

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  
第3版

平成24年9月24日



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

はじめに

安全性が確認された遺伝子組換え農産物とこれを原材料とする加工食品について、遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成12年3月31日農林水産省告示第517号）に基づき、遺伝子組換えに関する表示の義務化が平成13年4月から行われることとなった。遺伝子組換えに関する表示の対象となる農産物及びこれを原材料とする加工食品のうち、非遺伝子組換え農産物及びこれを原材料とする加工食品については、当該農産物及び原材料に関して、遺伝子組換えに関する表示義務はないものの、任意で「遺伝子組換えでない」旨の表示はできるが、非遺伝子組換え農産物について分別生産流通管理（IPハンドリング）が適切に行われていなければならない。

独立行政法人 農林水産消費技術センター（現独立行政法人 農林水産消費安全技術センター）において、遺伝子組換えに関する表示が適正に行われているかについてのモニタリングを行うに当たり、この検査分析方法の標準化のために本マニュアルを作成した。

遺伝子関連技術は、日進月歩の状態であり、本マニュアルに記載してある遺伝子組換え食品の分析方法についても、分析技術の向上に対応する必要がある。そのため、改訂履歴のとおり第3版として改訂することとした。

本マニュアルの主な改訂点は、新たに開発されたプライマー及びプラスミドを加えたことと、文言の修正及び統一を図り、編成を検査の流れに沿うよう基本操作編、分析試料取り扱い編、個別品目編（定性試験用）、定量的PCR編、分析試薬調製編及びコンタミネーション防止編の6編に変更したことである。遺伝子組換えに関する表示の対象となる加工食品の検査・分析に当たっては、マニュアルに記載された事項を遵守して行っていただきたい。

遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂履歴

版	改訂年月日	改訂内容
0	平成 13 年 4 月 1 日	新規 <ul style="list-style-type: none"> <li>・分析試料取り扱い編</li> <li>・基本操作編</li> <li>・個別品目編</li> <li>・分析試薬調製編</li> <li>・コンタミネーション防止編</li> <li>・定量的 PCR 編</li> </ul>
1	平成 13 年 5 月 25 日	内標比（別表.1）の追加 <ul style="list-style-type: none"> <li>・定量的 PCR 編</li> </ul>
2	平成 14 年 6 月 20 日	全編改訂 文言の修正及び統一を行った。 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第 7 条第 1 項及び生鮮食品品質表示基準第 7 条第 1 項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 5 1 7 号）における義務表示対象品目に、ばれいしょ加工食品が追加されたことに伴う分析法の追加を行った。 各編における変更は以下のとおり。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・分析試料取り扱い編                市販品検査時の買い上げ点数の追加した。                抽出法追加に伴う野帳記入要領を変更した。</li> <li>・基本操作編                章立ての変更を行った。（試験の概要、出典、適用の範囲、装置、試薬、操作、純度、記録及び備考）                抽出法にスピニングカラム及びイオン交換カラムを使用する方法を追加した。                ばれいしょ加工食品からの組換え体検知法を記載した。                PCR に、独立行政法人食品総合研究所を中心に開発された方法を採用し、記載した。                ばれいしょ用のプライマーを記載した。</li> <li>・個別品目編                前処理法が、定量試験と混同することのないように編題を「個別品目編（定性試験用）」とした。                適用範囲、使用機器を記載した。                ばれいしょ加工食品の前処理法を記載した。                抽出法の追加に伴うサンプル採取量を記載した。</li> <li>・分析試薬調製編                プライマーの使用法を、詳しく記載した。</li> <li>・定量的 PCR 編                章立ての変更を行った。（試験の概要、出典、適用の範囲、装置、試薬、操作、反応の解析、測定のやり直し、定量下限、記録及び備考）                定量的 PCR に適した DNA の抽出法について記載した。</li> </ul>
3	平成 24 年 9 月 24 日	各編について文言の修正及び統一を図るとともに改訂履歴の後に目次を追記した。 また、各編の順序を検査の流れに沿うよう変更した。 各編における変更は以下のとおり。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・基本操作編                認証標準物質の利用に関して追記した。                雑誌掲載予定であった文献のタイトルを実際に掲載された際のタイトルに変更した。</li> </ul> とうもろこし内在性遺伝子検知用プライマー対（SSIIb-3）を追加した。

・ 定量的 PCR 編

雑誌掲載予定であった文献のタイトルを実際に掲載された際のタイトルに変更した。

Primer・Probe Mix について、とうもろこし内在性遺伝子検知用試薬(SSIIb-3)を追加した。

標準プラスミド DNA 溶液について、ColE1/TE を使用した GM 大豆(RRS)プラスミドセット及び GM とうもろこしプラスミドセットを追加した。

NTC 用 ColE1/TE 溶液を追加した。

出願中であった特許について、特許番号を記載した。

内標比の表「別表 3.」を追加した。

## 目 次

### I 基本操作編

i) はじめに	1
ii) 試験における一般事項	1
iii) 試薬の管理	2
1 試料の買い上げ、整理	2
2 試料の前処理及びサンプリング	2
3 DNA 抽出	2
3. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出	2
3. 1. 1 試験の概要	2
3. 1. 2 出典	2
3. 1. 3 適用範囲	2
3. 1. 4 装置	2
3. 1. 5 試薬	3
3. 1. 6 抽出操作	3
3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出A	3
3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出B	4
3. 1. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算	4
3. 1. 8 抽出される DNA の純度	4
3. 1. 9 記録	5
3. 1. 10 備考	5
3. 2 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出	5
3. 2. 1 試験の概要	5
3. 2. 2 出典	5
3. 2. 3 適用範囲	5
3. 2. 4 装置	6
3. 2. 5 試薬	6
3. 2. 6 抽出操作：QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出	7
3. 2. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算	7
3. 2. 8 抽出される DNA の純度	7
3. 2. 9 記録	7
3. 2. 10 備考	7
3. 3 CTAB を用いた DNA の抽出	7
3. 3. 1 試験の概要	7
3. 3. 2 出典	7
3. 3. 3 適用範囲	8
3. 3. 4 装置	8
3. 3. 5 試薬	8
3. 3. 6 抽出操作	8

3. 3. 7	抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算	9
3. 3. 8	抽出される DNA の純度	9
3. 3. 9	記録	9
4	PCR 増幅及びゲル電気泳動	9
4. 1	試験の概要	9
4. 2	出典	10
4. 3	適用範囲	10
4. 4	装置	10
4. 4. 1	PCR	10
4. 4. 2	ゲル電気泳動	10
4. 5	試薬	11
4. 5. 1	PCR	11
4. 5. 2	ゲル電気泳動	12
4. 6	操作	12
4. 6. 1	PCR 操作	12
4. 6. 2	ゲル電気泳動	13
4. 6. 2. 1	前染色によるゲル電気泳動	13
4. 6. 2. 2	後染色によるゲル電気泳動	13
4. 7	PCR の成否	14
4. 8	特異性及び検知感度	14
4. 9	記録	14
5	結果の判定	15

## II 分析試料取り扱い編

1.	はじめに	19
2.	市販品の購入	19
3.	市販品検査台帳等の記入	19
4.	市販品の検査分析	20
5.	試料の保存及び廃棄	20
6.	結果の報告	20
	市販品検査台帳記入要領	21
	検査野帳記入要領	22

## III 個別品目編（定性試験用）

i)	はじめに	23
ii)	適用範囲	23
1	使用機器	23
2	農産物	24
2. 1	大豆（枝豆及び大豆もやしを含む。）	24
2. 2	とうもろこし	24

2. 3	ばれいしょ	24
3	農産物加工食品	24
3. 1	大豆加工食品	25
3. 1. 1	豆腐・油揚げ類	25
3. 1. 2	凍豆腐、おから及びゆば	25
3. 1. 3	納豆	26
3. 1. 4	豆乳類	26
3. 1. 5	みそ	26
3. 1. 6	大豆煮豆	26
3. 1. 7	大豆缶詰及び大豆瓶詰	26
3. 1. 8	きな粉	26
3. 1. 9	大豆いり豆	27
3. 1. 10	「3. 1. 1」から「3. 1. 9」までに掲げるものを 主な原材料とするもの	27
3. 1. 11	大豆（調理用）を主な原材料とするもの	27
3. 1. 12	大豆粉を主な原材料とするもの	27
3. 1. 13	大豆たん白を主な原材料とするもの	28
3. 1. 14	枝豆を主な原材料とするもの	28
3. 1. 15	大豆もやしを主な原材料とするもの	28
3. 2	とうもろこし加工食品	28
3. 2. 1	コーンスナック菓子	28
3. 2. 2	コーンスターチ	28
3. 2. 3	ポップコーン	28
3. 2. 4	冷凍とうもろこし	29
3. 2. 5	とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰	29
3. 2. 6	コーンフラワーを主な原材料とするもの	29
3. 2. 7	コーングリッツを主な原材料とするもの (コーンフレークを除く。)	29
3. 2. 8	とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの	29
3. 2. 9	「3. 2. 1」から「3. 2. 5」までに掲げるものを 主な原材料とするもの	29
3. 3	ばれいしょ加工食品	29
3. 3. 1	乾燥ばれいしょ	30
3. 3. 2	冷凍ばれいしょ	30
3. 3. 3	ばれいしょでん粉	30
3. 3. 4	ポテトスナック菓子	30
3. 3. 5	乾燥ばれいしょ、冷凍ばれいしょ、ばれいしょでん粉及び ポテトスナック菓子を主な原料とするもの	30
3. 3. 6	ばれいしょ（調理用）を主な原材料とするもの	31

## IV 定量的 PCR 編

1. 1 定量的検知技術について	33
1. 1. 1 遺伝子組換え(GM)農作物の育成・栽培の実態	33
1. 1. 2 遺伝子組換え体を検知するために必要な情報・試料	34
1. 1. 3 遺伝子組換え体の検知技術の現状	34
1. 1. 4 本マニュアル記載の検知技術の特徴	35
1. 1. 5 検知技術の問題点	37
1. 2 試験の概要	39
2 出典	39
3 適用範囲	39
4 装置	39
4. 1 試料の前処理及び DNA の抽出	39
4. 2 定量	39
5 試薬	40
5. 1 試料の前処理及び DNA の抽出	40
5. 2 定量	40
6 操作	41
6. 1 試料の前処理及び試料の抽出	41
6. 1. 1 試料の前処理	41
6. 1. 2 DNA の抽出	41
6. 2 定量	42
6. 2. 1 反応液の調製	42
6. 2. 2 装置本体へのプレートのセット	44
7 反応後の解析	45
8 測定のやり直し	46
9 定量下限	46
10 記録	46
11 備考	46
様式 1. Th.Line 決定表	49
様式 2. 混入率算出表①	50
様式 3. 混入率算出表②	51

## V 分析試薬調製編

はじめに	53
調製試薬一覧	53
(1) 滅菌水	54
(2) 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	54
(3) 1 mol/L Tris-HCl	54
(4) 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	55



(5)	0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	55
(6)	TE	55
(7)	CTAB 抽出液	56
(8)	CIA	56
(9)	PCI	56
(10)	ゲルローディング緩衝液 (ブルージュース)	57
(11)	TAE	58
(12)	TBE	58
(13)	DNA 分子量マーカー	59
(14)	プライマーの使用法	59
(15)	プロテインアーゼ K	60

## VI コンタミネーション防止編

1	はじめに	61
2	全体としての考え方	61
3	実験操作	61
3.1	サンプリング	61
3.2	DNA の抽出	62
3.3	PCR	62
3.4	電気泳動	62
4	日常管理	63
4.1	滅菌水	63
4.2	一般試薬	63
4.3	プライマー (試薬調製編を参照)	63
4.4	オートクレーブ	63
4.5	クリーンベンチ	63
4.6	実験室	64



# I 基本操作編



## i) はじめに

安全性が確認された遺伝子組換え農産物とこれを原材料とする加工食品について、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）の遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準に基づき、遺伝子組換えに関する表示の義務化が平成13年4月から行われることとなった。遺伝子組換えに関する表示の対象となる農産物及びこれを原材料とする加工食品のうち、非遺伝子組換え農産物及びこれを原材料とする加工食品については、当該農産物及び原材料に関して、遺伝子組換えに関する表示の義務はないものの、任意で「遺伝子組換えでない旨」の表示はできるが、非遺伝子組換え農産物について IP ハンドリングが適切に行われていなければならない。

農林水産消費技術センター（現農林水産消費安全技術センター）において、遺伝子組換えに関する表示が適正に行われているかについてのモニタリングを行うに当たり、この検査分析方法の標準化のために本マニュアルを作成した。

試験は、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）法による組換え遺伝子の定性検出法による。本編では、遺伝子組換え食品分析のための試験法を示してある。

なお、内部質管理において、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所、欧州委員会共同研究センターの標準物質計測研究所（Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM）及びアメリカ油化学会（American Oil Chemists' Society, AOCS）で販売している認証標準物質（certified reference materials, CRMs）又は自家調製した管理試料（自家標準物質：house reference materials, HRMs）を用いることもできる。

試験の流れを下に示し、これに沿って記述していく。

1. 試料の買い上げ、整理  
↓
2. 試料の前処理及びサンプリング  
↓
3. デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid, DNA）抽出  
↓
4. PCR 増幅及びゲル電気泳動  
↓
5. 結果の判定

## ii) 試験における一般事項

PCR では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので目的外の DNA（特に PCR 産物）の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面等から分泌されている DNA 分解酵素（deoxyribonuclease, DNase）の混入を防止しなければならない。そのため、本マニュアルのコンタミネーション防止編を参照し、適切な操作を行うが、特に次のような配慮も必要である。

（1）溶液類は、熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は、電気伝導率 0.0056 mS/m（25 °C）以下になるように脱イオン化されたものを用い、滅菌水は、純水を 121 °C、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

（2）チップやチューブ類は必ず使い捨てとし、洗ったものを再使用しない。

（3）マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 mL と 0.2 mL 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌をし、その後、乾燥器に入れ完全に乾かしてから用いる。あるいは、可能なものについては乾熱滅菌を行う。

（4）DNA を操作するときは、必要に応じてクリーンベンチを使用するとともに、実験台上をエタ

ノールで消毒し、必ずゴム手袋をはめ、作業中も頻繁にエタノールで消毒すること。ゴム手袋はパウダーなしのものを用いるか、パウダーを洗い落としてから使用する。

(5) 滅菌水や Tris-EDTA (TE) 緩衝液に DNase が混入すると被害が広がるので、この2つの溶液は実験者ごとに別々に作製し、頻繁に（少なくとも月に一回程度）作り直す。

### iii) 試薬の管理

遺伝子関連の実験では、強力な変異原性物質等を用いる場合もあるので、試薬や廃液の管理をしっかり行う必要がある。試薬管理マニュアル及び本マニュアル分析試薬調製編を参照し適切な管理を行うこと。

#### 1 試料の買い上げ、整理

市販品は本マニュアル分析試料取り扱い編に従う。

市販品は、通常、1商品につき3点の買い上げを行う。

#### 2 試料の前処理及びサンプリング

本マニュアル個別品目編（定性試験用）による。

#### 3 DNA 抽出

抽出は、買い上げた1点の試料につき1点とする。すなわち買い上げ点数だけ抽出が行われる。

シリカスピнкаラムを使用した方法、イオン交換カラムを使用した方法又はセチルトリメチルアンモニウムブロミド (cetyl-trimethyl ammonium bromide, CTAB) を使用した方法により DNA を抽出する。PCR に適した DNA の抽出ができ、また、環境保全や実験従事者の健康面を考慮し、シリカスピнкаラム又はイオン交換樹脂カラムを使用する方法が望ましい。以下に、シリカスピнкаラムを使用した方法として QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit (# 68163)、イオン交換樹脂カラムとして QIAGEN 社 Genomic-tip 20/G (# 10223) を使用した方法を示す。DNeasy Plant Maxi kit 及び Genomic-tip 20/G に限定するものではなく、手順についても、これに限定するものではない。しかし、同程度の品質（注1）の DNA が抽出できることを確認した上で試験を行わなければならない。

##### 3. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出

###### 3. 1. 1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNA 分解酵素 (ribonuclease, RNase) 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を高塩濃度緩衝液によりシリカゲルに吸着させ、低濃度緩衝液又は滅菌水を用いて溶出する。

###### 3. 1. 2 出典

Kuribara, Hideo; Shindo, Yoichiro; Matsuoka, Takeshi; Takubo, Ken; Futo, Satoshi; Aoki, Nobutaro; Hirao, Takashi; Akiyama, Hiroshi; Goda, Yukihiko; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. J. AOAC Int. 2002, vol. 85, p. 1077-1089. で用いられた DNA の抽出方法と同一である。

