

令和 8年 2月 27 日

STH-PAS を用いたしいたけ種(森 XR1 号)の DNA 品種判定(第 1 版)

株式会社 GENODAS

本マニュアルでは、しいたけ種の登録品種である「森 XR1 号」について、国内で流通する主要なしいたけ種 202 品種から PCR と STH-PAS を用いて特異的に品種を特定する方法を記載する。なお、本手法により「森 XR2 号」、「森 126 号」の品種の特定も可能である。

1. 使用機器・消耗品

<使用機器>

- 1) ハサミ(眉毛用のハサミなどの小型タイプを推奨)

＊消毒方法:70%エタノールでの殺菌か 99%エタノールを使用した火炎滅菌

- 2) 電子レンジ(DNA 抽出用)

＊500W または 600W に設定可能な機器を推奨。異なる W 数の場合には、機器に記載された W 数に応じて温める時間を算出すること。

- 3) サーマルサイクラー(Thermo Fisher Scientific 社の MiniAmp Plus など)

＊ランプスピード(上昇・下降温度)の設定を 3.5°C/sec に可能な機器を推奨

- 4) 遠心機(PCR チューブあるいはプレート、マイクロチューブが遠心できる機器)

- 5) マイクロピペッター:必要量を分取可能なピペッターを準備

以下の2種類のピペッターを推奨

①1.0~10 μ L

②10.0~100.0 μ L

- 6) ボルテックスミキサー(攪拌機)＊タッピングでも代用可能

- 7) アルミブロック

- 8) アイスボックス＊発泡スチロールでも代用可能

<消耗品>

- 1) 1.5 mL チューブ(滅菌済み)

- 2) PCR チューブ(滅菌済み)

＊シングルチューブ・8 連チューブ・96Well プレートなど、どのタイプのチューブで PCR を実施していただいても問題ありません。ただし、使用するサーマルサイクラーとの適合性を確認した PCR チューブを使用すること。

- 3) チップ(滅菌済み)

- 4) 使い捨て手袋

2. 試薬 (送付物) など

- 1) DNA 抽出液
- 2) PCR 酵素 (KAPA2G Fast Multiplex)
- 3) プライマー混合液
- 4) クロマト展開液
- 5) クロマト展開紙 (C-PAS_F6)
- 6) コントロール DNA 液
 - ・ポジティブコントロール DNA 液 (以下、PC と略す)
 - ・ネガティブコントロール DNA 液 (以下、NC と略す)

3. 一般注意事項およびトレーニング(対照実験)

本操作手順書の利用にあたり、DNA 抽出や PCR 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。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) を参照すること。加えて、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) を参照すること。

また、クロマト展開紙 (STH-PAS) は、検出感度が極めて高いため、PCR 時の僅かなコンタミネーションでも判定結果に影響を与えてしまう。そこで、以下の手順に従ってトレーニングを実施し、クロマト展開紙 (STH-PAS) を使用した DNA 品種判定の操作手順を習得する。

具体的には、2 つのコントロール DNA 液 (PC・NC) を用いたトレーニングを実施する。操作は、“4-2. DNA 増幅 (PCR)” および “4-3. クロマト展開 (STH-PAS による検出)” に従って行う。対照実験に用いた各コントロール DNA 液の検出結果は、表 1 に示す通りである。表 2 で示した対照実験の判定結果のパターンに従い、適宜次のトレーニングの内容を実施する。

表 1. 各コントロール DNA 液の正しい検出結果

サンプル名	F1	F2	F3	F4	F5	F8
PC	-	+	+	+	+	+
NC	-	-	-	-	-	-

表 2. 対照実験の判定結果のパターンと次のトレーニング内容

判定結果	PC	NC	次のトレーニング内容
パターン 1	同じ	同じ	トレーニング終了
パターン 2	異なる	異なる	PC・NC の再実験
パターン 3	異なる	同じ	1) 正しい PC の結果が得られるまで PC のみ実験 2) PC・NC の再実験
パターン 4	同じ	異なる	1) 正しい NC の結果が得られるまで NC のみ実験 2) PC・NC の再実験

