

## コメ (63Bt、NNBt、CpTI) の検査方法

本検査法ではコメおよびコメ加工品（コメを主原料とするもので、コメ粉やビーフン等、非加熱又は加工の程度の低いもの）を検査対象とし、DNA 抽出精製は、以下のイオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip 100/G) を使用した DNA の抽出精製法を用いる。別法としてシリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット (NIPPON GENE GM quicker 2) を使用した DNA 抽出精製法をコメおよび非加熱加工品に適用できる。

1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、DNA 試料液を用いて定性リアルタイム PCR 法を実施する。

### 1. DNA 抽出精製

#### 1.1. イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット法 (QIAGEN Genomic-tip) <sup>\*1</sup>

DNA 収量が十分である検体については、以下の操作を、試料 0.5 g から緩衝液と酵素使用量を半分にして DNA の抽出精製を行うことができる。

均質に <sup>\*2</sup> 細粉碎した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、G2 緩衝液 <sup>\*3</sup> 15 mL を加えて、試料が均質になるまでボルテックスミキサー等で混合し、 $\alpha$ -Amylase <sup>\*4</sup> 12  $\mu$ L と RNase A <sup>\*5</sup> 60  $\mu$ L を加え 37 °C で 30 分保温する。その間 2 ~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次に、Proteinase K <sup>\*6</sup> 60  $\mu$ 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、65 °C で 30 分保温する。その間 2 ~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。酵素処理終了後、氷中で冷やし、その遠沈管を 3,000 $\times$ g、低温下 (4°C)、15 分間遠心する <sup>\*7</sup>。上清をポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に移して、氷中に 60 分間静置後、3,000  $\times$  g、低温下 (4 °C)、15 分間遠心する。その間、あらかじめポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) 上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液 <sup>\*3</sup> 4 mL を通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する <sup>\*8</sup>。この時の溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液 <sup>\*3</sup> で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後 <sup>\*9</sup>、あらかじめ 50 °C に温めておいた QF 緩衝液 <sup>\*3</sup> 1 mL を負荷し、溶出液は捨てる。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しいポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) 上にセットし、再度 50 °C に温めておいた QF 緩衝液 <sup>\*3</sup> 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合する。マイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) に混合した溶液を分注し、10,000  $\times$  g 以上で、低温下 (4 °C) 15 分間遠心し上清を捨てる。この際、上清を極力除去する <sup>\*10</sup>。次いで、各遠沈管当たり 70% (v/v) エタノールを 1 mL ずつゆっくり加え、さらに 10,000  $\times$  g 以上で、低温下 (4 °C) 5 分間遠心する。上清を

捨て<sup>\*10</sup>、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5 mL 容）の沈殿を、予め 50 °C に温めた滅菌蒸留水 55 µL に溶解し、DNA 試料原液とする<sup>\*11</sup>。

<sup>\*1</sup> 実験を通して、液体を分注するピペットやフィルター付きピペットチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。

<sup>\*2</sup> 均質に細粉碎しないと抽出 DNA 量に変動があることがあるので、十分細粉碎し、均質化する。

<sup>\*3</sup> G2緩衝液、QBT緩衝液、QC緩衝液およびQF緩衝液は、キアゲン社（Cat. No. 19060）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。

<sup>\*4</sup> α-Amylase（高純度品）はニッポンジーン社製のもの、又は、同等の活性を持つものを用いる。

<sup>\*5</sup> RNase AはQIAGENキアゲン社製（100 mg/mL, Cat. no. 19101）、又は、同等の効力をもつものを用いる。

<sup>\*6</sup> Proteinase Kはキアゲン社製社製（20 mg/mL, Cat. no. 19133）、又は、同等の効力をもつものを用いる。

<sup>\*7</sup> 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。使用するローターおよび 50 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

<sup>\*8</sup> 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。

<sup>\*9</sup> 液体の流速が著しく減少した場合には、カラム上方から 10 mL テルモシリンジ（コード番号：SS-10SZ）のプランジャーなどを用いて穏やかに加圧させ、流速を増加させる。プランジャーを利用する場合には、プランジャーをカラムに 1 cm 程度挿し込んで抜く操作を繰り返す。この際、プランジャーを挿し込む操作は、プランジャー先端のゴム部分とカラム内壁を密着させ、空気が漏れないように行う。一方、プランジャーを抜く操作は、逆流を防ぐために、プランジャーを斜めにしてプランジャー先端のゴム部分とカラム内壁との間に隙間を空け、カラム内へ空気を入れながら行う。

<sup>\*10</sup> 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去する。

<sup>\*11</sup> 溶解操作の際には、まず1本のマイクロ遠沈管に55 µLの滅菌蒸留水を入れ、沈殿したDNAを溶解する。次いでそのDNA溶液を次のマイクロ遠沈管に入れ、沈殿したDNAを溶解する。この操作を繰り返し、最終的に各検体から得られるDNA溶液を55 µLとなるようにする。

## 1.2. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (NIPPON GENE GM quicker 2)

<sup>\*1</sup>（別法、コメおよび非加熱加工品に適用）

均質に<sup>\*2</sup>細粉碎した試料 500 mg をポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液<sup>\*3</sup> 2.1 mL を加えて、試料が均質になるまでボルテックスミキサー等で混合し、α-Amylase<sup>\*4</sup> 6 µL と RNase A<sup>\*3</sup> 30 µL を加え 37 °C で 30 分保温する。そ

の間 2 ～3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次に、Proteinase K<sup>\*3</sup> 60 μL 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、65 °C で 30 分保温する。その間 2 ～3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。GE2-K 緩衝液<sup>\*3</sup> 255 μL を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後<sup>\*5</sup>、氷上に 10 分間静置する。6,000 × g 以上、4 °C の条件で 15 分間<sup>\*6</sup>遠心する。上清<sup>\*7</sup>を新しいチューブ (2 mL 容) に移し、13,000 × g 以上、4 °C の条件で 5 分間遠心する。次いでその上清<sup>\*8</sup>を新しいチューブ (15 mL 容) に移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液<sup>\*3</sup> 375 μL およびイソプロパノール 375 μL を添加した後、10～12 回転倒混和する<sup>\*9</sup>。混合液を 700 μL ずつ spin column に負荷した後、13,000 × g 以上、4 °C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。すべての混合液を負荷するまでこの操作を繰り返す。次いで GW 緩衝液<sup>\*3</sup> 650 μL を負荷し、13,000 × g 以上、4 °C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新しいチューブ (1.5 mL 容) に移し、滅菌蒸留水 55 μL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 × g 以上、4 °C の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

<sup>\*1</sup> 実験を通して、液体を分注するピペットやフィルター付きピペットチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。

<sup>\*2</sup> 均質に細粉碎しないと抽出 DNA 量に変動があることがあるので、十分細粉碎し、均質化する。

<sup>\*3</sup> GE1 緩衝液、GE2-K 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、Proteinase K、α-Amylase および RNase A はシリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE GM quicker 2) 付属のもの、又は、同等の効力を持つものを用いる。

<sup>\*4</sup> 攪拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスに対して 15 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間攪拌する。

<sup>\*5</sup> 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2-K 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2-K 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

<sup>\*6</sup> 使用するローターおよび 15 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

<sup>\*7</sup> できる限り多くの上清を回収する。

<sup>\*8</sup> 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。

<sup>\*9</sup> GB3 緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。チューブの蓋の部分に液が付着した場合は軽くスピンドウンして全量を spin column に負荷する。

### 1.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

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し<sup>\*1</sup>、200～320 nm

の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 ( $A_{260}$  および  $A_{280}$ <sup>2)</sup> を記録する。次いで  $A_{260}$  の値 1 を 50 ng/ $\mu$ L DNA として DNA 濃度を算出する。また  $A_{260}/A_{280}$  を計算する。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<sup>3)</sup>。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 10 ng/ $\mu$ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 55  $\mu$ L ごとにマイクロ遠沈管に分注し、-20°C 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、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

<sup>1)</sup> 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および濃度域が異なるため、適宜とする。

<sup>2)</sup>  $A_{260}$  が DNA 由来の吸光度、 $A_{280}$  がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

<sup>3)</sup>  $A_{260}/A_{280}$  の比が 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. 定性リアルタイムPCR法 (ABI PRISM™ 7900または7500)

害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3試験においては、63Btコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対および63Btコメ検出用プローブ、NNBtコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対およびNNBtコメ検出用プローブ、CpTIコメ検出用試験としてCpTI2検出用プライマー対およびプローブをそれぞれ用い、リアルタイムPCRの3 試験を行い判定する。

また、試験にあたっては、コメ陽性対照用試験としてphospholipase D遺伝子配列を検知するプライマー対およびプローブを用いる。各プライマー\*およびプローブ\*の塩基配列は以下の通りである。

### ・コメ陽性対照用試験

コメ陽性対照用プライマー対、プローブ

PLD3959F : 5'-GCT TAG GGAACA GGG AAG TAA AGTT-3'

PLD4038R : 5'-CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'

PLD-P : FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCGC-TAMRA

### ・害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験

63Bt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマー対

T52-SF : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AGA TTC-3'

OsNOS-R2 : 5'-AAG ACC GGC AAC AGG ATT CA-3'

63Bt コメ検出用プローブ

GM63-Taq : FAM-AAT AAG TCG AGG TAC CGA GCT CGA ATT TCCC-TAMRA

NNBt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマーは 63Bt コメ検出用試験のプライマー（T52-SF と OsNOS-R2）と同様である。

NNBt コメ検出用プローブ

NGMr-Taq : FAM-AAT GAG AAT TCG GTA CCC CGA CCT GCA-TAMRA

CpTI コメ検出用試験

CpTI2 検出用プライマー対、プローブ

CpTI-2F : 5'- TGC AAG TCC AGG GAT GAA GAT-3'

NOS-1R : 5'- ACC GGC AAC AGG ATT CAA TC-3'

KDEL-P : FAM- ATG AGA AAG ATG AAC TCT AG-MGB

\* 各プライマー、プローブは水に溶解する。

## 2.1. PCR 用反応液の調製

各試験のPCR用反応液は25  $\mu\text{L}/\text{well}$ として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix<sup>\*1</sup> 12.5  $\mu\text{L}$ 、各対象プライマー（各50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）各0.4  $\mu\text{L}$ 、各対象プローブ（各10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）各0.25  $\mu\text{L}$ を混合し、滅菌蒸留水で全量20  $\mu\text{L}$ に調製後、DNA試料液

5  $\mu\text{L}$ （10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）を添加する。分注操作終了後、真上からシール<sup>\*2</sup>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。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad<sup>\*3</sup>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。

各試験は、各DNA試料液あたり2 ウェル並行で行うものとし、リアルタイムPCRのブランク反応液として、DNA試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの 1 ウェル分についても同時に調製する。

<sup>\*1</sup> 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。使う直前には必ず転倒混和した後、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。

<sup>\*2</sup> 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリケーションャター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate および MicroAmp 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。

<sup>\*3</sup> MicroAmp Optical Cover Compression Pad

MicroAmp Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。ABI PRISM™ 7500 では使用しない。

## 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、検体の配置と種類および、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、コメ陽性対照用試験、63Bt コメ検出用試験および NNBt コメ検出用試験の場合には Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように、また CpTI コメ検出用試験の場合で Reporter が「FAM」、Quencher が「None」となるように設定する。なお、コメ陽性対照用、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験各 3 試験のいずれとも、Passive Reference を「ROX」と設定する。

## 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。95 °C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。その後、95 °C 20 秒、60 °C で 1 分を 1 サイクルとして、50 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. 結果の解析と判定 (図1参照)

コメ陽性対照用試験および害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 試験の各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、および、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。害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 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、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性を疑う。次いで、ベースラインを (3 サイクルから 15 サイクル) 設定し、 $\Delta R_n$  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) 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。

2併行抽出より得られたDNA試料液（1抽出あたり2ウェル並行で測定）の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

- (1) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3 試験のいずれかの試験において、すべてのウェルで48未満のCt値が得られた場合に、当該試料は害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性と判定する。
- (2) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験の3 試験のいずれかの試験において、すべてのウェルで48未満のCt値が得られない場合は、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。
- (3) コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験 3試験のいずれかの試験においてすべてのウェルの結果が一致しない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2 回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液（合計4ウェル）について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

| 陽性検体のパターン | 陽性対照用PLD | 63Bt      | NNBt      | CpTI      |
|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 抽出DNA試料液① | (+/+)    | (+/+)     | (+/+)     | (+/+)     |
| 抽出DNA試料液② | (+/+)    | (+/+)     | (+/+)     | (+/+)     |
|           |          | ↓         | ↓         | ↓         |
|           |          | 63Bt コメ陽性 | NNBt コメ陽性 | CpTI コメ陽性 |

なお上記判定により害虫抵抗性遺伝子組換えコメ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降下や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、コメ陽性対照用試験のすべてのウェルで48未満のCt値が得られないDNA試料については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を行い、それでもコメ陽性対照用試験のすべてのウェルで48未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

ABI PRISM™ 7900 または 7500 以外のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM™ 7700、7000 等が適用可能である。使用するリアルタイム PCR 機器によって感度が異なるので、標準プラスミド DNA 溶液（下記参考）を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する。

