

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。

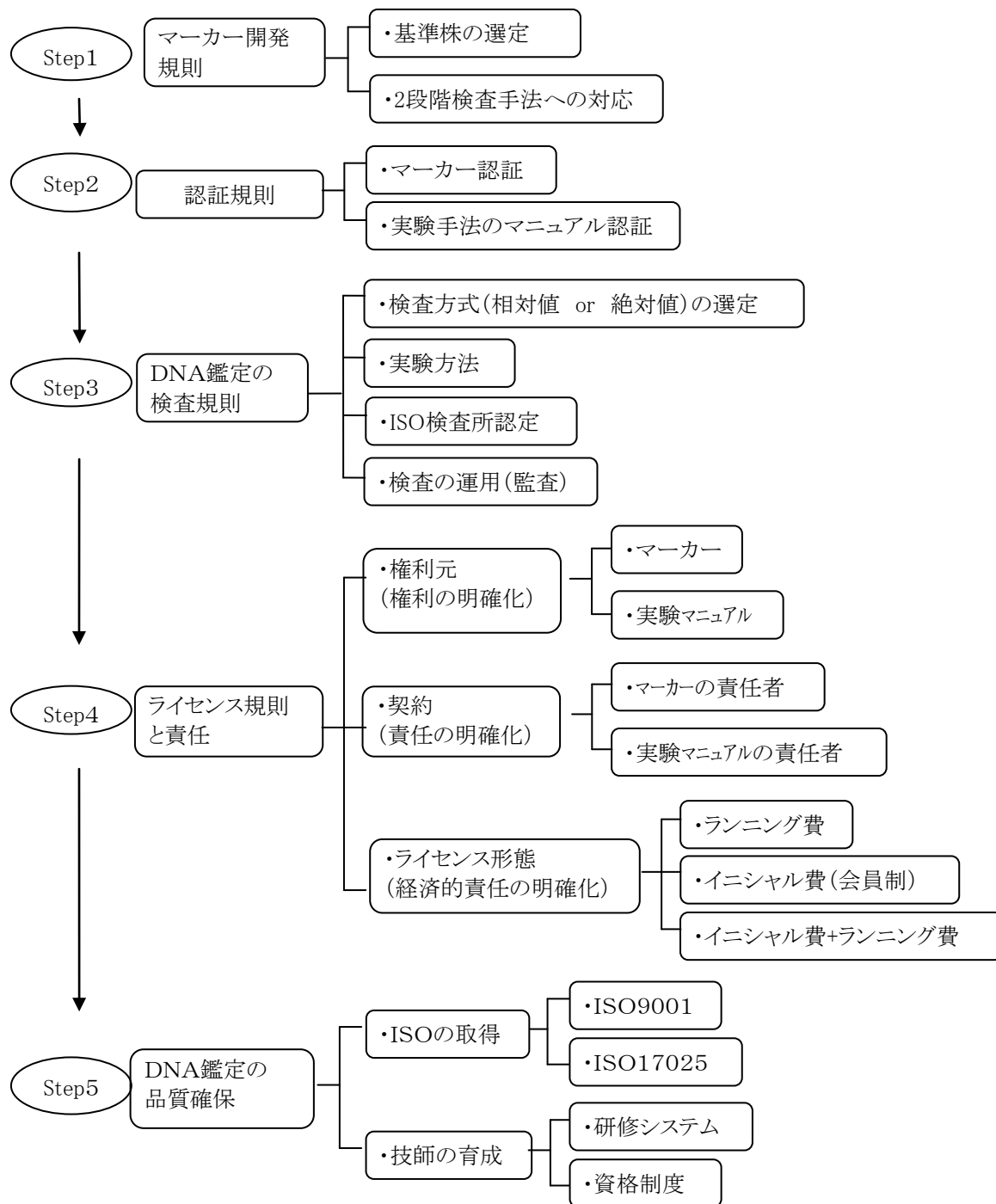


図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー

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。

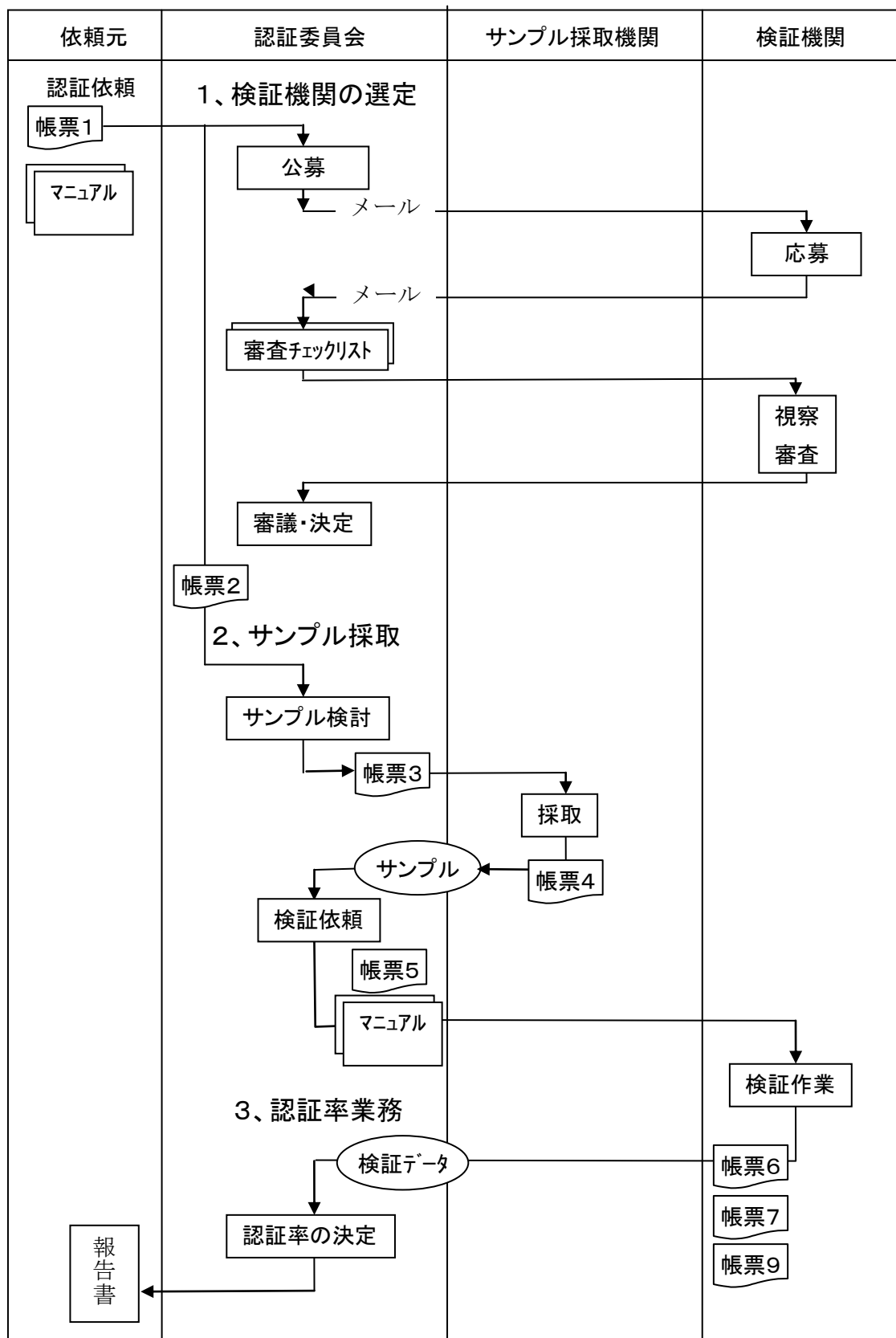


図2 認証の業務フロー

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。

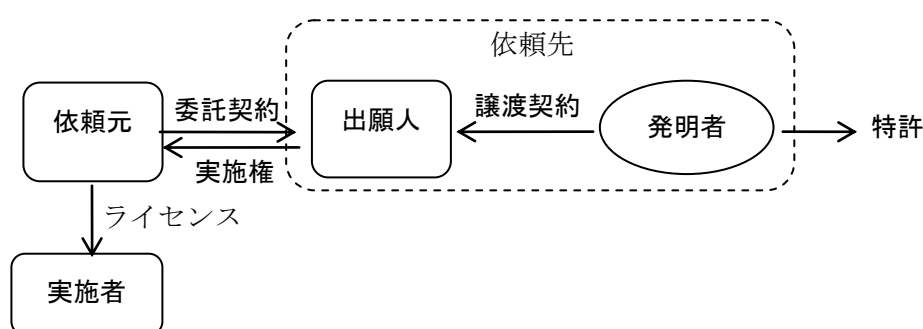


図3 権利関係

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。

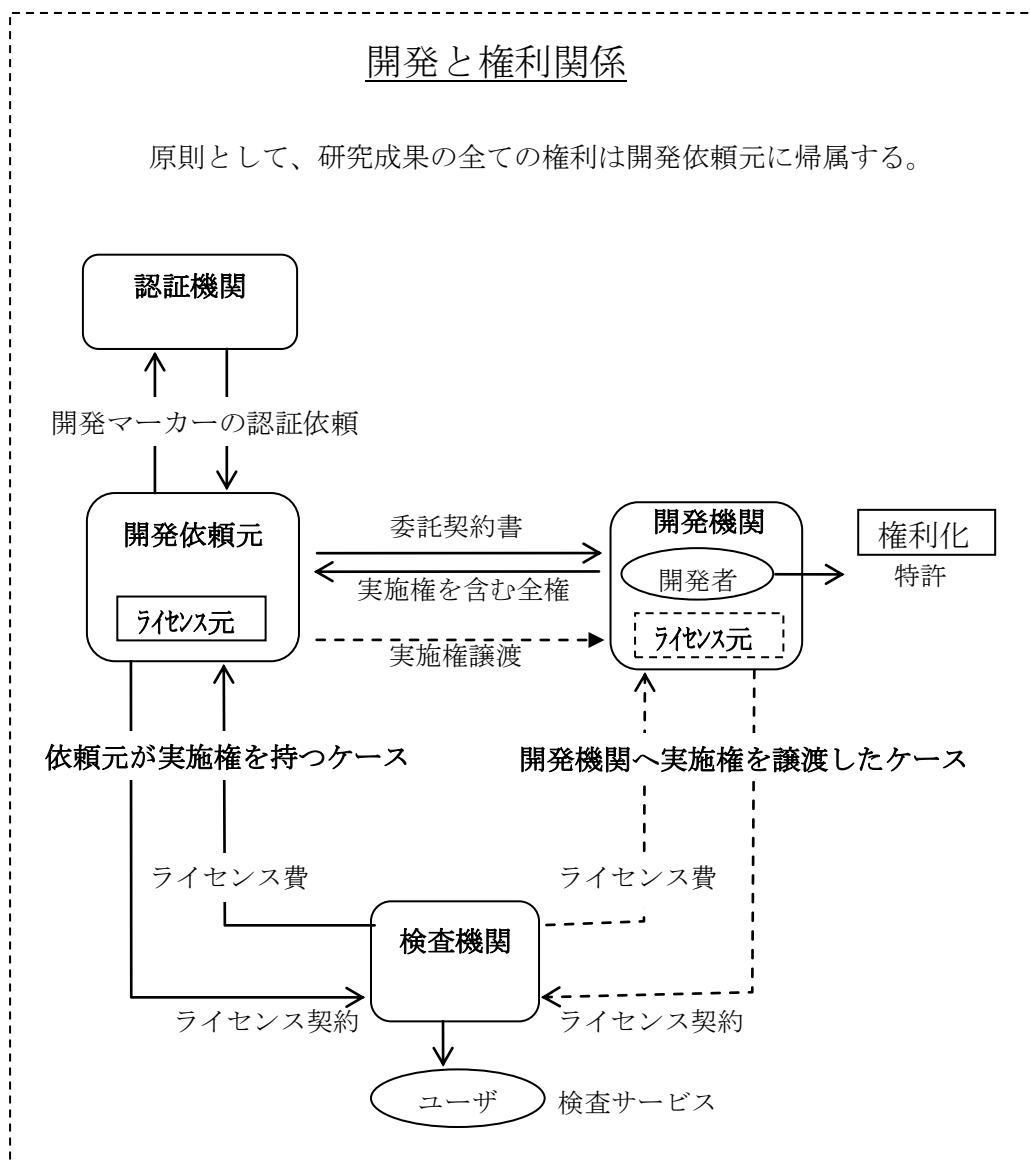


図4 権利化した場合

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) 識別マーカーの認証率

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 $\times \times \mu\text{l}$ 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 HOX1 号(霜降りひらたけ)の DNA 品種識別マニュアル

