	62.5%	75.0%	45.6%	61.0%	61.0%
MH025286	16	12	13.6	7.8	11.1	11.1	75.0%	85.0%	48.8%	69.6%	69.6%
MH025288	16	11	10.8	8.9	10.2	10.2	68.8%	67.5%	55.6%	64.0%	64.0%
MH025362	16	10	13	8.3	10.4	10.4	62.5%	81.3%	51.9%	65.2%	65.2%
MH025369	16	10.3	12.1	7.4	9.9	9.9	64.4%	75.6%	46.3%	62.1%	62.1%
MH025397	16	11	12.5	8.2	10.6	10.6	68.8%	78.1%	51.3%	66.0%	66.0%
MH025462	16	9	13	6.5	9.5	9.5	56.3%	81.3%	40.6%	59.4%	59.4%
MH025463	16	11	13.2	9.4	11.2	11.2	68.8%	82.5%	58.8%	70.0%	70.0%
MH025528	16	10.8	14.5	7.8	11.0	11.0	67.5%	90.6%	48.8%	69.0%	69.0%
平均	16	10.8	12.7	7.8	10.4	10.4	67.2%	79.3%	48.8%	65.1%	65.1%

B. 許容範囲±2

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12.0	13.8	13.0	12.9	12.9	75.0%	86.3%	81.3%	80.8%	80.8%
MH025066	16	12.0	12.5	14.1	12.9	12.9	75.0%	78.1%	88.1%	80.4%	80.4%
MH025012	16	12.0	14.4	14.2	13.5	13.5	75.0%	90.0%	88.8%	84.6%	84.6%
MH025064	16	12.0	13.7	14.7	13.5	13.5	75.0%	85.6%	91.9%	84.2%	84.2%
MH025286	16	12.0	14.6	14.9	13.8	13.8	75.0%	91.3%	93.1%	86.5%	86.5%
MH025288	16	12.0	11.8	12.9	12.2	12.2	75.0%	73.8%	80.6%	76.5%	76.5%
MH025362	16	12.0	14.7	14.0	13.6	13.6	75.0%	91.9%	87.5%	84.8%	84.8%
MH025369	16	12.4	14.0	13.4	13.3	13.3	77.5%	87.5%	83.8%	82.9%	82.9%
MH025397	16	12.0	14.2	12.6	12.9	12.9	75.0%	88.8%	78.8%	80.8%	80.8%
MH025462	16	10.0	14.0	12.5	12.2	12.2	62.5%	87.5%	78.1%	76.0%	76.0%
MH025463	16	12.0	14.2	14.5	13.6	13.6	75.0%	88.8%	90.6%	84.8%	84.8%
MH025528	16	10.8	15.3	14.5	13.5	13.5	67.5%	95.6%	90.6%	84.6%	84.6%
平均	16	11.8	13.9	13.8	13.2	13.2	73.5%	87.1%	86.1%	82.2%	82.2%

C. 許容範囲± 3

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12.0	13.8	14.0	13.3	13.3	75.0%	86.3%	87.5%	82.9%	82.9%
MH025066	16	12.0	13.0	15.0	13.3	13.3	75.0%	81.3%	93.8%	83.3%	83.3%
MH025012	16	12.0	14.5	15.0	13.8	13.8	75.0%	90.6%	93.8%	86.5%	86.5%
MH025064	16	12.0	13.7	15.0	13.6	13.6	75.0%	85.6%	93.8%	84.8%	84.8%
MH025286	16	12.0	15.3	15.0	14.1	14.1	75.0%	95.6%	93.8%	88.1%	88.1%
MH025288	16	12.0	12.1	14.9	13.0	13.0	75.0%	75.6%	93.1%	81.3%	81.3%
MH025362	16	12.0	14.7	15.0	13.9	13.9	75.0%	91.9%	93.8%	86.9%	86.9%
MH025369	16	12.4	14.3	15.0	13.9	13.9	77.5%	89.4%	93.8%	86.9%	86.9%
MH025397	16	12.0	14.2	13.9	13.4	13.4	75.0%	88.8%	86.9%	83.5%	83.5%
MH025462	16	10.0	14.0	13.0	12.3	12.3	62.5%	87.5%	81.3%	77.1%	77.1%
MH025463	16	12.0	14.2	15.0	13.7	13.7	75.0%	88.8%	93.8%	85.8%	85.8%
MH025528	16	10.8	15.3	15.0	13.7	13.7	67.5%	95.6%	93.8%	85.6%	85.6%
平均	16	11.8	14.1	14.7	13.5	13.5	73.5%	88.1%	91.6%	84.4%	84.4%

全体を平均してのフラグメントサイズ一致率は、許容正解の許容範囲を± 1にとると 65.1%、± 2にとると 82.2%、± 3にとると 84.4%となり、品種毎・検証機関毎にばらつきが見られた。

品種毎のフラグメントサイズ一致率は、正解の許容範囲正解の許容範囲を± 1にとると 59.4～70.2%、± 2にとると 76.0～84.8%、± 3にとると 77.1～86.9%であった。

また、検証機関毎のフラグメントサイズ一致率は、正解の許容範囲を± 1にとると 48.8～79.3%、正解の許容範囲を± 2にとると 73.5～87.1%、正解の許容範囲を± 3にとると 73.5～91.6%であった。

全体結果の一覧は添付資料 5「品種毎のマーカー一致率の詳細」を参照のこと。

当然のことながら、正解の許容範囲を狭く設定するほどフラグメントサイズの一致率は低くなり、50%を割る値もみられたが、許容範囲を広げると、70%代半ば以上の一致率が認められた。この数値は特に高い値ではなく、より精度の高い結果を得られるようなマーカーとマニュアルの改良が望まれる。しかし、品種名による識別結果が全機関全問正解であったことと考えあわせると、今回検証に用いた 11 種類 12 品種の識別には問題なく使用できるマーカーと考えられる。

また、これらの表から、品種毎に正解の許容範囲の変化に伴うマーカー一致率の

変化をグラフにしてみると、下記の図1のようになり、全体として、正解の許容範囲を拡げるとマーカー一致率が高くなる傾向が見られた。

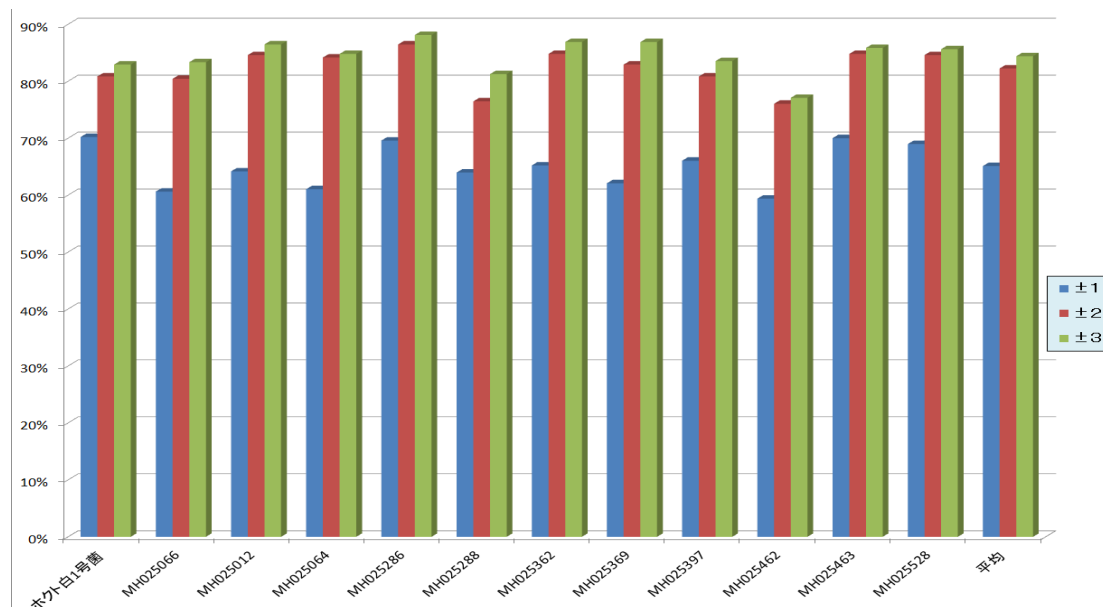
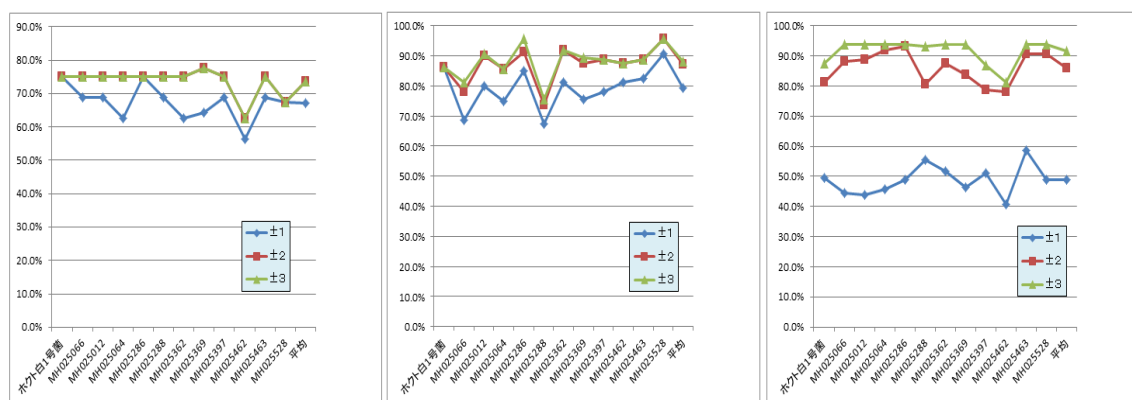


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカー一致率

さらに、検証機関毎に正解の許容範囲の相違に伴うマーカー一致率の相違をグラフにしてみると、下記の図2のようになり、全体として、正解の許容範囲を拡げるとマーカー一致率が高くなる傾向が見られた。

また、品種によってフラグメントサイズの一致率に違いが見られたが、検証機関毎に一致率の低い品種は異なり、一定の傾向は見られなかった。



B 社

F 社

L 社

図2 検証機関毎の正解の許容範囲とマーカー一致率の関係次に、各サンプルのマーカーフラグメントのうちどれだけが正解品種のマーカータイプと一致したかを

一致数と一致率で算出し、フラグメント毎に集計したのが、下記の表 1 1 である。また、提供されたマニュアルでは、各マーカーは 2 本または 1 本のため、それらをマーカー毎に合わせて、マーカーとしてのフラグメントの一致状況を集計したのが続く表 1 2 である。

表 1 1 マーカーフラグメント毎の一致状況

A. フラグメント一致数

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー															
			msHm-1		msHm-2		msHm-3		msHm-4		msHm-5		msHm-6		msHm-7		msHm-8	
±1	120	B社	14	44	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	6	50	56	60
		F社	28	35	59	51	56	52	53	48	56	47	54	41	5	44	45	55
		L社	0	26	7	10	16	46	0	54	3	56	0	32	59	50	38	60
		全体	14.0	35.0	42.0	40.3	44.0	52.7	37.7	52.0	39.7	54.3	36.0	44.3	23.3	48.0	46.3	58.3
±2		B社	60	60	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	60	50	56	60
		F社	58	35	59	51	56	52	53	48	56	47	54	41	46	44	45	55
		L社	37	54	60	60	41	57	0	54	60	60	49	60	60	50	56	60
		全体	51.7	49.7	59.7	57.0	52.3	56.3	37.7	52.0	58.7	55.7	52.3	53.7	55.3	48.0	52.3	58.3
±3		B社	60	60	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	60	50	56	60
		F社	58	35	59	51	56	52	53	48	56	51	54	45	46	44	49	55
		L社	60	60	60	60	56	60	7	54	60	60	53	60	60	50	56	60
		全体	59.3	51.7	59.7	57.0	57.3	57.3	40.0	52.0	58.7	57.0	53.7	55.0	55.3	48.0	53.7	58.3

B. フラグメント一致率

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー															
			msHm-1		msHm-2		msHm-3		msHm-4		msHm-5		msHm-6		msHm-7		msHm-8	
±1	120	B社	11.7%	36.7%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	5.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	23.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	39.2%	45.0%	34.2%	4.2%	36.7%	37.5%	45.8%
		L社	0.0%	21.7%	5.8%	8.3%	13.3%	38.3%	0.0%	45.0%	2.5%	46.7%	0.0%	26.7%	49.2%	41.7%	31.7%	50.0%
		全体	11.7%	29.2%	35.0%	33.6%	36.7%	43.9%	31.4%	43.3%	33.1%	45.3%	30.0%	36.9%	19.4%	40.0%	38.6%	48.6%
±2		B社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	48.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	39.2%	45.0%	34.2%	38.3%	36.7%	37.5%	45.8%
		L社	30.8%	45.0%	50.0%	50.0%	34.2%	47.5%	0.0%	45.0%	50.0%	50.0%	40.8%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		全体	43.1%	41.4%	49.7%	47.5%	43.6%	46.9%	31.4%	43.3%	48.9%	46.4%	43.6%	44.7%	46.1%	40.0%	43.6%	48.6%
±3		B社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	48.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	42.5%	45.0%	37.5%	38.3%	36.7%	40.8%	45.8%
		L社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	46.7%	50.0%	5.8%	45.0%	50.0%	50.0%	44.2%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		全体	49.4%	43.1%	49.7%	47.5%	47.8%	47.8%	33.3%	43.3%	48.9%	47.5%	44.7%	45.8%	46.1%	40.0%	44.7%	48.6%

表 1 2 マーカ一毎の一致状況

A. マーカ一一致数

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー								
			msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8	平均
±1	120	B社	58	120	120	114	120	114	56	116	102.3
		F社	63	110	108	101	103	95	49	100	91.1
		L社	26	17	62	54	59	32	109	98	57.1
		全体	49.0	82.3	96.7	89.7	94.0	80.3	71.3	104.7	83.5
±2		B社	120	120	120	114	120	114	110	116	116.8
		F社	93	110	108	101	103	95	90	100	100.0
		L社	91	120	98	54	120	109	110	116	102.3
		全体	101.3	116.7	108.7	89.7	114.3	106.0	103.3	110.7	106.3
±3		B社	120	120	120	114	120	114	110	116	116.8
		F社	93	110	108	101	107	99	90	104	101.5
		L社	120	120	116	61	120	113	110	116	109.5
		全体	111.0	116.7	114.7	92.0	115.7	108.7	103.3	112.0	109.3

B. マーカ一一致率

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー								
			msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8	平均
±1	120	B社	24%	50%	50%	48%	50%	48%	23%	48%	42.6%
		F社	26%	46%	45%	42%	43%	40%	20%	42%	38.0%
		L社	11%	7%	26%	23%	25%	13%	45%	41%	23.8%
		全体	20.4%	34.3%	40.3%	37.4%	39.2%	33.5%	29.7%	43.6%	34.8%
±2		B社	50%	50%	50%	48%	50%	48%	46%	48%	48.6%
		F社	39%	46%	45%	42%	43%	40%	38%	42%	41.7%
		L社	38%	50%	41%	23%	50%	45%	46%	48%	42.6%
		全体	42.2%	48.6%	45.3%	37.4%	47.6%	44.2%	43.1%	46.1%	44.3%
±3		B社	50%	50%	50%	48%	50%	48%	46%	48%	48.6%
		F社	39%	46%	45%	42%	45%	41%	38%	43%	42.3%
		L社	50%	50%	48%	25%	50%	47%	46%	48%	45.6%
		全体	46.3%	48.6%	47.8%	38.3%	48.2%	45.3%	43.1%	46.7%	45.5%

