

食安発 0803 第 8 号  
平成 21 年 8 月 3 日

各検査所長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長  
( 公 印 省 略 )

組換えDNA技術応用食品の検査方法について(補足)

標記については、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日付食発第110号厚生労働省医薬局食品保健部長通知)によって通知しているところであるが、今般、トウモロコシの一粒中に複数系統の組換えDNA配列が存在するスタック品種が開発されていることから、別添のとおり、トウモロコシ一粒単位で検査する検知法を開発したので通知する。これらスタック品種が分別生産流通管理を行っている非遺伝子組換えトウモロコシに混入していた場合、従来の検知法では実際の混入率よりも高い数値となることから、従来の検知法により検査した場合において、混入率が5%を超えた場合に活用するようお願いする。

なお、本検査法を活用し、これにより混入率が5%以下である結果が判明した場合、当該トウモロコシは分別生産流通管理が適切に実施されたものとして取扱うこととする。

(別添)

## 粒単位検査法

トウモロコシ穀粒試料から92粒をランダムサンプリングし、以下の検査法の手順に従って、遺伝子組換え穀粒を検知しその粒数を定量する。92粒(試験有効粒数90粒)中に遺伝子組換え穀粒の粒数が3以上9以下の場合は、さらに2回目の92粒の粒単位検査法を行う。次いで1回目の92粒(試験有効粒数90粒)の結果と2回目の92粒(試験有効粒数90粒)の総和184粒(試験有効粒数180粒)中に遺伝子組換え穀粒の粒数を定量し、適切な分別生産流通管理の可否を判定する。

### 1 粒単位の粉砕

トウモロコシ穀粒 500gから92粒をランダムサンプリングし、各粒の表面に付着している他の穀粒由来の破片を洗浄する。ランダムサンプリングした検体試料92粒を、蒸留水で洗浄後、次いで1% SDS水溶液で洗浄除去する。再び蒸留水で洗浄する。SDSを完全に洗い流すために、最後の蒸留水による洗浄は繰り返して行う。40°Cの恒温槽で40分間乾燥させる。各粉砕用チューブ<sup>\*1</sup>に検体試料1粒とメタルコーン<sup>\*1</sup>1個を順に入れ、しっかりふたをして粉砕器専用ラック<sup>\*1</sup>にのせ、粉砕器<sup>\*2</sup>を用いて粉砕(2,500rpm、60秒間)する。均一に粉砕するために専用ラックを反転させて再度粉砕操作を行い、粉砕試料とする。

<sup>\*1</sup> 粉砕用チューブはST-0350F-O(安井器械社製)またはその同等品、メタルコーンはMC-0316(安井器械社製)またはその同等品、粉砕器専用ラックはTR-348FPP(安井器械社製)を用いる。

<sup>\*2</sup> 粉砕器はMULTI-BEADS SHOCKER<sup>®</sup> MB701(安井器械社製)またはその同等品を用いる。

### 2 粒単位の DNA 抽出

DNA 抽出精製は以下のシリカゲル膜タイプキット法 A(QIAGEN DNeasy96 Plant kit)またはシリカゲル膜タイプキット法 B(NIPPON GENE GM quicker 96)に従って、92粒毎の粉砕試料からDNA抽出を行い、得られた各DNA溶液を用いて以降のマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施する。

#### 2.1 シリカゲル膜タイプキット法 A(QIAGEN DNeasy96 Plant kit)

粉砕試料の入った各粉砕用チューブにBuffer AP1 Premix 1mLずつ添加する<sup>\*1</sup> <sup>\*2</sup>。各粉砕用チューブを粉砕器専用ラックに移し、粉砕器にセットする。粉砕器専用ラックを固定するため、カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で粉砕試料とBuffer AP1 Premixを混合する。その後、粉砕用チューブをチューブ用ラック<sup>\*3</sup>に移し、65°Cの恒温層(またはWater Bath等<sup>\*4</sup>)で30分間、保温する。保温中は10分毎にラックごと10回反転させ、混合する<sup>\*5</sup>。

