

パパイヤ（PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN）の検査方法

本法では生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品を検査対象とし、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 100/G）を用いる。別法として、シリカゲル膜タイプ法（QIAGEN DNeasy Plant mini）を使用したDNA抽出精製を生鮮パパイヤおよび乾燥パパイヤなど加工度の低い製品*に適用できる。1検体から2併行でDNAを抽出精製し、DNA試料液を得る。そのDNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

*繰り返し検査に必要な十分量のDNAが抽出精製できるもの。

1. 生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品からのDNA抽出精製

生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品は以下の7種類の製品に細分類し、以下に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従ってDNA抽出精製前の試料調製を行う。

- ① 生鮮および調味漬け製品（生鮮パパイヤ、缶詰、漬物など乾固されていないある程度パパイヤの原型を保持している試料）
- ② 乾物製品（乾燥パパイヤ）
- ③ 砂糖漬け乾燥製品（ドライフルーツ）
- ④ 乾燥製品（健康食品、お茶など）
- ⑤ 果肉含有ゲル状製品（ジャム、ピューレなど）
- ⑥ 果汁・飲料製品（フルーツミックスジュース、ドリンク剤など）
- ⑦ 氷菓等製品（アイス、シャーベットなど）

1.1. 試料前処理

1.1.1. 生鮮および調味漬け製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し（生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分）、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、よく水分をきり、Millser等で粉砕する（生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉砕する）。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液* 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.2. 乾物製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、Millser等で粉砕する。粉砕した試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液* 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.3. 砂糖漬け乾燥製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、等重量分の滅菌蒸留水を加え、Millser等で粉砕する。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液* 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.4. 乾燥製品

Millser等で粉砕し均質にした試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液* 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.5. 果肉含有ゲル状製品

Millser等で粉砕し均質にした試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとり、G2緩衝液* 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

1.1.6. 果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品100 mLをメスシリンダーで量りとり、凍結乾燥用容器（500 mL容量）に移し、傾けた状態で-80°C冷凍庫中で2時間凍結させる。その後、凍結乾燥機にセットし、24時間乾燥後、試料30gを乳鉢に量りとりG2緩衝液* 20 mLに乳棒を用いて溶解させる。次いで全量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たにG2緩衝液* 10 mLを追加し洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。

1.1.7. 氷菓等製品

試料100gを凍結乾燥用容器に量りとり、24時間凍結乾燥する。その後、試料10gを先にG2緩衝液* 30 mLを入れたポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に少しずつ加えながら溶解させ、よく転倒混和して均質にする。

* G2緩衝液はキアゲン社（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

1.2. パパイヤ試料からのDNA抽出精製

1.2.1. DNAの抽出精製

1.2.1.1. 陰イオン交換樹脂タイプキット法（QIAGEN社製 Genomic-tip 100/G）

DNA 抽出用試料に、100 mg/mL RNase A^{*1} 20 µL、cellulase^{*2} 500 µL を加えて（なお、⑤ 果肉含量ゲル状製品のジャム製品に限り、α-Amylase^{*3} 20 µL も同時に加える）、転倒混合し均質化した後、50 °C で1時間放置する。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 Proteinase K^{*4} 200 µL を加え 50 °C で1時間放置する。その間も2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、その遠沈管を 3,000×g、低温下（4 °C）、20分間遠心し、得られた上清（約25~35 mL）を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液^{*5} 4 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する。次いで、100/G を QC 緩衝液^{*5} で 7.5 mL ずつ3回洗浄した後、あらかじめ 50 °C に温めておいた QF 緩衝液^{*5} 1 mL を負荷し、はじめの溶出液は捨てる。新しい遠沈管に移し、再度 50 °C に温めておいた QF 緩衝液^{*5} 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、遠沈管（1.5 mL もしくは 2.0 mL 容）に移し、10,000×g 以上で、低温下（4 °C）15分間遠心する。上清を捨てる。この際、上清を極力除去する^{*6}。70%エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000×g 以上で、低温下（4 °C）5分間遠心する。さらに上清を捨て^{*6}、残った沈殿を、乾燥させた後、予め 50 °C に温めた滅菌蒸留水 70 µL に溶解し、DNA 試料原液とする。

*1 キアゲン社（Cat. no. 1018048）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*2 シグマアルドリッチ社（Cat. no. C2730-50ML）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 ニッポン・ジーン社（Cat. no. 312-06671）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*4 プロメガ社（Cat. no. V3021）100 mg を滅菌水 5 mL に溶解したもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 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、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*6 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。

