

食安発第0618001号  
平成20年6月18日

各 検疫所長 殿

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(一部改正)

組換えDNA技術応用食品の検査方法については、平成13年3月27日付け食発第110号厚生労働省医薬局食品保健部長通知(平成18年6月29日付け食安発第0629002号により一部改正)によって通知しているところであるが、今般、新たに安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査法の評価が終了したことにより、当該通知を下記のとおり改正することとしたので、検査を行う場合には、これらの方法により実施されたい。

なお、改正後の同通知別添「組換えDNA技術応用食品の検査方法」全文を参考までに添付する。

記

「2.1.3.1.2. 結果の判定」の項目の次に、別紙に示す「2.1.4. トウモロコシ(DAS59132)の検査」の項を加える。

(別紙)

#### 2.1.4. トウモロコシ(DAS59132)の検査

トウモロコシ穀粒について、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用)(2.2.1.2.)に従って、一試料につき2回並行で抽出を行い、得られたDNA 溶液を用いて以下のリアルタイムPCR を用いた定性PCR法を実施する。

##### 2.1.4.1. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは、トウモロコシ(3.2.)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、スターチシンターゼ IIb(SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を用いる。

##### 2.1.4.1.1. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法(ABI PRISM™ 7900)

###### 2.1.4.1.1.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は 25  $\mu\text{L}/\text{well}$ 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> 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液(各プライマー、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ <sup>\*2</sup>、対象プローブ溶液(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ <sup>\*3</sup>を混合し、水で全量 20  $\mu\text{L}$ に調製後、10 ng/ $\mu\text{L}$  DNA試料液 5.0  $\mu\text{L}$  (50 ng)を添加する。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についても同時に調製する。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ャーを用いて行う。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。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad<sup>\*5</sup>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。試験は、1DNA試料液当たり2ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は2ウェル分を同時に調製する。

\*1 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。

\*2 対象プライマー対

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25  $\mu\text{mol/L}$ ) を用いる場合には 0.5  $\mu\text{L}$  を加えること。

\*<sup>3</sup> 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-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 社) 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 Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。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。

#### 2.1.4.1.1.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### 2.1.4.1.1.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C 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°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、40 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。

#### 2.1.4.1.2. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7500)

##### 2.1.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は 25  $\mu\text{L/well}$  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> 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$  \*<sup>2</sup>、対象プローブ溶液 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$  \*<sup>3</sup> を混合し、水で全量 20  $\mu\text{L}$

に調製後、10 ng/μL DNA試料液 5.0 μL (50 ng)を添加する。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についても同時に調製する。分注操作終了後、真上からシール\*4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ーターを用いて行う。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。試験は、1DNA試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

\*1 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。

\*2 対象プライマー対

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25 μmol/L)を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

\*3 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

\*4 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 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。

#### 2.1.4.1.2.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### 2.1.4.1.2.3. PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取込みを開始する。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℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なおランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。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。

#### 2.1.4.1.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7700)

##### 2.1.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は 25  $\mu\text{L}/\text{well}$ 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> 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液(各プライマー、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$  \*<sup>2</sup>、対象プローブ溶液(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$  \*<sup>3</sup>を混合し、水で全量 20  $\mu\text{L}$ に調製後、10 ng/ $\mu\text{L}$  DNA試料液 5.0  $\mu\text{L}$  (50 ng)を添加する。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についても同時に調製する。分注操作終了後、真上からキャップシ \*<sup>4</sup>、完全にウェルを密閉する。このとき、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。試験は、1DNA試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

##### \*<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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5' -CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5' -GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )を用いる場合には 0.5  $\mu\text{L}$ を加えること。

##### \*<sup>3</sup> 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5' -FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

##### \*<sup>3</sup> 96 ウェルプレートおよびプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps、8caps/strips (Flat) (Applied Biosystems 社)を使用する。

#### 2.1.4.1.3.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### 2.1.4.1.3.3. 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℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。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。

#### 2.1.4.1.4 結果の解析と判定

トウモロコシ陽性対照用試験及びDAS59132 検出用試験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とCt 値の確認及び 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 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合に陽性を疑う。次いでベースライン(3 サイクルから 15 サイクル)の  $\Delta R_n$  のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh. Lineを選択する\*。そのTh. LineからCt値が得られるか否かを解析する。その後トウモロコシ陽性対照用試験及びDAS59132 検出用試験の両方において、38 未満のCt値が得られた場合に陽性と判定し、38 未満のCt値が得られない場合は陰性と判定する。なお、上記判定により陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、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、どちらか一方の抽出液において、トウモロコシ陽性対照用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法以降の操作を行い、それでも 38 未満の Ct 値が得られない場合には、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 抽出液ともにトウモロコシ陽性対照用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、改めて 3 回目の DNA 抽出精製を行い、さらにリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法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トウモロコシ陽性対照用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は

不能とする。

\* 個々の機種の状態によってAmplification plot上の $\Delta Rn$ が変動することから、普遍的なTh. Lineの設定の数値を示すことが困難である。従ってAmplification plot上でベースライン(3サイクルから15サイクル)の $\Delta Rn$ のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh. Lineを選択する。参考として、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7900 及びABI PRISM™ 7500 のいずれにおいても0.2-0.5の範囲であると考えられる。

(別添)

## 組換えDNA技術応用食品の検査方法

### 1. 検体採取方法

#### 1.1. 組換えDNA技術応用食品の検体採取

##### 1.1.1. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取

組換えDNA技術応用食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な一定量\*を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

\* 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品のうち、該当するトウモロコシ系統の検査を目的とした定性PCR用試料又は安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品を対象とした定量検査用試料として用いるには、500g必要である。

##### 1.1.1.1. 袋積みの場合

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(kg)	検体数
≦ 15	2	1	1
16 ~ 25	3	1	1
26 ~ 90	5	1	1
91 ~ 150	8	1	1
151 ~ 280	13	1	1
281 ~ 500	20	1	1
501 ~ 1,200	32	1	1
1,201 ~ 3,200	50	1	1
3,201 ~ 10,000	80	1	1
10,001 ~ 35,000	125	1	1
35,001 ~ 150,000	200	1	1
150,001 ~ 500,000	315	1	1
≧ 500,001	500	1	1

##### 1.1.1.2. ばら積みの場合

###### 1.1.1.2.1. サイロ搬入時

サイロに搬入する際に1サイロを1ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15回、計10kg以上を検体採取したものを縮分してサイロ毎に検体(1kg以上)とする。

既にサイロに搬入したものについては、他のサイロに移動させる時点で同様に検体採取を行う。

#### 1.1.1.2.2. はしけ搬入時

はしけ(内航船を含む。)に搬入する際に1はしけを1ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15回計10kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1検体(1kg以上)とする。

#### 1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取

すでにはしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1はしけを1ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各5カ所、計15カ所から、計10kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1検体(1kg以上)とする。

#### 1.1.2. パパイアの検体採取

パパイアの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(個)
$\leq 50$	2	2
51 ~ 500	3	3
501 ~ 35,000	5	5
$\geq 35,001$	8	8

#### 1.2. 加工食品の検体採取

加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

##### 1.2.1. トウモロコシ及び大豆の粉砕加工品(コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、穀粒を粉砕したもの)

検体採取については、1.1.1.1.の袋積みの場合に従う。なお、安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品のうち、該当するトウモロコシ系統の検査を目的とした定性 PCR 用試料には、採取した検体のうち、500gを均質に粉砕した試料を用いる。

##### 1.2.2. それ以外の加工食品

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(g)	検体数
$\leq 15$	2	120	1
16 ~ 50	3	120	1
51 ~ 150	5	120	1
151 ~ 500	8	120	1
501 ~ 3,200	13	120	1
3,201 ~ 35,000	20	120	1
35,001 ~ 500,000	32	120	1
$\geq 500,001$	50	120	1

#### 2. 安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法

## 2.1. 検査方法

### 2.1.1. トウモロコシ(CBH351)の検査

トウモロコシの穀粒については、ラテラルフロー法で行う。また、コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、遺伝子組換えにより新たに発現されるタンパク質が物理化学的な変化を受けていない粉碎加工品(以下、「トウモロコシ半製品」という。)についても、ラテラルフロー法で行う。

その他のトウモロコシ加工品については定性 PCR 法で行う。

なお、トウモロコシ半製品については、ラテラルフロー法で行った後、定性 PCR 法による確認試験を行う。

#### 2.1.1.1. トウモロコシ穀粒からの CBH351 トウモロコシの検知

##### 2.1.1.1.1. ラテラルフロー法

市販の Test Kit は、Strategic Diagnostics 社(SDI)製 Trait・Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012) を用いる方法である。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。なお、実験室で実験を行う場合には、水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を用いることを推奨する。

##### 2.1.1.1.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ穀粒から無作為に800粒を採取し粉碎した後、粉碎物\*を500mL 容程度の口の広い蓋付きの容器に採り、水288mL を加えた後、10-20秒間、試料が全て濡れるまでよく振とうする。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、少量の水を加え、試料をよく振とうし、振とう後上澄み液が生じたかどうか観察する。振とう後、数 mL 程度の上澄み液が生じるまで水を加える。次に、試料の上澄み液0.5mL をキット付属の1.5mL 容試料管に移し、その試料管に Trait・Bt9 テストストリップを垂直に立てる。

\* 通常230g を量り採り粉碎したもの(230g で800粒に満たないときは800粒の粉碎物)。

##### 2.1.1.1.1.2. 結果の判定

テストストリップを試料管に立て、5分経過した時点\*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に2本現れれば陽性、コントロールラインだけが現れれば陰性と判定する。また、1本も現れなければ、その試験は無効と判定する。

