

## ナタネ (*RT73 B. rapa*) の検査方法

本検査法ではナタネ穀粒を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下の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。

除草剤耐性の遺伝子組換えナタネであるRT73 *Brassica rapa* (RT73 *B.rapa*) は、我が国において安全性審査が終了した除草剤耐性RT73 *Brassica napus* (RT73 *B.napus*) と非遺伝子組換えナタネ (*B.rapa*) が交配し作出された遺伝子組換えナタネである。そのためRT73 *B.rapa* を検知するためには、1つの穀粒において*B.rapa* と*B.napus* の識別検査と遺伝子組換えナタネの特異的領域の検査をする必要がある。従って、以下の1.のスクリーニング検査を行った後、*B. rapa* の混入と遺伝子組換えナタネの特異的領域が検知された場合は、2.の粒確認検査を行って判定する。

### 1. スクリーニング検査

#### 1.1. DNA 抽出精製法

ナタネからの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DNA 試料液を用いて以下の定性リアルタイムPCR法を実施する。均質に粉碎した試料200 mg を2 mL 容チューブに量り採り、GE1 緩衝液<sup>\*1</sup> 800  $\mu$ L、Proteinase K 20  $\mu$ L、RNase A 10  $\mu$ 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<sup>\*2</sup>、65 °C 15 分間静置する。GE2-K 緩衝液<sup>\*3 \*4</sup> 100  $\mu$ 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 °Cの条件で5 分間遠心<sup>\*5</sup> する。次いでその上清<sup>\*6</sup> 350  $\mu$ L を1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液 130  $\mu$ L およびイソプロパノール 130  $\mu$ L を添加した後、10~12 回転倒混合する<sup>\*7</sup>。混合液 610  $\mu$ L (全量) をspin column に負荷した後、13,000  $\times$  g以上、4 °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  $\mu$ L を負荷し、13,000  $\times$  g 以上、4 °Cの条件で1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水 50  $\mu$ L を加え室温で3 分間静置した後、13,000  $\times$  g 以上で1 分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液<sup>\*8</sup> とする。

<sup>\*1</sup> GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 2) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

<sup>\*2</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。ボルテックスミキサー回転部に対して

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。

<sup>\*3</sup> GE2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE: GM quicker 2）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

<sup>\*4</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>\*5</sup> 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。

<sup>\*6</sup> 上清を回収する際は、可能な限り沈殿や浮遊物等を取らないように注意する。

<sup>\*7</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合する。

<sup>\*8</sup> DNA 試料原液を滅菌蒸留水で10 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。

## 1.2. 定性リアルタイムPCR法（ABI PRISM™ 7900又はABI PRISM™7500）

定性リアルタイムPCR法において用いるプライマー対およびプローブは、以下の通りである。各プライマーは水で溶解し、使用する。

### *B. rapa* 識別試験

*B. rapa* 識別用プライマー対,プローブ

*B. rapa* 識別試験は、*B. rapa* acetyl CoA carboxylase（ACCg8）遺伝子配列および *B. napus* cruciferin（BnC1）遺伝子配列を検知するプライマー対とプローブを用いる。

ACCg8 検出用プライマー対,プローブ

B.rapa-ACCg8 F: 5'-GGT TAT ATA CGG CTT TGT GGT TGC-3'

B.rapa-ACCg8 R: 5'-AAC ATC AGG CTG TCC AAG AAA GAT-3'

B.rapa-ACCg8: 5'-VIC-CTA TGT CTG AGG AAT TAT AA-MGB-3'

BnC1 検出用プライマー対,プローブ

B.napus BnC1-969F: 5'- GAA GCT CTC CTT CGT GGC TAAA-3'

B.napus BnC1-1043R: 5'- TCA CGA ATT TGA ATC TCG ATA CTCA-3'

B.napus BnC1-994T: 5'-FAM-ACG TGA ATC TGA TTT TGA-MGB-3'

### RT73 検出試験

RT73検出用プライマー,プローブ

RT73 検出試験はRT73 検出用プライマー対とプローブと、ナタネ陽性対照用として acyl-ACP thioesterase (FatA) 遺伝子配列を検知するプライマー対とプローブを用いる。

RT73 検出用プライマー対,プローブ

RT73 Primer1: 5'-CCA TAT TGA CCA TCA TAC TCA TTG CT-3'

