

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」  
令和6年度 分担研究報告書

核酸等温増幅反応を用いた簡易核酸クロマト検査の検討

研究分担者 曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

研究要旨：近年の食品種の多様化、世界各国からの食品の輸入量及びその安全性確保需要の増加に伴い、我が国における食品遺伝子検査数も増すことが見込まれる。現在の食品遺伝子検査はリアルタイム PCR がゴールドスタンダードになっているが、機械が高価かつ時間がかかることが問題視されていた。一方で、他分野では遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。特に、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温でかつ数十分で反応が完了することから、定性検査法として医療分野では普及が進んでいる。しかし、国内の食品遺伝子検査としては検討が進んでいないのが実情である。そこで本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

本研究では、オンサイトで迅速に結果を確認できる試験法として、遺伝子組換え (GM) トウモロコシ検査をモデルに、RPA または LAMP を用いた核酸クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (C-PAS) を検討した。とうもろこしの陽性対照として、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素IIb (SSI**IIb**) を、GM の共通配列として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした。RPA-C-PAS では、非特異的な増幅が検出されて、偽陽性が多いことから現時点での適用は困難と考えられた。LAMP-C-PAS では、SSI**IIb**、P35S および TNOS において、Simplex-C-PAS が機能することを確認した。しかし、マルチプレックス化を検討した際に、プライマー濃度を調整することで Duplex の SSI**IIb**/TNOS、P35S/TNOS は機能することを確認できたが、Triplex 試験などは増幅するべきものが確認できないことや、非特異的な増幅が確認される等課題が残った。さらに、公定検査法として運用する際には、反応チューブ開閉時の作業環境汚染の問題を解決する必要がある、そのためには閉鎖系で実験から解析まで完了できる新たな検討が必要と考えられた。

## A. 研究目的

世界の食品安全性検査市場は 2022 年に 211 億米ドルと推定され、2027 年には 311 億米ドルに達し、8.1%の年次成長率になると予測されている (MarketsandMarkets 社、2022)。近年では、「培養肉」等の新規技術で開発された食品種が増えるとともに、世界の食品取引及び規制遵守を満

たすための安全性確保需要も増加することから、結果的に食中毒等のリスクを低減し、かつ食品表示不正を防止するために世界各国で食品検査の需要が増すと考えられる。

食品行政にかかる遺伝子検査（遺伝子組換え食品、アレルゲン、微生物）はリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) がゴールドスタ

ンダードになっている。その理由として、特異性が高いことおよび高感度なことが挙げられる。

しかし、PCR はサーマルサイクラーを用いて特定温度の多段階ステップを複数サイクル繰り返す必要があるため、高価な機械が必要なこと及び結果を得るまでに数時間がかかることが課題であった。従って、今後はリアルタイム PCR と同等の特異性・感度・精度を有しつつ、より簡便で検査速度を向上させた試験法の開発が求められる。

近年、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、60-65°Cの等温反応であり、インキュベーション時間も数十分と短時間で済むことから、世界的にも近年の Covid-19 検査などの感染症診断の分野で適用され始めており、我々も LAMP 法を用いた DNA 粗抽出法やラテラルフロー法の検討を進めている (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*, Narushima et al, 2020, *Biosci Biotechnol Biochem*)。Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 20-45°Cの反応温度でインキュベーション時間が最短 10 分未満という利便性を備えた核酸増幅であり、蛍光プローブで検出する方法に加え、CRISPR-Cas システムを応用した DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) (Chen et al, 2018, *Science*) 等は感染症診断分野での高感度検査法として特に注目されている。一般に等温核酸増幅反応では、PCR と比べて DNA ポリメラーゼが夾雑物に強いという特徴を有することから、DNA 抽出も簡便な方法に代替されうる。しかしながら、食品行政に関わる公定検査法としての検討はあまり進んでいないのが実情である。

昨年度までの検討で、文献調査や簡易 DNA 抽出のしやすさから RPA の有用性を確認している。

本年度は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いた核酸クロマト技術の検査法として応用について検討を行う。

## B. 研究方法

### 試料

国産とうもろこし穀粒および遺伝子組換え (GM) とうもろこし MON863 系統の認証標準物質 (ERM-BF416d、10%GMO、Merck) を用いた。

### ゲノム抽出

Genomic-Tip 100G (QIAGEN) を用いて、添付プロトコールに従い、ゲノム DNA を抽出した。

### RPA-C-PAS

クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (以後、**C-PAS** と表記)、展開液、ラテックスビーズ、標的タグプライマーを TBA 社に生産委託した。GM とうもろこしをモデルに、とうもろこしの陽性対照として、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (*SSIIB*) を標的とした。GM の共通配列として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした。RPA 用プライマー及びプローブを用いた (表 1)。C-PAS 用に各フォワードプライマーに C-PAS とのハイブリタグ DNA を付加した。各リバースプライマーには、アビジンコートされたラテックスと複合体を形成させるために、ビオチンを標識した。RPA-C-PAS の概要を図 1 に示した。TwistAmp Basic Kit (TwistDx) に含まれる試薬を用い、下記の通りに反応溶液を調製した。

|                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| Rehydration Buffer    | 29.6 $\mu$ L         |
| 純水                    | 9.2 $\mu$ L          |
| Primer-F (10 $\mu$ M) | 2.4 $\mu$ L (480 nM) |
| Primer-R (10 $\mu$ M) | 2.4 $\mu$ L (480 nM) |
| Total                 | 43.6 $\mu$ L         |

上記組成で PCR チューブ内に調製・混和し、2 個の PCR チューブにそれぞれ 21.8  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。

分注した各チューブに DNA 抽出液 (10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) を 2.0  $\mu\text{L}$  加えた後、蓋に  $\text{MgOAc}$  (280 mM) 1.2  $\mu\text{L}$  を滴下し、遠心で落とすことで混合し、反応を開始した。反応中は Veriti サーマルサイクラー (ThermoFisherScientific) を用いて、37°C、30 分間保温した。保温後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5~10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。

### LAMP-C-PAS

RPA 同様に GM とうもろこしをモデルに検討した。*SSIb* 用プライマーは、PrimerExplorer (栄研化学) を用いて作成した。P35S は以前開発したもの (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*) を、TNOS は既報のもの (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) を利用した。配列を表 2 に示した。LAMP-C-PAS の概要を図 4 に示した。Master Mix はニッポンジーン社製の LAMP MASTER を用いた。