\* 5分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので注意が必要。

#### 2.1.1.2. トウモロコシ加工品からの CBH351 トウモロコシの検知

加工食品からの DNA の抽出精製法(2.2.3.)に従って、一試料につき2回並行で抽出を行い、得られた DNA 溶液を用い、以下の条件で定性 PCR を行う。

##### 2.1.1.2.1. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動により分離した後に、その増幅産物を検知する方法である。

\* PCR 法では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅産物が検知されうる。したがって、目的外の DNA (特に PCR 増幅産物)の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーション

ンしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17MΩ/cm まで精製した超純水など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

\* また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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 コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

#### 2.1.1.2.1.1. 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>、0.20mmol/L dNTP、3mmol/L 塩化マグネシウム、0.2μmol/L 5' 及び 3' プライマー<sup>\*2</sup> 並びに 0.625units Taq DNA ポリメラーゼ<sup>\*3</sup> を含む液に、10ng/μL に調製した DNA 試料液 2.5μL (DNA として 25ng) を水中に加え、全量を 25μL にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置<sup>\*4</sup> にセットする。反応条件は次の通りである。95°C に 10 分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5 分間、60°C 0.5 分間、72°C 0.5 分間を 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°C で 7 分間保った後、4°C 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、CBH351 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<sup>\*5</sup> 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 CBH351 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (CaM03-5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3') : 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-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 9700 (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'

#### 2.1.1.2.1.2. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

##### 2.1.1.2.1.2.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液<sup>\*1</sup> を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に 100mL 当たり 5μL のエチジウムブロミド溶液<sup>\*2</sup> (10mg/mL) を加え、ゲルを 50°C 前後まで冷やした後ゲルメーカーに流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する<sup>\*3</sup>。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長

さに応じて決める必要があるので、目的とする PCR 増幅産物のバンド長にあわせてゲル濃度(1.0~4.0%)を決める。

#### \*<sup>1</sup> TAE 緩衝液

各最終濃度が40mmol/L Tris-酢酸、1mmol/L EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

#### \*<sup>2</sup> エチジウムブロミド溶液

2本鎖DNAの鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

#### \*<sup>3</sup> 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.1.1.2.1.2.3.に従って、ゲルを後染色しても良い。

### 2.1.1.2.1.2.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液7.5 $\mu$ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの1/2から2/3まで進んだところで電気泳動を終了する。

### 2.1.1.2.1.2.3. ゲルの染色(後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液100mL 当たり、5 $\mu$ L のエチジウムブロミド溶液(10mg/mL)を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら30分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。

### 2.1.1.2.1.3. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ\*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線(312nm)を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的の PCR 増幅バンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

\* ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

### 2.1.1.2.1.4. 結果の判定

陽性対照用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、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで170bp 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 用反応液を調製し、確認用プライマー対\*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、171bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は CBH351 陽性と判定する。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用プライマー対で予定長の PCR 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 PCR 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用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 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陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用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	陽性対照用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出2	陽性対照用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	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。

\* CBH351 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Cry9C-5'): 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3'): 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

#### 2.1.1.3. トウモロコシ半製品(コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等)からの CBH351 トウモロコシの検知

試料について粉砕せず、そのまま230g採る他は 2.1.1.1.1.ラテラルフロー法に従って行う。ラテラルフロー法により陽性の結果が得られた検体については、1.2.1.並びに2.2.1.に従い2回並行で DNA を抽出し、DNA 試料液を用いて更に 2.1.1.2.1.の定性 PCR を実施し、どちらかの抽出液由来の PCR 増幅反応液において、陽性対照用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、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで170bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、陽性と判定する。

#### 2.1.2. パパイヤ(55-1)の検知

##### 2.1.2.1. 定性 PCR 法

生食用パパイヤ及び加工食品については、検出用として207bp の PCR 増幅バンドが検出される 55-1 検出用プライマー対(NosC-5', CaMVN-3')及び陽性対照用として211bp の PCR 増幅バンドが検出される Papain プライマー対(papain-5', papain-3')を用いること。なお、250bp の PCR 増幅バンドが検出される 55-1 確認用プライマー対(CaM 3-5', GUS n-3')が異なる他は 2.1.1.2.1.と同様の方法で定性 PCR を行う。

##### 55-1 検出用プライマー対

F-primer(NosC-5'): 5'-TTA CGG CGA GTT CTG TTA GG-3'

R-primer(CaMVN-3'): 5'-CAT GTG CCT GAG AAA TAG GC-3'

##### 陽性対照用(Papain 遺伝子検出用)プライマー対

F-primer (papain-5') : 5'-GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA-3'  
R-primer (papain-3') : 5'-CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC-3'

#### 55-1 確認用プライマー対

F-primer (CaM -5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'  
R-primer (GUS n-3') : 5'-TCG TTA AAA CTG CCT GGC AC-3'

#### 2.1.2.2. GUS 試験法

遺伝子組換え体作出の際、組換えの指標とするため  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子を目的とする外来遺伝子に加えて導入する場合がある。この手法を用いて作出された遺伝子組換え体は、外来遺伝子に加えGUS遺伝子も同時に発現するため、GUS活性を検出することにより遺伝子組換え体であることの判定を行うことが可能となる。GUSは5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc)を基質とする。当該基質はGUS活性により脱エステル化されインドキシル誘導体モノマーを生じる。生じたモノマーは空気により酸化されることで重合し、青色の水不溶性インジゴチン色素を生成する。遺伝子組換えパパイヤ(55-1)においてもGUS遺伝子が導入されているため、上記原理に従い、青色を呈することを指標にその活性を検出し、遺伝子組換えパパイヤであることの判定を行うことが可能である。なお、本試験法における試料検体は、呈色反応の識別しやすいことを考慮し、胚を対象とする。

##### 2.1.2.2.1. 実験操作

あらかじめ、200mMリン酸緩衝液(pH7.0)<sup>\*1</sup>を1ウェル当たり50 $\mu$ Lずつ96ウェルプレートのうち必要数のウェルに分注しておく。試験には、パパイヤ1個体につき12個の胚を用いるため、必要となるウェル数は(パパイヤの個体数 $\times$ 12)である。

採取したパパイヤ果実を縦半分に切り、種子を無作為に1粒選出する。以下の手順に従い胚を取り出す。まず、ガラス板上で、粘性のある外皮をピンセットまたはメスの先端を利用し取り除く。次に、メスで種子の縦中央に切れ目を入れる<sup>\*2</sup>。深く突き刺さないよう留意しながら切れ目にメスの先端を入れ、種皮を完全に取り除き、淡白色の胚珠を採取する。次に、胚珠の縦中央に観察される白線に沿ってメスを入れ、胚珠を縦半分に切断する<sup>\*3</sup>。切断後、切断面に露出する胚をピンセットで注意深く取り出し<sup>\*4</sup>、あらかじめ96ウェルプレートに分注しておいた200mMリン酸緩衝液(pH7.0)に速やかに浸す。この操作を繰り返し、1検体当たり12個の胚を取り出す。胚を採取する過程において、種皮が白色の種子や胚珠が含まれない種子が観察される場合があるが、それらは試験に用いない。ウェルに検査に用いる全ての胚を採取し終えた後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去する。続いて、基質溶液<sup>\*5</sup>を1ウェル当たり50 $\mu$ Lずつ加える。基質溶液を添加した後、その浸透を促すためアスピレーターを用いて15分間の脱気処理を行う。脱気処理後、96ウェルプレート全体をパラフィルムで密封し、37 $^{\circ}$ C、10~15時間<sup>\*7</sup>の条件で保温する。保温後、各ウェルに70%エタノールを50 $\mu$ Lずつ加え反応を停止する。それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS発現率<sup>\*8</sup>を算出する。

<sup>\*1</sup> 200mMリン酸緩衝液(pH7.0)

200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>と200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を3.3:6.7(v/v)の割合で混合した溶液を200mMリン酸緩衝液(pH7.0)とする。調製時には、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、混合後、必ずpHが7.0であることを確認する。なお、当緩衝液は、必ず試験を開始する直前に作製し、一試験毎に使い切ること(用時調製)。

<sup>\*2</sup> パパイヤの種子は縦方向に長く、これに比して横方向に短い。このことを基準に、種子を実験者に対して横向きになるよう配置させ、メスを左端に入れ、右端に向かって横方向に切り進めるこ

とで切れ目を入れるとよい。メスを深く差し込むと胚を切断してしまうこともあるので注意する。

\*<sup>3</sup> 胚珠はその中心部に位置する胚とその周りを覆う胚乳で構成されている。また、全体としては胚乳の示す淡白色をしている。しかし、胚珠表面を注意深く観察することで、淡白色とは明らかに異なる白色の線が中央部を上端から下端にかけて走っていることが観察される。この白色の線は胚によって示されるものである。胚珠を切断する際には、刃がこの線に対して平行となるようにメスを入れ、胚を傷つけないよう注意しながら二分する。

\*<sup>4</sup> 胚が露出しなかった場合、切断面において胚を覆っている胚乳をメスで削り取り、胚を露出させる。その後、ピンセットを用いて注意深く取り出す。この際、胚を傷つけないよう充分注意しながら操作を進める。傷のついた胚は非特異的に青色を呈する場合がある。

#### \*<sup>5</sup> 基質溶液

X-Gluc 溶液\*<sup>6</sup>が最終濃度1mMとなるように、200mMリン酸緩衝液(pH7.0)で調製した溶液を基質溶液とする。基質溶液調製時には、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、均一な溶液として調製する。なお、基質溶液は、必ず試験に供する胚すべてを採取し終えた後に調製し、一試験毎に使い切るものとする。

#### \*<sup>6</sup> X-Gluc溶液

X-Gluc粉末20mgをマイクロ遠沈管(1.5mL)に量り取り、1mLのジメチルホルムアミドを加え溶解したものをX-Gluc溶液とする。-20°Cで保存すること。

\*<sup>7</sup> 恒温器を使用して保温する。また、15時間を超えて保温した場合、非遺伝子組換えパパイヤの胚が非特異的に染色される可能性が考えられる。この場合、正確な判定を下すことができなくなるため、保温時間については記載された時間を厳守すること。

\*<sup>8</sup>  $GUS\text{発現率}(\%) = \left[ \frac{\text{青色を呈した胚の数}}{\text{試験した胚の数12}} \right] \times 100$

### 2.1.2.2.2. 結果の判定

検体が遺伝子組換えパパイヤ(55-1)の場合、理論的には75%(9胚/12胚)の割合で胚が青色を呈する。しかし、当該試験法においては、試験に供する胚を無作為に選出するため、必ずしも上記理論値には合致しない。一方、非遺伝子組換えパパイヤでは、青色を呈する胚は観察されない。したがって、GUS発現率が30%以上(青色を呈した胚の数が4以上)の場合を陽性と判定し、GUS発現率が30%未満(青色を呈した胚の数が4未満)の場合を陰性と判定する。

判定例: 試料1は、試験に供した12個の胚のうち青色を呈した胚はみられない(GUS 発現率0%)ため、陰性と判定される。また、試料2は、12個の胚のうち、9個が青色を呈した(GUS発現率75%)ため、陽性と判定される。

試料番号	1	2	3	陰性対照
調査した胚の数	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	9	4	0
GUS 発現率	0	75	33	0
判定	陰性	陽性	陽性	陰性

### 2.1.3. トウモロコシ(Bt10)の検査

#### 2.1.3.1. 定性 PCR 法

トウモロコシ穀粒又はトウモロコシ半製品について、PCR 増幅及び結果の判定を除き、2.1.1.2.1.

