

## 1 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験

### 2 次のように改める。

3 天然物の品質確保の第一歩は、基原の正しい原材料を使用す  
4 ることである。したがって、生薬の基原は、適否の判定基準で  
5 あることが、生薬総則4に明示されている。生薬の基原を鑑別  
6 する方法には、形態学的方法や、官能試験、化学的方法が  
7 あり、それぞれ各条に適切な方法が明示されている。形態学的  
8 方法や、官能試験、化学的方法は、生薬の表現形質に基づく  
9 種の鑑別方法である。他方、近年分子生物学的な技術の進歩と  
10 植物の遺伝子情報の蓄積に伴い、それぞれの生薬の遺伝子型を  
11 確認することで、種を鑑別する手法が確立されつつある。この  
12 ような方法は、形態学的方法などによる植物の表現型に基づ  
13 く鑑別法とは異なり、環境による影響を受けない。また、鑑別  
14 のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られ  
15 やすい等の利点がある。

16 生物の進化は、遺伝子の突然変異により担われており、近縁  
17 種間における遺伝子の塩基配列の違いは、種の系統関係を反映  
18 している。この理論に基づき、近年微生物の鑑別では、核ゲノ  
19 ム上のリボソームRNA(rRNA)をコードする遺伝子領域  
20 (rDNA)の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法  
21 が採用されている。同様に遺伝子型を用いた高等植物の鑑別に  
22 も、このrDNAの塩基配列が最もよく用いられている。特に  
23 rDNAのITS(Internal Transcribed Spacer)領域では、コード  
24 遺伝子領域と比較して塩基置換が起こりやすいため、近縁種を  
25 区別しやすいことになる。また、核ゲノム上の遺伝子は、両親  
26 に由来するため、種間雑種を確認できる利点がある。高等植物  
27 には、更にミトコンドリアゲノム上の遺伝子と葉緑体ゲノム上  
28 の遺伝子がある。これらのゲノム上の遺伝子も鑑別のためよく  
29 用いられるが、通常単性遺伝であるため、種間雑種の確認はで  
30 きない。

31 ここに示した三つの方法は、近年、論文報告<sup>1-4)</sup>されたrDNA  
32 のITS領域の遺伝子配列の違いに基づき開発された、1)ピャク  
33 ジュツ中のソウジュツに関する純度試験法及び2)ポウフウ中の  
34 ペウケダナム・レデボウリエルロイデスに関する純度試験法で、  
35 バリデーシヨンのための共同試験が終了したものである。

36 各条では、ソウジュツの基原植物は、*Atractylodes lancea*  
37 *De Candolle*又は*A. chinensis* Koidzumi (*Compositae*)、ピャク  
38 ジュツの基原植物は、*A. japonica* Koidzumi ex Kitamura  
39 又は*A. macrocephala* Koidzumi(*Compositae*)と規定されてい  
40 る。また、両者の基原の適否は、基本的に鏡検を含む生薬の性  
41 状と確認試験の薄層クロマトグラフィーで規定されている。上  
42 記の論文では、これらの四種の植物について、前述したITS領  
43 域の塩基配列を比較することで、明確に区別できること、更に  
44 種特異的なプライマー対を用いた遺伝子の増幅(PCR)、又は、  
45 種特異的な配列を認識する制限酵素の利用により、塩基配列の解  
46 析を行わずに種の鑑別が簡便に行えることが示されている。

47 同じく、ポウフウの基原植物は、*Saposhnikovia divaricata*  
48 *Schischkin* (*Umbelliferae*)と規定されており、基原の適否は、  
49 生薬の性状と確認試験の薄層クロマトグラフィーで規定されて  
50 いる。論文<sup>4)</sup>では、陝西省や山西省でポウフウとして扱われて  
51 いる生薬の中には、ペウケダナム・レデボウリエルロイデスを  
52 基原とするものが、高い頻度で含まれており、両者は、rDNA

