

栽培用アマ種子における遺伝子組換えアマ（FP967）の検査法

本検査法は栽培用アマ種子(アマニ)を対象とする。Genomic-tip 20/G (QIAGEN 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・プローブ及びスルフォニル系除草剤耐性アマ FP967（以下「FP967 アマ」という。）の組換え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、FP967 アマ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

検査に用いるアマ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、表面に他の付着物がないことを確認すること。当該アマ種子から無作為に 10,000 粒を採取し、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用いて粉砕する。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 アマ種子からの DNA の抽出・精製

分析試料 0.5 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出・精製キット（QIAGEN Genomic-tip）を用い以下のように DNA を抽出・精製する。

試料に、G2 緩衝液 ^{*1}7.5 mL と α -amylase ^{*2}20 μ L を加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、37℃で1時間保温する。さらに G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K ^{*3}200 μ L、及び、RNaseA ^{*4} 20 μ L を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで攪拌し、50℃で1時間保温する。その間2～3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、5,000 x g、4℃で15分間遠心分離し、得られた上清を2 mL ずつ、2 mL 容チューブ5本（計 10 mL）に移し ^{*5}、20,000 x g、4℃で15分間遠心分離する。あらかじめ QBT 緩衝液 ^{*1} 1 mL で平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に、各 2 mL 容チューブから上清を 1 mL ずつ採取し ^{*5} 負荷する（計 5 mL）。次いで、チップを QC 緩衝液 ^{*1} で 2 mL ずつ3回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ 50℃に加温した QF 緩衝液 ^{*1}500 μ L を負荷し、DNA を溶出する（溶出 1）。チップを新しい遠沈管に移し、さらに QF 緩衝液 ^{*1} 500 μ L で DNA

を溶出する（溶出 2）。次いで、溶出液と等量のイソプロパノールを溶出 1 と溶出 2 にそれぞれ添加し、ゆっくり 10 回転倒混和した後、5 分間室温で静置する。12,000 x g、4℃で 15 分間遠心し、上清を廃棄した後 70%エタノール 500 μ L を添加し、10 回転倒混和する。12,000 x g、4℃で 3 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿を適度に乾燥させる。溶出 2 の遠沈管にあらかじめ 60℃に加温した水 50 μ L を加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を溶出 1 の遠沈管に移し入れ、よく混合し^{*6}、抽出 DNA 試料液とする。抽出 DNA 試料液は分光光度計を用いて DNA 濃度測定を行う。

^{*1} G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び、QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

^{*2} α -amylase（高濃度品）は Nippon Gene 社製のもの、又は、同等の活性を持つものを用いる。

^{*3} Proteinase K は QIAGEN 社製（20 mg/mL）または同等の効力をもつものを用いる。

^{*4} RNaseA は QIAGEN 社製（100 mg/mL）または同等の効力をもつものを用いる。

^{*5} 沈殿物や上層の膜状の部位を取らないように注意する。

^{*6} 沈殿物（DNA）が溶解しない場合は、65℃で 15 分間振とう溶解する。それでも完全に溶解できず、不溶物が認められる場合は、12,000 x g、4℃で 3 分間遠心して得られた上清を新しい遠沈管に移し、これを抽出 DNA 試料液とする。

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 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nm の範囲で紫外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/ μ L 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（A 260/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。

^{*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。

2.2 DNA 試料液の調整及び保存

純度を確認した DNA 試料原液を滅菌蒸留水で希釈して 50 ng/ μ L に調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 20 μ L 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。

3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

FP967 の検出は GM アマ検知用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR とアマ陽性対照用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR の 2 試験を行い判定する。

GM アマ検知用として、NOS ターミネーターとスペクチノマイシン耐性遺伝子の境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。また、アマ陽性対照用として *stearoyl-acyl carrier protein desaturase 2* (SAD) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

GM アマ検知用プライマー対・プローブ

NOST-Spec F: 5'- AGC GCG CAA ACT AGG ATA AA-3'

NOST-Spec R: 5'- ACC TTC CGG CTC GAT GTC TA-3'

NOST-Spec probe: 5'-FAM- CGC GCG CGG TGT CAT CTA TG-BHQ1-3'

アマ陽性対照用プライマー対・プローブ

SAD F: 5'- GCT CAA CCC AGT CAC CAC CT -3'

SAD R: 5'- TGC GAG GAG ATC TGG AGG AG -3'

SAD probe: 5'-FAM- TGT TGA GGG AGC GTG TTG AAG GGA-BHQ1-3'

3.1 リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (ABI PRISM™ 7900)

3.1.1 PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。組成は以下のとおりである。

Universal PCR Master Mix *¹ 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 µmol/L）各 0.4 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.25 µL を混合し、水で全量 22.5 µL に調製後、50 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL（125 ng）を添加する。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する *²。分注操作終了後、真上からシール *³ し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad *⁴ を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。各 DNA 試料液あたり GM アマ検知用リアルタイム PCR とアマ陽性対照用リアルタイム PCR をそれぞれ 2 ウェル並行して行うものとする。

*¹ 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。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

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

^{*3} 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 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 (Applied Biosystems 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。

3.1.2 プレート情報の設定

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

3.1.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 15 秒間、60 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして、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。

3.2 リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法(ABI PRISMTM 7500)

3.2.1 PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。組成は以下のとおりである。Universal PCRMaster Mix^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各 0.4 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.25 μ L を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、50 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L（125 ng）を添加する。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する^{*2}。分注操作終了後、真上からシール^{*3} し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリーケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡

を抜いておく。各 DNA 試料液あたり GM アマ検知用リアルタイム PCR とアマ陽性対照用リアルタイム PCR をそれぞれ 2 ウェル並行して行うものとする。

***¹ 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。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

***² Non-Template Control (NTC)**

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

***³ 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリーケーター**

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 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。

3.2.2 プレート情報の設定

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

3.2.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 15 秒間、60 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして、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

GM アマ検知用試験およびアマ陽性対照用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 上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

まず、目視で Amplification plot 上に NOST-Spec の指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、FP967 陽性を疑う。次いで、ベースライン（3 サイクルから 15 サイクル）の ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) を選択する*。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全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、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全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、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全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ遺伝子組換え体検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1 種子由来の 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 FP967 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、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 以降の操作を行い、それでも 43 未満の Ct 値が得られない場合には、その DNA 試料液の測定結果を無効とする。

* 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔR_n が変動することから、普遍的な Th. line の設定の数値を示すことが困難である。したがって Amplification plot 上でベースライン（3 サイクルから 15 サイクル）の ΔR_n のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. line を選択する。参考として ABI PRISM™ 7900 及び ABI PRISM™ 7500 とともに 0.2-0.5 の範囲であると考えられる。