と同様の方法で定性 PCR を行う。なお、DNA 抽出精製は、2.2.1.2. に示すシリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用) を用いる。

#### 2.1.3.1.1. 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>、0.16mmol/L dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 $\mu$ mol/L 5' 及び 3' プライマー\*<sup>2</sup> 並びに 0.8units Taq DNA ポリメラーゼ\*<sup>3</sup> を含む液に、10ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液 5.0 $\mu$ L (DNA として 50ng) を水中に加え、全量を 25 $\mu$ L にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置\*<sup>4</sup> 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 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\*<sup>5</sup> を使い、同様に PCR 増幅を行う。

##### \*<sup>1</sup> 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。

##### \*<sup>2</sup> Bt10 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (JSF5) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG GTT ACT CA-3'

R-primer (JSR5) : 5'-ACA CGG AAA TGT TGA ATA CTC ATA CTC T-3'

##### \*<sup>3</sup> 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。

##### \*<sup>4</sup> PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (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。

##### \*<sup>5</sup> 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'

#### 2.1.3.1.2. 結果の判定

陽性対照用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 117bp 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 用反応液を調製し、Bt10 確認用プライマー対\*<sup>1</sup> を使い PCR 増幅を行う\*<sup>2</sup>。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、151bp の PCR 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。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、陽性対照用プライマー対で予定長の PCR 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 PCR 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用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 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

陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。判定例は 2.1.1.2.1.4.を参照のこと。

\*<sup>1</sup> Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt10LS-5') : 5'-GCC ACA ACA CCC TCA ACC TCA -3'

R-primer (Bt10LS-3') : 5'-GAA GTC GTT GCT CTG AAG AAC AT-3'

\*<sup>2</sup> Bt10 確認用プライマー対を用いる場合の PCR 条件は以下の通りである。94℃に10分間保ち反応を開始させた後、94℃ 25秒間、65℃ 30秒間、72℃ 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℃ 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。

#### 2.1.4. トウモロコシ (DAS59132) の検査

トウモロコシ穀粒について、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用) (2.2.1.2.) に従って、一試料につき2回並行で抽出を行い、得られた DNA 溶液を用いて以下のリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。

##### 2.1.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは、トウモロコシ(3.2.) 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、スターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を用いる。

##### 2.1.4.1.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (ABI PRISM™ 7900)

###### 2.1.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25  $\mu$ L/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> 12.5  $\mu$ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、10  $\mu$ mol/L)1.0  $\mu$ L\*<sup>2</sup>、対象プローブ溶液(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L\*<sup>3</sup>を混合し、水で全量 20  $\mu$ L に調製後、10 ng/ $\mu$ L DNA 試料液 5.0  $\mu$ L (50 ng)を添加する。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についても同時に調製する。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ターを用いて行う。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。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad\*<sup>5</sup>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。試験は、1DNA 試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

\*<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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25  $\mu$ mol/L) を用いる場合には 0.5  $\mu$ L を加えること。

\*3 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)  
5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

\*4 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 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。

\*5 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。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。

#### 2.1.4.1.1.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### 2.1.4.1.1.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C 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°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、40 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。

#### 2.1.4.1.2. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (ABI PRISM™ 7500)

##### 2.1.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 µL/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> 12.5 µL、対象プライマー対溶液(各プライマー、10 µmol/L) 1.0 µL<sup>\*2</sup>、対象プローブ溶液(10 µmol/L) 0.5 µL<sup>\*3</sup>を混合し、水で全量 20 µL に調製後、10 ng/µL DNA 試料液 5.0 µL (50 ng) を添加する。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についても同時に調製する。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ーケーターを用いて行う。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。試験は、1DNA 試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

\*1 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。

\*2 対象プライマー対

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25 μmol/L) を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

#### \*<sup>3</sup> 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-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アクター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 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。

### 2.1.4.1.2.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

### 2.1.4.1.2.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C 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°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なおランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。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。

### 2.1.4.1.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (ABI PRISM™ 7700)

#### 2.1.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μL/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> 12.5 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10 μmol/L) 1.0 μL<sup>\*2</sup>、対象プローブ溶液 (10 μmol/L) 0.5 μL<sup>\*3</sup> を混合し、水で全量 20 μL に調製後、10 ng/μL DNA 試料液 5.0 μL (50 ng) を添加する。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についても同時に調製する。分注操作終了後、真上からキャップし<sup>\*4</sup>、完全にウェルを密閉する。このとき、専用のシーリング用アプリアクターを用いて行う。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。試験は、1DNA 試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

#### \*<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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25  $\mu\text{mol/L}$ ) を用いる場合には 0.5  $\mu\text{L}$  を加えること。

\*<sup>3</sup> 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

\*<sup>3</sup> 96 ウェルプレートおよびプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps, 8caps/strips (Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

#### 2.1.4.1.3.2. 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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### 2.1.4.1.3.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C 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°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。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。

#### 2.1.4.1.4 結果の解析と判定

トウモロコシ陽性対照用試験及び DAS59132 検出用試験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と Ct 値の確認及び 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 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合に陽性を疑う。次いでベースライン(3 サイクルから 15 サイクル)の  $\Delta R_n$  のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. Line を選択する\*。その Th. Line から Ct 値が得られるか否かを解析する。その後トウモロコシ陽性対照用試験及び DAS59132 検出用試験の両方において、38 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判定し、38 未満の Ct 値が得られない場合は陰性と判定する。なお、上記判定により陽性が判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、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、どちらか一方の抽出液において、トウモロコシ陽性対照用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法以降の操作を行い、それでも 38 未満の Ct 値が得られない場合には、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 抽出液ともにトウモロコシ陽性対照用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、改めて 3 回目の DNA 抽出精製を行い、さらにリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法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トウモロコシ陽性対照

用試験で 38 未満の Ct 値が得られない場合には、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。

\* 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の  $\Delta Rn$  が変動することから、普遍的な Th. Line の設定の数値を示すことが困難である。従って Amplification plot 上でベースライン(3 サイクルから 15 サイクル)の  $\Delta Rn$  のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. Line を選択する。参考として、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7900 及び ABI PRISM™ 7500 のいずれにおいても 0.2-0.5 の範囲であると考えられる。

## 2.2. DNA 抽出精製法

DNA の抽出精製の際用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17M $\Omega$ /cm まで精製した超純水など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

### 2.2.1. トウモロコシ及び大豆穀粒からの DNA 抽出精製

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製する CTAB 法は、応用範囲が広い上、PCR 阻害物質が残存しにくく、純度の高い DNA を得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。市販の DNA 抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販の DNA 抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシ、大豆等の穀粒から PCR に利用可能な DNA を抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB 法とシリカゲル膜タイプキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 並びに NIPPON GENE GM quicker)を用いた方法、シリカベースのレジンタイプキット(Promega Wizard DNA Clean-up System)を用いた方法を記す。なお、シリカゲル膜タイプキット法は、使用するキット及び、適用する試料によって操作方法が異なるため注意する。

#### 2.2.1.1. CTAB 法

均質に粉碎された試料 2g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、CTAB 緩衝液\*<sup>1</sup> 15 mL を入れ、ホモジナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモジナイザーの先を洗浄するように CTAB 緩衝液 30mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間放置する\*<sup>2</sup>。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液 600 $\mu$ L をマイクロ遠沈管(1.5mL 容)に量り採る。次いで 500 $\mu$ L のフェノール/クロロホルム混合液\*<sup>3</sup> を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ g で 15 分間室温遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層に触れないように注意する。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液\*<sup>4</sup> 500 $\mu$ L を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ g で 15 分間室温で遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール(室温)を加え、転倒混和後 7,500 $\times$ g で 10 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500 $\mu$ L の 70% エタノールを壁面から静かに加え、7,500 $\times$ g で 1 分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3 分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50 $\mu$ L の TE 緩衝液\*<sup>5</sup> を加えてよく混和後、室温に 15 分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 $\mu$ L を加え、37°C で 30 分間放置する。200 $\mu$ L の CTAB 緩衝液を加えた後、250 $\mu$ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ g で 15 分間室温遠心後、水層(上

層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように採取する。200 $\mu$ Lのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7,500 $\times$ gで10分間、室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 $\mu$ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500 $\times$ gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないよう注意する。50 $\mu$ Lの水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液<sup>\*6</sup>とする。

