

Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)法および DNA クロマト (C-PAS) 法を用いたブドウ品種「シャインマスカット」の品種特異的 DNA 品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門
果樹茶業研究部門
株式会社ニッポンジーン

1. はじめに

「シャインマスカット」は、農研機構によって育成された人気ブドウ品種である。本品種の苗木が国外に無断で持ちだされ、生産、販売されている疑いが発生している。また、これら海外で生産されたシャインマスカットが日本に「逆輸入」されることへの懸念から、2021 年に農研機構による輸入差止め申立が行われた。この申立ては受理され、現在、税関はシャインマスカットを水際で差止める対象として、海外からの輸入品に対する検査を実施している。品種識別に関しては、品種ごとの DNA の塩基配列の違いを利用した手法が一般的に採用されており、上記の水際検査においても、DNA 品種識別技術の導入が必要とされている。しかし、生鮮品であるブドウの水際検査では、時間や施設などに制約があるため、できるだけ簡易かつ迅速に実施可能な遺伝子検査法が求められている。

本マニュアルでは、シャインマスカットについて、生の果実を対象に、Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法および DNA クロマト (C-PAS) 法を利用した簡易識別キットを用いて、国内で流通する主要なブドウ品種 24 種類から特異的に識別可能な方法について記載する。



図 1 「シャインマスカット」の果実の写真

「シャインマスカット」（品種登録番号：第 13891 号）は、種無し生産ができる黄緑色の大粒ブドウで糖度が高く、マスカット香をもつ。皮の渋みが少なく皮ごと食べられ口の中で碎ける硬い果肉である。

2. 一般的注意事項及び DNA 抽出法について

DNA 品種識別分析における一般的注意事項については、＜植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項―技術開発と利用のガイドライン―(http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf)＞及び＜DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン(https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf)＞を参照のこと。

コンタミネーションの防止等については、＜JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版(http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/_doc/manual_3.pdf)のコンタミネーション防止編＞を参照のこと。

ブドウの果肉や果皮から抽出した DNA には LAMP 反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどが混入することから、本マニュアルでは GenCheck® DNA Extraction Reagent（ファスマック社）を用いて DNA の粗抽出をおこなっている。本マニュアルでは、同試薬を用いた果皮からの DNA 粗抽出手順を記載しているが、葉等の他の組織から他の DNA 抽出試薬で抽出した DNA 溶液についても、DNA クロマトを用いた品種特異的 DNA 品種識別技術に利用できることを確認している。ジュースや干しブドウなどの加熱や化学処理した加工品から

抽出した DNA は、低分子に断片化されている懸念があり、使用にあたって十分に注意すること。

<準備するもの>

- ・ GenCheck® DNA Extraction Reagent (ファスマック社)
- ・ 2×LAMP Master Mix (ニッポンジーン社)
- ・ シャインマスカットLAMP識別プライマーセット (ニッポンジーン社)
(シャインマスカット識別用10×LAMPプライマーミックス、
ブドウ内在性用10×LAMPプライマーミックス、
陽性コントロール等を含む)
- ・ C-PAS (F4) (TBA社)
- ・ アビジンコート着色ラテックス液 (TBA 社)
- ・ クロマト展開液 (TBA社) (展開液 (改) の方を使用する)
- ・ 滅菌超純水
- ・ 使い捨てペッスル
(ビーエム機器社「チューブミキサー 1.5mLチューブ用」など)
- ・ 使い捨てメス (秋山製作所「スカルペル (エルプ) No.10」など)
- ・ 1.5 mLチューブを95℃以上で加熱可能なブロック恒温槽等の装置
- ・ 1.5 mLチューブを65℃で加温可能なブロック恒温槽あるいは
ユニット恒温槽
- ・ チップ、マイクロチューブ等のプラスチック消耗品類
(チップはフィルター付き、滅菌済みのものを使用する。
また、マイクロチューブはペッスルの先端が底に届くものを使用する)
- ・ ペーパータオル、キムワイプ
- ・ ピンセット
- ・ 高速微量遠心機