#### ・ 10×LAMP プライマー Mix

|                        |                                        |
|------------------------|----------------------------------------|
| 50 $\mu\text{M}$ FIP   | 12.8 $\mu\text{L}$ (16 $\mu\text{M}$ ) |
| 50 $\mu\text{M}$ BIP   | 12.8 $\mu\text{L}$ (16 $\mu\text{M}$ ) |
| 50 $\mu\text{M}$ F3    | 1.6 $\mu\text{L}$ (2 $\mu\text{M}$ )   |
| 50 $\mu\text{M}$ B3    | 1.6 $\mu\text{L}$ (2 $\mu\text{M}$ )   |
| 50 $\mu\text{M}$ LoopF | 6.4 $\mu\text{L}$ (8 $\mu\text{M}$ )   |
| 50 $\mu\text{M}$ LoopB | 6.4 $\mu\text{L}$ (8 $\mu\text{M}$ )   |
| 純水                     | 38.4 $\mu\text{L}$                     |
| Total                  | 80 $\mu\text{L}$                       |

C-PAS の場合は以下の組成で反応させた。

#### ・ 反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

|                                       |                  |
|---------------------------------------|------------------|
| DNA 抽出液 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) | 4 $\mu\text{L}$  |
| 2×LAMP MASTER                         | 10 $\mu\text{L}$ |
| 5×LAMP プライマー Mix                      | 4 $\mu\text{L}$  |
| 純水                                    | 2 $\mu\text{L}$  |
| Total                                 | 20 $\mu\text{L}$ |

65°C、30 分間保温後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5~10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。マルチプレックス LAMP を行う場合は、プライマー総モル量を変えず、標的毎にモル比を調節した。

増幅の確認を蛍光検出で行う場合は、以下の組成で行った。

#### ・ 反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

|                                       |                  |
|---------------------------------------|------------------|
| DNA 抽出液 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) | 4 $\mu\text{L}$  |
| 2×LAMP MASTER                         | 10 $\mu\text{L}$ |
| 5×LAMP プライマー Mix                      | 4 $\mu\text{L}$  |
| 10×インターカラータ Mix                       | 2 $\mu\text{L}$  |
| Total                                 | 20 $\mu\text{L}$ |

反応は等温増幅蛍光測定装置 GeneLyzer FIII (日立キャノンメディカル) を用いて 65°C で 30 分間保温し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。融解曲線分析では、LAMP 後に 1 秒当たり 0.05°C のスピードで 98°C から 80°C まで温度を降させ、蛍光シグナルデータを取得した。

## C. 研究結果

### RPA-C-PAS (核酸クロマト法)

RPA はこれまで電気泳動および蛍光プローブを用いたリアルタイム検出ではワークすることが確認されている。本検討では RPA を C-PAS による検出に適用できないか検討した。GM とうもろこしをモデルに、RPA-C-PAS の系を設計した (図 1)。シングルプレックスで *SSIb*、P35S および TNOS の各領域の増幅を確認したところ、陽性コントロール GM とうもろこしの増幅指標位置に着色が確認されたが、陰性コントロールでも同様の濃さの着色が確認された (図 2A)。非特異的増幅はプライマー濃度および展開液にも起因することから、プライマー濃度を下げ、かつ展開液も非特異的増幅抑制剤が含まれるもの

を用いて検討を行ったところ、5 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が認められた（図 2B）。10 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が見られなかった。

陰性コントロールの増幅原因を調べるために、本法で用いたプライマーに加え、既報（Liu et al, 2021, Food Chem）のプライマーを用いた RPA の増幅産物のアガロースゲル電気泳動で確認したところ、陰性コントロールでもしばしばスメア状バンドが確認されることがあった（図 3）。

### LAMP-C-PAS（核酸クロマト法）

LAMP は既に、C-PAS の報告がなされているが、本検討で図 4 に示した構想で、GM とうもろこし検査をモデルとした *SSI**II**b*、P35S、TNOS マルチプレックス検査を検討した。昨年度利用した LAMP-*SSI**II**b* は、融解曲線ピークがブロードな形状を示していた。このブロードなピークは増幅産物が多様に含まれ、非特異的な増幅が多いことを示している。そこで、本研究では最初に *SSI**II**b* のプライマーの改良を検討した。PrimerExplorer によりプライマーを新たに 3 種類設計し、それらを用いて LAMP を行った検討結果を図 5 に示した。プライマー *SSI**II**b*-Original-1 は増幅が確認されなかった。昨年度の検討で用いたプライマー *SSI**II**b*-Original-2 では陽性及び陰性の両コントロールで 12～13 分で増幅が確認され、融解曲線解析では 86～96℃でブロードな蛍光値変化が認められた。なお、陰性コントロールでの増幅は、前回の増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性とみられる。プライマー *SSI**II**b*-Original-3 は増幅が確認されたが、曲線の立ち上がり方が 20 分以降と遅く、融解曲線も 85～91℃とブロードなピークが確認された。プライマー *SSI**II**b*-Original-4 は、16 分で陽性コントロールでのみ増幅が確認され、かつ 90℃付近をピークとしたシャープな融解曲線が確認された。よって、非特異的な増幅が少ないと考えられる以後は

*SSI**II**b*-Original-4 のプライマーペアを用いることにした。

次に、C-PAS を行うためのハイブリゼーションタグとビオチン標識の組み合わせを検討した。LAMP はプライマー 6 種類用いるため、様々な標識パターンが想定されるが、今回はハイブリダイゼーションタグを FIP または LoopF プライマーに、ビオチンを BIP または LoopB に標識し、それぞれの組み合わせ①～④（図 6A）の中からシグナル感度が高く、特異性が良好なものを選抜することにした。LAMP-C-PAS を行ったところ、組み合わせ①～④全てにおいて、陽性コントロールでのみ F1 のライン（図 4）に青の着色が確認された（図 6B）。続いて、その増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、全ての組み合わせにおいて、陽性コントロールでのみ LAMP 特有のラダー状のバンドが認められた（図 6C）。よって、用いた組み合わせのどれに関しても C-PAS で検出が可能と判断されたが、以降の検討は標識の組み合わせ①を利用した。P35S と TNOS による蛍光検出および C-PAS での増幅を確認し、その結果を図 7 に示した。リアルタイム蛍光検出では、P35S は約 14 分後に、TNOS は約 20 分後に増幅が確認でき、融解曲線ピークもそれぞれ 86～87℃、80～81℃付近にシャープなものが認められた。C-PAS では、P35S および TNOS どちらも目的の位置に着色が確認された。よって、Simplex-LAMP は全て機能することが確認された。

次に C-PAS のマルチプレックス化の検討のため、各プライマーセットを混合して、Duplex あるいは Triplex-LAMP-C-PAS を検討した。図 5、7 に示した通り、TNOS-LAMP 速度は *SSI**II**b* と P35S の LAMP 速度と比較して遅いため、TNOS プライマー濃度を濃く調製して検討したところ、*SSI**II**b*/TNOS の Duplex-LAMP ではプライマーモル比 1 : 7 の時に GM とうもろこしで *SSI**II**b* と TNOS の両方で着色が認められた（図 8A）。ま