###### 3. 1. 3 適用範囲

本マニュアル個別品目編（定性試験用）を参照のこと。

###### 3. 1. 4 装置

スイング式遠心機：50 mL のポリプロピレンチューブを 3,000×g で遠心可能なもの。

冷却遠心機：2 mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる（注2）。

恒温水槽

試験管ミキサー

### 3. 1. 5 試薬

QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit

### 3. 1. 6 抽出操作

#### 3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、10-100  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 20  $\mu$ L の RNase (kit 添付品)、及び 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 10 mL の Buffer AP1 (kit 添付品、65 °C) を直接添加し、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (2) 65 °C の恒温水槽中で 1 時間保温する。（15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。）
- (3) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 10 分間遠心分離する。
- (4) 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 7 mL 採取し、新しい 15 mL (又は 50 mL) 容チューブに移す。
- (5) チューブに、1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 2.5 mL の Buffer P3 (旧名称：AP2 buffer) (kit 添付品) を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 35 分間遠心分離する。
- (7) 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 8 mL 採取し、QIA shredder spin column (lilac) に負荷する。
- (8) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で、室温で 5 分間遠心分離する。
- (9) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて上清を 7.5 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (10) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 6.8 mL を採取し、新しい 50 mL チューブに移す。
- (11) 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 10.2 mL の Buffer AW1 (旧名称：AP3/Et-OH buffer) (kit 添付品) を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column (colorless) に負荷する。
- (12) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 15 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。
- (13) 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いてカラムに 12 mL の Buffer AW2 (旧名称：AW buffer) (kit 添付品) を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 15 分間遠心分離する。
- (14) カラムを新しい 50 mL チューブに移し、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、カラムに温めておいた 1 mL 滅菌水 (65 °C) を加える。
- (15) 5 分間室温で静置後、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 10 分間遠心分離する。
- (16) 100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて溶出液の液量を測り、2 mL のサンプルチューブに移す。100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。

- (17) 上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (18) 遠心分離器を使用し、12,000×g で 4 °C、15 分間遠心分離後、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (19) 100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 500 μL の 70 %エタノールを添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。
- (20) 遠心分離器を使用し、12,000×g で 4 °C、3 分間遠心分離後、100-1,000 μL 容のマイクロピペット又は 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (21) 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて 100 μL の TE (pH 8.0)緩衝液を加え、沈殿物を溶解させる（備考参照）。
- (22) 指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し、最後に一晚（12-24 時間）冷蔵庫に静置する。
- (23) 目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×g で 4 °C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20 °C 以下で保存すること。

### 3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、0.5-10 μL 容のマイクロピペットを用いて 10 μL の RNase (kit 添付品)、及び 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 5 mL の Buffer AP1 (65 °C) を直接添加し、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (2) 65 °C の恒温水槽中で 1 時間保温する（15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。）。
- (3) チューブに、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、1.8 mL の Buffer P3 (旧名称：AP2 buffer) を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 15 分間遠心分離する。
- (5) 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 4.2 mL 採取し、QIA shredder spin column (lilac) に負荷する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 5 分間遠心分離する。
- (7) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて上清を 4 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (8) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 3.4 mL を採取し、新しい 50 mL チューブに移す。
- (9) 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 5.1 mL の Buffer AW1 (旧名称：AP3/Et-OH buffer) を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌する。デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column (colorless) に負荷する。
- (10) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。

以下、操作 (11) ~ (21) として、「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」の (13) ~ (23) をそれぞれ読み替えて操作する。

### 3. 1. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

抽出後の DNA 溶液は、0.5-10 μL 容のマイクロピペットを用いて 5 μL を採り、TE 緩衝液を加えて 50 μL にし 200 ~ 300 nm の範囲で紫外吸光スペクトルを測定し、230、260 及び 280 nm の吸光度を測定する（注 3）。1 O.D. 260 nm を 50 ng/μL DNA 溶液（注 4）として DNA 濃度を算出し、滅菌水に



より PCR 用の溶液 (10 ng/μL) を調製する (注 5)。濃度が薄い場合は再度抽出を行う。再抽出した DNA も濃度が薄い場合には、そのまま用いる。

### 3. 1. 8 抽出される DNA の純度

本法により、大豆種子及びとうもろこし種子においては、O.D.260 nm/O.D.280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 程度になる。

### 3. 1. 9 記録

希釈倍率と吸光度値及び吸光度の比を記録する。また、PCR 用 DNA 溶液を得るために特別に行った操作があれば、詳細に記録すること。

### 3. 1. 10 備考

「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」の操作 (21) は、抽出される DNA 量によって、適宜、希釈量を変更する。大豆種子においては TE 100 μL、とうもろこし及びとうもろこし加工食品においては、TE 50 μL で行うと良い。

PCR に必要な濃度の DNA 溶液が得られなかった場合は、以下の対策を行う。

- ① 得られた DNA 溶液を、エタノール沈殿等を行い濃縮する。
- ② 最初から DNA 抽出をやり直し、「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」の操作 (21) で、DNA の融解に用いる TE を 20 μL にする。

それでも、PCR に必要な濃度の DNA 溶液が得られない場合は、最終的な DNA 溶液を PCR 用 DNA 溶液とする。その場合は、PCR 用 DNA 溶液の DNA 量を記録すること。

(注 1) 同程度の品質とは、抽出した DNA 溶液の O.D.260 nm/O.D.230 nm 比だけでなく、本マニュアル個別品目編 (定性試験用) に記載した多くの品目に対し、PCR に適した DNA の抽出ができることをいう。さらに、当センターでは、当該農産物から DNA を抽出し、本マニュアル定量的 PCR 編に基づき内在性遺伝子の定量を行い、比較することにより確認している。

(注 2) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注 3) DNA は、230 nm で吸収極小を示し、260 nm で吸収極大を示す。また、タンパク質等不純物は、280 nm 付近に吸収を示す。

(注 4) Sambrook, J., Russel, D. W. "Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd Ed. (volume 3)", Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, A8.20. (ISBN 0-87969-577-3 (pbk), ISBN 0-87969-576-5 (cloth))

(注 5) 抽出される DNA 量によって、適宜、希釈量は変更する。

## 3. 2 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出

### 3. 2. 1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を低塩濃度緩衝液によりイオン交換樹脂カラムに吸着させ、高濃度緩衝液を用いて溶出する。

### 3. 2. 2 出典

製品添付のプロトコールを「組換え DNA 技術応用食品の検査法について (平成 13 年 3 月 27 日食発第 110 号厚生労働省医薬局食品保健部長通知)」及び「組換え DNA 技術応用食品の検査法について (一部改正) (平成 13 年 5 月 25 日食発第 158 号厚生労働省医薬局食品保健部長通知)」を参考に、改変している。

### 3. 2. 3 適用範囲

本マニュアル個別品目編（定性試験用）を参照のこと。

### 3. 2. 4 装置

スイング式冷却遠心機：50 mL のポリプロピレンチューブを 3,000×g で遠心可能なもの。

冷却遠心機：2 mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10 μL、10-100 μL、100-1,000 μL、1,000-5,000 μL 容等を用いる（注1）。

恒温水槽

試験管ミキサー

### 3. 2. 5 試薬

イオン交換樹脂カラム：QIAGEN 社 QIAGEN Genomic-tip 20/G (# 10223)

RNase A：QIAGEN 社 RNase A (# 19101)

Proteinase K：QIAGEN 社 QIAGEN Proteinase K (# 19131 又は 19133)

G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液（注2）

### 3. 2. 6 抽出操作：QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、1,000-5,000μL 容のマイクロピペットを用いて 7.5 mL の G2 緩衝液、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 200 μL の QIAGEN Proteinase K、及び 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて 20 μL の RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (3) 50 °C の恒温水槽中で 1 時間保温する（15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。）。
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で 4 °C で 15 分間遠心分離する。
- (5) 15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。
- (6) チューブをフラッシュ遠心する。
- (7) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (8) 100-1,000 μL 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (9) tip に、100-1,000 μL 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。
- (10) (9) のカラムの洗浄操作を、更に 2 回行う。
- (11) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 750 μL の QF 緩衝液(50 °C)を加え、DNA を溶出する（溶出 1）。
- (12) tip を新しい 1.5mL 容チューブに移し、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 750 μL の QF 緩衝液(50 °C)を加え、DNA を溶出する（溶出 2）。
- (13) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて等量のイソプロパノールをそれぞれ添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置

する。

- (14) 遠心分離器(アングルロータ)を使用し、12,000×gで4℃、15分間遠心分離後、200-1,000 μL容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (15) 100-1,000 μL容のマイクロピペットを用いて1,000 μLの70%エタノールを添加し、上下にゆっくり10回転倒混和する。
- (16) 遠心分離器(アングルロータ)を使用し、12,000×gで4℃、3分間遠心分離し、100-1,000 μL容のマイクロピペット又は10-100 μL容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (17) 10-100 μL容のマイクロピペットを用いて溶出2のチューブに50 μLのTE(pH 8.0)を加え、沈殿物を65℃で15分間振とう溶解させる。
- (18) 10-100 μL容のマイクロピペットを用いて溶出2のチューブの液を全量、溶出1のチューブに入れ、DNAを65℃で15分間振とう溶解する。
- (19) 指先でチューブをはじき、(12-24時間)冷蔵庫に静置する。
- (20) 目視で不溶物がないことを確認し、これをDNA抽出溶液とする。24時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×gで4℃、3分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20℃以下で保存すること。

以下、操作(21)～(27)として、「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」の操作(17)～(23)をそれぞれ読み替えて操作する。

### 3.2.7 抽出DNAの確認及び抽出DNA量の計算

3.1.7に同じ。

### 3.2.8 抽出されるDNAの純度

本法により、大豆種子及びとうもろこし種子においては、O.D.260 nm/O.D.280 nm比が1.7～2.0程度になる。

### 3.2.9 記録

3.1.9に同じ。

### 3.2.10 備考

3.1.10に同じ。ただし、「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」の操作(21)は、「3.2.6 抽出操作: QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」の操作(17)に読み替えて操作する。

(注1) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注2) 製品添付のプロトコールに従い作製する。Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (#13323) 又は、Genomic DNA buffer set (#19060) を購入しても良い。

## 3.3 CTABを用いたDNAの抽出

### 3.3.1 試験の概要

抽出緩衝液中に試料を溶解し、夾雑物及びタンパク質の除去、RNase処理を行い、DNAを抽出する。CTABを溶出液とすることで、多糖類等が抽出されるのを避けている。

### 3. 3. 2 出典

Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 1980, vol. 8, p. 4321-4325. を一部改変している。

### 3. 3. 3 適用範囲

本マニュアル個別品目編（定性試験用）を参照のこと。

### 3. 3. 4 装置

冷却遠心機：2 mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる（注1）。

恒温水槽

試験管ミキサー

### 3. 3. 5 試薬

本マニュアル分析試薬調製編を参照のこと。

### 3. 3. 6 抽出操作

#### (1) 試料の溶解

試料適量を乳鉢に採取（注2及び3）し、石英砂少々、CTAB抽出液2 mLを加え、磨砕して、1.5 mL チューブへ移す（注4：プロテイナーゼ処理）。

60 °C、30 分間インキュベートした後、14,000 rpm、3 分間遠心分離（注5）する。

上清約 700  $\mu$ L を採取して、新しいチューブへ移す。

#### (2) フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（PCI）除タンパク処理

試料溶液に等量の PCI を加え、2 分間激しく振り、14,000 rpm、15 分間遠心分離（注6）する。

上層を新しいチューブに採取する。

#### (3) クロロホルム-イソアミルアルコール（CIA）処理

試料溶液に等量の CIA を加え、2 分間激しく振り（注7）、14,000 rpm、3 分間遠心分離する。

上層を新しいチューブに採取する。

#### (4) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え（注8）、30 秒間チューブを転倒混和した後、12,000 rpm、3 分間遠心分離（注9）する。

上清を捨てる。

アルコール洗浄：70 %エタノール 800  $\mu$ L を加え、転倒混和し、3 分間静置した後、12,000 rpm、3 分間遠心分離する。

上清を捨て（注10）、5 分間真空乾燥（注11）する。

#### (5) DNA の溶解と RNA の除去

TE 100  $\mu$ L、RNase A（10 mg/mL）2  $\mu$ L を加え、DNA を溶解する。

室温又は 37 °C で 30 分間静置した後、400  $\mu$ L の CTAB 抽出液を加える。

#### (6) 再 CIA 処理

500  $\mu$ L の CIA を加えて軽く混和する。12,000 rpm、15 分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

#### (7) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え（注7）、30 秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、12,000 rpm、3 分間遠心分離（注8）する。

上清を捨て（注 10）、5 分間減圧乾燥（注 11）する。

（8）DNA の溶解

滅菌水 100  $\mu$ L を加え、DNA を溶解する（DNA 溶液）。溶液は小分けして -20  $^{\circ}$ C 以下で凍結保存する（注 12 及び 13）。

3. 3. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

3. 1. 7 に同じ。

3. 3. 8 抽出される DNA の純度

大豆種子及びとうもろこし種子においては、O.D.260 nm/ O.D.280 nm 比が 1.8 ~ 2.0 程度になる。

3. 3. 9 記録

3. 1. 9 に同じ。また、「3. 3. 6 抽出操作」時の以下の点も記録する。

（1）PCI 除タンパク処理のチューブの様子

（2）アルコール沈殿の試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、遠心分離し、上清を捨てたときの沈殿の様子

（注 1）マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

（注 2）試料は秤量採取するが、あまり多すぎるとフェノール除タンパク処理の時に中間層が多くなり、後の操作が困難になる。

（注 3）薬包紙の代わりに滅菌した乳鉢を包んでいたアルミ箔を使うと良い。試料を採取するときは、滅菌した薬さじを使用する。素手で触らない。

（注 4）プロテイナーゼ処理：あらかじめタンパク質が多く PCI 処理で中間層が多くなることが予想される試料については、プロテイナーゼ K (20 mg/mL) 溶液を各チューブ当たり 20  $\mu$ L 程度加えると中間層を減らすことができる。

（注 5）遠心機は Centrifuge 5417R (Eppendorf 社製) の場合を想定。約 16,000 $\times$ g。一般には、最大遠心でよい。

（注 6）このとき、チューブの様子をノートに記録すること。ピペット操作は、中間層を吸い込まないように気をつける。また、処理がうまくいかないときは遠心分離をやり直すか、もう一度 PCI 除タンパク処理をする。遠心分離は全て室温で行う。低温で行うと、CTAB が沈殿して失敗する。

（注 7）水層からフェノールを除くための操作。

（注 8）DNA を沈殿させるわけだが、試料溶液の塩濃度や糖類の量によって条件が変わることもある。

（注 9）約 13,000 $\times$ g。

（注 10）上清を採取してから、フラッシュ遠心 (5,000 ~ 12,000 rpm、数秒) をかけて、再度上清を採取すると、きれいに液を除くことができる。このとき沈殿がゲル状の場合には、アルコール洗浄を繰り返すと、ある程度改善される。

（注 11）遠心濃縮機又は小型のデシケータを使う。乾燥の具合は目視で確認する。

（注 12）DNA の溶解には TE を用いてもよいが、TE に含まれる EDTA が PCR バッファー中のマグネシウムイオンを捕捉して PCR 反応に影響を与える可能性があるため、ここでは滅菌水を用いる。

（注 13）凍結・融解を繰り返さないよう小分けして保存し、使い捨てとするのがよい。

## 4 PCR 増幅及びゲル電気泳動

### 4. 1 試験の概要

抽出 DNA を鋳型とし、DNA ポリメラーゼ、遺伝子組換え体に特異的なプライマー対を用い、PCR を行う。その後、電気泳動、紫外線照射下での可視化を行い、予想される長さの PCR 産物が得られるか否かにより、試料中に遺伝子組換え体が含まれていたかを判定する。同時に、抽出した DNA が PCR 増幅に適していることを確認するために、各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、目的の PCR 産物が得られることを確認する。

#### ※エチジウムブロミドについて

この試薬は、2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な変異原性がある。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。廃液は、必ず処理した後に捨てること。

#### ※エチジウムブロミドの処理

エチジウムブロミド処理用の器具が市販されているので、それを利用する。高濃度の場合は、処理に出すこと。

### 4. 2 出典

PCR、大豆及びとうもろこしのプライマーについては、Kuribara, Hideo; Shindo, Yoichiro; Matsuoka, Takeshi; Takubo, Ken; Futo, Satoshi; Aoki, Nobutaro; Hirao, Takashi; Akiyama, Hiroshi; Goda, Yukihiro; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. J. AOAC Int. 2002, vol. 85, p. 1077-1089 及び Kodama, Takashi; Kuribara, Hideo; Minegishi, Yasutaka; Futo, Satoshi; Watai, Masatoshi; Sawada, Chihiro; Watanabe, Takahiro; Akiyama, Hiroshi; Maitani, Tamio; Teshima, Reiko; Furui, Satoshi; Hino, Akihiro; Kitta, Kazumi. Evaluation of Modified PCR Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using Reference Molecules: Interlaboratory Study. J. AOAC Int. 2009, vol. 92, p. 223-233.による。ばれいしょのプライマーについては、「組換え DNA 技術応用食品の検査法について」による。電気泳動操作については、製品添付のプロトコールによる。

### 4. 3 適用範囲

大豆については、遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soy (40-3-2 系統) の特異的検知。

とうもろこしについては、遺伝子組換えとうもろこし Bt11、Event176、T25、MON810 及び GA21 の 5 系統の特異的検知又は、スクリーニング。

