

亜麻（FP967）の検査方法

本検査法では亜麻穀粒を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下の陰イオン交換樹脂タイプキット法（QIAGEN社製Genomic-tip 20/G）を用いる。1 検体から2 併行でDNAを抽出し、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. イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット法（QIAGEN Genomic-tip）

粉碎試料 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）を用いて以下のように 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°Cで 1 時間保温する。さらにG2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K^{*3} 200 μ L、および、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°C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 \times g、4°C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 \times g、4°C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°Cに加熱した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 \times g、4°Cで15 分間遠心し、上清を廃棄した後に70% エタノール500 μ Lを添加し、10 回転倒混和する。12,000 \times g、4°C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°Cに加熱した滅菌蒸留水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、および、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。

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

^{*4} RNaseAはキアゲン社製（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 °C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 × g、4 °C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。

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/μL 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 50 ng/μL に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 15 μL 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）

FP967の検出はFP967検知用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRと亜麻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。

FP967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、亜麻陽性対照用として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。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー対、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

FP967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'

亜麻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'

2.1. 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、滅菌蒸留水で全量 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、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。各DNA試料液あたりFP967検知用リアルタイムPCRと亜麻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 µL 添加する。

^{*3} 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。

^{*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(「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。

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 秒間、60 °Cで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. 結果の解析と判定 (図1参照)

FP967検知用試験および亜麻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、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。

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。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

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) 亜麻陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつFP967検知用試験のすべてのウェルで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) 亜麻陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt値が得られ、かつFP967検知用試験のすべてのウェルにおいて43未満のCt値が得られない場合は陰性と判定する。
- (3) FP967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かった場合は、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、FP967陰性と判定する。

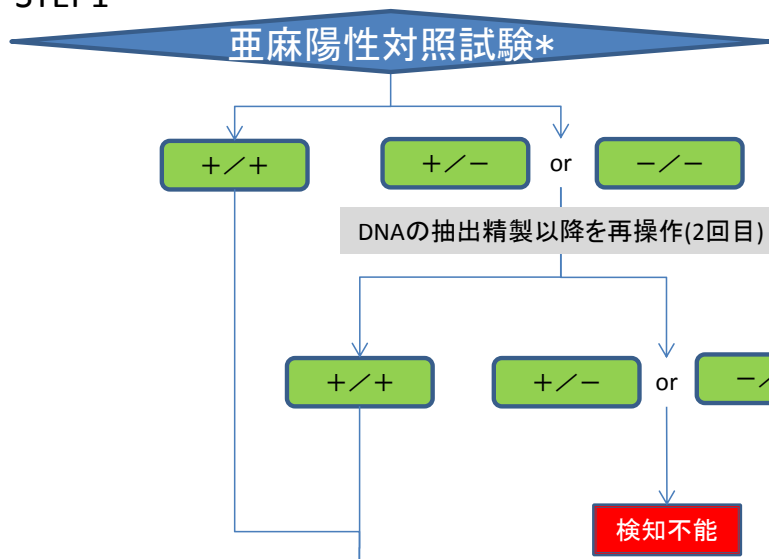
2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液（合計4ウェル）について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

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。

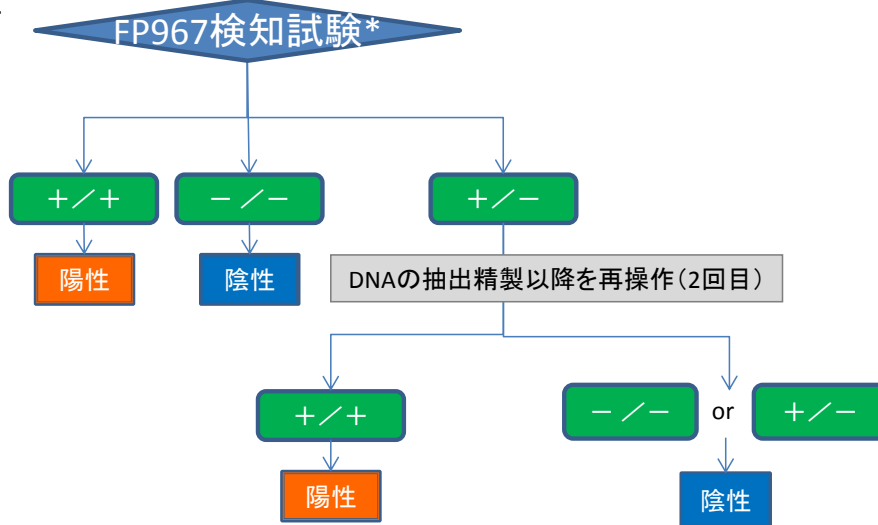
また、亜麻陽性対照用試験で2ウェル並行の両方で43未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでも2ウェル並行の両方で43未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム

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。