#### \*1 CTAB緩衝液

ビーカーに、0.5mol/L EDTA(pH8.0)8mL、1mol/L Tris-塩酸(pH8.0)20mL、5mol/L食塩水56mLを入れ、約150mLとなるように水を加え、攪拌しながらCTAB 4gを加えて完全に溶解する。さらに水を加え全量を200mLとし、オートクレーブで滅菌したものをCTAB緩衝液とする。

\*2 ホモジナイザーを使用しない場合には、ボルテックスミキサーを用いて試料塊がないように激しく混合する。その際には、まず15mLのCTAB緩衝液を加え十分に混合した後、さらにCTAB緩衝液30mLを加え混合する。混合後は、加温処理以降の操作に従う。

#### \*3 フェノール/クロロホルム混合液

1mol/L Tris-塩酸(pH8.0)飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を1:1(v/v)で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

#### \*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1(v/v)で混合したものをクロロホルム/イソアミルアルコール混合液とする。

#### \*5 TE緩衝液

各最終濃度が10mmol/L Tris-塩酸(pH8.0)、1mmol/L EDTA(pH8.0)となるように水を用いて調製したものをTE緩衝液とする。

\*6 定量PCRに供する際は、DNA試料液はTE緩衝液を用いてDNAを溶解し、濃度を調製したものとす。そのため、定量PCR法を実施することを目的としてDNA抽出を行う場合には、真空乾燥させた沈殿に50 $\mu$ LのTE緩衝液を加えて混合した後、4 $^{\circ}$ Cで一晩保存することで完全に溶解し、DNA試料原液とする。

### 2.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用)

均質に粉碎した試料2gをポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量り採り、あらかじめ65 $^{\circ}$ Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup>10mLとRNase A 20 $\mu$ Lを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65 $^{\circ}$ Cで15分間加温する。その間2、3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2緩衝液<sup>\*2</sup>3,250 $\mu$ Lを加え、氷上に10分間静置した後、4,000 $\times$ g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で20分間遠心する<sup>\*3</sup>。次いでその上清500 $\mu$ LをQIAshredder spin columnに負荷し、10,000 $\times$ g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管(15mL容)に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の1.5倍量のAP3緩衝液<sup>\*4</sup>・エタノール混液<sup>\*5</sup>を加える。その混合液500 $\mu$ Lをmini spin columnに負荷し、10,000 $\times$ g以上で1分間<sup>\*6</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500 $\mu$ Lを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いでAW緩衝液<sup>\*7</sup>500 $\mu$ Lを負荷し、10,000 $\times$ g以上で1分間<sup>\*6</sup>遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計3回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin columnを乾燥させるため、10,000 $\times$ g以上で20分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ65 $^{\circ}$ Cに温めておいた水70 $\mu$ Lを加え、5分間静置した後、10,000 $\times$ g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液

\*<sup>8</sup> とする。

\*<sup>1</sup> AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>2</sup> AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>3</sup> 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

\*<sup>4</sup> AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>5</sup> AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液\*<sup>4</sup> とエタノール(96-100%)を1:2で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

\*<sup>6</sup> 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

\*<sup>7</sup> AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものを AW 緩衝液とする。

\*<sup>8</sup> 定量PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。「mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ65°Cに温めておいた TE 緩衝液70μL を加え、5分間静置した後、10,000×g 以上で1分間遠心し DNA を溶出する。もう一度 TE 緩衝液を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

### 2.2.1.3. シリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: 大豆に適用)

均質に粉碎した試料1g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいた AP1 緩衝液\*<sup>1</sup> 10mL と RNase A 20μL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間5、6回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。スイング式遠心分離機を使用し、3,000×g、室温の条件で10分間遠心後、その上清7mL を、ポリプロピレン製遠沈管(15mL 容)に移す。AP2 緩衝液\*<sup>2</sup> 2,500μL を加え、ボルテックスミキサーで10秒間激しく攪拌する。氷上に15分間静置後、スイング式遠心機で3,000×g 以上、室温の条件で35分間遠心する\*<sup>3</sup>。得られた上清のうち8mL を新しい15mL チューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、500μL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000×g 以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管(15mL 容)に移す。その溶出液の1.5倍量の AP3 緩衝液\*<sup>4</sup>・エタノール混液\*<sup>5</sup>を加える。混合液500μL を mini spin column に負荷し、10,000×g 以上で1分間\*<sup>6</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500μL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液\*<sup>7</sup> 500μL を負荷し、10,000×g 以上で1分間\*<sup>6</sup>遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計

3回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000×g 以上で20分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ65℃に温めておいた水70μL を加え、5分間静置した後、10,000×g 以上で1分間遠心しDNA を溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液\*<sup>8</sup>とする。

\*<sup>1</sup> AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>2</sup> AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>3</sup> 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返す、以降の操作を行う。

\*<sup>4</sup> AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>5</sup> AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液\*<sup>4</sup> とエタノール(96-100%) を1:2で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

\*<sup>6</sup> 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

\*<sup>7</sup> AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%) を混合したものを AW 緩衝液とする。

\*<sup>8</sup> 定量PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。「mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ65℃に温めておいた TE 緩衝液70μL を加え、5分間静置した後、10,000×g 以上で1分間遠心し DNA を溶出する。もう一度 TE 緩衝液を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。」

#### 2.2.1.4. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用)

均質に粉碎した試料 1g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、GE1 緩衝液\*<sup>1</sup> 6mL と RNase A 20μL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30秒間混合した後\*<sup>2</sup>、室温で10分間静置する。GE2 緩衝液\*<sup>3</sup> 750μL を加え、10~12回転倒混和し\*<sup>4</sup>、氷上に10分間静置する。5,000×g 以上、4℃の条件で10分間遠心\*<sup>5</sup>する。次いでその上清\*<sup>6</sup>400μL を1.5mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50μL 及びエタノール(100%) 200μL を添加した後、10~12回転倒混和する\*<sup>7</sup>。混合液650μL(全量)を spin column に負荷した後、13,000×g 以上、4℃の条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600μL を負荷し、13,000×g 以上、4℃の条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を乾燥させるため、13,000×g 以上、4℃の条件で3分間遠心する。spin column を新たな1.5mL 容チューブに移し、水 50μL を加え3分間室温で静置した後、13,000×g 以上で1分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液\*<sup>8</sup>とする。

\*1 GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker)付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30～60秒間攪拌する。

\*3 GE2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker)付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

\*5 使用するローター及び50mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

\*6 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。また、上清は4mL 程分取することが可能であり、4℃の条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNA の再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。

\*7 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

\*8 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。「spin column を新たな1.5mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50μL を加え3分間室温で静置した後、13,000×g 以上で1分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。」

#### 2.2.1.5. シリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker: 大豆に適用)

均質に粉碎した試料 1g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、GE1 緩衝液\*1 12mL と RNase A 40μL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30秒間混合した後\*2、室温で10 分間静置する。GE2 緩衝液\*3 1,500μLを加え、10～12回転倒混和し\*4、氷上に10分間静置する。5,000×g 以上、4℃の条件で 10分間遠心する\*5。次いでその上清\*6700μL を2.0mL チューブに移し、GE3 緩衝液 250μL 及びイソプロパノール(100%) 250μL を添加した後、10～12回転倒混和する\*7。混合液600μL を spin column に負荷し、13,000×g 以上、4℃の条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てる。残りの混合液全量を同じ spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液600μL を負荷し、13,000×g 以上、4℃の条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな1.5mL 容チューブに移し、水 50μL を加え、3分間室温で静置した後、13,000×g 以上で1分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液\*8 とする。

\*1 GE1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker)付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30～60秒間攪拌する。

\*3 GE2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker)付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽

出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

\*<sup>5</sup> 使用するローター及び50mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

\*<sup>6</sup> 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。また、上清は8mL 程分取することが可能であり、4°Cの条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNA の再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。

\*<sup>7</sup> GB3 緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

\*<sup>8</sup> 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。「spin column を新たな1.5mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 $\mu$ L を加え3分間室温で静置した後、13,000 $\times$ g 以上で1分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。」

#### 2.2.1.6. シリカベースレジソタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)

均質に粉砕した試料2g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、抽出用緩衝液\*<sup>1</sup> 17.2mL、5mol/L グアニジン-塩酸2mL 及び20mg/mL Proteinase K を0.8mL 加え、激しくボルテックスミキサーで攪拌後、55~60°Cで振とうしながら3時間保温する。次いで、室温まで温度を下げ、3,000 $\times$ g で10分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマイクロ遠沈管(1.5mL 容)に移し、さらに14,000 $\times$ g で10分間遠心する。得られた澄明な上清500 $\mu$ L と、DNA Clean-up Resin1mL をマイクロ遠沈管(1.5mL 容)に採り、転倒混和し、混合液とする。次に mini column の上部に注射筒を付け、マニホールド(吸引装置)に装着する。マニホールドのコックを閉じ、吸引装置内部が十分に減圧になっていることを確認した後、混合液を注射筒から mini column に負荷する。直ちにコックを開け、最速で減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで2mL の80%イソプロピルアルコールを注射筒から加えカラムを洗浄する。注射筒を外した mini column をマイクロ遠沈管(1.5mL 容)に装着し、室温下10,000 $\times$ g で2分間遠心し、カラムを乾燥する。次に mini column を新しいマイクロ遠沈管(1.5mL 容)に移し、あらかじめ65~70°Cに温めておいた水100 $\mu$ L を滴下する\*<sup>2</sup>。1分間放置後、室温下10,000 $\times$ g 以上で1分間遠心し、DNA を溶出し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

##### \*<sup>1</sup> 抽出用緩衝液

150mM 塩化ナトリウム、2mmol/L EDTA 及び1% SDS を含む10mmol/L Tris-塩酸緩衝液(pH7.5)

\*<sup>2</sup> 定量PCR法に供する際は、水の代わりにあらかじめ65~70°Cに温めておいたTE緩衝液100 $\mu$ Lを滴下する。

#### 2.2.2. パパイヤからの DNA 抽出精製

採取したパパイヤから種子を除いた果肉部分をおよそ10mm 角に切り出し、凍結乾燥を行う。次にミキサーミル等でこれらを混合し、粉砕する。粉砕試料を用い、以下の CTAB 法または、シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)を用いた方法に従って DNA を抽出精製する。

