

栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査法

本検査法は栽培用のクリーピングベントグラスの種子を対象とする。GenCheck（ファスマック社）を用い、1検体から2反復でDNAを抽出する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマーセット及び組換え体由来遺伝子検出用プライマーセットを用いた蛍光LAMPに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。なお、本検査法は、遺伝子組換え体のスクリーニング検査であることから、遺伝子組換え体陽性と判定した試料は、既存のリアルタイムPCR法を用いた検査法により確定診断を行う。

1 種子由来DNAの抽出

1.1 種子の粉砕

収去したクリーピングベントグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に1gを採取し、表面に種子コーティングが施されている場合は、超純水で10回洗浄後、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに65℃で乾燥させる。その後、ビーズ式粉砕器（マルチビーズショッカー MB601（安井器械社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの簡易DNA抽出

種子粉砕物1点につき2反復で実施する。

種子粉砕物40mgを1.5 mLチューブに量り取り、GenCheck 400 µLを加える。試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、100℃で10分間加熱する。加熱後すぐに氷上で1分間冷却し、遠心分離機により15,000×g、室温で5分間遠心分離する。上清を回収し、LAMP鑄型とする。

2. 蛍光LAMP法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。蛍光LAMPにはリアルタイムPCR機（Quantstudio5と同等の性能を有する機種）又は蛍光LAMP専用機（GenieII等）*を使用する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマーセット「P35S」及びアグロバクテリウム・TiプラスミドNOS

ターミネーター遺伝子配列を検知するプライマーセット「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、クリーピングベントガラスの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマーセット「18S rRNA」を用いる。プライマーセットの塩基配列は以下のとおりである。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマーセット「P35S」

P35S-F3 : 5' - ATT GCG ATAAAG GAAAGG CTA TCG -3'

P35S-B3 : 5' - ACT TCC TTA TAT AGA GGAAGG GTC -3'

P35S-FIP : 5' - GAA GAC GTG GTT GGA ACG TCT TCT TAG TGG TCC CAA AGA
TGG A -3'

P35S-BIP : 5' - GCA AGT GGA TTG ATG TGA TAT CTC CTT GCG AAG GAT AGT
GGG A -3'

P35S-LoopF : 5' - TTT CCA CGA TGC TCC TCG -3'

P35S-LoopB : 5' - CGT AAG GGA TGA CGC ACA -3'

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマーセット「NOS ter」

TNOS-F3 : 5' - CGC GAT AAT TTA TCC TAG TTT G -3'

TNOS-B3 : 5' - CGT TCAAAC ATT TGG CAA T -3'

TNOS-FIP : 5' - GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT TTT TCG CGC TAT ATT TTG
TTT TCT A -3'

TNOS-BIP : 5' - CAT GCT TAA CGT AAT TCA ACA TTT TTG AAT CCT GTT GCC
GGT C -3'

TNOS-LoopF : 5' - GAT TAG AGT CCC GCA ATT ATA C -3'

TNOS-LoopB : 5' - AAA TTA TAT GAT AAT CAT CGC AA -3'

③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマーセット「18S rRNA」

18SrRNA-F3 : 5' - CTC GGC AAC GGA TAT CTC G -3'

18SrRNA-B3 : 5' - TAC CCG ATG AGG GTG TGG -3'

18SrRNA-FIP : 5' - TGG TTC GCG GGA TTC TGC AAT TTC TCG CAT CGA TGA AGA
ACG -3'

18SrRNA-BIP : 5' - AGT CTT TGA ACG CAA GTT GCG CAG CGT GTT TTG CGT GAC
G -3'

18SrRNA-LoopF : 5' - CAC ACC AGG TAT CGC ATT TCG -3'

18SrRNA-LoopB : 5' - CGA GGC CAT TCG GCT GA -3'

*488nmの励起波長において、520nmの蛍光を検出する機種が使用できる。

2. 1 LAMP用反応液の調製

LAMP用反応液は、以下の手順により、25 µL/ウェルになるように調製する。なお、調整は氷上で行う。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、Isothermal Master Mix (OptiGene社) 15 µL、1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 0.25µL、0.1mol/L DTT 0.25µL、F3、B3プライマー (20µmol/L) 各 0.25 µL、FIP、BIPプライマー (20µmol/L) 各2.0µL、LoopF、LoopBプライマー (20 µmol/L) 各1.0 µL、滅菌超純水1.0µLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、LAMP用の Pre-mix溶液を作製して、各ウェルに23.0 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.0 µLを添加する。LAMPのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する*。操作終了後、ウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、遠心して気泡を取り除く。

* Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.0 µL 添加する。

2. 2 測定情報の設定

2. 2. 1 リアルタイム PCR 機を用いた場合の設定

リアルタイム PCR 機を使用する場合は、測定情報を設定する。設定する項目は、測定の初期設定、蛍光色素の特性並びに検体の配置及び種類である。測定の初期設定については、「Experiment type」を「Standard Curve」、「Run mode」を「Standard」とする。蛍光色素の特性は、Reporter は「FAM」、Quencher は「None」、Passive Reference は「None」と設定する。調整したプレートの配置に対応するように検体の配置及び種類（「N」：Non-Template Control、「U」：DNA 試料液）の設定を行う。「Sample Volume」は 25 µL に設定する。