各粉砕用チューブにBuffer AP2 を、170μLずつ添加し<sup>\*6</sup>、フタを閉めた後にチューブ用ラックごと5回反転させ、混合する。チューブ用ラックを-20°Cの冷凍庫で30分間静置する。

各粉砕用チューブを粉砕器専用ラックに移し、遠心機<sup>\*7</sup>にセットする。室温下、2,900rpmで20分間の遠心<sup>\*8</sup>の後、沈殿物の浮遊を防ぐため、慎重に粉砕器専用ラックを取り出す。各粉砕用チューブ内の上清を、マイクロピペットを用いて600μL、事前にラベルしておいた1.5mL容チューブに採取する。上清の入った1.5mL容チューブを更に微量高速冷却遠心機で4°C、10,000xg以上、5分間の条件下で遠心する<sup>\*9</sup> <sup>\*10</sup>。再度その上清400μLを、マイクロピペットを用いて、事前にラベルした2mL容チューブに採取する。

次いで、バキュームポンプ、Vacuum Regulator、QIAvacをホースで連結し、QIAvac内にCollection Microtubesを、QIAvac上にDNeasy 96 Plateをセットする<sup>\*11</sup> <sup>\*12</sup>。

Buffer AP3 600 $\mu$ L<sup>\*13</sup>を、上清の入った2mL容チューブに添加する<sup>\*14</sup>。これをAP3 混合液とする。Vortexで3秒間混合した後、DNeasy 96 Plateの各ウェルにAP3 混合液を、マイクロピペットを用いて1mLずつ添加し<sup>\*15</sup>、シールで密閉する<sup>\*16</sup>。バキュームポンプの電源を入れ、Vacuum Regulatorの弁を閉めて吸引を行う。全てのAP3 混合液がカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け圧力を開放してから、ポンプの電源を切る。Collection Microtubesに溜まった溶出液は廃棄する<sup>\*17</sup>。DNeasy 96 Plateの全ウェルにBuffer AWを800 $\mu$ Lずつ添加する<sup>\*18</sup>。先の操作と同様にシールをして<sup>\*16</sup>吸引を行う。全てのBuffer AWがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Collection Microtubesに溜まった溶出液は廃棄する<sup>\*17</sup>。

DNeasy 96 Plate各ウェルに99.5% エタノール(特級)を800 $\mu$ Lずつ添加する<sup>\*19</sup>。添加後、先の操作と同様にシールをして吸引を行う。全てのエタノールがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Collection Microtubesを取り出し、溶出液ごと廃棄する。新しいCollection Microtubesをセットし、DNeasy 96 Plateは再度シールをして密閉し、30分間吸引してカラムを乾燥させる<sup>\*20</sup>。乾燥後、端からシールをはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。その後、Collection Microtubeは取り除く。

DNA採取用のElution Microtubesを取り付け、DNeasy 96 Plate各ウェルに予め65 $^{\circ}$ Cに保温しておいたDWを75 $\mu$ Lずつ添加し<sup>\*21</sup>、シールして密閉する<sup>\*16</sup>。室温で5分間、静置した後、先の操作と同様に吸引を行う。全てのDWがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Elution Microtubesに溜まった溶出液はそのままにしておき、再度、予め65 $^{\circ}$ Cに保温しておいたDWを75 $\mu$ Lずつ添加し<sup>\*21</sup>、シールして密閉する。室温で5分間、静置した後、吸引を行う。この溶出液(150 $\mu$ L)をDNA試料液<sup>\*22</sup>とする。

\*1 予め65 $^{\circ}$ Cに温めておいたBuffer AP1 1mLに対してRNase A 1 $\mu$ Lを加え、Buffer AP1 Premixを必要量調製する。Buffer AP1 Premixを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容専用チップコンビチッププラスは1回の充てんで10回まで連続分注可能である。

\*2 粉砕チューブは事前に全てのフタを緩めておき、Buffer AP1 Premixを加える直前にフタをあけ、1本添加する度にフタを閉めるとコンタミネーションを極力防止できる。以後の操作も同様に行う。また、フタに粉末試料が付着している場合、フタをあける際に粉末試料が飛散することが考えられる。飛散を防ぐため、ベンチ台で軽くタッピングして試料を落とす。Buffer AP1 Premixを添加する際にも、粉末が飛散するのを防ぐため、慎重にチューブの壁に添加する。この時、チップの先が壁に接触した場合はチップを交換する。