図2 抽出に使用する使い捨てメス、使い捨てペッスル、ピンセットの例

<基本操作>

3. 簡易 DNA 抽出

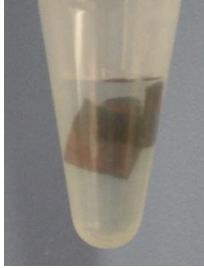
- (1) ブドウ果実を取り出す。冷凍されている場合には、2～3分程室温に置いた方が皮を剥きやすい。
- (2) ブドウ果実の表面を流水で洗い落としたのち、ペーパータオルで表面の水分を取り除く。
- (3) 新しいペーパータオル等の上で、果皮を使い捨てのメスを用いて、5 mm 角程度を1～2枚切出す（図3）。この際、果肉をできるだけ取らないように気を付ける。先の細いピンセットを用いると剥きやすい。切出した果皮を秤量し、約 10 mg 採取する。切り出したブドウ果皮を 1.5 mL チューブに入れる。コンタミネーション防止のため、試料ごとにピンセットを洗淨する。



図3 ブドウ果皮のサンプリング（写真のブドウ品種は「ピオーネ」）

- (4) チューブに GenCheck® DNA Extraction Reagent を 200 μ L 加える。試料は正確に 10 mg である必要はない。例えば 12 mg の場合には、GenCheck® DNA Extraction Reagent を 240 μ L 加えれば良い。

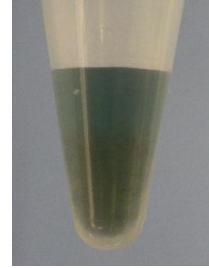
使い捨てペッスルを用いて、懸濁状態となるまで磨り潰す（図4）。



磨砕前



磨砕



磨砕後

図4 ペッスルによりブドウ果皮を磨砕した様子（写真のブドウはピオーネ）

- (5) 上記(1)~(5)の操作を各試料について繰り返す。ペッスルとメスは試料ごとに交換する。
- (6) すべての試料の磨砕が終わったら、磨砕した各試料が入ったチューブを 100°C で 10 分間加熱する。

* 本ステップで十分に加熱処理を行うことが重要である。95°C 以上のお湯につけるなどで実施し、その際は火傷に注意する。

** 加熱処理は、適用温度範囲が 95°C 以上のブロック恒温槽に水を入れて浸す方法や、ガスコンロまたは IH 調理器等を用いて鍋でお湯を沸かし、フローターで浮かせる方法などで行う。加熱していたチューブは、氷に浸して急冷する（5 分以上）。

- (7) 遠心（13,000 $\times$ g 以上, 5 分間, 室温）、上清を新しいマイクロチューブに回収する。150 μ L 程度、底の残渣を吸わないように気を付ける。
回収液を粗抽出液とし、LAMP 反応に供する。すぐに使用しない場合は、-20°C で保存する。

* 本マニュアルでは、GenCheck® DNA Extraction Reagent（ファスマック社）による抽出方法を記載している。他の DNA 抽出試薬を使用する際は、使用するキット等の取扱説明書に従って実施する。LAMP 反応に必要な鋳型 DNA の量は 5~20 ng 程度で、液量は 1~2.5 μ L 程度が望ましい。

抽出 DNA 溶液は濃度に応じて希釈調製する必要がある。濃度が薄い場合は希釈せずそのまま使用することが可能である。また、使用前には各 DNA 溶液について、上記(6)~(7)と同様の手順で DNA の熱変性を行うことを推奨する。

4. LAMP 反応

シャインマスカット用 LAMP 反応液は、1 反応系 (25 μ L) あたり、2 $\times$ LAMP Master Mix 12.5 μ L、シャインマスカット識別用 10 $\times$ LAMP プライマーミックス 2.5 μ L、ブドウ内在性用 10 $\times$ LAMP プライマーミックス 2.5 μ L、3.で調製した粗抽出液 1 μ L、滅菌超純水 6.5 μ L を含む。

分注操作における誤差を最小限に抑えるために、以下のLAMP用Master Mixを調製し、粗抽出液や陰性コントロールとして鋳型DNAを含まない滅菌超純水 (NTC)、または陽性コントロール (PC) を加えることでLAMP反応液を調製する。