##### 2.2.2.1. CTAB 法

粉砕試料20mgをマイクロ遠沈管(1.5mL容)に量り採り、CTAB緩衝液150 $\mu$ Lを入れ、マイクロミキサーで組織が見えなくなるまで均一化する\*。ミキサーの先を洗浄するように CTAB緩衝液450 $\mu$ Lを加え、転倒混和してから55°Cで30分間放置する。500 $\mu$ Lのフェノール/クロロホルム混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ gで15分間室温遠心後、水層(上層)を新

しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように注意する。500 $\mu$ L クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ gで15分間室温遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール(室温)を加え、転倒混和後 7,500 $\times$ gで10分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500 $\mu$ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500 $\times$ gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50 $\mu$ LのTE緩衝液を加えてよく混和後、室温に15分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間放置する。200 $\mu$ LのCTAB緩衝液を加えた後に、250 $\mu$ Lのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ gで15分間室温遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時、中間層に触れないように採取する。200 $\mu$ Lのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7,500 $\times$ gで10分間室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨て、ピペットでイソプロピルアルコールを捨てる。次いで、200 $\mu$ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500 $\times$ gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないよう注意する。50 $\mu$ Lの水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液とする。

\* マイクロミキサーを使用しない場合には、ボルテックスミキサーを用いて試料塊がないように激しく混合する。その際には、まず300 $\mu$ LのCTAB緩衝液を加え十分に混合した後、さらにCTAB緩衝液300 $\mu$ Lを加え混合するようにする。混合後は、加温処理以降の操作に従う。

#### 2.2.2.2. シリカゲル膜タイプキット法

粉砕試料80mgをマイクロ遠沈管(2mL容)に量り採り、シリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)を用い、以下の方法に従ってDNAを抽出精製する。

試料にあらかじめ65 $^{\circ}$ Cに温めておいたAP1緩衝液600 $\mu$ Lとキット付属のRNase A 4 $\mu$ Lを加え、試料塊がないようホモジナイザーを用いて混合し、65 $^{\circ}$ Cで15分間放置する。その間数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。その後AP2緩衝液195 $\mu$ Lを加え、氷上に5分放置後、室温下10,000 $\times$ gで5分間遠心する。上清をQIAshredder spin columnに負荷し、室温下10,000 $\times$ gで2分間遠心し、溶出液をマイクロ遠沈管(2mL容)に移す。遠沈管に1.5倍量のAP3緩衝液・エタノール混液を加え、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、得られた混合液のうち500 $\mu$ Lをmini spin columnに負荷し、室温下10,000 $\times$ gで5分間遠心し\*、溶出液を捨てる。次いで、残りの混合液のうち、さらに500 $\mu$ Lを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで、columnにAW緩衝液500 $\mu$ Lを加え、室温下10,000 $\times$ gで5分間遠心し、溶出液を捨てもう一度AW緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨て、mini spin columnを乾燥させるため、10,000 $\times$ g以上で15分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ温めておいた水50 $\mu$ Lを加え、5分間放置した後、10,000 $\times$ gで1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同様の操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とする。

\* 混合液中に析出物が有る場合columnが詰まりやすくなる。その場合、完全に溶出させるため遠心時間を10分程度まで延ばす。

#### 2.2.3. 加工食品からのDNAの抽出精製

平成12年農林水産省告示第517号第3条に規定する別表2の加工食品からのDNAの抽出精製は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の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 個別品目編」に記載されている方法を準用する。タコス、トルティーヤ、コーンチップ及びコーンフレーク(加熱加工されているものに限る。)、ジャガイモ(加工品を含む。)並びに缶詰のパパイヤからの DNA の抽出精製は以下の手法で行う。

#### 2.2.3.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップ及びコーンフレーク(加熱加工されているものに限る)からの DNA の抽出精製

試料を凍結乾燥した後、ミキサーミル等で粉砕する。次いで粉砕試料1g をポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を用い以下のように DNA を抽出精製する。

試料に G2 緩衝液\*<sup>1</sup> 4mL を加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、さらに G2 緩衝液 4 mL、Proteinase K\*<sup>2</sup> 100 $\mu$ L と RNase A 10 $\mu$ L を加えて、よく振って混合した後、50 $^{\circ}$ C で 2 時間放置する。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3,000 $\times$ g 以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C) 15 分遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管(15mL 容)に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT 緩衝液\*<sup>1</sup> 1mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に 2mL ずつ数回に分けて負荷する。次いで、チップを QC 緩衝液\*<sup>1</sup> で 2mL ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ 50 $^{\circ}$ C に温めておいた QF 緩衝液\*<sup>2</sup> を 1mL ずつ 2 回加え、DNA を溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10,000 $\times$ g 以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C) 15 分間遠心し、上清を捨てた後、70%エタノール 1mL を加え、さらに 10,000 $\times$ g 以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C) 5 分間遠心する。さらに上清を捨て、残った沈殿をアスピレーターを用い乾燥した後、水 100 $\mu$ L を加え、65 $^{\circ}$ C で 5 分間放置し、ピペッティングにより DNA を溶解させ、DNA 試料原液とする。

\*<sup>1</sup> G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

\*<sup>2</sup> QIAGEN 社のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

#### 2.2.3.2. ジャガイモ(加工品を含む)からの DNA の抽出精製

試料をミキサーミル等により粉砕した後、粉砕試料 200mg をポリプロピレン製遠沈管(15mL 容)に量り採る。試料中に水分が多い場合は 8,000 $\times$ g で 15 分間遠心し、上清を捨てる。次いでシリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)を用い、以下の様に DNA を抽出精製する。

試料にあらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた AP1 緩衝液 1.5mL と RNase A 10 $\mu$ L を加え、試料塊がないようボルテックスミキサーで激しく混合し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間放置する。その間数回遠沈管を反転させサンプルを攪拌する。その後 AP2 緩衝液 400 $\mu$ L を加え、氷上に 5 分放置後、室温下 10,000 $\times$ g で 5 分間遠心する。上清を別の遠沈管に移し、その内 500 $\mu$ L を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 $\times$ g で 2 分間、室温で遠心し、溶出液をキットの遠沈管に移す。これを全量終えるまで数回繰り返す。得られた溶出液のうち半量を別のマイクロ遠沈管(2mL 容)に移し、それぞれの遠沈管に 1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち 500 $\mu$ L を、mini spin column に負荷し、室温下 10,000 $\times$ g で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで残りの溶解液のうち、さらに 500 $\mu$ L を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。

次いで、column に AW 緩衝液 500 $\mu$ L を加え、室温下 10,000 $\times$ g で 1 分間遠心し、溶出液を捨てもう一度 AW 緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨てた後、mini spin column を乾燥するため、10,000 $\times$ g 以上で 15 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらか

じめ温めておいた水50 $\mu$ Lを加え、5分間放置した後、室温下10,000 $\times$ gで1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

#### 2.2.3.3. 缶詰のパパイヤからの DNA の抽出精製

試料を水でよく洗浄し、凍結乾燥した後、ミキサーミル等で粉碎する。次いで粉碎試料2gをポリプロピレン製遠沈管(50mL 容)に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を用い以下のようにDNAを抽出精製する。

試料に G2 緩衝液7.5mLを加え、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、さらに G2 緩衝液7.5 mL、QIAGEN Proteinase K 200 $\mu$ LとRNase A 20 $\mu$ Lを加えて、よく振って混合した後、50 $^{\circ}$ Cで2時間放置する。その間2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3,000 $\times$ g以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C)15分間遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管(15mL 容)に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT 緩衝液1mLを用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/Gに2 mL ずつ数回に分けて負荷する。次いで、tip を QC 緩衝液で2mL ずつ3回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ50 $^{\circ}$ Cに温めておいた QF 緩衝液を1mL ずつ2回加え、DNAを溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10,000 $\times$ g以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C)15分間遠心し、上清を捨てた後、70%エタノール2mLを加え、さらに10,000 $\times$ g以上で、低温下(4 $^{\circ}$ C)5分間遠心する。さらに上清を捨て、残った沈澱をアスピレーターを用い乾燥した後、水100 $\mu$ Lを加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間放置し、ピペッティングによりDNAを溶解させ、DNA 試料原液とする。

#### 2.2.4. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適量を取り、水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し<sup>\*1</sup>、200~320nmの範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260nm 及び280nm の吸光度(O.D.260及び O.D.280<sup>\*2</sup>)を記録する。次いでO.D.260の値1を50ng/ $\mu$ L DNAとしてDNA濃度を算出する。またO.D.260/O.D.280を計算する。この比が1.7~2.0になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して<sup>\*3</sup>DNA 試料液とし、20 $\mu$ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

<sup>\*1</sup> 試験の目的により、DNA 試料原液は水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、適宜とする。

<sup>\*2</sup> O.D.260が DNA 由来の吸光度、O.D.280がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

<sup>\*3</sup> 定量 PCR 法に供する際は、TE 緩衝液を用いて希釈する。

### 3. 安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法

#### 3.1. 大豆

##### 3.1.1. ELISA 法

試料中の CP4EPSPS タンパク質を検知する手法である。100mesh(編み目の一目の長さ150 $\mu\text{m}$ )のふるいを通じた粉末試料0.5gを用いて、SDI 社製 GMO Soya Test Kit Ver.2.1の説明書に記載された手法に従って試験する。以下に方法について記述する。