\*3 チューブ用ラックはTR-03(安井器械社製)またはその同等品を用いる。

\*4 Water Bathを用いる場合、紙ラックごとチャックつきのビニール袋に入れて密閉し、水の混入やラベル消失を防ぐ。

\*5 粉末試料がチューブの底に溜まらないようになるまで混合する。

\*6 Buffer AP2 を添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(1mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。1mL容コンビチッププラスは2回の充てんで5回まで連続分注可能である。

\*7 遠心機はMETALFUGE<sup>®</sup> MBG101(安井器械社製)またはその同等品を用いる。

- \*<sup>8</sup> 遠心中に、番号(No.1～No.92)をラベルした1.5mL容チューブ及び2mL容チューブを用意しておく。
- \*<sup>9</sup> 上清を採取する際は、沈殿物や上層の膜状の物ができている場合もあるので、それらを取らないように慎重に行う。
- \*<sup>10</sup> 回転数は14,000xgを推奨。
- \*<sup>11</sup> バキュームポンプはDA-60D(実効排気速度:60L/分、到達圧力:3.3kPa)(ULVAC社製)またはその同等品を用い、Vacuum Regulatorは(キアゲン社製)またはその同等品を用いる。
- \*<sup>12</sup> DNeasy 96 PlateはA1のウェルが左上にくるようにセットする。DNeasy 96 Plateの排出口とCollection Microtubesの注入口がしっかりと連結するよう、Collection MicrotubeとQIAvacの間に専用の板等を挟み底上げする。また、QIAvac内が密閉できないと溶出が正確に行われないため、隙間ができていないか確認しておく。
- \*<sup>13</sup> 採取できた上清が400 $\mu$ Lに満たない場合は、実際に採取した上清量に対して1.5倍量のBuffer AP3を添加する。
- \*<sup>14</sup> Buffer AP3を添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで16回まで連続分注可能である。
- \*<sup>15</sup> 添加する際、DNeasy 96 PlateはQIAvac上にセットされた状態で行う。またA1ウェルにNo.1 AP3 混合液を添加し、A2にNo.2、A3にNo.3となるよう左上から右下に向かって順にAP3 混合液を添加する。
- \*<sup>16</sup> シールで各ウェルが密閉されていない場合、コンタミネーションや低収量の原因となるため、しっかりと密閉できていることを確認する。
- \*<sup>17</sup> チューブをビニールテープで束ねておく、または指で固定しながら廃棄するとチューブの離脱を防げる。溶出液を廃棄する際は、Collection Microtubesごとデカンテーションで廃棄する。この際、廃液がCollection Microtubesに付着するが、キムワイプ等でふき取る。
- \*<sup>18</sup> Buffer AWを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで12回まで連続分注可能である。
- \*<sup>19</sup> エタノールを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10ml容コンビチッププラスは1回の充てんで12回まで連続分注できる。
- \*<sup>20</sup> エタノールの残存は、後に行う 3.1 のマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法への反応阻害が考えられる。その阻害を防ぐため、乾燥操作前にDNeasy 96 Plateの排出口をキムワイプに押さえつけてよく拭き取る。十分に乾燥を行うことが望ましい。
- \*<sup>21</sup> DWを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(2.5mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。2.5mL容コンビチッププラスは1回の充てんで33回まで連続分注できる。
- \*<sup>22</sup> DNA試料液は、各チューブにCollection Microtube capsを取りつけ、3.1 のマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知試験に使用するまで4 $^{\circ}$ Cで保存する。

## 2.2 シリカゲル膜タイプキット法 B (NIPPON GENE GM quicker 96)

粉碎試料の入った各粉碎用チューブにGE1 Buffer Premix 1.5mLずつ添加する<sup>\*1</sup> <sup>\*2</sup>。各粉碎用チューブを粉碎器専用ラックに移し、粉碎器にセットする。粉碎器専用ラックを固定するため、カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で粉碎試料とGE1 Buffer Premixを混合する。その後、粉碎用チューブをチューブ用ラック<sup>\*3</sup>に移し、室温で10分間、静置する。