全体としてのマーカ一一致率は、正解の許容範囲を±1にとると 34.8%、±2に

とると 42.6%、± 3にとると 45.5%であり、高いとは言えない。マーカー毎の一致率は、正解の許容範囲を± 1にとると 20.4~43.6%、± 2にとると 37.4~48.6%、± 3にとると 38.3~48.6%となり、マーカー毎にばらついた。なお、正解の許容範囲を± 3まで広げても、一致率が 100%となるマーカーは、どこの検証機関でも見られず、中には一致率が最高で 40%に満たないマーカーもあった。検査の再現性に疑問が生じる危険性を避けるためには、マーカーやマニュアルに改良の余地があると考えられる。

個々のマーカーの一致率が高くないにもかかわらず、品種識別の成績が良かったのは、今回検証に用いた品種のマーカーサイズやパターンが相互に大きく異なり、多少のサイズの逸脱があっても全体のパターンとして精度よく品種を判定できるシステムになっているように思われる。

三検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なり、その原因はマーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値の違いによるものと同時に、提供されたマニュアルに記載されているマーカーのタイプやサイズの正確さにも問題があると思われる。

例えば、基準品種としているホクト白 1 号菌の msHm-7 のマーカーは、提供されたマニュアルによればフラグメントは 1 本となっている。しかし、検査結果を見ると、3 か所の検証機関すべてにおいて、70 ベース程の鎖長付近にもう一本のフラグメントが検出されている。このように、フラグメントサイズの多少の誤差よりも検査結果の精度に及ぼす影響が大きいと思われる、フラグメント数が異なるという現象が見られることは、提供されたマニュアルからは、検査結果に大きな影響を与える可能性のある要素が排除されていないことを示すため、十分な検討・改良が必要と思われる。

(2) 品種内多型調査の結果

品種内多型調査のための検査は、ホクト白 1 号菌 1 品種のみにつき、30 株を用いて行った。ホクト株式会社きのこ総合研究所から、1.5ml のエッペンドルフチューブに入れた冷凍のホクト白 1 号菌が、DNA 鑑定学会宛てに配送された。1 番から 30 番までの番号が記載されたチューブが番号毎に 3 本ずつ用意されていた。これらを 1 番から 30 番までの続き番号のチューブを各 1 本ずつ含む 30 本単位のグループ 3 組に分け、それぞれのグループを、3 箇所の検証機関に配布し、検査を行った。

詳細なデータは、「添付資料 6 ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）」参照のこと。

正解の許容範囲別に、各検証機関の検査結果のフラグメントの一致数と一致率のまとめを下記の表 1 3 に示した。

表 1 3 ホクト白 1 号菌の品種内多型検査のマーカーフラグメント一致状況

許容範囲	合計 フラグメント 数	一致フラグメント数				一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
±1	16	15.0	15.0	7.3	12.4	93.8%	93.5%	45.8%	77.7%
±2	16	15.0	15.0	12.8	14.3	93.8%	93.5%	80.0%	89.1%
±3	16	15.0	15.0	14.0	14.7	93.8%	93.8%	87.5%	91.7%

全体として、マーカー一致率は正解の許容範囲として±1をとると 77.1%、±2をとると 89.1%、±3をとると 91.7%と、許容範囲を拡げるに従ってかなり高い値となった。検証機関毎に結果を見ると、大多数のサンプルでマーカーフラグメントの一致数および一致率が同じ数値になっていることから、これらの 30 組のサンプル集団の中で多型が見られているとは考えにくいと思われる。

サンプル毎のマーカーフラグメントの一致数および一致率の詳細なデータは、「添付資料 7 許容範囲毎の品種内多型検査結果」参照のこと。

次に、マーカーフラグメント毎、およびマーカー毎の一致率を図 3 に示した。これを見ると、フラグメントサイズの違いの許容範囲を±3まで拡げれば、ほとんどのフラグメントが基準品種のサイズと一致することがわかる。しかし、前項で記述した msHm-7 のマーカーについては、全ての検証機関ですべてのサンプルに 2 本のフラグメントが検出されているため、マニュアルでは検出されないと記述されている右側のフラグメントの一致率がゼロになっている。そしてこの結果、マーカー単位

で見た一致率も、msHm-7 では 50%程度に留まっている。

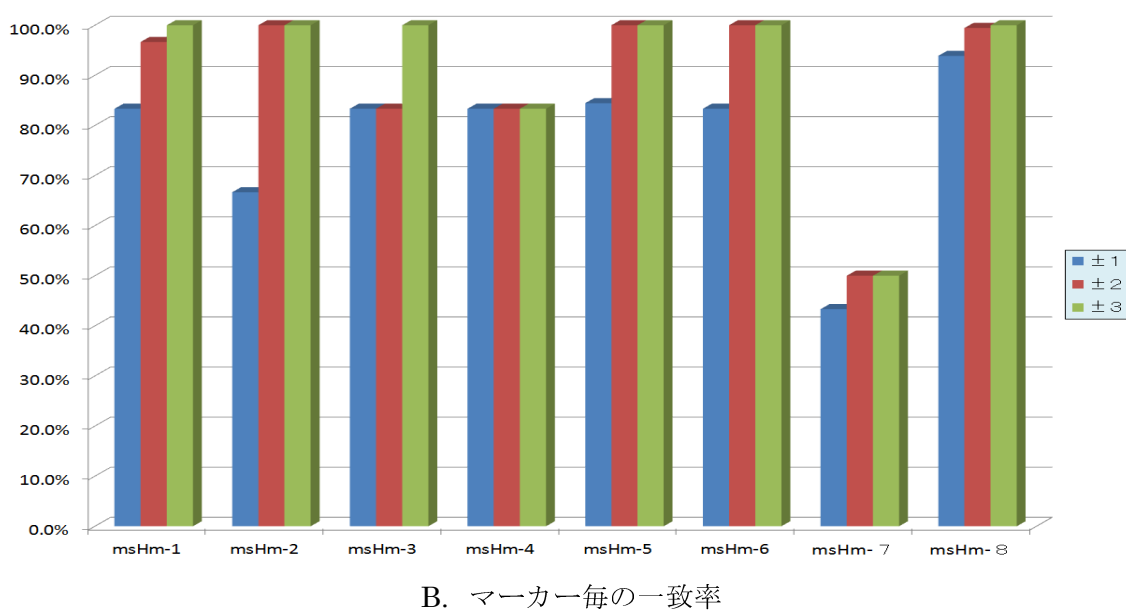
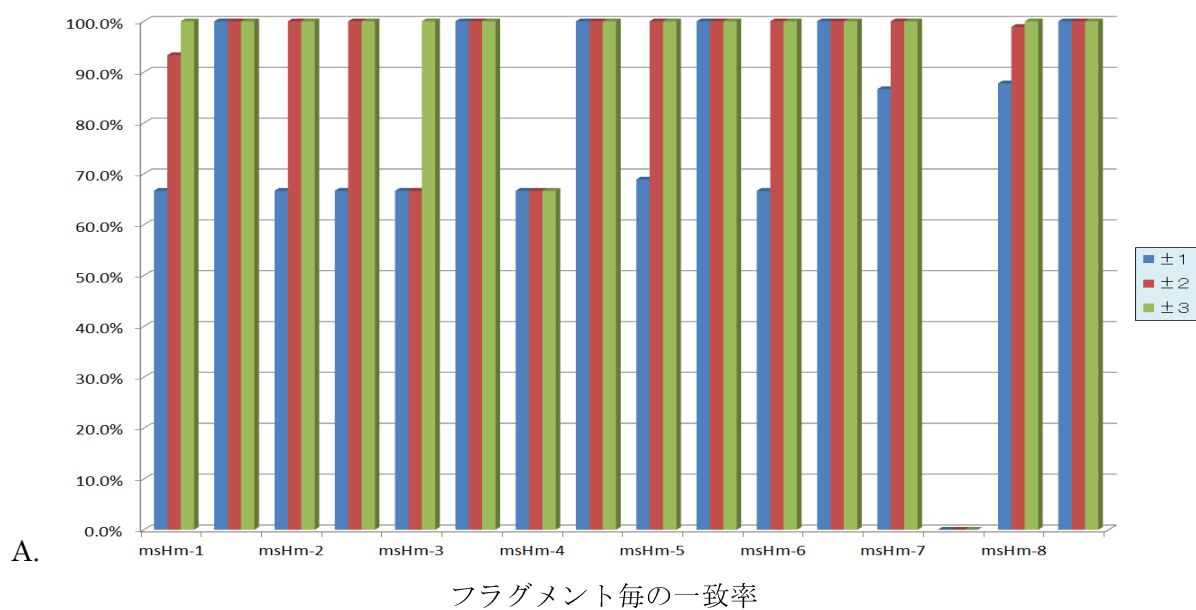


図3 品種内多型調査におけるフラグメント毎の一致率

これらの結果から、今回提供されたブナシメジの品種識別マーカーは、今回の基準品種であるホクト白1号菌の品種内多型の検出に用いるには不十分なものであると考えられ、検討・改良が必要と思われる。

4. 「SSR マーカーによる冷凍ブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」の評価は、下記の以下の表 1 4 の通りである。

表 1 4 「SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」の評価

マニュアル	提供されたマニュアルによる品種名の認証率は、ホクト白 1 号菌、MH025066/MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528 の 11 種類 12 品種の品種識別においては、すべての検証機関において 100%であった。 したがって、提供されたマニュアルは、ホクト白 1 号菌とそれ以外の 10 種類 11 品種の識別、および、ホクト白 1 号菌を含む 11 種類 12 品種の相互間での識別を、高い信頼性を持って行えるマニュアルであると言える。 しかしながら、三検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なっており、その一つの原因は、マーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値の違いによるものと思われる。このため、初めての実験者でも高いマーカー一致率が得られ、その結果として精度の高い安定的な品種識別を行えるよう、更なるマニュアルの改良を検討することが望ましい。
マーカー	提示されたマーカー毎の認証率は、全体に 50%以下の低い数値であった。一方で、品種毎にみたマーカーの認証率は、およそ 60～85%程度の間でばらついた。こちらは低い数値とは言えない。このことから、今回検証に用いた品種間のマーカーサイズのパターンは相互に大きく異なり、パターン全体から品種識別をしやすいシステムになっていると考えられる。 マーカーの正確なサイズは、使用する機器や実験技術者個人の力量によっても変わる可能性があるため、本システムのように、厳密なマーカーサイズ測定結果でなくとも誤りなく品種識別ができるシステムは、判定の精度を高く保つ良い方法と思われる。 しかし、マーカーサイズの一致率が高くないことは、特に未経験者がマニュアルに従って得た実験結果のフラグメントサイズのセットから正解品種を導き出す際には、誤った判定の原因になりうるため、マーカーとして用いるフラグメントのサイズについては、十分な再検討を要すると考えられる。 例えば、基準品種としているホクト白 1 号菌の msHm-7 のマーカーは、提供されたマニュアルによればフラグメントは 1 本となっている。しかし、検査結果を見ると、3 か所の検証機関すべてにおいて、70 ベース程の鎖長

	付近にもう一本のフラグメントが検出されている。このように、フラグメントサイズの多少の誤差よりも検査結果の精度に及ぼす影響が大きいと思われる、フラグメント数が異なるという現象が見られることは、提供されたマニュアルからは、検査結果に大きな影響を与える可能性のある要素が排除されていないことを示すため、十分な検討・改良が必要と思われる。
妥当性 総合評価	今回の検証に用いた 12 品種のブナシメジの品種識別を行った場合の認証率は 100% で、品種識別結果は精度が高い。 マーカーは、マニュアルと全検証機関との検査結果が異なるものも含まれており、慎重な再検討が必要である。

以上

添付資料 1

DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則

DNA鑑定提供までのジョブフローと規則

- DNA鑑定提供までのジョブフロー
- マーカー開発規則
- 認証規則
- DNA鑑定の検査規則
- ライセンス規則と責任
- DNA鑑定の品質確保
- 品種識別マニュアルの書き方

特定非営利法人 DNA鑑定学会
妥当性委員会



(H25.6.7)

更新経歴表

更新月日	内容
2009/6/16	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を追加した。
2009/6/22	「3. 1. 2 妥当性実施機関の条件」を追加した。 それに伴い、「3. 1 委員会」を「3. 1. 1」に変更し、3. 1には「3. 1 妥当性の確保」を設けた。
	「図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー」にstep5として「DNA鑑定の品質確保」を追加した。
	「6. DNA鑑定の品質確保」を追加した。
2009/7/8	「2. 2 権利関係」の文章表現を分かり易くした。内容に変更なし。
	「3. 認証規則」の序論に「同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求める」を追加した。
	「2. 4 自己検証」 (1) 以下の株で品種判別を実施すること。 基準株：分譲元 生産者：分譲先生産者の産物 市販品：種苗会社などの流通品 を追加した。
2010/11/2	「4. 2. 4 2 検体の比較検査」を追加
	「4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方」を追加
	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を削除し、 「7. 品種識別マニュアルの書き方」を追加
	タイトルを「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」から 「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」
2011/7/5	「2. 3. 1 マーカーの開発」の「(3) 2bp 以上の SSR マーカー」と「(4) 誰でも活用できる検査技術」を追加

目次

1.	DNA鑑定提供までのジョブフロー	2
2.	マーカー開発規則	3
3.	認証規則	5
4.	DNA鑑定の検査規則	10
5.	ライセンス規則と責任	13
6.	DNA鑑定の品質確保	18
7.	品種識別マニュアルの書き方	19

1. DNA鑑定提供までのジョブフロー

本ジョブフローは、研究開発の成果を産学官の協力で実社会に提供することを目的とし、提供までに必要な事柄とそのガイドラインをジョブフローとして図1に現します。

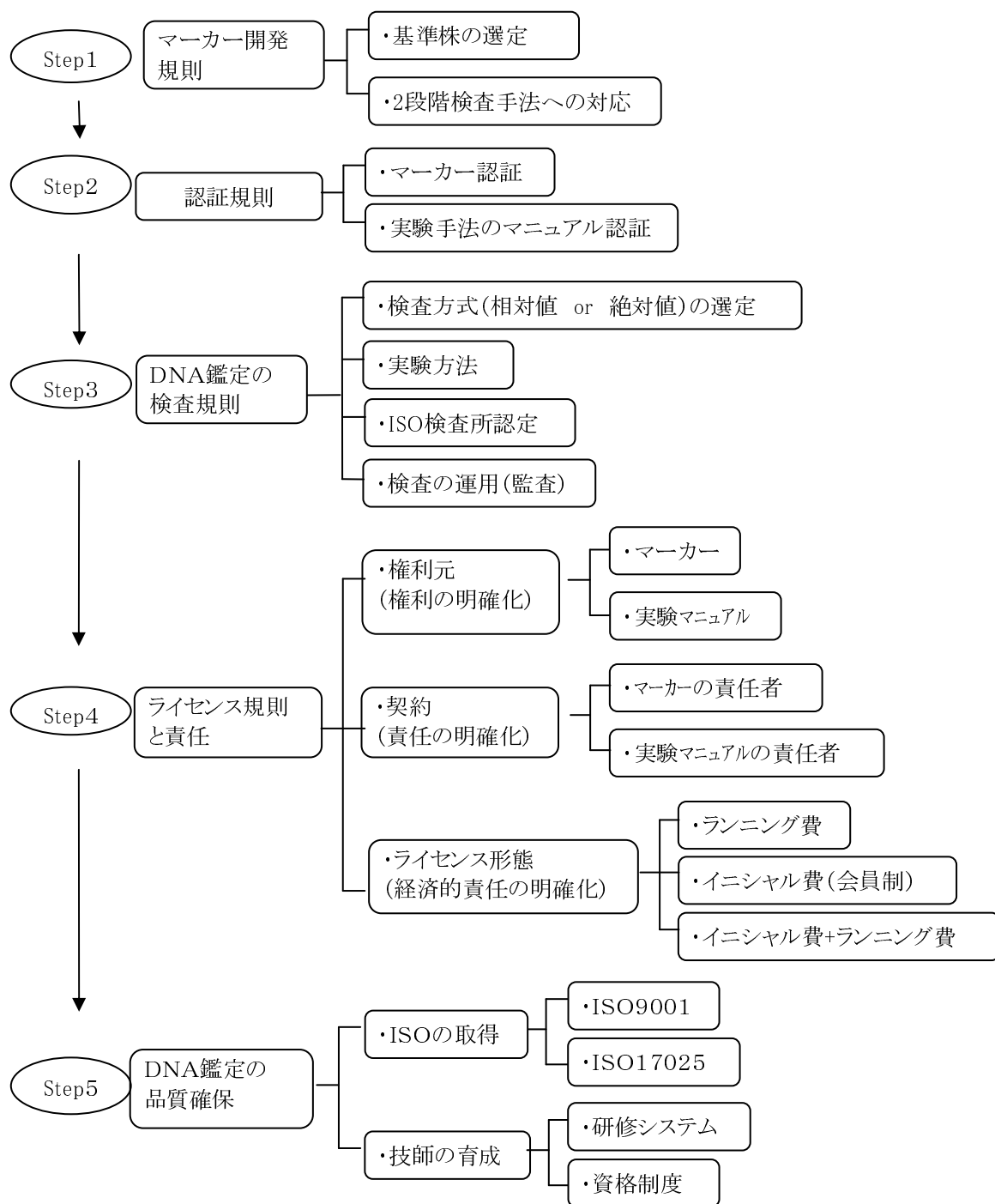


図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー

2. マーカー開発の規則

2. 1 基本的な考え方

DNA鑑定に必要な要素を、識別するための「マーカー」と、マーカーを検出するための「実験方法」とに区別して定義する。また、権利も各々で異なり、規則も権利に従って設定する。