た、非 GM とうもろこしでは *SSI**II**b* の着色のみ認められた。P35S/TNOS の Duplex-LAMP では TNOS の着色が薄いプライマーモル比 1 : 2 時に、GM とうもろこしで両方の着色が確認された (図 8B)。また、非 GM とうもろこしでは着色が認められなかった。よって、*SSI**II**b*/TNOS および P35S/TNOS の Duplex-LAMP はマルチプレックスとして機能することが示唆された。一方で、*SSI**II**b*/P35S の Duplex-LAMP および *SSI**II**b*/P35S/TNOS の Triplex-LAMP も検討を行ったが、増幅されるべき反応が認められないことや非特異的な増幅が認められる等の運用するための問題が残った (データ示さず)。

#### D. 考察

##### RPA-C-PAS

RPA を C-PAS で取り扱った報告がまだ存在しないため、本研究で初めて検討を行ったところ、標的とした 3 つの配列についていずれも陰性コントロールにおいて非特異的なシグナルが認められた。既に RPA の加水分解プローブ法および、核酸クロマト技術で既に論文で報告されているプライマーを用いても、RPA は電気泳動時に陰性コントロールでスミアが確認されることから、C-PAS で検出されるものは必ずしも標的の増幅を示すものではなく、プライマーダイマーや非特異的な増幅を検知していると考えられる。RPA の加水分解プローブを用いた系では、Tetrahydrofuran および C3-Spacer をオリゴに導入することが一般的で、生産コストが高いという問題点があり、RPA の低コスト化のための導入には適さない。また、既報 (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) では、オリゴ DNA の 5'側に蛍光標識またはビオチンの抗体をマウントした抗原抗体反応を利用した試験紙であるのに対し、本研究では DNA タグとのハイブリダイゼーションする核酸をマウントした C-PAS のため、増幅産物のト

ラップ様式が異なっている。最適化にはさらなる検証が必要であると考えられる。

研究開始時は RPA で利用するポリメラーゼは TwistDx 社しか取り扱いがなかったが、ThermoFisher 社などからも販売が開始している。今後、試薬に関しては汎用性が高くなると予想されるが、第一は蛍光検出や電気泳動による確認がメインになると考えられる。

##### LAMP-C-PAS

LAMP-C-PAS に関しては GM 食品検査においては、パパイヤ等で既に報告されている (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*, Takabatake et al, 2023, *Biol Pharm Bull*)。今回、GM とうもろこしのスクリーニング検査として適用することを念頭に、GM とうもろこしの C-PAS を検討した。とうもろこし内在性遺伝子検査は *SSI**II**b* を標的として、蛍光検出から、C-PAS の Simplex-検査までを良好なプライマーセットをデザインすることができた。続いて、P35S や TNOS を対象とした C-PAS も既存の方法を用いて良好な Simplex-検査結果を得ることができた。しかし、C-PAS のマルチプレックス化において、プライマーの組み合わせの最適な条件を組むことが難しく、今回機能することが確認できたのは *SSI**II**b*/TNOS または P35S/TNOS の Duplex-LAMP-C-PAS に留まった。LAMP ではプライマーを 6 種類添加するため、標的が増えるにつれて、プライマー間の相互作用の組み合わせは PCR と比較して劇的に増加していく。すなわち、予期せぬプライマーダイマーが生じる可能性が高くなり、PCR と比較してマルチプレックス化を難化させている。今回 3 セットのプライマーで検討を行ったが、各反応のマルチプレックス化を行う場合は、さらに多数の組み合わせの検討を要すると考えられる。さらには、C-PAS は一度反応を終えたチューブを開封して、クロマト試験紙を挿入することから、開封時に増幅した

多数の DNA が大気中に拡散し、作業環境を汚染するリスクが大いにある。実際に、作業の後半においては陰性コントロールで本来増幅する可能性のない反応系で非特異的な増幅が多数確認され、本研究の足枷となった。作業環境汚染による偽陰性が生じる系では、公定試験法として運用する上の大きな障壁となるだろう。この問題をクリアするには、閉鎖系で反応からクロマト試験紙に展開するような器具を専用で開発することが望ましい。本研究班ではそこまで至らなかったが、実用に向けて検討を続ける。

#### E. 結論

RPA および LAMP のクロマト試験検査として GM とうもろこし検査をモデルに C-PAS を検討した。RPA-C-PAS は陰性コントロールでも増幅が確認され、適用が難しい結果となった。LAMP-

C-PAS では Simplex 検査および一部 Duplex 検査は機能することを確認したが、Triplex 検査ではうまく機能しなかったことから、今後検討が必要である。さらに、今後公定検査法として C-PAS を適用するには、作業環境汚染による偽陽性の問題をクリアする必要がある、閉鎖系の反応を構築することが必要と考えられた。

#### F. 研究発表・業績

・曾我慶介、中山達哉、柴田識人「全国検査機関を対象とした核酸等温増幅反応による迅速遺伝子検査需要調査」第 61 回全国衛生化学技術協議会年会、堺市、2024 年 11 月 22 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