各粉碎用チューブにGE2-K Bufferを、180μLずつ添加し<sup>\*4</sup>、フタを閉めた後に粉碎器専用ラックに移し、粉碎器にセットする。カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で混合する。

各粉碎用チューブを粉碎器専用ラックごと遠心機<sup>\*5</sup>にセットする。室温下、2,900rpmで10分間の遠心の後、沈殿物の浮遊を防ぐため、慎重に粉碎器専用ラックを取り出す。各粉碎用チューブ内の上清を、マイクロピペットを用いて400μL、96穴プレートに採取する<sup>\*6</sup>。GB3 Buffer/Isopropanol 250μLを、上清の入った96穴プレートに添加する<sup>\*7</sup>。これをGB3混合液とする。ピペッティングで混合した後、コレクションプレートを取り付けたカラムプレートの各ウェルにGB3混合液を、マイクロピペットを用いて650μL(全量)ずつ添加し、室温下、2,900rpmで20分間の遠心を行う。コレクションプレートに溜まった溶出液は廃棄する<sup>\*8</sup>。カラムプレートの全ウェルにGW Bufferを650μLずつ添加する<sup>\*9</sup>。先の操作と同様に室温下、2,900rpmで10分間の遠心を行う。コレクションプレートに溜まった溶出液を廃棄後、再度、室温下、2,900rpmで20分間の遠心を行い、カラムを乾燥させる<sup>\*10</sup>。乾燥後、DNA採取用のコレクションプレートを取り付け、カラムプレートの各ウェルにDWを50μLずつ添加し<sup>\*11</sup>、室温で3分間、静置した後、室温下、2,900rpmで10分間の遠心を行う。この溶出液をDNA試料液<sup>\*12</sup>とする。

<sup>\*1</sup> GE1 Buffer 1.5mLに対してRNase A 5μLを加え、GE1 Buffer Premixを必要量調製する。GE1 Buffer Premixを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容専用チップコンビチッププラスは1回の充てんで6回まで連続分注可能である。

<sup>\*2</sup> 粉碎チューブは事前に全てのフタを緩めておき、GE1 Buffer Premixを加える直前にフタをあけ、1本添加する度にフタを閉めるとコンタミネーションを極力防止できる。以後の操作も同様に行う。また、フタに粉末試料が付着している場合、フタをあける際に粉末試料が飛散することが考えられる。飛散を防ぐため、ベンチ台で軽くタッピングして試料を落とす。GE1 Buffer Premixを添加する際にも、粉末が飛散するのを防ぐため、慎重にチューブの壁に添加する。この時、チップの先が壁に接触した場合はチップを交換する。

<sup>\*3</sup> チューブ用ラックはTR-03(安井器械社製)またはその同等品を用いる。

<sup>\*4</sup> GE2-K Bufferを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(1mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。1mL容コンビチッププラスは1回の充てんで5回まで連続分注可能である。

<sup>\*5</sup> 遠心機はMETALFUGE® MBG101(安井器械社製)またはその同等品を用いる。

<sup>\*6</sup> 96穴プレートは、各穴容量1mL以上の製品を用いる。上清を採取する際は、沈殿物や上層の膜状の物ができている場合もあるので、それらを取らないように慎重に行う。

<sup>\*7</sup> GB3 Buffer/IsopropanolはGB3 Buffer 125μLに対してIsopropanol 125μLを加え、必要量調製する。GB3 Buffer/Isopropanolを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充て

んで40回まで連続分注可能である。

\*<sup>8</sup> 溶出液を廃棄する際は、コレクションプレートごとデカンテーションで廃棄する。この際、廃液がコレクションプレートに付着するが、キムワイプ等でふき取る。

\*<sup>9</sup> GW Bufferを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(10mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで15回まで連続分注可能である。

\*<sup>10</sup> エタノールの残存は、後に行うマルチプレックスリアルタイム PCR を用いた粒単位の定性検知法への反応阻害が考えられるため、十分に乾燥を行うことが望ましい。

