

栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体のスクリーニング検査法

本検査法はパパイヤの種子を対象とする。GM quicker2（NIPPON GENE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LAMP法に供し、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・精製

種子の粉碎については、「栽培用パパイヤ種子における遺伝子組換え体の検査法」の「1 種子由来DNAの抽出・精製」に従う。得られた種子粉碎物からのDNA抽出・精製法については、以下の通り行う。

種子粉碎物100 mgを量り採った1.5 mL容チューブへ、GE1緩衝液^{※1} 800 μ L、RNase A^{※1} 10 μ L、Proteinase K^{※1} 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 $^{\circ}$ Cで15分間静置する。GE2-K 緩衝液^{※1}100 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで混合する。

13,000 $\times$ g 以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で10 分間遠心分離する。上清550 μ L^{※2}を新たな1.5 mL容チューブに移し、13,000 $\times$ g 以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で10分間遠心分離する。

上清500 μ L^{※3}を新たな1.5 mL容チューブに移し、GB3緩衝液^{※1} 185 μ L及びイソプロパノール185 μ Lを添加した後、10～12回転倒混和する。

混合液 650 μ LをSpin column^{※1}に負荷した後、13,000 $\times$ g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で30秒間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液全量を負荷するまでこの操作を繰り返す。

次いでGW緩衝液^{※1} 650 μ Lを負荷し、13,000 $\times$ g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で1分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin columnを新たな1.5 mL 容チューブに移し、滅菌水 50 μ Lを加え室温で3分間静置した後、13,000 $\times$ g 以上で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液とする。

※1 GE1緩衝液、RNase A、Proteinase K、GE2-K 緩衝液、GB3緩衝液、GW緩衝液、Spin columnは、GM quicker2（NIPPON GENE社）に付属のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

※2 上清550 μ L以上を得ることが難しい場合、可能な限り多くを回収する。多少の沈殿物や浮遊物が混ざっていても問題は無い。

※3 上清が500 μ Lに満たない場合、以降のGB3とイソプロパノールは（回収量 $\times$ 0.37） μ Lを添加することとする。

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^{※4}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（A260/A280）。この比が1.7～2.0になれば、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。

※4 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50 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。

使用前に95-100℃で10分間熱変性し、氷につけて急冷後、スピンドウンしたものを鋳型として用いる。

DNA試料液は20 μLごとに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。なお、DNA試料原液の濃度が50 ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

3 LAMP反応

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。LAMP反応にはリアルタイムPCR機（QuantStudio® 5と同等の性能を有する機種）又は蛍光LAMP専用機（Genie II等）を使用する。

組換え遺伝子検知用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子由来配列(以下、「P35S」という。)を検知するプライマーセット「P35S」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用として、パパイヤのChymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマーセット「Chy」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 ATA AAG GAA AGG C(C/T)A TCG -3'

P35S-B3 : 5' - ACT TCC TTA TAT AGA GGA AGG 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 内在性遺伝子 (Chy) 検知プライマーセット「Chy」

Chy-F3 : 5' - TCT ACA ATC TTG CTA ACC CT -3'

Chy-B3 : 5' - AGT CAT CTT GAG AAT AAC CCA C -3'

Chy-FIP : 5' - TGG ATG AAG GGA AAT GGG AGG AGC AAG TAG AGT GAA TGA CAA GA -3'

Chy-BIP : 5' - CCA CTC TTG AGA GTT AGC TAG TAT GAG ACA TGT TGC CAA GAA -3'

Chy-LoopF : 5' - CGC ATG GGT TTA TAT ACT AGC -3'

Chy-LoopB : 5' - ACA ATG GCT ACG ATG AGT TCA -3'

3.1 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。

1ウェル当たりの試薬の分量は表1のとおりである。Isothermal Master Mix (OptiGene社)^{※5} 15.0 μL、10× プライマーミックス2.5 μLに滅菌超純水を加えて23.0 μLに調製する。10× プライマーミックスは各プライマー100 μM (100 pmol/μL) の溶液を混合して調製する。組成は表2および表3のとおり、P35SとChyのFIPおよびBIPプライマーの濃度が異なるので注意する。これらを試験点数に応じて必要量混合し、各ウェルに分注後、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試料液の代わりにTE溶液^{※7}を2.0 μL添加したものも同時に調製する^{※6}。

分注後のチューブ等については、卓上遠心機等でスピンドウンしてからセットすることが望ましい。

※⁵ Isothermal Master Mix for Genie® IIIとして（株）ニッポンジーンより入手可

※⁶ Non-Template Control (NTC)

※⁷ TE溶液は、GM quicker2（NIPPON GENE社）に付属のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

3.2 測定情報の設定

3.2.1 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、機器のデフォルトの設定で使用する。

3.2.2 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。QuantStudio® 5における測定の初期設定については、「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「Other」、「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。調製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。