2. 2 権利関係

識別の開発で発生する知的所有権は、品種などを識別する「識別マーカー」と、識別マーカーを用いて判別する実験手段を記載した品種識別マニュアルとがある。

「品種識別マーカー」は、特許権としての権利となり、識別するための実験手段を書いた手順書の「識別マニュアル」は著作権としての権利となる。

2. 3 開発

2. 3. 1 マーカーの開発

品種識別などのマーカー開発をするにあたって、基本的に以下の事項を考慮して開発しなくてはならない。

(1) 基準株を明確に定めて開発

マーカーを開発するにあり、分譲している基準株を用いて開発をおこなうこと。

(2) 2段階検査に対応したマーカーの開発

簡易検査と精密検査との2段階で検査を可能としたマーカーであること。簡易検査とは断片長などの簡易的な手法で判別がおこなえること。精密検査とは現在の技術でベストと思われる判別手法の塩基配列で判別できること。

(3) 2bp以上のSSRマーカー

電気泳動の誤差が2bp程度生じるため、4bp以上のSSRマーカーが好ましい。

(4) 誰でも活用できる検査技術

エチプロなど健康面で問題とされている物を使用しない方式とする。

2. 3. 2 品種識別マニュアルの開発

品種識別マニュアルとは、識別マーカーを使って識別する実験方法を記載するもので、学会で指定する目次に従って記載すること。内容は、第三者が使用して品種識別が出来る内容でなくてはならない。ただし、新たな技術が開発され、マニュアルに記載されている内容で実験することが出来ないようなときは、新たに

マニュアルを作成し、定義して実施すること。このとき、マーカーの変更をしてはならない。

2. 4 自己検証

信頼性を確認するため、品種識別の開発終了時、以下の条件で最終確認をおこなうこと。

- (1) マーカー開発した人物と異なる人物で最終確認を実施することが好ましい。
- (2) 品種識別マニュアルで検証作業を実施すること。
- (3) 以下の株で品種判別を実施すること。
 - 基準株：分譲元
 - 生産者：分譲先生産者の産物
 - 市販品：種苗会社などの流通品
- (4) 実験の繰り返し回数を複数回おこなうこと。
- (5) 品種確認は同一品種別個体で5個体以上の個体検査をおこない、検証結果を提示できる状況にしておくこと。

3. 認証規則

認証業務とは、依頼元から提供されたマニュアルに記載している「DNAマーカーと検査手順」について、同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求めるものである。

検証業務とは、マニュアルに従って検査を実施し、手順の再現性確認と識別の認証率を求めるものである。

認証率とは、サンプル採取した複数の生物検体を、マニュアルに従って検査をおこない、DNAマーカーによる判別の結果をデータ評価したもので、DNAマーカーでの品種一致率を求めたものである。

3. 1 妥当性の確保

妥当性を確保するために、委員会を設け、妥当性に相応しい機関で実施しなくてはならない。

3. 1. 1 妥当性委員会の設置

認証業務は複数人の第三者委員会（中立委員を委員長として、大学、独立法人研究機関、民間等の専門家から構成）で構成させ、検証機関の選定、サンプルの採取および認証率を合議の上で決定し、図2の認証業務フローに従って遂行すること。

3. 1. 2 妥当性実施機関の条件

妥当性とは、品種基準株の選定、品種識別マーカーの開発方法、マーカーの認証率およびDNA鑑定検査方法を検証して評価し、その妥当性を判別することである。そのため、妥当性には中立性と公平性が要求されるため、以下の業務に係わっている機関が妥当性業務を実施してはならない。

- (1) 品種識別マーカーの開発業務
- (2) DNA鑑定による検査業務
- (3) 種苗の管理業務

3. 2 認証基準

委託された認証業務において、帳票にて申請を受付け、以下の条件をクリアした申請のみを受け入れるものとする。検査手順のマニュアルがあること。

- (1) 検査手法の中にコントロールマーカーが定義されていること。
- (2) マーカー判別手法において、最終的に塩基配列を読み取ることで正確な判別できる方式であること。
- (3) マーカーの探索において、以下の条件を実施して決めること。
 - ・同一DNAで繰返し実験をし、再現性の確認をおこなう。

- ・同一品種の複数個体との比較を実施する。
- ・異なる品種に対しても、1品種複数個体で比較を実施する。

3. 3 検証機関の選定基準

検証機関の選定基準とは、検証業務を実施する機関を選定するための基準について定義したものである。(基本的にはISO17025の試験所認定機関のレベルに準拠した検証機関であることが望ましい)

1) 機関選定の手法

学会の法人会員に対して公募をおこない、応募機関の中から選定することを原則とする。ただし、応募の中に認証を取得している機関が無い、あるいは何らかの都合で公募がおこなえないときは、委員会で協議して検証先を決定する。

2) 検証機関の選定基準

認証資格として、ISO17025, ISO15189 または ISO9001 を取得している機関を優先することを原則とする。但し、何らかの事情により、認証を取得していない機関を選定対象とするときは、以下に述べるチェック項目に従い当該機関のチェックを委員会でおこなう。

- (1) 検証機関に試験所品質管理マニュアル相当のマニュアルがあること。
- (2) 検証機関は検証業務に関する権限と責任を明確にした組織表が作成されていること。(機密保持体制、職員への内圧外圧の排除を含む)
- (3) 品質マニュアルには品質管理者、技術管理者の権限と責任が明確に記載されていること。
- (4) 検証機関の品質マニュアルには品質目標、品質方針の記載があること。
- (5) 検証機関は文書管理体制(品質マニュアル等の配布管理、文書ファイル、文書改定、文書保管管理、文書取扱責任者など)が整っていること。
- (6) 検証機関では依頼内容の確認、記録が取られていること。
- (7) 検証業務に使用する検査機器、試薬などの購買、受入検査の記録を保持していること。
- (8) 検証業務に関する不適合試験業務の管理(不適合処理、是正処置、予防処置)が行われていること。
- (9) 検証業務の見直しのための内部監査及びマネジメントレビューが行われていること。
- (10) 検証業務に関与する職員の教育訓練、資格認定を実施していること。
- (11) 検証業務に関する施設の適合性の記録(温度、湿度、環境制御など)を取っていること。
- (12) 検証業務に関する試験方法及び妥当性確認(検査手順書の適合性、検査

手順書の改定、対応規格の有無、対応試験方法の有無、不確かさレベルの確認など)

- (13) 検証業務に関する検査機器の保全計画及び実績、検査機器の設備管理台帳、ソフトウェアの管理記録を整備していること。
- (14) 検証業務、測定トレーサビリティの確保がおこなわれていること。(認証標準物質又は標準物質、検査機器、試薬など)
- (15) 検証業務に関する試験試料の識別管理、保管管理を行っていること。
- (16) 検証業務に関する品質の保証(精度管理:正確さ、再現精度の管理)を行っていること。
- (17) 検証業務に関する鑑定の報告実績があること。

以上のチェック項目に関して70%以上の適合性があることが望ましい。

認証機関の選定確認用のチェックリストは別添の「ISO17025試験所またはISO17025試験所相当レベルに該当するかどうかを確認するための監査チェックリスト」を使用する。

3.4 サンプルの採取基準

マニュアルに記載されているDNAマーカで判別を実施するためのサンプル採取基準を定義する。サンプルは以下の観点で採取する。

1) 標準株

標準株を管理している機関から、同一株を複数個採取する。これは、DNAマーカが標準株に対して、どの程度の妥当性があるか判別するためである。

2) 市販品

市販されている株を複数個所から購入し、DNAマーカで判別する。これは、DNAマーカと市販品株とにどの程度の差異が生じているか判別するためのものである。

3) 多品種との妥当性

上記、1)、2)は同一品種株に対する妥当性評価のためであるが、異なる品種に対しても同様の判別を実施すること。

3.5 認証率

妥当性を確保するために、検証機関を複数機関選定し、各機関に同一のサンプルを与えて検証業務を実施させる。認証率は、依頼されたDNAマーカと標準株および市販品との一致率をまとめて求める。

3.6 是正処置及び予防処置

学会での認証活動において発生した問題点とその対策を記録し、是正処置を講じる

ことで、その後の予防処置をおこなう。

学会での認証活動は、認証委員会での討議内容を議事録として残し、是正処置が発生した場合は是正処置内容を対象の検証機関に報告して、1ヶ月以内に是正処置報告書を検証機関に提出してもらいその内容を再度認証委員会にて審議して最終的な検証機関の選定を行う。

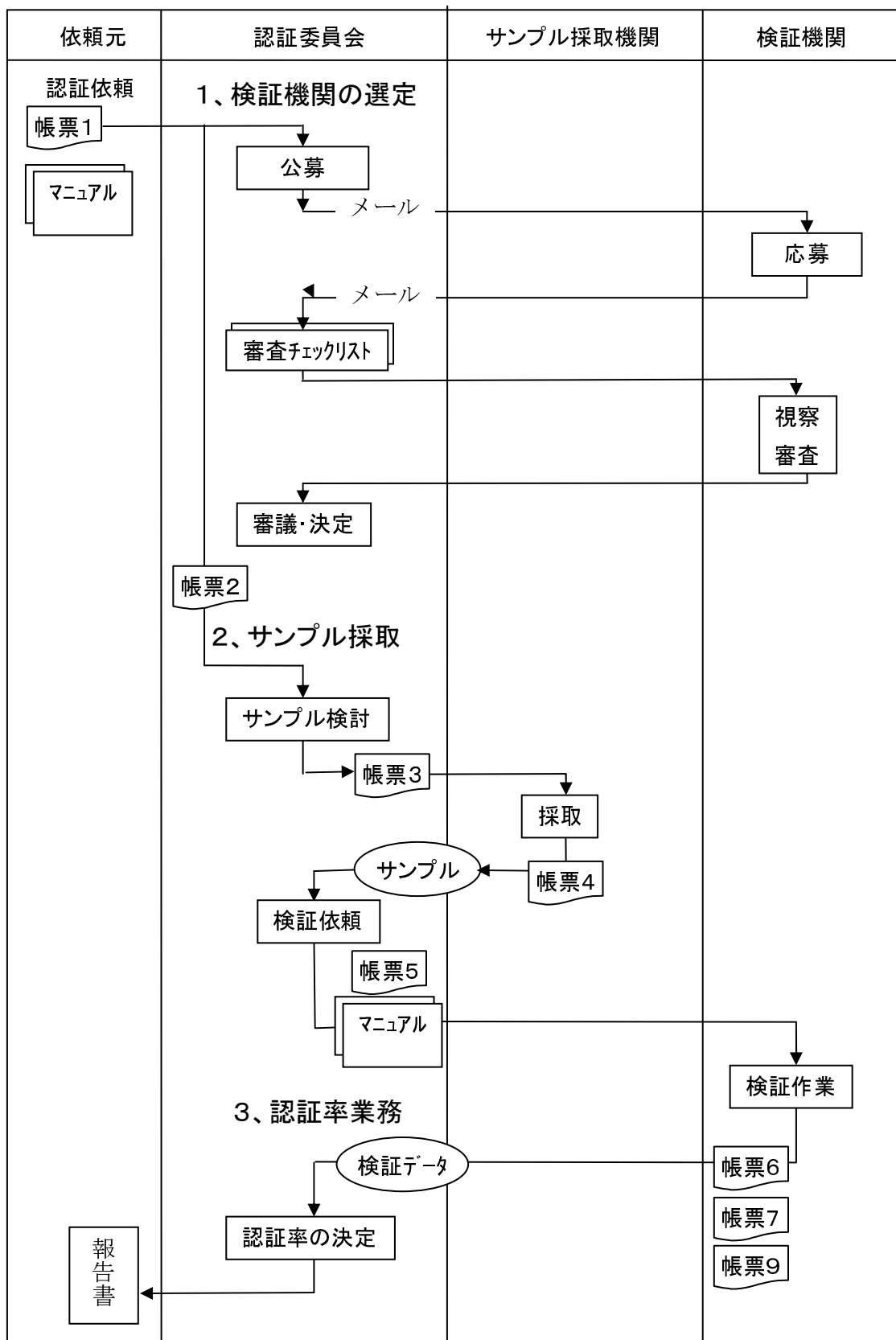


図2 認証の業務フロー

4. DNA鑑定の検査規則

4. 1 基本的な考え方

DNA鑑定において、品種識別マニュアルで識別の実験方法などを記載しているが、全機関がマニュアルに記載されている同一の環境で実験することは現実的でない。そのため、以下の指針を設けることで、DNA鑑定の品質を確保する。

(1) 検査の手法

基準品種と被検査物のマーカーを一緒に、あるいは平行に測定し、基準品種マーカーと被検体のマーカーを相対比較する。

(2) 基準品種の設定

検査の前に基準品種を設定して検査をおこなう。

(3) 2段階検査

簡易検査と精密検査の2段階検査方式とし、精密検査では塩基配列で判別する。

4. 2 DNA鑑定の検査

4. 2. 1 検査の手法

DNA鑑定の検査は大きく分けて、基準品種のマーカー値を基準値として定義して置き、被検体のマーカー測定値と基準値とを比較して判別する方法の絶対値方式と、基準品種のDNAと被検体のDNAとを一緒に、あるいは平行に測定する相対値方式とに区別することが出来る。絶対値方式では、検査に使用する機器など、各検査機関の環境が異なると、測定値にバラツキが生じる。そのため、判別の信頼性を確保するためには、各検査機関の環境が異なっても、同じ測定結果を得ることができる相対値方式を用いるものとする。