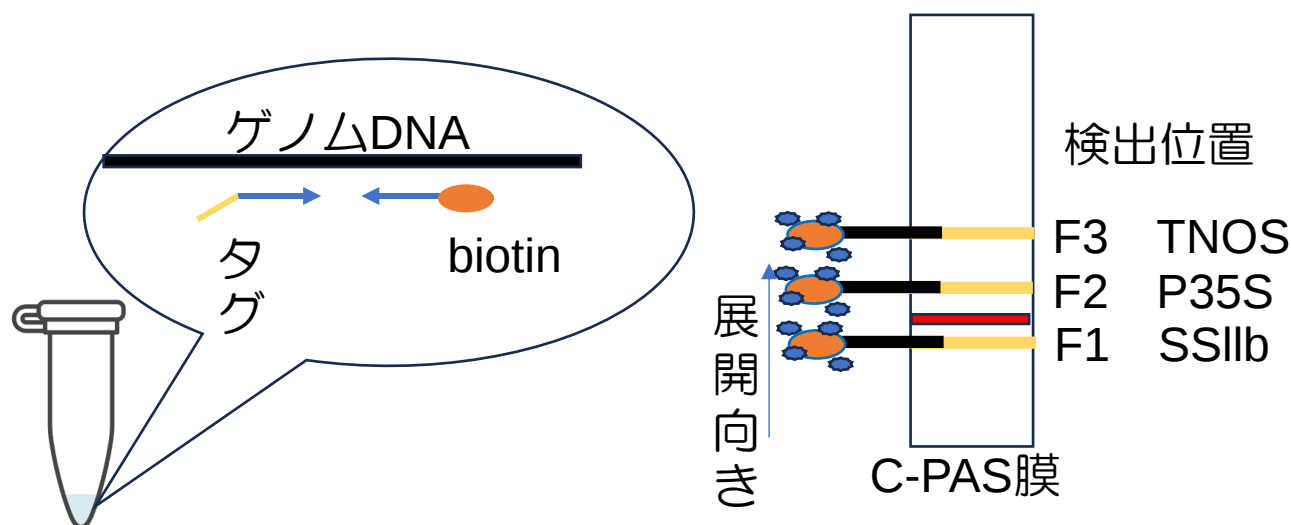
表 1 RPA用プライマー

|                  | 遺伝子名        | プライマー名        | オリゴ配列(5'-3')                        | 増幅長    | C-PAS時     | 参照                           |
|------------------|-------------|---------------|-------------------------------------|--------|------------|------------------------------|
| とうもろこし<br>内在性遺伝子 | SSIIb       | SSIIb-rpa-fw9 | ccgaagcaaagtcagagcgctg<br>caatgcaa  | 183 bp | F1タグ       | オリジナル                        |
|                  |             | SSIIb-rpa-rv8 | gctttccaccggtctagcatcatc<br>acctgc  |        | ビオチン<br>タグ |                              |
| GM配列             | P35S        | p35s-rpa1-Fw5 | tgatatctccactgacgtaaggg<br>atgacgc  | 100 bp | F2タグ       | オリジナル                        |
|                  |             | p35s-rpa1-Rv  | ccctgtcctctccaaatgaaatg<br>aacttcc  |        | ビオチン<br>タグ |                              |
|                  | P35S-<br>2" | RPA-P-35s-F2  | cctctgccgacagtgggtccaaa<br>gatggacc | 123 bp |            | Liu et al Food<br>Chem, 2021 |
|                  |             | RPA-P-35s-R   | cccttacgtcagtgagatatca<br>catcaatcc |        |            |                              |
|                  | TNOS        | 12-NOS-F      | gatcgttcaaacatttggaata<br>aagtttct  | 220 bp | F3タグ       | Ding et al,<br>JAR, 2024     |
|                  |             | 12-NOS-R      | atttatcctagtttgcgcgtata<br>ttttgtt  |        | ビオチン<br>タグ |                              |

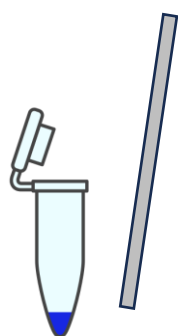
表 2 LAMP-C-PAS用プライマー

| 遺伝子   | プライマー<br>役割                               | オリゴ配列                                         | C-PAS時     | 参考文献                                            |
|-------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------|
| SSIIb | F3                                        | GCTCCGAAGCAAAGTCAGA                           |            | Original-1                                      |
|       | B3                                        | CTTAGCATCCACCGTTTCAG                          |            |                                                 |
|       | FIP                                       | CAGCTTTGGGTCCGGACACCGCGCTGCAATGCAAAACG        |            |                                                 |
|       | BIP                                       | AGAGAAATCGATGCCAGTGCGGGCTTCCACCGGTCTAGC       |            |                                                 |
|       | LoopF                                     | TGCTGCCCCCACTCGTT                             |            |                                                 |
|       | LoopB                                     | TGAAGCCAGAGCCCGCA                             |            |                                                 |
|       | F3                                        | GATTCTGCTTCACCTCCCAA                          |            | Original-2<br>令和5年度<br>研究報告書<br>で用いたもの          |
|       | B3                                        | GTCTAGCATCATCACCTGCG                          |            |                                                 |
|       | FIP                                       | GCCCCCACTCGTTCCGTTTTGCCTTTGACATCTGCTCCGAA     |            |                                                 |
|       | BIP                                       | GGTGTCCGGACCCAAAGCTGGCACTGGCATCGATTCTCT       |            |                                                 |
|       | LoopF                                     | GCAGCGCTCTGACTTTGC                            |            |                                                 |
|       | LoopB                                     | TCATCCATCAGCTCCTGTCAC                         |            |                                                 |
| F3    | GACCCAAAGCTGATCATCCA                      |                                               | Original-3 |                                                 |
| B3    | GGCCAGGTTCAATTATCCTCC                     |                                               |            |                                                 |
| FIP   | CATCATCACCTGCGGGCTCTG-TCAGCTCCTGTCACCAAGA |                                               |            |                                                 |
| BIP   | AAGCATAGGCATCGCTGAACCG-CATAAGGAGCACTCGCCG |                                               |            |                                                 |
| LoopF | CGCACTGGCATCGATTCTC                       |                                               |            |                                                 |
| LoopB | CTAAGGCTGATGCAGCTCCGG                     |                                               |            |                                                 |
| F3    | GATGCCAGTGCGGTGAAG                        |                                               | Original-4 |                                                 |
| B3    | GGAGCACATTCAGAAGCCA                       |                                               |            |                                                 |
| FIP   | CCGGAGCTGCATCAGCCTTAGATGATGCTAGACCGGTGGAA | F1タグ<br>ビオチン標識                                |            |                                                 |
| BIP   | GGCGGCGAGTGCTCCTTATGCACATTAGGCCAGCCAA     |                                               |            |                                                 |
| LoopF | GGTTCAGCGATGCCTATGCT                      |                                               |            |                                                 |
| LoopB | ACAGGGAGGATAATGAACCTGG                    |                                               |            |                                                 |
| P35S  | F3                                        | ATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCG                      |            | Takabatake et al,<br>2018, J Agric<br>Food Chem |
|       | B3                                        | ACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTC                      |            |                                                 |
|       | FIP                                       | GAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTAGTGGTCCCAAAGATGGA   |            |                                                 |
|       | BIP                                       | GCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCTTGCGAAGGATAGTGGGA   |            |                                                 |
|       | LoopF                                     | TTTCCACGATGCTCCTCG                            | F2タグ       |                                                 |
|       | LoopB                                     | CGTAAGGGATGACGCACA                            | ビオチン標識     |                                                 |
| TNOS  | F3                                        | CGCGATAATTTATCCTAGTTTG                        |            | Hardinge et al,<br>2018, Sci Rep                |
|       | B3                                        | CGTTCAAACATTTGGCAAT                           |            |                                                 |
|       | FIP                                       | GCATGACGTTATTTATGAGATTTTTCGCGCTATATTTGTTTTCTA | F3タグ       |                                                 |
|       | BIP                                       | CATGCTTAACGTAATTCAACATTTTGAATCCTGTTGCCGGTC    |            |                                                 |
|       | LoopF                                     | GATTAGAGTCCCGCAATTATAC                        |            |                                                 |
|       | LoopB                                     | AAATTATATGATAATCATCGCAA                       | ビオチン標識     |                                                 |