3.3 LAMP増幅

3.3.1 蛍光LAMP専用機を用いたLAMP反応

装置にチューブをセットし、反応を開始する。反応条件は65 °C、30分間の条件で設定する。LAMP反応終了後、会合曲線解析を実施する。会合曲線解析が終了し、ヒートブロックの温度が下がっていることを確認し、結果の解析を行う。

〔蛍光LAMP機におけるLAMP反応の設定例〕

増幅反応	65 °C 30分
	↓
会合曲線解析	98 °C
	↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定
	80 °C

3.3.2 リアルタイムPCR機を用いたLAMP反応

65°Cで30分間（機器設定例は65 °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 65 °C 30秒 60サイクル[†]
 ↓ Ramp rate 1.6 °C/s
 会合曲線解析 98 °C
 ↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定
 80 °C
 ↓ Ramp rate : 機器のデフォルトの設定
 98 °C

[†] 蛍光データを取得する。

4. 結果の解析と判定

4.1 結果の解析

4.1.1 蛍光LAMP専用機における結果の解析

結果の判定はAmplification 画面上での指数関数的な明確な増幅曲線の有無をもって確認する。設定画面のAmplification RateのThresholdを0.015に設定する。

Amplification画面上で「Chy」から増幅があり、さらに「P35S」において、目視で指数関数的な増幅曲線が確認され、Peaksに増幅時間が表示された場合には、遺伝子組換えパパイア陽性を疑う。

4.1.2 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^{※8}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。

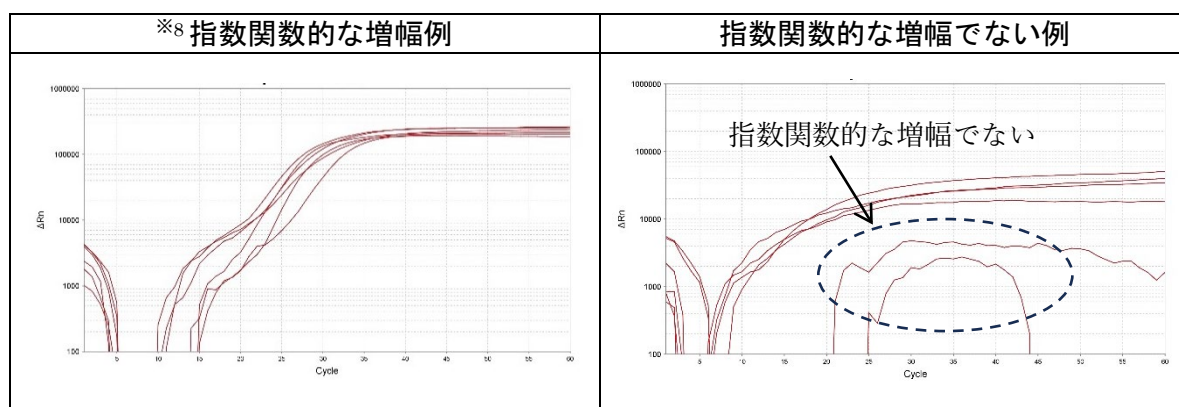


表 QuantStudio® 5における T_m 値 (Annealing Temperature) の基準値

検出対象	T _m 値 (Annealing Temperature) ^{※9}
組換え遺伝子検知「P35S」	86.14 °C
内在性遺伝子検知「Chy」	83.45 °C

^{※9} T_m 値 (Annealing Temperature) は、機種ごとに一定の幅 (±7 °C) が存在する。

4.2 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指数関数的増幅が確認され、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数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指数関数的増幅が確認され、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には、当該試料は陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで指数関数的増幅が確認され、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。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について全てのウェルで指数関数的増幅が得られない場合は、リアルタイム PCR 法を用いた検査法により判定する。

表 1 LAMP反応液組成

	濃度	1テスト容量 (μL)
Isothermal Master Mix		15.0
10×プライマーミックス	10 ×	2.5
DNA試料液	50 ng/μL	2.0 (total 100 ng)
滅菌超純水		5.5
Total		25.0

表 2 カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (P35S) 用10 X プライマーミックスの組成

	1テスト容量 (μl)	100テスト容量 (μl)
100 μM FIP	0.8	80.0
100 μM BIP	0.8	80.0
100 μM F3	0.05	5.0
100 μM B3	0.05	5.0
100 μM LF	0.2	20.0
100 μM LB	0.2	20.0
H ₂ O	0.35	35.0
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.025	2.5
0.1 M DTT	0.025	2.5
Total	2.5	250.0

表 3 Chymopapain (Chy) 遺伝子用10 X プライマーミックスの組成

	1テスト容量 (μl)	100テスト容量 (μl)
100 μM FIP	0.4	40.0
100 μM BIP	0.4	40.0
100 μM F3	0.05	5.0
100 μM B3	0.05	5.0
100 μM LF	0.2	20.0
100 μM LB	0.2	20.0
H ₂ O	1.15	115.0
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.025	2.5
0.1 M DTT	0.025	2.5
Total	2.5	250.0