\*<sup>11</sup> DWを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ(2.5mL容)を装着した連続分注機(マルチペットプラスまたはその同等品)を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。2.5mL容コンビチッププラスは1回の充てんで50回まで連続分注可能である。

\*<sup>12</sup> DNA試料は、各チューブにコレクションプレートキャップを取りつけ、マルチプレックスリアルタイム PCRを用いた粒単位の定性検知試験に使用するまで4℃で保存する。

### 3 マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法(ABI PRISM™ 7900、ABI PRISM™ 7500)

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日付食発第110号厚生労働省医薬局食品保健部長通知)トウモロコシの定量PCR法(3.2.1)と同様に、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、スターチンターゼ IIb(SSIIb) 遺伝子を用いる。なお本試験では同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 と蛍光色素として VIC を標識したプローブ SSIIb-TaqV を用いる。遺伝子組換えトウモロコシ粒を検知するために Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter(CaM) 配列のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Taq、及び GA21 に特異的なプライマー対 GA21-3 とプローブ GA21-Taq を用いる。

各粒由来 DNA 試料液につき1ウェル(92試料、92ウェル)、また PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものを2ウェル分、粒単位検査法用標準プラスミド DNA 溶液として2ウェル分、の合計96ウェルで分析を行う。

#### 3.1 PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は25μL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix \*<sup>1</sup> 12.5μL、対象プライマー対としてSSIIb-3 (25μmol/L) 0.5μL \*<sup>2</sup>、GA21-3 (25μmol/L) 0.25μL \*<sup>2</sup>、P35S-1 (25μmol/L) 0.25μL \*<sup>2</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10μmol/L) 0.5μL \*<sup>3</sup>、GA21-Taq (10μmol/L) 0.25μL \*<sup>3</sup>、P35S-Taq (10μmol/L) 0.25μL \*<sup>3</sup>、を混合し、水で全量22.5μLに調製後、粒由来各DNA試料液2.5μLを添加する。分注操作終了後、真上からシール\*<sup>4</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく\*<sup>5</sup>。

\*<sup>1</sup> Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

\*<sup>2</sup> 対象プライマー対としてSSIIb-3、GA21-3、P35S-1 を用いる。

\*<sup>3</sup> 対象プローブとして、蛍光色素としてVICを標識しているSSIIb-TaqV、蛍光色素としてFAMを標識しているGA21-Taq、P35S-Taqを用いる。

SSIIb-TaqV は以下の通りである。(プローブは水で溶解する。)

5'-VIC-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-TAMRA-3'

\*<sup>4</sup> 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーションター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

\*<sup>5</sup> ABI PRISM™ 7900 の場合は、プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems) を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

### 3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及び、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「UNKN」:DNA試料液)の設定を行う。またプローブ特性に関しては、SSIIb-TaqVは、Reporterが「VIC」、Quencherが「TAMRA」、P35S-Taq及びGA21-TaqはReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」、となるように設定する\*。なお、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

\* 蛍光色素のDetectorを登録する際に、「SSIIb」は「VIC」、「GA21&P35S」は「FAM」に設定する。

### 3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 30秒間、59℃ 1分30秒間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。なお反応条件の設定において9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

### 3.4 遺伝子組換えトウモロコシ粒の解析

各粒由来 DNA 試料液のいずれについても、結果の判定は、Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線の確認および multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度(FAM)の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。第一に目視で Amplification plot 上で15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線が確認された DNA 試料液を遺伝子組換え穀粒(由来)と判定する。一方、15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線が確認されない DNA 試料液を非遺伝子組換え穀粒(由来)と判定する。

なお上記判定により遺伝子組換え穀粒と判定された結果について multicomponent を解析し、目視でFAMの顕著な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、各DNA試料液のSSIIbのAmplification plot 上で15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線が確認されない場合には、当該DNA試料液に対してマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法以降の操作を行い、それでも同様の結果の場合には、そのDNA試料液での結果を無効とする。SSIIbの増幅曲線が確認されるDNA試料液における試験は有効と判断され、92粒のDNA試料液中で90粒のDNA試料液以上におけるSSIIbの増幅曲線が確認される場