*2回以上の再実験を実施しても正しい判定結果が得られない場合には、株式会社 GENODAS に連絡すること。判定結果のパターンに基づいて、使用する機器・消耗品等の見直しを実施する。

4. 実験手順

4-1. DNA 抽出

- ① 手袋をして菌床から原基（白い塊）を採取する（写真1-左を参照）。
＊アルミホイルを敷いて行くと良い
- ② 異物・異種等の汚染（コンタミネーション）を防止するために、採取した原基の外側をハサミ等で取り除く（写真2-右）。



写真1-左:発達（大きな）している原基（白い塊）を採取

写真1-中央:採取した原基（白い塊）

写真1-右:外側をハサミで取り除いた様子（白い部分のみを残し、オガコを入れない）

- ③ DNA 抽出液（200 μ L）の入った 1.5 mL チューブに切り出した原基を移す。

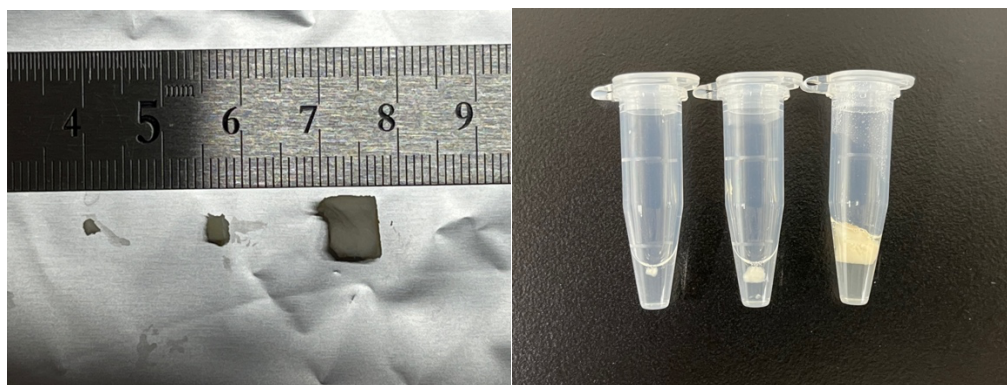


写真2 切り出した原基とチューブに移した時の様子

＊原基のサイズは、1～6 mm 角のいずれの大きさでも DNA 抽出および DNA 判定に影響はないが、3 mm 角（写真の中央）程度を推奨する。

＊原基が DNA 抽出液に浸っていることを確認すること。

<注意事項・確認事項>

サンプル採取が終わったら使用した手袋を捨てること。サンプルを採取した手袋を着用したままマイクロピペッターやチューブに触れるとコンタミネーションの原因となる。

- ④ DNA 抽出液の入った 1.5mL チューブの蓋をしめ、電子レンジ 500W で 30 秒間加熱する(写真4を参照)。

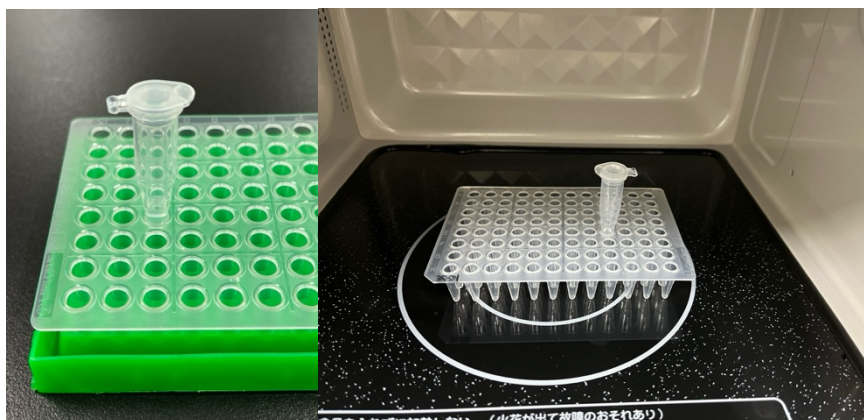


写真3 電子レンジで加熱する時の様子

- *96Well PCR プレートはチューブラックとして使用可能である。
- *切り出した原基のサイズが大きい時(写真2の右側のサイズ)には、電子レンジでの加熱時に熱くなりやすいため、火傷に注意すること。
- *加熱により蓋が開いてしまった場合には、DNA の抽出作業を最初からやり直す。
- *電子レンジの出力が 600W の場合には、25 秒間(500W÷600W×30秒)加熱する。

- ⑤ 振盪混和(タッピング)し、卓上小型遠心機で短時間遠心する(スピンドウン)。
- *スピンドウンを行うことで、チューブの蓋の開閉時におけるチューブ内の液体の飛散防止、マイクロピペットへのチューブ内の液体の付着防止に努める。