①増幅 37°C、30分



②ラテックス液（展開液）  
＋C-PASを挿入



③展開（常温、10分）  
目視検出

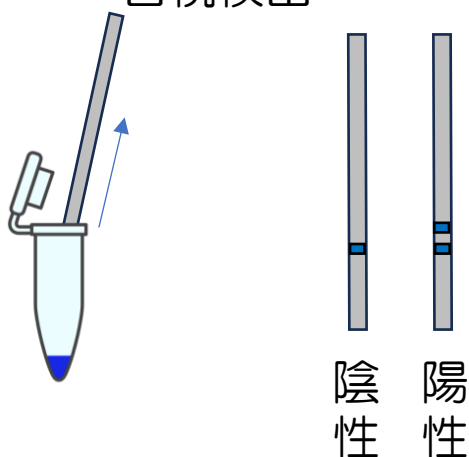
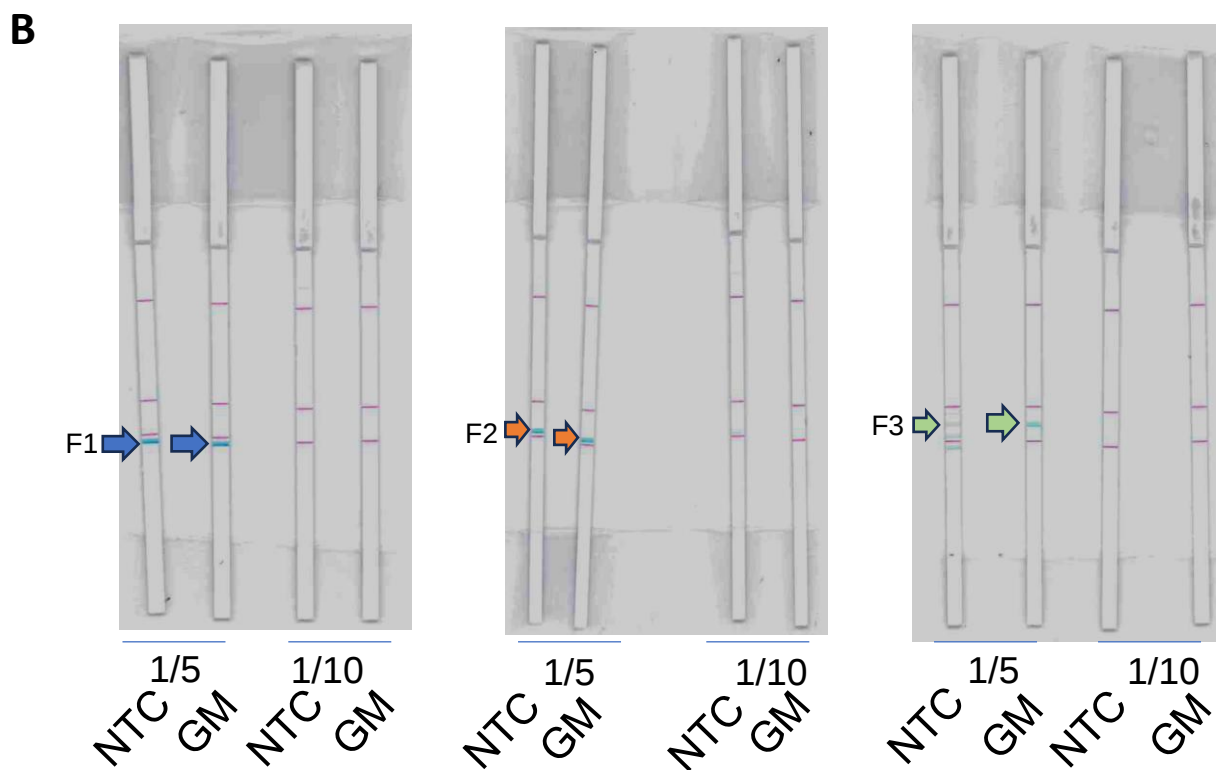
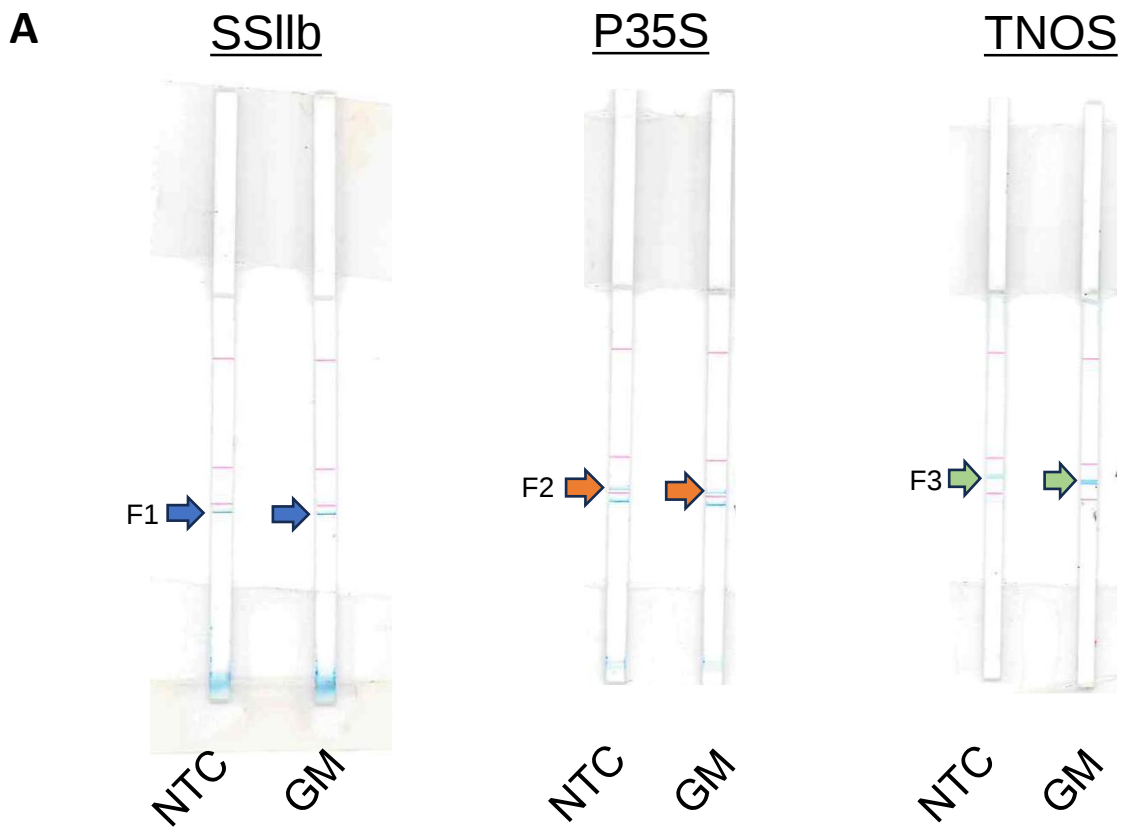