4. 2. 2 基準品種の設定

前記の相対値方式によるDNA鑑定方法は、基準品種のDNAを保存して置き、そのDNAを使用する方法と、基準品種の固体を保存して置き、検査に時にDNAを抽出して使用する方法がある。相対値方式ではどちらの手段を用いてもよい。基準品種のDNAを抽出して使用する方法は、品種の基準株を複数個体用意し、個々のマーカーを測定して同一の測定値が多く存在したDNAを基準DNAとして使用する。

4. 2. 3 2段階検査

現在のバイオテクノロジーにおいて、十分な証拠能力を有する検査結果を出すためには、最終的にマーカー部位の塩基配列で判別を行なうことが最善の手法である。しかし、常に塩基配列を読取って判別することはコスト面から現実的でない。そこで、まず簡易検査によって基準品種と異なる品種の疑いがあるかどうかのスクリーニングを行い、その結果、基準品種と異なる品種の疑いがあるものについては、精密検査としての塩基配列決定を行なうという2段階の検査システムを採用する。

この2段階検査の方式は、以下のような利点を持つ。

- (1) 簡易検査の結果により精密検査の必要性を判断できるため、手間と費用のかかる精密検査を行なう件数を減らすことができる。
- (2) 簡易検査のみでは証拠として不十分とされる危険性を、精密検査の結果によって払拭することが可能となり、十分な証拠能力を有する検査を行なうことができる。

従って、簡易検査は、後に精密検査を行なうことを考慮して、精密検査を行うに十分な量と質の検体または検体から抽出したDNAを保存できるような簡易検査でなくてはならない。

4. 2. 4 2検体の比較検査

2検体を電気泳動の分離で比較するときは、検体ごとに異なる蛍光色素を標識して、一緒に電気泳動させる。これは、検体を別々に電気泳動すると電気泳動の環境が毎回異なるため、誤差が生じることを防ぐためである。

4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方

検体が多くて一緒に電気泳動できない様なときは、基準マーカー&サイズマーカーを用いてマーカーと一緒に検体と電気泳動させる。基準マーカー&サイズマーカーの測定値を基準として、検体の測定値を正規化し、比較する。このとき、電気泳動が異なると基準マーカーやサイズマーカーの測定値にも誤差が生じることを考慮する必要がある。

4. 3 検査機関の認定

検査機関の認定は、以下に示す検査方法に準じて作を実施できる機関を認定する方式とし、DNA鑑定の品質監査を定期的におこない品質を維持させることを目的とする。

- (1) 識別マーカーは学会で指定するものを使用すること。
- (2) 基準品種株は学会が指定したものを使用すること。
- (3) 測定は相対値方式でおこなうこと。
- (4) 自機関における実験用マニュアルの作成をおこない、当該マニュアルの更新経歴管理など品質を維持するためのシステムを向けていること。

- (5) マニュアルは学会で指定する目次に従って記載すること。
- (6) 実験マニュアルの妥当性として、一定量の品種識別を実施したデータを学会に提示すること。
- (7) 各実験過程において記録を取り、ドキュメント管理をおこなうこと。
- (8) 学会は、認定機関に対してのクレーム窓口を用意すること。

5. ライセンス規則と責任

5. 1 目的

DNA鑑定サービスをビジネス社会に組み入れるためには、トラブル発生時の対処ができるよう責任の所在や関連する知的財産などの権利を明確にしておかなくてはならない。そのためには、関係する機関との権利関係を明確にし、契約書を結んで鑑定サービスを実施しなくてはならない。

特許登録済のマーカ－：実施権のライセンス契約（ライセンス費）を結ぶ。

特許未登録のマーカ－：技術コンサル（技術指導費）という形で契約を結ぶ。

責任の所在や権利を明確にし、技術漏洩および無断使用の状況にならないようにする。特に営利企業へ技術供与する場合には特に注意する必要がある。

5. 2 権利内容

DNA鑑定の技術に関連して発生する権利には、識別をするための「識別マーカ－」と実験手法を記載した「検査マニュアル」の二種類の知的所有権があり、各々の権利は表1に表すように権利の種類が異なる。

識別マーカ－を権利化するためには特許を取得することによって権利を主張することができる。検査マニュアルについては刊行物と同様、著作物として権利化することができる。ただし、検査マニュアルに記載している内容を権利化するときは、新規性のある内容について特許を取得する必要がある。

表1 知的所有権

種類	知的所有権		実施権
識別マーカ－	特許権	発明者	出願人であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、全ての権利（研究成果）が委託開発の依頼元に所有する旨の契約条項が記載されている。
識別マニュアル	著作権	作成者	著作物であり、多方面へ配布するなどの場合には、作成者の了解が必要であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、委託契約書（または研究成果の納入）で依頼元に権利が帰属される。

5. 3 権利の帰属

権利の帰属先は開発の条件によって異なるが、一般的には図3に示すような構成に

なっている。権利は発明者が権利化し、出願人が実施権を持つために発明者との間で取り決めを交わす。例えば、特許ロイヤリティまたは製品化などで得た利益をどのように分配するかを決めておくなどの方法で、利益を発明者に還元するためである。

基本的には実施権は出願人に帰属するが、委託研究によって生まれた発明については、委託契約書で依頼元に帰属する契約となっていることが一般的である。ただし、国の委託研究などでは、依頼先が大学などの非営利団体のときは申請すれば依頼先へ帰属させることができる場合もある。そのため、権利を実施したい者は権利の帰属している機関を探して、そことライセンス契約を結ぶ必要がある。

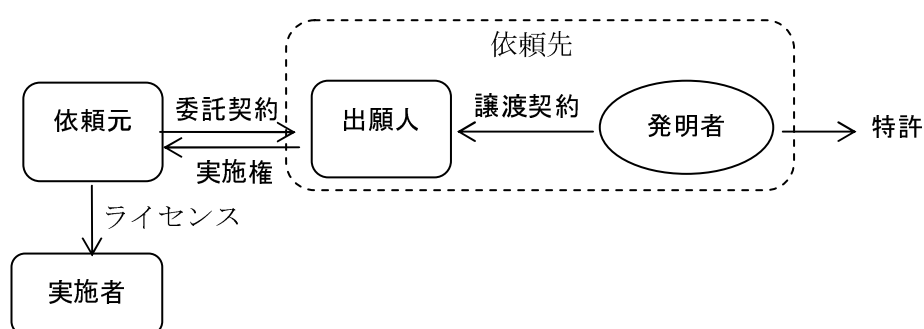


図3 権利関係

5. 4 実施時の責任関係

DNA鑑定の実施形態における責任の所在は、知的所有権を権利化した場合と権利化しなかった場合とで異なる。開発と権利関係を図4にDNA鑑定と責任の所在を表2に表して説明する。

5. 4. 1 開発と権利関係

DNA鑑定の開発に関係する機関としては下記の機関が存在し、その役割と権利関係を下記のように定義する。

開発依頼元：識別マーカーの開発を依頼する。

開発機関：開発依頼元から依頼された識別マーカーの開発をおこなう。

認証機関：開発された識別マーカーの妥当性として、基準株や品種識別の認証率などの評価をおこなう。

検査機関：開発された識別マーカーでDNA鑑定サービスをおこなう。

一般的に、識別マーカーの開発をおこなう場合、全ての権利が開発依頼元に所属するよう委託契約書に記載されているため、ライセンスの契約は開発依頼元と契約することになる。しかし、国の委託研究では、開発機関が大学などの非営利のときは、権利の譲渡を申請することにより、開発機関に帰属させることができる。このようなと

きのライセンス契約は開発機関と結ぶことになる。

そのため、企業がDNA鑑定サービスを実施するときは、権利の帰属先を明確にして、ライセンス契約を結ぶ必要がある。

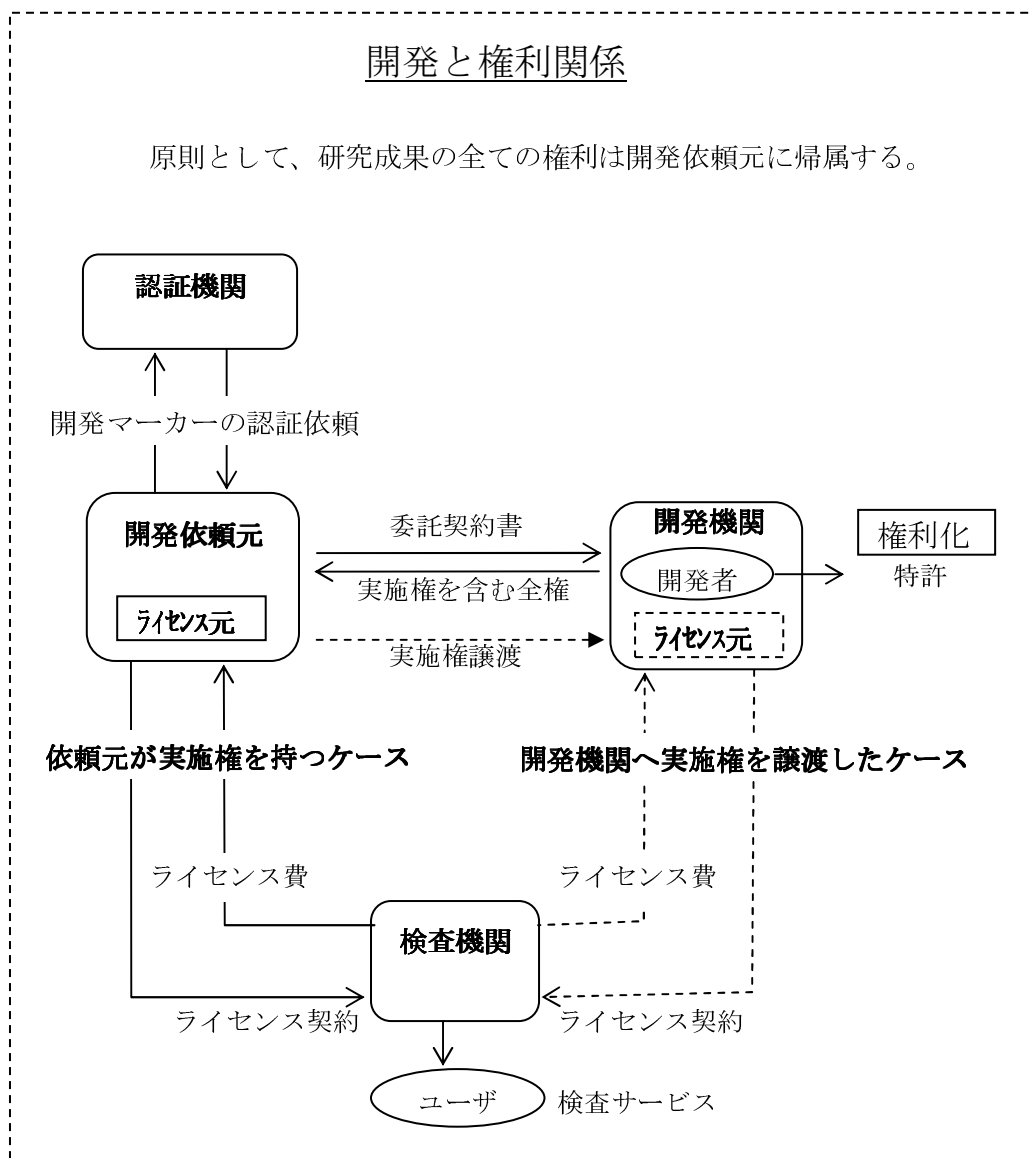


図4 権利化した場合

5. 4. 2 DNA鑑定と責任の所在

DNA鑑定における責任の所在として、ライセンス元、検査機関および認証機関の3機関が存在し、知的所有権を権利化した場合としなかった場合で責任の所在も異なる。

DNA鑑定結果で生じる問題としては以下の事象が予想され、そのときの責任の所在を表2に示す。

(1) 検査作業における瑕疵義務

検査時の作業ミスで結果が正確にでなかった。

検査機関の問題であり、権利関係の責任とは関係ない。

(2) 検査マニュアルの不備

検査マニュアル通りに実施したが検査結果が正確にでなかった。

一般的に検査機関では検査マニュアル採用時に不備を確認するため、通常では起こりえないが、起こった場合は契約条項に従う。

(3) 識別マーカの認証率

定義されている認識率の精度で識別できない。

認証における責任の所在は、権利化の形態に関係なく、妥当性評価を実施した場合、評価した認証機関の責任となる。妥当性評価を実施していない場合は、ライセンス契約の有無で異なり、契約しているときは、ライセンス元の責任となり、未契約のときは検査機関の責任となる。

表2 DNA鑑定と責任の所在

形態	ライセンス 契約		妥当性 の実施	検査結果の責任(検査の瑕疵は除く)		
				ライセンス元	検査機関	認証機関
知的所有権を権利化した場合	必要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	
知的所有権を権利化しなかった場合	不要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	

5. 5 ライセンス費

ライセンス契約を結んでDNA鑑定サービスを実施するときは、知的所有権者に対してロイヤリティの費用を支払う必要がある。一般的にロイヤリティの支払い方法には、「イニシャル費」、「ランニング費」および「イニシャル費+ランニング費」の3タイプがあり、契約時に明確にしておく必要がある。

イニシャル費： ライセンス費として、最初に一度だけロイヤリティ費を支払う。

ランニング費： 1回ごとの検査に対してロイヤリティを支払うもので、検査費用の%で支払う。

イニシャル費+ランニング費： 初期にロイヤリティを支払い、且つ、検査時にも1回ごとのロイヤリティを支払う。

6. DNA鑑定の品質確保

DNA鑑定の実施にあたってISOの取得、また、検査を実施する検査技術者の技術水準を維持するなど、品質を確保することが必要である。

6.1 ISOの取得

DNA鑑定を実施する機関は、国際水準の品質保証を確保するため、ISOを取得することが望ましい。

ISO9001：品質保証の認証

ISO17025：検査所の認定

6.2 技師の育成

DNA鑑定の検査を実施する技師の水準を確保するため、資格制度を設け、検査する技師の技術水準を基準化する。さらに、技術を維持するための仕掛けを設け、変化するDNA鑑定技術に対応できるようにする。

7. 品種識別マニュアルの書き方

【基本的な書き方】

- 1) 表現は大きいや暖かいなどの曖昧な表現ではなく、 $XXX \pm YY$ や $XX^{\circ}C \sim XX^{\circ}C$ の様に数値で表す。色が必要なときは、写真などで貼り付けることが望ましい。
- 2) マニュアル使用の対象者は、当該種を扱った経験の無い検査技師であることを前提に記載する。

【目次】

1. 適用範囲（具体的な適用の範囲や目的を述べる）

このマニュアルで検査できる対象範囲を記載する。

例：北海道立十勝農業試験場で保存している小豆が対象である。対象試料は粒であり、加工品は対象としていない。

2. 一般事項（識別に必要とされる一般的な規格、指針、ガイドなどがあれば記載する） 一般的に注意しておく事項について記載する。

例：

- ・ 本技術については、技術開発元の〇〇が特許出願中（出願番号 XXXX）であるため、業務利用については出願者の許諾が必要である。
- ・ 品種DNAと被検体DNAとの相対値での検査でおこなうこと。
- ・ 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
（平成14年6月20日 （独）農林数遺産消費技術センター）を参照。

3. 測定の方法（測定の方法を簡潔に述べる。識別能力にも言及する）

DNAマーカー及び識別方法の原理について記載する。

例：

- ・ 〇〇を利用した品種特異的マーカーの測定法。××種類の品種識別が可能。
（以下、具体的な品種名を列挙）

4. 識別方法（具体的な識別方法名を記載する）

識別方法の手段について記載する。

例：

- ・ 本技術は、作物の進化過程において発生した、ゲノム上の品種特異的な short sequence repeat (SSR) マーカーの反復回数の違いを、SSRを含んだゲノム領域の増幅鎖長の違いにより識別する、SSR法である。