53 のITS領域の塩基配列により区別可能であることが示されてい  
54 る。

55 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験では、試験の簡便さを  
56 最大限考慮し、塩基配列の解析を行わず、種特異的なプライマ  
57 ー対を利用し、PCR増幅バンドを観察する方法(Mutant Allele  
58 Specific Amplification法：方法1)及び各基原植物に共通のプ  
59 ライマー対により調製したPCR産物に対して種特異的な配列を認  
60 識する制限酵素で処理し、生成するDNA断片を観察する方法  
61 (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism法：方法  
62 2)を設定した。このような、PCR法を利用する試験法では、  
63 微量の鋳型DNAが理論的には、数十億～数千億倍に増幅され  
64 る。したがって、粉末生薬の確認試験として用いる場合、分析  
65 する生薬のほとんどが不適なもので僅かに適合植物由来の生薬  
66 の粉末が存在していても、検出対象のDNA断片が観察される  
67 ことになる。このため、確認試験法として利用するには、他生  
68 薬由来の粉末の混入に注意しながら切断生薬、全形生薬の単  
69 一対に対して利用することになる。他方、純度試験として用い  
70 る場合、どのような形態の生薬であったとしても、対象遺伝子  
71 に多型が存在せず正しく遺伝子増幅が行われる限り、純度試験  
72 で対象とする不適な植物由来のDNA断片が確認されれば、生  
73 薬の形態にかかわらず、対象とする不適な生薬が混入してい  
74 ることが明らかとなる。

75 なお、ここで示した方法は参考情報であり、現段階で本法を  
76 用いて得られた結果がそのまま各条の生薬の適否を左右するも  
77 のでない。また、単一対からなる生薬試料に対して、論文で  
78 示されたシーケンスを行うことで、基原種についてより正確  
79 な判定が行えることはいうまでもない。

### 1. DNA増幅装置

81 生薬より抽出精製して得られたDNAの増幅に用いる。機器  
82 により、温度調節方法等が微妙に異なるため、指定された条件  
83 でPCRを行っても、PCR増幅バンドの強度等が異なることが  
84 ある。したがって、方法1のようにPCRの増幅バンドの有無の  
85 みで、結果を判定する場合、JAS分析試験ハンドブック、遺伝  
86 子組換え食品検査・分析マニュアル<sup>5)</sup>に記載の装置を用いるこ  
87 とが推奨される。他の装置を使用する場合、事前にあらかじめ  
88 基原種が判明している試料を用い、得られたDNAを用いて  
89 PCRを行い、適切な増幅バンドのみが得られることを確認し、  
90 得られない場合には、PCRの温度条件を微調整することが必  
91 要となる。同装置は、方法2における制限酵素処理にも転用す  
92 ることができる。

### 2. 一般的注意

94 生薬は、新鮮な植物体とは異なり乾燥物で、採取されてから  
95 ある程度の時間を経たものである。したがって、DNAが断片  
96 化を起こしている場合が多く、また植物中には様々なPCRの  
97 反応阻害物が存在している可能性があり、鋳型DNAの抽出精  
98 製は、最も注意を要する過程である。ジュツ類生薬の場合、生  
99 薬の周皮に阻害物が存在している場合が多いため、周皮を清潔  
100 なメスなどで剥ぎ落として除いた試料を使用する。

101 また、本試験で使用されるPCRは、検出対象のDNAを数億  
102 倍以上に増幅する技術であり、僅かなコンタミネーションがあ  
103 っても、誤った結果を導いてしまう。このため、コンタミネ  
104 シヨンの防止には、細心の注意が必要である。コンタミネ  
105 シヨンの防止処置については、上記のマニュアルのコンタミネ  
106 シヨンの防止編<sup>6)</sup>を参照されたい。