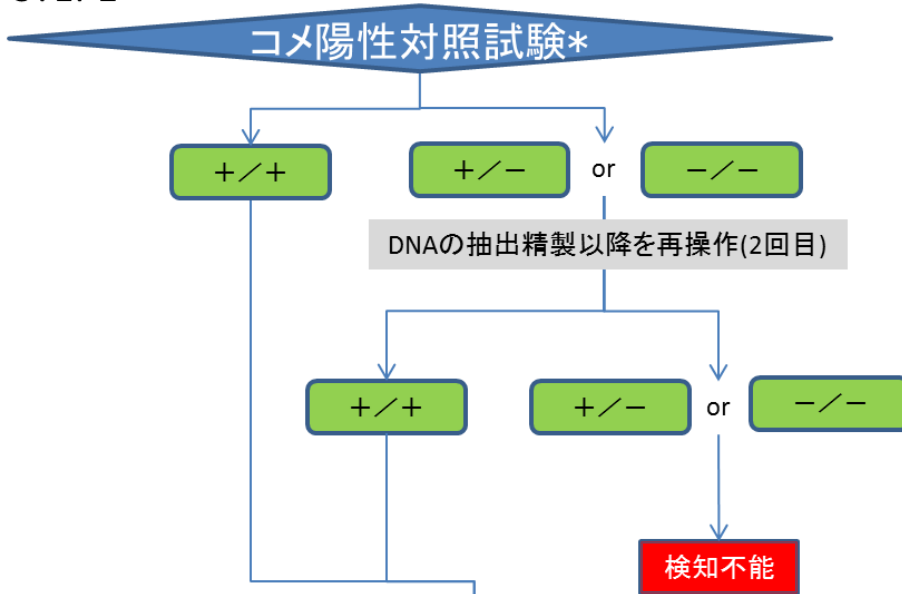
（参考）

- （1）イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）は、キアゲン（〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 FOREFRONT TOWER II. Tel. 03-6890-7300 Fax. 03-5547-0818）から購入可能である。シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法）の NIPPON GENE GM quicker 2 キットは、ニッポンジーン（〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel.076-451-6548 Fax. 076-451-6547）から購入可能である。
- （2）コメの検査法に用いるプライマー対、プローブ（CpTIコメ検出用プローブ（KDEL-P）を除く。）およびリアルタイムPCR法用標準プラスミド（GMコメ害虫抵抗性コメ検出用陽性コントロールプラスミド）は、ニッポンジーン（〒930-0834 富山市問屋町1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）又はファスマック（〒243-0041厚木市緑ヶ丘5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738）から購入可能である。
- （3）コメの検査法に用いるプローブのうち、CpTIコメ検出用プローブ（KDEL-P）についてはライフテクノロジーズ社（〒108-0023 港区芝浦4-2-8 住友不動産三田ツインビル東館 Tel. 03-6832-9300）から購入可能である。

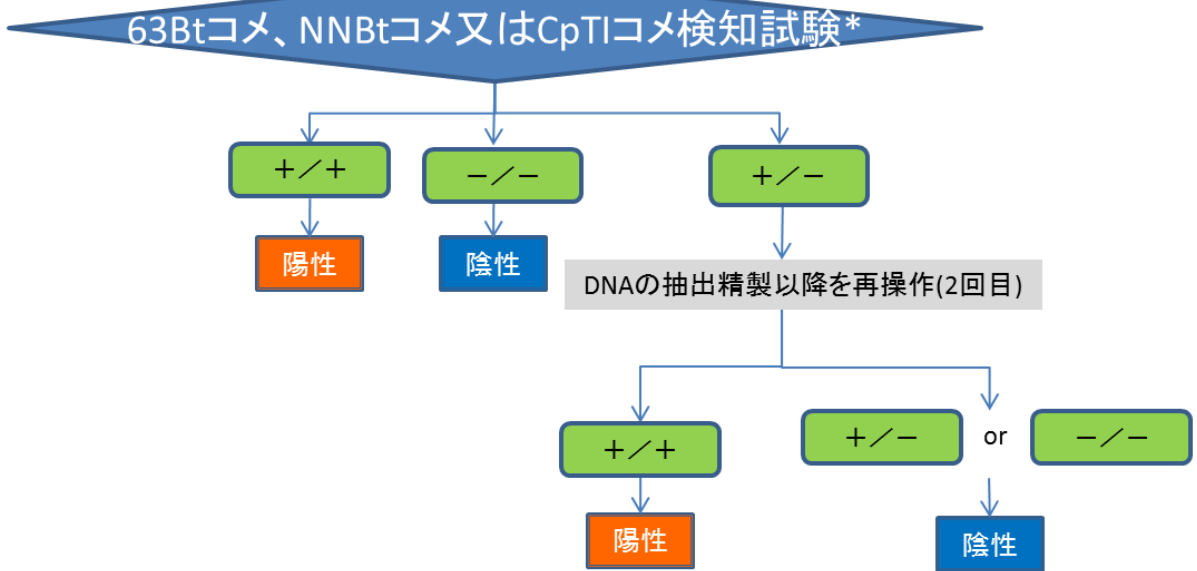


図1 結果判定スキーム

STEP1



STEP2



\*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。