1.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN 社製 DNeasy Plant Mini）

採取したパパイヤから種子を除いた果肉部分をおよそ 10 mm 角に切り出し、凍結乾燥を行う。次にミルサー等でこれらを混合し、粉砕する。粉砕試料を用い、以下の方法に従って DNA を抽出精製する。

粉砕試料 80 mg をマイクロ遠沈管（2 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 600 µL と RNase A^{*1} 4 µL を加え、試料塊がないよう混合し、65 °C で 15 分間放置する。その間数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。その後 P3 緩衝液 195 µL を加え、氷上に 5 分放置後、室温下 10,000×g で 5 分間遠心する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、室温下 10,000×g で 2 分間遠心し、溶出液をマイクロ遠沈管（2 mL 容）に移す。遠沈管に 1.5 倍量の AW1 緩衝液を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、得られた混合液のうち 500 µL を mini spin column に負荷し、室温下 10,000×g で 5 分間遠心し^{*2}、溶出液を捨てる。次いで、残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで、column に AW2 緩衝液 500 µL

を加え、室温下 10,000×g で 5 分間遠心し、溶出液を捨てもう一度 AW2 緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000×g 以上で 15 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 50 °C 温めておいた水 50 μL を加え、5 分間放置した後、10,000×g で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同様の操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 キアゲン社 (Cat. no. 1018048) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*2 混合液中に析出物が有る場合columnが詰まりやすくなる。その場合、完全に溶出させるため遠心時間を10分程度まで延ばす。

1.2.2. 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^{*1}し、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^{*2}(A_{260} および A_{280})を記録する。次いで A_{260} の値 1 を50 ng/μL DNAと換算し、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、DNA試料原液を10 ng/μLに滅菌蒸留水で希釈して調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は40 μLごとにマイクロ試料管に分注後、-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10 ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

*1 希釈する場合には、滅菌蒸留水を用いる。また、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

遺伝子組換えパパイヤ2系統 (PRSV-YK、PRSV-SC) 検知試験用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列とそれぞれの系統に特異的に導入されているPapaya Ringspot Virus coat protein (PRSV-cp) 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。遺伝子組換えパパイヤ1系統 (PRSV-HN) 検知試験用として、パパイヤゲノムと系統特異的に導入されている配列の境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列 (CaM) 検知試験用として、CaMを検知するプライマー対、および、プローブを用いる。また、パパイヤ陽性対照試験用として、Chymopapain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、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用プライマー対、および、プローブ

YK-2F: 5'-ACA CGG GGG ACT CTA GAG -3'

YK-2R: 5'-ACC GGT ATC CAC AGC TTC -3'

YK-2P: 5'-FAM- TCC CTT CCA TGG CGTC-TAMRA-3'

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知試験用プライマー対、および、プローブ

SC-F: 5'-CAT TTC ATT TGG AGA GAA CACG-3'

SC-R: 5'-ACC AGC ATC CAC AGC TTC-3'

SC-P: 5'-FAM-ACT CTA GAG GAT CCA TGT CCAA-TAMRA -3'

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知試験用プライマー対、および、プローブ

HN-F: 5'-GAC GAG TAC AAG GAG ACG CC-3'

HN-R: 5'-GTT GTC ACT GAA GCG GGA AG-3'

HN-P: 5'-FAM-TGG CTG CTA TTG GGC GAA TCA ACT AC-BHQ1-3'

CaM配列検知試験用プライマー対、プローブ

35S-F : 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTTC-3'

35S-P : 5'-FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CACG-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対、プローブ

Q-Chy-1F2: 5'-CCA TGC GAT CCT CCCA-3'

Q-Chy-2R: 5'-CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'

Q-Chy-P(new): 5'-FAM-TTC CCT TCA TCC ATT CCC ACT CTT GAGA-TAMRA-3'

2.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。組成は以下のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix^{*1} またはEagleTaq Master Mix with ROX^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各0.4 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.25 μ Lを混合し、DNA試料液5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製する。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。DNA試料液あたりパパイヤ陽性対照試験、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験、およびCaM配列検知試験をそれぞれ2ウェル並行して行うものとする。

*¹ TaqMan Gene Expression Master Mix または EagleTaq Master Mix with ROX

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。使う直前には必ず軽く攪拌後、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 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 5 μ L 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