## 107 3. ビャクジュツのソウジュツに関する純度試験

## 108 3.1. 方法 1 (Mutant Allele Specific Amplification 法)

109 本法は、一般に Mutant Allele Specific Amplification  
110 (MASA)法又は Amplification Refractory Mutation System  
111 (ARMS)法と呼ばれる方法で、種特異的プライマー対による  
112 PCRにおけるDNA増幅の有無により、検体由来の鋳型DNAの  
113 塩基配列情報を得る方法である。

## 114 3.1.1. 操作法

115 以下、操作法の一例を示す。

## 116 3.1.1.1. 鋳型DNAの調製

117 試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有  
118 害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれ  
119 ば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。その  
120 場合、最終的に得られるDNA量(濃度)に注意して、最初の試料  
121 量とDNAを溶出させる液量を調整する必要がある。組換え  
122 DNA技術応用食品の検査方法に関する通知<sup>7)</sup>で使用されている  
123 シリカゲル膜タイプのキットを用い、同法に準拠して抽出精製  
124 を行う場合、試料採取量は200 mgとし、AP1緩衝液1 mL、  
125 RNase Aを2  $\mu$ L、AP2緩衝液325  $\mu$ Lを用いるのが適当である。  
126 また、第一カラムに負荷する上清は、清澄であることが最も重  
127 要で、無理に1 mLを負荷する必要はない。また、最終的に  
128 DNAを溶出させる液量は、50  $\mu$ Lが適当であり、通常1回目の  
129 溶出液をDNA試料原液として用いる。

## 130 3.1.1.2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認及びDNAの定量

131 原液中のDNAの純度は、分光光度計を用いOD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>  
132 の比で確認することができる。同比が1.5になれば、DNAが十  
133 分に精製されていることを示す。DNA量は、1 OD<sub>260nm</sub> = 50  
134  $\mu$ g/mLで換算する。上記の測定は、適当に希釈したDNA試料  
135 原液を用いて行い、得られた結果を基に、以後PCRの反応に  
136 必要な濃度に水で希釈し、DNA試料液として、マイクロ試料  
137 管に分注し、必要な場合は-20°C以下で冷凍保存する。分注  
138 したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度  
139 保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度がPCRで規定  
140 された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用  
141 いる。

## 142 3.1.1.3. PCR

143 上記の通知で例示された定性PCR法<sup>8)</sup>で用いる市販の酵素を  
144 用いた場合、酵素に添付されたマグネシウム入りPCR緩衝液  
145 2.5  $\mu$ L、酵素に添付されたdNTP(0.2 mmol/L)、5'及び3'プ  
146 ライマー(0.4  $\mu$ mol/L)及びTaq DNAポリメラーゼ(1.25 units)を  
147 含む液に、10 ng/ $\mu$ Lに調製したDNA試料液5  $\mu$ L(DNAとして  
148 50 ng)を氷中で加え、全量が25  $\mu$ Lで反応を行うのが適当であ  
149 る。なお、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験を実  
150 施する場合、プライマー対は、前述の論文<sup>1)</sup>で示されたC、D(C  
151 は、*A. lancea*で陽性、Dは、*A. chinensis*で陽性)を使用するが、  
152 プライマー対A、Bを組み合わせて使用すると、それぞれの検  
153 体の基原種を確認することができる。また、DNAが正しく抽  
154 出されていることを確認するため、以下の陽性対照プライマー  
155 対を用いた反応液を調製するとともに、陰性対照として、調製  
156 したDNA試料液を加えないもの、それぞれのプライマー対を  
157 加えないものも調製し、同時にPCRを行う必要がある。

158 Pf : 5'-CAT TGT CGA AGC CTG CAC AGC A-3'

159 Pr : 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'

160 PCR反応は、以下の条件で行う。95°Cに10分間保ち反応を

161 開始させた後、95°Cで0.5分間、68°C(プライマー対Cを用いる  
162 場合のみ69°C)で0.75分間を1サイクルとして、30サイクルの  
163 PCR増幅、次に終了反応として72°Cで7分間保った後、4°Cで  
164 保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。