RT73 Primer2: 5'-GCT TAT ACG AAG GCA AGA AAA GGA-3'

RT73 Probe: 5'-FAM-TTC CCG GAC ATG AAG ATC ATC CTC CTT-TAMRA-3'

FatA 検出用プライマー対,プローブ

FatA Primer1: 5'-GGT CTC TCA GCA AGT GGG TGAT-3'

FatA Primer2: 5'-TCG TCC CGA ACT TCA TCT GTAA-3'

FatA Probe: 5'-VIC-ATG AAC CAA GAC ACA AGG CGG CTT CA-TAMRA-3'

### 1.2.1. PCR用反応液の調製

PCR 用反応液は25  $\mu$ L/well として調製する。組成は以下のとおりである。Universal PCR MasterMix<sup>\*1</sup> 12.5  $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50  $\mu$ mol/L）0.25  $\mu$ L、対象プローブ溶液（10  $\mu$ mol/L）0.5  $\mu$ L を混合し、滅菌蒸留水で全量22.5  $\mu$ Lに調製後、DNA 試料液2.5  $\mu$ L（スクリーニング試験ではDNA 試料液10 ng/ $\mu$ Lを用いる）を添加する<sup>\*2</sup><sup>\*3</sup>。分注操作終了後、真上からシール<sup>\*4</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>\*5</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。1 DNA 試料液あたり*B. rapa* 識別試験とRT73 検出試験の2 試験を行うものとし、*B. rapa* 識別試験はACCg8 とBnC1の各プライマー対とプローブを混合してリアルタイムPCR を行い、RT73 検出試験はRT73とFatA の各プライマー対とプローブを混合してリアルタイムPCRを行う。スクリーニング試験は、1 DNA 試料液あたり*B. rapa* 識別試験の2 ウェル並行、RT73検出試験の2 ウェル並行で行うものとする<sup>\*6</sup>。

#### \*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 粒検査試験では濃度未調整のDNA 試料原液を2.5  $\mu$ L 用いる。

\*3 検体試料液（測定対象）の他に3 種のControl すなわちNon-Template Control (NTC) 1 ウェル分、*B. rapa* Positive Control 1 ウェル分および*B. napus* Positive Control 2 ウェル分についてもそれぞれ調製する。DNA試料液の添加の際、NTCには水を、*B. rapa* Positive Control には*B. rapa* 標準プラスミドを、

*B. napus* Positive Control には *B. napus* 標準プラスミドを、それぞれのウェルに2.5 µL、DNA試料液の代わりに添加する。

\*<sup>4</sup> 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plateおよび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。

\*<sup>5</sup> MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISM 7900の場合、Life Technologies社) を使用する。

ABI PRISM 7500では使用しない。

\*<sup>6</sup> 粒確認試験では*B. rapa* 識別試験、RT73検出試験ともにそれぞれ 1 ウェルで行う。

### 1.2.2. 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、ACCg8 検出用はReporter が「VIC」、Quencher が「Non Fluorescent」に、BnC1 はReporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」に、RT73 検出用はReporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」に、FatA 検出用はReporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、*B. rapa* 識別試験、RT73 検出試験ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

### 1.2.3. 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 °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30 秒を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。反応終了後、Remaining timeが0分となっていることを確認し、測定結果の解析を行う。

### 1.2.4. End-point解析 (ABI PRISM™ 7900)

*B. rapa* 識別試験に関してはリアルタイムPCR反応終了後、直ちにEnd-point解析を行う。サンプルはリアルタイムPCR反応が終了したプレートをそのまま用いる。[Marker Manager] ダイアログにおいて、DetectorにはリアルタイムPCRで設定した『ACCg8』、『BnC1』を選択し設定を行う。この設定条件で測定を開始し読み取り終了後、[System Table Pane]に表示されたACCg8、BnC1のRn値をそれぞれの蛍光強度として結果の解析を行う。

### 1.2.5. End-point解析 (ABI PRISM™7500)

*B. rapa* 識別試験に関してはリアルタイムPCR反応終了後、直ちにEnd-point試験を行う。サンプルはリアルタイムPCR反応が終了したプレートをそのまま用いる。[Select Markers]ダイアログにおいて、DetectorにはリアルタイムPCRで設定した『ACCg8』、『BnC1』を選択し設定を行う。この設定条件で測定を開始し読み取り終了後、[Report]タブに表示されたACCg8、BnC1のRn値をそれぞれの蛍光強度として結果の解析を行う。