2. 2. 2 蛍光LAMP専用機を用いた場合の設定

蛍光LAMP専用機を使用する場合は、520nmの蛍光を検出するように設定する。

2. 3 LAMP反応

2. 3. 1 リアルタイム PCR 機を用いた LAMP 反応

64°Cで 30 秒間を 1 サイクルとして、60 サイクルの増幅反応を行い、その後融解曲線解析*を実施する。RUN が終了して解析画面に切り替わったことを確認し、測定結果を解析する。

* 融解曲線解析は各機器の初期設定でよい。

〔リアルタイム PCR 機における LAMP 反応の設定例〕

増幅反応 64°C 30 秒 60 サイクル[†]
 ↓ Ramp rate 1.6°C/s

融解曲線解析 95℃ 15 秒
 ↓ Ramp rate 1.6℃/s
 60℃ 1 分
 ↓ Ramp rate 0.15℃/s[†]
 95℃ 1秒

[†] 蛍光データを取得する。

2. 3. 2 蛍光LAMP専用機を用いたLAMP反応

64℃で30分間増幅反応を行い、その後会合曲線解析を実施する。RUNが終了していることを確認し、測定結果を解析する。

〔蛍光 LAMP 機における LAMP 反応の設定例〕

増幅反応 64℃ 30 分
 ↓
 会合曲線解析 95℃
 ↓ Ramp rate 0.05℃/s
 60℃

3. 結果の解析と判定

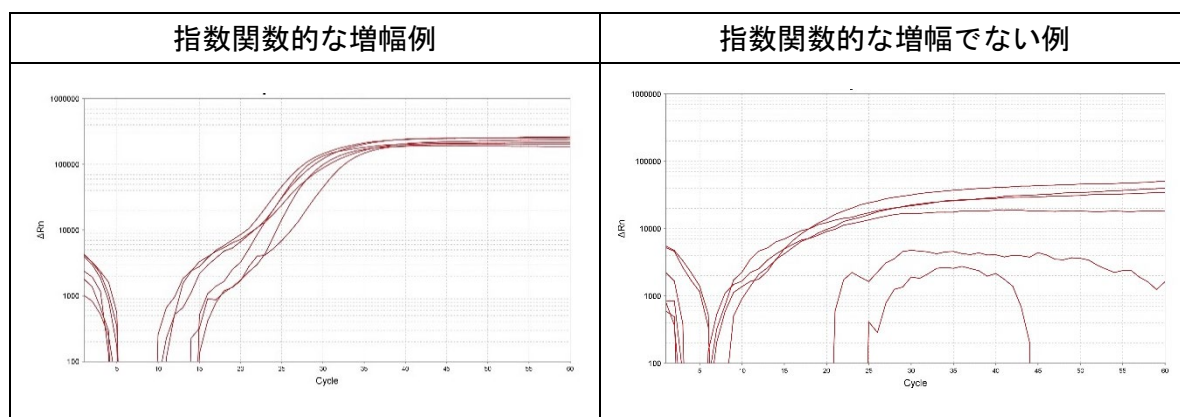
3. 1 結果の解析

3. 1. 1 リアルタイム PCR 機における結果の解析

結果の判定は Amplification plot 上での指数関数的な増幅曲線の確認及び融解曲線解析の結果得られた特異的な増幅反応を示す T_m 値の確認をもって行う。

まず、Amplification Plot において指数関数的な増幅曲線*が認められるかを確認する。指数関数的な増幅が認められた場合、Melting Curve plot において Melting Curve のピーク値（T_m 値）を確認する。

増幅曲線の指数関数的な増幅が認められた場合において、T_m 値が表の値に近似する場合は特異的な増幅と判定し、近似しない場合は非特異的な増幅と判定する。



3. 1. 2 蛍光 LAMP 専用機における結果の解析

結果の判定は Amplification 画面での指数関数的な増幅曲線及び Detection Time の確認並びに会合曲線解析の結果得られた特異的な増幅反応を示す Annealing Temperature の確認をもって行う。

まず、Amplification 画面において指数関数的な増幅曲線が認められ、Detection Time が得られるかを確認する。Detection Time が得られた場合、Anneal 画面において Annealing Temperature を確認する。

増幅曲線及び Detection Time により指数関数的な増幅が認められた場合において、Annealing Temperature が表の値に近似する場合は特異的増幅と判定し、近似しない場合は非特異的増幅と判定する。

表 Quantstudio5 における Tm 値 (Annealing Temperature) の基準値

検出対象	Tm 値 (Annealing Temperature) *
組換え遺伝子検知「P35S」	87.24°C
組換え遺伝子検知「NOS ter」	80.93°C
内在性遺伝子検知「18SrRNA」	91.25°C

* Tm 値 (Annealing Temperature) は、機種ごとに一定の幅 ($\pm 7^{\circ}\text{C}$) が存在する。

3. 2 結果の判定

内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全てのウェルの結果により、スクリーニング検査法における遺伝子組換え体検出の結果判定を行う。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認された場合には、当該試料は陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査法により確定診断を実施する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみの全てのウェルで特異的増幅が確認された場合には、当該試料は擬陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査法により確定診断を実施する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認されなかった場合（指数関数的増幅が確認されなかった場合及び非特異的増幅と判定した場合）には、当該試料は陰性と判定する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで特異的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、当該試料は擬陽性と判定し、リアルタイム PCR 法を用いた検査法により確定診断を実施する。
- (5) 内在性遺伝子検知試験について全てのウェルで特異的増幅が得られない場合（指数関数的増幅が確認されなかった場合及び非特異的増幅と判定した場合）は、リアルタイム PCR 法を用いた検査法により判定する。