ABI PRISM 7900HT または ABI 7500 を使用する場合は、MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、および、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。LightCycler 96 または 480 を使用する場合は、LightCycler[®]480 Multiwell Plate 96 または LightCycler 8-Tube Strips(white) (LightCycler 480 の場合は LightCycler 8-Tube Strip Adapter Plate を用いる) (ロシユ・ダイアグノスティックス社) 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 (Life Technologies 社) は、ABI PRISM 7900HT の場合のみ使用する。ABI 7500 または LightCycler では使用しない。

2.2. リアルタイム PCR による測定 (ABI PRISM 7900HT、ABI 7500、LightCycler 96 または LightCycler 480 を使用する)

2.2.1. ABI PRISM 7900HT

- ① オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。PC が完全に起動してから ABI PRISM 7900HT 本体の電源を入れ、30 分以上ウォーミングアップしたのちに反応を開始する。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [ABI PRISM 7900 SDS Software] をダブルクリックして開く。メニューバーの [File] → [New] を選択し、{New Document} ダイアログを表示させる。{Assay} は [Absolute Quantification (Standard Curve)]、{Container} は [96 Wells Clear Plate]、{Template} は [Blank Template] を選択し、[OK] ボタンをクリックする。
- ③ メニューバーの [Tools] → [Detector Manager] を選択し、{Detector Manager} ダイアログを表示させる。[New] ボタンをクリックし、{Add Detector} ダイアログを開く。Detector の設定は、YK-2P、SC-P、HN-P、35S-P、Q-Chy-P(new)ともに Reporter を [FAM]、Quencher は YK-2P、SC-P、35S-P、Q-Chy-P(new)は[TAMRA]、HN-P は[Non Fluorescent] となるように設定し、[OK] ボタンをクリックする。{Detector Manager} ダイアログ上で使用する Detector(リアルタイム PCR 反応陽性対照試験、各検知試験)を選択し、[Copy To Plate Document] ボタンをクリックし、[Set Up] タブ上に使用する Detector を登録し、最後に [Done] ボタンをクリックする。
- ④ 画面左上枠でリアルタイム PCR 反応陽性対照試験または、検知試験のウェルを選択し、右枠の [Set Up] タブ上で、Detector が [リアルタイム PCR 反応陽性対照試験] または [各検知試験 (YK-2P、SC-P、HN-P、35S-P)] の行の {Use} 欄にチェックを入れる。次にウェルごとに {Task} 欄でそれぞれの情報 (Non-Template Control : NTC、測定対象検体 : Unknown) を選択し、{Sample Name} フィールドにサンプル番号を入

力する。{Passive Reference} が [ROX] に設定されていることを確認する。

- ⑤ [Instrument] タブ上の [Thermal Profile] よりサーマルサイクラー条件を以下のように設定する。[50°C, 2分 → 95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 60°C, 1分) ×45 サイクル]
- ⑥ {Sample Volume} を[25 µL] に設定し、{9600 emulation モード} にチェックが入っていることを確認する。
- ⑦ 設定条件をプレートドキュメント (.sds) として保存する。
- ⑧ [Instrument] タブ上の [Connect] ボタンをクリックし、PC と ABI PRISM 7900HT 本体を connect 状態にする。[Instrument] タブ上の [Open / Close] ボタンをクリックし、ステージを装置本体から出し、2.1.で調製した 96 ウェルプレートの切欠き部を右上にしてステージ上に載せる。再び [Open / Close] ボタンをクリックし、96 ウェルプレートを装置本体にセットする。
- ⑨ [Instrument] タブ上の [Start] ボタンをクリックし、反応とデータの取り込み（所要時間：約 2 時間）を開始する。