4. 1 方法の要旨

この方法を用いた趣旨を記載する。

例：

- ・ 近年増加しつつある海外からの〇〇の輸入に際し、国内生産者の育成者権保護のために、類似品種の識別の必要性が増大している。輸入品の場合、輸送・保存のための加工処理により DNA が断片化する場合が多い。SSR 法はゲノム DNA の非常に短い領域のみを検査対象とするため、断片化した DNA でも、高感度かつ高精度に品種識別が可能である。また、本法において利用する××種類の SSR マーカーは品種ごとの多型性が高く、多型間のマーカーサイズの違いも大きいいため、相互に明確な識別が可能である。

4. 2 検査試料

検査試料の種類および量や、入手先の選定理由について記載する。

例：

- ・ 〇〇の葉、子実、葉柄を検査試料対象とし、病害や虫害等の損傷のない健全な組織を用いる。1 サンプルは1 葉、1 子実、または1 本の葉柄（各××グラム程度）とし、複数の検査試料を複数回検査する。検査試料は、依頼元より提供された。基準とする〇〇は、△△研究所より、凍結葉を入手する。入手した検査試料は、-20℃以下に冷凍保存する。

4. 3 購入試薬

購入する試薬を記載する。

例：

- ・ エタノール（96-100%）（和光純薬、Cat No：057-00451）
- ・ マーカーA 特異的プライマーペア（受託会社に合成を発注）

A-F：GACTCGATAGTTACGATC

A-R：TCAGTTACGATCGAGCTA

4. 4 調製試薬

調整・保存方法を記載する。

例：

- ・ マーカー特異的プライマー

滅菌蒸留水を用いて各 10pmol/ μ l に調製。1.5ml チューブに 100 μ l ずつ分注し、-20℃以下で凍結保存。一度検査に用いたチューブに残った溶液は破棄。

4. 5 機器・プログラム

使用する機材を記載する。

例：

- ・ 粉砕器：本法では、水分含量の高い試料に適したものを用いる。分解洗浄、滅菌が出来るものが望ましい。△△は DNA を分解するため使用してはならない。
- ・ DNA 溶液濃縮装置：（品名）遠心濃縮機 （メーカー・型番）TOMY CC-105

4. 6 実験操作

色々な方式があると思われるが、下記の趣旨に従って記載すること。また、各工程において、実験時の注意事項を記載すること。（例えば、泡を取り除いてから処理するなど）

4. 6. 1 操作準備作業

基準を設けて実施する。

例：

- ・ 安全確保：検査者は、白衣、防護用眼鏡、ゴム手袋を着用する。
- ・ 実験準備：恒温槽を〇〇℃に調整しておく。

4. 6. 2 操作場所

実験する場所を記載する。

例：

- ・ 有機溶媒の分注操作はドラフト内で行う。
- ・ DNA 抽出と PCR 増幅反応は別室で行う。

4. 6. 3 試薬及び器具

使用する試薬や機器の種類を記載する。検査の各過程に必要なものをすべて列挙する。

例：

購入試薬

・ DNA 合成酵素 品名：KOD FX メーカー・型番：TOYOBO KFX-101

調整試薬

・ 電気泳動溶液

1) 2000ml プラスチック体積計で超純水 1960ml を計量し、2000ml プラスチックびんに入れる。

2) 50ml ピペットで 50X TAE 40ml を計量し、超純水に加える。

3) 2000ml プラスチックびんの蓋をしっかりと閉め、20 回転倒混和し、電気泳動溶液とする。

(室温で 1 カ月保存可能)

4. 6. 4 試験材料の取り出し

マーカー開発に使用した株や自己検証に用いた株とその調達先を記載する。

4. 6. 5 DNAの抽出操作

操作手順を記載する。

「試料の 2～3 倍程度」、「〇〇の一部を別に取り」などの曖昧な表現を避け、「試料重量の 2.5 倍」、「〇〇の $\times \times \mu$ l を微量分注器で別の 1.5ml チューブに取り分け」など、全ての操作について、具体的な操作が迷いなくできる表現にする。

4. 6. 6 PCR増幅操作

DNAの増幅方法を記載する。(コントロールを入れて確認する)

コントロールは何をどれだけどのように用意するか、なども具体的に記載する。

4. 6. 7 DNAマーカーの検出方法について説明する。

電気泳動によるDNAの分離での検出や、塩基配列読み取りなどの方法の種類、コントロールには何をどれだけどのように用いるか、なども、数量的な表現で明確に記載する。

検出の有無を判断する場合には、たとえば、「〇〇機の $\times \times$ の条件における読み取り結果のピーク値が $\Delta \Delta$ 以上」など、その根拠を明確にする。

4. 6. 8 データ解析、判定

複数回の実験を実施してデータを解析する。

判定基準を明確に記載する。基準値との比較をする場合には、基準値の定義と不確かさおよび検査値とその不確かさを明確に記載する。基準値を複数設定する場合には、それらの利用法とその根拠を記載する。「実験によっては」のでは、正確な判定はできない。

複数の基準値を解析や判定に用いる場合には、その必要性の根拠、用い方などを具体的に明確に記載する。

4. 6. 9 実験操作フロー図

実験手順のジョブフローを記載する。

サンプルから DNA 抽出、識別用反応、識別操作、判定までの全体の流れを、方法の名称（PCR、DNA シーケンサーによる鎖長解析など）とともに 1 枚の図にする。上から下へ、矢印で各作業をつなぐ。

5、トラブルシューティング

実験時のトラブル対策についての Q & A を、上記本文中の記載に対応して記述する。

例：

- ・ DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合

エタノール沈殿で濃縮を行う。

具体的には、 $××\mu\text{l}$ の $\Delta\Delta$ を加え、・・・

(本文の手順中では「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上であることを確認後」などと記載があり、脚注などで、「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合についてはトラブルシューティング参照のこと」と書いておくことが前提)

6、是正処置

是正依頼票など是正が必要と思われる事項についての情報収集をおこなう仕組みを記載する。

例：

- ・ 実験操作内容改善、プロトコールの不明箇所改善、手法改善等に役立てるため、マニュアル使用者に「問題票（別紙 001）」を配布し、記入してもらって回収する。記載された事項について、是正処置担当者は、原因を究明し、適切な是正処置を選択して、是正依頼票を作成する。文書発行責任者の承認後、是正依頼票をマニュアル作成者へ渡し、マニュアル作成者はマニュアルの是正を行う。マニュアル作成者が是正処置を行った場合、審査、承認を経て本プロトコールの「変更改訂履歴」へ内容を記載し、マニュアル使用者へ報告する。是正処置担当者は、是正されたマニュアルの使用者に聞き取りを行い、是正処置が効果的に行われて問題が解決されたかどうかを監視する。問題が解決されない場合は再度、是正処置を行う。

実験操作については操作の順番に従った操作フロー図（作業ブロック図）を付けることが推奨される。

付属文書：（本文規定以外に参考になる文書や文献があればそれらを付属文書として番号をつけて記述する。）

参考文献：（本文での引用文献名、参考文献名とそれらの引用番号を本文に1）、2）のようにつけてその文献名称を順番にリストアップする）

添付資料 2
SSR マーカーによるブナシメジの
DNA 品種識別マニュアル

SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル

ホクト株式会社きのこ総合研究所

Ver2.0
2014/10/20

ブナシメジの DNA 品種識別マニュアルの目次

目次

1. 適用範囲
2. 一般事項
3. 測定の原理
4. 識別方法
 4. 1 方法の要旨
 4. 2 検査試料
 4. 3 購入試薬
 4. 4 調製試薬
 4. 5 機器・プログラム
 4. 6 実験操作
 4. 6. 1 操作準備作業
 4. 6. 2 操作場所
 4. 6. 3 試薬および器具
 4. 6. 4 試験材料の取り出し
 4. 6. 5 DNA 抽出操作
 4. 6. 6 DNA の定量
 4. 6. 7 PCR 増幅操作
 4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験
 4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法
 4. 6. 10 データ解析、判定
 4. 6. 11 実験操作フロー図
5. トラブルシューティング
6. 是正処理

付属文書：

1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細
2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

別添資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

この目次リストはDNA鑑定学会の様式に準拠したものです。

1. 適用範囲

ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) は、今日ではシイタケ、エノキタケに次ぐ第 3 位の消費量を誇る食用きのこで、きのこの需要が増大した結果、日本などで広く栽培され、流通している。国内生産量が増加し、現在では多くの品種が農林水産省に登録されるに至った。

品種登録では、ブナシメジの重要な形質に基づいて品種が判断されるため、栽培試験による特性調査を行う必要がある。そのため品種を識別するためには数ヶ月の期間を要する。品種識別の簡易的な方法として、審査基準 (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>) にあるように、対峙培養試験が有効とされているが、対峙培養試験であっても品種を識別するには 1.5 ヶ月程度要する。税関で育成者権侵害物品を取り締まるためには、短期間で侵害嫌疑貨物を疎明することが必要となる。

そこで、ブナシメジの品種識別法を確立することを目的に、ブナシメジにおいて多数の SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) 領域を同定し、そのうちの 6 種類の品種識別に有用な SSR マーカーを開発した。このマーカーにより当社保有の登録品種「ホクト白 1 号菌(品種登録番号:第 13294 号)」と、持ち込まれたサンプル品種との異同の鑑定が可能である。

基準品種：ホクト白 1 号菌 (品種登録番号：第 13294 号)

被検査物：子実体 菌糸体 (ブナシメジ加工品は対象外)



図 1 子実体 (左図) と菌糸体 (右図)

2. 一般事項

本 DNA 品種識別マニュアルは、ホクト株式会社きのこ総合研究所 (長野県長野市下駒沢 800-8) で維持・栽培されている既存栽培品種の 10 品種 (ホクト白 1 号菌、MH025014、MH025016、MH025019、MH025022、MH025066、MH025091、MH025146、MH025217、MH025374)、野生品種である 10 品種 (MH025038、MH025045、MH025046、MH025054、MH025070、MH025092、MH025097、MH025121、MH025160、MH025339)、そして市販されている 10 品種 (MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528) の計 30 品種を用いて、解析・作成されたものである。

本 DNA 品種識別マニュアルは、子実体または菌糸体から抽出した DNA を用

いて、SSR マーカーによる分析法を確立し、マニュアルとして作成したものである。

3. 測定の原理

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略称であり、法医学では、Short Tandem Repeat と呼ばれ、STR と略称されている。SSR 分析は、2～数塩基の反復配列からなる SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用い、PCR 法で増幅した DNA 断片の長さの差異（遺伝子型）を検出する方法である。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいとされており、DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種間でも判別が可能である。その測定手順は、

- 1) ブナシメジのサンプルから、ゲノム DNA を抽出する。
- 2) SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、ブナシメジのサンプルから抽出したゲノム DNA とホクト白 1 号菌のゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。PCR の際に、一方のプライマーの 5' 端に蛍光標識したものをを用いる。
- 3) 蛍光 DNA シーケンサーを用いて、PCR 増幅産物を電気泳動で分離し、検出する。
- 4) 内部標準のサイズスタンダードを基に、フラグメント解析用ソフトウェアを用いて、PCR 増幅産物の長さとして遺伝子型を決定する。
- 5) 2)～4)を 3 回、反復実験を行い試験結果に矛盾がないか検討する。
(トラブルシューティング参照)
- 6) サンプルのブナシメジがホクト白 1 号菌と同一品種であるかを照合して判定する。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカーを 8 種類用いた識別方法である。

4. 1 方法の要旨

ゲノム中に豊富に散在している 4 塩基以上の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異を蛍光 DNA シーケンサーで分析する。SSR 領域はその反復回数に突然変異を起こやすく、塩基置換と比較して変異頻度が 1～2 ケタ大きいとされている。

本マニュアルで利用する 8 種類の SSR マーカーは、ホクト株式会社のこの総合研究所保有菌株「ホクト白 1 号菌」のゲノム DNA 配列を次世代シーケンサーによって決定し、得られた配列を基に 4 塩基以上の反復配列を探索し、開発したものである。「表 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの特徴」と「付属文書 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細」に詳細なデータを記している。

表1. ブナシメジ品種識別に用いる8種類のSSRマーカーの特徴				
SSR マーカー	アニー リング 温度(℃)	プライマー配列 (5'-3')		ターゲッ トサイズ (bp)
		Forward	Reverse	
msHm-1	59	CGAGTGTTCATCGCTGT	GCTGATGATGCTCGTTGATG + Tailed option	132
msHm-2	59	AAGCTGCGAGAATCCACTC	ACCGTCCGTGAGAATACGAG + Tailed option	77
msHm-3	59	GAGGTGTGCGTTCTCGTTCT	GCACCAGTACCTACGCCAAC + Tailed option	139
msHm-4	59	ACCCGGAAATAGAACGAGAG	CAACCTCTGTTCAACCACTC + Tailed option	150
msHm-5	59	CAGAAGGCTGTCCTCACACA	GAGCCGATCAAGAACCGATA + Tailed option	256
msHm-6	59	CCGTTGTGGGTTAGGTCAA	TAGTATGTGTAGGCGACAAAGG + Tailed option	126
msHm-7	59	GGAAGAGAGGGAGGCAAAAA	GTCGACGGTTATTTTCAACG + Tailed option	131
msHm-8	59	ATCACGCATATACGCACCC	CACCTCTCGCAGGTATGGAC + Tailed option	242

4. 2 検査試料

ブナシメジの子実体、菌糸体を検査試料対象とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。1 サンプル 1 子実体、または 1 菌糸体とする。

基準とするホクト白 1 号菌の DNA、もしくは子実体、菌糸体は、ホクト株式会社きのか総合研究所より入手する。入手した検査試料は、4℃で保存する。

4. 3 購入試薬

<一般試薬>

- ・ フォルテクターⅡ(消毒用エタノール)(日本化薬フードテクノ株式会社)

<DNA抽出関係>

- ・ Plant Geno-DNA-Template™ (Geno Technology社, code: 786-135)

Template Extraction Buffer

pink RESIN

Wash- I

Wash- II (要調製)

スピンカラム

TE Buffer

RNase

- ・ クロロホルム(Wako, code:038-02606)
- ・ エタノール(99.5) (Wako, code:057-00456)

<PCR 関係>

- ・ SSR プライマーセット (ABI Prism 社)

表 1 に記した msHm-1~8 の 8 種類のマーカーを増幅するプライマーセットを使用する。蛍光プライマーの合成には、必ず ABI Prism 社受託合成サービスの DNA フラグメント解析用カスタム蛍光プライマーを利用する。フォワードプライマーの 5'端に VIC で蛍光ラベルしたものをを用いる。リバープライマーは、ノンラベルとし、オプションでテイル配列を付ける。

※ABI Prism 社のテイル配列は非公開となっているため、本マニュアル通り

の結果を出すために、蛍光プライマーの合成は ABI Prism 社で行うこととする。

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)
 <電気泳動関係>
- ゲルローディング溶液 (シグマアルドリッチジャパン社)
- DNA マーカー 100bp DNA Ladder One (ナカライテスク社)
- TBE バッファー (10x) (Tris-Borate-EDTA buffer 10x) (シグマアルドリッチジャパン社)
- Agarose 900 (株式会社 同仁化学研究所)
- エチジウムブロマイド溶液 (滅菌超純水に 0.5-1.0 μ g/ml の濃度でエチジウムブロマイドを加えた溶液)
 <フラグメント解析関係>
- Genetic Analyzer Buffer with EDTA (アプライドバイオシステムズ社)
- Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ社)
- 3130 POP-7 ポリマー (アプライドバイオシステムズ社)
- 3100/3130xl 50cm Capillary Array (61cm $\times$ 50 μ m、アプライドバイオシステムズ社)
- GeneScan 600LIZ サイズスタンダード (アプライドバイオシステムズ社)