ばれいしょについては、遺伝子組換えばれいしょ NewLeaf (Bt6 系統及び SPBT02-05 系統)、及び NewLeaf Plus (RBMT21-129 系統、RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統) の特異的検知。

なお、とうもろこしのスクリーニングについては、Cauliflower mosaic virus の 35S promoter を検知している。したがって、同配列を含む他の農産物ととうもろこしを混合して原材料とする加工食品には適用できない。

### 4. 4 装置

#### 4. 4. 1 PCR

サーマルサイクラー： MJ Research 社 PTC-200 DNA Engine, 宝酒造(株)製 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applid Biosystems 社 GeneAmp system 9700 (昇温モード: MAX)、又はこれらの機器を用いて行った PCR の結果と同等であるもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000 µL 容等を用いる (注 1)。

## 4. 4. 2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動装置：ミューピッド II 電気泳動装置（株式会社アドバンス製）又は同等品。

ゲルメーカー：電気泳動装置指定品。

トランスイルミネータ

写真撮影装置

マイクロピペット：0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる（注1）。

## 4. 5 試薬

## 4. 5. 1 PCR

DNA ポリメラーゼ：AmpliQ<sup>TM</sup> Gold（Applied Biosystems 社）又は同等品。

デオキシヌクレオシド三リン酸溶液：dNTP（2 mmol/L each）AmpliQ<sup>TM</sup> Gold 添付品。

塩化マグネシウム溶液：MgCl<sub>2</sub>（25 mmol/L）AmpliQ<sup>TM</sup> Gold 添付品。

PCR 用緩衝液：10 x PCR buffer II

プライマー対：表 4. 1（1）～（3）に示した検知対象に応じて、既製のプライマーを購入するか、合成する。既製のプライマー又はプライマー対については、(株)ニッポンジーン又は(株)ファスマックより購入する。増幅長については、表 4. 1（1）～（3）に示す。通常は、以下に示すプライマー又はプライマー対を購入すればよい。

《大豆用プライマー対》

- ・内在性遺伝子(*Le1*)検知用：(株)ニッポンジーン（# 313-05501）、又は(株)ファスマック（# S1-1M）、若しくは同バルク品。
- ・RRS specific 検知用：同（# 310-05511）、又は同（# S2-1M）、若しくは同バルク品。

《とうもろこし（スクリーニング）用プライマー対》（注2）

- ・内在性遺伝子（*SSIb*）検知用：①(株)ニッポンジーン（# 315-05441）、又は同バルク品。  
②同（# 312-06051）又は、(株)ファスマック（# M1-1M）、若しくは同バルク品。
- ・CaMV 35S promoter 検知用：同（# 317-05521）、又は同（# C1-1M）、若しくは同バルク品。
- ・GA21 specific 検知用：同（# 312-05451）、又は同（# M2-1M）、若しくは同バルク品。

《とうもろこし（系統）用プライマー対》（注2）

- ・内在性遺伝子（*SSIb*）検知用：①(株)ニッポンジーン（# 315-05441）、又は同バルク品。  
②同（# 312-06051）、又は(株)ファスマック（# M1-1M）、若しくは同バルク品。
- ・GA21 specific 検知用：同（# 312-05451）、又は同（# M2-1M）、若しくは同バルク品。
- ・Bt11 specific 検知用：同（# 319-05461）、又は同（# M3-1M）、若しくは同バルク品。
- ・Event176 specific 検知用：同（# 316-05471）、又は同（# M4-1M）、若しくは同バルク品。
- ・T25 specific 検知用：同（# 313-05481）、又は同（# M5-1M）、若しくは同バルク品。
- ・MON810 specific 検知用：同（# 310-05491）、又は同（# M6-1M）、若しくは同バルク品。

《ばれいしょ用プライマー》（注3）

- ・内在性遺伝子検知用（Pss 定性用）：(株)ニッポンジーン（# 316-05231）、又は(株)ファスマック（# G5-1）、又は同バルク品、若しくは合成品。
- ・NewLeaf specific 検知用：
- ・NewLeaf Plus specific 検知用：同（# 312-05191）、又は同（# G1-1）、又は同バルク品、若しくは合成品。

標準プラスミド溶液（注4）：(株)ニッポンジーン、又は(株)ファスマックより購入する。

《大豆用標準プラスミド》

- ・GM 大豆（RRS）陽性コントロールプラスミド：(株)ニッポンジーン（# 311-04941）、又は(株)ファスマック（# PS-1）、若しくは同バルク品。

《とうもろこし用標準プラスミド》

- ・GM とうもろこし陽性コントロールプラスミド：(株)ニッポンジーン（# 314-04811）、又は(株)ファスマック（# PM-1）、若しくは同バルク品。

《ばれいしょ用標準プラスミド》（注3）

- ・GM ばれいしょ（NewLeaf Plus）陽性コントロールプラスミド：(株)ニッポンジーン（# 311-05301）、又は(株)ファスマック（# PP-1）、若しくは同バルク品。

#### 4. 5. 2 ゲル電気泳動

アガロースゲル

Tris-ホウ酸-EDTA（TBE）、又は Tris-酢酸-EDTA（TAE）緩衝液

エチジウムブロミド

ゲルローディング緩衝液（ブルージュース）

DNA 分子量マーカー：PCR 産物の増幅長に適したマーカーを使用する。100 bp ラダーマーカー等が適当である。

#### 4. 6 操作

##### 4. 6. 1 PCR 操作

準備

使用するチューブ、チップは使い捨てとし、使用のできるだけ直前に 121 °C、15 分以上オートクレーブ滅菌しておくこと。

操作に当たっては、専用のゴム手袋を着用すること。

操作は氷上で行う。

##### (1) 必要な PCR チューブの本数

PCR は、抽出後の DNA 溶液 1 点につき 1 本ずつ行う。抽出した DNA で PCR 増幅ができることを確認するために、必ず各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、予想される長さの PCR 産物が得られることを確認する。その他、内在性遺伝子検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注5）と、各農産物に対応した標準プラスミドを使用したポジティブコントロールを用意する（注6）。組換え体検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注5）を用意する。さらに、各 PCR 装置一回の反応につき、標準プラスミドを鋳型として、プライマー対を含まないネガティブコントロールを一本以上用意する（注7及び8）。

##### (2) マスターミックスの調製

PCR 反応液の組成は「表 4. 2 PCR 反応液の組成」に定める。プライマー対以外を先に混合した後に、プライマー対を混合する。PCR を行う試料数にあわせて、滅菌した 0.2 mL チューブを用意する。この本数にあわせ、全体の使用量を決め（注9）、表の液量と比較して適当な倍率になるように、鋳型 DNA を除く各液を混合調製する。これを反応チューブに各 22.5 µL 分取する。



プライマー対なしのネガティブコントロールについては、別にプライマー対を含まないマスターミックスを用意する。なお、マイクロピペットの最小容量に注意すること。

(3) 試料の添加

分取したマスターミックスに鋳型 DNA 溶液 2.5  $\mu$ L を加える。

試料の添加は、抽出 DNA、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの順に行う。

(4) PCR 増幅

全ての溶液を加えたら、PCR 増幅装置にかける。PCR の温度条件は「表 4. 3 温度サイクル」に定める。

(5) 増幅後の処理

反応終了後は冷蔵若しくは冷凍保存するか、又は直ちに電気泳動を行う。

4. 6. 2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動は、「4. 6. 2. 1 前染色によるゲル電気泳動」又は、「4. 6. 2. 2 後染色によるゲル電気泳動」を行う。

本マニュアルではミューピッド II 電気泳動装置を用いることを想定して記述してある。

準備

この段階では、特に滅菌した器具を用いる必要はない。

危険防止のためゴム手袋を使用すること。

4. 6. 2. 1 前染色によるゲル電気泳動

(1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3 %アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液（注 10 及び 11）を加え、加熱してアガロースを溶解する（注 12）。ゲルが均一になった時点で、100 mL 当たり 50  $\mu$ g エチジウムブロミドを含むようにエチジウムブロミド溶液を加える。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける（注 13）。30 分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く（注 14）。

(2) 泳動槽の準備

DNA の泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする（注 15）。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液（TBE）を満たす（注 10 及び 16）。

(3) 電気泳動

PCR 後の試料 DNA 溶液 5  $\mu$ L に 1  $\mu$ L のゲルローディング緩衝液を加え（注 17）、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時に DNA 分子量マーカーも泳動する（注 18）。

試料を間違いなく注入できたら、100 V の電圧で電気泳動を行う（注 19）。ゲルローディング緩衝液に含まれるブロモフェノールブルー（bromophenol blue, BPB）がゲルの 1/2 まで進んだところで電気泳動を止める（注 20）。

速やかに、泳動写真の撮影を行う（注 21）。

(4) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ（注 22）をしき、その上にゲルを置き紫外線を照射する（注 23）。CCD (charge coupled device) カメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA 分子量マーカーと比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

#### 4. 6. 2. 2 後染色によるゲル電気泳動

##### (1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3 %アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液（注 10 及び 11）を加え、加熱してアガロースを溶解する（注 12）。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける（注 13）。30 分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く（注 14）。

##### (2) 泳動槽の準備

DNA の泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする（注 15）。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液（TBE）を満たす（注 10 及び 16）。

##### (3) 電気泳動

PCR 後の試料 DNA 溶液 5  $\mu$ L に 1  $\mu$ L のゲルローディング緩衝液を加え（注 17）、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時に DNA 分子量マーカーも泳動する（注 18）。

試料を間違いなく注入できたら、100 V の電圧で電気泳動を行う（注 19）。ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/2 まで進んだところで電気泳動を止める（注 20）。

速やかに、ゲルの染色に移る（注 21）。

##### (4) ゲルの染色

ゲルが浸る量の新しい泳動緩衝液をプラスチック製容器に入れ、これに泳動後のゲルを移し入れる。ゲルを入れたら、緩衝液 100 mL 当たり 50  $\mu$ g の割合でエチジウムブロミド溶液を加える。容器をシェーカーに乗せて軽く振とうしながら 30 分ほど染色する。

##### (5) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ注 22) をしき、その上にゲルを置き紫外線を照射する（注 23）。CCD カメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA 分子量マーカーと比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

#### 4. 7 PCR の成否

ネガティブコントロールからバンドがみられないことを確認し、ポジティブコントロールから予想される長さのバンドがみられることを確認する。確認後は、「5 結果の判定」から組換え体存在の有無を判定する。コンタミネーションがみられる場合は、本マニュアルコンタミネーション防止編を参照し速やかに適当な処置を行うこと。処置後、必要に応じて DNA の抽出をやり直し、PCR を行うこと。

#### 4. 8 特異性及び検知感度

大豆種子、うもろこし種子及びばれいしょから DNeasy Plant Maxi kit を用いて抽出した DNA 溶液を鋳型として、本編に記載された PCR を行った場合、目的とする遺伝子組換え体のみ増幅バンドがみられる。また、他の主要農作物（米、小麦、大麦）において増幅バンドがみられない。

#### 4. 9 記録

泳動結果は画像データとして保存しておく。

（注 1）マイクロピペットは、一例を示している。

（注 2）内在性遺伝子（SSI**IIb**）検知用プライマー対の①は表 4. 1（2）の SSI**IIb**-1 に該当、②は同表の SSI**IIb**-3 に該当し、SSI**IIb**-3 は SSI**IIb**-1 に比べて増幅長が短くなっており、加工食品のように DNA の分解が進んだ試料に対しても検知感度が高くなると考えられる。

- (注 3) 遺伝子組換えばれいしょ NewLeaf について、現在のところ系統検知用プライマー対は開発されていない。当面の間、遺伝子組換えばれいしょ NewLeaf については、CaMV 35S promoter 検知用プライマー対を使用し、GM 大豆 (RRS) 陽性コントロールプラスミド又は GM とうもろこし陽性コントロールプラスミドを用いて、試験することとする。なお、カリフラワーモザイクウイルス (cauliflower mosaic virus, CMV) に感染した植物、及び多くの組換え体においても、PCR で増幅するので注意すること。
- (注 4) PCR 反応のポジティブコントロール、及び遺伝子組換え農産物検知の判定のためのポジティブコントロールとして使用している。組換え体が入手できればそれを抽出して使用しても良い。
- (注 5) 使用している試薬に、PCR の鑄型となるようなコンタミネーションがないことを示す。
- (注 6) プライマー対の品質、混合等に問題がなく、PCR 反応が問題なく進行していることを示す。
- (注 7) 使用している試薬に、プライマー対のコンタミネーションがないことを示す。
- (注 8) 対象農産物の非組換え体が入手可能であったら、非組換え体から抽出した DNA 溶液を鑄型としたネガティブコントロールを用意する。組換え体検知用プライマー対に、内在性遺伝子検知用プライマー対等のコンタミネーションがないことを示すことができる。
- (注 9) チップの壁に反応液が付着するなどして損失する溶液量を考慮し、多めに作製する。
- (注 10) 問題がなければ、TAE 緩衝液を使用してもよい。その場合は、電気泳動緩衝液も TAE 緩衝液を使用するのがよい。
- (注 11) 100 mL のゲル溶液で、大 2 枚、小 1 枚の作製が可能である。
- (注 12) 電子レンジを用いて加熱すると簡単である。ただし、突沸の可能性もあるので、やけど等しないように取り扱いに注意すること。
- (注 13) このときコームの周囲に気泡が入らないよう注意する。
- (注 14) 注意してコームを抜き取らないと、コームを抜き取った後のウェル (ゲルの試料を入れる穴) の底に穴があきサンプルが漏れることがある。
- (注 15) 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。
- (注 16) 緩衝液は適量がよい、多すぎると電流密度が下がり泳動時間が長くなる。
- (注 17) 試料溶液 5  $\mu$ L に対しゲルローディング緩衝液 1  $\mu$ L の割合であるが、ゲルローディング緩衝液の量は、厳密である必要はない。ラボフィルム上にゲルローディング緩衝液をおき、試料溶液を採取したピペットで何回か溶液を出し入れして混合すればよい。また、試料溶液又はウェルの大きさ等により、泳動に供する試料溶液量を変更する場合は、試料溶液に対して 1/6 倍量のゲルローディング緩衝液を加える。この場合、泳動に供した試料溶液量を記録すること。
- (注 18) 試料注入に時間が掛かりすぎると、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。
- (注 19) 電極で、水の電気分解による気泡を確認する。
- (注 20) ゲルの 1/2 と、厳密に規定するものではないが、PCR の増幅長が短いため、長時間泳動するのは好ましくない。
- (注 21) 時間が経つと DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなる。
- (注 22) 食品包装用のラップ。紫外線の波長によっては、ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないとう紫外線が吸収されてしまい、像が得られない場合がある。
- (注 23) 紫外線照射装置には、波長に各種のものがある。人体への有害性や感度面からみて、312 nm 程度の波長を持つ照射装置を用いるのがよい。

## 5 結果の判定

結果の判定は目的の PCR 産物の有無を電気泳動結果から判定して行う。すなわち、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られ、かつ遺伝子組換え農産物に対応する長さの PCR 産物が得られた場合、遺伝子組換え農産物が検出されたとする。

内在性遺伝子に対応する PCR 産物が認められない試料については、既に抽出している DNA 溶液を用いて、再度 PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、再度 DNA の抽出を行い、PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、「検出不能」とする。

表4. 1 (1) プライマー対：大豆\*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>Le1</i> 用	Le1-n02	118 bp	<i>Le1</i>	
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の CMV に感染した植物等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOS ter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の土壌細菌等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 RRS 用	RRS-01	121 bp	CTP4 from <i>P. hybrida</i> – CP4EPSPS 間	

\* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社による特許である（特許第 4291568 号）。

表4. 1 (2) プライマー対：とうもろこし\*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>SSIb</i> 用	SSIb-1	151 bp	<i>zSSIb</i>	4. 5. 1において使用するプライマー対が①の場合
	SSIb-3	114 bp	<i>zSSIb</i>	4. 5. 1において使用するプライマー対が②の場合
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の CMV に感染した植物等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOS ter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の土壌細菌等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 Event176 用	E176-2	100 bp	<i>cryIA(b)</i> – PEPC#9 intron	
組換え遺伝子 Bt11 用	Bt11-3	127 bp	<i>adh1-1S</i> – <i>cryIA(b)</i>	
組換え遺伝子 GA21 用	GA21-3	133 bp	OTP – <i>m-epsps</i>	
組換え遺伝子 T25 用	T25-1	149 bp	<i>pat</i> – 35S-ter	

組換え遺伝子 MON810 用	M810-2	113 bp	<i>hsp70 - cryIA(b)</i>
--------------------	--------	--------	-------------------------

\* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社による特許である（特許第 4291568 号）。

表 4. 1 (3) プライマー対：ばれいしょ

対象遺伝子	記号	増幅長	配列 (5'→3')	増幅部分
内在性遺伝子 Pss 用	Pss 01n-5' Pss 01n-3'	216 bp	TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCG A	<i>S. tuberosum</i> sucrose synthase/ sense 同 /anti-sense
組換え遺伝子 NewLeaf 用				
組換え遺伝子 NewLeaf Plus 用	p-FMV02-5' PLRV01-3'	234 bp	AAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGA AAAAGAGCGGCATATGCGGTAAATCTG	p-FMV/ sense PLRV/ anti-sense

