

食安監発第 0509002 号

平成 17 年 5 月 9 日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長

(公印省略)

遺伝子組換えトウモロコシ Bt10 の暫定検査法について

米国における安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ種子の流通事例の情報を
受け、その暫定検査法を策定しましたので、検査に当たっては、「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 日付け食発第 110 号)によるほか、
別添の検査法により実施してください。

なお、本検査法は現在バリデーション作業中であり、バリデーション作業が終了
次第、改めて通知する予定であることを申し添えます。

(別 添)

Bt10 トウモロコシの検査方法

1. Bt10 トウモロコシの検査

トウモロコシ穀粒、あるいはコーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等の粉砕加工品(トウモロコシ半製品)について、定性PCR法で行う。なお、検体採取は、「組換えDNA技術応用食品の検査方法」(平成13年3月27日付け食発第110号別添、以下「通知法」という。)1.に示す方法に従うこととし、採取した検体のうち、500gを粉砕器等を用いて均質に粉砕する。また、DNA抽出精製は、通知法 2.2.1.2.に示すシリカゲル膜タイプキット法を用い、アガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析等の試験操作は、通知法 2.1.1.2.1.2.から 2.1.1.2.1.3.に示す操作と同様の方法で行う。

2. 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^{*1}、0.16 mmol/L dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 μ mol/L 5'及び3'プライマー^{*2}並びに0.8 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*3}を含む液に、10ng/ μ Lに調製したDNA 試料液5.0 μ L(DNAとして50ng)を氷中で加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR 増幅装置^{*4}にセットする。反応条件は次の通りである。94 $^{\circ}$ Cに10分間保ち反応を開始させた後、94 $^{\circ}$ C 25秒間、62 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 45秒間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72 $^{\circ}$ Cで7分間保った後、4 $^{\circ}$ Cで保存し、得られた反応液をPCR 増幅反応液とする。PCR 反応のブランク反応液として、必ずプライマー対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。また、試料からDNAが抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、Bt10 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対^{*5}を用い、同様にPCR増幅を行う。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II(アプライドバイオシステムズ社製、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。

*2 Bt10 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(JSF3):5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG G-3'

R-primer(JSR3):5'-GGG AAT AAG GGC GAC ACG G-3'

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社製)又は同等の結果が得られ

るものを用いる。

*4 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 7900 (アプライドバイオシステムズ社製) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*5 陽性対照用のプライマー対は以下の通りである。

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

3. 結果の判定

陽性対照プライマー対を用いたレーンで157bp の PCR 増幅バンドが検出され、Bt10 検出用プライマー対を用いたレーンで130bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 反応液を調製し、Bt10 確認用プライマー対*1 を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、127bp の増幅バンドが検出された場合、本検体は Bt10 系統陽性と判定する*2。なお、2つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において、陽性対照プライマー対で予定長の増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2つの DNA 抽出液とも陽性対照プライマー対を用いたレーンで対応する増幅バンドが検出できない場合には、改めて3回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。3回目の DNA 抽出液を用いた場合でも対照プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出1	対照プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出2	対照プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号9の例の場合には、3回目の抽出を行う。

+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

*¹ Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(Bt11 3-5') : 5'-AAA AGA CCA CAA CAA GCC GC-3'

R-primer(Bt11 3-3') : 5'-CAA TGC GTT CTC CAC CAA GTA CT-3'

*² Bt10 確認用プライマー対を用いて増幅する DNA 配列は、既に安全性審査を終了している Bt11 トウモロコシにも導入されている。本試験法は、Bt10 検出のための反応組成及び反応条件を示しているが、Bt11 が混入している場合にも確認試験の結果は陽性となる可能性が考えられるため、必ず Bt10 検出用プライマー対を用いた結果と併せて結果の判定を行うこと。