4. 4 調製試薬

- SSR プライマー溶液
 8 組の蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーのペアを、それぞれ 10pmol/ μ L の濃度になるように滅菌超純水に溶解した溶液を、8 マーカーそれぞれに対応して用意する。
- Wash- II
 使用前に 99.5%エタノールを 80ml 加え、ストック溶液として保存する。
- TBE バッファー (10x)
 使用時に、超純水で 10 倍希釈したものを以後使用する TBE バッファーとして用いる。
- 70%エタノール (DNA 抽出用)
 99.5%エタノールを滅菌超純水希釈して 70%エタノールを調製する。

4. 5 機器・プログラム

- フリーザー (−20℃以下)
- 凍結乾燥機 (EYELA FDU-1100)
- ボルテックスミキサー
- 高速冷却遠心機 (1.5-2 ml チューブが利用可能なもの)
- 分光光度計 (Thermo Scientific 社 Multiskan GO)
- PCR Thermal cycler (BIO-RAD 社 C1000 Thermal Cycler)
- 電気泳動装置 (アドバンス社、Mupid など)
- 紫外線照射装置
- 振盪装置

- ・ 電子天秤
- ・ オートクレーブ
- ・ 超純水製造装置
- ・ 恒温機（ヤマト科学株式会社 DG400）
- ・ Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）
もしくはこれに準じる蛍光 DNA シーケンサー
- ・ Gene Mapper ソフトウェア（アプライドバイオシステムズ社）
※フリーソフトである Peak Scanner software でもサイジングが可能

4. 6 実験操作

4. 6. 1 操作準備作業

DNA 実験操作は、実験開始前に実験台上を 70%エタノールで消毒する。また、無菌作業が必要なときはクリーンベンチを使用する。実験操作時は、白衣、上履きを着用し、各操作に応じてゴム手袋、眼鏡、マスクを着用する。

4. 6. 2 操作場所

DNA 抽出から PCR 増幅、DNA シーケンサー分析まで、供試サンプル以外の DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

4. 6. 3 試薬および器具

- ・ 上記の購入試薬、調製試薬
- ・ 滅菌超純水
- ・ ポテトブドウ糖寒天培地（分包：造粒タイプ）（関東化学株式会社）
- ・ ラップ
- ・ アルミホイル
- ・ 輪ゴム
- ・ 新聞紙
- ・ 9cm 滅菌シャーレ
- ・ スパーテル
- ・ 白金耳
- ・ メス
- ・ ピンセット
- ・ ステンビーカー(容量 1000ml)
- ・ ソレックス SH 容量 5ml(連続式自動分注器)（アズワン株式会社）
- ・ 1.5 ml チューブ
- ・ 2 ml チューブ
- ・ パラフィンフィルム
- ・ ホモジナイゼーション用ペッスル（フナコシ社）
- ・ マイクロピペット各種容量
- ・ マイクロピペット用チップ
- ・ 96 穴 PCR プレートまたは 8 連 PCR チューブ（アプライドバイオシステムズ社）

ズ社)

- ・ PCR 用 96 穴シーリングマット
- ・ 96 穴プレートセプター

純水は電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C) 以下になるように脱イオン化されたものをさらに精製した超純水を用いる。滅菌水は超純水を 120°C、20 分間オートクレーブで処理したものを用いる。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等のグレード）を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、オートクレーブ滅菌(120°C、20 分)し、その後、60°Cに設定した恒温器に入れ、完全に乾燥してから用いる。

4. 6. 4 試験材料の取り出し

サンプルの取り出し・取り扱い時には、サンプル間で相互に混入しないように、サンプル毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行うとともに、マスクを着用し唾液などの飛散を防ぎながら操作に細心の注意をはらう。

子実体を検査試料対象とする場合（図 2 参照）、汚れていない子実体の内側を使用するため、傘部分と柄の部分を取り分け、柄の部分の外皮を削ぐように切り落とし内側を露出させる。それをメスとピンセットを用いて 5mm 角程度の大きさに切り分けて 2ml のチューブに 8 粒程度入れ、-20°C以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。

図 2 および後述の図 3 では手袋を未着用であるが、サンプルに素手で触れてしまう危険のある場合は手袋を着用することでコンタミのリスクを軽減させることができる。

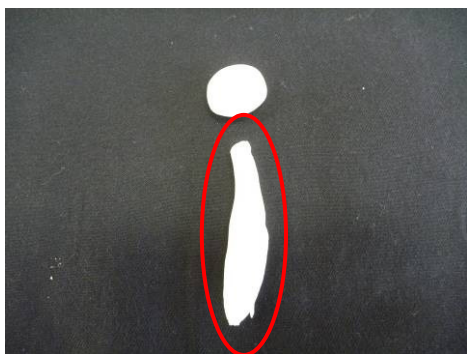


図 2-1 子実体ブナシメジ
赤丸の部分を使用する



図 2-2 子実体の外側部分を削ぐ



図 2-3 5mm 角に試料を裁断する



図 2-4 2ml チューブに試料を入れ完成

菌糸体を検査試料対象とする場合、まず、ポテトデキストロース（PDA）平板培地を 9cm シャーレに作製する。ポテトブドウ糖寒天培地分包 1 袋をステンレスビーカーに開け、超純水 400ml 加えてよく混和する。ラップをし、アルミホイルで蓋をして輪ゴムでとめる。ソコレックス SH をアルミホイルで包み、さらに新聞紙で全体を包み輪ゴムでとめる。ポテトブドウ糖寒天培地とソコレックス SH をオートクレーブで 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌をする。培地が 60℃まで冷めたらクリーンベンチ内で、ソコレックス SH を用いて、ポテトブドウ糖寒天培地を 9cm 滅菌シャーレに 16ml ずつ分注する。25 枚ほど作製できる。培地が固まるまで 1 時間ほどクリーンベンチ内で静置する。作製した PDA 平板培地 4 枚(予備 1 枚含む)の中央部付近に、クリーンベンチ内で菌糸体または子実体の小片を接種し、25℃、2 週間培養後、気中菌糸を集菌する（0.1g-0.5g で可、0.3g が適量）。集菌方法は図 3 参照。まず、スパーテルを用いて菌糸を集める。このとき、寒天培地を削り取らないように注意する。次に、集めた菌糸を 2ml チューブに入れる。2ml チューブ 1 本に PDA 平板培地 3 枚分の気中菌糸を集菌し、-20℃以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。



図 3-1 スパーテルを用いて菌糸を集める



図 3-2 全体から集菌しまとめる



図 3-3 集めた菌糸を 2ml チューブに入れる



図 3-4 1 本につき 3 片ほど入れて完成

いずれの場合も、DNA 抽出の際には、凍結乾燥機からサンプルを出して、できる限り短時間(15 分以内)に扱うことが重要である。室温で長時間放置すると吸湿し、糖質がでてくるため、粉碎が困難になる。なお、凍結サンプルを保存したい場合は-20℃以上のフリーザーで、2ml チューブにパラフィンフィルムをまいて保存するようにする。

4. 6. 5 DNA 抽出操作

基本操作は、Geno Technology 社の Plant Geno-DNA-Template™ のプロトコルに従っている。なお、抽出工程が多く 2 時間程度要するため、マスクおよびゴム手袋を着用し、クロロホルム使用時には眼鏡を使用することで安全を確保するとともにコンタミのリスクを軽減できる。

1. 4.6.4 で 2ml チューブに作製した凍結サンプルを凍結乾燥し、ホモジナイゼーション用ペッスルを用いてそのサンプルを粉状になるまで丁寧に粉碎する。
2. 300μl の Template Extraction Buffer を添加し、ホモジナイゼーションペッスルでさらにサンプルをすりつぶした後 300μl の Template Extraction Buffer を加えて合計 600 μl とし、室温で 20 分間放置する。
3. 200μl のクロロホルムを添加し、数回反転させて混合する。

4. 冷却遠心機で、15,000 x g、15 分間、室温で遠心する。(この遠心中に、恒温機を 60℃に設定し、その中に TE buffer を入れて温めておく)
5. 4 の遠心分離で得られた上清 (クロロホルムの下層、菌糸体の凝集物である中間層、Buffer に DNA が溶出している液の上層のうちの上層のこと) を、新しい 1.5ml チューブに回収し、等量(約 600μl)の 70%エタノールを添加する。

上清を回収する際、上清と沈殿したクロロホルムを混合しないために、中間層にある粉碎した子実体または菌糸体の凝集物に触れないよう静かに上清を吸い取るようにする。また、70%エタノールを添加する際、上清との境界を乱さないよう、チューブ壁を伝わらせて静かに重層する。ここで 70%エタノールを上清と混合してしまうと DNA の収率が著しく低下してしまうため、細心の注意を払う。
6. 40μl の *pink* RESIN を添加後、数回反転させて混合し、室温で 5 分間放置(ときどき混合して懸濁状態を保つ)。なお、*pink* RESIN は使用前にボルテックスまたはピペッティングを激しく行い、溶液を均一な状態にすること。また、*pink* RESIN は顆粒状の物質を多く含んでいるため、ピペットチップの先端をはさみで斜めに切り、孔を大きくすることで先端での顆粒の詰りを防ぐことができる。
7. 12,000xg、5 分間、室温で遠心し、デカンテーションして上清を除去する。
8. チューブをタッピングして沈殿をほぐし(ボルテックスミキサーを用いてはならない)沈殿がほぐれたことを確認してから、500μl の Wash- I を添加して *pink* RESIN をタッピングでさらに懸濁する。
9. 12,000xg、5 分間、室温で遠心し、上清を除去する。
10. 新しい 1.5ml チューブにスピнкаラムをセットし、そこに 500μl の調製済みの Wash- II に再懸濁 (※8 と同様の操作を行い、沈殿がしっかりほぐれるまで懸濁すること) した *pink* RESIN を添加する。
11. 10,000xg、2 分間室温で遠心し、溶出された洗液を除去し、調製済みの Wash- II で同様に、さらに 2 回遠心洗浄する。この洗浄の際にスピнкаラム内でメンブレンにピペットの先が触れないようにピペッティング操作を行い、しっかりとペレットを洗うことにより抽出される DNA の品質が向上する。また、2 回目の遠心はカラムから洗液を完全に除去するよう、10 分間行う。
12. スピнкаラムを新しい 1.5ml チューブに移し、1μl の RNase と 50μl の TE Buffer (50~60℃)を添加して、ピペットチップを用いて RESIN を懸濁し、室温で 10 分間静置する。
13. 3,600xg、10 分間、室温で遠心し、DNA 溶出液を得る。DNA 溶液は 4℃保存する。長期保存の場合は -20℃保存し、凍結融解を繰り返さないように注意する。

4. 6. 6 DNA の定量

抽出したDNAの定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。本マニュアルでは、分光光度計による定量を行う。本分析については通常の分子生物実験でのDNA濃度測定法に準じたものであればよい。なお、石英セルを使用する場合、セルを直接素手で触れて光路面を汚さないためにゴム手袋を着用する。

1. 5 μ l のサンプル DNA に 995 μ l の滅菌超純水を添加し、DNA 溶液を 1/200 に希釈する。
2. 260nm と 280nm の吸光度を測定する(図 4 参照)。
260nm/280nm の値の比が 1.8-2.0 になることを確認する(トラブルシューティング参照)。
DNA濃度計算は吸光度 1 の時の濃度が50 μ g/ml であるので、
DNA 濃度 (μ g/ml) =260nmの吸光度 $\times$ 50 $\times$ 200で計算できる。
3. SSR分析用に、100ng/ μ l (50-100ng/ μ l) の調製DNA溶液を、滅菌超純水を溶媒として作成する。
4. 元の DNA 溶液は-20 $^{\circ}$ C以下で凍結保存し、調製 DNA 溶液がなくなるまたは調製DNA 溶液を作成してから1ヶ月程度経過した際に再度融解し、調製 DNA 溶液を作成するようにする。なお、凍結・融解を繰り返して使用するのはこの調製 DNA 溶液とする。

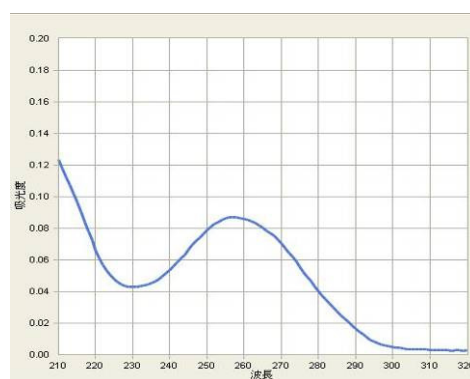


図 4 分光光度計を用いた DNA の波長

このような山成の形状になり、260nm付近に
ピークがくる形が望ましい

なお、NanoDrop などの微量サンプル測定機器による DNA 吸光度の測定でも同様の結果が得られればサンプルを使用してよい。

4. 6. 7 PCR 増幅操作

PCR 増幅操作は以下の通りである。なお、PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混

入を防止しなければならない。コンタミネーション防止のため、実験の際はマスクと手袋を必ず着用する。また、PCR 反応液の調製はすべて氷上で行う。

1. PCR反応液の調製（1 サンプル分）

サンプル DNA 溶液（20 ng/μl）	1.0 μl
調整済み SSR プライマー溶液	1.0 μl
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	10.0 μl
滅菌超純水	8.0 μl
合計	20.0 μl

なお、SSR マーカー毎の組成の誤差を防ぐために、例えば 30 品種測定する場合、30 サンプル分+ロス分を見込んだ量(31 サンプル分)の、サンプル DNA 溶液を除く試薬の混合液を予め作成し、チューブに 1 反応分ずつの液量を分注してから、各々のチューブにサンプル DNA 溶液を加えるようにする。

2. PCR システムを用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

※不必要な PCR 産物の増幅を最小限に抑えるため、ステップダウン PCR 法を用いて行う。これによりフラグメント解析が容易になる。

- ・ 95℃10 分間熱変性。
- ・ 95℃30 秒間、62℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- ・ 95℃30 秒間、60℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- ・ 95℃30 秒間、58℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、35 サイクル。
- ・ 72℃7 分間の反応後、4℃で∞。

3. 反応終了後にサンプルを保存する場合は、プライマーの蛍光標識を失活させないようにするためアルミホイルで遮光し、-20℃で保存する。

4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験

4. 6. 7 で作成した PCR 産物の増幅を確認するため、アガロースゲル電気泳動を行う。増幅が確認された場合は 4. 6. 9 へ、増幅がみられなかった場合にはトラブルシューティングを参照し、再度 4. 6. 7 の PCR 増幅操作を行い、産物を得るようにする。

なお、得られた産物は今後の試験に使用する可能性が高いため、コンタミを防ぐためにマスクとゴム手袋を必ず着用する。

1. 泳動用アガロースゲルと泳動用バッファの作成

TBE バッファを、電気泳動装置に入れ、また 200ml 程度の三角フラスコに TBE バッファ 70ml と Agarose 900 を 1.05g 加えて濃度が 1.5% のゲルを作成する。フラスコにラップをかけて電子レンジで溶解させる。このとき、突沸が起きないように 500W を数十秒単位でかけながら内部を確認する。一度

かけたら、アガロースを融解させるようにゆっくりとフラスコを回すように混ぜる。内部にアガロースの粒が見えなくなったら、ゲル板に溶液を流し込んで固まるまで静置する。

2. サンプルの泳動

ゲルが作成できたら、電気泳動装置に入れてゲルが浸ることを確認してからアプライを行う。サンプルの一部 (5 μ l) を未使用の PCR チューブまたは 8 連チューブに移し、そこにゲルローディング溶液を 1 μ l 加えて計 6 μ l とする。一番左に 100bp のラダーマーカを 5 μ l アプライし、その他のサンプルも順次アプライする。アプライが完了したら、100V25 分または 125V20 分で泳動を行う。この条件に関してだが、バンドがしっかり分離でき、産物の有無が確認できればよいので電圧と時間は適宜変更してもかまわない。