- ⑥ 1.5mL チューブ(チューブ内の液体を含む)が常温に戻ったことを確認し、電子レンジ 500W で再度 30 秒加熱する。
- *1.5mL チューブが温かい状態のまま電子レンジで加熱すると蓋が開いてしまうことがあるので、十分に冷ましてから電子レンジで再加熱すること。
 - *実験時間の短縮が必要な場合には、冷蔵庫に数分置くことで急冷した後に、常温で数分間置いてから電子レンジで再加熱すること。
- ⑦ タッピングし、卓上小型遠心機でスピンドウンし“抽出 DNA 液”とする。
- *抽出 DNA 液は、冷蔵で保管する。

4-2. DNA 増幅 (PCR)

PCR 実験は、DNA 抽出液だけではなく、必ず NC 液も一緒に実験を実施する。

- ① 使用するサーマルサイクラーに表3のプログラムを入力する。

<注意事項・確認事項>

*使用するサーマルサイクラーの機器や使用する PCR チューブに応じて専用スペーサーを設置する。

*PCR の反応時間:約 50 分

*ランプスピード(上昇・下降温度)の設定:3.5℃/sec(推奨)

表3. PCR のプログラム(反応条件)

温度	時間	サイクル数
95℃	3 分	1
95℃	15 秒	31
57℃	15 秒	
72℃	15 秒	
72℃	30 秒	1
4℃	hold	1

- ② アイスボックスを用意し、PCR 用の試薬類・DNA 液・PCR チューブ・アルミブロック等を氷上に置く。

<注意事項・確認事項>

*8連の PCR チューブは、適宜ハサミ等で切断しても問題ない。



写真4. 発泡スチロール上での実験の様子

- ③ 1.5 mL チューブに、表4の組成で PCR に用いる必要量の①PCR 酵素と②プライマー混合溶液を調製する。

<注意事項・確認事項>

*PCR 用混合液の調製作業は、必ず氷上で行う。

*必ず実験サンプル数に加えて 2 サンプル以上の混合液を調製する。

*PCR 用混合溶液は、よく攪拌し（ボルテックスミキサーあるいはタッピングを 5 秒以上）、スピンドウンする。

表4. PCR 用混合液の組成（1 反応分・4 反応分・8 反応分の例）

試薬類	1 反応分の量	4 反応分の量	8 反応分の量
① PCR 酵素	5.0 μL	20.0 μL	40.0 μL
② プライマー混合液	2.0 μL	8.0 μL	16.0 μL
合計	7.0 μL	28.0 μL	56.0 μL

