

栽培用アルファルファ種子における遺伝子組換え体の検査法

本検査法は栽培用のアルファルファの種子を対象とする。GM quicker 2(NIPPON GENE 社)を用い、1検体から2反復でDNAを抽出・精製する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイムPCR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。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したアルファルファ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、5gを無作為に採取し、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）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DNA抽出・精製

種子粉砕物1点につき2反復で実施する。

種子粉砕物1gをポリエチレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液12 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65°Cで15分間静置する。GE 2-K 緩衝液1,500 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより4,000 \times g、室温で10分間遠心分離する。上清1 mLを1.5 mL容サンプルチューブに分取し、遠心分離機により18,000 \times g以上、室温で5分間遠心分離する。上清700 μ Lを新たな2.0 mL容サンプルチューブに分取し、GB 3 緩衝液260 μ L及びイソプロピルアルコール260 μ Lを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により18,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 μ Lを加え、遠心分離機により18,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離する。Spin columnを新たな1.5 mL容サンプルチューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え、室温で3分間静置する。遠心分離機により18,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7～2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20℃以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。

^{*1}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT^{*}) を用いた定性PCR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。

組換え遺伝子検知用としては、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対・プローブ「NOS ter」及びフィグモートモザイクウイルスプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「PFMV」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、アルファルファの*ACCI*遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「ACC1」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

- ① NOS ターミネーター配列検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ② PFMV プロモーター配列検知プライマー対・プローブ「PFMV」
PFMV-F : 5'- ATC AAC AAG GTA CGA GCC ATA TC -3'
PFMV-R : 5'- TGA GGC TTT GGA CTG AGA ATT C -3'
PFMV-P : FAM 5'- CCA AGA AGG AAC TCC CAT CCT CAA AGG TTT -3' TAMRA
- ③ アルファルファ *ACCI* 遺伝子配列検知プライマー対・プローブ「ACC1」
ACC1-F : 5'- GAT CAG TGA ACT TCG CAA AGT AC -3'
ACC1-R : 5'- CAA CGA CGT GAA CAC TAC AAC -3'
ACC1-P : FAM 5'- TGA ATG CTC CTG TGA TCT GCC CAT GC -3' TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix*¹12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μ mol/L）各0.5 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.5 μ L、滅菌超純水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する*²。操作終了後、真上からシール*³し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad*⁴を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*¹ TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*² Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

*³ 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate（Life Technologies 社）、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover（Life Technologies 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*⁴ ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad（Life Technologies 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関して、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃・2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。次いで、95℃・15秒間、60℃・1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

2点並行で抽出した DNA 試料液 1点につき、2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、遺伝子組換え体検知試験のすべてのウェルで一致した結果が得られない場合には、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、本試料からの本検査法による検知は不能とする。

なお、上記判定により遺伝子組換え体陽性が判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROX の蛍光強度の明確な下降や FAM の蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、内在性遺伝子検知試験にて少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Ct 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「1 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い、判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても内在性遺伝子検知試験にて少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、本試料からの本検査法による検知は不能とする。