### 1.3. 結果の解析と判定 (図1参照)

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。1 DNA 試料液あたり*B. rapa* 識別試験の2 ウェル並行、RT73検出試験の2 ウェル並行で行うものとする。

*B. rapa* 識別試験についてはEnd-point解析の結果により判定を行い、RT73検出試験については明確な増幅曲線の有無で判定を行う。*B. rapa* の混入が判断され、かつRT73が検出された場合のみ2.の粒確認検査を実施する。

*B. rapa* 識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料液のACCg8 (VIC) の蛍光強度 (2 ウェルの結果の平均値) と*B. napus* Positive ControlのACCg8 (VIC) の蛍光強度 (2 ウェルの結果の平均値) との比が2.04以上 (ABI PRISM™ 7900) , 1.40以上 (ABI PRISM™ 7500) の場合、*B. rapa* が混入していると判断する。

また、RT73検出試験については、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。第一に目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合にRT73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、 $\Delta Rn$ 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。

DNA試料液において、

- (1) FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られ、かつ同時に行ったRT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られた場合にRT73陽性と判定する。
- (2) FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得

られ、RT73検出用プローブ（FAM）を用いた試験のすべてのウェルで38未満のCt値が得られない場合はRT73陰性と判定する。

- (3) FatA検出用プローブ（VIC）を用いた試験で38未満のCt値が得られ、RT73検出用プローブ（FAM）を用いた試験で38未満のCt値がすべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「1.2. 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、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、*B.rapa*識別試験およびRT73検出試験の両方について陽性と判定された検体を陽性と判断し、さらに、2.の粒確認試験を行う。

なお上記判定によりRT73陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMあるいはVIC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あるいはVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、FatA検出用プローブを用いた試験（VIC）で38未満のCt値が得られないウェルについては、再度、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法以降の操作を行い、それでも38未満のCt値が得られない場合には、本試料からの安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検知は不能とする。

## 2. 粒確認検査

1.のスクリーニング検査において*B. rapa* の混入とRT73の増幅が確認された場合、当該検体の粒試料から無作為に92粒を採取し、各粒毎にDNA抽出を行い、各DNA試料原液を対象に上記の1.のスクリーニング検査における1.2.の定性リアルタイムPCR法（*B. rapa* 識別試験とRT73検出試験）を行う。

### 2.1. DNA抽出精製法（1粒抽出）

ナタネ粒からのDNA抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE: GM quicker 96ナタネに適用）を用いる。抽出するにあたり事前にナタネを洗浄しておく必要がある、洗浄方法は以下に示す。ナタネの入ったビーカーに10% SDSを加え、スパーテルで攪拌し、SDSを破棄する、この工程を3回行う。次にビーカーに超純水を加えてすすぎ洗いし、超純水を破棄する、この工程も3回行う。洗浄後、粉碎用プレート（RCD-96）の各ウェルにナタネを1粒ずつ入れ、65℃に設定した恒温槽で1時間乾燥させる。十分にナタネが乾燥したら、粉碎用プレートの各ウェルにメタルコーン（MC-96415R）を1つずつ入れCPD-96でフタをした後、MULTI-BEADS SHOCKER（YASUI KIKAI）を用いて1,500 rpm

の条件で20 秒間粉砕する<sup>\*1</sup>。粉砕後、粉砕用プレートにGE1 緩衝液<sup>\*2</sup> 500 µL、Proteinase K 20 µL、RNase A 10 µLを加え、MULTI-BEADS SHOCKER にセットし1,500rpm の条件で15 秒間混合する。プレートごと65 °Cで15 分間静置する<sup>\*3</sup>。GE2-K 緩衝液<sup>\*4</sup><sup>\*5</sup> 85 µLを加え、MULTI-BEADS SHOCKER にセットし1,500 rpm の条件で15 秒間混合し、METALFUGE (YASUI KIKAI: MBG 100) で2,900 rpm の条件で5 分間遠心する。次いでその上清<sup>\*6</sup> 400 µL を、コレクションプレートをセットしたフィルタープレート<sup>\*7</sup> に添加し、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5 分間遠心する。コレクションプレートの各ウェルにGB3 緩衝液 150 µL およびイソプロパノール 150 µL を添加した後、ピペッティングして混合する<sup>\*8</sup>。混合液700 µL (全量) を、コレクションプレートをセットしたspin columnプレートに負荷した後、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5 分間遠心し、コレクションプレートに溜まった溶出液を捨てる。次いでGW 緩衝液650 µLを負荷し、METALFUGEで2,900 rpm の条件で5 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnプレート内のエタノールを完全に除去するため、METALFUGEで2,900 rpm の条件で20 分間遠心する。spin columnプレートを新たなコレクションプレートに移し、滅菌蒸留水 50 µLを加え室温で3 分間静置した後、METALFUGEで2,900 rpmの条件で5 分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