1
2
3
4
5
6
7 **SSR マーカーによる HOX 1 号(霜降りひらたけ)の**
8 **DNA 品種識別マニュアル**
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19
20 **ホクト株式会社きのこ総合研究所**
21
22
23
24
25
26
27

28
29 **Ver1.8**
30 **2018/2/7**
31
32
33

1	SSR マーカーによる HOX 1 号（霜降りひらたけ）の DNA 品種識別マニュアル	
2	の目次	
3		
4	目次	
5	0. はじめに	3
6	1. 適用範囲	4
7	2. 一般事項	5
8	3. 測定の方法	5
9	4. 識別方法	
10	4. 1 方法の要旨	6
11	4. 2 検査試料	6
12	4. 3 購入試薬	6
13	4. 4 調製試薬	8
14	4. 5 機器・プログラム	8
15	4. 6 実験操作	
16	4. 6. 1 操作準備作業	9
17	4. 6. 2 操作場所	9
18	4. 6. 3 試薬および器具	9
19	4. 6. 4 試験材料の取り出し	10
20	4. 6. 5 DNA 抽出操作	12
21	4. 6. 6 DNA の定量	13
22	4. 6. 7 PCR 増幅操作	13
23	4. 6. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験	14
24	4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法	15
25	4. 6. 10 データ解析	16
26	4. 6. 11 判定	17
27	4. 6. 12 実験操作フロー図	20
28	5. トラブルシューティング	21
29	6. 是正処置	26
30		
31	付属文書：	
32	1. HOX 1 号の識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細	27
33	2. 供試品種の特徴	36
34	*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。	
35		

0. はじめに

ヒラタケ属 (*Pleurotus*) はヒラタケ (*P. ostreatus*) などの優秀な食用きのこを含む分類群である。本属のきのこは比較的栽培が容易で順応性に優れることから、世界中で広く人工栽培されている¹⁾。日本国内においては現在7種確認されており、中でもヒラタケは古くから知られ、広く鋸屑・原木栽培が行われている²⁾。最近では、国内には自生していないエリンギ (*P. eryngii* var. *eryngii*) やバイリング (*P. eryngii* subsp. *tuoliensis*) などの海外産ヒラタケ属きのこの市場参入も目立つようになり、それに伴い新しい品種の開発が大手企業や各研究機関で盛んに行われている。

2012 年、ホクト株式会社きのこ総合研究所において、日本産ヒラタケとヨーロッパ産ヒラタケ属 (*P. eryngii* var. *eryngii*、*P. eryngii* var. *elaeoselini*、*P. nebrodensis*) を用いた交配育種によるヒラタケ属の新品種“HOX 1 号” (商標名：霜降りひらたけ) が開発された。HOX 1 号は、流通過程で傘が割れやすい、日持ちしない等の従来ヒラタケが抱えていた栽培・流通上の問題点が改良された品種であり、外見の新規性も高く、旨みや風味に関して市場でも高い評価を得ている。実際、平成元年の 35,700t をピークに年々減少を続け、一時は 1,883t にまで落ち込んだヒラタケの全国生産量が、HOX 1 号が販売開始された 24 年から上昇傾向にあり、2016 年現在では 3,263t にまで達したとの報告がなされている^{3,4)}。このような現状を考慮すると、HOX 1 号が今後もヒラタケの国内生産量および消費量を牽引する品種としてますます重要性を増すことは想像に難くない。また、HOX 1 号は上記のような商品的価値だけではなく、その作出方法についての学術的価値も認められている⁵⁾。このことについては、特許出願 (WO2014020653 A1) も行っており、法的保護もなされている。しかしながら、本品種が所属するヒラタケ属きのこは木材腐朽菌の仲間であることから子実体からの組織分離や単孢子分離による増殖が容易であり、農林水産省に品種登録されているものであっても国内外の第三者による不法な増殖や流出といった危険性がある。このような現状から、HOX 1 号育成者の権利を保護するための対策が必要と考えられた。

そこで、当研究所は HOX 1 号の育成者権を保護することを目的として、HOX 1 号の片親にあたる一核菌株 MH006408-1 のゲノム DNA を次世代シーケンサーによって取得した塩基配列データをもとに、HOX 1 号であるか否かを識別できる 8 種類の SSR マーカーを開発し、本マニュアルを作成した。

<参考文献>

- 1) Miles, P G and Chang, S T: Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact, CRC press, 315-325 (2004)
- 2) 今関六也・大谷吉雄・本郷次雄（編）：日本のきのこ（増補新版）、山と溪谷社、東京、pp 21-25 (2011)
- 3) 株式会社特産情報きのこ年鑑編集部：2016 年度版きのこ年鑑、プランツワールド、東京、pp 78-80 (2016)
- 4) 林野庁ホームページ：別添 2「参考（平成 23 年～27 年の生産量等）」
<http://www.rinya.maff.go.jp/j/press/tokuyou/attach/pdf/160810-2.pdf>
- 5) 石川真梨子・原田慎嗣・安積良仁・奥竹史・大内謙二・稲富聡：ヒラタケ属の新規菌株の育種、日本きのこ学会誌、24: 7-15 (2016)

1. 適用範囲

識別可能な品種：基準品種 HOX 1 号を含むヒラタケ属きのこ 12 品種（付属文書

2. 供試品種の特徴を参照）

被検査物：子実体および菌糸体（加工品は対象としていない）

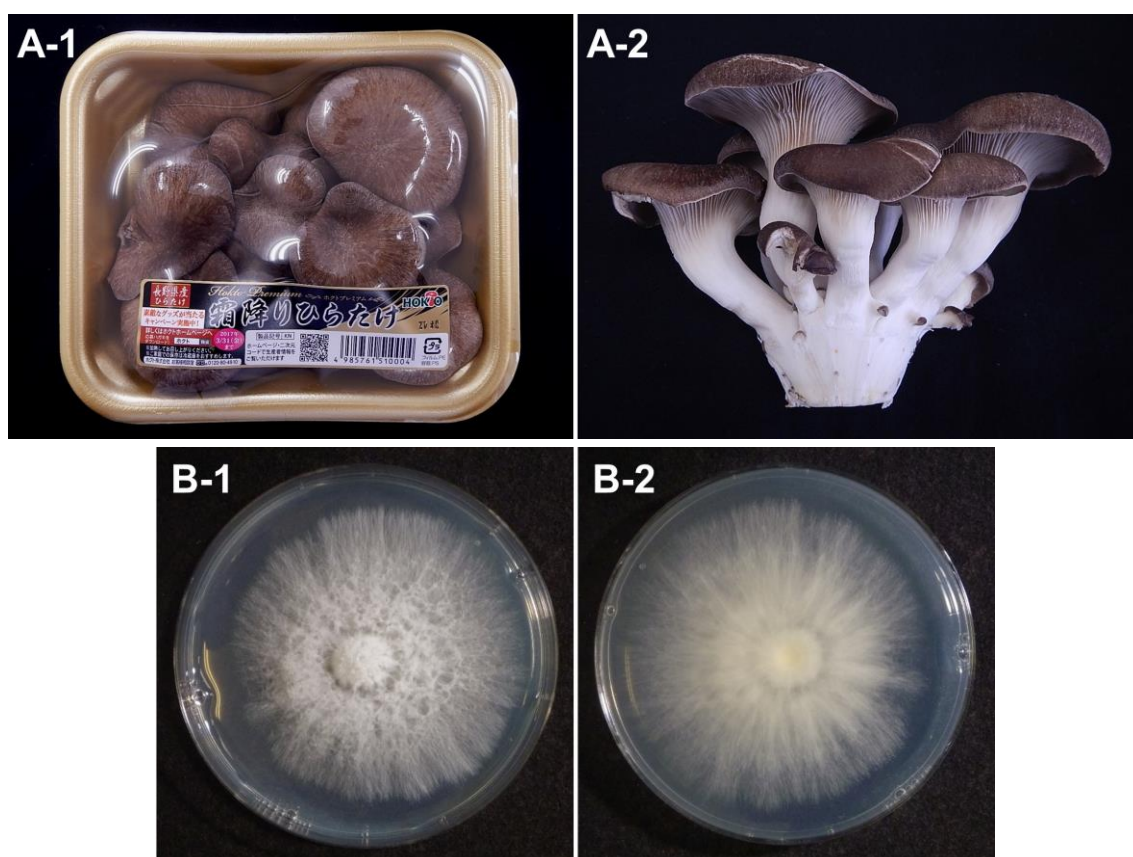


図 1. A : HOX 1 号の子実体（1 : 包装、2 : 包装から取り出した状態）、B : HOX 1 号の菌糸体（1 : 表、2 : 裏）

2. 一般事項

①本マニュアルの基本方針は次の資料に準拠している。

- ・DNA 品種識別技術討論会（2003）植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項－技術開発と利用のガイドライン－別添資料（植物品種識別における品種同定理論）

- ・独立行政法人種苗管理センター（2008）DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン－SSR を中心として－

- ・DNA 鑑定学会（2013）添付資料 1 DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則

②本マニュアルは、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）で保存されている既存栽培品種の 12 品種（HOX 1 号、MH006393、MH006407、MH006408、MH006008、ホクト PLE-2 号、PLE-3 号、PLE-5 号、菌興 PE1 号、ホクト Y-3、ホクト Y-5、ふくひら 1 号）（各品種の詳細は付属文書 2 を参照）を用いて、解析・作成されたものである。これら 12 品種は、本マニュアルに記載されている 8 種類の SSR マーカーによって全て区別可能である。

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 法は、数塩基モチーフ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。その一般的手順を以下に記す。

①調査対象および基準品種の試料から、ゲノム DNA を抽出する。

②SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、①で得た DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。このとき、一方のプライマーの 5'末端に蛍光物質を標識したものをを用いる。