## 165 3.1.1.4. アガロースゲル電気泳動とPCR産物の検出

166 反応終了後、PCR増幅反応液5  $\mu$ Lを、適当量のゲルローデ  
167 イング緩衝液と混合し、2 w/v%アガロースゲルのウェルに添  
168 加し、1倍TAE緩衝液(参考情報、遺伝子解析による微生物の  
169 迅速同定法参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当な  
170 DNA分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝  
171 液に含まれるプロモフェノールブルー色素がゲルの1/2から2/3  
172 まで進んだところで電気泳動を終了する。

173 泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲ  
174 ルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析  
175 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312  
176 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標  
177 準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。

## 178 3.1.2. 結果の判定

179 まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で305 bpのバン  
180 ドが確認され、プライマー対を加えないもの、DNA試料液を  
181 加えないものでバンドが確認されないことを確かめる。次に、  
182 Cプライマー対を加えたもので226 bpのバンド、あるいはDプ  
183 ライマー対を加えたもので200 bpのバンドが確認された場合、  
184 試料はソウジュツと判定され(刻み生薬の場合は、ソウジュツ  
185 の混入が認められ)、不合格となる。陽性対照プライマー対を  
186 加えたもので305 bpのバンドが確認され、プライマー対を加  
187 えないもの、DNA試料液を加えないものでバンドが確認され  
188 ず、Cプライマー対で226 bpのバンド、Dプライマー対で200  
189 bpのバンドが確認されない場合、試料はソウジュツではない  
190 (刻み生薬の場合は、ソウジュツの混入がない)と判定され、純  
191 度試験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバンドが  
192 確認されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考えられ  
193 るので、DNAの抽出からやり直すことが求められる。また、  
194 プライマー対を加えないもの、DNA試料液を加えないもので  
195 バンドが確認された場合は、PCR操作に間違いがあったもの  
196 として、3.1.1.3.のPCRから実験をやり直すことになる。

197 3.2. 方法 2 (PCR-Restriction Fragment Length  
198 Polymorphism 法)

199 本法は、一般に PCR-Restriction Fragment Length  
200 Polymorphism (RFLP)法と呼ばれる方法であり、対象植物の  
201 DNA配列に共通のプライマー対を用いて増幅したPCR産物に  
202 対して、種特異的な配列を認識する制限酵素による消化反応を  
203 行い、生成するDNA断片のパターンを観察することにより、  
204 検体由来の鋳型DNAの塩基配列情報を得る方法である。

205 試験は、各ロット、25個体に番号を付し、各個体別にPCR-  
206 RFLPによる基原種鑑別を行い、若い番号から順に、鑑別可能  
207 な20個体中に不適合試料が幾つ存在するかで、純度試験の合  
208 否判定を行う。

## 209 3.2.1. 操作法

210 以下に操作の一例を示す。

## 211 3.2.1.1. 鋳型DNAの調製

212 試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有  
213 害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれ  
214 ば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。近年

215 では、検体由来のPCR酵素阻害物質の作用を抑える働きを有  
216 するPCR試薬が市販されており、このような試薬を利用する  
217 場合、検体からの鋳型DNAの調製は、DNA抽出試薬によるイン  
218 キュベーション操作のみで良い。試験実施者の利便性を考え、  
219 ここでは、このようなPCR試薬を用いる場合のDNA調製法を  
220 示す。

221 検体20 mgを清潔なナイフで刻み、細片化し、DNA抽出用  
222 試薬400  $\mu$ Lを加え、55°Cで一晩(16 ~ 18時間)インキュベーシ  
223 ョンする。終了後、95°C、5分間加温し、試薬中の酵素を失活  
224 させる。検体が沈殿するまで、遠心分離を行い、上清50  $\mu$ Lを  
225 分取し、鋳型DNA溶液とする。なお、この方法で調製した  
226 DNA溶液は、検体由来の多くの夾雑物を含んでおり、OD<sub>260nm</sub>  
227 に基づく濃度測定は、適用できない。