<sup>\*1</sup> 粉砕後、METALFUGE (YASUI KIKAI) を用いてプレートごと2900 rpm の条件で1 分間スピンドウンすることで、フタに付着したサンプルを落としコンタミネーションを予防する。

<sup>\*2</sup> GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 96) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

<sup>\*3</sup> 65 °Cで静置する際、ウェル内の空気が膨張してフタが開きやすくなりコンタミネーションが起こる可能性がある。これを防ぐため、しっかりとフタをし、プレートごとラップで覆うなどする。

<sup>\*4</sup> GE2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE: GM quicker 96) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

<sup>\*5</sup> 泡が他のウェルに混入するのを防ぐため、フタを空ける前にMETALFUGE (YASUI KIKAI) を用いてプレートごと2900 rpm の条件で 1 分間スピンドウンすることで、フタに付着した泡を消しコンタミネーションを予防する。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> 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>\*7</sup> フィルタープレートはWhatmanの容量800 µL、ポアサイズ0.45 µLのポリプロピレンフィルターを使用する。

<sup>\*8</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合する。

## 2.2. 結果の解析と判定 (図1参照)

各DNA試料原液における結果の判定は、*B. rapa* 識別試験についてはEnd-point解析の結果により判定を行い、RT73検出試験については明確な増幅曲線の有無で判定を行う。*B. rapa*であると判断され、かつRT73が検出された検体はRT73 *B. rapa*であると判定する。

*B. rapa* 識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料原液のACCg8 (VIC) の蛍光強度と *B. napus* Positive ControlのACCg8 (VIC) の蛍光強度 (2ウェルの結果の平均値) との比が2.63以上 (ABI PRISM™ 7900)、1.69以上 (ABI PRISM™ 7500) で、BnC1 (FAM) の蛍光強度と *B. napus* Positive Controlの蛍光強度 (2ウェルの結果の平均値) の比が0.28以下 (ABI PRISM™ 7900)、0.35以下 (ABI PRISM™ 7500) の場合、そのDNA試料原液は *B. rapa* であると判断し、当該DNA試料原液のRT73の検出を確認する。RT73検出試験については、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。第一に目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合にRT73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、 $\Delta Rn$ 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。FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られ、かつ同時に行ったRT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験で、38未満のCt値が得られた場合、RT73陽性と判定する。FatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られ、RT73検出用プローブ (FAM) を用いた試験で38未満のCt値が得られない場合はRT73陰性と判定する。また、FatAの1.3倍以上のCt値がRT73検出用プローブ (FAM) で得られた場合は、他の粒の粉砕物のコンタミネーションが起こっていると判断し、当該DNA試料原液はRT73陰性と判定する。なお上記判定によりRT73陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMあるいはVIC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あるいはVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、FatA検出用プローブを用いた試験 (VIC) で38未満のCt値が得られないDNA試料原液については、再度、当該DNA試料原液に対して定性リアルタイムPCR法以降の操作を行い、それでも同様の結果の場合には、そのDNA試料原液での結果を無効とする。92粒のDNA試料原液中で90粒以上のDNA試料原液でFatA検出用プローブ (VIC) を用いた試験で38未満のCt値が得られる場合は、本試験は成立する。再度リアルタイムPCRを行い、それでもFatAで38未満のCt値が得られたDNA試料原液が89粒以下の場合、本試験は不成立として、改めて92粒を無作為に採取し、「2.1. DNA抽出 (1粒抽出)」以降から行う。

*B. rapa* 識別試験において *B. rapa* と判断され、かつRT73検出試験においてRT73陽性と判断されたDNA試料原液が1検体でもある場合は、当該検体はRT73 *B. rapa* 陽性と判定する。



# 図1. RT73 *B.rapa*検査システムのフロー