③蛍光 DNA シークエンサーを用いて、PCR 増幅産物のフラグメント長を検出する。

④内部標準のサイズスタンダードに基づき、フラグメント解析用ソフトウェアを用いてフラグメント長の実測値と遺伝子型を決定する。調査対象と基準品種のフラグメントパターンが一致するか確認する。

⑤調査対象試料が基準品種と同一品種であること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

きのかの品種を識別する方法として、伝統的には子実体や菌叢の外見に基づく形態比較法や両口試験管またはシャーレを利用した対峙培養法などが用いられてきた。しかし、いずれも多く多くの時間と労力がかかる上に試験者の経験や主観に依存するところが大きく、識別精度も必ずしも高いとはいえない。そこで、環境要因に影響を受けず結果が客観的で安定性の高い方法として DNA マーカーによる品種識別が期待されており、識別技術の開発が進められている。中でも、本マニュアルで採用している SSR 法は、共優性で多型性に富み、再現性も高いことから、ヒトを含む様々な生物における品種識別の手法として利用されている。SSR マーカーの多型を検出するにはアガロースゲル等を用いて電気泳動し PCR 増幅産物のサイズを確認すればよいが、系統関係の近い品種間同士の場合は目視レベルでの識別が難しい。そのため、本マニュアルでは、ゲル電気泳動の工程は PCR 増幅産物の確認レベルに留め、より精度が高い蛍光 DNA シーケンサーによるフラグメント解析で最終的に識別するものとする。

本マニュアルで利用する 8 種類の SSR マーカーは、ホクト株式会社きのか総合研究所保有菌株「HOX 1 号」の片親菌株にあたる「MH006408」の子実体から取得した単一孢子由来の菌株「MH006408-1」の 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. 8SSR マーカーの詳細情報」と「付属文書 1. HOX 1 号の識別に用いる 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。

4. 2 検査試料

子実体、菌糸体を検査試料の対象とし、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 試料につき 1 子実体、または 1 菌糸体由来とする。

基準とする HOX 1 号の DNA (ポジティブコントロール) 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、作業を始めるまでは 4℃ で冷蔵保存する。

4. 3 購入試薬

1 <一般試薬>

- 2 ・ 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）

3 <DNA 抽出関係>

- 4 ・ GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit（Sigma-Aldrich社）

- 5 ・ エタノール（99.5%）（Wako, code: 057-00456）

- 6 ・ RNase A（凍結乾燥品、タカラバイオ社）

7 <PCR 関係>

- 8 ・ SSR プライマーセット

9 表 1 に記した 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
10 光プライマーの合成には、ThermoFisher Scientific 社の受託合成サービスを利用
11 する。フォワードプライマーの 5'末端に各々指定された蛍光標識（FAM、HEX、
12 NED、PET）を行う。FAM と HEX 指定のプライマーは Invitrogen™ のカスタム
13 DNA プライマーのウェブページ*から、NED と PET 指定のプライマーは Applied
14 Biosystems カスタム TaqMan プローブ&プライマーのウェブページ**から合成を
15 依頼する。精製グレードは脱塩でよい。

16 * : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos.html>

18 ** : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/applied-biosystems-custom-primers-probes/5-prime-labeled-primers-primer-pairs.html>

- 20 ・ AmpliTaq Gold 360 Master Mix（Applied Biosystems 社）

21 <電気泳動関係>

- 22 ・ ゲルローディングバッファー（Sigma-Aldrich 社）

- 23 ・ DNA ラダーマーカー（日本ジェネティクス社、100bp DNA Ladder）

- 24 ・ TBE バッファー（TaKaRa 社、TBE 10x Powder pH8.3）

- 25 ・ アガロース（日本ジェネティクス社、アガロース（スタンダード））

- 26 ・ DNA 蛍光染色試薬（日本ジェネティクス社、ミドリグリーンアドバンス）

27 * 電気泳動関係の試薬類は、上記のものと同等の性能を有するものであれば代
28 替品として使用が可能である。

29 <フラグメント解析関係>

- 30 ・ Genetic Analyzer Buffer with EDTA（Applied Biosystems 社）

- 31 ・ Hi-Di Formamide（Applied Biosystems 社）

- 32 ・ 3130 POP-7 ポリマー（Applied Biosystems 社）

- 33 ・ サイズスタンダード（Applied Biosystems 社、Genescan 600LIZ dye Size Standard
34 v2.0）

1 表 1. 8SSR マーカーの詳細情報.

マーカー名	プライマー配列 (5'-3')		座乗 Scaffold 番号 ³⁾	フラグメント解 析希釈倍率 ⁴⁾
	Forward ¹⁾	Reverse ²⁾		
F4	6-FAM —CGGTTCTGGTTGGAAATGTGG	gtttcttGCCGTATACCCAAATTTGCGA	10	×150
F5	6-FAM —ACCAAAACCAGGGTTCAGGC	gtttcttCATTAGCTTGGGCGGTTC	2	×150
F6M1RC	6-FAM —CCACTATCGCTGCTTCAACC	gtttcttAGCAACACCCCTCCGAGTTAT	3	×150
H6	HEX —TCGTTCTTCGTCGAATCCTGG	gtttcttCCTCGGGAGGTAATGCTGAC	6	×100
Sca0903	HEX —CGTACCTGCTATCTTGCCAG	gtttcttAAGGGAGGGAGAATTAGCGA	9	×150
Sca0707	NED —GTCGAGGTTGACGGAGATCG	gtttcttTCCAGTGCTTGGAGCGTTC	7	×150
Sca0101	PET —TGGATATCCTGGAGGTGGAC	gtttcttCCCGTTCAACTTCGTGATTC	1	×150
Sca0502	PET —TCCATCGTGTAGAAGAGATGCT	gtttcttCCTGCTCCCGAGTATCAA	5	×100

2 1): ボールドイタリック体は蛍光物質 (6-FAM[青]、HEX[緑]、NED[黄]、PET[赤]) を示す。

3 2): 波形を安定させるための PIG-tailing 配列 (gtttctt) *を付加した。

4 3): 「付属文書 1」を参照されたい。

5 4): フラグメント解析用サンプルの希釈倍率 (p. 15 : 「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」参照)

6 *: Brownstein, MJ., Carpten, JD and Smith, JR. "Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase:
7 primer modifications that facilitate genotyping." Biotechniques 20.6 (1996): 1004-6.

9 4. 4 調製試薬

10 • SSR プライマー溶液

11 8 組の蛍光標識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、
12 それぞれ 1pmol/μL の濃度になるように滅菌超純水に溶解させた混合溶液を用
13 意する。この操作については、コンタミネーションを避けるためクリーンベン
14 チ内で行う。

15 • GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Wash Solution

16 使用前に 99.5%エタノールを 72mL 加える。

17 • RNase A

18 使用前に滅菌超純水を 1,200μL 加える (5U/μL)。

19 • TBE バッファー

20 TBE 粉末 1 袋分を超純水で 1,000mL にメスアップして 10×TBE 溶液とし、ス
21 トック用として室温で保存する。アガロースゲルの作製や電気泳動用バッ
22 ファーには、これを超純水で 10 倍希釈した 1×TBE 溶液を使用する。

24 4. 5 機器・プログラム

25 • フリーザー (-20℃以下)

26 • 凍結乾燥機

27 • ボルテックスミキサー

28 • 高速冷却遠心機 (1.5–2.0 mL チューブが利用可能なもの)

- 1 ・分光光度計（Thermo Scientific 社、Multiskan GO）
- 2 ・PCR サーマルサイクラー（Eppendorf 社、Mastercycler Nexus Gradient GSX1）
- 3 ・電気泳動装置（Mupid 社、Mupid-exU）
- 4 ・紫外線照射装置
- 5 ・電子天秤
- 6 ・オートクレーブ
- 7 ・超純水製造装置
- 8 ・恒温機
- 9 ・シーケンサー（Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer）
- 10 ・3130xl/3100 Genetic Analyzer 16-Capillary Array, 50cm（Applied Biosystems 社）
- 11 ・解析用ソフトウェア（Applied Biosystems 社の Peak Scanner™ Software または
- 12 Gene Mapper® Software）

14 4. 6 実験操作

15 4. 6. 1 操作準備作業

16 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、
17 無菌作業が必要な場合はクリーンベンチを使用する。実験操作時は、白衣およ
18 び上履きを着用し、各操作に応じてゴム手袋、眼鏡、マスク、帽子を着用する。

20 4. 6. 2 操作場所

21 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
22 DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

24 4. 6. 3 試薬および器具

25 上記の購入試薬、調製試薬

- 26 ・滅菌超純水*
- 27 ・ラップ
- 28 ・アルミホイル
- 29 ・輪ゴム
- 30 ・新聞紙
- 31 ・9 cm 滅菌シャーレ
- 32 ・スパーテル
- 33 ・白金耳
- 34 ・メス

- 1 ・ピンセット
- 2 ・ステンबीカー（容量 1,000mL）
- 3 ・連続式自動分注器（ソコレックス SH 容量 5mL）（アズワン株式会社）
- 4 ・平底 1.5 mL チューブ
- 5 ・丸底 2 mL チューブ
- 6 ・パラフィルム
- 7 ・ホモジナイゼーション用ペッスル（フナコシ社）
- 8 ・マイクロピペット各種容量
- 9 ・マイクロピペット用チップ
- 10 ・96 穴 PCR プレート（Applied Biosystems 社）または 8 連 PCR チューブ
- 11 ・96 穴用シリコンラバーマット

13 *超純水とは、純水を電気伝導率 0.0056mS/m (25℃) 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ものである。滅菌超純水は、その超純水をオートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）したものを用いる。

16 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。

19 チップは滅菌済みのもの、チューブ類はオートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）済みのものを用い、必ず使い捨てとする。

22 4. 6. 4 試験材料の取り出し

23 試料の取り出し・取り扱い時には、試料毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行い、マスクおよびゴム手袋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。器具類は使用前にオートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）する。

28 子実体を検査試料対象とする場合、汚れていない子実体内部の組織を使用する。以下の手順に従って試料を取り出す（図 2 参照）。

30 ①子実体の傘部分と柄部分を切り分ける。

31 ②柄部分の外皮を削ぐようにメス*で切り落とし、内部組織を露出させる。

32 ③メス*とピンセットを用いて 5mm 角程の大きさに切り分け、2mL のチューブに 5 粒程度入れ、-20℃以下のフリーザーで凍結させる。

34 ④DNA 抽出直前に凍結乾燥し、次項の「4.6.5 DNA 抽出操作」に用いる。

- 1 *試料の不用意な混入を防ぐため、メスの刃は試料毎に新しい替刃にする、ま
2 たは火炎滅菌する。



3
4 図 2. 子実体を検査試料対象とする場合の取り出し手順.