228 DNA抽出用試薬の組成は、下記のとおりである。

230	2-アミノ-2-ヒドロキシメ	
231	チルー1,3-プロパンジオー	
232	ル・塩酸(pH 8.0)	20 mmol/L
233	エチレンジアミン四酢酸	5 mmol/L
234	塩化ナトリウム	400 mmol/L
235	ドデシル硫酸ナトリウム	0.3%
236	プロテインナーゼK	200 $\mu$ g/mL

### 238 3.2.1.2. PCR

239 論文<sup>3)</sup>で示されたPCR酵素及びPCR試薬を用いた場合、2倍  
240 濃縮PCR試薬10.0  $\mu$ L、5'及び3'プライマー(0.5  $\mu$ mol/L)及び  
241 Taq DNAポリメラーゼ(0.5 units)を含む液に、鋳型DNA溶液  
242 0.5  $\mu$ Lを水中に加え、全量が20  $\mu$ Lで反応を行うのが適当であ  
243 る。

244 PCR反応は、以下の条件で行う。95°Cに10分間保ち反応を  
245 開始させた後、95°Cで0.5分間、65°Cで0.25分間、72°Cで0.25  
246 分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅、次に終了反  
247 応として72°Cで7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応  
248 液をPCR増幅反応液とする。PCR反応の際には、陰性対照(鋳  
249 型DNA溶液の代わりに水)を必ず置く。各プライマーの配列は  
250 下記のとおりである。

251 5'-プライマー: 5'-GGC ACA ACA CGT GCC AAG GAA  
252 AA-3'

253 3'-プライマー: 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC  
254 C-3'

### 255 3.2.1.3. 制限酵素処理

256 2種の制限酵素、*FauI*及び*MspI*を用い、それぞれ、個別に  
257 処理する。*FauI*については、酵素に添付の反応緩衝液及び1.0  
258 unitの酵素からなる反応液にPCR産物3.0  $\mu$ Lを水中に加え、全  
259 量を15.0  $\mu$ Lとする。同様に、*MspI*では、反応緩衝液及び20.0  
260 unitsの酵素からなる反応液にPCR産物3.0  $\mu$ Lを加え、全量を  
261 15.0  $\mu$ Lとする。これらの反応液をメーカー推奨の温度条件で、  
262 2時間インキュベーションし、終了後、72°Cで10分間加温し、  
263 酵素を失活させる。PCR反応における陰性対照試料について  
264 も、制限酵素処理を行う。

### 265 3.2.1.4. アガロースゲル電気泳動とDNA断片の検出

266 制限酵素反応終了後、反応液全量を、適当量のゲルローディ  
267 ング緩衝液と混合し、4 w/v%アガロースゲルのウェルに添加  
268 し、1倍TAE緩衝液(参考情報、遺伝子解析による微生物の迅

269 速同定法参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当なDNA  
270 分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝液に含  
271 まれるプロモフェノールブルー色素がウェルより2 cm程度進  
272 んだところで電気泳動を終了する。4 w/v%アガロースゲルは、  
273 粘度が高く、調製、取り扱いが難しいことから、市販のプレキ  
274 ャスト型ゲルを使用した方が良い。

275 泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲ  
276 ルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析  
277 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312  
278 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。

## 279 3.2.2. 結果の判定

### 280 3.2.2.1. 各個体の判定

281 PCR反応の際の陰性対照試料にプライマーダイマー(約40  
282 bp)を除くバンドが検出されないことを確認する。次に、*FauI*  
283 処理した各検体において、約80 bp及び60 bpのバンドが検出  
284 される場合、あるいは、*MspI*処理した各検体において、約90  
285 bp及び50 bpのバンドが検出される場合、このものは、ソウジ  
286 ュツと判断する。いずれの酵素処理においても、約140 bpの  
287 バンド及びプライマーダイマーの他にバンドを認めない場合、  
288 このものは、ビャクジュツと判断する。いずれの反応液におい  
289 ても、プライマーダイマーの他にバンドを認めない場合、その  
290 検体からは、PCR産物が得られていないと判断し、判定不能  
291 とする。