2.2.2. ABI 7500

- ① オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。PC が完全に起動してから ABI 7500 本体の電源を入れ、30 分以上ウォーミングアップしたのちに反応を開始する。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [7500 System Software] をダブルクリックして開く。メニューバーの [File] → [New] を選択し、{New Document} ダイアログを表示させる。{Assay} は [Absolute Quantification (Standard Curve)]、{Container} は [96 Wells Clear]、{Template} は [Blank Template]、{Run Mode} は [9600 emulation] を選択し、[NEXT] ボタンをクリックする。
- ③ Detector の設定は、YK-2P、SC-P、HN-P、35S-P、Q-Chy-P(new) (リアルタイム PCR 反応陽性対照試験) とともに Reporter が[FAM]、Quencher は YK-2P、SC-P、35S-P、Q-Chy-P(new)を [TAMRA]、HN-P を [Non Fluorescent] とし、[ADD] ボタンをクリックする。{Passive Reference} が [ROX] に設定されていることを確認し、[NEXT] ボタンをクリックする。
- ④ 画面下枠で 3 種類の遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験、CaM 配列検知試験、およびパパイヤ陽性対照試験のウェルを選択し、上枠で、Detector が [PCR 反応陽性対照試験] または [YK-2P、SC-P、HN-P、35S-P 検知試験] の行の {Use} 欄にチェックを入れる。次にウェルごとに {Task} 欄でそれぞれの情報 (Non-Template Control : NTC、測定対象検体 : Unknown) を選択し、[FINISH] ボタンをクリックする。
- ⑤ [Setup] タブ上の各ウェルをダブルクリックし、サンプル名を入力する。
- ⑥ [Instrument] タブ上の [Thermal Cycle Protocol] よりサーマルサイクラー条件を以下のように設定する。[50°C, 2分 → 95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 60°C, 1分) ×45 サイクル]
- ⑦ {Sample Volume} を[25 µL] に設定する。
- ⑧ 設定条件をプレートドキュメント (.sds) として保存する。
- ⑨ 2.1. で調製した 96 ウェルプレートの切欠き部を右上にして、装置本体のステージ上に載せセットする。
- ⑩ [Instrument] タブ上の [Start] ボタンをクリックし、反応とデータの取り込み（所要時間：約 2 時間）を開始する。

2.2.3. LightCycler® 96

- ① LightCycler 96 本体の電源を入れ、セルフテストが完了して起動するまで約 5 分待機する。
- ② LightCycler 96 本体タッチパネル右の[New] をタッチし {Create New Experiment} を表示させる。[New experiment based on Roche template] から [RunTemplate_Hydrolysis Probe_Amp] を選択し、{Experiment Name} を入力して[Create]する。
- ③ [Run Editor] タブの[Measurement]タブで、{Reaction Volume(μl)} を[25] に設定する。
- ④ [Run Editor] タブの[Profile]タブでサーマルサイクラー条件を[95°C, 10 分 → (95°C, 15 秒 → 60°C, 1 分) x 45 サイクル]と設定する。60°Cの Step の Acquisition Mode が [Single]となっていることを確認する。
- ⑤ [Eject]をタッチしてローダーを出し、2.1. で調製した 96 ウェルプレートの切欠き部を右下にして、サーマルブロック上にセットして閉じる。
- ⑥ 本体画面右上の [Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。
- ⑦ 反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。
- ⑧ [Sample Editor] タブ画面を表示し、右側の 96 ウェルフォーマット図で 3 種類の遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験、CaM 配列検知試験およびパパイヤ陽性対照試験のウェルを選択し、Gene の {FAM} 欄に検出する遺伝子名を入力する。(一度入力すると、プルダウンから選択する事が出来る)
- ⑨ 次にウェルごとに Sample の {Type} 欄で、それぞれのサンプルタイプ (Negative Control、または測定対象検体: Unknown) を選択する。
- ⑩ 96 ウェルフォーマット図の各ウェルを選択し、Sample の {Name} 欄にサンプル名を入力する。(一度入力すると、プルダウンから選択する事が出来る)

2.2.4. LightCycler[®] 480

- ① LightCycler[®] 480 本体の電源を入れ、セルフテストが完了して起動するまで約 5 分待機する。オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [LightCycler480 SW] をダブルクリックし、[User Name]と[Password]を入力してソフトを立ち上げる。
- ③ [New Experiment from Template] をクリックし {Create Experiment from Template} の一覧から [Mono color HydrolysisProbe-UPL] を選択し、OK する。
- ④ [Run Protocol] タブで、{Reaction Volume} を[25] に設定し、サーマルサイクラー条件を次のように設定する。[95°C, 10 分 → (95°C, 15 秒 → 60°C, 1 分) x 45 サイクル → 40°C, 30 秒] と設定する。60°Cの Step の Acquisition Mode が [Single]となっていることを確認する。
- ⑤ Save をクリックし設定条件を保存する。
- ⑥ 本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出し、2.1. で調製した 96 ウェルプレートの切欠き部を右下にしてセットした後、再度ボタンを押してプレートローダーを格納する。
- ⑦ [Start Run] をクリックし、反応とデータの取り込みを開始する。
- ⑧ (反応中に) [Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を作成し、サンプルをセットしたウェルを選択した後 Apply をクリックする。
- ⑨ [Sample Editor]にて、Step1: [Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2: [Select Samples]内の[Subset]のプルダウンメニューから、⑧で作成した Subset を選択する。Step3: [Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれの情報 (Negative Control、または測定対象検体: Unknown)