- 5
6 菌糸体を検査試料対象とする場合、シャーレ上で培養した菌糸体を使用する。
7 以下の手順に従って試料を取り出す。
8 ①ポテトブドウ糖寒天培地分包 1 袋をステンबीカーに開け、超純水 400mL 加
9 えてよく混和する。
10 ②ラップ、アルミホイルの順にステンबीカーに蓋をして輪ゴムでとめる。
11 ③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
12 とめ、②と共にオートクレーブ滅菌 (121℃、20 分間) する。
13 *以後の操作はすべてクリーンベンチ内で行う。
14 ④培地が 60℃程度まで冷めたら、ソコレックス SH を用いて 9cm シャーレに
15 12mL ずつ分注し (約 32 枚分)、培地が固まるまで 1 時間ほどクリーンベンチ内
16 で静置する。
17 ⑤作製した PDA 平板培地 4 枚(予備 1 枚含む)の中央部に、菌糸体または子実体
18 の小片を接種し、25℃暗黒下で 2 週間培養する。
19 ⑥伸長した菌糸体をそれぞれスパーテルで集菌し (0.2g 程度)、1 プレート分を
20 1 本の丸底 2mL チューブに入れたあと (図 3 参照)、-20℃以下のフリーザーで
21 凍結させる。
22 ⑦DNA 抽出直前に凍結乾燥し、次項の「4. 6. 5 DNA 抽出操作」に用いる。
23 *寒天培地を試料に混入させないように注意する。

24

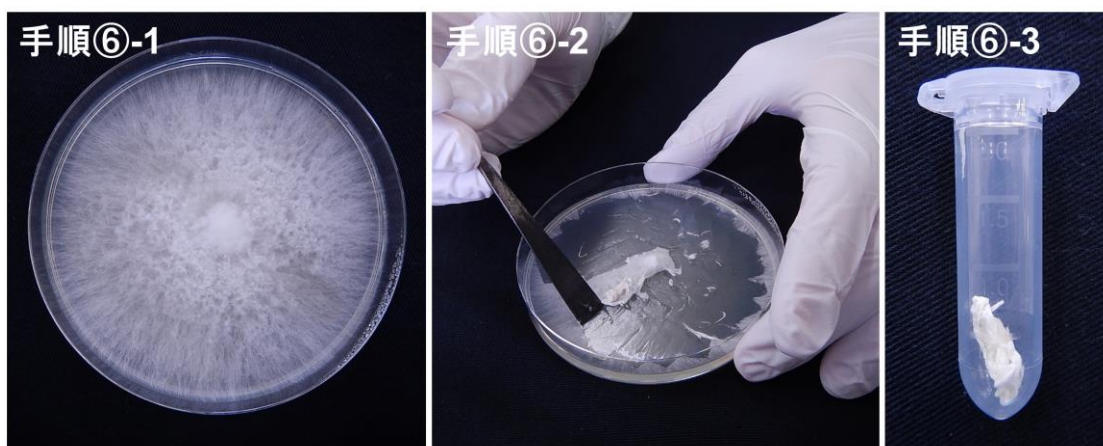


図 3. 菌糸体を検査試料対象とする場合の取り出し手順.

いずれの場合も、凍結乾燥後は速急に次項「4. 6. 5 DNA 抽出操作」に移ること。室温で凍結乾燥試料を長時間放置すると、吸湿により粉砕が困難になる。

4. 6. 5 DNA 抽出操作

基本操作は GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit の添付プロトコールに従っている。マスクおよびゴム手袋を着用して操作を行うこと。以下に手順を示す。

① 4.6.4 で準備した凍結乾燥済みのサンプルを、ホモジナイゼーション用ペッスルで粉状になるまで丁寧に粉砕する。

② 350μL の Lysis Solution Part A および 50μL の Lysis Solution Part B を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌する。その後、RNase A 溶液を 10μL (50U) 添加し、65℃で 10 分間インキュベートする（途中で 2～3 回転倒混和する）。

③ 130μL の Precipitation Solution を添加し、転倒混和する。その後、氷上に 5 分間置いたのち、16,000xg、5 分間、室温の条件で遠心分離する。

④ ③で得られた上清を GenElute filtration column (2mL collection tube が付属している青色のカラム) に移し、16,000xg、1 分間、室温の条件で遠心分離する。

⑤ GenElute filtration column のカラムを捨て、700μL の Binding Solution を添加したのち、転倒混和する。

⑥ 500μL の Column Preparation Solution を GenElute Miniprep Binding Column (赤色の O リング付) の各カラムに添加し、12,000xg、1 分間、室温の条件で遠心分離したのち、通過した画分を捨てる。

⑦ ⑥で処理したカラムに⑤の混合液のうち 700μL を添加し、16,000xg、1 分間、

室温の条件で遠心分離する。通過した画分を捨て、カラムを collection tube に戻す。⑤の残りの混合液をカラムに添加し、上記と同じ条件で遠心分離したのち、通過した画分を捨てる。

⑧ ⑦のカラムを新しい collection tube に移す。500 μ L の Wash Solution をカラムに添加し、16,000xg、1 分間、室温の条件で遠心分離したのち、通過した画分を捨てる。

⑨ 500 μ L の Wash Solution を再度カラムに添加し、カラムを乾燥させるために 16,000xg、3 分間、室温の条件で遠心分離する。

⑩ ⑨のカラムを新しい collection tube に移し、事前に温めておいた (65°C) Elution Solution を 100 μ L 添加する。その後、16,000xg、1 分間、室温の条件で遠心分離し、DNA を溶出させる。この操作をもう一度行い、合計 200 μ L の DNA 溶出液を得る。溶出液は、すぐに使用する場合には 2~8°C、長期保存する場合には -20°C 以下で保存する。

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。以下に手順を示す。

①260nm と 280nm の吸光度を測定する。

②260nm/280nm の値の比が 1.8-2.0 になることを確認する。

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で計算できる。

*DNAの定量には同等あるいはそれ以上の性能を有する機器であれば適用可能とする。DNA濃度が2.0ng/ μ L以上であれば「4. 6. 7 PCR増幅操作」に進む。

4. 6. 7 PCR 増幅操作

PCR 増幅操作は以下の通りである。PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されてしまうので、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 ①PCR 反応液を以下の組成に従って調製する。

2 表 2. PCR 反応液の組成.

PCR 反応液	1 試料分 (μL)
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	10.0
調製済み SSR プライマー溶液 (各 1pmol/μL)	5.0
合計	15.0

3 * 例えば、調査品種が 1 つならば、

4 1) 基準品種 HOX 1 号 DNA のサンプル (ポジティブコントロール)

5 2) DNA 溶液を含まないサンプル (ネガティブコントロール)

6 3) 調査品種サンプル

7 の合計 3 サンプル分の PCR 反応液を準備することになる。

8 * サンプルの数が多い場合は分注時にロスが生じることがあるため余分に PCR
9 反応液を調製する。ロス分の目安は、8 サンプルにつき 1 サンプル分である。

10 例 1) 3 サンプルであれば 1 サンプル分余分に調製する。

11 例 2) 10 サンプルであれば 2 サンプル分余分に調製する。

12 ②2ng/μL に希釈した DNA 溶液を PCR チューブに 5.0μL 分注する。

13 ③①で調製した PCR 反応液を 15.0μL 添加する。

14 ④サーマルサイクラーを用いて、以下に示すプログラムで PCR 反応を行う。

15

16 PCR プログラム

サイクル前 熱変性	熱変性	アニーリング	伸長反応	最終 伸長反応	最終 ホールド
ホールド	35 サイクル			ホールド	ホールド
95℃ 10 分間	95℃ 30 秒間	55℃ 30 秒間	72℃ 1 分間	72℃ 7 分間	4℃ ∞

17

18 ⑤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
19 ないようにするためアルミホイルで遮光し、4~8℃以下で保存する。

20

21 4. 6. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験

22 「4. 6. 7 DNA 抽出操作」で作成した PCR 増幅産物の増幅を確認するた
23 めに、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
24 SSR マーカーの検出方法」へ、増幅がみられなかった場合にはトラブルシュー
25 ティング (p.21) を参照し、再度「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻って PCR
26 増幅操作を行い、PCR 増幅産物を得るようにする。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、コンタミネーションや酵素的分解を防ぐためにマスクとゴム手袋を必ず着用して扱う。以下に手順を示す。

①電気泳動用 1.5%アガロースゲルの作製

0.9g のアガロース粉末をはかりとり、200mL 程度の三角フラスコにいれる。60mL の 1×TBE バッファーを加え、口部分をラップで半分程覆った後、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。時々、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。やけどを防ぐため、三角フラスコに触れる際は必ず厚手の軍手を着用する。内部にアガロースの粒が見えなくなったら 60～70°C 程度まで常温下で冷まし、ミドリグリーンアドバンスを 3 μ L 加えて混ぜる。その後、ゲル板に溶液を流し込んでコームを差し込み、ゲルが完全に固まるまで静置する。

②サンプルの電気泳動

ゲルが作製できたら、1×TBE バッファーの入った電気泳動槽装置に設置し、ゲルが完全に浸ることを確認してからサンプルのアプライを行う。サンプルの一部 (3 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 4 μ L とする。一番左に 100bp のラダーマーカートを 3 μ L アプライし、次いでサンプルも 4 μ L ずつアプライしていく。アプライが完了したら、135V、30 分間で電気泳動を行う。この条件に関して、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構わない。

③増幅産物の確認

電気泳動が完了したら、手袋をした手でゲルを紫外線照射装置にのせて紫外線を照射し、写真撮影する (試験状況の証拠写真となるため、専用のフォルダを作成し保存する)。バンドが確認されたら、そのサンプルを次項「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」でフラグメント解析に用いる。

4. 6. 9 SSR マーカーの検出

前項で得た PCR 増幅産物を蛍光 DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。フラグメント値はラン日の気温やバッファー等の影響を受けることがあるため、同じマーカー由来の試料は同じ日に解析する。基本的分析操作

は、Applied Biosystems 社のフラグメント解析のプロトコールに従って行う。以下に手順を示す。

①前項の「4. 6. 7 PCR 増幅操作」で得た PCR 増幅産物を、表 1 で指定されている希釈倍率に滅菌超純水で希釈する（表 1、付属文書 1 を参照）。

②①で希釈した PCR 増幅産物を Optical 96-Well reaction plate (Applied Biosystems) に 1.0μL ずつ添加する。

③1 サンプルあたり Hi-Di Formamide 9.7μL と 600LIZ サイズスタンダード 0.3μL を新しいチューブにて混合し、その後 5~10 秒程度ボルテックスミキサーで攪拌する。

* サンプルの数が多い場合は分注時にロスが生じることがあるため、余分に Hi-Di Formamide と 600LIZ サイズスタンダードの混合液を調製する。ロス分の目安は、8 サンプルにつき 1 サンプル分である。

例 1) 3 サンプルであれば 1 サンプル分余分に調製する。

例 2) 10 サンプルであれば 2 サンプル分余分に調製する。

④③で調製した混合液 10μL を、Optical 96-Well reaction plate 内の PCR 増幅産物に添加する。

⑤④で作成したサンプル入り Optical 96-Well reaction plate を、サーマルサイクラーを用いて 95°C 5 分間熱変性を行った後、氷上で 5 分間以上急冷する。

⑥Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzers の添付プロトコールに従い、50cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用バッファー（Genetic Analyzer Buffer with EDTA）を用いて解析を行う。

4. 6. 10 データ解析

「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」で得られたデータを、Gene Mapper[®] Software または Peak Scanner[™] Software を用いて結果の解析を行う。ここでは、フリーで利用できる Peak Scanner[™] Software v1.0 による解析方法の手順を示す。

①ThermoFisher Scientific 社の HP より、Peak Scanner Software[™] v1.0 をダウンロード・インストールする (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4381867>)。

②Peak Scanner Software を起動し、「Start New Project」をクリックする。

③「Add Files」をクリックし、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」で取得した「.fsa」形式の生データを読み込む。

④「Size Standard」の項目は「GS600LIZ」を、「Analysis Method」の項目は「Sizing Default」を選択し、「Analyze」をクリックする。

⑤検出されたピークを選択すると、その下に各パラメータが表示される。このうち、S (Base Pair Position) の欄に示されている数値がフラグメント値に相当する。

＜Peak Scanner™ Software によるフラグメント解析結果の解説＞

正確な値を取得するためには、「Samples View」タブ内の「Offscale」および「Quality」に表示される3種類のラベル（☒：適、☒：否、☒：チェック）を確認する必要がある。正常に解析結果が表示されている場合、Offscale と Quality の両方に☒が表示される（図4）。正常に解析結果が表示されていない場合は☒または☒が表示されるため、トラブルシューティング③に従って対処する。

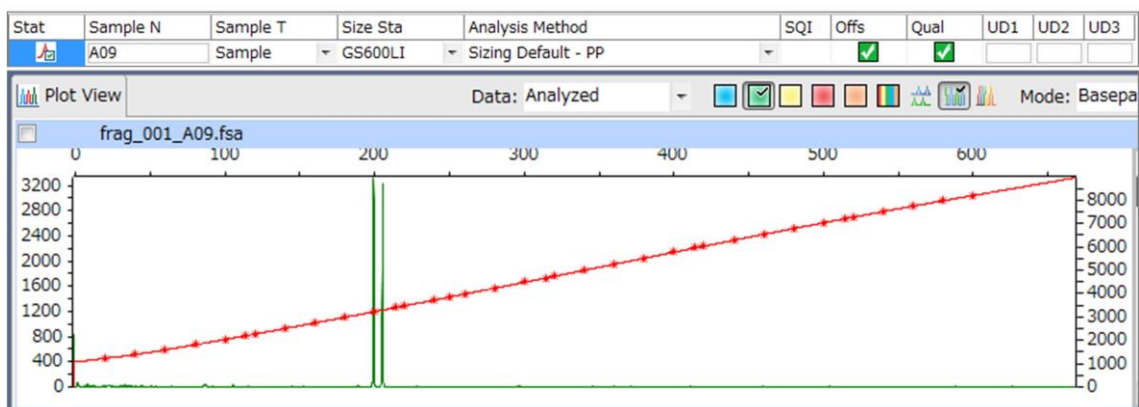


図4. フラグメント解析結果の成功例

Offscale と Quality の両方に☒が表示されている。これは、サイズスタンダードと試料のピーク値が共にソフトウェアの上限値内に収まっており、ピークに乱れもないことを示している。すなわち信頼性の高いデータといえる。

4. 6. 1 1 判定

以下の手順に従ってフラグメント値を決定し、基準品種 HOX 1 号のフラグメント値（表4）と比較する。以下にフラグメント値を決定するまでの流れを示した。

1) 「4. 6. 1 0 データ解析」でフラグメント値を取得し、小数第一位を四捨五入して整数にする。

2) 表4に記載されている HOX 1 号の遺伝子型と比較する。

8 マーカーのフラグメント値が HOX 1 号のフラグメント値とすべて一致した場合、調査品種は「HOX 1 号である可能性が高い」と判断することができる。

注 1) 「4. 6. 10 データ解析」で得られるフラグメント値は、シーケンサー、キャピラリー、ポリマー、サイズスタンダード、測定日の環境（気温等）等によって影響を受け増減するため、表 4 に示したフラグメント値と同一の値が得られるとは限らない。

注 2) フラグメントが複数検出される品種については「/」記号を用いて表記する（表 4、表 5）。また、単一のフラグメントが検出される品種についてはすべてホモ接合体であると解釈し、同じフラグメント値を並べて表記するものとする。

注 3) 表 5 の遺伝子型は、基準品種において検出されたフラグメントのうち最も値の小さいフラグメントを基準とし、そのフラグメント値からの距離を表したものである。

1 表 4. 12 品種、8SSR マーカーのフラグメント値

品種名称	SSR マーカー							
	F4	F5	F6M1RC	H6	Sca0903	Sca0707	Sca0101	Sca0502
HOX 1 号(基準品種)	125/131	145/145	142/154	133/151	168/168	143/149	193/193	100/108
MH006393	125/131	145/175	142/142	133/139	168/168	143/149	193/199	104/108
MH006407	125/131	127/145	142/154	133/133	168/168	143/143	193/193	100/108
MH006408	125/131	145/175	142/154	133/151	162/168	143/149	193/193	100/108
MH006008	125/125	175/175	154/154	139/151	162/162	149/149	193/193	100/100
ホクト PLE-2 号	131/131	127/145	142/142	133/133	168/168	143/143	193/199	108/108
PLE-3 号	131/131	145/145	142/142	133/133	168/168	143/143	193/199	108/120
PLE-5 号	131/131	127/145	142/142	133/133	168/168	143/143	193/199	108/120
菌興 PE1 号	131/131	127/145	142/142	133/133	168/168	143/143	193/193	108/108
ホクト Y-3	125/125	175/205	148/154	139/151	162/162	149/149	193/193	96/100
ホクト Y-5	125/125	181/193	142/154	133/139	162/162	149/155	193/193	100/100
ふくひら 1 号	125/131	187/205	142/142	145/145	162/168	149/149	193/193	100/100

2

3

4 表 5. 12 品種、8SSR マーカーの遺伝子型

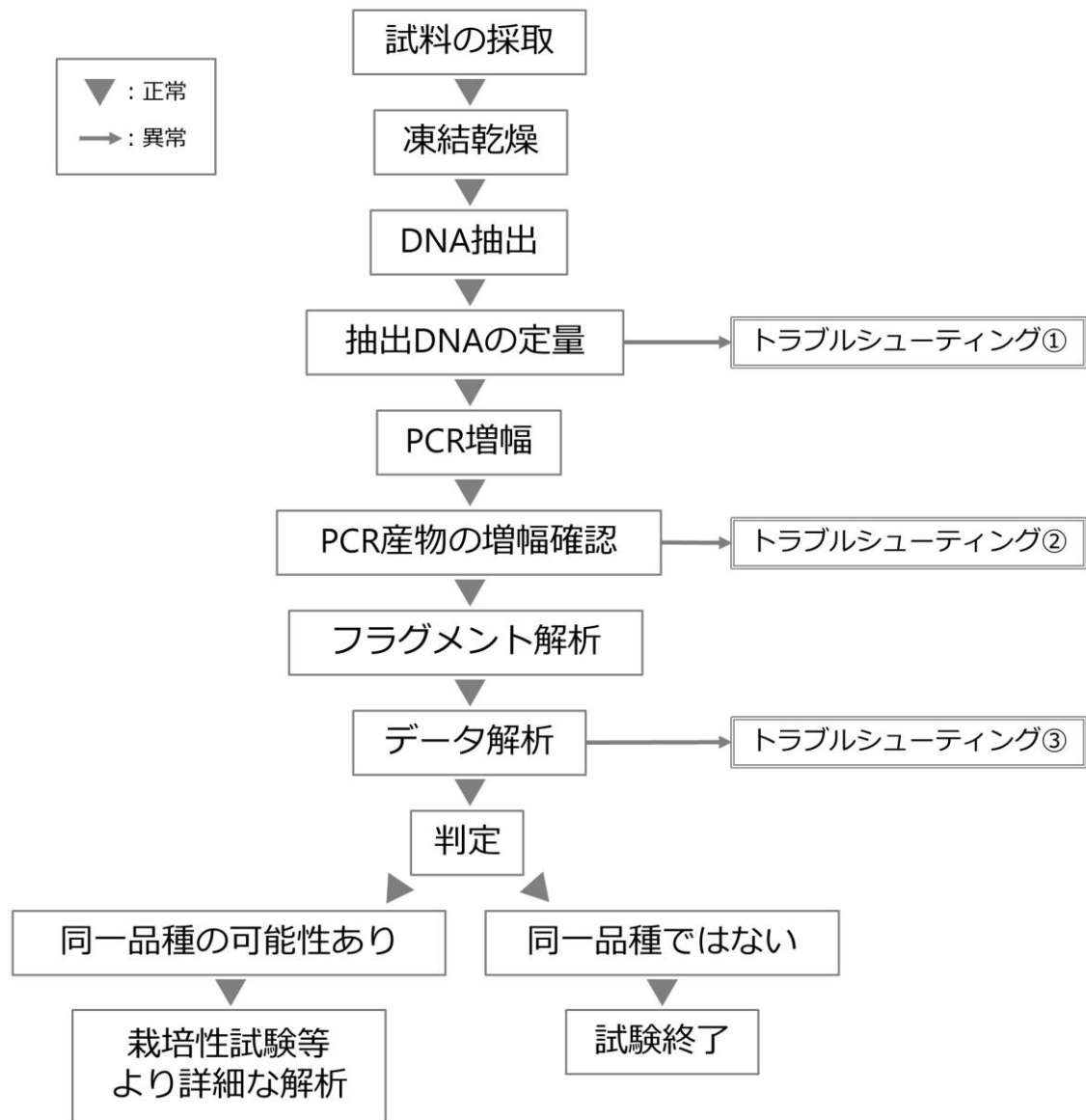
品種名称	SSR マーカー							
	F4	F5	F6M1RC	H6	Sca0903	Sca0707	Sca0101	Sca0502
HOX 1 号(基準品種)	A/A+6	B/B	C/C+12	D/D+18	E/E	F/F+6	G/G	H/H+8
MH006393	A/A+6	B/B+30	C/C	D/D+6	E/E	F/F+6	G/G+6	H+4/H+8
MH006407	A/A+6	B-18/B	C/C+12	D/D	E/E	F/F	G/G	H/H+8
MH006408	A/A+6	B/B+30	C/C+12	D/D+18	E-6/E	F/F+6	G/G	H/H+8
MH006008	A/A	B+30/B+30	C+12/C+12	D+6/D+18	E-6/E-6	F+6/F+6	G/G	H/H
ホクト PLE-2 号	A+6/A+6	B-18/B	C/C	D/D	E/E	F/F	G/G+6	H+8/H+8
PLE-3 号	A+6/A+6	B/B	C/C	D/D	E/E	F/F	G/G+6	H+8/H+20
PLE-5 号	A+6/A+6	B-18/B	C/C	D/D	E/E	F/F	G/G+6	H+8/H+20
菌興 PE1 号	A+6/A+6	B-18/B	C/C	D/D	E/E	F/F	G/G	H+8/H+8
ホクト Y-3	A/A	B+30/B+60	C+6/C+12	D+6/D+18	E-6/E-6	F+6/F+6	G/G	H-4/H
ホクト Y-5	A/A	B+36/B+48	C/C+12	D/D+6	E-6/E-6	F+6/F+12	G/G	H/H
ふくひら 1 号	A/A+6	B+42/B+60	C/C	D+12/D+12	E-6/E	F+6/F+6	G/G	H/H

