

LAMP法を用いた簡易迅速GM検知

— 前処理から検出まで1時間以内 —

技術の特徴

- ・検知対象となる安全性審査済み遺伝子組換え(GM)作物の種類は年々増え続けており、従来の方法では、その全てを検知することは困難になってきている。とくに、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター等の共通配列を持たない系統が増えてきている(1)。
- ・Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法は、等温反応で且つ極めて短い時間で標的DNAを検出可能な技術である。
- ・複数のGM系統に共通に導入されている組換え配列を標的とした、効率的な定性的スクリーニング検査法を開発した。全ての検出系において、検出限界は0.5%以下であった(2)。
- ・GenCheck^(R) DNA Extraction Reagent((株)ファスマック)を用いることにより、試料の前処理から検出結果が得られるまでに1時間以内で終了する系を開発した(3)。

研究の内容

1. 安全性審査済みGMダイズ及びトウモロコシのP35Sの有無

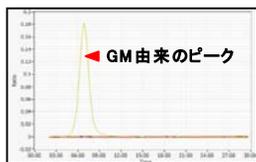
GMトウモロコシ			GMダイズ		
P35S		P35S	P35S		P35S
Bt11	+	1507	+	MON87460	+
Event176	+	DAS59122	+	40278	-
MON810	+	MON88017	+	Event5307	-
T25	+	MIR604	-		
GA21	-	MON89034	+		
NK603	+	MIR162	-		
MON863	+	3272	-		
				40-3-2(RRS)	+
				A2704-12(LLS)	+
				MON89788(RRS2)	-
				DP305423	-
				MON87701	-
				MON87705	-
				MON87769	-

現在、わが国で商品化可能なGM作物は333品種(ダイズは28品種、トウモロコシは213品種)存在する(平成29年7月現在)

2. LAMP法によるGM検知法の開発



等温増幅蛍光測定装置
Genie II (OptiGene社)



測定時間 ≤ 30分

検出下限 (LOD) の検証

Target	GM event	LOD	Detection Time (分)	Annealing Temperature (°C)	
P35S	Bt11	0.1%	18.56±3.30	86.22±0.035	
	Event176	0.5%	19.17±3.19	86.21±0.099	
	MON810	0.3%	18.09±1.57	86.20±0.048	
	T25	0.3%	16.43±2.25	86.15±0.059	
	NK603	0.3%	18.24±3.28	86.14±0.057	
	MON863	0.3%	20.21±2.55	86.11±0.082	
	TC1507	0.5%	16.51±2.20	86.27±0.080	
	DAS59122	0.3%	17.14±2.30	86.14±0.054	
	MON88017	0.3%	21.50±2.33	86.09±0.085	
	MON89034	0.5%	17.22±4.09	86.30±0.077	
MON87460	0.5%	20.13±2.52	86.25±0.064		
EPSPS	RRS	0.05%	18.23±4.32	85.96±0.064	
	A2704-12	0.05%	17.13±3.41	85.97±0.063	
	NK603	0.3%	21.28±2.43	93.63±0.158	
PAT	MON88017	0.3%	21.40±2.54	93.63±0.095	
	RRS	0.1%	21.12±2.03	93.55±0.075	
PAT	Bt11	0.3%	12.31±2.56	87.17±0.047	
	T25	0.3%	13.21±2.56	87.16±0.050	
	TC1507	0.3%	14.15±3.17	87.16±0.046	
	DAS59122	0.3%	11.09±2.04	87.15±0.070	
	A2704-12	0.05%	12.59±2.28	87.07±0.097	
	pmi	MIR604	0.3%	16.32±3.13	87.03±0.046
		MIR162	0.3%	16.43±3.12	87.02±0.084
		3272	0.5%	13.36±2.02	87.12±0.040
	tE9	MON89788	0.1%	20.29±2.17	80.73±0.053
		MON87705	0.5%	18.42±1.50	80.73±0.039
MON87769		0.5%	18.42±1.15	80.79±0.043	
Cry1Ab/Cry1Ac	Bt11	0.3%	15.34±3.49	87.00±0.048	
	MON87701	0.1%	11.44±1.24	86.89±0.029	
GA21	GA21	0.1%	14.50±3.37	90.73±0.030	

3. 粗抽出液を用いた簡易検出法の開発



GenCheck^(R)
DNA Extraction
Reagent

ダイレクトLAMP 試料(粉末) 20mg + GenCheck^(R) DNA Extraction Reagent 400µl → Vortex (標準プロトコール) → 100°C, 10分 → 1分 水中 → 20°C, 15000×g 5分 → 上清を回収して分析に供する

Target	GM event	GM (%)	Positive/Total	Positive rate	Detection Time (min)	Annealing Temperature (°C)
P35S	MON810 (40 mg)	0.5%	21/21	100%	15.03±2.09	86.18±0.047
	MON810 (20 mg)	0.5%	18/21	85.7%		
	RRS (20 mg)	0.5%	21/21	100%	16.59±1.19	86.22±0.046
EPSPS	MON88017 (40 mg)	0.5%	21/21	100%	17.57±0.36	93.72±0.048
	RRS (20 mg)	0.5%	21/21	100%	24.08±0.23	93.96±0.884
PAT	Bt11 (40 mg)	0.4%	21/21	100%	10.01±0.34	87.23±0.042
	A2704-12 (20 mg)	0.5%	21/21	100%	11.34±0.14	87.23±0.033
pmi	MIR604 (40 mg)	0.5%	21/21	100%	16.48±3.45	87.00±0.047
	MIR604 (20 mg)	0.5%	15/21	71.4%		
tE9	MON89788 (20 mg)	0.5%	21/21	100%	24.21±0.44	80.72±0.049
Cry1Ab/Cry1Ac	Bt11 (40 mg)	0.4%	21/21	100%	10.18±0.28	87.00±0.036
	MON87701 (20 mg)	0.5%	21/21	100%	12.33±0.48	87.03±0.039
GA21	GA21 (40 mg)	0.5%	21/21	100%	13.57±1.55	90.78±0.032

(試料前処理 < 20分 + 測定時間 ≤ 30分) < 1時間

今後の展開

GM検知のさらなる簡易迅速化、低コスト化を追求する。



農研機構
食品研究部門

代表研究者: 高島 令王奈
所属: 食品分析研究領域
信頼性評価ユニット

問い合わせ先: 交流チーム: 029-838-7980