表 4. 2 PCR 反応液の組成

	液量/tube	終濃度
滅菌水	15.375 µL	
AmpliTaq™ Gold	0.125 µL	0.625 U
10x PCR buffer II	2.5 µL	1 x
dNTP (2 mmol/L each)	2.5 µL	200 µmol/L each
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1.5 µL	1.5 mmol/L
プライマー対 (25 µmol/L each)	0.5 µL	0.5 µmol/L each
鋳型 DNA (10 ng/µL)	2.5 µL	25 ng
全量	25 µL	

表 4. 3 温度サイクル

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95 °C	10 min	1 サイクル
変性	95 °C	30 sec	40 サイクル
アニーリング	60 °C	30 sec	
伸長反応	72 °C	30 sec	
最後の伸長反応	72 °C	7 min	1 サイクル
保存	4 °C	-	-

## II 分析試料取り扱い編





### 1.はじめに

ここには遺伝子組換え食品検査・分析のために用いる分析試料の取り扱いとして、買い上げから廃棄までの手順を示してある。関連する事項として検査の登録、買い上げに関する手続き、報告の方法等は、それぞれ業務実施要領等を参照すること。

### 2.市販品の購入

市販品は、基本的に1商品につき3点分析する（注1）こととし、以下の項目に留意して購入する。詳細は、業務実施要領等を参照すること。

- ①検査スケジュールに従い、適当なサンプル及び数を購入する。
- ②検査する品目のサンプリング法に従い必要な量を確保し、できるだけ同一ロットの市販品を購入する。
- ③購入後、表示にある保存方法に従い運搬、保管する。

（注1）1商品につき3点とは、買い上げ調査における数であり、各地域センターでの内部質管理等に転用するべきではない。母集団を考慮し、適切なサンプル数を選択することが望ましい。

### 3.市販品検査台帳等の記入

試料を購入したら、市販品検査台帳、検査野帳及び試料に必要事項を記入する。記入に際しては、消去することの出来ないボールペン、又はインクを用いる。また、その他の必要な事務手続きを行う。

（1）買い上げた市販品について、必要事項を市販品検査台帳に記入する。

- ①検査番号
- ②担当者
- ③名称
- ④商品名
- ⑤原材料名
- ⑥対象原材料
- ⑦内容量
- ⑧賞味期限等
- ⑨保存方法
- ⑩製造業者等
- ⑪購入年月日
- ⑫購入価格
- ⑬店舗名
- ⑭備考（遺伝子組換えに関する表示（有機を含む））

（2）検査野帳に必要事項を記入する。

- ①検査番号
- ②検査開始日
- ③名称

#### ④試料総量

(3) 試料に検査番号等を明示する。

試料に、検査番号、処理状態、検査対象を明示したラベルを付ける。試料が小さい場合や分割されている場合は、ビニール袋等の容器に入れ、それにラベルを付ける。各試料には検査番号を明示する。

- ①検査番号
- ②処理状態
- ③検査対象

#### 4.市販品の検査分析

市販品は速やかに分析に供する。賞味期限等を越えて分析してはならない。

分析マニュアルに従い分析を行う。その際、検査野帳に必要事項をもれなく記入する。

#### 5.試料の保存及び廃棄

サンプリング操作に供するまで、市販品は包材等に表示された保存方法によって保存する。

サンプリング後の試料は、ビニール袋等に入れ、最低でも再分析可能な量を、原則として四半期報告が終了するまで、-20℃以下で凍結保存する。また、抽出DNA溶液についても同様に保存する。

次の場合は、全ての事務処理が終了するまで保存する。

遺伝子組換え農産物が検出されたもので、さらなる調査等の処理が必要なもの。

次の場合は、翌年4月1日まで保存する。

- ①遺伝子組換え農産物が検出されたもので、さらなる調査等の処理が必要でないもの。
- ②分析不能であったもの。

上記保存期限を過ぎた場合には、速やかに生ゴミとして廃棄すること。

試料とした市販品の包材は、検査番号を明示して翌々年の4月1日まで保存する。

#### 6.結果の報告

分析が終了した場合、市販品検査台帳等に結果等必要事項を記入する。同時に、業務実施要領等の定めに従い報告を行う。

## 市販品検査台帳記入要領

①検査番号

購入順に定められた番号を記入する。

②担当者

分析に当たる担当者名を記入する。

③名称

一括表示内容を記入する。

④商品名

市販品に表示されている最も一般的な名称を記入する。

⑤原材料名

一括表示内容を記入する。

検査対象となる原材料にはアンダーラインを引く。

⑥対象原材料

検査対象となる原材料を記入し、括弧書きで対象農産物を記入する。

⑦内容量

一括表示内容を記入する。

⑧賞味期限等

西暦表示の場合は一括表示内容を記入し、そうでない場合は西暦に変換し、括弧書きで一括表示内容を記入する。

⑨保存方法

一括表示内容を記入する。

⑩製造業者等

一括表示内容を記入（製造所固有記号等を含む）する。

⑪購入年月日

西暦で記入する。

⑫購入価格

消費税を含んだ価格を記入する。

提供品の場合は0円と記入する。

⑬店舗名

買い上げを行った店舗名を記入する。

⑭備考

遺伝子組換えに関する表示（有機を含む）、ロット記号等、その他の情報を記入する。

## 検査野帳記入要領

- ①検査番号  
市販品検査台帳に登録された番号を記入する。
- ②分析者名  
分析に当たった者の名を記入する。
- ③検査開始日  
検査を開始した日を記入する。
- ④検査終了日  
分析の終了した日を記入する。
- ⑤名称  
一括表示内容を記入する。
- ⑥対象原材料  
検査対象となる原材料を記入し、括弧書きで対象農産物を記入する。
- ⑦サンプリング量  
遺伝子の抽出に使用した量を記入する。
- ⑧基本操作編  
各抽出法の「記録」に記載された内容を記入する。
- ⑨抽出 DNA 量  
UV 測定の結果及びその数値から計算された DNA 量を記入する。
- ⑩泳動結果  
電気泳動の結果から、それぞれの試料について、「検出」、「検出せず」、「検出不能」を記入する。
- ⑪泳動写真貼付  
PCR 産物の電気泳動写真を貼り付ける。
- ⑫備考  
分析上、気がついた点等を記入する。

### Ⅲ 個別品目編 (定性試験用)



i) はじめに

遺伝子組換え食品の品質表示は、その適用範囲が非常に広い。また、新たな組換え体等に対応するため、毎年見直しがされる。

遺伝子関連技術は、日進月歩の状態であり、本マニュアルに記載してある遺伝子組換え食品の試験方法についても、分析技術の向上と品質表示基準の見直しに対応するため、常に見直しをしておく必要がある。特に、個別品目についての分析方法は、常により良い方法を模索し、適切な検査を行う必要がある。

ここにあげられている試験方法は、表紙に記載した日付において、各品目から分析可能な DNA の抽出を行うために適切と思われる方法である。試料の粉碎には、試料に滅菌水等を加えてホモジナイズする方法、又は試料をフリーズドライ等により乾燥させて粉碎する方法が考えられるが、本マニュアルでは、主に、試料に滅菌水を加えてホモジナイズする方法を記載している。なお、加工食品においては、その加工工程で DNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能な DNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

ii) 適用範囲

本編は、表示のモニタリングに資するため、食品からの遺伝子組換え体の定性 PCR における試料の前処理の方法及び抽出方法について記述している。大豆、とうもろこし及びばれいしょの農産物とその加工食品に適用できる。

1 使用機器

粉碎机：試料の粉碎に用いる。粉碎机には、水分を含む試料に適した粉碎机と、乾燥試料に適した粉碎机があるので、試料の性状にあわせて選択する。また、粉碎机には、刃が回転するもの、粉碎ボールを利用するボールミル、遠心力と高速回転のローターにより粉碎する超遠心粉碎机等があるが、粉碎机はコンタミネーション防止のために、粉碎容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行える粉碎机を用いる。さらに望ましくは、滅菌できるものが良い。粉碎容器、カッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーは DNA を分解するので使用してはならない。

本マニュアルでは、水分を含む試料に適した粉碎机として、(株)日本精機製作所製エースホモジナイザー又は同等品を想定している。粉碎容器及びカッターは洗浄後滅菌して用いる。乾燥試料に適した粉碎机は、粉碎容器、カッター等が超音波洗浄可能なものとする。粉碎容器、カッター等は超音波洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。

乳鉢及び乳棒：洗浄後滅菌して用いる。

2 農産物

## 2. 1 大豆（枝豆及び大豆もやしを含む。）

### （1）大豆

試料1パックを乾燥試料に適した粉砕器に入れ全量を粉砕する。十分に細かくなったものを抽出に供する。DNeasy Plant Maxi kitを使用する場合は、1.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」に従う。

### （2）大豆もやし

試料1パックを1 cm程度に切断し、水分を含む試料に適した粉砕器に移し、試料重量と同じ重量の滅菌水を加えて粉砕する。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kitを使用する場合は、1.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」に従う。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

### （3）枝豆

試料1パック（皮付きのものは皮付きのまま）（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kitを使用する場合は、1.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」に従う。

なお、CTABを用いる方法による場合は、50 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

## 2. 2 とうもろこし

試料1パックを乾燥試料に適した粉砕器に移し粉砕する。

DNeasy Plant Maxi kitを使用する場合は、1.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出B」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2.0 gを採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」に従う。

## 2. 3 ばれいしょ

植物防疫法上、生のばれいしょは、日本に輸入されることはない。

## 3 農産物加工食品



### 3. 1 大豆加工食品

遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soy (40-3-2 系統) を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により前処理をした後、DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法も適用可能であり、試料採取量は各項目に示した。

#### 3. 1. 1 豆腐・油揚げ類

##### (1) 豆腐

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、120 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

##### (2) 油揚げ

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

厚揚げの場合、中の柔らかい部分のみを豆腐と同様に処理しても良い。

#### 3. 1. 2 凍豆腐、おから及びゆば

##### (1) 凍豆腐

試料に試料重量の10倍量の滅菌水を加え、10分後に水分を含む試料に適した粉砕器に移し粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

##### (2) おから

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）分を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

##### (3) ゆば

試料に試料重量の5倍量の滅菌水を加え、20分後に水分を含む試料に適した粉砕器に移し粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、150 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 3 納豆

ざる（注1）に1パックを開け、流水（水道水）で15分間洗浄して、表面のぬめりを除く。滅菌水で十分にすすいだ後、重量を測定し水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

（注1）台所用品の水切りネットを使い捨てにして使用するとよい。

### 3. 1. 4 豆乳類

試料をよく振って混合したものを直接、抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、50 µLを採取する。石英砂を加える必要はない。

### 3. 1. 5 みそ

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 6 大豆煮豆

#### （1）水煮大豆

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 7 大豆缶詰及び大豆瓶詰

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 8 きな粉

試料をそのまま抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mg採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 9 大豆いり豆

試料1パックを乾燥試料に適した粉碎器に採り粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 10 「3. 1. 1」から「3. 1. 9」までに掲げるものを主な原材料とするもの

(1) 液体

「3. 1. 4 豆乳類」に従う。

(2) 液体以外

大豆のみ（又は大豆以外）分離が可能なものについては分離し、原材料に従い3. 1. 1から3. 1. 9の各項目を参照する。

分離が困難なものについてはそのまま、試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 11 大豆（調理用）を主な原材料とするもの

大豆のみ（又は大豆以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのまま、試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 12 大豆粉を主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ。

3. 1. 13 大豆たん白を主な原材料とするもの

(1) 魚肉ソーセージ

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、250 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) その他

「3. 1. 11」に同じ

### 3. 1. 14 枝豆を主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ。

ただし、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、50 mg 採取し、分離が困難なものについては、100 mg 採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

### 3. 1. 15 大豆もやしを主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、200 mg 採取し、分離が困難なものについては、100 mg 採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

## 3. 2 とうもろこし加工食品

遺伝子組換えとうもろこし Bt11、Event176、T25、MON810 及び GA21 の5系統を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により前処理をした後、DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出B」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法も適用可能であり、試料採取量は各項目に示した。

### 3. 2. 1 コーンスナック菓子

#### (1) コーンチップス

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

#### (2) コーンパフ

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、400 mg を採取する。

### 3. 2. 2 コーンスターチ

試料をそのまま抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

### 3. 2. 3 ポップコーン

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の3倍の重さの滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

3. 2. 4 冷凍とうもろこし

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

3. 2. 5 とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰

缶詰に含まれる水分を切った後、試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

3. 2. 6 コーンフラワーを主な原材料とするもの

コーンフラワーのみ（又はコーンフラワー以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのままの、試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む試料についてはそのまま粉砕する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

3. 2. 7 コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。）

「3. 2. 6」に同じ。

3. 2. 8 とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの

「3. 2. 6」に同じ。

3. 2. 9 「3. 2. 1」から「3. 2. 5」までに掲げるものを主な原材料とするもの

「3. 2. 6」に同じ。 試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む試料についてはそのまま粉砕する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

3. 3 ばれいしょ加工食品

遺伝子組換えばれいしょ New Leaf（Bt6 系統及び SPBT02-05 系統）及び New Leaf Plus（RBMT21-129、RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統）を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により前処理をした後、本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」を、改変が必要なものは各項目に示したように操

作する。試料採取量は、各項目に示す。

### 3. 3. 1 乾燥ばれいしょ

粉末のものにあつては、試料をそのまま 2.0 g を採取し、抽出に供する。粉末以外のものにあつては、試料 1 パック（又は、乾燥試料に適した粉砕器に入る量）を乾燥試料に適した粉砕器に採り、粉砕する。均質になったものから、2.0 g を採取し、抽出に供する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤によりカラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50 °C、1 時間保温する。

### 3. 3. 2 冷凍ばれいしょ

試料 1 パック（1 パック 500 g 以上のものは、500 g 以上）を乳鉢に採り、乳棒で粉砕する。均質になったものから、2.0 g を採取し、抽出に供する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤によりカラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50 °C、1 時間保温する。

### 3. 3. 3 ばれいしょでん粉

試料から 10 g を採取し、そのまま抽出に供する。本マニュアル基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」の（1）及び（2）を次に示すように、改変して操作する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤によりカラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50 °C、1 時間保温する。

（1）試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、15 mL G2 緩衝液を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。

（2）さらにチューブに、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて 15 mL G2 緩衝液、100-1,000 µL 容のマイクロピペットを用いて 200 µL QIAGEN Proteinase K、及び 10-100 µL 容のマイクロピペットを用いて 20 µL RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。

### 3. 3. 4 ポテトスナック菓子

試料 1 パックを、厚手のビニール袋に入れ、木づち等でたたき粉末にする。ビニール袋をよく振り混合した後、2.0 g 採取する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤によりカラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50 °C、1 時間保温する。

### 3. 3. 5 乾燥ばれいしょ、冷凍ばれいしょ、ばれいしょでん粉及びポテトスナック菓子を主な原料とするもの

ばれいしょのみ（又はばれいしょ以外に）分離できるものについては分離する。試料 1 パックについて、次のように操作する。いわゆる「はるさめ」等の乾燥品については、0.50 mm のメッシュがとおる程度に粉砕し、「3. 3. 3 ばれいしょでん粉」の操作を行う。

焼成した菓子については、「3. 3. 4 ポテトスナック菓子」の操作を行う。その他については、「3. 3. 2 冷凍ばれいしょ」の操作を行う。

3. 3. 6 ばれいしょ（調理用）を主な原材料とするもの

液体のものは、試料1パックを良く混合した後に、2.0 gを採取し、抽出に供する。

液体以外の性状のものは、ばれいしょのみ（又はばれいしょ以外に）分離できるものについては分離する。試料1パックについて、「3. 3. 2 冷凍ばれいしょ」の操作を行う。





## IV 定量的 PCR 編



## 1. 1 定量的検知技術について

農産物及びその加工食品中の遺伝子組換え体を定量的に検知するためには、商品化されている遺伝子組換え体に関する情報のみならず農産物の生産・流通システムや安全性評価システムなども理解しておく必要がある。ここでは、本マニュアルに記載されている遺伝子組換え体の定量的検知技術を使用するに当たって、理解しておくべきことについて述べる。

### 1. 1. 1 遺伝子組換え (genetically modified, GM) 農作物の育成・栽培の実態

安全性が確認された GM 農作物は、従来技術で育種された品種と同様に栽培、流通、加工利用されて良いと各国で判断されたものである。しかしながら、その実態は余り理解されていないので紹介する。

#### 1) 系統と品種

開発され安全性が確認された GM 農作物は、開発された際の系統名等 (Event176、Bt11、MON810 等) で呼ばれている。この系統とは、育種上の用語で最初に遺伝子組換え体として作出された際に付けられる個体番号である。同じ組換え遺伝子を同じ植物培養組織に導入しても、染色体のどの部位に何カ所挿入されるか (コピー数) は特定できないため、多くの組換え体 (クローン) が分離取得される。その個体毎 (系統) に増殖され、特性評価、安全性評価が実施され、一度安全性が確認された系統の後代は改めて安全性確認の必要性はない。しかしながら、1つの系統では様々な気候で栽培することが困難であるために、開発者はこの系統を片親として従来品種との交雑を行って実際に栽培する品種を育成し、商品化している。