5

6

1 4. 6. 1 2 実験操作フロー

2



3

4

5

1 5. トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	対応
①-1. A260 のピークが検出されない、または抽出DNA濃度が2ng/μL未満である。	操作手順に誤りがある。	「4. 6. 5 DNA 抽出操作」に記されている操作手順を確認し、再度 DNA 抽出をやり直す。その際、試料をより細かくホモジナイズすることにより改善される可能性がある。
①-2. 分光光度計により得られた抽出 DNA の吸光度比 $A_{260/280}$ 値が1.8-2.0にならない。	吸光度比 $A_{260/280}$ 値が1.8を下回る場合はタンパク質の混在、2.0を上回る場合はRNAの混在。	いずれの場合も、次項「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に進み、増幅産物が確認できれば継続して試験を進めてよい。確認できなかった場合は「4. 6. 5 DNA 抽出操作」に戻り、DNA 抽出をやり直す。
②-1. DNA ラダーメーカーが検出されない。	使用したアガロースのメーカーが異なる。	「4. 6. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験」に戻り、推奨試薬と同等あるいはそれ以上の精製度を有するアガロースを使用して再試験する。
	ミドリグリーンアドバンスが劣化している。	新しいミドリグリーンアドバンスを購入し、「4. 6. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験」に戻って再試験する。
②-2. PCR 増幅産物（バンド）がほとんど、または全く検出されない。	PCR 反応液が混合されていない。	「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻る。PCR 反応液を調製した後、反応液をボルテックスミキサーでよく攪拌する。

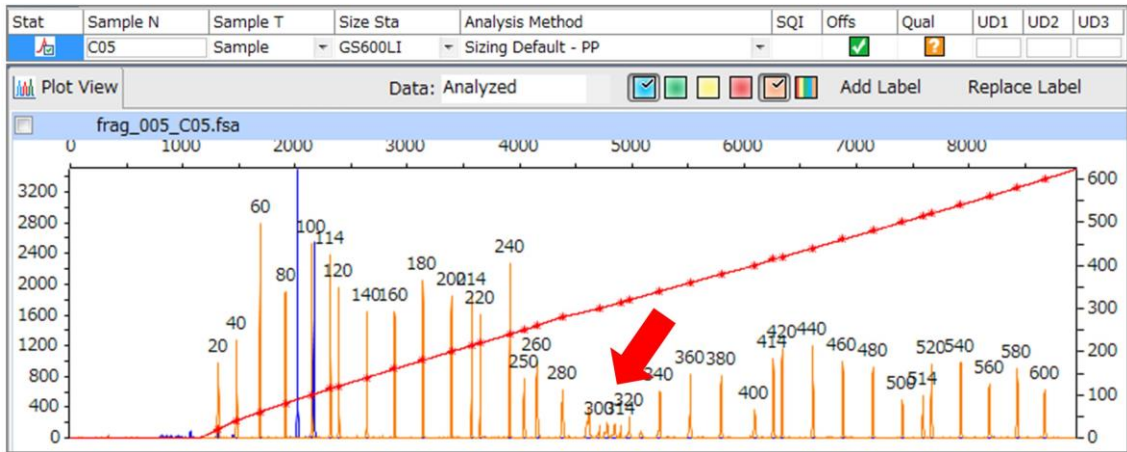
	鋳型 DNA またはプライマーの濃度が不足している。	「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻る。使用する鋳型 DNA 濃度を 2 倍程度にすると改善される可能性がある。または、プライマー濃度を 2 倍程度にすると改善される可能性がある。
	チューブの蓋、またはシリコンカバーが完全に閉まっていない。	「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻る。反応前に蓋またはシリコンカバーが閉まっていることを確認する。
	PCR 反応条件が異なっている。	「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻る。表を見直し、条件を確認する。PCR 増幅をやり直す。
	使用したサーマルサイクラーのメーカーまたは機種が異なる。	「4. 6. 7 PCR 増幅操作」に戻る。推奨機器 Mastercycler Nexus Gradient GSX1 (Eppendorf) と同等あるいはそれ以上の性能を有する機器を使用する。バンドが検出されない場合は、サイクル数を 5 回程度上げる、またはアニーリング温度を 1.0~3.0℃下げる。非特異的なバンドが検出される場合は、アニーリング温度を 1.0~3.0℃上げる。
③-1. サイズスタンダードが正常に検出されない (図 5-1, 3, 4 参照)。	サイズスタンダードが劣化している。	新しいサイズスタンダードを購入し、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻って再試験する。
	Hi-Di Formamide が劣化	新しい Hi-Di Formamide を購

	している。	入し、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻って再試験する。
	サイズスタンダードと Hi-Di Formamide が均等に混ざっていない。	「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻る。Hi-Di Formamide にサイズスタンダードを加えた後、ボルテックスミキサーによる攪拌を念入りに行う。
	サイズスタンダードの濃度が濃い、または薄い。	「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻る。濃度が濃い場合はサイズスタンダードの量を 0.20~0.25 μ L に、薄い場合は 0.35~0.40 μ L にすると改善される可能性がある。
③-2. サイズスタンダードによる検量線は作成されたが、試料のピークが検出されない。	PCR 増幅産物を希釈しすぎている。	「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻り、PCR 増幅産物を定められた倍率になるように丁寧に希釈する。
	蛍光色素が劣化している。	新しいプライマーを購入し、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」に戻って再試験する。蛍光標識されたプライマーおよび PCR 増幅産物は遮光し、繰り返しの凍結・融解を避けて保存すること。
③-3. 試料のピークは検出されているが、Offscale の欄に  が表示される（図 5-2, 3, 4 を参	試料の濃度が濃い。	「4. 6. 9 SSR マーカーの検出」の①に戻り、指定の濃度より 1/2~1/10 程度に希釈して再度泳動を試み

照)。		る。
③-4. 同試料で解析結果が一致しない。	鋳型 DNA が純粋なものでない。	鋳型 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。「4. 6. 5 DNA 抽出操作」に戻り、DNA 抽出からやり直す。

1

2

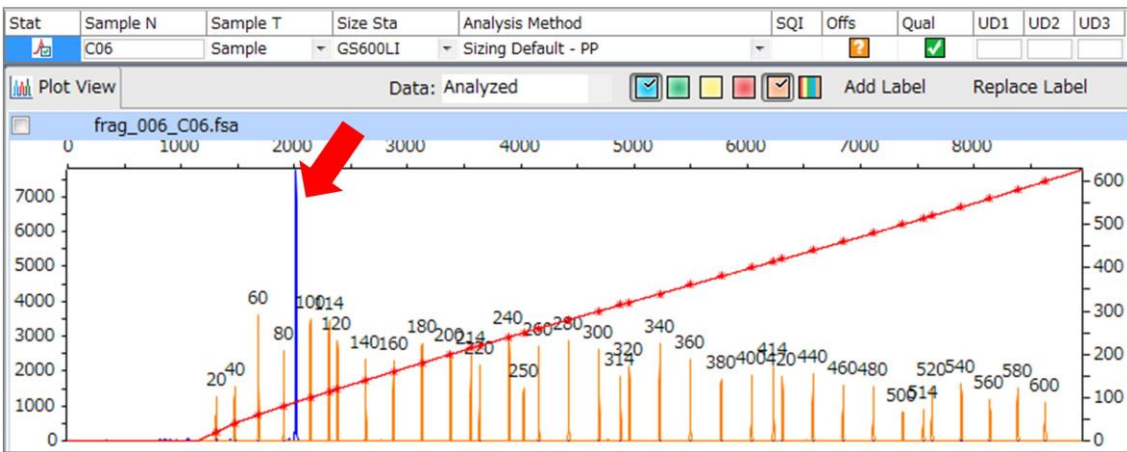


3

4 図 5-1. フラグメント解析結果の例②

5 Offscale に ☒、Quality に ☐ が表示されている。これは、試料のピークは正常に
6 検出されているものの、サイズスタンダードの一部のピークに乱れが生じてい
7 ることを示している。検量線が正しく作成されていない可能性があるため、「4.
8 6. 9 SSR マーカーの検出方法」の②から再試験する必要がある。

9



10

図 5-2. フラグメント解析結果の例③

Offscale に 、Quality に が表示されている。これは、サイズスタンダードのピークは正常に検出されているものの、試料のピークが検出上限値を超えてしまっていることを示している。この場合、ピークの先端が表示されず、ピーク値が正しく表示されない。よって、PCR 増幅産物の希釈濃度を再検討し、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」から再試験する必要がある。

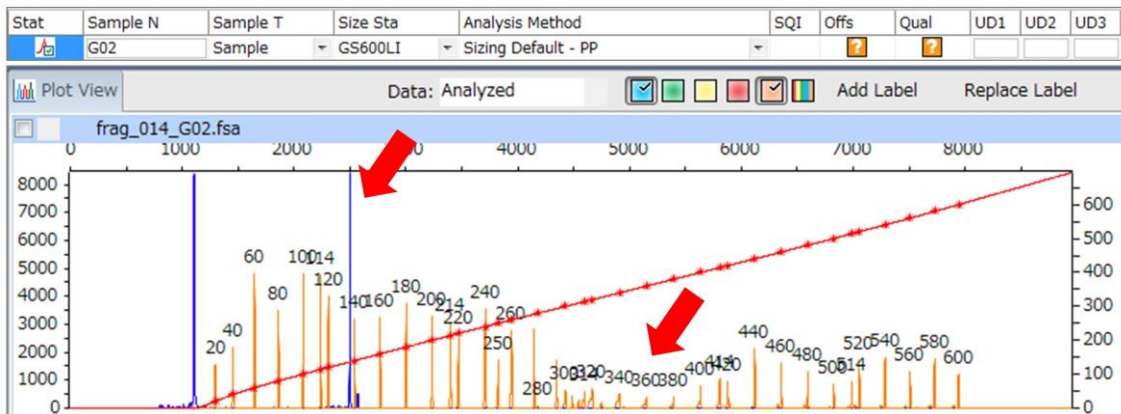


図 5-3. フラグメント解析結果の例④

Offscale と Quality の両方に が表示されている。これは、試料のピークが検出上限値を超えてしまっており、かつ、サイズスタンダードの一部のピークに乱れが生じていることを示している。この場合、ピークの先端が表示されないうえ、検量線も正しく作成されていない可能性が考えられる。よって、PCR 増幅産物の希釈濃度を再検討し、「4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法」から再試験する必要がある。