試料又は標準品0.5gをポリプロピレン製遠沈管(15mL容)に正確に量り採り、Soya Extraction 緩衝液4.5mLを加え、ボルテックスミキサーを用い10秒間混合した後、2,500 $\times$ gで15分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液280 $\mu\text{L}$ に抽出液20 $\mu\text{L}$ を加え攪拌し希釈液とする。さらに、Soya Assay 緩衝液380 $\mu\text{L}$ に希釈液20 $\mu\text{L}$ を加え攪拌し、試料液とする。このキットで作成できる検量線の範囲は0~2.5%であるので、未知検体の抽出液について検量線の範囲内で定量値が内挿できるよう、別に10倍希釈した試料液も準備しておく。ウェルに試料液を100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間保温する。その後、Wash 緩衝液で3回洗浄し、Reconstituted and Diluted Soya Conjugate Mix 100 $\mu\text{L}$ を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間保温する。さらに Wash 緩衝液で3回洗浄する。次に、Color Reagent 100 $\mu\text{L}$ を加え、室温で10分間放置した後、Stop Solution 100 $\mu\text{L}$ を加えて反応を停止する。反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、450nmの波長でウェルの吸光度を測定し、別途購入した標準試料を用い作成した検量線より組換え体の含有量を求める。なお、同一の実験を2ウェルで行い、得られた値を平均する。

##### 3.1.2. 定量 PCR 法

TaqMan Chemistryを応用した定量PCR法を行う。同法では、定性PCR法に通常使用するプライマー対に加え、蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。当プローブはプライマー対により増幅される塩基配列中に相補鎖を形成するように設計されている。また、同プローブにはリポーター、クエンチャー両色素が結合しており、DNAポリメラーゼによる増幅産物の伸長反応に伴い加水分解を受けると、蛍光を放射する。蛍光強度は、PCRサイクル数に対し指数関数的に増強し、また一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数は、鋳型DNA量に依存する。したがって、一定の蛍光強度に達したPCRサイクル数を比較することで、鋳型DNA量が求められる。

組換えDNA技術応用食品の定量は、非組換え体、組換え体を問わず普遍的に存在する遺伝子(内在性遺伝子)を内標として用い、内在性遺伝子のコピー数に対する組換え遺伝子のコピー数を求めることで行う。本法においては、標準物質として標準プラスミドDNA溶液\*<sup>1</sup>を使用する。標準プラスミドDNA溶液に含まれるDNAの量はコピー数として規定されており、そのため、定量PCRの結果はコピー数として求められる。

大豆を対象とした定量PCR法においては、大豆に普遍的に存在するレクチン遺伝子を内在性遺伝子としている。検査の際には、まずレクチン遺伝子を標的とするプライマー対(Le1-n02)とプローブ(Le1-Taq)を使用し定量PCRを行い、DNA試料液中のレクチン遺伝子のコピー数を求める。また、同時に、同一DNA試料液について、組換え遺伝子を標的とするプライマー対(RRS-01)とプローブ(RRS-Taq)を使用し別に定量PCRを行い、組換え遺伝子のコピー数を求める。組換え遺伝子のコピー数をレクチン遺伝子のコピー数で除し、その値をあらかじめ求められている係数(内標比\*<sup>2</sup>)でさらに除して得られた値に100を乗したものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の%含量となる。以下に定量PCR法の実際を述べる。定量PCRはABI PRISM<sup>TM</sup> 7700、ABI PRISM<sup>TM</sup> 5700、ABI PRISM<sup>TM</sup> 7900HT(96well及び384well)、ABI PRISM<sup>TM</sup> 7000並びにRoche LightCycler System、若しくは同等の性能を有する装置を用いて行う。また、使用する機種により、試薬、反応液組成、反応条件、手技並びに解析手法が異なるため、検査に際しては、以下機種ごとに記載された各項に従い、必ず使用する機種に適した方法を用いること。なお、3.1.2.及び

3.2.1. 記載の、定量PCR法で用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製したRO水又は蒸留水を Milli-Q 等で17MΩ/cm まで精製した超純水とする。

#### \*1 標準標準プラスミド DNA 溶液

内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特異的プライマー対により増幅された増幅産物をプラスミド上に連結したもの(標準プラスミド DNA)を、ColE1/TE 溶液(5ng/μL)で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては20、125、1,500、20,000、250,000コピーの5段階希釈液に加え、標準プラスミド DNA の含まれていない ColE1/TE 溶液(5ng/μL)をブランク試料液(NTC:no template control)とした、計6点の検量線を作成する。なお、ColE1/TE 溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド(ColE1 プラスミド)を TE 緩衝液で5ng/μL の濃度に調製した溶液である。

#### \*2 内標比

純粋な遺伝子組換え体の種子を対象に定量PCRを実施し、得られる組換え遺伝子のコピー数と内在性遺伝子(大豆の場合レクチン遺伝子)のコピー数との比を求めたもの。この内標比は各組換え作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。各プライマー対及びプローブを用いて測定を行った組換え作物系統ごとの内標比は別紙に規定する。なお、内標比は定量PCR法に使用する機種によって異なるため、混入率の算出時には必ず使用した機種につき規定されている内標比を用いること。また、使用する試薬によっても影響を受ける可能性が考えられるため、参考にも記載のある機種に適した試薬類を確認の上、使用すること。

### 3.1.2.1. ABI PRISM™ 7700及びABI PRISM™ 5700を用いた定量PCR

#### 3.1.2.1.1. PCR用反応液の調製(ABI PRISM™ 7700及びABI PRISM™ 5700)

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\*1 12.5μL、対象プライマー対溶液(各プライマー、25μmol/L)0.5μL、対象プローブ溶液(10μmol/L)0.5μL、水9μL、20ng/μL DNA 試料液2.5μL(50ng)又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液2.5μL、あるいは5ng/μL ColE1/TE 溶液(ブランク試料液:NTC)2.5μL。試験は、1 DNA 試料液あたり3ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*2。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液(マスターミックス)を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液\*3を先に調製しておき、これと Universal PCR Master Mix を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA 試料液(3ウェル分)当たり81μL が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*4の微量遠沈管に78.75μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を8.75μL 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25μL/well として96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からプレートの蓋\*5をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで専用ローラーを用いて完全にウェルを密閉する。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。

#### \*1 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。

#### \*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、対象プローブ濃度が0.5 $\mu\text{mol/L}$ となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

#### \*4 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

#### \*5 96ウェルプレートおよびプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps, 8caps/strips (Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

### 3.1.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)

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、検体の種類あ(「STND」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*<sup>1</sup>、「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを Replicate として指定する\*<sup>2</sup>。またプローブ特性に関しては、「STND」、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについて Reporter が「FAM」、Reference が「ROX」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する。

#### \*1 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

#### \*2 Replicate としての指定

同一の溶液を分注したウェルに付けた名称 (name 欄に入力) と同一の名称を、replicate 欄に入力する。

### 3.1.2.1.3. PCR (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)

装置にプレートをセットし、装置の蓋の温度 (Cover temperature) が105°C付近になったことを確認した後、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°C、2分間の条件で保持した後、95°C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°C 30秒、59°C 1分を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。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。

### 3.1.2.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 ( $\Delta R_n$ ) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、検量線用標準プラスミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅してい

る  $\Delta Rn$  部を選択し、Threshold line (Th)を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を3に、End を15に設定する。Th の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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 定量的 PCR 編」に記載されている方法を準用する。Th と、検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数値 (x 軸) に対する Ct 値 (y 軸) をプロットし、各 Ct に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* 実際は Th を引いた後、「Amplification Plot」ウインドウ上にある、「Update Calculations」ボタンを押すことで、検量線は自動作成される。この検量線は「Analysis」タブから「Standard Curve」を選択することで表示させる。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

### 3.1.2.2. ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well を用いた定量 PCR

#### 3.1.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM™ 7900HT 96well)

PCR 用反応液は25 $\mu$ L/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> 12.5 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、水9 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA 試料液2.5 $\mu$ L (50ng) 又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液2.5 $\mu$ L、あるいは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液:NTC) 2.5 $\mu$ L。試験は、1 DNA 試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*<sup>2</sup>。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液\*<sup>3</sup> を先に調製しておき、これと Universal PCR Master Mix を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液 (3ウェル分) 当たり81 $\mu$ L が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*<sup>4</sup> の微量遠沈管に78.75 $\mu$ L ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を8.75 $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 $\mu$ L/well として96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、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\*<sup>5</sup>。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。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad\*<sup>6</sup> 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。

#### \*<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を要する。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> 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法 (通常、ふきとめと呼ばれる操作) を理解して使用すること。

#### \*<sup>3</sup> 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、対象プローブ濃度が0.5 $\mu\text{mol/L}$ となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

\*4 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

\*5 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate(Applied Biosystems 社)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。

\*6 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad(Applied Biosystems 社)を使用する。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。

### 3.1.2.2.2. PCR 用反応液の調製(ABI PRISM™ 7900HT 384well)

PCR 用反応液は20 $\mu\text{L/well}$ 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> 10 $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液(各プライマー、25 $\mu\text{mol/L}$ )0.4 $\mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液(10 $\mu\text{mol/L}$ )0.4 $\mu\text{L}$ 、水7.2 $\mu\text{L}$ 、20ng/ $\mu\text{L}$  DNA 試料液2 $\mu\text{L}$ (50ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液2 $\mu\text{L}$ \*<sup>2</sup>、あるいは5ng/ $\mu\text{L}$  ColE1/TE 溶液(ブランク試料液:NTC)2 $\mu\text{L}$ 。試験は、1 DNA 試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*<sup>3</sup>。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液(マスターミックス)を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液\*<sup>4</sup>を先に調製しておき、これと Universal PCR Master Mix を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA 試料液(3ウェル分)当たり66 $\mu\text{L}$ が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*<sup>5</sup>の微量遠沈管に63 $\mu\text{L}$ ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA 溶液を7 $\mu\text{L}$  加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を20 $\mu\text{L/well}$ として384ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリーケーターを用いて行う\*<sup>6</sup>。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。

\*1 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を要する。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、ウェルに分注するときは、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。

\*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液

ABI PRISM™ 7900HT 384well を用いた試験においては、反応液に添加する検量線用標準プラスミド DNA 溶液の液量を2 $\mu$ としている。このため、対応するコピー数は、16、100、1,200、16,000、200,000となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

\*3 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

#### \*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、対象プローブ濃度が0.5 $\mu\text{mol/L}$ となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

#### \*5 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

#### \*6 384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

ABI PRISM384-Well Clear Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems 社) 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。

### 3.1.2.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well)

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。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する\*1。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェルすべてを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、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(「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*2、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液)を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### \*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくが良い。

#### \*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する(3.1.2.2.2. 項に記載したように、96ウェルを使用する場合と、384ウェルを使用する場合では、液量の違いから、コピー数が異なるため注意する。)

### 3.1.2.2.4. PCR (ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well)

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°C、2分間の条件で保持した後、95°C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°C 30秒、59°C 1分を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、9,600 emulsion モードのチェックを入れておく。また、96ウェルと384ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。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。

### 3.1.2.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well)

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 ( $\Delta Rn$ ) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、検量線用標準プラスミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している  $\Delta Rn$  部を選択し、Threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を3に、End を15に設定する。Th の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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 定量的 PCR 編」に記載されている方法を準用する。Th と、検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数值 (x 軸) に対する Ct 値 (y 軸) をプロットし、各 Ct に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* 実際は Th を引いた時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

### 3.1.2.3. ABI PRISM™ 7000 を用いた定量 PCR

#### 3.1.2.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM™ 7000)

PCR 用反応液は25 $\mu$ L/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> 12.5 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、水9 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA 試料液2.5 $\mu$ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液2.5 $\mu$ L、あるいは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液: NTC) 2.5 $\mu$ L。試験は1 DNA 試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*<sup>2</sup>。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液\*<sup>3</sup> を先に調製しておき、これと Universal PCR Master Mix を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA 試料液 (3ウェル分) 当たり81 $\mu$ L が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*<sup>4</sup> の微量遠沈管に78.75 $\mu$ L ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を8.75 $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 $\mu$ L/well として96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、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\*<sup>5</sup>。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。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad\*<sup>6</sup> 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。

#### \*<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を要する。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、ウェルに分注するときは、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> 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、

低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

\*<sup>3</sup> 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu$ mol/L、対象プローブ濃度が0.5 $\mu$ mol/L となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

\*<sup>4</sup> 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

\*<sup>5</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

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate(Applied Biosystems 社)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>6</sup> ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad(Applied Biosystems 社)を使用する。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。

### 3.1.2.3.2. プレート情報の設定(ABI PRISM™ 7000)

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。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する\*<sup>1</sup>。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェルすべてを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、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(「Standard」:検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*<sup>2</sup>、「NTC」:ブランク試料液、「Unknown」:DNA 試料液)を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

\*<sup>1</sup> Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくが良い。

\*<sup>2</sup> 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

### 3.1.2.3.3. PCR(ABI PRISM™ 7000)

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、59℃ 1分を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、9,600 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。

### 3.1.2.3.4. 検量線の作成(ABI PRISM™ 7000)

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量( $\Delta R_n$ )をプロットした増幅曲線(Amplification Plot)上で、検量

線用標準プラスミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している  $\Delta Rn$  部を選択し、Threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を3に、End を15に設定する。Th の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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 定量的 PCR 編」に記載されている方法を準用する。Th と、検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数值 (x 軸) に対する Ct 値 (y 軸) をプロットし、各 Ct に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

### 3.1.2.4. Applied Biosystems 7500 System を用いた定量 PCR

#### 3.1.2.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems 7500 System)

PCR 用反応液は25 $\mu$ L/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> 12.5 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、水9 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA 試料液2.5 $\mu$ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液2.5 $\mu$ L、あるいは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液: NTC) 2.5 $\mu$ L。試験は1 DNA 試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*<sup>2</sup>。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液<sup>\*3</sup> を先に調製しておき、これと Universal PCR Master Mix を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA 試料液 (3ウェル分) 当たり81 $\mu$ L が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*4</sup> の微量遠沈管に78.75 $\mu$ L ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を8.75 $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 $\mu$ L/well として96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、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<sup>\*5</sup>。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。

#### \*1 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を要する。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、ウェルに分注するときは、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。

#### \*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法 (通常、ふきとめと呼ばれる操作) を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu$ mol/L、対象プローブ濃度が0.5 $\mu$ mol/L となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能である

が、凍結融解を繰り返すことは避ける。

#### \*4 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

#### \*5 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

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate(Applied Biosystems 社)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。

### 3.1.2.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems 7500 System)

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。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する\*1。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェルすべてを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、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(「Standard」:検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*2、「NTC」:ブランク試料液、「Unknown」:DNA 試料液)を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

#### \*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくが良い。

#### \*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

### 3.1.2.4.3. PCR (Applied Biosystems 7500 System)

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、59℃ 1分を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、RUN Mode を 9,600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

### 3.1.2.4.4. 検量線の作成 (Applied Biosystems 7500 System)

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 ( $\Delta Rn$ ) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、検量線用標準プラスミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している  $\Delta Rn$  部を選択し、Threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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 定量的 PCR 編」に記載されている方法を準用する。Th と、検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数值 (x 軸) に対する Ct 値 (y 軸) をプロットし、各 Ct に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

### 3.1.2.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR

#### 3.1.2.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)

PCR 用反応液は20 $\mu$ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes<sup>\*1</sup> 2 $\mu$ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、25  $\mu$ mol/L) 0.4 $\mu$ L、対象プローブ(10 $\mu$ mol/L) 0.4 $\mu$ L、水9.8 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 溶液(25mM) 2.4 $\mu$ L、10 ng/ $\mu$ L DNA 試料液5 $\mu$ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液5 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、あるいは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE 溶液(ブランク試料液:NTC) 5 $\mu$ L。試験は、検量線用標準プラスミド DNA 溶液、及び NTC に対し1キャピラリー、1DNA 試料液に対し2キャピラリー並行で行うものとし、DNA 試料液に対する PCR 用反応液は2キャピラリー分を同時に調製する<sup>\*3</sup>。

調製の実際は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes に MgCl<sub>2</sub> 溶液、水並びに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液(マスターミックス)を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液<sup>\*4</sup>を先に調製しておき、これと LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl<sub>2</sub> 溶液、水の混合液を8:7の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1キャピラリー当たり19.8 $\mu$ L が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup>の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及び NTC に対し18  $\mu$ L、DNA 試料液に対し36 $\mu$ L とする。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を6 $\mu$ L (検量線用標準プラスミド溶液及び NTC)あるいは12 $\mu$ L (DNA 試料液)加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を20 $\mu$ L/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作<sup>\*6</sup>を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

#### \*1 LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes

LC-FastStart Enzyme (1a red cap) と LC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes (1b colorless cap) とを混合し、調製する。調製した LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes は、4 $^{\circ}$ Cで一週間の保存が可能である。また、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を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。

#### \*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液

Roche LightCycler System を用いた試験においては、反応液に添加する検量線標準プラスミド DNA 溶液の液量を5 $\mu$ Lとしている。このため、対応するコピー数は、40、250、3,000、40,000、500,000となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

#### \*3 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

また、Roche LightCycler System を用いた定量 PCR においては、試験を検量線用標準プラスミド DNA 溶液、及び NTC に対し1キャピラリー、1DNA 試料液当たり2キャピラリー並行で行う。装置

にかけられるキャピラリーの総数、及び1度の反応につき内在性遺伝子並びに組換え遺伝子の両方を測定することから、1回の測定当たり測定可能な DNA 試料液の最大数は5となる。

\*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、対象プローブ濃度が0.5 $\mu\text{mol/L}$  となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

\*5 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液(5点)及びブランク試料液(1点)、この計6点に DNA 試料液の数を加えた数。

\*6 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカラーセル遠心機を使用し行うか、あるいは汎用の遠心機を使用する場合には700 $\times g$  以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作の如何に関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカラーセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

### 3.1.2.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)

反応に際しては、キャピラリー情報の設定を行わなければならない。具体的にはサンプルリスト作成画面上で、調製したキャピラリーの配置(カラーセル上の配置)に対応するように気を付けながら、検体の種類(「Standard」:検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*1、「Negative」:ブランク試料液、「Unknown」:DNA 試料液)を Type 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された2キャピラリーについては Replicate であることを指定する\*2。また、Seek Temperature を30 $^{\circ}\text{C}$ と設定し、Maximum Position にはカラーセルに装填したキャピラリーの最大位置番号を入力する。

\*1 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。各検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したキャピラリーに対し、Concentration 欄にコピー数を入力する。

\*2 Replicate の指定

例えば、キャピラリー位置番号の7と8に同一の溶液を分注した場合、まず番号7に関する情報を設定し、その後、番号8は番号7の Replicate であることを指示する。具体的には番号8の Replicate 欄において「7」を入力することで指示を行う。

### 3.1.2.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカラーセルをセットし、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。95 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間の条件で加温したホットスタート法により反応を開始した後、95 $^{\circ}\text{C}$  15秒、59 $^{\circ}\text{C}$  30秒(1 $^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ )\*1を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行う。増幅反応終了後、40 $^{\circ}\text{C}$  30秒の条件で保つ。データの取り込みは、増幅反応の各サイクル終了時に行わせるよう設定する\*2。

\*1 加温、冷却速度

ここに示している以外、加温、冷却の速度は20 $^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ とする。

\*2 データの取り込み設定

データの取り込み設定の実際は、サイクルプログラムデータ画面において、59 $^{\circ}\text{C}$  30秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

#### 3.1.2.5.4. 検量線の作成(Roche LightCycler System)

反応が終了していることを確認した後に、解析を行う。解析は「Fit Point 法」を用いて行う。内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。Base Line は Proportional とし、Number of Points は2とする。解析する検体のみを選択した状態にし、Noise Band を0.1に設定する。上記条件にて検量線を作成させ、Error 値\* が0.2以下であった場合には、その際に得られた数値を解析値とする。