大豆の場合は、閉花性の植物であることから、在来優良系統との交配、自殖を人為的に繰り返して遺伝子をホモ (homozygous) で持つ GM 品種が育成されている。除草剤の影響を受けない大豆 (ラウンドアップ・レディー大豆) は、米国内で多数の品種が販売、栽培されていると聞いている。

とうもろこしの場合は、他殖性であるため、通常の種子も一代限りの優良形質を持つ F1 ハイブリッド (雑種強勢品種) として育成されているが、組換え体においても大豆の場合と同様に優良品種との交配、自殖を繰り返して一度導入遺伝子をホモで持つ植物体を育成し、これを片親とし、もう一方の片親を在来交配種とするハイブリッド品種が育成されている。さらに最近になって、異なる組換え系統を両親とする F1 ハイブリッド品種も育成されており、これはスタック (stack) 品種と呼ばれている。F1 雑種の種子が栽培されるので、F2 世代の種子が穀物として生産されることになる。このため、生産された GM 種子は各 GM 系統の表現形質ではメンデルの遺伝の法則に従い 3 : 1 に分離し、組換え遺伝子は (+/+ : +/- : -/-=1 : 2 : 1) に分離する。また、とうもろこしは放任受粉の植物であり、花粉は通常的环境条件では 9 割以上が数 m ~ 数十 m の範囲内にしか飛散しないが、風が強ければかなりの距離を移動するため、他の畑の花粉が混ざること否定できない。このため、GM 農作物を栽培している畑でも遺伝子組換え体でない (non-GM) 種子はできるし、その逆も起きているはずである。また、これら穀物は植物種子であるため、とうもろこしなどの有胚乳種子ではゲノム量が胚 (2n) と胚乳 (3n) で異なる。胚乳の 2n 分は母親由来のため、GM 系統が雌しべ親の場合での胚乳部分の導入遺伝子量は在来系統を雌しべ親にした場合の 2 倍となる。このため、育成過程の経緯の違いにより胚と胚乳の比率が品種間で異なる可能性もあり、定量結果に影響がでると考えられるが、農作物の栽培・流通シス

テムを考えると、それらを考慮することは現実的でないと考えられる。

## 2) GM 農作物の栽培と流通

米国の農家は、一軒で一作物を百ヘクタール規模で栽培しており、使用する品種はリスク分散のために複数採用している。商品化が認可された GM 系統由来の品種の種子は、安全性評価が終了し他の品種と同様のルートで販売されているので、畑では GM 品種と non-GM 品種が混在して栽培されていることが多い。大豆、とうもろこしといった穀物は品種毎ではなく、食用油、飼料等の目的別に流通されるため、IP ハンドリングを行わない限り、農家が栽培した農作物は収穫段階から複数品種が混在することになる。遺伝子組換え食品の表示制度においては、「遺伝子組換えでないものを分別」、「遺伝子組換えでない」等の表示が任意でできるが、分別生産流通管理のためのマニュアル「アメリカ及びカナダ産のバルク輸送非遺伝子組換え原料（大豆、とうもろこし）確保のための流通マニュアル」を（財）食品産業センターが配布しており、分別流通を実施しても混入してくる組換え体の許容限度と、国内の輸送、加工時における管理方法について説明している。組換え体混入許容値は大豆、とうもろこしについては 5 %以下を目安とした取引が可能であるとしている（注）。

### 1. 1. 2 遺伝子組換え体を検知するために必要な情報・試料

食品原料、加工食品中の GM 農作物の検知には、①輸入可能な GM 農作物の種類と、導入されている組換え遺伝子の情報（DNA 塩基配列、検知用 DNA プライマー）や試料（組換えたん白質の抗体）、②対象となる GM 農作物の純粋な種子と、non-GM 農作物の種子を入手する必要がある。しかしながら、①の情報を得るためには DNA データベースの検索や、安全性評価資料の閲覧の必要があり、PCR 法に使用する検知用プライマーの種類によって検知結果も影響を受ける。また、標準物質として必要となる②の種子を手に入れることは極めて困難であり、同じ系統の組換え体でもその品種が多数あるために、どの品種の種子を用いるかで測定した結果は異なることも起きうる。また、とうもろこしについては通常入手可能な種子は純度が 90 %程度のものであるため、単一品種の種子を入手したとしても、定量に影響を与える他品種の種子が混入していないか精査する必要がある。このようなことから、本マニュアルでは、標準的な分析法を詳述し、組換え体混入率を算出するための標準物質を提示している。

### 1. 1. 3 遺伝子組換え体の検知技術の現状

#### 1) PCR 法を用いた組換え DNA の検知

組換え遺伝子の検知法としては PCR 法がある。PCR 法は分子生物学の基礎的研究から遺伝子診断、犯罪捜査まで使われている DNA 増幅技術であり、基本的な知識は、多くの入門書があるので、それを参照してもらいたい（中山, 1996. 島本, 1997）。

PCR の鑄型となる DNA の抽出がうまくいかないと PCR 反応は阻害され、良好な結果を得ることができない。CTAB 等を利用した方法（松岡, 1999）や、市販の DNA 抽出用のキット（シリカメンブラン等を利用したもの）があり、加工工程で DNA が分解されていても、比較的容易に DNA を抽出することが可能である。しかし、穀物や食品から、これらの方法を用いて得られた DNA 溶液中には PCR の阻害若しくは促進物質の混入が起きていることもある。加工食品から特定の DNA を検知することは、一定の DNA が残っていれば可能であるが、DNA が残っている

ことは考えられない精製植物油やしょうゆ、糖類などを除いて、加工工程の条件によって DNA の状態は異なり、抽出法に左右されるであろう。

加工が進むと物理的作用や熱によって DNA は短く切断されていくので、検知用プライマーも短い DNA 配列を検知できるように設計しなければならない。本マニュアルで使用するプライマーについては後述する。通常、PCR 後の反応液は電気泳動したものをエチジウムブロミドで染色し、CCD カメラ等で写真撮影する。設計したプライマーに挟まれた DNA の長さとも一致するバンドが検知されれば、該当する DNA が含まれていると判断してよい。さらに、増幅 DNA の中に適当な制限酵素の切断部位があるようにプライマーを設計したり、増幅 DNA をシーケンスするのが確実である。

また PCR 反応は、特定部位の DNA を増幅する分析技術のため、さまざまな汚染が起きやすいので、通常の DNA 実験を行う以上に注意を払う必要がある。例えば、試料の粉碎、DNA の抽出、PCR 反応液の混合作業を別の実験室で行い、これら実験室間を頻繁に行き来しないことや、常に清潔に保つ配慮が必要である。また、PCR 反応については特許があるので、その点でも注意が必要である。

## 2) 組換えたん白質の検知

農作物の組織から特定の 1 つのたん白質を検知するには、検知したいたん白質の抗体を利用した方法がある。測定対象の抗原となるたん白質と特異的な抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素を化学的に結合させた二次抗体で検知する酵素抗体法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法）が向いている。しかし、検知対象のたん白質が高温、酸等により変性すると抗体との特異性がなくなるため、加工食品中の組換え遺伝子由来のたん白質を検知することはできない。

ELISA 法を利用して、我が国で商品化されている GM 農作物を検知できる定量用 96 穴プレートキットが市販されている。しかし、試料の粉碎方法によってたん白質の抽出効率が異なるため、標準物質と同程度の粒径にすべきであろう。また、害虫抵抗性とうもろこしでは同じ遺伝子が複数系統に利用され各系統でたん白質の発現量が異なる。このため、複数の害虫抵抗性とうもろこしが混ざっているような試料では、ELISA 法では正確な害虫抵抗性とうもろこしの混入率は定量できない。上述のように、これらの ELISA キットは、加工食品には利用できない。

### 1. 1. 4 本マニュアル記載の検知技術の特徴

#### 1) PCR プライマー

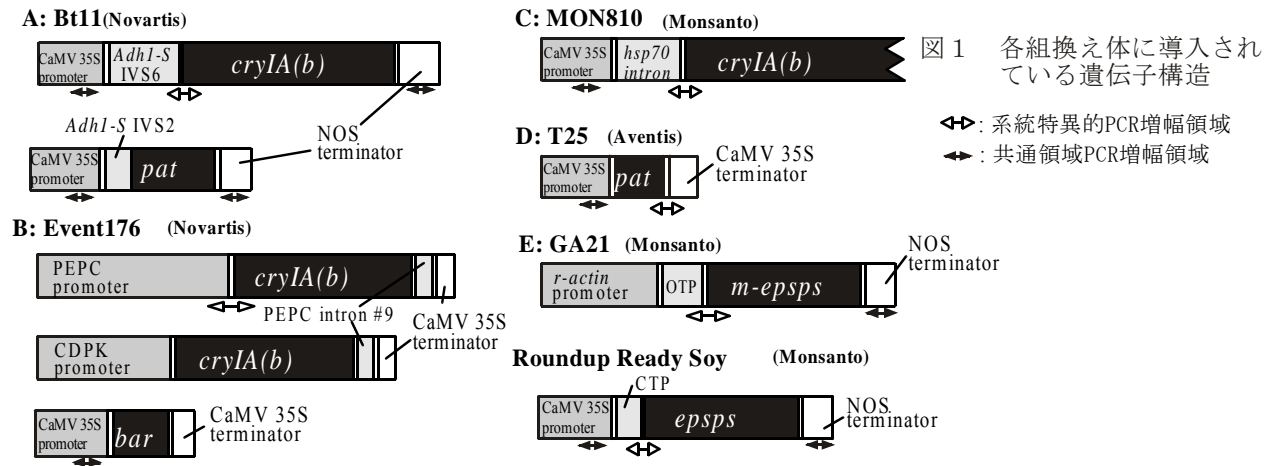
本マニュアルで使用する PCR プライマーは、厚生労働省、農林水産省から公開されている安全性評価の資料の閲覧と、DNA データベース（国立遺伝学研究所の DDBJ、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>）を利用して、各 GM 農作物に導入されている組換え DNA の塩基配列を元に、プライマー設計の基本的なルールに従って作製したものである。その特異性については、他の組換え系統、イネ、大麦、小麦由来のゲノム DNA に対して非特異的バンドが観察されないものを選択してある。また、PCR 反応を行う際には、コントロールとして対象農作物に必ず含まれる DNA 配列（大豆であれば *Le1* 遺伝子等、とうもろこしであれば *SSI1b* 遺伝子）を検知するプライマーも同様の手順で特異性が高いものを使用している。

## 2) 定量 PCR 法

GM 農作物の PCR 法を利用した定量では、現在のところ、GM 農作物の絶対量を知る方法はなく、該当する農作物が必ず持っている内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の存在比率から組換え体は何%存在するかを相対的に測定する方法しかない。具体的には、通常の PCR 用のプライマー間に挟まれた DNA 配列中の一部と相補的配列を持った蛍光色素・消光色素を結合させた DNA プロブを準備し、ポリメラーゼ反応が繰り返されるに従って分解される DNA プロブに伴って放出される蛍光の量を動力学的に測定し、鋳型 DNA 量を定量するリアルタイム PCR 装置が必要となる。PCR を用いた定量法としては、特殊な装置を必要としない競合的 PCR 法もあるが、最終的にゲル電気泳動の結果を肉眼で判断するためラフな分析しかできない。

### (1) PCR 用標準物質

GM 農作物とその加工食品から遺伝子組換え体を PCR 法により定量するためには、分析用の標準物質として、各 GM 農作物系統を一定量だけ含む non-GM 農作物の種子粉砕物又はそのゲノム DNA が必要になる。GM 農作物の混入率は、複数の混入率の標準物質から測定した定量値から計算することになる。しかしながら、前述のように1つの GM 系統には多数の品種があり、また non-GM 農作物の品種も多数あるため、測定結果は標準物質の調製に使用した品種の影響を受けることになる。同一機関等が同一品種の種子から標準物質を調製した場合でも、農作物であるため常に一定の品質のものを入手することは困難である。このため、本マニュアルで使用している標準物質は、GM 大豆、各 GM とうもろこしを特異的検知できる PCR 用プライマー (図 1) から増幅された DNA 配列をプラスミド上につなげたものを使用している。本標準物質を使用することで、標準物質として GM 農作物系統毎、non-GM 農作物の種子を入手する必要がなくなり、無限供給可能な同じ物質で測定した結果から標準曲線を求めることができる。



### (2) 内標比の考え方

リアルタイム PCR 法で定量するには、まず純粋な GM 系統毎の代表的な品種を使用して大豆又はとうもろこし種子から抽出した DNA 中の (組換え遺伝子) / (内在性遺伝子) の比率 (内標比) を求める。この際には、(1)の標準物質のプラスミドを使用して標準曲線を作製することになる。この内標比 (遺伝子の存在比) は各組換え系統種子中で一定の比率を示すはずである。

$$\text{内標比} = \frac{\text{GM 系統特異的 DNA 配列の数}}{\text{内在性遺伝子数}}$$

しかしながら、前述のように1つの GM 系統には多数の品種があり、また non-GM 農作物の品種も多数あるため、この内標比もどの品種を用いたかで影響を受けることになる。このため、本マニュアルでは、農林水産省が入手した標準的な各 GM 系統種子を使用して複数研究室で測定した値の平均値を内標比として採用している。実際に測定する際は未知試料の定量分析を行い、本マニュアル記載の内標比を用いて次式に従って GM の混入率 (%) を計算することになる。

$$\text{GM 混入率} = \frac{\text{GM 系統特異的 DNA 配列の数}}{\text{内在性遺伝子数}} \times \frac{1}{\text{内標比}} \times 100$$

リアルタイム PCR 法では、標準曲線は一定の蛍光強度 (Threshold) となる PCR のサイクル数 (Ct 値) と標準物質の量 (本マニュアルではプラスミドコピー数、対数軸) で作成する。本マニュアルにおける Threshold の決め方は多くの実験結果から、各濃度において安定した増幅率で PCR の増幅が起きている蛍光強度としている。

### (3) 加工食品への適用

本マニュアル記載の定量法を用いて加工食品中の遺伝子組換え体の混入率を測定することは、試料中の大豆又はとうもろこし中の内在性遺伝子と組換え遺伝子の加工に伴う分解率が同じであると仮定した場合には可能である。しかしながら、複数の組換え体加工品を原料とする加工食品では、原料間で DNA 分解率が異なり、PCR の鋳型として機能する長さの DNA は一定でないため、そのような試料中の GM 農産物の混入率を測定することは目安程度にしかならない。

#### 1. 1. 5 検知技術の問題点

分析法が決まっても、次のことは理解しておくべきである。①開発中の GM 農作物など導入遺伝子等の情報がないものは検知を行うことは極めて難しいこと、②定量 PCR で得られるデータは、Ct 値を基準にしたものであり、この値は、常にもとの DNA 量を 2 を底とする対数で表したものであるため、他の分析とは異なる精度となること。③定量 PCR で得られるデータは、(組換え体) / (非組換え体) の相対的な比率であり、試料中に存在する遺伝子組換え体の絶対量を示すものではないこと、④とうもろこしのように多種類の組換え体とその F1 ハイブリッドやスタック品種が栽培され、その混入率が不明の場合は、測定値は、一粒検知をもとにした混入率とは一致しないこと。また、今後も増加すると考えられる GM 農作物の開発に応じて、常に標準分析法と標準物質の提供が必要であるし、EU 等の国際的な動向を見据えた分析法の国際的基準作りも必要となろう。

(注) 「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について (平成 12 年 6 月 10 日 12 食流第 1775 号 (平成 19 年 4 月 1 日一部改正) 農林水産省食品流通局長通知)」において、意図せざる混入について、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が 5 % 以下であること又は非遺伝子組換えとうもろこしの場合で遺伝子組換えとうもろこしの混入率が 5 % 以下であることとする。」と定めている。

(参考文献)

- 1) 中山広樹. バイオ実験イラストレイテッド: 第3巻 本当にふえるPCR, 秀潤社, 1996, 162p., (目で見える実験ノートシリーズ).
- 2) 島本功, 佐々木卓治監修. 新版植物のPCR実験プロトコール: 核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法, 秀潤社, 1997, 232p., (植物細胞工学シリーズ).
- 3) 松岡猛, 川島よしみ, 穂山浩, 三浦裕仁, 合田幸広, 瀬畑環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛. ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法 (第1報). 食品衛生学雑誌. 1999, vol. 40, p. 149-157.
- 4) Matsuoka, Takeshi; Kawashima, Yoshimi; Akiyama, Hiroshi; Miura, Hirohito; Goda, Yukihiro; Kusakabe, Yuko; Isshiki, Kenji; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. A Method of Detecting Recombinant DNAs from Four Lines of Genetically Modified Maize. J. Food Hyg. Soc. Japan. 2000, vol. 41, p. 137-143.
- 5) Köppel, E.; Stadler, M.; Lüthy, J.; Hübner, P. Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne "Roundup Ready™". Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1997, vol. 88, p. 164-175.
- 6) Ehlers, B.; Strauch, E.; Goltz, M.; Kubsch, D.; Wagner, H.; Maidhof, H.; Bendiek, J.; Appel, B.; Buhk, H. -J. Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundhbl. 1997, vol. 4, p. 118-121.
- 7) Matsuoka, Takeshi; Kuribara, Hideo; Akiyama, Hiroshi; Miura, Hirohito; Goda, Yukihiro; Kusakabe, Yuko; Isshiki, Kenji; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. A Multiplex PCR Method of Detecting Recombinant DNAs from Five Lines of Genetically Modified Maize. J. Food Hyg. Soc. Japan. 2001, vol. 42, p. 24-32.



## 1. 2 試験の概要

試料を、均一な粉末とした後に、QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi Kit により DNA を抽出する。その後、TaqMan™ ケミストリーを利用したリアルタイム PCR 装置により、内在性遺伝子と組換え遺伝子を同一プレートで測定する。遺伝子組換え農産物混入率の算出は、内在性遺伝子と組換え遺伝子の比を算出することで求める。

## 2 出典

この定量的 PCR 法は、Kuribara, Hideo; Shindo, Yoichiro; Matsuoka, Takeshi; Takubo, Ken; Futo, Satoshi; Aoki, Nobutaro; Hirao, Takashi; Akiyama, Hiroshi; Goda, Yukihiko; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. J. AOAC Int. 2002, vol. 85, p. 1077-1089.、Shindo, Yoichiro; Kuribara, Hideo; Matsuoka, Takeshi; Futo, Satoshi; Sawada, Chihiro; Shono, Jinji; Akiyama, Hiroshi; Goda, Yukihiko; Toyoda, Masatake; Hino, Akihiro. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. J. AOAC Int. 2002, vol. 85, p. 1119-1126.及び Kodama, Takashi; Kuribara, Hideo; Minegishi, Yasutaka; Futo, Satoshi; Watai, Masatoshi; Sawada, Chihiro; Watanabe, Takahiro; Akiyama, Hiroshi; Maitani, Tamio; Teshima, Reiko; Furui, Satoshi; Hino, Akihiro; Kitta, Kazumi. Evaluation of Modified PCR Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using Reference Molecules: Interlaboratory Study. J. AOAC Int. 2009, vol. 92, p. 223-233.による（注1）。

## 3 適用範囲

遺伝子組換えとうもろこし Bt11、Event176、T25、MON810 及び GA21 の 5 系統あるいは組換え大豆 RoundupReady Soy (40-3-2 系統) について、系統ごとのあるいは総量としての、非組換え体に対する組換え体の混入率測定に適用する。

対象品目は、大豆、デント種とうもろこし乾燥品、とうもろこし半加工品（コーングリッツ、コーンフラワー及びコーンミール）である。

1 商品につき基本的に 3 包装単位買い上げるものとし、1 包装単位を 1 点とする。

なお、加工食品については、妥当性確認が終了していない（注2）。

## 4 装置

### 4. 1 試料の前処理及び DNA の抽出

粉砕器：0.50 mm 程度に粉砕できるものを使用する（注3）。

その他の装置は、本マニュアル基本操作編「3. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出」の「3. 1. 4 装置」による。

### 4. 2 定量

ABI PRISM™ 7700 又は ABI PRISM™ 5700 (Applied Biosystems 社)、若しくは同等の性能を有する装置を使用すること（注4）。

本マニュアルでは ABI PRISM™ 7700 を用いることを想定して記述してある。

## 5 試薬

### 5.1 試料の前処理及び DNA の抽出

試薬は、本マニュアル基本操作編「3.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出」の「3.1.5 試薬」による。

### 5.2 定量

- ・ TaqMan™ Universal PCR Master Mix : Applied Biosystems 社 (# 4304437) 又は同等品
- ・ Primer・Probe Mix (組成 : 5' 及び 3' primer 各 1.25 µmol/L、TaqMan™ Probe 各 0.5 µmol/L に滅菌水で調製する。ただし、CaMV35S promoter 検知用のみ TaqMan™ Probe は 0.25 µmol/L に滅菌水で調製する。) : (株)ニッポンジーン又は(株)ファスマックより購入する。

《大豆用》

- ・ 内在性遺伝子 (Le1) 検知用 : (株)ニッポンジーン (# 319-05601) 、又は(株)ファスマック (# S1-2M 及び# S1-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ RRS specific 検知用 : 同 (#316-05611) 、又は同 (# S2-2M 及び# S2-2P)、若しくは同バルク品。

《とうもろこし用》

- ・ 内在性遺伝子 (SSIb) 検知用 : ①(株)ニッポンジーン (# 311-05541) 、又は同バルク品。  
②同 (# 319-06061) 、又は(株)ファスマック (# M1-2M 及び# M1-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ CaMV 35S promoter 検知用 : 同 (# 313-05621) 、又は同 (# C1-2M 及び# C1-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ NOS terminator 検知用 : 同 (# 310-05631) 、又は同 (# C2-2M 及び# C2-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ GA21 specific 検知用 : 同 (# 318-05551) 、又は同 (# M2-2M 及び# M2-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ Bt11 specific 検知用 : 同 (# 315-05561) 、又は同 (# M3-2M 及び# M3-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ Event176 specific 検知用 : 同 (# 312-05571) 、又は同 (# M4-2M 及び# M4-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ T25 specific 検知用 : 同 (# 319-05581) 、又は同 (# M5-2M 及び# M5-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ MON810 specific 検知用 : 同 (# 316-05591) 、又は同 (# M6-2M 及び# M6-2P) 、若しくは同バルク品。
- ・ 標準プラスミド DNA 溶液 : (株)ニッポンジーン又は(株)ファスマックより購入する。

《大豆用標準プラスミド》

- ・ GM 大豆 (RRS) プラスミドセット : ①(株)ニッポンジーン (# 310-05131) 又は同バルク品。  
②同 (# 316-05971) 、又は(株)ファスマック (# PS-2) 、若しくは同バルク品。

《とうもろこし用標準プラスミド》

- ・ GM とうもろこしプラスミドセット：①(株)ニッポンジーン (# 319-04981) 又は同バルク品。  
②同 (# 313-05981) 、又は(株)ファスマック (# PM-2) 、若しくは同バルク品。

共に以下の濃度である。

20 copies/ 2.5  $\mu$ L

125 copies/ 2.5  $\mu$ L

1,500 copies/ 2.5  $\mu$ L

20,000 copies/ 2.5  $\mu$ L

250,000 copies/ 2.5  $\mu$ L

・ no template control (NTC)

- ・ ① NTC 用サケ精子 DNA 溶液 (5 ng/ $\mu$ L に滅菌水で調製したもの) : 上記標準プラスミド添付品、又は(株)ニッポンジーン (# 316-04991)。
- ・ ② NTC 用 ColE1/TE 溶液 (5 ng/ $\mu$ L に滅菌水で調製したもの) : 上記標準プラスミド添付品、又は(株)ニッポンジーン (# 318-06031) 、若しくは(株)ファスマック (# NC-2) 。

大豆を分析する際に、標準プラスミド DNA 溶液及び NTC にそれぞれ、標準プラスミド DNA 溶液の①及び NTC の①を使用した場合、内標比は別表 1. に従うこと。また、標準プラスミド DNA 溶液の②及び NTC の②を使用した場合、内標比は別表 2. に従うこと。

とうもろこしを分析する際に、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix 、標準プラスミド DNA 溶液及び NTC にそれぞれ、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix の①、標準プラスミド DNA 溶液の①及び NTC の①を使用した場合、内標比は別表 1. に従うこと。また、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix の②、標準プラスミド DNA 溶液の②及び NTC の②を使用した場合、内標比は別表 2. に従うこと。

## 6 操作

### 6. 1 試料の前処理及び試料の抽出

#### 6. 1. 1 試料の前処理

粉末を扱うために、コンタミネーションが起りやすい。したがって、粉碎室と他の操作を行う部屋は別室とすること。粉碎器及び室内を十分に洗浄、清掃すること。

##### (1) 粉碎

試料は、十分に乾燥していることを確認する。湿潤があれば、フリーズドライにより十分に乾燥して粉碎に供する。粉碎は、1 包装単位全量を粉碎することとし、粉碎器添付のマニュアルに従い、適切に粉碎する。

##### (2) 混合

粉碎物をプラスチックバッグ等に入れ、良く振って全体が均一になるまで混合する。

#### 6. 1. 2 DNA の抽出

DNA の抽出は、1 点につき 1 抽出行う。

大豆粉碎物は、1.0 g を抽出に供し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6 抽出操作」の

「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従い DNA を抽出する。

とうもろこし及びとうもろこし半加工品粉砕物は、1.0 g を抽出に供し、本マニュアル基本操作編「3. 1. 6 抽出操作」の「3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B」に従い DNA を抽出する。

抽出した DNA は、本マニュアル基本操作編「3. 1. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算」及び「3. 1. 8 抽出される DNA の純度」に従い、純度の確認、DNA 量の計算等を行う。その後、O.D.260 nm 吸光度より定量 PCR 用 DNA 溶液として、20 ng/μL（注5）に調製する。

ただし、「5. 2 定量」において、大豆を分析する際に、標準プラスミド DNA 溶液及び NTC にそれぞれ、標準プラスミド DNA 溶液の①及び NTC の①を使用した場合は滅菌水により、標準プラスミド DNA 溶液の②及び NTC の②を使用した場合は TE により調製する。また、とうもろこしを分析する際に、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix、標準プラスミド DNA 溶液及び NTC にそれぞれ、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix の①、標準プラスミド DNA 溶液の①及び NTC の①を使用した場合は滅菌水により、内在性遺伝子検知用 Primer・Probe Mix の②、標準プラスミド DNA 溶液の②及び NTC の②を使用した場合は TE により調製する。

本マニュアル基本操作編「3. 1. 9 記録」に基づき記録すること。

## 6. 2 定量

分析は、標準及び各試料について3点並行（3ウェル）で行う。また、試薬を調製する前に、定量装置（ABI PRISM™ 7700）の電源を ON にする。

### 6. 2. 1 反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、室温で融解後、氷上で保持する。冷蔵庫から出した試薬類は、氷上に保持する等の冷蔵の状態を保つ。

使う前には、最高速で3秒ほど試験管ミキサーにかけ、スピンドウンしておく。

反応液の調製手順

- (1) マスターミックスの調製
- (2) マスターミックスの分注
- (3) 分注液へのテンプレート DNA 添加
- (4) 定量 PCR 用プレートへの分注

1つのサンプル当たり3つのウェルを用い、1つのウェル当たり25 μL の系で反応を行う。

マスターミックスは、内在性遺伝子用と目的とする組換え体特異的遺伝子（specific gene）用を用意する。

TaqMan™ Universal PCR Master Mix を含む溶液は非常に粘性が高く、マイクロピペットで正確な容量を採取するには注意が必要である。このような粘性が高い溶液の容量を正確に採取する際のマイクロピペットの操作を以下に示す。

- ① マクロピペットのプッシュボタンを第1ストップよりも若干深く押し下げる。
- ② マイクロピペットを垂直に保ち、チップの先端を溶液に浸す。
- ③ プッシュボタンをゆっくり戻す。採取したい容量よりも多めに吸引される。
- ④ プッシュボタンを2～3度ゆっくりと第1ストップまで押し、溶液を出し入れしてチップに

なじませる。

- ⑤ マイクロピペットを垂直に保ち、チップの先端を溶液に浸す。
- ⑥ プッシュボタンをゆっくり戻す。採取したい容量よりも多めに吸引される。
- ⑦ チップの先端が溶液内に挿入された状態でチップ内の液面が安定するまで保持する。
- ⑧ チップを静かに引き上げ、マイクロピペットを垂直に保ち、分取先のチューブの内壁にチップ先端をそわせる。
- ⑨ プッシュボタンを第1ストップまで押し下げ、チップ内の液面が安定するまで保持する。
- ⑩ チップ内に残った過剰の溶液は吐き出さず、第1ストップまで押し下げた状態で、チップをチューブから抜き取る。
- ⑪ 連続して同じ溶液を分取する際は、第1ストップまで押し下げた状態（過剰の溶液がチップ内に残った状態）から⑤～⑩の操作を繰り返す。

#### (1) マスターミックスの調製

TaqMan<sup>TM</sup> Universal PCR Master Mix と Primer・Probe Mix を 5 : 4 の割合で混合しマスターミックスを調製する。

試薬の混合を行う前に、全てのサンプルを処理できるマスターミックスを用意するために各試薬の倍数を決める。必要とするマスターミックスの量は、テンプレート DNA の数等で調整する。マスターミックスの倍数決定においてはピペッティングの際に生じる気泡の形成などによる分注量の損失を補填できる十分な量を調製できるように考慮する。

#### 〈混合本数〉

大豆の場合、内在性遺伝子 (Le1) 用と RRS specific 用の 2 種類のマスターミックスを用意する。

とうもろこしの場合、CaMV 35S promoter、GA21 specific な系を用いて定量を行い、検出量によっては、その後 specific な系を用いて定量を行う。この場合、最初に内在性遺伝子 (SSIIb) 用と CaMV 用、GA21 用の 3 種類のマスターミックスを用意する。

次の specific な系においては、内在性遺伝子 (SSIIb) 用と、Bt11 用、T25 用、Event176 用、MON810 用及び必要に応じて行う GA21 用の計 5 又は 6 種類のマスターミックスを用意する。

#### 〈混合量〉

TaqMan <sup>TM</sup> Universal PCR Master Mix	$12.5 \times (X + \alpha)$ $\mu\text{L}$
Primer・Probe Mix	$10.0 \times (X + \alpha)$ $\mu\text{L}$

X : 試薬の倍数 (1 つのサンプル当たり 3 つのウェルを使うのでテンプレート DNA 数の 3 倍)

$\alpha$  : 補填分

調製後最高速で 3 秒程度試験管ミキサーにかけてからスピンドウンする (注 6)。

#### (2) マスターミックスの分注

テンプレート DNA の数だけ 500  $\mu\text{L}$  チューブを用意し、油性マーキングペンで番号を付ける。

マスターミックスを 78.75  $\mu\text{L}$  ずつ、用意したそれぞれの 500  $\mu\text{L}$  チューブに分注する。

なお、この分注量については一例である。1 ウェルに必要なマスターミックス量は 22.5  $\mu\text{L}$  なので、理論的には 67.5  $\mu\text{L}$  以上あればよい。

### (3) 分注液へのテンプレート DNA 添加

マスターミックスを分注したチューブにテンプレート DNA を 8.75  $\mu\text{L}$  ずつ加える。

添加後最高速で 3 秒程度試験管ミキサーにかけてからスピンドウンする（注 6）。

添加量は分注量 78.75  $\mu\text{L}$  に対応している。テンプレート：マスターミックス比は 5：45 を保っている。

### (4) 定量 PCR 用プレートへの分注

反应用 96 ウェルプレート上の反応液の配置を決める。

反应用プレート（MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems 社# N801-0560）を角の切れ込みが右上に来るように置き、（3）で混合した反応液を 25  $\mu\text{L}$  ずつそれぞれ 3 つのウェルに分注する。

分注が終了したらプレートのふたをする。MicroAmp Optical Caps, Applied Biosystems # N801-0935 又は# 4323032 を用いる。同一プレートに# N801-0935 と# 4323032 のふたが混在してはならない。ふたは、真上からまっすぐ閉める。無理な方向から閉めるとふたが破損し、反応液の蒸発・飛散につながる。

最後は、専用の「ローラー付きふた閉め器」を用いて完全に閉める。

ウェルの底に気泡がある場合は、プレートのふちを軽く叩いて気泡を上を追いやる。気泡がウェルの底に残ってしまうと、分析値が不正確になる。

## 6. 2. 2 装置本体へのプレートのセット

- (1) 装置コントロール用 Macintosh の電源を入れる（すでに電源が入っている場合は再起動する。（メニューバーの「Special」→「Restart」））。
- (2) 装置本体の電源が ON になっていることを確認する。緑の READY ランプが点灯していることを確認する。
- (3) 装置本体の右側のカバーを開け、サンプルを載せたプレートをセットする（ふたのつまみを閉めるとき、締め付けすぎないように注意。白い印が手前にきた状態でよい。）。
- (4) Mac 画面のデスクトップ上のアプリケーション“Sequence Detector”をダブルクリックして開く。
- (5) ウェル情報を記入したシートを新規作成する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを replicate として指定しておく。
- (6) メニューバーの「Setup」→「Sample Type Palette」でパレットが出てくるので、パレットの「Sample Type Setup」ボタンを押し、「STND」、「UNKN」、「NTC」の Reporter が「FAM」になっていることを確認する。また、Reference が「ROX」になっており、Quencher が「TAMRA」になっていることを確認する。確認後、パレットを閉じる。
- (7) Setup 画面の「Thermal Cycler Condition」ボタンを押し、反応条件が以下のように設定されていることを確認する。[50  $^{\circ}\text{C}$  2 分→95  $^{\circ}\text{C}$  10 分→（95  $^{\circ}\text{C}$  30 秒→59  $^{\circ}\text{C}$  1 分）×40

サイクル]

- (8) 「Sample Volume」が 25  $\mu\text{L}$  になっていることを確認する。確認後、「OK」を押して閉じる。
- (9) 「Show Analysis」ボタンを押し、Analysis 画面に切り替える。
- (10) Status の表示が、「Idle」になっており、PCR 装置のふたの温度 (Cov. Temp) が 105  $^{\circ}\text{C}$  付近になっていることを確認する。
- (11) 「Run」ボタンをクリックして、反応とデータの取り込みを開始する。

## 7 反応後の解析

反応中に収集された生データは、ハードディスク「SDS7700」の中の「SDS Runs f」に自動的に保存される。(ファイル名の形式: run(MM-DD-YY;TT.MM.SS))

解析は、新たに解析用フォーマットを開き、そこへ生データを取り込む (import) ことによって行われる。以下、手順を示す。

- (1) 「Remaining time」が「00:00:00」になっていることを確認して「STOP」ボタンを押す。
- (2) 開いているファイルを閉じる (念のため適当なファイル名を付けて保存する。)
- (3) 新しいシートを作成し、メニューバーの「File」→「Import」→「LabView Format Raw Data」を選択し、「SDS Runs f」内に保存されている生データを取り込む。
- (4) はじめに、内在性遺伝子を解析する。Set up 画面上で、内在性遺伝子以外のウェルを not in use に指定し、解析対象から外し、「Show Analysis」ボタンを押し、Analysis 画面に切り替える。
- (5) メニューバーの「Analysis」→「Analyze」により、データ解析を行う。「OK」ボタンを押す。
- (6) 反応に使用した全てのウェルを選び、メニューバーの「Analysis」「Amplification Plot」を選択する。新しく開いたウィンドウで増幅の様子がチェックできる。
- (7) 「Amplification Plot」のウィンドウ上で、以下の操作を行う。
  - 1) Baseline の Start を 3 に、Stop を 15 にする。
  - 2) Mult.\*Stddev の値に  $2^m$  を入力する。最初は  $m = 0$  とする (つまり 1 を入力する。)
  - 3) 「Suggest」ボタンを押し、次に「Update Calculations」ボタンを押す。
  - 4) 「Analysis」「Standard Curve」を選択し、Standard Curve の Corr.、slope 及び Y-intercept の値を確認し、「様式 1.Th. Line 決定表」に th. line の値と共に記入する。m を 1 ずつ増加させながら同じ手順を繰り返す。このとき 1 つでも NTC の増幅曲線が th. line と交差する場合は備考欄に NTC と記入する (目視で判断できない場合、Experiment Report 上で Ct 値が 40 に達したとき交差しなくなると判断する。以下同じ。)
  - 5) この操作は最小コピー数の Std 増幅曲線が th. line と交差しなくなるまで繰り返す。最小コピー数の Std 増幅曲線が 1 つでも th. line と交差しなくなったら「様式 1. Th. Line 決定表」備考欄に plot out と記入する。Standard Curve の Corr.、slope 及び Y-intercept の値は記入する必要はない。
  - 6) 増幅率 (A) 及び  $|\Delta A|$  を計算し、以下の条件を満たす th. line を採用する。  
 A 及び  $\Delta A$  の定義:  $A = 10^{(-1/\text{slope})}$ ,  $\Delta A = (A_{m+1} - A_m) / A_m \times 100$   
 条件 1:  $|\Delta A|$  が 2 区間以上連続して 1 % 以下になるときの区間 (最小 m 最大 m)

における中点（以下 mt）での th. line を採用する。ただし、mt が整数にならないときは、小数点以下を切り上げる。

ただし、採用された th. line で得られた Standard Curve の Corr. の値が 0.990 以上かつ増幅率（A）の値が 2.1 以下の条件を満たし、さらに、採用された th. line が NTC の曲線と交差しないこと。

条件 2：条件 1 に合致しない場合は、条件 1 の  $|\Delta A|$  の許容値を 2 % に変えてみる。それでも合致しないときはさらに  $|\Delta A|$  の許容値を 3 %、4 %、5 % と変えてみる。

条件 3：条件 1 又は条件 2 を満たす m が複数ある場合には、大きい m の値を採用する。

（棄却）： $|\Delta A|$  の許容値を 5 % に変えても th. line を採用できない場合には、実験を棄却する。

(8) 決定した th. line で解析結果を表示させる。（「Window」→「Experiment Report」）

(9) 「Experiment Report」上でサンプル中の内在性遺伝子のコピー数を確認し、「混入率算出表」に記入する。

(10) 適当な名前を付けファイルを保存し、閉じる。

(11) 次に、specific gene を解析するために、新しいシートを作成する。

(12) メニューバーの「File」→「Import」→「LabView Format Raw Data」を選択し、「SDS Runs f」内に保存されている生データを取り込む。

(13) 以下、内在性遺伝子と同様にして、解析を行い、「Experiment Report」上でサンプル中の specific gene のコピー数を確認し、「様式 2. 混入率算出表①」又は「様式 3. 混入率算出表②」に記入し、下記の式により各遺伝子組換え系統の混入率を計算する。

$$\text{各遺伝子組換え系統の混入率 (\%)} = \frac{\text{(各遺伝子組換え系統の特異的 DNA 配列のコピー数)}}{\text{(内在性遺伝子のコピー数)} \times \text{(各遺伝子組換え系統の内標比)}} \times 100$$

※ 各遺伝子組換え系統の内標比については、別表 1. 又は 2. に従うこと。

(14) 各遺伝子組換え系統の混入率を合算し、遺伝子組換え体の混入率とする。

## 8 測定のやり直し

測定は 3 ウェルで行われるが、そのうち 1 つでも異常に低い（又は高い）蛍光値（異常値）がでた場合、マスターミックスとテンプレート DNA の混合に問題があることが考えられるため、その試料については再測定を行う（標準プラスミド DNA の測定で異常値がでた場合、検量線が引けなくなるので、全ての測定をやり直す。）。

## 9 定量下限

本方法において、農林水産省が入手した標準的な各 GM 系統種子を使用した場合、RRS specific において 0.1 %、Event176 specific 及び GA21 specific において 0.1 % 並びに Bt11 specific、MON810 specific 及び T25 specific において 0.5 % である。

## 10 記録



抽出に係る記録、様式 1. Th. Line 決定表及び様式 2. 混入率算出表①又は様式 3. 混入率算出表②に必要事項を記入する。

### 1.1 備考

JAS ハンドブックは、一般の小売り用の食品を対象としているため、1 包装を 1 単位としている。ロットの非常に大きい袋積みのもや、サイロ等における検査のサンプリング方法については、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」及び「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正）」を参照する。

遺伝子組換えとうもろこしのスクリーニング法として、CaMV 35S promoter 検知用及び GA21 specific 検知用のプライマー及びプローブを用い、CaMV 35S promoter の測定を MON810 換算して定量し、GA21 の定量値と合算して定量する方法が厚生労働省より出されている。また、JAS ハンドブックの定量法は、ISO 21570:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods(食品—遺伝子組換え体及びその由来製品の分析方法—核酸に基づく定量法)の付属書 C4 から C9 までに記載されている。

(注 1) 本法は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社による特許である（特許第 4291568 号）。

(注 2) 加工食品については、今後、妥当性確認を行っていく予定である。

(注 3) PCR を行うのに十分な DNA 量が得られない場合には、粉碎方法についても検討すること。

(注 4) 別表 1.及び 2.は、ABI PRISM™ 7700 を使用したときの値である。そのため、他機種を用いる場合は、内標比を測定し直す必要がある。

(注 5) 定量では、濃度が薄いものを使用してはならない。濃度が薄い場合は再度抽出を行うこと。

(注 6) 混合する溶液の粘度が高いため、十分に混合する必要がある。混合が不十分な場合 PCR がうまくいかないことがある。

別表 1. ABI PRISM™ 7700 を使用した時の各遺伝子組換え系統の内標比①

作物名	系 統	PCR 増幅領域		
		CaMV35S promoter	NOS terminator	系統特異的定量領域
とうもろこし	Bt11	0.91	0.96	0.50
	GA21	—	1.05	1.40
	T25	0.31	—	0.34
	Event176	0.79	—	2.05
	MON810	0.39	—	0.38
大豆	40-3-2 (RRS)	0.94	1.10	0.95

別表 2. ABI PRISM™ 7700 を使用した時の各遺伝子組換え系統の内標比②

作物名	系 統	PCR 増幅領域		
		CaMV35S promoter	NOS terminator	系統特異的定量領域
とうもろこし	Bt11	0.91	0.86	0.44
	GA21	—	1.34	2.01
	T25	0.34	—	0.34
	Event176	0.86	—	2.02
	MON810	0.39	—	0.38
大豆	40-3-2 (RRS)	0.77	0.97	1.04

様式 1. Th. Line決定表

センター名				備 考	
実験者氏名					
定 量 日					
プレート No.					
Target名					

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	増幅率(A)	ΔA   (%)	ΔA   条件	備 考	採用値
0	1									
1	2									
2	4									
3	8									
4	16									
5	32									
6	64									
7	128									
8	256									
9	512									
10	1024									
11	2048									
12	4096									

様式 2. 混入率算出表①

センター名		特記事項															
実験者氏名																	
定量日																	
試料番号	試料名	Target コピー数および混入率	大豆		とうもろこし スクリーニング				とうもろこし 系統別定量								
			RRS Specific		CaMV35S promoter (MON810)		GA21 Specific		Bt11 Specific		T25 Specific		E176 Specific		M810 Specific		
			内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	
1	コピー数																
	混入率(%)																
2	コピー数																
	混入率(%)																
3	コピー数																
	混入率(%)																
4	コピー数																
	混入率(%)																
5	コピー数																
	混入率(%)																
6	コピー数																
	混入率(%)																
7	コピー数																
	混入率(%)																
8	コピー数																
	混入率(%)																
9	コピー数																
	混入率(%)																
10	コピー数																
	混入率(%)																
11	コピー数																
	混入率(%)																
12	コピー数																
	混入率(%)																
Target		RRS Specific		CaMV35S promoter (MON810)		GA21 Specific		Bt11 Specific		T25 Specific		E176 Specific		M810 Specific			
内標比		0.95		0.39		1.40		0.50		0.34		2.05		0.38			

様式 3. 混入率算出表②

センター名		特記事項															
実験者氏名																	
定量日																	
試料 番号	試料名	Target コピー数および混入率	大豆		とうもろこし スクリーニング				とうもろこし 系統別定量								
			RRS Specific		CaMV35S promoter (MON810)		GA21 Specific		Bt11 Specific		T25 Specific		E176 Specific		M810 Specific		
			内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	内在性配列	特異的配列	
1		コピー数															
		混入率(%)															
2		コピー数															
		混入率(%)															
3		コピー数															
		混入率(%)															
4		コピー数															
		混入率(%)															
5		コピー数															
		混入率(%)															
6		コピー数															
		混入率(%)															
7		コピー数															
		混入率(%)															
8		コピー数															
		混入率(%)															
9		コピー数															
		混入率(%)															
10		コピー数															
		混入率(%)															
11		コピー数															
		混入率(%)															
12		コピー数															
		混入率(%)															
Target			RRS Specific		CaMV35S promoter (MON810)		GA21 Specific		Bt11 Specific		T25 Specific		E176 Specific		M810 Specific		
内標比			1.04		0.38		2.01		0.44		0.34		2.02		0.38		



## V 分析試藥調製編





はじめに

試薬の調製に当たっては、以下の注意を守ること。

- ・ 特別の指定のある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等グレード）を用いること。
- ・ 使用する純水は、電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C)以下になるように脱イオン化されたもの（いわゆる超純水）を用いること。
- ・ 調製試薬には試薬名（試薬内容）、濃度、調製者、調製日を明示しておくこと。
- ・ 専用試薬はその旨明示すること。
- ・ 不要となった試薬あるいはコンタミネーションを起こした試薬は速やかに処分すること。
- ・ 試薬の調製は、基本的な量を示しているので、使用量にあわせて適宜量を調製すること。
- ・ 試薬によっては、結晶水の数が違うものもあるので調製の際は十分確認するとともに、採取量を変えることで溶液の調製ができるようにしておくこと。
- ・ 滅菌した試薬は、クリーンベンチ以外の場所で開いた場合には、内部の滅菌状態は保たれていないことになるので、必要なら再度滅菌する。
- ・ 試薬の調製は、分析の内容をよく理解して必要な精度で行えばよい。

その他、一般的な化学常識に従うこと。

調製試薬一覧

- (1) 滅菌水
- (2) 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
- (3) 1 mol/L Tris-HCl
- (4) 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)
- (5) 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)
- (6) TE
- (7) CTAB 抽出液
- (8) CIA
- (9) PCI
- (10) ゲルローディング緩衝液(ブルージュース)
- (11) TAE
- (12) TBE
- (13) DNA 分子量マーカー
- (14) プライマーの使用法
- (15) プロテインアーゼ K

(1) 滅菌水

純水を 121 °C、15 分以上オートクレーブで滅菌したもの。調製後、ガラスビン中で室温保存する。

滅菌水はコンタミネーションの原因となりやすいので、できるだけ使用量に見合う分ずつ小分けして、一度開封したものは再使用しないようにする。

(2) 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

この試薬は種々の使い方をするので、滅菌したものとししないものを作っておくと便利である。

EDTA・2Na・2H <sub>2</sub> O	試薬特級	46.5 g
純水		200 mL + α
pH 調整用		
NaOH (粒状)	試薬特級	約 5 g
5 mol/L NaOH		適宜
全量		250 mL

ビーカーなどの広口の容器に純水を入れ、スターラーで混ぜながら EDTA を入れる。

粒状の NaOH を加え、EDTA を溶かす。(pH を上げないと EDTA は溶けない)

pH メーターで測りながら 5 mol/L NaOH を加え pH を調整する。

最終液量まで純水を加え、メスアップする。

オートクレーブ滅菌する。室温で保存可能。

(3) 1 mol/L Tris-HCl

Tris : トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン

この試薬は種々の使い方をするのでコンタミネーションに注意する。

種々の pH のものが用いられるが、pH 8.0 のものを主に用いる。

Tris	試薬特級	30.3 g
純水		200 mL + α
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 10 mL
全量		250 mL

ビーカーなどの広口の容器に純水を入れ、スターラーで混ぜながら Tris を加え、溶かす。pH メーターで測定しながら HCl を加えていき、pH を調整する。

溶液が室温に戻るまで冷ます。さらに HCl を加えて pH を調整し直す。

最終液量まで純水を加え、メスアップする。

オートクレーブ滅菌する。室温で保存可能。

Tris 溶液の pH は、温度が 1 °C 上がるごとに 0.03 減少する。

温度も同時に測定しながら次の計算式により求めた補正值に pH を合わせてもよい。

$$(\text{pH の補正值}) = (\text{指示された pH}) - \{ (\text{現在の液温}) - 20 \} \times 0.03$$

(4) 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)

この試薬はもっぱらフェノール平衡化用に用いるが、フェノール平衡化用はフェノール蒸気によるフェノール混入の可能性があるので専用試薬として用いる必要がある。

簡単に作製するのであれば、1 mol/L Tris-HCl を滅菌水により 2 倍に希釈すればよい。

Tris	試薬特級	15.1 g
純水		200 mL + $\alpha$
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 5 mL
全量		250 mL

調製方法は 1 mol/L Tris-HCl と同じ。

(5) 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)

この試薬はもっぱらフェノール平衡化用に用いるが、フェノール平衡化用はフェノール蒸気によるフェノール混入の可能性があるので専用試薬として用いる必要がある。

使用量が少ないので、簡単に作製するのであれば、1 mol/L Tris-HCl を滅菌水により 10 倍に希釈すればよい。

Tris	試薬特級	3.0 g
純水		200 mL + $\alpha$
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 1 mL
全量		250 mL

調製方法は 1 mol/L Tris-HCl と同じ。

(6) TE

10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0); 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)	2 mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	0.4 mL
滅菌水 (又は純水)	約 200mL
全量	200mL

2 mL の 1 mol/L Tris-HCl と 0.4 mL の 0.5 mol/L EDTA を採取し、滅菌水により 200 mL にメスアップする。

本来なら正確にメスアップするのであるが、TE の使用方法からみて、滅菌水を 200 mL 加えても問題はない。

(必要ならオートクレーブ滅菌する。) 室温で保存可能である。

#### (7) CTAB 抽出液

0.1 mol/L Tris-HCl; 0.02 mol/L EDTA; 1.4mol/L NaCl; 2 % CTAB; 1 % ポリビニルピロリドン K30; 0.2 % 2-メルカプトエタノール

CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide; Hexadecyltrimethylammomium (シグマ社製を用いる)

1mol/L Tris-HCl	10 mL
0.5mol/L EDTA	4 mL
NaCl	8.18 g
CTAB (シグマ社製)	2 g
ポリビニルピロリドン K30 (注)	1 g
2-メルカプトエタノール	200 $\mu$ L
純水	約 80 mL+ $\alpha$
全量	100 mL

10 mL の 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、4 mL の 0.5 mol/L EDTA、8.18 g の塩化ナトリウム、2 g の CTAB、1 g のポリビニルピロリドンを温めながら全量 100 mL に溶かし、オートクレーブ滅菌の後、冷めたら 200  $\mu$ L のメルカプトエタノールを加える。