図1 RPA-C-PAS概略図

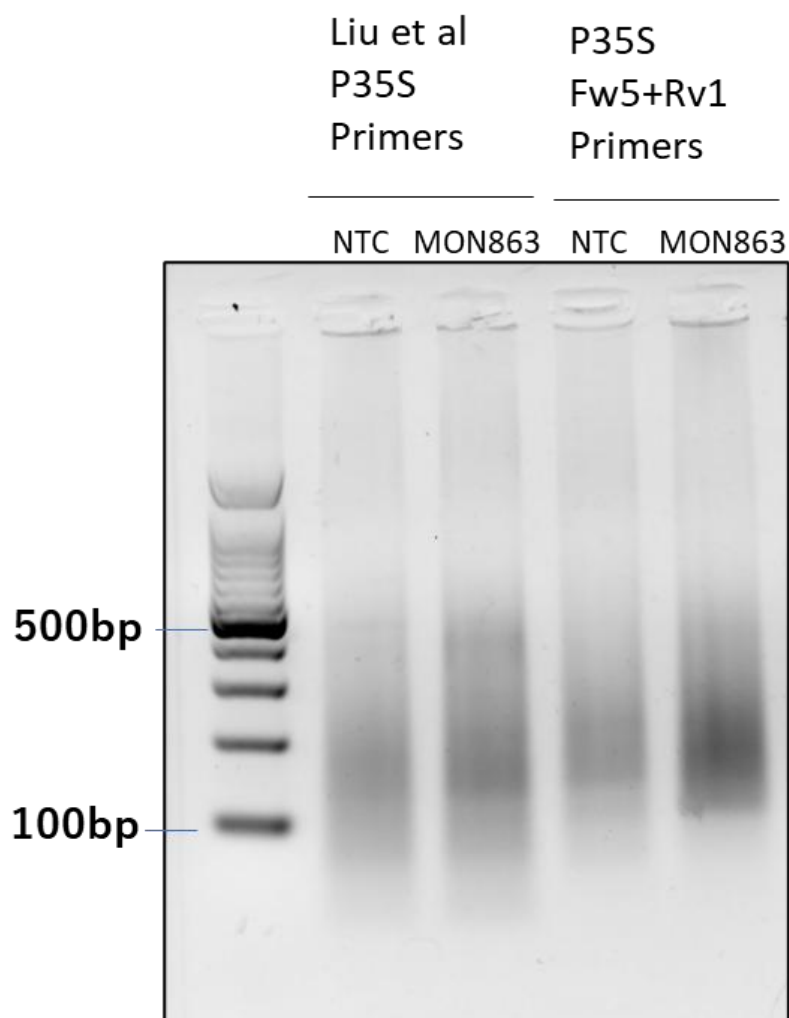
クロマト目視判定試験紙Printed Array Strip (C-PAS) をRPAを用いて実施。

① ビオチンプライマーとシングルタグDNA付プライマーにより標的DNAを増幅、② その増幅液をアビジンコートラテックス（青）と混合してメンブレンストリップに展開、③ ライン状に固相化された相補タグDNAとタグDNAの強いハイブリダイゼーション反応により増幅産物をトラップ、④ トラップされたラテックス標識RPA増幅産物でラインが青色になることにより、検体中の標的DNAの有無を目視判別。実際は、37°C、30分で増幅後、増幅液と展開液を混合した溶液中にC-PASを挿入し、約10分静置。着色を目視で判定。



**図2 RPA-C-PASのSimplexの検討結果**

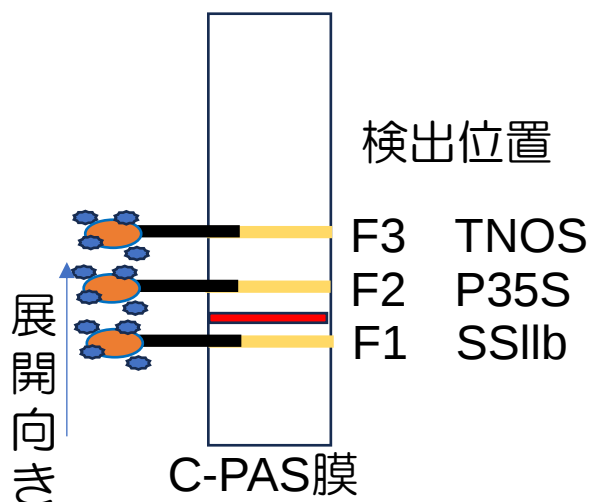
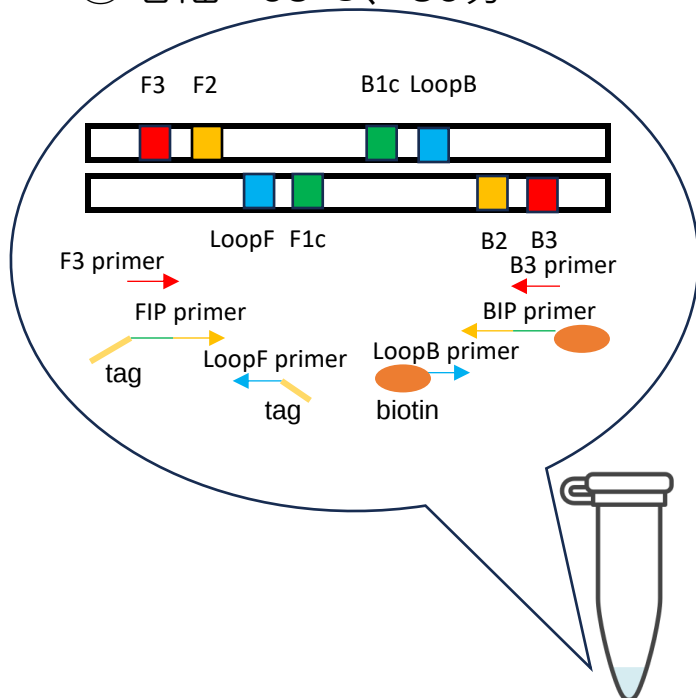
SSIIb、P35SおよびTNOSに関して、テンプレート無し（NTC）、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA（GM）からSimplex RPAを行い、C-PASで判定を行った。F1はSSIIb、F2はP35S、F3はTNOSのフォワードプライマーに相補的なタグがそれぞれマウントされている。A) 従来プライマー濃度、B) プライマー濃度5倍希釈、10倍希釈。非特異的増幅を抑える展開液（改）を用いた。