3. ゲルの染色

泳動が完了したら、300ml の純水にエチジウムブロマイド溶液を 3~5 μ l 混合したゲル染色液を作成し、その中に泳動したゲルを浸して 20~30 分ほど浸透し、染色する。染色後、手袋をした手でゲルを紫外線照射装置にのせ、254nm や 366nm などの紫外線を照射する。図 5-1 のようにバンドが確認されたらそのサンプルを 4. 6. 9 のフラグメント解析に用いる。

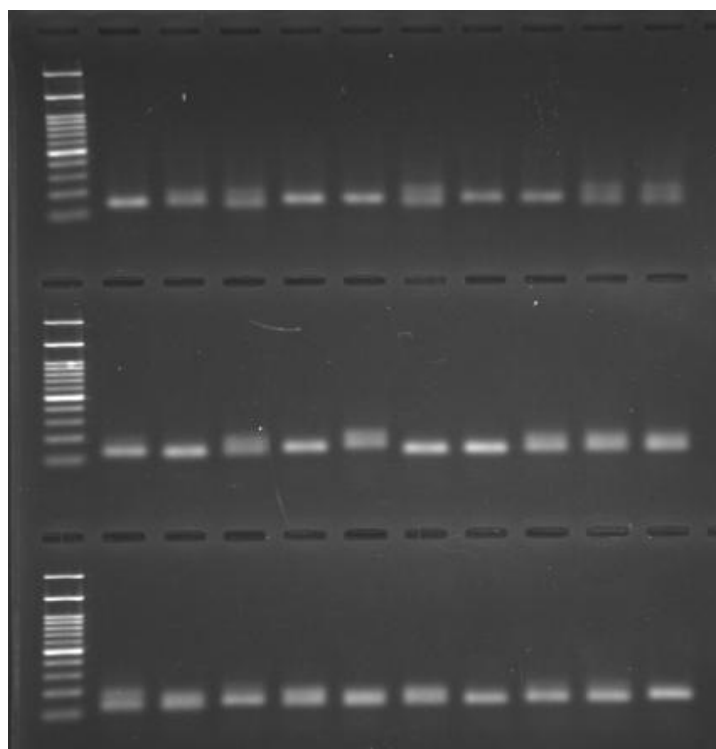


図5-1 msHm-1 の電気泳動図 30 菌株すべてで増幅がみられる
このようにマニュアル記載のバンドを確認することで次のフラグ
メント解析をスムーズに行うことができる

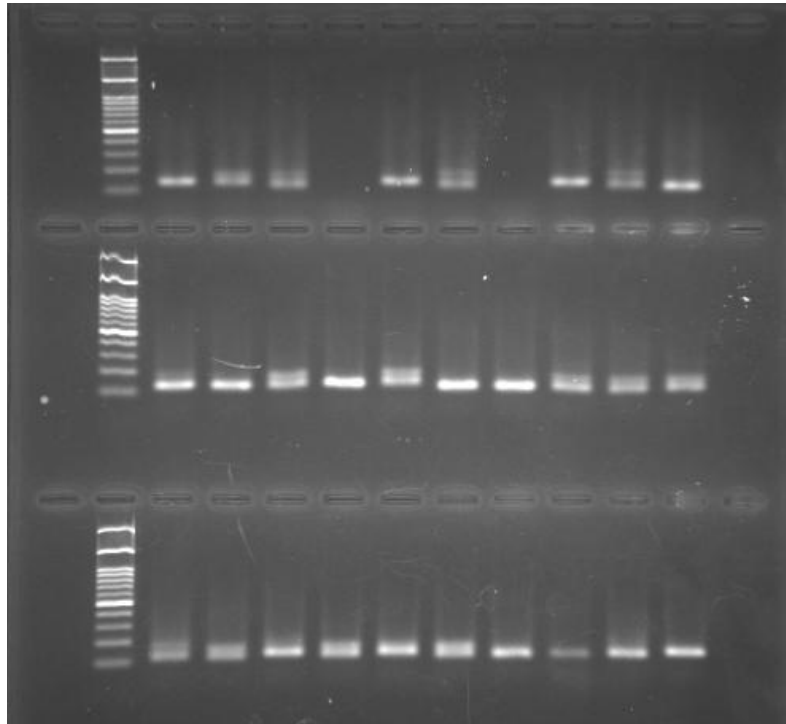


図 5－2 msHm-1 の電気泳動図 2 か所で増幅がみられない
 この場合トラブルシューティングを参照し、すべての菌株でバンドが
 見える様に再度 PCR を行う。

4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法

前項で得た SSR マーカーによる PCR 産物を DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、アプライドバイオシステムズ社のフラグメント解析のプロトコルに従って行う。

1. 前項で得た PCR 産物を、滅菌超純水で 100 倍から 500 倍に希釈する。希釈倍率は、PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で行う。(トラブルシューティング参照)
2. 1.0 μ l の希釈 PCR 産物、0.2 μ l の 600LIZ サイズスタンダード、10 μ l の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレートに入れ混合し、シーリングマットで蓋をする。
3. PCR システムなどを用いて、95℃3 分間熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。※サーマルサイクラーのプログラムを使用し、95 度 3 分間の反応後、4℃で ∞ とすることで同様の反応として扱うことができる。
4. Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer のプロトコルに従い、50cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用のバッファー (Genetic Analyzer Buffer with EDTA) を用いて、分析を行う。
5. Gene Mapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

4. 6. 10 データ解析、判定

表 2 にホクト白 1 号菌の 8 SSR マーカーの遺伝子型(フラグメント長)を示した。フラグメント長は 600LIZ サイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで 2 つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで 2 本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。付属文書 2 に、全 8 種類の SSR マーカーでの既存栽培品種の 10 品種 (ホクト白 1 号菌、MH025014、MH025016、MH025019、MH025022、MH025066、MH025091、MH025146、MH025217、MH025374)、野生品種である 10 品種 (MH025038、MH025045、MH025046、MH025054、MH025070、MH025092、MH025097、MH025121、MH025160、MH025339)、そして市販されている 10 品種 (MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528) の計 30 品種の 8 SSR マーカーの遺伝子型を示した。この計 30 品種を 8SSR マーカーで識別を行ったところ、すべての品種を区別することが可能であった。

表 2.ホクト白 1 号菌の 8SSR マーカーの遺伝子型 (フラグメント長)

	SSRマーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	133	67/79	145	155	269	130	132	243

SSR マーカーの開発時に、プライマー対の Tm 値、プライマーダイマーやヘアピン構造を考慮して、プライマーを作成している。50℃～63℃までアニー

リング温度を検討して、至適アニーリング温度の決定を行い、波形を安定させるためのテイル配列をプライマーに付加している。

以下、データ解析、判定に際しての注意点を記す。

1. まず、全ての蛍光色素を表示して波形を確認する。次に VIC の蛍光色素である緑色のピークのみを表示して解析を行う。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントのピークとして検出されるはずのない色が検出されることがあり、ターゲットのフラグメントの正しい値を表していないことがある。その場合は、原則として高い値を示している上位二本のピークを選びこれを遺伝子型とする。
2. PCR 増幅産物はサイズスタンダードのピークと比較して適正な希釈濃度にする。PCR 増幅産物の希釈濃度が低い場合、サイズスタンダードのピークと比較して、サンプルのピークが低くなる。最も高いフラグメントのピークがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合は別の低いフラグメントのピークを見落とす危険があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈倍率を 2 倍～4 倍程度低くして、濃度のより高い希釈液を作製し直し、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとピークの大きさが検出限界を超えてしまい、ピークの先端が表示されない（波形の相対値が 10000 を超えている）。この場合、フラグメントのサイズデータが正しく表示されないため、PCR 産物の希釈倍率をさらに 5～20 倍希釈してピークが上限を超えないように調製する。（図 6-1）
3. サイズスタンダードの波形を確認する。フラグメント解析におけるピークの数値は、サイズスタンダードのピークサイズをもとに作成した検量線によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できず、結果が表示されない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析を 4. 6. 9 の 2 からやり直す。

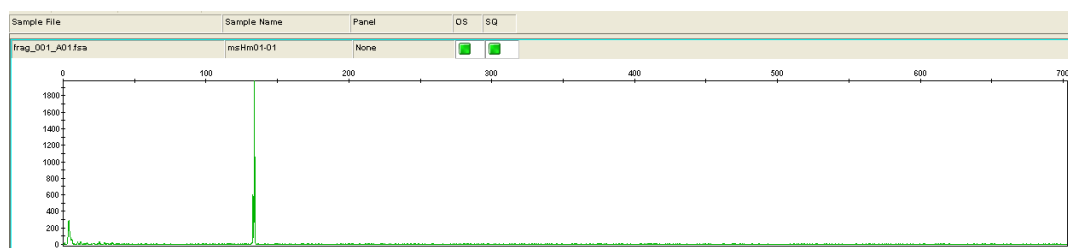


図 6-1 フラグメント解析結果の例①

ピークが 2 箇所のみに表示されており、そのピークの値も上限を超えていない。OS, SQ という表示が緑印になっている。サイズスタンダードの波形、サンプルの波形がともに安定しているということであるため、信頼性の高いデータといえる。



図 6-2 フラグメント解析結果の例②

ピークが 2 箇所のみに表示されているが、ピークの値が 10000 程度の高い値になってしまっており、ピークが高すぎるためにサンプルの波形に信頼性がないということで黄色い三角印 (OS) が表示されてしまう。図のように単一のバンドしか検出されない場合はアリルを決定することが可能であるが、複数 (2 本) のバンドが出現してしまった際に、それが非特異的なものか判断するのが非常に難しくなるため、そのような波形は望ましくない。複数のピークが出てしまって判断できないときは希釈倍率を変更して再度フラグメント解析を行う。

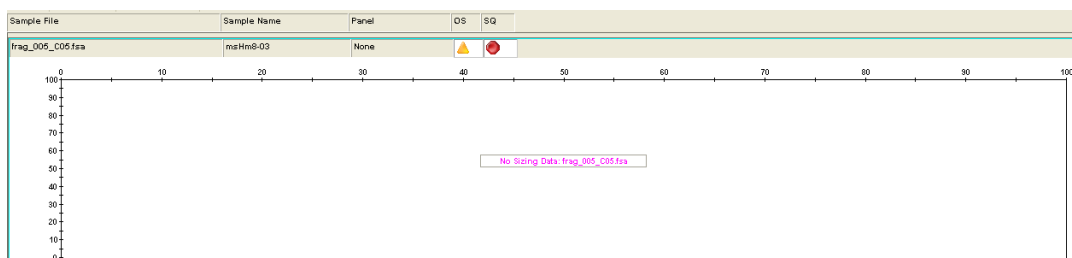


図 6-3 フラグメント解析結果の例③

解析を行ったが波形がみられない状態。この場合 SQ に赤い丸が表示され、上図のような画面が表示される。要因の一つとしては、サイズスタンダードとサンプルの濃度が濃すぎたために泳動がうまくいかなかったことが考えられる。サイズスタンダード、サンプルともにピーク値が 100 程度あれば検出可能であるため、なるべく低濃度に調製して再度泳動を試みることによって改善される可能性が高い。

4. 6. 1 1 実験操作フロー図

サンプル採取	ブナシメジ子実体もしくは菌糸体 ↓
DNA抽出	Plant Geno-DNA-Template™キットを用いる方法または、同等の濃度及び純度のDNA が抽出できる方法 ↓
DNA 濃度測定 (分光光度計)	DNA量の確認、DNAの質の確認(吸光度260nm/280nm比)、DNA溶液 (20ng/μl) の調製 ↓
PCR増幅	PCR反応液 ↓ ※ 4. 6. 7 参照 PCR 産物の増幅を電気泳動で確認 ↓ 産物ありの場合は次のステップへ ↓ 産物がない場合は再度 PCR 反応を行う
フラグメント解析	希釈PCR産物+サイズスタンダード+Hi-Di Formamide ↓ DNAシーケンサー分析 ↓ GeneMapperソフトウェアによる解析、遺伝子型決定 ↓ 同じパターン ↓ ホクト白1号菌と同一品種の可能性あり 栽培試験等のさらなる詳細な解析が必要 ↓ 違うパターン ↓ ホクト白1号菌と同一品種ではない (解析終了)

5. トラブルシューティング

問題点	対応
1. 反復実験で同じ結果が得られない	鋳型とする DNA (テンプレート DNA) とプライマーがすべての試験で同一の場合、PCR で増幅される産物は原則として同一のものが得られるはずである。従って、反復実験で同じ結果が得られない原因としては①テンプレート DNA が純粋なものではない②フラグメント解析での希釈率が適正でないため波形が安定しない、の2つがあげられる (②に関しては後述のトラブルシューティングを参照)。 よって、同一の結果が得られなかった場合は 1) の DNA 抽出までさかのぼり、実験を再度行う必要がある。
2. 抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない	分光光度計を用いて抽出した DNA の純度を測定した際、図 4 のような波形にならなかった場合、まず 260nm の部分にピークがあるかどうかを確認する。ピークがあった場合、そのまま次の行程に進み、PCR 産物が増幅されたらそのままテンプレート DNA として用いてよい。増えなかった場合はトラブルシューティング「SSR-PCR 反応で増幅がうまくいかない」を参照。ピークがなかった場合は、再度 DNA 抽出を行う。その際、試料をより細かくホモジナイズすること、上清を取るときに下層と混じり合わないことなどを注意すると改善される可能性がある。

3. PCR 反応で増幅がうまくいかない (産物が得られない、非特異的なバンドが多数出現する等)	抽出 DNA の質や夾雑物の混在に問題がある場合(抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない場合)、テンプレート DNA を滅菌超純水で 5-10 倍希釈することで、増幅が向上する場合がある。希釈しても増幅が見られないときは、再度 DNA 抽出を行う。 PCR 機の温度制御は、メーカー／機種によって異なるため、PCR Thermal cycler は BIO-RAD 社 C1000 Thermal cycler を推奨機器としている。異なるメーカー／機種を用いて、SSR-PCR 反応の増幅が悪い場合、アニーリング温度を 2-5℃下げる。一方、非特異的なバンドが多数出る場合(図 5-2)には、アニーリング温度を 2-5℃上げる。
4. フラグメント解析の際に波形がみられない	蛍光標識をつけた PCR 産物は光に弱く、遮光保存を行わないと失活してしまう。PCR 産物を作成し、それらを保存しておいてから後日フラグメント解析を行った際に波形がみられなかった場合、PCR 産物が失活している可能性が高いため、再度 PCR からやり直す。 図 6 より、SQ が赤丸で表示されて波形がみられない場合は、全体の濃度を 1/5 ～1/10 程度に希釈して再度泳動を試みる。

6. 是正処置

本マニュアルの使用者からの情報収集として、改善依頼票を設けて情報交換を行い、必要に応じてマニュアル等の是正措置を行う。

付属文書：

1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細
2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

別添資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

付属文書 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細

※注 付属文書 1 は、Roche GS-FLX の結果を基に作成した参考データである。実際は、配列をアセンブルする際に Variant が複数箇所存在するので本来の配列とは数塩基程度異なる場合がある。そのため、プライマー 1 とプライマー 2 で挟み込まれている塩基数と本文中で表記されているフラグメント鎖長には差が生じているが、本文のフラグメント鎖長を基準とする。