を選択する。

3. 結果の解析と判定 (図1.参照)

3種類の遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験、CaM配列検知試験およびパパイヤ陽性対照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 (Cq) 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。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験、および、CaM配列検知試験の両試験とも目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 陽性を疑う。

ABI PRISM 7900HTまたはABI 7500を使用した場合のデータの解析

- ① メニューバーの [Analysis] → [Analyze] を選択する。
- ② 画面右枠の [Result] タブをクリックして {Amplification Plot} 画面を表示させる。
- ③ {Amplification Plot} 画面上の {Plot} 欄で [ΔRn vs Cycle] を表示させ、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、{Threshold} 欄に [0.2] と入力する。
- ④ {Amplification Plot} 画面上の {Detector} 欄で [All] を選択する。表中に Ct 値が表示される。

LightCycler 96を使用した場合のデータの解析

- ① [Analysis]タブをクリックし[Add Analysis] を選択し{Create New Analysis}ウィンドウを表示させる。[Abs Quant]を選択し[OK]をクリックする。
- ② [Amplification Curves]に増幅曲線が、[Result Table] に Cq 値が表示される。

LightCycler 480を使用した場合のデータの解析

- ① [Analysis]ボタンをクリックし{Create new analysis}にて、[Abs Quant/2nd Derivative Max] を選択し [Subset] プルダウンから作成した Subset を選択し [OK]をクリックする。
- ② 表示された画面で、[Calculate]をクリックする。
- ③ 増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

PRSV-YK、PRSV-SCまたはPRSV-HNの判定は、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8ウェルすべてを用いて判定する (PRSV-YKを判定する場合は、PRSV-YKの2併行4ウェルとCaMの2併行4ウェルの計8ウェル、PRSV-SCを判定する場合は、PRSV-SCの2併行4ウェルとCaMの2併行4ウェルの計8ウェル、PRSV-HNを判定する場合は、PRSV-HNの2併行4ウェルとCaMの2併行4ウェルの計8ウェル)。

*CaMの結果は、PRSV-YK、PRSV-SCとPRSV-HNで共通

PRSV-YKの判定:

DNA試料液において、

- (1) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、か

つ遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られた場合（STEP 2のパターン①）に、当該試料はPRSV-YK陽性と判定する。

- (2) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られない場合（STEP 2のパターン②）には、PRSV-YK陰性と判定する。
- (3) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知試験あるいはCaM配列検知試験の結果の組み合わせがSTEP 2のパターン①又はSTEP 2のパターン②のいずれにも該当しない場合は、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、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）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試料液についてPRSV-YKおよびCaMの両方で陽性と判定された検体を陽性と判断する。

PRSV-YK 陽性検体のパターン

	陽性対照用Chy	PRSV-YK	CaM
抽出DNA試料液－①	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液－②	(+/+)	(+/+)	(+/+)


 PRSV-YK 陽性

PRSV-SCの判定：

DNA試料液において、

- (1) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-SC）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られた場合（STEP 2のパターン①）に、当該試料はPRSV-SC陽性と判定する。
- (2) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-SC）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られない場合（STEP 2のパターン②）には、PRSV-SC陰性と判定する。
- (3) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-SC）検知試験あるいはCaM配列検知試験の結果の組み合わせがSTEP 2のパターン①又はSTEP 2のパターン②のいずれにも該当しない場合は、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、遺伝子組換えパ

パイヤ（PRSV-SC）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試料液についてPRSV-SCおよびCaMの両方で陽性と判定された検体を陽性と判断する。

PRSV-SC 陽性検体のパターン

	陽性対照用Chy	PRSV-SC	CaM
抽出DNA試料液－①	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液－②	(+/+)	(+/+)	(+/+)



PRSV-HNの判定：

DNA試料液において、

- (1) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-HN）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られた場合（STEP 2のパターン①）に、当該試料はPRSV-HN陽性と判定する。
- (2) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-HN）検知試験およびCaM配列検知試験の両試験ともすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られない場合（STEP 2のパターン②）には、PRSV-HN陰性と判定する。
- (3) パパイヤ陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-HN）検知試験あるいはCaM配列検知試験の結果の組み合わせがSTEP 2のパターン①又はSTEP 2のパターン②のいずれにも該当しない場合は、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、遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-HN）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試料液についてPRSV-HNおよびCaMの両方で陽性と判定された検体を陽性と判断する。