\* 検量線の Error 値が0.2以上になる場合には以下の検討を行う。Crossing Line の調整幅 (Crossing Line を移動させる範囲)を0.1から0.2の間とし、手動で Crossing Line を移動させる。移動させながら検量線の Error 値が最小となるような Crossing Line を設定し、その時点で得られる数値を解析値とする。上記解析を行ってなお検量線の Error 値が0.2以上になる場合には、検量線から大きく外れている検量線用標準 DNA 溶液1点を解析対象から外し、同様の解析を行う。以上の解析を行っても Error 値が0.2以上になる場合にはその解析条件下での最小 Error 値を示した時点の数値を解析値とする。

#### 3.1.3. 試料の組換え DNA 技術応用食品含有率の計算

未知 DNA 試料液につき検量線作成で用いた  $T_h$  を使用して Ct 値を求め、内標遺伝子及び組換え遺伝子につき、それぞれの検量線から各3ウェル\*とも内在性遺伝子のコピー数を内挿し、それにより得られる値の平均を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。次に次式に従って、対象組換え DNA 技術応用食品含有率を求める。

$$\text{対象組換え DNA 技術応用食品含有率(\%)} = \frac{\text{[組換え遺伝子のコピー数 / (内在性遺伝子のコピー数} \times \text{内標比)]}}{\text{}} \times 100$$

大豆の場合、現在のところ市場に流通している遺伝子組換え大豆は Roundup Ready Soybean のみであり、Le-1 と RRS 遺伝子のコピー数から算出された値は、遺伝子組換え大豆の含有率を示している。

\* Roche LightCycler System を用いた場合には、1DNA 試料液当たり各3ウェルではなく、2キャピラリーで実施するので、3.1.2.4.3.記載の解析の結果得られた2キャピラリー分のデータの平均値を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。

#### 3.1.4. 結果の判定

3試料につき各1回の抽出を行い、ELISA 法又は定量 PCR 法により得られた値の平均が5%を越えた試料については、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。

### 3.2. トウモロコシ

トウモロコシでは、異なった発現タンパク質をもつ組換え系統が存在する上、同一の発現タンパク質が発現する組換え系統であっても、組換え系統毎にタンパク質の発現量が異なるため、多種の遺伝子組換えトウモロコシが混入している穀粒では、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める目的で ELISA 法を用いることはできない。したがって、定量 PCR 法でのみ分析が可能である。

#### 3.2.1. 定量 PCR 法

上述のように、トウモロコシでは分析対象が複数系統存在するため、まず一次スクリーニングを実施し、得られた結果に基づき、さらに系統毎の分別定量を行い、組換え系統毎の定量値を合計

して、結果の判定を行う。なお、トウモロコシの場合、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を使用して得られた同遺伝子のコピー数と、分析対象となる組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブを使用して得られた対象遺伝子のコピー数を大豆の場合と同様に算出し、3.1.3.で示した式に基づき対象遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める。

### 3.2.1.1. スクリーニング

#### 3.2.1.1.1. Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter が組み込まれた組換え系統の定量

組換えトウモロコシ系統 Event176、Bt11、T25 及び Mon810 には、共通して Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter (CaM) 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除き大豆の定量 PCR 法で示された方法と同一である。内在性遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Taq\* であり、別紙に規定された内標比を用いて、最終的に CaM 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率を算出する。

\* P35S-1 と P35S-Taq を用いた際の内標比は Mon810 を対象として算出されたものを用いる。同系統は米国で最も作付け面積が広い組換え系統であること、組換え遺伝子中に 35S promoter が 1コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を過小評価する可能性が低い。なお、P35S-Taq は、他のプローブの半分の濃度(終濃度:0.1 $\mu$ mol/L)で使用するため、反応液の調製の際には留意する(定量機器に Roche LightCycler System を用いる場合には、これに当たらず、他のプローブと同濃度で使用する。)

#### 3.2.1.1.2. GA21 の定量

組換え系統 GA21 は、CaM 配列が組み込まれていない。したがって、本系統の含有率を確認するため、CaM 配列を分析するものと同じの DNA 試料液について、別に GA21 に特異的なプライマー対 GA21-3 とプローブ GA21-Taq を用い、3.2.1.1.1.と同様の方法で GA21 遺伝子のコピー数を算出し、GA21 の含有率を求める。

#### 3.2.1.1.3. 結果の判定

3試料につき、各1回の抽出を行い、得られた DNA 試料液について定量 PCR 行った結果、CaM 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率に GA21 の含有率を加えた値が4.5%を越える場合、さらに、別に2回の抽出を行い、計3回の抽出より得られた DNA 試料液について、それぞれトウモロコシ組換え系統特異的定量を行う。

### 3.2.1.2. トウモロコシ組換え系統特異的定量

#### 3.2.1.2.1. Event176、Bt11、T25 及び Mon810 の定量

GA21 については、3.2.1.1.2.と同様の方法で行う。組換え系統 Event176、Bt11、T25 及び Mon810 については、定量用プライマー対とプローブとして、それぞれ E176-2 と E176-Taq、Bt11-3 と Bt11-Taq、T25-1 と T25-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を用い、3.2.1.1.1.と同様の方法\*で Event176、Bt11、T25、Mon810 の各遺伝子のコピー数を算出し、Event176、Bt11、T25、Mon810 の系統別含有率を求める。

\* Roche LightCycler System を用いて Bt11 を対象とする測定を行う場合は、反応液組成 (MgCl<sub>2</sub>

濃度)が異なるため、注意する。組成を以下に示す。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes 2 $\mu$ L、対象プライマー対溶液(25 $\mu$ mol/L)0.4 $\mu$ L、対象プローブ溶液(10 $\mu$ mol/L)0.4 $\mu$ L、水11.4 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 溶液(25mM)0.8 $\mu$ L、10ng/ $\mu$ L DNA 試料液5 $\mu$ L(50ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液5 $\mu$ L、あるいは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE 溶液(ブランク試料液:NTC)5 $\mu$ L。

また、ABI PRISM™ 7500 を用いてトウモロコシ組換え系統特異的定量試験は行うことができない。

### 3.2.2. 結果の判定

3.2.1.1.2.で得られたGA21、Event 176、Bt11、T25 及び Mon810 の含有率について、1DNA 試料液ずつ総和を算出し、それらの平均が5%を越えた試料については、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。

## (別紙) 内標比

## ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.05	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.39	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.01	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	Event176	1.99	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び E176-2 と E176-Taq を使用
トウモロコシ	Bt11	0.44	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び Bt11-3 と Bt11-Taq を使用
トウモロコシ	T25	0.34	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び T25-1 と T25-Taq を使用
トウモロコシ	Mon810	0.38	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を使用

## ABI PRISM™ 7900HT 96well

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.38	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.99	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	Event176	2.02	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び E176-2 と E176-Taq を使用
トウモロコシ	Bt11	0.40	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び Bt11-3 と Bt11-Taq を使用
トウモロコシ	T25	0.34	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び T25-1 と T25-Taq を使用
トウモロコシ	Mon810	0.36	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を使用

## ABI PRISM™ 7900HT 384well

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.00	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.39	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.06	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

トウモロコシ	Event176	2.12	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び E176-2 と E176-Taq を使用
トウモロコシ	Bt11	0.43	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び Bt11-3 と Bt11-Taq を使用
トウモロコシ	T25	0.37	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び T25-1 と T25-Taq を使用
トウモロコシ	Mon810	0.38	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を使用

ABI PRISM™ 7000

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	0.95	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.35	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.83	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	Event176	1.93	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び E176-2 と E176-Taq を使用
トウモロコシ	Bt11	0.41	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び Bt11-3 と Bt11-Taq を使用
トウモロコシ	T25	0.40	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び T25-1 と T25-Taq を使用
トウモロコシ	Mon810	0.38	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を使用

ABI PRISM™ 7500

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.02	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.46	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.13	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

LightCycler System

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.01	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.53	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.63	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

トウモロコシ	Event176	2.60	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び E176-2 と E176-Taq を使用
トウモロコシ	Bt11	0.63	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び Bt11-3 と Bt11-Taq を使用
トウモロコシ	T25	0.31	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び T25-1 と T25-Taq を使用
トウモロコシ	Mon810	0.49	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を使用

(参考)

- (1) 2.2. DNA 抽出精製法のうち、2.2.1.2.及び 2.2.1.3.のシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)に用いられる AP1 及び AP2 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別にキアゲン(〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II. Tel. 03-5547-0811 Fax. 03-5547-0818)から購入可能である。
- (2) 2.2. DNA 抽出精製法のうち、2.2.1.4.及び 2.2.1.5.のシリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker)に用いられる GE1 及び GE2 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン(〒930-0982 富山市問屋町 1-29. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)から購入可能である。
- (3) 3. 安全性審査済の組換え DNA 技術応用食品の検査方法のうち、3.1.2.記載の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液(GM ダイズ(RRS)プラスミドセット-ColE1/TE-; GM Soybean (RRS) Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-; GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-)は、ニッポンジーン(〒930-0982 富山市問屋町 1-29. 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。
- (4) 3. 安全性審査済の組換え DNA 技術応用食品の検査方法のうち、3.1.2.1.1.及び 3.2.1.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、対象プローブは、ニッポンジーン、ファスマックから購入可能である。
- (5) 3. 安全性審査済の組換え DNA 技術応用食品の検査方法のうち、3.1.2.4.1.記載の Light Cycler System を用いた定量 PCR において使用する試薬類はロシュ・ダイアグノスティック(〒105-0014 東京都港区芝 2-6-1. Tel. 03-5443-5287 Fax. 03-5443-7098)から購入可能である。
- (6) 独立行政法人農林水産消費技術センター作成の 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」は下記ホームページから入手可能である。  
[http://www.maff.go.jp/sogo\\_shokuryo/jas/manual00.htm](http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm)