

事 務 連 絡

平成18年10月5日

各検疫所 御中

医薬食品局食品安全部監視安全課

輸入食品安全対策室

モニタリング検査の実施について

(中国産米加工品)

標記については、平成18年3月31日付け食安輸発第0331006号及び平成18年9月26日付け事務連絡により実施しているところですが、今般、検査法の一部を改良したことから、平成18年9月26日付け事務連絡の別添を別紙のとおり改正します。

別添(平成18年10月5日改正)

Bt63 米の定性 PCR 法

米加工品について、以下の定性 PCR を行う。なお、DNA 抽出精製は、イオン交換樹脂タイプキット法 (QIAGEN Genomic-Tip 20/G) を用いる。なお下記に示した 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日付け食発第 110 号, 最新改正食安発第 0629002 号) 2.1.1.2.1.と同様の方法で定性 PCR を行う。

イオン交換樹脂タイプキット法 (QIAGEN Genomic-Tip 20/G) *1

均一に粉碎調製された試料 1gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採る。同遠沈管にG2 緩衝液*2 7.5mLを加えてボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらにG2 緩衝液 7.5mL、並びに α -アミラーゼ*3 (1mg/mL) 200 μ Lを加え再びボルテックスミキサーで混合する。混合処理後、37°Cで 1 時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、Proteinase K*4 100 μ LならびにRNase A 20 μ Lを加えボルテックスミキサーで混合し、その後、50°Cで 2 時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。次いで、低温下 (4°C)、3,000 x g 以上の条件で 15 分間遠心する。遠心終了後得られる上清をポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に移す。移し終えた後、溶液中に浮遊する残存物を除くためさらに軽く遠心する。この遠心操作の間にQIAGEN Genomic-Tip 20/GをQBT緩衝液*2 1mLを用いて平衡化しておく。遠心操作終了後の上清を平衡化済みQIAGEN Genomic-Tip 20/Gに 2mLずつ数回に分けて負荷する。上清全量の負荷操作を終了した後、tipにQC緩衝液*2 2mLを負荷し、洗浄する。同様の洗浄操作を合計 3 回繰り返した後、tipを新しいポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に移し変える。洗浄操作終了後のtipに予め 50°Cに温めておいたQF 緩衝液*2 1mLを加えDNAを溶出する。同tipに対し、もう 1 度同様の溶出操作を行う。得られた計 2mLの溶出液に対し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、低温下 (4°C)、10,000 x g 以上の条件で 15 分間遠心し、沈殿*5を除かないよう注意を払いつつ上清のみを除く。上清を除いた後の遠沈管に 70% エタノール 1mLを加え、低温下 (4°C)、10,000 x g 以上の条件で 5 分間遠心する。上清を捨て、残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて 5 分間程度の真空乾燥処理を行う。このとき完全に乾燥しないように注意する。沈殿が乾燥したことを確認した後、水 100 μ Lを加え、65°C、5 分間の条件での加温処理、ならびにピペッティングによりDNAを溶解させ、DNA試料原液とする。

*1 本法は主に加糖、油脂処理、加熱混合、発酵などの処理が施された加工程度の高い検査対象検体に適用が可能である。

*2 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。

*3 SIGMA 社製 (Cat. No. A-6380)、または、同等の効力を持つものを用いる。

*4 QIAGEN 社製 (Cat. No. 19133)、または、同等の効力を持つものを用いる。

*5 この沈殿が抽出された DNA である。検査対象検体によっては DNA が極微量しか抽出されないため、目視する事が不可能な場合もあるが、遠沈管の底には沈殿があるということに注意を払いながら操作を行う。

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、0.16mmol/L dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、0.6μmol/L 5' 及び 3' プライマー*²並びに 0.8units Taq DNAポリメラーゼ*³ を含む液に、10ng/μLに調製したDNA試料液 5.0μL (DNAとして 50ng)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*⁴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 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 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°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、Bt63 米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*^{5,6} 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 Bt63 米検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (AC-3F) : 5' -GTT CGC CTA TGG AAC CTC TT-3'

R-primer (AC-3R) : 5' -TTC TGT GGT GGG ATT TCG TC-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 (SPSF) : 5' -TTG CGC CTG AAC GGA TAT-3'

R-primer (SPSR) : 5' -CGG TTG ATC TTT TCG GGA TG-3'

*6 陽性対照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℃ 30 秒間、56℃ 30 秒間、72℃ 30 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。

結果の判定

陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 81bpのPCR増幅バンドが検出され、Bt 63 米検出用プライマー対を用いたレーンで 90bp付近の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、Bt63 米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、100bp付近のPCR増幅バンドが検出された場合、本検体はBt63 米陽性と判定する。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。

*¹ Bt63 米確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (AC-1F) : 5' -GAC GGA ACA GAG TTC GCC TAT G -3'

R-primer (AC-1R) : 5' -TGT TCT GTG GTG GGA TTT CGT C-3'