合は、本試験は成立する。その後、SSIIbの増幅曲線が確認されたDNA試料液の結果から遺伝子組換え穀粒と非遺伝子組換え穀粒の数を測定する。89粒のDNA試料液以下におけるSSIIbの増幅曲線が確認された場合は、本試験は不成立として、改めて92粒のランダムサンプリングを行い、1.の粒単位粉砕から試験を実施する。

なおマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法では、ABI PRISM™ 7900及びABI PRISM™ 7500以外のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7000、LightCycler™ 480等が適用可能であると考えられる。使用するリアルタイムPCR機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、粒単位検査法用標準プラスミドDNA溶液を用いて事前にPCR用反応液の調製法、PCR条件、解析方法を最適化する必要がある。

#### 4 結果の判定

3.4で得られた結果において、92粒(試験有効粒数90粒)中に遺伝子組換え穀粒の粒数が2以下であれば、適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。遺伝子組換え穀粒の粒数が3以上9以下の場合は、さらに2回目の92粒の粒単位検査法を行う。次いで1回目の92粒の結果(試験有効粒数90粒)と2回目の92粒(試験有効粒数90粒)の総和184粒(試験有効粒数180粒)中に遺伝子組換え穀粒の粒数が9以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。1回目の92粒の結果(試験有効粒数90粒)で遺伝子組換え穀粒の粒数が10以上の試料、あるいは1回目の92粒の結果(試験有効粒数90粒)と2回目の92粒(試験有効粒数90粒)の総和184粒(試験有効粒数180粒)中に遺伝子組換え穀粒の粒数が10以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

なお参考検査法として遺伝子組換えトウモロコシ系統判別マルチプレックス定性PCRの検査を別添2に示す。

(別添2) 参考検査法: 遺伝子組換えトウモロコシ系統判別マルチプレックス定性 PCR の検査  
マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法において遺伝子組換え穀粒と  
判定したDNA試料液について、PCR増幅及び結果の判定を除き、「組換えDNA技術応用食品の  
検査方法について」(平成13年3月27日付食発第110号厚生労働省医薬局食品保健部長通  
知)2.1.1.2.1と同様の方法で定性PCRを行い、系統を判別する。

#### PCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR緩衝液\*<sup>1</sup>、0.2mmol/L  
dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、プライマー対混合液\*<sup>2</sup>並びに1.25units Taq DNAポリメ  
ラーゼ\*<sup>3</sup>を含む液に、粒単位検査法の2粒単位のDNA抽出で調製したDNA試料液2.5μL(25ng)  
\*<sup>4</sup>を氷中で加え、全量を25μLにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置\*<sup>5</sup>にセットする。反  
応条件は次の通りである。95℃に10分間保ち反応を開始させた後、95℃ 30秒間、65℃ 60秒  
間、72℃ 60秒間を1サイクルとして、10サイクルのPCR増幅を行う。続けて95℃ 30秒間、60℃  
60秒間、72℃ 60秒間を1サイクルとして、27サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として7  
2℃ で7分間保った後、4℃で保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCRのブランク  
反応液として、必ずプライマー対混合液を加えないもの及びDNA試料液を加えないものについ  
ても同時に調製する。

#### \*<sup>1</sup> PCR緩衝液

PCR buffer II(ライフテクノロジーズジャパン社製、塩化マグネシウムを含まないもの)又は同等  
の結果が得られるものを用いる。

\*<sup>2</sup> プライマー対混合液の各プライマー対最終濃度および塩基配列は以下の通りである。

#### NK603

F-primer(M810 1-5'): 0.2μmol/L: 5'-GAG TTT CCT TTT TGT TGC TCT C-3'

R-primer(NK603 1-3'): 0.2μmol/L: 5'-GCT GCT TGC ACC GTG AAG -3'

#### Event176

F-primer(Event176 1-5'): 0.05μmol/L: 5'-GTA GCA GAC ACC CCT CTC CAC A-3'

R-primer(cryIA 1-3'): 0.2μmol/L: 5'-TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

#### T25

F-primer(T25 2-5'): 0.1μmol/L: 5'-GGC ATG ATG TTG GTT TTT GGC AAA G-3'