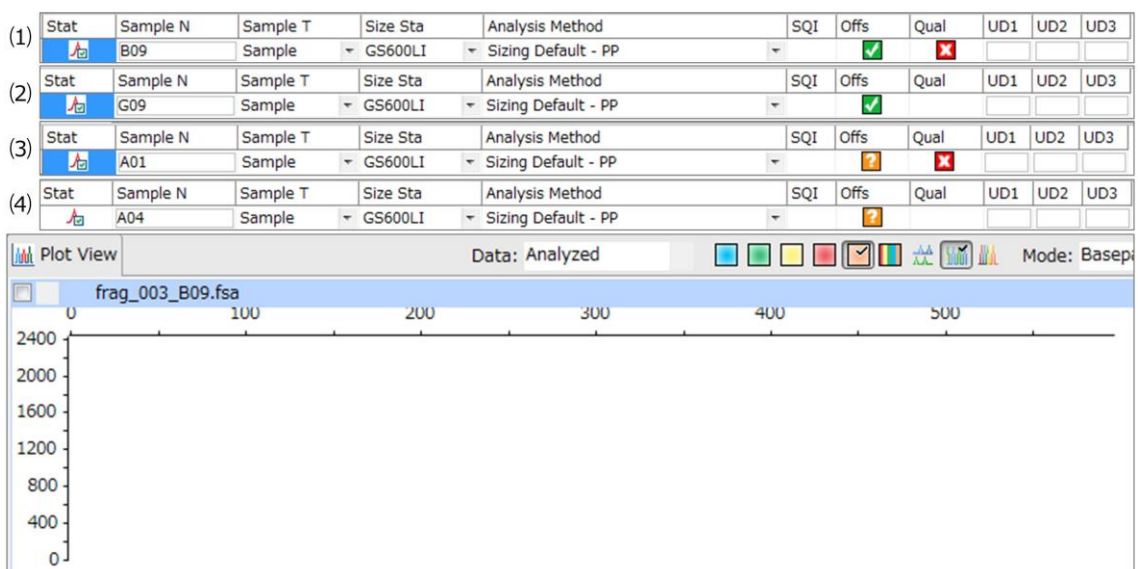


図 5-4. フラグメント解析結果の例⑤

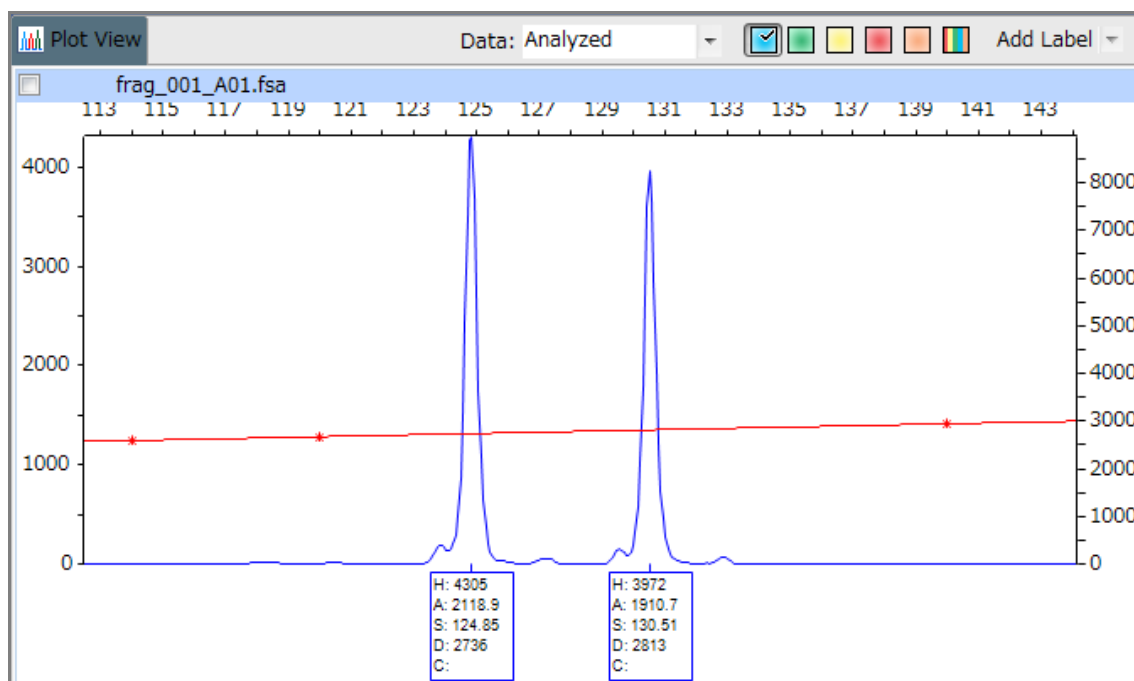
上図(1)~(4)のパターンが表示された場合、**Plot View** にピークが表示されない。
 本原因の 1 つとして、サイズスタンダードが正常に検出されず検量線が作成で
 きなかったことが考えられる。また、Offscale に ⚠ が表示されている場合 ((3)と
 (4)) は試料のピーク値が検出上限値を超えてしまっていることも考えられる。
 よって、PCR 増幅産物の希釈濃度を再検討したうえで「4. 6. 9 SSR マー
 カーの検出方法」から再試験する必要がある。

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処置を行う。

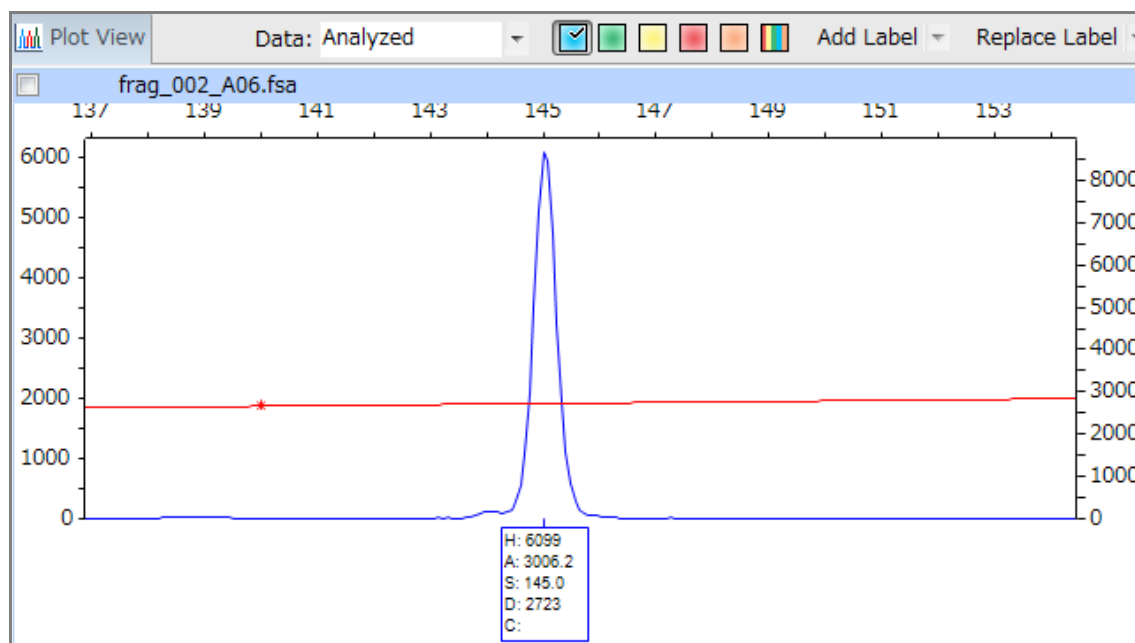
1 付属文書 1. HOX 1 号の識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細
2 注 1) 各マーカーのゲノム上の位置 (Scaffold 番号) は、JGI Genome portal (ht
3 tps://genome.jgi.doe.gov/portal/) にて公開されている *Pleurotus ostreatus* PC15 v2.
4 0 のゲノム情報 ¹⁾を利用して特定したものである。
5
6 <参考ウェブサイト>
7 1) https://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html
8

- 1 SSR マーカー名 : F4
- 2 フォワードプライマー配列 : **(6-FAM)**–CGGTTCTGGTTGGAAATGTTGG
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttGCCGTATACCCAAATTTTGCGA
- 4 モチーフ : (AGCCTG)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 10
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



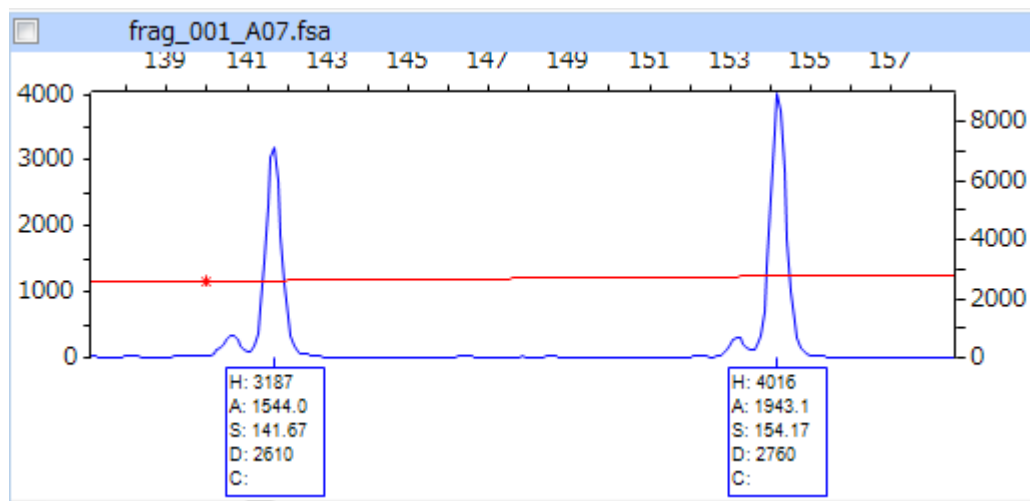
*検出されるピークは2本。

- 1 SSR マーカー名 : F5
- 2 フォワードプライマー配列 : (6-FAM)-ACCAAAACCAGGGTTCAGGC
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttCATTAGCTTGGGCGGTTGC
- 4 モチーフ : (AACGCC)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 2
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



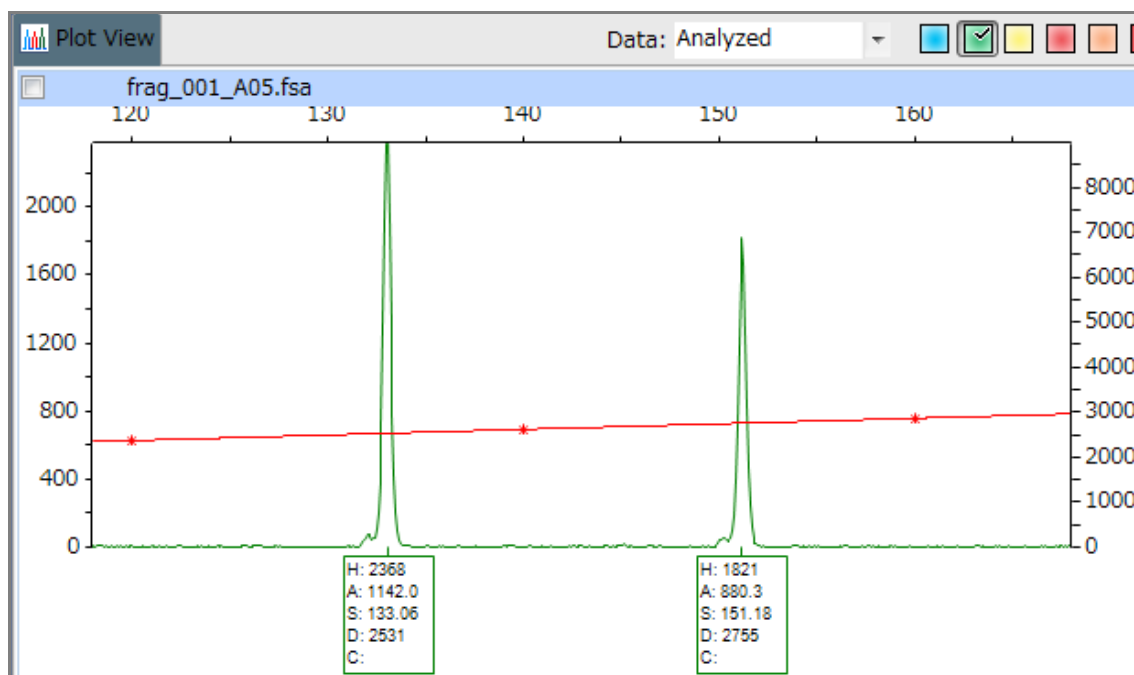
- 8
- 9 *検出されるピークは1本。
- 10

- 1 SSR マーカー名 : F6M1RC
- 2 フォワードプライマー配列 : (6-FAM)-CCACTATCGCTGCTTCAACC
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttAGCAACACCCTCCGAGTTAT
- 4 モチーフ : (TGGACC)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 3
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