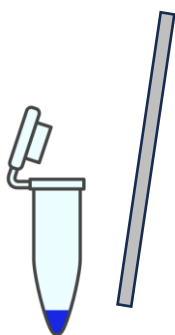
**図3 RPAの増幅産物確認**

P35Sに関して、既報（Liu et al, 2021, Food Chem）の方法と本法で、テンプレート無し（NTC）、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNAからRPAを行い、アガロースゲル電気泳動で増幅産物の確認した。既報は増幅産物123 bp、本法は100 bp。

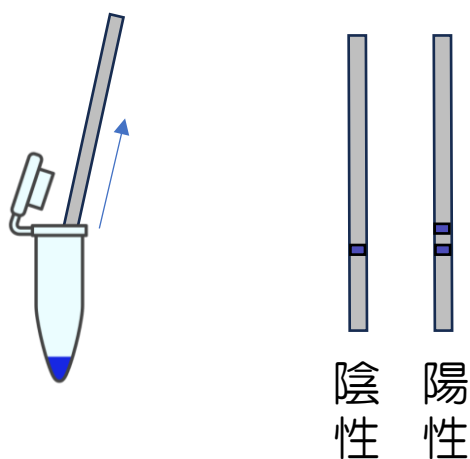
# ①増幅 65°C、30分



## ②ラテックス液（展開液） ＋C-PASを挿入



## ③展開（常温、10分） 目視検出



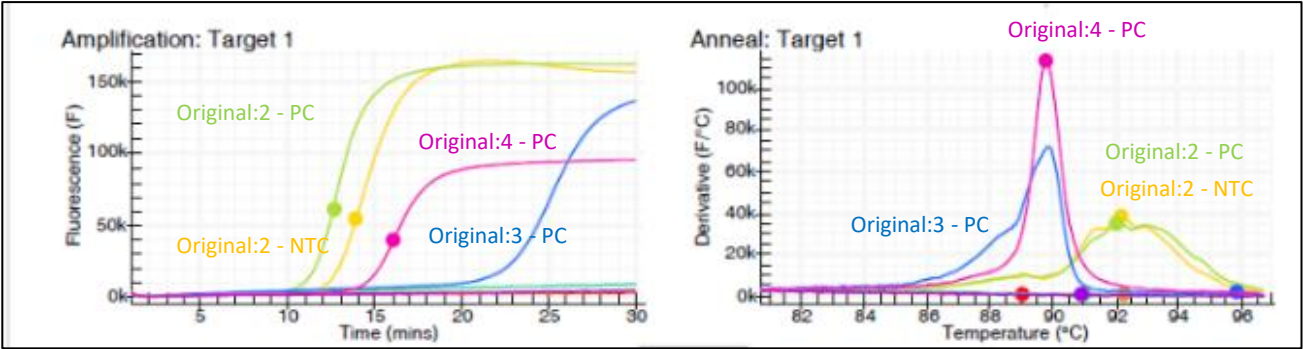
**図4 LAMP-C-PAS概略図**

クロマト目視判定試験紙Printed Array Strip（C-PAS）をLAMPを用いて実施。

① ビオチンプライマーとシングルタグDNA付プライマーにより標的DNAを増幅、② その増幅液をアビジンコートラテックス（青）と混合してメンブレンストリップに展開、③ ライン状に固相化された相補タグDNAとタグDNAの強いハイブリダイゼーション反応により増幅産物をトラップ、④ トラップされたラテックス標識LAMP増幅産物でラインが青色になることにより 検体中の標的DNAの有無を目視判別。

実際は、65°C、30分で増幅後、増幅液と展開液を混合した溶液中にC-PASを挿入し、約10分静置。着色を目視で判定。

A



B

| SSIIb<br>プライマーペア | 試料  | 時間 (分) | 融解温度 (°C) ピーク |
|------------------|-----|--------|---------------|
| Original:1       | NTC | —      | —             |
|                  | PC  | —      | —             |
| Original:2       | NTC | 13:55  | 92.20         |
|                  | PC  | 12:36  | 92.06         |
| Original:3       | NTC | —      |               |
|                  | PC  | — *    | — *           |
| Original:4       | NTC | —      | —             |
|                  | PC  | 16:07  | 89.79         |

\* 蛍光値プロットでは目視で増幅が確認されたが、ソフトウェアで値が算出されなかった。

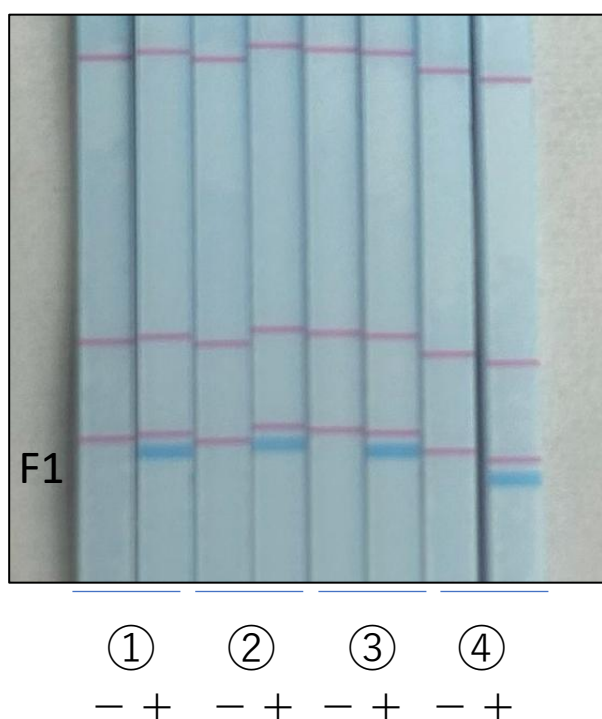
図5 LAMP-SSIIbのシングルプレックスの検討結果

SSIIbを標的としたLAMPに関して、4種類のプライマーセット（Original:1～4）を用い、テンプレート無し（NTC）またはとうもろこし由来ゲノムDNA（PC）を鋳型として検討した。A）Genelyzerにより蛍光を検出した際の増幅曲線（左）と融解曲線（右）、B）増幅の閾値を超えるまでの時間と、融解温度