PRSV-HN 陽性検体のパターン

	陽性対照用Chy	PRSV-HN	CaM
抽出DNA試料液－①	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液－②	(+/+)	(+/+)	(+/+)

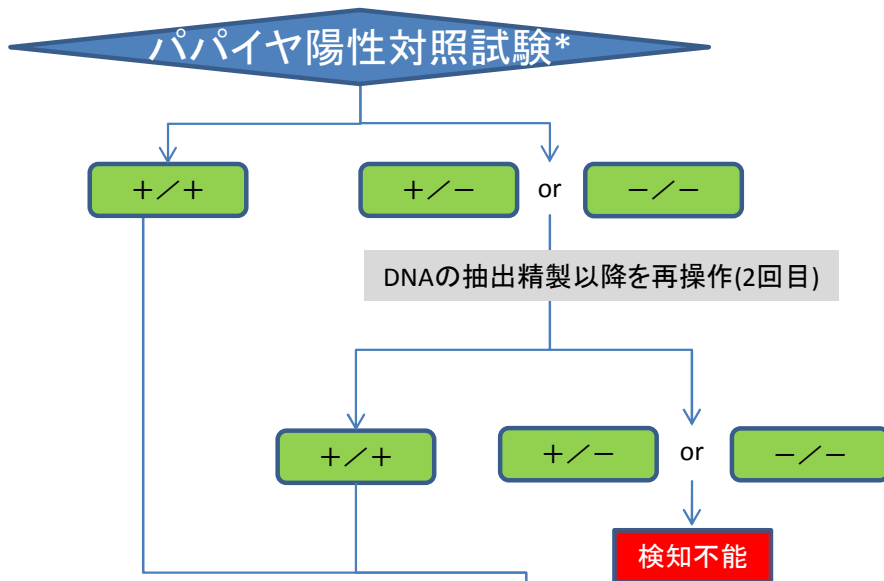


また、パパイヤ陽性対照試験のすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られないDNA試料液については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を行い、それでもパパイヤ陽性対照試験のすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

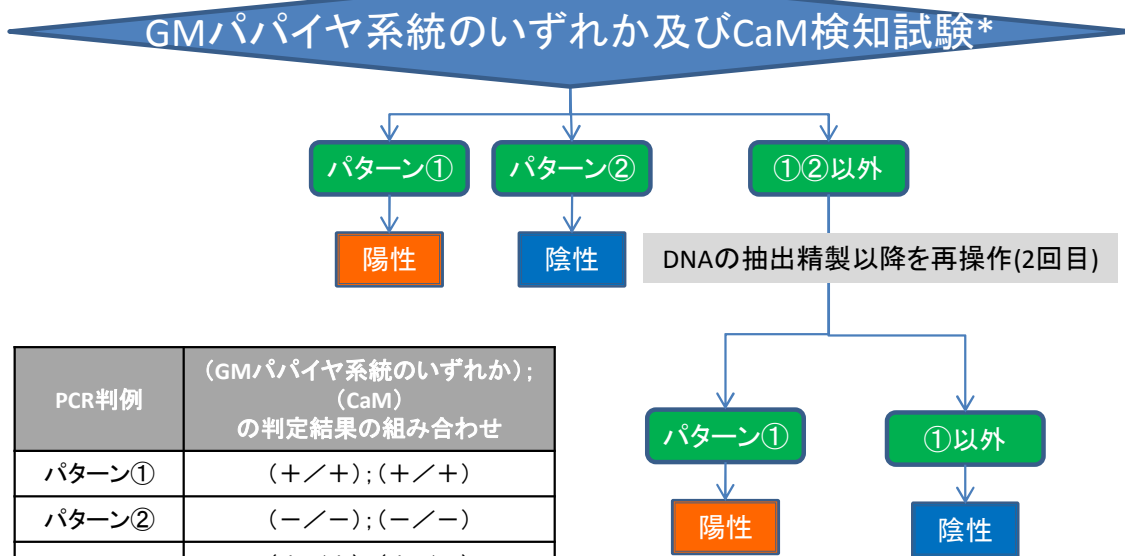
* DNA 抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「1.1. 試料前処理」から実施する。

図1. 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



PCR判例	(GMパイパヤシステムのいずれか); (CaM) の判定結果の組み合わせ
パターン①	(+ / +); (+ / +)
パターン②	(- / -); (- / -)
①②以外	(+ / +); (+ / -) (+ / +); (- / -) (+ / -); (+ / +) (+ / -); (+ / -) (+ / -); (- / -) (- / -); (+ / +) (- / -); (+ / -)

*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。