R-primer(T25 2-3'): 0.1μmol/L: 5'-AAT TCG AGC TCG GTA CCC CT-3'

#### GA21

F-primer(GA21 1-5'): 0.1μmol/L: 5'-ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG-3'

R-primer(GA21 1-3'): 0.1μmol/L: 5'-TCT CCT TGA TGG GCT GCA-3'

#### MON863

F-primer(M863 1-5'): 0.2μmol/L: 5'-GAT GAC CTG ACC TAC CAG A-3'

R-primer(M863 1-3'): 0.2μmol/L: 5'-GCA CAC ACA TCA ACC AAA TT-3'

#### MON810

F-primer(M810 1-5'): 0.2μmol/L: 5'-GAG TTT CCT TTT TGT TGC TCT C-3'

R-primer(cryIA 1-3'): 0.2μmol/L: 5'-TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

#### ssIIb

F-primer(ssIIb 1-5'): 0.045μmol/L: 5'-CTC CCA ATC CTT TGA CAT CTG C-3'

R-primer(ssIIb 1-3'): 0.045μmol/L: 5'-TCG ATT TCT CTC TTG GTG ACA GG-3'

TC1507

F-primer(TC1507 1-5'):0. 1 $\mu$ mol/L:5'-TTG ACA GGT TTG AGT TGA TTC CAG-3'

R-primer(TC1507 1-3'):0. 1 $\mu$ mol/L:5'-CCA AGA ACT CAT GTT AGT CGC AA-3'

Bt11

F-primer(Bt11 1-5'):0. 2 $\mu$ mol/L:5'- CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C-3'

R-primer(cryIA 1-3'):0. 2 $\mu$ mol/L:5'- TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

\*<sup>3</sup> Taq DNAポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ(ライフテクノロジーズジャパン社製)又は同等の結果が得られるものを用いる。

\*<sup>4</sup> DNA試料液の濃度は10ng/mLに調製して使用する。

\*<sup>5</sup> PCR増幅装置

GeneAmp PCR System 9700(ライフテクノロジーズジャパン社製)又は同等の結果が得られるものを用いる。

### 系統判別

ブランク反応液を除く全てのレーンでSSIIb(151bp)のPCR増幅バンドが検出されていることを確認する。次にDNA分子量標準を基に、SSIIb以外の検出されたPCR増幅バンドの予定長を概算する。検出されたPCR増幅バンドの遺伝子組換えトウモロコシ系統を判別する\*。ブランク反応液を除く全てのレーンでSSIIbの増幅バンドが検出されなかった場合は、電気泳動以降の操作をやり直す。再度、同様の結果が得られた場合は、改めてPCR増幅以降の操作を実施して判別を行う。

\* 各遺伝子組換えトウモロコシ系統のPCR増幅バンドの予定長

Targetted GM	Name	Amplicon (bp)
NK603	M810 1-5'	444
	NK603 1-3'	
Event176	Event176 1-5'	343
	cryIA 1-3'	
T25	T25 2-5'	311
	T25 2-3'	
GA21	GA21 1-5'	270
	GA21 1-3'	
MON863	M863 1-5'	234
	M863 1-3'	
MON810	M810 1-5'	199
	cryIA 1-3'	
ssIIb	ssIIb 1-5'	151
	ssIIb 1-3'	
TC1507	TC1507 1-5'	131
	TC1507 1-3'	
Bt11	Bt11 1-5'	110
	cryIA 1-3'	

(参考)

- (1) 粒単位検査法記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対、対象プローブ (SSIIb-TaqV 以外) および粒単位検査法用標準プラスミド DNA 溶液は、ニッポンジーン(〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック(〒243-0041 厚木市緑ヶ丘 5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738)から購入可能である。
- (2) 3 記載のマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法記載の PCR 用反応液の調製に用いられる蛍光色素として VIC を標識したプローブ SSIIb-TaqV は、ライフテクノロジーズジャパン(〒104-0032 東京都中央区八丁堀 4-5-4 ダヴィンチビル Tel. 0120-477-392 Fax. 03-5566-6538)に合成依頼して購入可能である。