以下、試料数が5種類の場合の調製の手順を記す。

(実際の検査では、必要な試料数に応じて調整する)

- (1) 1.5 mLチューブを8本用意する。そのうち、1.5 mLチューブ1本をLAMP用Master Mixに使用する。組成は以下の通り

LAMP用Master Mix：

((7 反応分+余剰分) を調製する。)

2 $\times$ LAMP Master Mix	125.0 μ L
シャインマスカット識別用10 $\times$ LAMPプライマーミックス	25.0 μ L
ブドウ内在性用10 $\times$ LAMPプライマーミックス	25.0 μ L
滅菌超純水	65.0 μ L
Total	240.0 μ L

- (2) 残りの1.5 mLチューブのうち7本に試料名、PC、NTCと記入し、LAMP用Master Mixを24 μ Lずつ分注する。
- (3) 上記チューブに、3. の粗抽出液をそれぞれ1 μ L加える。PCには、陽性コントロール溶液1 μ L、NTCには滅菌超純水を1 μ L加える。

(4) 各反応液をタッピング等でよく攪拌した後、卓上遠心機などによってスピンドアウンする。

(5) 予め、**65℃**に設定しておいたブロック恒温槽（ヒートブロック）あるいは恒温水槽（ウォーターバス）に上記チューブをセットし、**40分間**加温する。

* LAMP反応を行う恒温槽については、予め電源を入れ、65℃に保温しておく。使用機器によっては、温度が安定する前に時間がかかる場合もあるため、試料を磨砕する前に準備をしておくことが望ましい。

* * LAMP反応を行うチューブは、65℃の水槽に浸して反応させること。

ヒートブロックの場合は、ブロックに水を入れてチューブを浸す（図5左）。

ウォーターバスの場合は、フローター等でチューブを浮かせる（図5右）。



図5 LAMP 反応の様子。ブロック恒温槽の場合はウェルに水を入れる（左）、恒温水槽の場合はフローター等を使用する（右）。

(6) 加温後、室温に戻るまで静置し、スピンドアウンしたものをLAMP反応液とし、DNAクロマトを用いた品種判定に使用する。

* 2×LAMP Master Mix には、二本鎖 DNA 結合性蛍光色素が含まれていることから、等温増幅蛍光測定装置あるいはリアルタイム PCR 装置によっても、LAMP の増幅産物を検出できる。その場合は、上記ステップ(5)から、各装置を用いて分析を行う。各装置の使用方法については、それぞれの取扱説明書に従って実施する。蛍光波長の設定は、2×LAMP Master Mix のマニュアルに従う。LAMP 反応を 65℃、40 分間行った後、会合曲線解析もしくは融解曲線解析を行う。

5. DNA クロマトを用いた品種の判定

DNA クロマトを用いて、シャインマスカットであるか否かを判定する。

DNAクロマト反応液は、1反応系（22 μL ）あたり、DNAクロマト展開液（改）塩濃度150 mM 10 μL 、滅菌超純水 10 μL 、DNAクロマト用ラテックス液 1 μL 、LAMP反応液 1 μL を含む。DNAクロマト展開液（改）塩濃度150 mMは、0 mMと300 mMを等量混合して調製する。

以下、4.で調製した5種類の試料、陰性コントロール（NTC）および陽性コントロール（PC）を検出する場合の調製の手順を記す。

分注操作での誤差を小さくするために、以下のような、LAMP反応液を除くDNAクロマト用Master Mixを調製し、これにLAMP反応液を1 μL 加える。

(1) 1.5 mLチューブを8本用意する。そのうち、1.5 mLチューブ1本をDNAクロマト用Master Mixに使用する。組成は以下の通り

DNAクロマト用Master Mix：

（（7 反応分+余剰分）を調製する。）

DNA クロマト展開液（改）塩濃度 0 mM	50.0 μL
DNA クロマト展開液（改）塩濃度 300 mM	50.0 μL
滅菌超純水	100.0 μL
DNAクロマト用ラテックス液	10.0 μL
Total	210.0 μL