(注) ポリビニルピロリドンを用いると DNA の回収率が落ちる場合がある。

#### (8) CIA

クロロホルム : イソアミルアルコール = (24 : 1)

クロロホルム	48 mL
イソアミルアルコール	2 mL

ガラスの容器にクロロホルムとイソアミルアルコールを指定された量ずつ入れて混ぜる。遮光して室温で保存する。

#### (9) PCI

フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = (25 : 24 : 1)

ガラスの容器に平衡化中性フェノールと CIA (24 : 1) を等量ずつ入れて混ぜる。

アルミ箔で覆い、4 °C で保存する。4 °C で約一ヶ月保存可能である。

#### ○平衡化中性フェノールの作製法

フェノールは、強力なタンパク質変性作用を持つ試薬で、腐食性が強く、皮膚については薬品性の火傷を起こすので、取り扱いには十分注意をしなければならない。もし皮膚についてしまった場合は、速やかに大量の流水と石けんで洗い流すこと。核酸抽出用として販売されているフェノールは、無色の結晶である。

フェノールは吸水性があるので、あらかじめ緩衝液で飽和しておく必要がある。また、DNA は酸性条件下ではフェノール層に分配されてしまうため、弱酸性のフェノールはそのままでは DNA の抽出に用いることができない。そこで、通常は、フェノールの液性を Tris 緩衝液などで中性に調整する。

#### 平衡化中性フェノール

フェノール（核酸抽出用）	40 g
8-ヒドロキシキノリン	0.04 g
2-メルカプトエタノール	90 $\mu$ L
0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）	90 $\mu$ L
<hr/>	
0.5 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）	60 mL 以上（フェノール平衡化専用）
0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）	60 mL 以上（フェノール平衡化専用）

- ① フェノール結晶を 50 mL のポリプロピレンチューブに採る。
- ② 0.04 g の 8-ヒドロキシキノリンを加える。
- ③ 0.5 mol/L Tris-HCl をチューブにほぼ一杯になるまで加える。
- ④ ふたをして、65 °C のウォーターバスに入れてフェノールを溶かす。
- ⑤ 5-10 分間激しく混合する。
- ⑥ 2,000 rpm で 5 分間遠心して、上層の水層を除く。
- ⑦ もう一度 0.5 mol/L Tris-HCl を加え、15 分間混合した後、遠心して水層を除く。
- ⑧ 0.1 mol/L Tris-HCl を加えて混合し、遠心して水層を除く。
- ⑨ フェノール層の pH を試験紙で確認し、pH 7.8 以上になるまでこの操作を続ける。
- ⑩ 約 10 mL の 0.1 mol/L Tris-HCl を加え、さらにメルカプトエタノール、0.5 mol/L EDTA を加える。
- ⑪ アルミ箔で覆い、平衡化した日付を明記し、4 °C あるいは-20 °C で保存する。-20 °C で保存すると三ヶ月程度は保存可能である。

#### (10) ゲルローディング緩衝液（ブルージュース）

メーカーによっては DNA 分子量マーカーを買うと添付されていることがある。

BPB：ブロモフェノールブルー

XC：キシレンシアノール FF

1 % BPB	2.5 mL
1 % XC	2.5 mL
0.5 mol/L EDTA	0.02 mL
フィコール 400	1.5 g
滅菌水	+ $\alpha$
<hr/>	
全量	10 mL

BPB、XC を測り、滅菌水を用いてそれぞれ 1 % の水溶液を 10 mL 作る。

BPB、XC、EDTA 溶液と、フィコールを計量し、容器に入れる。

滅菌水を加え、よく混ぜる。室温で保存する。

(11) TAE

Tris-酢酸、EDTA

電気泳動用の緩衝液である。TAE は数 kb 以上の長い DNA の分離に適する。

		1×	50×
Tris	試薬特級	4.84 g	242 g
酢酸	試薬特級	1,142 $\mu$ l	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA		2 mL	100 mL
純水		900 mL + $\alpha$	700 mL + $\alpha$
<hr/>			
	全量	1,000 mL	1,000 mL

それぞれの試薬を測り、ビーカーに入れて溶かす。

最終液量までメスアップする。

(12) TBE

Tris-ホウ酸、EDTA

電気泳動用の緩衝液である。TBE は短い DNA の分離に適するので、PCR 産物の泳動には主にこれを用いる。

		1×	50×
Tris	試薬特級	10.8 g	540 g
ホウ酸	試薬特級	5.5 g	275 g
0.5 mol/L EDTA		4 mL	200 mL
純水		900 mL + $\alpha$	600 mL + $\alpha$
<hr/>			
	全量	1,000 mL	1,000 mL

それぞれの試薬を測り、ビーカーに入れて溶かす。

最終液量までメスアップする。

TAE と TBE は電気泳動で大量に必要なになるので、50 倍濃度のもの (50× と表示) を用意し、使用時に 50 倍希釈して用いるとよい。

#### (13) DNA 分子量マーカー

電気泳動の際に、DNA のおよその大きさを知るために同時に泳動する標準物質。各種の分子量のものが種々の組み合わせで含まれたものが販売されているので、目的とする DNA サイズにあったものを使用すればよい。

原液の濃度が  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 500 \text{ ng}/\mu\text{L}$  の場合、これを目的の濃度に希釈して用いる。使用濃度は  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  なので、前記の場合滅菌水で 50 倍に希釈する。これを、ゲルローディング緩衝液と規定量で混合し冷蔵保存しておく。ただしあまり大量に作っておくと、DNase が混入したときに被害が大きくなる。

#### (14) プライマーの使用法

プライマーは、既製のプライマーを発注するか、必要とする DNA 配列のものを合成することになる。

プライマー溶液のコンタミネーション等の異常は、直接結果に影響を与えるので、取り扱いに当たっては、次の注意事項を厳密に守ること。

- ・希釈に使用する TE 及び滅菌水は、できるだけ使用の間近に滅菌した未開封のものを使用する。
- ・分注・希釈作業は、他の作業と別に PCR 用クリーンベンチ内で行う。
- ・コンタミネーションを起こした場合は速やかに処分する。
- ・凍結融解を繰り返すとプライマーは劣化するので、できるだけ一本のチューブは早めに使い切るようにする。

#### ○既製のプライマーの場合

5' プライマー (50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  調製品)、3' プライマー (50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  調製品) 又は、5' プライマー・3'プライマー混合品 (各 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  調製品) が、(株)ニッポンジーン又は、(株)ファスマックより販売されている。

##### ① プライマー対溶液の調製

500  $\mu\text{L}$  チューブ (又は 1.5 mL) を用意し、5' プライマー・3'プライマー混合品はそのまま、5' プライマーと 3' プライマーが別々になっている場合は等量混合し、チューブに 20  $\mu\text{L}$  ずつ分注する。チューブの蓋にプライマー名とナンバーを書いたシールを貼る。ナンバーは 1 から順に増やして同じ番号を使わないようにする。チューブを  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冷凍庫の所定の箱に保存する。箱の上にプライマーの名前を書いたシールを貼る。

##### ② 使用中のプライマーについて

使用したプライマー対溶液は、チューブの蓋 (シール) に赤でチェックを入れて使用中であることを記す。

#### ○カスタム合成品の場合

DNA のカスタム合成については種々の試薬会社に取り扱っているため、PCR プライマーとして適当なものを発注すればよい。合成 DNA は凍結乾燥した粉末として入手される場合が多いので、これを希釈して用いる必要がある。この場合、希釈濃度が低いほど、保存中に脱プリン化が起これ、プライマーとしての用をなさなくなることがあるので、希釈に当たっては、保存用のプライマー原液と、当面の使用に供するプライマー溶液の2段階希釈とする。

① プライマー原液の調製

プライマーのチューブ（乾燥品）に TE を加え、200  $\mu\text{mol/L}$  とする。チューブは、 $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍庫の所定の場所に保存する。

TaKaRa Custum DNA の場合、製品に付随する説明書に以下のように表示している。100 pmol/  $\mu\text{L}$  にするために加える Buffer (TE) 量：○○  $\mu\text{L}$  （○○は、製品ごとに異なる。）

200  $\mu\text{mol/L}$  に調製するためには、○○  $\mu\text{L}$  の半量の TE を加えればよい。

(参考) pmol/ $\mu\text{L}$  =  $\mu\text{mol/L}$

② プライマー対溶液の調製

500  $\mu\text{L}$  チューブ（又は 1.5 mL）を用意し、5' プライマー原液を 25  $\mu\text{L}$  取り、滅菌水 75  $\mu\text{L}$  を加え、全量 100  $\mu\text{L}$ 、濃度 50  $\mu\text{mol/L}$  とする。3' プライマー原液を 25  $\mu\text{L}$  取り、滅菌水 75  $\mu\text{L}$  を加え、全量 100  $\mu\text{L}$ 、濃度 50  $\mu\text{mol/L}$  とする。両溶液を混合し、500  $\mu\text{L}$  チューブに 20  $\mu\text{L}$  ずつ分注する（計 10 本）。チューブの蓋にプライマー名とナンバーを書いたシールを貼る。ナンバーは 1 から順に増やして同じ番号を使わないようにする。チューブを  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍庫の所定の箱に保存する。箱の上にプライマーの名前を書いたシールを貼る。

③ 使用中のプライマーについて

使用したプライマー対溶液は、チューブの蓋（シール）に赤でチェックを入れて使用中であることを記す。

(注) 当然のことながら、厳密に 20  $\mu\text{L}$  である必要はなく、使用しやすい量に分注すればよい。

(15) プロテイナーゼ K

プロテイナーゼ K は、ロシュ・ダイアグノスティックス社製、凍結乾燥品を用いる。滅菌した容器に必要量のプロテイナーゼ K を秤量し、滅菌水を加えて 20 mg/mL の溶液を作製する。冷凍保存する。



## VI コンタミネーション防止編



## 1 はじめに

遺伝子組換え食品の検査・分析には PCR を用いる。この技術は、目的とする DNA を数百万倍に増幅し、検出しようとするものである。このため、わずかなコンタミネーション (contamination=汚染) があっても、間違った検出がされてしまう。このため、コンタミネーションの防止には細心の注意を払う必要がある。

遺伝子組換え食品の検査・分析はおよそ次のような流れで行われる。

サンプリング→DNA抽出→PCR増幅→電気泳動

コンタミネーションを防ぐためには、実験室をこの流れに沿った作業動線とし、流れを逆流させないことが重要になる。また、各担当者に作業手順等について十分な知識を与え、例えば、検査が重なった場合でも電気泳動をしたその手で PCR の操作にはいるような作業手順とならないような検査計画を作らせることが重要である。

## 2 全体としての考え方

- ・コンタミネーションの原因は実験環境によるものが大きい。特に、試料の前処理において、試料を粉体とする場合は、コンタミネーションがおこりやすいため、少なくとも粉碎室と他の操作を行う部屋は別室とすること。
- ・コンタミネーションを完全に防止することはできないので、リスクを低減する方法を考える。
- ・コンタミネーションが起こったときの原因究明を含めた対処法を用意しておく。
- ・実験操作の意味を十分理解した上で、なるべく簡単・簡便な方法を採用する。
- ・器具の使用方法について十分理解した上で、なるべくディスポーザブル (使い捨て) のものを採用する。
- ・多人数での作業を考え、作業毎の区分管理を徹底する。
- ・コンタミネーションとして特に注意するのは、DNase と検出対象の DNA 断片である。DNase が混入すると必要な DNA が分解され、検査不能となる。検出対象の DNA 断片が混入すると、誤った陽性結果が得られる。
- ・オートクレーブで DNA を完全に分解することはできないので、過信しないこと。
- ・PCR のアンプリコン (PCR 産物) を廃棄するときは、ビニール袋等に密封して適切に処理すること。
- ・実現可能なコンタミネーション防止法を採用する。
- ・目的に応じた内部質管理レベルを組織的にはっきりさせる。人によって対応が異ならないようにする。

## 3 実験操作

- ・作業毎の手洗いはコンタミネーションの防止に有効である。
- ・不要の DNA を分解させるには、次亜塩素酸処理と UV 照射が有効である。
- ・各作業は独立に行い、実験の流れを遡ってはならない。

### 3.1 サンプリング

- ・試料の粉碎には、十分な作業スペースを確保すること。実験台にラップ等を敷いて粉碎器をその上に置き、試料を粉碎する。粉碎した試料の粉末を飛散させないように気をつける。例えば、ドラフト中で作業することも望ましい。

### 3.2 DNA の抽出

- ・溶液の入ったチューブ類は開ける前に軽く遠心し、フタについた溶液を落とす。
- ・チューブの開閉の際に飛沫が飛ばないように注意する。できれば専用のチューブオープナーを利用すると良い。
- ・実験の際は、操作をしやすいように器具試薬を机の上に配置する。

### 3.3 PCR

#### 解説

PCR は DNA の特定部分を何百万倍にも増幅する技術である。理論的には一本の DNA があれば増幅可能であり、20 回の PCR 反応後には、約 100 万倍の PCR 産物が生じ、検出が可能となる。

このため PCR においては外からの遺伝子の混入を防ぐことが重要になる。

- ・操作は隔離した部屋又はクリーンベンチで行う。
- ・PCR には専用のピペッター、チップ等を用いる。これらには明確に PCR 用と表示すること。
- ・ピペットチップは操作毎に使い捨てとする。できればフィルター付きを用いる。
- ・実験には、新しい手袋を装着する。
- ・できれば眼鏡（防護眼鏡）、帽子、マスクを着用する。
- ・作業中は話さない。咳・くしゃみをしないこと。人間の体内には DNase が含まれているため、つばが飛んでチューブにはいると DNA が分解されてしまう。
- ・試料 DNA を加える前に、他の試薬すべてを加えておく。
- ・コントロールなしで PCR を行ってはならない。
- ・次のチューブに試料を加える前に、必ず他のチューブを閉じておく。

### 3.4 電気泳動

#### 解説

PCR は DNA の特定部分を何十倍にも増幅する技術である。すなわち PCR 産物は再び PCR の鋳型となるので、コンタミネーション防止の観点からいうと、PCR 反応液は高濃度のコンタミネーション原因物質である。

電気泳動に際しては、この PCR 産物を密閉されたチューブから取り出し、ピペット操作を行う。この操作中に、PCR 産物がエアロゾルとして拡散することが考えられる。このようなエアロゾルは、空気中を長く飛散することとなり、コンタミネーションの原因となる。このため、電気泳動は、できるだけ他の作業と区分して行う必要がある。

電気泳動は、PCR 産物を他の操作（例えば nested PCR）に使うのでなければ無菌的に行う必要はない。このため、電気泳動専用の器具類は、電気泳動の作業場所において準備、

使用、廃棄等を行うことができる。

- ・電気泳動は他の作業と明確に区分して行う。
- ・電気泳動には専用のピペッター、チップ等を用いる。これらには明確に電気泳動用と表示すること。
- ・PCR 産物を取り扱った器具類は、他の場所に持ち出さない。
- ・電気泳動の準備に使用したチップやチューブ、パラフィルムは密封できるポリ袋（ジップロック等）に封入してからゴミとして廃棄すること。

#### 4 日常管理

##### 4.1 滅菌水

- ・滅菌水はコンタミネーションの原因となりやすいことから、1回に使い切る量程度に小分けして、オートクレーブ滅菌を行う。

##### 4.2 一般試薬

- ・溶液類は熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。
- ・試薬類はなるべく1回に使い切る程度に小分けして、個人管理とする。個人管理とすることで、コンタミネーションが起こったときの被害を最小限にできる。
- ・専用試薬は、その旨明示すること。
- ・不要となった試薬あるいはコンタミネーションを起こした試薬は速やかに処分する。

##### 4.3 プライマー（本マニュアル分析試薬調製編を参照）

- ・プライマーの希釈・分注には最大限の注意を払う。
- ・希釈・分注に用いる器具、試薬はオートクレーブ後、未開封のものを使用する。
- ・フィルター付きチップを用いるのが望ましい。
- ・希釈したプライマーは小さなチューブに分注して保存する。
- ・チューブは一度使用したら、そのことを明示し、使用したものが責任を持って管理する。

##### 4.4 オートクレーブ

###### 解説

オートクレーブは、水蒸気を利用して高温高圧の環境を作り出し、滅菌を行う装置であるが、DNAを完全に分解することはできない。このためオートクレーブ中に特異的なDNA断片が残り、それによってコンタミネーションが起こる可能性がある。

- ・専用のオートクレーブを用いる。
- ・できれば使用毎にオートクレーブ内部の洗浄を行う。

##### 4.5 クリーンベンチ

###### 解説

クリーンベンチはフィルターを通した空気を実験台上に供給することで無塵の環境を作

り出している。しかし、DNA がフィルターにどの程度トラップされるのかは不明である。したがって、空気を循環させながら PCR のピペット操作を行うことが良いのか悪いのか、現時点では明らかでない。このため、クリーンベンチを過信せず、できるだけクリーンな状態を保つよう心がける。

- ・ 不要な DNA を分解するために、UV ランプを点灯し、8 時間以上 UV を照射する。

#### 4.6 実験室

- ・ 定期的の実験台や試薬棚の掃除を行う。