### 292 3.2.2.2. 純度試験の判定

293 各個体の判定結果を用いて、純度試験の判定を行う。判定不  
294 能と判断された個体を除き、若い番号順に20個体の結果を用  
295 いる。20個体中、ソウジュツと判断される個体がなければ、  
296 純度試験合格とする。20個体中、ソウジュツと判断される個  
297 体が1個体存在する場合、新たに25個体を選び、同様の試験を  
298 行い、ソウジュツと判断される個体がなければ、合格とする。  
299 2度目の試験においてもソウジュツと判断される個体が見出さ  
300 れる場合及び1度目の試験において、ソウジュツと判断される  
301 個体が二つ以上見出される場合は、純度試験不合格とする。

## 302 4. ボウフウのペウケダヌム・レデボウリエルロイデスに対す 303 る純度試験

### 304 4.1. 方法I

305 3.1と同様に、種特異的プライマー対によるPCRにおける  
306 DNA増幅の有無により、検体由来の鋳型DNAの塩基配列情報  
307 を得る方法である。

#### 308 4.1.1. 操作法

309 以下、操作法の一例を示す。

##### 310 4.1.1.1. 鋳型DNAの調製

311 ジュツ類生薬の際には、シリカゲル膜タイプのキットによる  
312 調製法を採用したが、ボウフウ及びペウケダヌム・レデボウリ  
313 エルロイデスでは、3.2.1.1で示した簡易的な調製法による  
314 DNA試料溶液を鋳型に用いた場合においても、安定したPCR  
315 が可能であることが確認できたことから、試験実施者の利便性  
316 を考え、以下に示す簡易調製法を採用した。

317 検体10 mgを清潔なナイフで刻み、細片化し、DNA抽出用  
318 試薬400  $\mu$ Lを加え、55°Cで一晩(16~18時間)インキュベーシ  
319 ョンする。終了後、95°Cで5分間加温し、試薬中の酵素を失活  
320 させる。検体が沈殿するまで、遠心分離し、上清50  $\mu$ Lを分取  
321 し、鋳型DNA溶液とする。なお、この方法で調製したDNA溶  
322 液は、検体由来の多くの夾雑物を含んでおり、OD<sub>260nm</sub>に基づ

323 く濃度測定は、適用できない。

324 DNA抽出用試薬の組成は、下記のとおりである。

325

326	2-アミノ-2-ヒドロキシメ	
327	チル-1,3-プロパンジオ-	
328	ル・塩酸(pH 8.0)	20 mmol/L
329	エチレンジアミン四酢酸	5 mmol/L
330	塩化ナトリウム	400 mmol/L
331	ドデシル硫酸ナトリウム	0.3%
332	プロテインアーゼK	200 µg/mL

333

#### 334 4.1.1.2. PCR

335 論文<sup>3)</sup>で示されたPCR酵素及びPCR試薬を用いた場合、2倍  
336 濃縮PCR試薬10.0 µL、5'及び3'プライマー(0.5 µmol/L)及び  
337 Taq DNAポリメラーゼ(0.5 units)を含む液に、鋳型DNA溶液  
338 0.5 µLを氷中で加え、全量が20 µLで反応を行うのが適当であ  
339 る。

340 ボウフウのペウケダヌム・レデボウリエルロイデスに関する  
341 純度試験を実施する場合、種特異的プライマー対を用いた反応  
342 液のほかに、DNAが正しく抽出されていることを確認するた  
343 め、以下の陽性対照プライマー対を用いた反応液を調製すると  
344 ともに、陰性対照として、調製したDNA試料液を加えないも  
345 のも調製し、同時にPCRを行う必要がある。