- ④ PCR に用いる DNA 抽出液と NC 液を 3.0 μL ずつ分取し、PCR チューブの底にそれぞれ分注する。

*チューブを持ち上げて確認しないこと

- ⑤ ③で調製した PCR 用混合溶液を 7.0 μL ずつ、各 PCR チューブに分注する。

<注意事項・確認事項>

*PCR 用混合溶液の各チューブへの分注は、1 回ずつマイクロピペッターのチップを変えて実施すること。

*シングルチューブや8連チューブを使用する場合には、アルミブロック上で蓋を強く閉めると PCR チューブが取り出しづらくなるため、専用のベースを用いること。

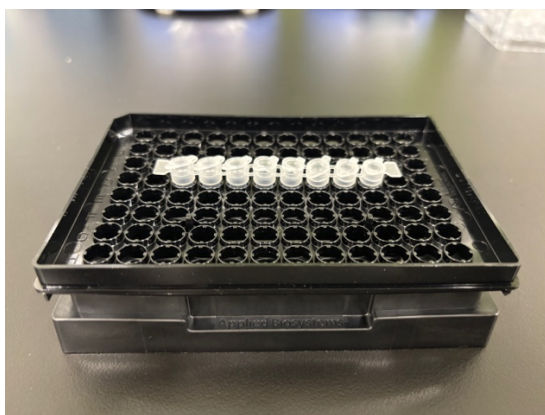


写真5. 蓋を閉めるときの様子

⑥ PCR チューブをスピンドウンし、目視で液量が一定であるか、蓋が正しく閉まっているかを確認する。

⑦ サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、入力したプログラムをスタートする。

<注意事項・確認事項>

*PCR 終了後は、すぐにクロマト展開実験を実施し、常温で PCR 産物を放置しないこと。

4-3. クロマト展開 (STH-PAS による検出)

- ① クロマト展開液 (青色) をよく攪拌し (タッピングあるいはボルテックスミキサーなどで 5 秒以上)、スピンドウンする。

- ② 1.5 mL のマイクロチューブを準備し、クロマト展開液 (青色) を 10.0 μ L ずつ分注する。

<注意事項・確認事項>

* 1.5 mL のマイクロチューブの蓋には、DNA 抽出液などのサンプル名を記載すること。

- ③ PCR 産物を②で準備したクロマト展開液 (青色) が入った 1.5 mL マイクロチューブに全量分注する。

* PCR 産物の液量が 10.0 μ L よりも顕著に少ない場合 (9.0 μ L 以下) には、PCR チューブの変形による蒸発の恐れがあるため、PCR チューブの設置やチューブの適合性を見直し、再実験を実施する。なお、使用しなかったクロマト展開液は、冷蔵庫で 1 年程度保存可能である。

- ④ ②のチューブの蓋を閉めてよく攪拌し (タッピングあるいはボルテックスミキサーなどで 5 秒以上)、スピンドウンしてチューブの蓋を開ける。

- ⑤ クロマト展開紙 (C-PAS_F6) を容器から吸収パッド側を持って取り出す (図 1. C-PAS 検出位置 参照)。

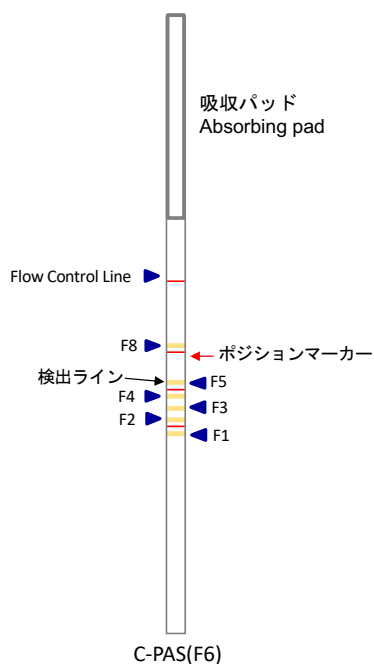


図 1 C-PAS 検出位置 (見本図)

* 黄色の検出ラインが着色ラインの位置 (実際には青色になる)

＊黒太枠部分：吸収パッド（実験時の持ち手部分）

- ⑥ クロマト展開紙の吸収パッド側と反対側を PCR 産物とクロマト展開液の混合した液に浸ける（写真4を参照）。

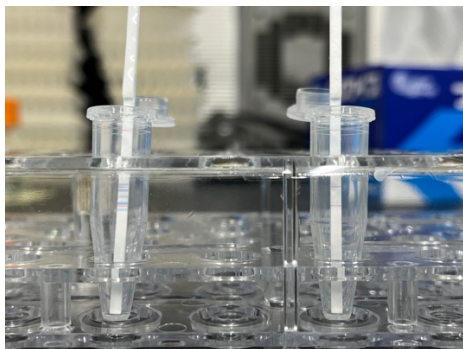


写真6 クロマト展開紙を 1.5mL チューブにつけた状態

<注意事項・確認事項>

＊クロマト展開紙（C-PAS_F6）は、チューブの底面につくように差し入れること。

- ⑦ クロマト展開紙（C-PAS_F6）を浸けてから数分後に着色ライン（バンド）が見えてくるが、必ず PCR 産物とクロマト展開液の混合した液が全て吸水され、乾燥するまでチューブ内にクロマト展開紙を入れたままにすること（最低でも30分以上）。

<注意事項・確認事項>

クロマト展開紙での着色ラインの検出は、常温（15～30℃）・湿度 40%以上で可能である。過度の乾燥は非特異シグナルを出現しやすくするため、エアコンなどの風が直接当たらない環境で操作する。

- ⑧ 全液体が吸水・乾燥したことを確認し、チューブからクロマト展開紙（C-PAS_F6）を取り出して並べ、写真撮影あるいはバンドの着色パターンを記録する（写真7を参照）。

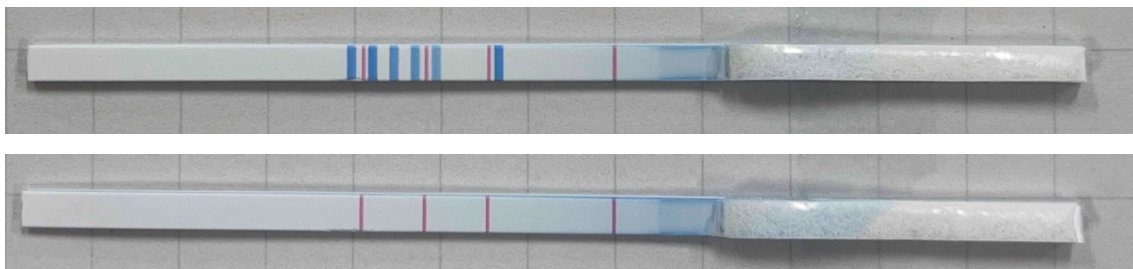


写真7 着色ライン（青色のバンド）の見本

左から順番に F1～F8 である（下はネガティブコントロール）。

<注意事項・確認事項>

着色バンドの有無をより明瞭にしたい場合には、チューブから取り出した後にクロマト展開紙(C-PAS_F6)に染み込んだクロマト展開液(青色)が十分に乾くまで(30 分程度: 白色に変化するまで)放置すること。

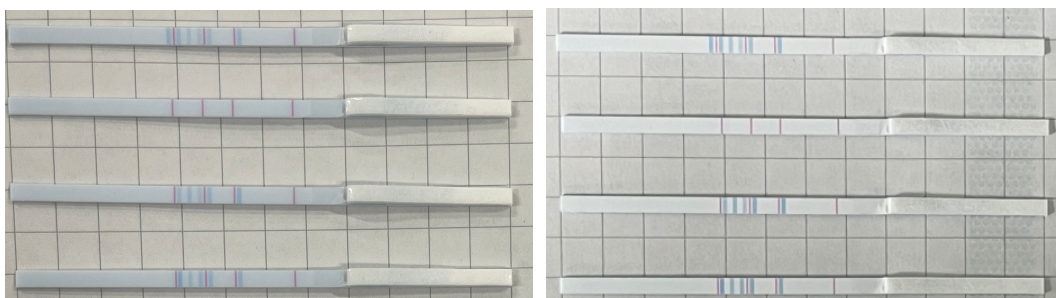


写真6 “吸水後”(左)と“乾燥後(約 30 分間放置)”(右)の様子

5. 品種の判定

STH-PAS の各バンドにおける着色の有無を確認し、品種の判定を行う。なお、本マニュアルの当該品種の STH-PAS の各バンドにおける着色パターンは以下の通りである。

品種名	F1	F2	F3	F4	F5	F8
森 XR1 号	-	+	+	+	+	+
森 XR2 号	-	+	-	+	+	+
森 I26 号	+	+	+	+	+	+

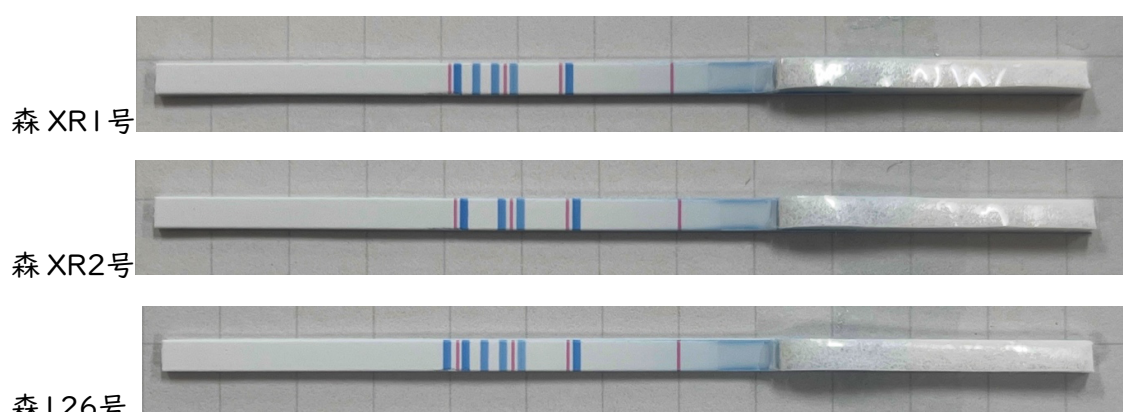


写真 7. 各品種の着色ライン（青色のバンド）の見本

解説 1: F8 (吸収パッド側から 2 番目の赤いラインの直上) はポジティブコントロールなので、このバンドが着色されていなければ、いずれかの操作の失敗であることを示す。

解説 2: F8 のバンドに着色があり、かつ上記 F1~F5 のバンドの着色パターンが上記と異なる場合は、上記 3 品種以外の品種であることを示す。

解説 3: NC 液の場合には、全てのバンドに着色がないことを確認する。

手順確認表

- ☐ サーマルサイ클ラーに PCR のプログラムを入力する（必要に応じて、専用スペーサーを設置）
- ☐ アイスボックスを準備する
- ☐ アルミブロック・PCR 試薬・PCR チューブを氷上に置く
- ☐ PCR 用混合液を調製し、よく攪拌・スピンドウンして氷上に置く
- ☐ DNA 液 3.0 μL 分取し、各 PCR チューブの底に分注する
- ☐ PCR 用混合溶液を 7.0 μL ずつ、各 PCR チューブの底に分注する
- ☐ PCR チューブをスピンドウンして液量が一定であるかを目視で確認する
- ☐ PCR チューブをスピンドウンして蓋が正しく閉まっているかを目視で確認する
- ☐ PCR のプログラムを実行する
- ☐ PCR 終了後に常温で PCR 産物を放置していない
- ☐ PCR 産物の液量が 10.0 μL よりも顕著に少ない（9.0 μL 以下）
- ☐ PCR 産物とクロマト展開液の混合した液が全て吸水・乾燥されたこと確認

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

利用者が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、株式会社 GENODAS は、一切責任を負いません。

妥当性の確認

本操作手順書は<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) 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

本操作手順書は、令和4年度および令和5年度木材製品等の輸出支援対策事業費補助金（きのこの知的財産保護対策事業）、令和7年度農林水産物・食品輸出促進対策事業補助金品種保護制度における特性調査・品種識別技術の高度化に係る調査の支援を受けて、開発されたものです。