SSR マーカー名：msHm-1

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：CGAGTGTTTCTCATCGCTGT<青字>

プライマー 2**：GCTGATGATGCTCGTTGATG<青字>

反復モチーフ：(ACCAGC)6<赤字>

塩基配列**：

```
AATTGTCCAA CTGTCTCTAT AAACAATTGT CCAACTGTCT CTATAAACTC
GTGCGTAAGG ATCGTGCTTA TAATTGAACG TTTATCCTGA CATCTAGCCA
GCTTCCCGCA ACCGATCCCT CAAAAACAT TTGTACCAGG ATGGGCCTTT
CTGGATGTGA AGGTAGCGTA TGCTTCGCTC CCACTGCGAC AAGTCTCATG
ACTTTGTCCA GGCGAATGAC ATGTTTGAGC AGGCGAATGC TAAACAGAAC
GCAAGTAAGT ATTGACATCT GTACATTTCG AGTGTTTCTC ATCGCTGTAT
CTGAAGATAT AACCGAGTCG ACGGCTGCCC CTTCCCCCAG CAAGACCGAC
ACCAGCACCA GCACCAGCAC CAGCACCAGC ACCAGCATCA CATCAACGAG
CATCATCAGC GCCACCACAT CCACGACGTT TCTTGCGAGC AGTCCATCAT
CACCTGTTAC TACAGCCGAT TCCGCCTCCA CTAGCGAGAC AGCGGCGGGCG
TCTCTGGAGT CACATGCGAA CGCGGTTGTC GGGGGGATTG TTGGTGGTGC
AATGGGCCTC ACTCTTATCC TGGGCTTTGC ATACTGGTAC ATCAGTCGAC
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2 には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-2

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：AAGCTGCGAGAATTCCACTC<青字>

プライマー2**：ACCGTCCGTGAGAATACGAG<青字>

反復モチーフ：(ACCT)8<赤字>

塩基配列**：

**AAGAAGGCGC GCAACCCTCA CAGTCAGAAC AAGCATCCAT GTTTCCTTCG
TCCAGCAAGA AGGCGCGCAA CCCTCACAGT CAGAACAAGC ATCCATGTTT
CCTTCGTCCA TATTGTTCAA GTATATGAAT CTGTCGTGCA TAGGCCTCGC
TACAGCTAAG CTGCGAGAAT TCCACTTAC CTACCTACCT ACCTACCTAC
CTACCTACCT ACCACTCGTA TTCTCACGGA CGGTGACTTC CACCATGGTC
ATTGCAACTA ATGGGGGCCT GAAATAAAGT GTTCAAGTTA AAAGAGGCGG
TCAACGAACT GATCCGATCA CTGATCGTGA CGTCGACGCC TTAAATCTAA
ATCACGTGCT CTCCAAAATT TCGATCGACA GTCCACAGCA GTCCACCCTT**

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-3

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：GAGGTGTGCGTTCTCGTTCT<青字>

プライマー2**：GCACCAGTACCTACGCCAAC<青字>

反復モチーフ：(GCTGGT)6<赤字>

塩基配列**：

TTGCAGTGGG TCAACGGGTT CATCTTTCAC GATAGTAACG GGAGGTGGAG
GTGTAGGTGC AGAGGGAGGC ACGGGTTTCG TTTGTCGAGC TTGAGGTGTG
CGTTCTCGTT CTGGTTCTTG TCGTTCCGCC TCGGCGGGTT GGGGAGGAGC
AGCCCTCTTA GGGCCACTGG GTGGTGCTGG TGCTGGTGCT GGTGCTGGTG
CTGGTGCTGG TGTGGCGTA GGTACTGGTG CTGGTGTGGG TGTGGGTGCG
GATATTCCAA GACCGCGACT TTCACGGAAT GCCTGCACCA GACCAATCAA
CGTCGGTTCA CTGAAGGCCT CGAGATTCGC GACGATGAGT TCCGTAATGA

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-4

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：ACCCGGAAATAGAACGAGAG<青字>

プライマー2**：CAACCTCTGTTCAACCACCTC<青字>

反復モチーフ：(GACTCG)5<赤字>

塩基配列**：

GACTTGTTC AGACGTTGAC CCAGCTGTGA TTTGGGTAAC TGTTTCAACG
ATCACGTTGG TGTTTGACCC GGAAATAGAA CGAGAGGGAG AGGGTGATGG
TGATGGTGAT GGAGTAGGAG AATTGATACT GGGCGGGGCC GCTGGTCGCG
TCGTCTCCGG ACTCAGACTC GGA**CTCGGAC****TCGGACTCGG****ACTCGGAGGT**
GGTTGAACAG AGGTTG**AGGA** CTGTGATGTT TGAGGATCTA TGAGGCAATA
GCCACAGCCG AAAAAAAAAA AAAAAAAGGG GAAACGAAAA GAAAATACAG
AAGGTGCGTT AGAATGAGCG GGGAGACACT GAAGTACCTA AAGCGACCTC
GAAATAGTCC CGAATTCTTG GCGAGAACCA GAAATTGTTG CCGTC

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-5

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：CAGAAGGCTGTCCTCACACA<青字>

プライマー 2**：GAGCCGATCAAGAACCGATA<青字>

反復モチーフ：(GATA)5<赤字>

塩基配列**：

```
AGACTGCGGT CACATTTCAG AAGGCTGTCC TCACACAACC CCTTTAAATT
CTGCGTGGGA TTGAAAAATT TCGACATTAC TGTATTATTC TTCCTTTGCT
ACCAATTGTG TTGCTTGCTT TGATATGCAT CTTACGAGTG ATTTAGCTAT
CCGCATTTTT AGTGTTGAA ATAAACAGCC TGAGCAAATA TGAATCGTGT
GATAGATAGA TAGATAGATA TTTTTTTGTG AAGTGCAATA TCATGTTTTC
CGTAAGTACA TATCGGTTCT TGATCGGCTC CAGACTAGTA TCCGAAGCCT
GCGTAGGTTT AAGCAGAGTA AGTATCTACC GCATCACATC AATCCAATCA
CATTCTCCT GCGGGCTCGT CCTGCGTGTC CTTGCAAAA CTTGACCTTT
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー 2 には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-6

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：CCGTTGTGGGTTAGGTCAAA<青字>

プライマー2**：TAGTATGTGTAGGCGACAAAGG<青字>

反復モチーフ：(TGGA)5<赤字>

塩基配列**：

```
CTGATATCGT TGTTCGTAT ATACCACGTC CTGACCTCCT GATTCTGATT
GTAGTCAAAG TTGCACCAAG TATAGCGACT TCTTTTTTCA CGTATGAGCT
TGTGAGTTTG TTCATCCTTT TTGCTTCCTT ATGTGGTGAT TGATGTGCCG
TTGTGGGTTA GGTCAAAGAC TTCCTTGTCG CGACATGATA CACAGACAAT
TGGATGGATG GATGGATGGA TGTAGAACAG GATTCTTCTT TCTCTCTTGC
CCCTTTGTGG CCTACACATA CTATTATTAC AACTAAGGC CGAGCCCTCT
GCGCAGGGAT AACATATACT ATAGAACAGA TGAATGCCAA TGGACAGGTG
ACTGAATCGA TATCCGTATA GCATCAGGAA CGTTTGAGGC CATGTGCGTG
```

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-7

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：GGAAGAGAGGGAGGCCAAAAA<青字>

プライマー2**：GTCGACGGTTATTTTCGAACG<青字>

反復モチーフ：(AAGG)13<赤字>

塩基配列**：

```
GAGAATTGGA ATGGGAAAGG GAGGGGGAAG TGAGGCAGAA AAGAGGCGGA
CGGAGAATTG GAATGGGAAA GGGAGGGGGA AGTGAGGCAG AAAAGAGGCG
GACGTGTGTT TCTGGTGAAC GGAGGCACGG GGAAGAGAG GGAGGCCAAA
AAGAGAGAGG GGAGGGAGGG AGGGAAGGAA GGAAGGAAGG AAGGAAGGAA
GGAAGGAAGG AAGGAAGGAA GGAAGGAAGA AGGGA CTACG TACGTTTCGAA
ATAACCGTCG ACGGTGCGAT ACGCTGCACG TTCGCTTTCA CGTTTTCTTC
GACGAGGGCG CGGAACGCCG CTACATCATG CAGATAGTGA GGATGTGGTA
TATGTCGGGG AAAAAAAGA AGAGAGGTAT ACGGACGATC ATGCAAATCC
GGCAATTGCT CGCCCGCTTC CTTCGTGCCT GTCTCCCTTG TCCTCGTGTT
GAGCGTAGCC CTCTCCC
```

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名 : msHm-8

作成に用いた材料品種 : ホクト白1号菌

至適アニーリング温度 : 59℃

プライマー 1* : ATCACGCATATACGCACCC<青字>

プライマー 2** : CACCTCTCGCAGGTATGGAC<青字>

反復モチーフ : (AAAGA)₈<赤字>

塩基配列** :

```
GGTTGAGTGA TGCAGAGGAA GACGAAGAGG CAGAAGTGGG TGTagAAGAA
GCAGAAGCCG AAAACGAACG AAGAGAAAAC CCCGCATCAC GCATATACGC
ACCCCGCAAC TTCTTCGGGT CCGTAGCGAG CGTATGCATA TATCTTCACG
TGCATAAAGT TACATTCAGT AAGGAAACCG CAGATTTAAT ATTACGCAGG
AAGTAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAGAGAAA
ACGCACCGTT GCAGAAAAGC CACAGCCGTG GGCTCGACGT CCGCCATCTC
ATCCGCGGTC CATACCTGCG AGAGGTGCGG TTCCGTTTCC ACTGGATTCC
AGGGATCTAC CTCCACCTCC ACGTCCACTG GTGGGACTTT AGGGACGGGG
AGCTTTTCGCC GGGGTAAGGA
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー 2 には tail 配列を付加した。

付属文書 2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長

	SSRマーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	A	B-12/B	C	D	E	F	G	H
MH025014	A	B-12/B+8	C-6/C	D+6	E+21	F+4	G-40	H-23
MH025016	A-18/A	B-12	C-18/C-6	D-6	E+12	F	G	H-23
MH025019	A	B-12/B	C-18/C	D-6	E+15	F+8	G-40/G	H-23
MH025022	A	B-12	C-18/C-6	D+6	E+15	F/F+8	G-40/G	H-23
MH025066	A-18/A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H
MH025091	A	B-12/B	C-18	D-6	E+15	F	G-40/G	H-23
MH025146	A	B-12	C	D-6	E/E+15	F+4	G	H-36
MH025217	A-18/A	B-12/B	C	D	E/E+15	F	G	H
MH025374	A-18/A	B-12/B	C	D	E	F	G-60	H
MH025038	A-12	B-12	C-26/C-8	D+6	E+9/E+24	F+4	G-45	H-23
MH025045	A-18	B-12/B-8	C-12/C	D/D+6	E+24	F	G-35	H-28
MH025046	A-18/A-6	B-20/B-8	C-6	D-6	E+12	F+4	G-40	H-23/H
MH025054	A-6	B-8	C-18	D	E+9	F-4	G-40	H-23
MH025070	A-6/A+12	B-8	C-6	D-12	E+9	F	G-40	H-36
MH025092	A-18	B-12/B-4	C	D-6/D+6	E+15	F+4/F+8	G-45	H-23
MH025097	A-18	B-12	C-18/C-6	D+6	E-4/E	F+4/F+18	G-55	H-34
MH025121	A-18/A-6	B-16	C-18	D+12	E-4/E+15	F	G-60	H-20
MH025160	A-18/A-6	B-16/B-4	C-18	D+12	E+12	F-8	G-48	H+48
MH025339	A-18/A-12	B-12/B-8	C-12	D+18	E+15	F-4/F+4	G-40	H-23
MH025012	A-18/A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H
MH025064	A-18/A-12	B-12	C-18/C-6	D	E-4/E	F+4	G-60	H-36
MH025286	A	B-12/B	C-18/C-6	D	E/E+24	F/F+4	G-60	H
MH025288	A-12/A	B-12	C-18	D-6	E-4/E+15	F+12	G-40	H-23
MH025362	A-18/A-12	B-12/B	C-6	D+6	E	F+4	G-60	H+4
MH025369	A-18/A-12	B-12/B-8	C-6	D+6	E/E+12	F+4	G-60	H-26/H+4
MH025397	A-18	B-16/B	C	D-6	E/E+15	F	G-60/G	H
MH025462	A-12	B-12/B-8	C-18/C-6	D+6	E	F/F+4	G-60	H-26
MH025463	A-12	B-8/B	C-6	D	E/E+24	F+4	G-60	H+4
MH025528	A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H

フラグメント長は 600LIZ サイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで2つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで2本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。

付属文書 3. 参考文献

- 1) Bell, C J And Ecker, J R: *Genomics*, **19**, 137-144 (1994)
- 2) Davis, T M, DiMeglio, L M, Yang, R, Stanton, M N S And Lewers, K S: *J Amer Soc Hort Sci*, **131**, 506-512 (2006)
- 3) Dirlewanger, E, Cosson, P, Tavaud, M, Aranzana, M J, Poizat, C, Zanetto, A, Arús, P And Lagre, F: *Theor Appl Genet*, **105**, 127-138 (2002)
- 4) Foulon-Gne-Oriol M, Spataro C And Savoie, J M: *Appl Microbiol Bio Technol*, **84**, 1125-1135 (2009)
- 5) Hossain, K G, Kawai, H, Hayashi, M, Hoshi, M, Yamanaoka, N And Harada, K: *DNA Res*, **7**, 103-110 (2000)
- 6) Ito Y, Fushimi, T And Yanagi, S O: *MycoScience*, **39**, 361-365 (1998)
- 7) Kimura, T, Shi, Y Z, Shoda, M, Kobuchi, K, Matsuta, N, Hayashi, T, Ban, Y And Yamamoto, T: *Breed Sci*, **52**, 115-121 (2002)
- 8) Kresovich, S, Szewczyk-MCFadden, A K, Bliks, S M And McFerson, J R: *Theor Appl Genet*, **91**, 206-211 (1995)
- 9) 北村眞希・石井 真・星 雅子・稲富 聡・原田久也：日本きのこ学会誌, **18**, 7-12 (2010)
- 10) Panaud, O, Chen, X And McCouch, S R: *Genome*, **38**, 1170- 1176 (1995)
- 11) RosA, V D, Cappuccino, I, Fanelli, C And Urbanielli, S: *Mol Ecol Notes*, **4**, 271-273 (2004)
- 12) Röder, M S, Plaschke, J, König, S U, Börner, A, Sorrells, M E, Tanksley, S D And Ganal, M W: *Mol Gen Genet*, **246**, 327-333 (1995)
- 13) Röder, M S, Wendehake, K, Korzun, V, Bredemeijer, G, Lohorie, D, Bertrand, L, Isaac, P, Rendell, S, Jackson, J, Cooke, R J, Vosman, B, And Ganal, M W: *Theor Appl Genet*, **106**, 67-73(2002)
- 14) Rozen, S And Skaltsky, H: *Methods Mol Biol*, **132**, 365-386 (2000)
- 15) Song, Q J, QuiGley, C V, Nelson, R L, Carter, T E, Boerma, H R, Strachan, J L And Cregan, P B: *Plant Var Seeds*, **12**, 207-220 (1999)
- 16) Song, S, Su, W, Zeng, W And Wang, Z: *Science And Cultivation of Edible Fungi*, Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp 191-199 (2000)
- 17) 砂川政英・根田 仁・宮崎和弘：木材学会誌, **41**, 949-951 (1995)
- 18) Turuspekov, Y, Nakamura, K, Yoshikawa, R And Tuberosa, R: *Breed Sci*, **51**, 215-218 (2001)

