

コメ (LL601) 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、非加熱加工品に限る。）を対象とし、DNA抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2）を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出精製し、各抽出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. シリカゲル膜タイプのDNA抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2）

均質に粉碎した試料500 mgをポリプロピレン製遠沈管（2 mL容）に量り採り、GE1 緩衝液^{*1} 700 μ L、Proteinase K（20 mg/mL） 20 μ L、 α -Amylase（高濃度品） 2 μ LおよびRNase A（100 mg/mL） 10 μ Lを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30 秒間混合した後^{*2}、65 $^{\circ}$ Cの条件で15 分間加温する。GE2-K 緩衝液^{*3} 85 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後^{*4}、氷上に10 分間静置する。13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で5 分間遠心^{*5}する。次いでその上清^{*6} 400 μ Lを1.5 mLチューブに移し、GB3 緩衝液 150 μ Lおよびイソプロパノール（100%） 150 μ Lを添加した後、10 ~12 回転倒混和する^{*7}。混合液700 μ Lをspin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いでGW 緩衝液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、TE緩衝液 30 μ Lを加え3 分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ 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。

*1 GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker2）付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*2 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2 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。

*3 GE2-K緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker2）付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*4 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。

*5 使用するローターおよび2 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。

*6 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。

*7 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。

1.2. 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^{*1}、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} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ 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^{*3}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 40 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 50 μ 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。

*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および濃度域が異なるため、適宜とする。

*2 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。

*3 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)

LL601 の検出はGM コメ検出用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCR とコメ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。

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

F-primer (KVM159) : 5'-TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT-3'

R-primer (KVM160) : 5'-CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTCC-3'

KVM-P: VIC-TGT TGT GCT GCC AAT GTG GCC TG-TAMRA

・ LL601 コメ検出用試験

LL601検出用プライマー対、プローブ

F-primer (MDB498) : 5'-TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC-3'

R-primer (DPA143) : 5'-ATG TCG GCC GGG CGT CGT TCTG-3'

LL601-P : FAM-TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CATT-MGB

2.1. PCR用反応液の調製

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^{*1} 12.5 μL 、対象プライマー対溶液（各プライマー、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）1 μL ^{*2}、対象プローブ溶液（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）0.5 μL 、滅菌蒸留水5 μL 、40 ng/ μL DNA試料液^{*3}5.0 μL 。分注操作終了後、真上からシールし、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、MicroAmp 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 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 対象プライマー対溶液量

コメ陽性対象用の各プライマーを用いる場合には0.5 μL を加えること。

*3 DNA試料原液の濃度が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。

*4 MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISMTM 7900の場合、Life Technologies社)

ABI PRISMTM 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（「UNKN」：DNA試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、コメ陽性対象用の場合には、Reporterが「VIC」、Quencherが「TAMRA」となるように、またLL601検出用の場合には、Reporterが「FAM」、Quencherが「MGB」となるように、設定する。なお、コメ陽性対象用、LL601検出用ともに、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

2.3. 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 °C、2 分間の条件で保持した後、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。その後、95 °Cで15 秒、60°Cで1 分を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. 結果の解析と判定 (図1参照)

コメ陽性対象用試験およびLL601検出用試験のいずれについても、結果の判定は、Th. LineとPCR産物の増加を示すAmplification plotとの交点 (Ct値) が得られるか否かをもって行う。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、 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。Ct値についてはAmplification plot上で目視にて確認するとともに、結果として出力される数値について確認する。

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) コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつLL601検知用試験ですべてのウェルで43未満のCt値が得られた場合当該試料は陽性と判定する。
- (2) コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、LL601検知用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は陰性と判定する。
- (3) コメ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、LL601検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、粉砕・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、LL601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。

なお上記判定によりLL601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、コメ陽性対照用試験ですべてのウェルで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. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでもすべてのウェルで43未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム