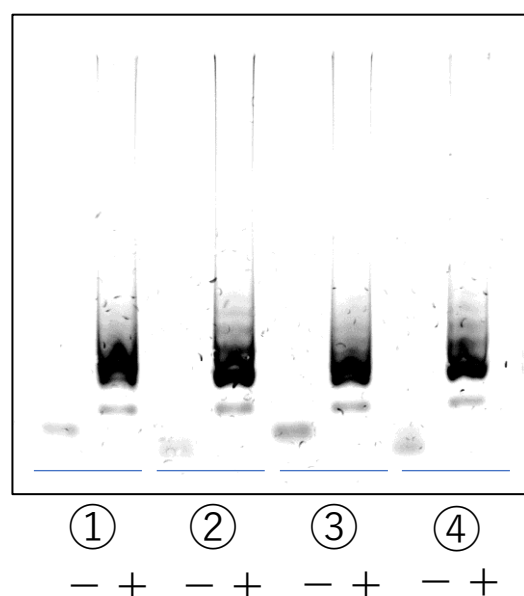
**A**

| 組み合わせ    | ①   | ②     | ③     | ④     |
|----------|-----|-------|-------|-------|
| F1タグ     | FIP | LoopF | FIP   | LoopF |
| Biotinタグ | BIP | LoopB | LoopB | BIP   |

**B**



**C**



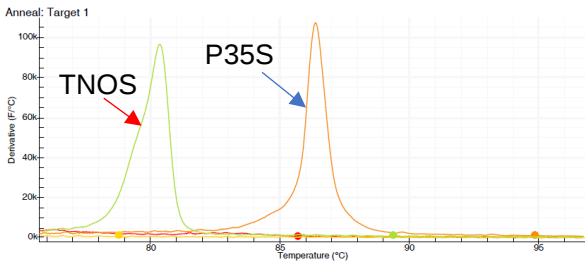
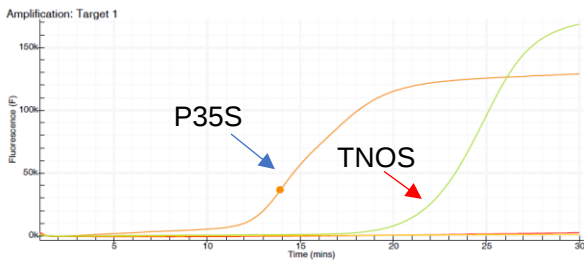
## 図6 LAMP-SSIIbのC-PASの検討結果

SSIIbを標的としたLAMP-C-PASに関して、プライマー②を用い、テンプレート無し（NTC）またはとうもろこし由来ゲノムDNA（PC）を鋳型として検討した。－がNTC、＋がPCを示す。A) 標識パターンの組み合わせ4種類、B) C-PAS結果、F1はSSIIbのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがマウントされている。C) アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認

A

| プライマーペア | 試料  | 時間（分） | 融解温度（℃）ピーク*2 |
|---------|-----|-------|--------------|
| P35S    | NTC | —     | —            |
|         | GM  | 13:56 | 86～87        |
| TNOS    | NTC | —     | —            |
|         | GM  | —*    | 80～81        |

\*蛍光値プロットでは目視で増幅が確認されたが、ソフトウェアで値が算出されなかった。  
\*2ソフトウェアにより融解温度ピークが正しく算出されなかったため、目安を示した。



B

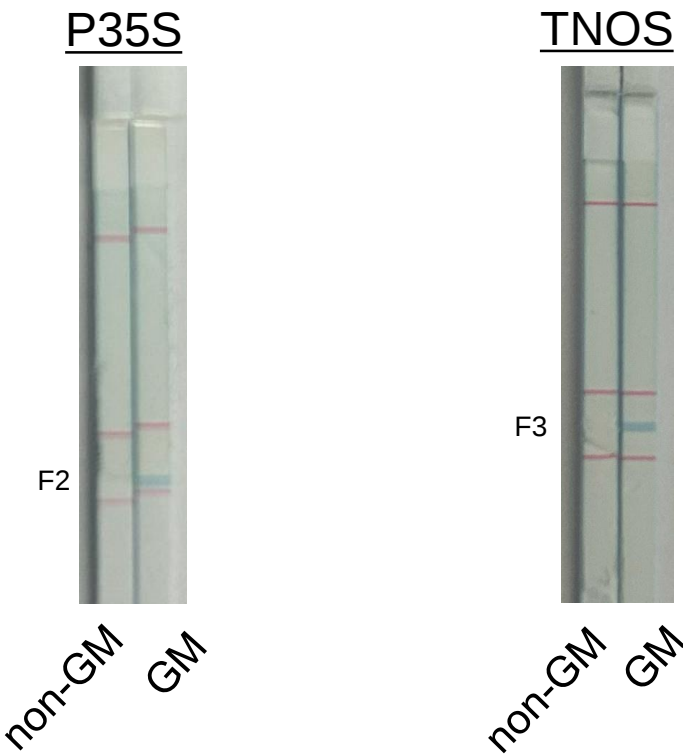
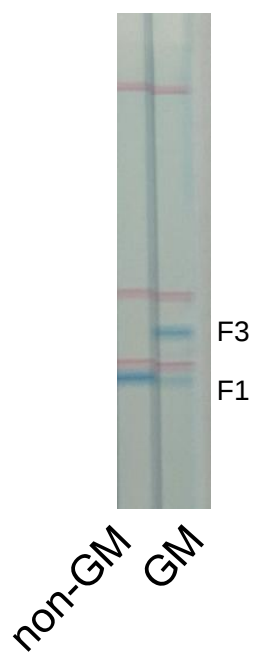
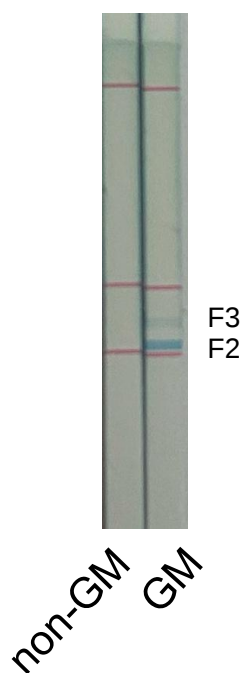


図7 LAMP-C-PAS (P35S, TNOS)

P35SおよびTNOSに関して、非GMとうもろこし由来ゲノムDNA (non-GM)、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA (GM) を鋳型にLAMPを行った。A) 左がリアルタイム蛍光検出の増幅曲線、右が融解曲線、B) C-PASでの目視判定。F2はP35S、F3はTNOSのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがそれぞれマウントされている。

**A****B****図8 マルチプレックスLAMP-C-PAS**

非GMとうもろこし由来ゲノムDNA (NTC) 、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA (GM) を鋳型にマルチプレックスLAMP-C-PASを行った。F1はSSIIb、F2はP35S、F3はTNOSのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがそれぞれマウントされている。A) SSIIbおよびTNOSのDuplex-LAMP (SSIIb : TNOS = プライマー濃度比 1 : 7) 結果、B) P35SおよびTNOSのDuplex-LAMP (P35S : TNOS = プライマー濃度比 1 : 2) 。