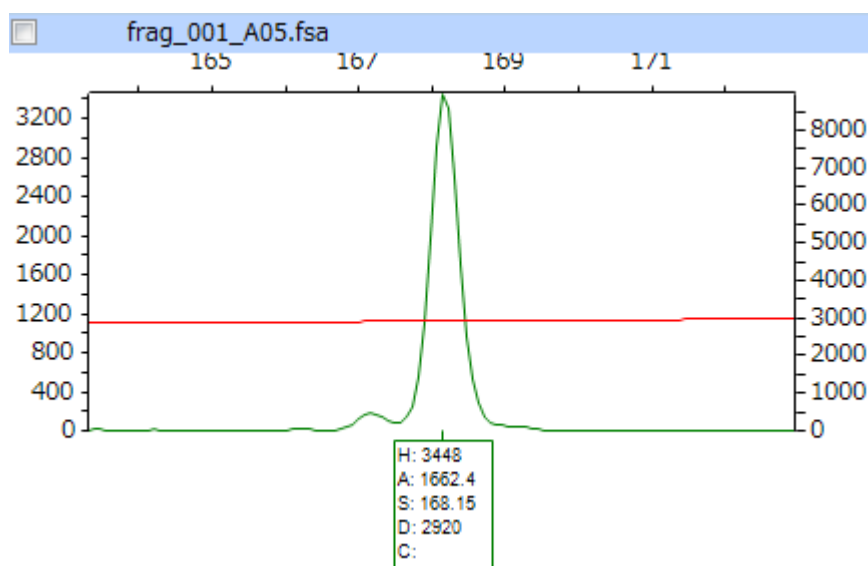
*検出されるピークは2本。

- 1 SSR マーカー名 : H6
- 2 フォワードプライマー配列 : (HEX)-TCGTTCTTCGTCGAATCCTGG
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttCCTCGGGAGGTAATGCTGAC
- 4 モチーフ : (TTGCCA)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 6
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 100 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



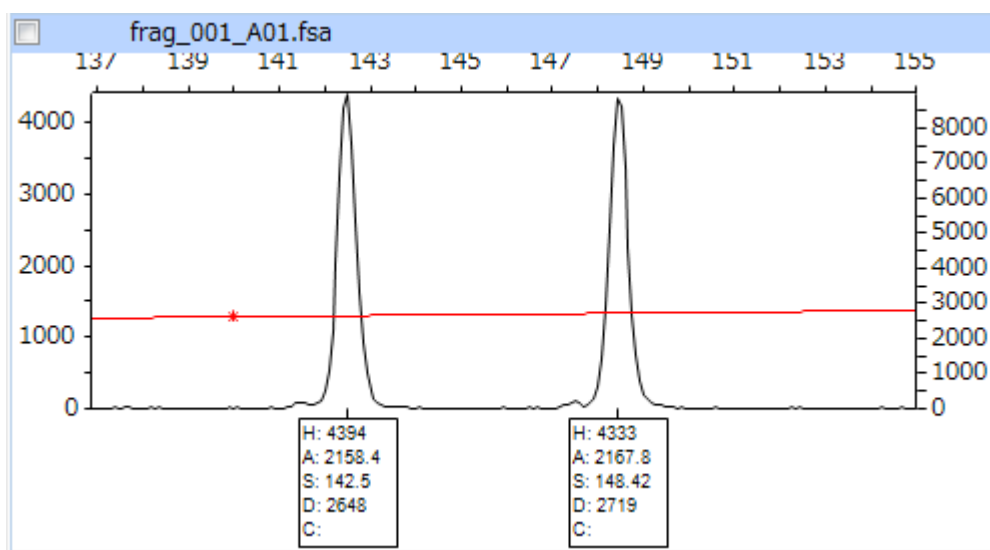
- 8
- 9 *検出されるピークは2本。
- 10

- 1 SSR マーカー名 : Sca0903
- 2 フォワードプライマー配列 : (HEX)–CGTACCTGCTATCTTGCCAG
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttAAGGGAGGGAGAATTAGCGA
- 4 モチーフ : (TCTCCT)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 9
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



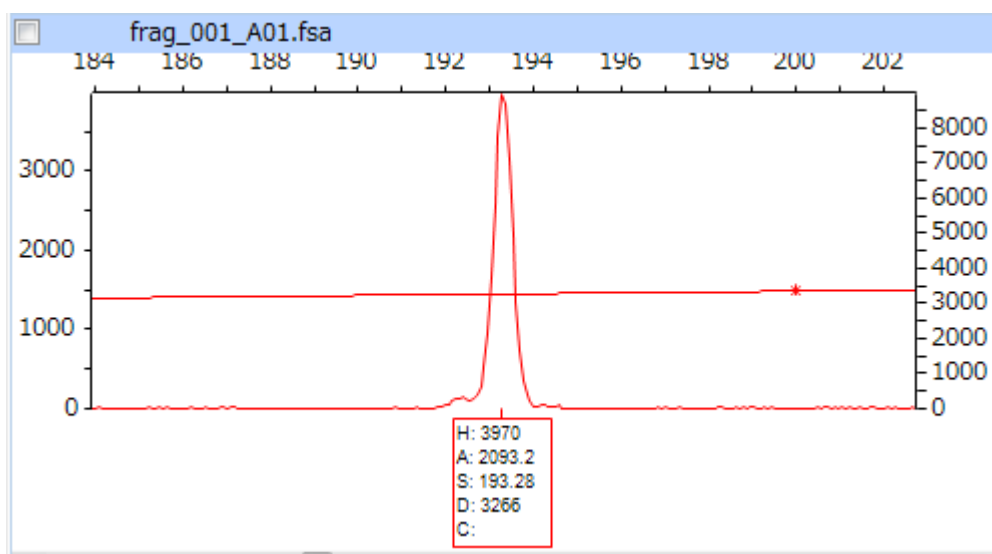
- 8
- 9 *検出されるピークは1本。
- 10

- 1 SSR マーカー名 : Sca0707
- 2 フォワードプライマー配列 : (NED)–GTCGAGGTTGACGGAGATCG
- 3 リバープライマー配列 : gtttctTCCAGTGTCTTGGAGCGTTC
- 4 モチーフ : (AACGGG)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 7
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



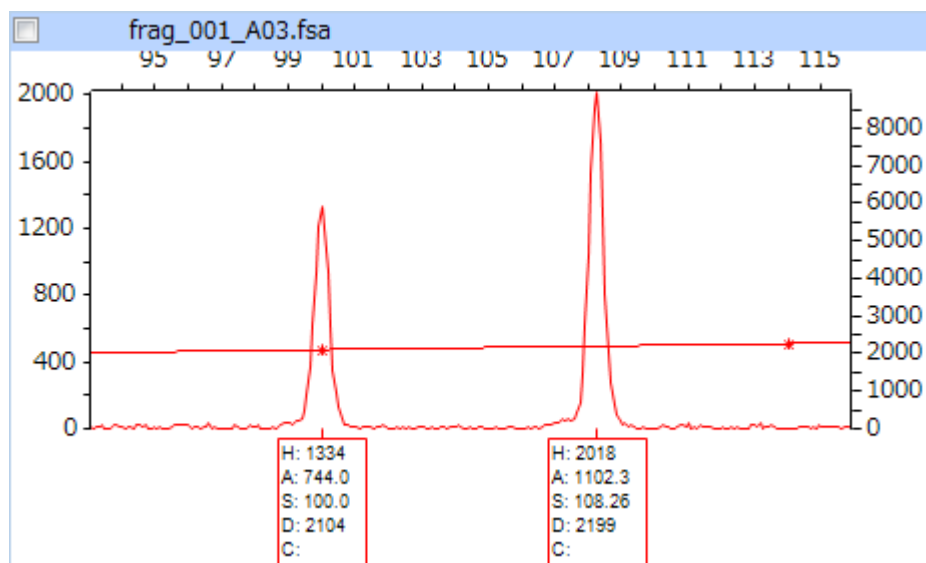
- 8
- 9 *検出されるピークは2本。
- 10

- 1 SSR マーカー名 : Sca0101
- 2 フォワードプライマー配列 : (PET)–TGGATATCCTGGAGGTGGAC
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttCCCGTTCAACTTCGTGATTC
- 4 モチーフ : (CCAGGA)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 1
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 150 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



- 8
- 9 *検出されるピークは 1 本。
- 10

- 1 SSR マーカー名 : Sca0502
- 2 フォワードプライマー配列 : (PET)–TCCATCGTGTAGAAGAGATGCT
- 3 リバープライマー配列 : gtttcttCCTGCTCCCCGAGTATCAAA
- 4 モチーフ : (TATG)
- 5 座乗 Scaffold 番号 : 5
- 6 フラグメント解析用 PCR 増幅産物の希釈倍率 : 100 倍
- 7 基準品種 HOX 1 号のフラグメントピーク :



- 8
- 9 *検出されるピークは2本。
- 10

1 付属文書 2. 供試品種の特徴

品種名称	登録番号	出願番号	農林水産植物の種類	育成者権者名/備考
HOX 1 号	23540	27429	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. × <i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	ホクト株式会社
MH006393	-	-		ホクト株式会社*
MH006407	-	-		ホクト株式会社*
MH006408	-	-		ホクト株式会社*
MH006008	-	-	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	ホクト株式会社*
ホクト PLE-2 号	10615	11533	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	ホクト株式会社
PLE-3 号	19912	22928	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	ホクト株式会社
PLE-5 号	19913	22929	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	ホクト株式会社
菌興 PE1 号	-	29362	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	一般財団法人日本きのこセンター
ホクト Y-3	2567	2767	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	ホクト株式会社
ホクト Y-5	5244	5462	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	ホクト株式会社
ふくひら 1 号	3103	3750	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	福井県

- 2 *MH006393、MH006407、MH006408、MH006008 は、HOX 1 号を作出するために供試
 3 された品種である。詳細は、本マニュアル p.3 の参考文献 5) の Fig. 2. を参照されたい。