346 PCR反応は、以下の条件で行う。95°Cに10分間保ち反応を  
347 開始させた後、95°Cで0.5分間、62°Cで0.5分間、72°Cで0.75  
348 分間を1サイクルとして、45サイクルのPCR増幅、次に終了反  
349 応として72°Cで7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応  
350 液をPCR増幅反応液とする。各プライマーの配列は、下記の  
351 とおりである。なお、陽性対照PCR用3'-プライマーと種特異  
352 的PCR用3'-プライマーは同一のものである。

353 陽性対照PCR用5'-プライマー：5'-GCC TGG GTG TCA  
354 CGC ATC G-3'

355 陽性対照PCR用3'-プライマー：5'-GTA GTC CCG CCT  
356 GAC CTG-3'

357 種特異的PCR用5'-プライマー：5'-CTG AGA AGT TGT  
358 GCC CGG-3'

359 種特異的PCR用3'-プライマー：5'-GTA GTC CCG CCT  
360 GAC CTG-3'

#### 361 4.1.1.3. アガロースゲル電気泳動とPCR産物の検出

362 反応終了後、PCR増幅反応液5 µLを、適当量のゲルローデ  
363 イング緩衝液と混合し、2 w/v%アガロースゲルのウェルに添  
364 加し、1倍TAE緩衝液(参考情報、遺伝子解析による微生物の  
365 迅速同定法参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当な  
366 DNA分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝  
367 液に含まれるプロモフェノールブルー色素がウェルより2 cm  
368 程度進んだところで電気泳動を終了する。

369 泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲ  
370 ルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析  
371 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312  
372 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標  
373 準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。

#### 374 4.2. 結果の判定

375 まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で250 bpのパ  
376 ンドが確認され、DNA試料液を加えないものでは、プライマー

377 ダイマー(約40 bp)を除くバンドが確認されないことを確かめ  
378 る。次に、種特異的プライマー対を加えたもので200 bpのバ  
379 ンドが確認された場合、試料はペウケダヌム・レデボウリエル  
380 ロイデスが混入していると判定され、不合格となる。陽性対照  
381 プライマー対を加えたもので250 bpのバンドが確認され、  
382 DNA試料液を加えないものでバンドが確認されず、種特異的  
383 プライマー対で200 bpのバンドが確認されない場合、試料は  
384 ペウケダヌム・レデボウリエルロイデスの混入がないと判定さ  
385 れ、純度試験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバ  
386 ンドが確認されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考  
387 えられるので、DNAの抽出からやり直すことが求められる。  
388 また、DNA試料液を加えないものでバンドが確認された場合  
389 は、PCR操作に間違いがあったものとして、4.1.1.2.のPCRか  
390 ら実験をやり直すことになる。

#### 391 5. 参考資料

- 392 1) Y. Guo, et al., J. Nat. Med.60, 149-156 (2006).
- 393 2) K. Kondo, et al., J. Jpn. Bot. 84, 356-359 (2009).
- 394 3) 丸山卓郎ら, 生薬学雑誌 64, 96-101 (2010).
- 395 4) T. Maruyama, et al., J. Nat. Med. in press.
- 396 5) (独)農林水産消費安全技術センター, JAS分析試験ハンド  
397 ブック, 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル, 第3版, I  
398 基本操作編, 4.4.1 PCR, 平成24年9月24日.
- 399 6) (独)農林水産消費安全技術センター, JAS分析試験ハンド  
400 ブック, 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル, 第3版,  
401 VIコンタミネーション防止編, 平成24年9月24日.
- 402 7) 平成13年3月, 食発第110号, 一部改正, 平成18年6月, 食  
403 安発第0629002号2.2.1.2.
- 404 8) 平成18年6月, 食安発第0629002号2.1.3.1.1.
- 405