- (2) 残りの1.5 mLチューブに試料名、PC、NTCと記入し、DNAクロマト用Master Mixを21 μL ずつ分注する。
- (3) 4.のLAMP反応液を、上記チューブにそれぞれ1 μL 加えてよく混合する。
- (4) 各混合液をタッピング等でよく攪拌した後、卓上遠心機などによってスピンドアウンする。
- (5) C-PAS（F4）を、各混合液につき1本ずつ、スポンジ部分を上にして浸し、15分程度静置する。
- (6) DNA クロマト紙により検出されたマーカーのパターンを、図6に示す陽性例、陰性例と比較して、「シャインマスカット」であるか否かを判定する。

*簡易 DNA 抽出、LAMP 反応液の混合や分注、装置へのセットおよび DNA クロマトによる検出は、すべて室温で行う。



図6 「シャインマスカット」の検出例 陽性及び陰性

3本のピンクのラインは位置マーカーを示す。増幅確認用マーカーはブドウ内在性配列を使用しており、中央の位置マーカーの少し下に表示されるように設計し、シャインマスカット識別用マーカーは、一番下の位置マーカーの少し下に表示されるように設計している。

* 等温増幅蛍光測定装置あるいはリアルタイム PCR 装置によって分析を行った場合には、会合曲線解析もしくは融解曲線解析により、陽性コントロールにおいて、二峰性のピークが得られていることを確認する。低温度側がシャインマスカット識別用マーカー由来のピーク、高温度側がブドウ内在性配列由来のピークとして判定する。

よくある問題と対処方法

- ・ 増幅確認用マーカーは、シャインマスカット識別用マーカーよりも青い発色が薄く出る傾向がある。

- ・増幅確認用マーカーが検出されない場合は、LAMPによる増幅が適切に行われていない可能性があるため、LAMPまたは試料調製からやり直す。
- ・陽性コントロール（PC）で、増幅確認用マーカーおよびシャインマスカット識別用マーカーの片側もしくは両方が検出されない場合には、LAMPによる増幅が適切に行われていない可能性が考えられる。とくに、増幅確認用マーカーのみが検出され、シャインマスカット識別用マーカーが検出されなかった場合には、LAMP反応に用いたブロック恒温槽あるいはユニット恒温槽等の設定温度（65℃）を確認する。
- ・ネガティブコントロール（NTC）の反応でマーカーが検出された場合には、使用した試薬や器具へのDNAのコンタミネーションや、非特異的な増幅の発生が考えられる。使用する試薬や器具を交換して再度分析を行う。

本検出キットで、陰性となることを確認したブドウの品種（果皮または葉から抽出したDNAを用いて確認）

「安芸クイーン」「キャンベルアーリー」「巨峰」「クイーンニーナ」「グロースクローネ」「甲州」「コンコード」「サンヴェルデ」「翠峰」「スチューベン」「赤嶺」「高尾」「デラウェア」「ナイアガラ」「ナガノパープル」「ピオーネ」「藤稔」「ブラックビート」「ポートランド」「マスカット・オブ・アレキサンドリア」「マスカット・ベリーA」「ルビーロマン」「ロザリオビアンコ」

注意事項

本マニュアルの利用にあたり、DNAの取り扱いなど一般的な分子生物学的手法の経験があることが望ましい。

著作権に関する事項

本技術に掲載された内容は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、販売などの利用はできません。

免責事項

記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、農研機構は一切責任を負いません。

特許権等

本技術については、特許出願中（特願 2024-105539）です。本マニュアルを業として利用する場合には、特許許諾について農研機構までご相談下さい。

<<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/patent>>

妥当性の確認

本技術マニュアルは、「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン（令和 4 年度改訂版）」（令和 5 年 3 月 農林水産省輸出・国際局知的財産課作成）(https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf)に記載の事項を満たした試験構成で妥当性確認試験を行い、妥当性を確認しています。

謝 辞

本技術マニュアルは、農林水産研究推進事業 委託プロジェクト研究「品種識別技術の開発」及び、みどりの食料システム戦略実現技術開発・実証事業のうち「農林水産研究の推進」（委託プロジェクト研究）の「品種識別技術の開発」の支援を受けて、開発したものです。