

別添

バルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこしの分別生産流通管理の指針

1. 農家の生産段階及びカントリーエレベーターの流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 種子の播種

種子証明書または種子名（番号）によるチェック

② 収穫

非遺伝子組換えのみを他のものと混じらないよう収穫

③ 農器具・機器

播種機、収穫機等の農機具・機器は非遺伝子組換え専用化、併用の場合クリーニング

④ 出荷又は集荷輸送のための車両等

車両等については非遺伝子組換え専用利用が望ましいが、専用利用されない車両等はあらかじめクリーニング

⑤ 保管施設及び搬出入施設

サイロ等の保管施設及び搬出入施設については非遺伝子組換え専用利用。時期をずらして使用する等専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

農家又は農家を管理すべき立場にあるカントリーエレベーター等の集荷業者

(3) 記録

種子名（番号）、出荷数量、出荷年月日、集荷（搬入農産物の種子名 [番号]、購入農家、数量、年月日）、保管（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日）、入出庫（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日）、非遺伝子組換え専用利用されない場合クリーニング実施確認

(4) 確認主体

集荷業者は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

2. リバーエレベーターの流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 集荷輸送のためのトラック、貨車及びはしけ（バージ）

トラックについては非遺伝子組換え専用利用が望ましいが、専用利用されないトラック及び貨車、はしけはあらかじめクリーニング

② 保管施設及び搬出入施設

保管施設及び搬出入施設については非遺伝子組換え専用利用。専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

リバーエレベーター

(3) 記録

集荷（搬入農産物の種子名〔番号〕、購入農家、数量、年月日）、保管（品名、専用の場合を除きビン番号）、入出庫（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日）、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

集荷業者または輸入業者等は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

3. エクスポートエレベーター及び日本までの輸送段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 保管施設及び本船への積み込み施設

非遺伝子組換え専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

② 船艙への積み込み

一つの船艙内に異なる品種（商品）を区分して搬入する場合には充分注意し、他との混入がないようにする。

③ 本船から内航船、はしけへの積み替え

非遺伝子組換え専用利用されないはしけ及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

エクスポートエレベーター及び港湾サイロの管理者もしくは管理受託者

(3) 記録

入荷、入出庫、輸出入（品名、数量、本船名、ハッチ番号、年月日、搬出入港）、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

輸入業者は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

4. 港湾サイロの日本国内流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① サイロビン、バケットエレベーター、計量器、コンベア等サイロへの搬出入非遺伝子組換え専用利用されない港湾サイロ及び機器についてはあらかじめクリーニング

② 選別作業（バケットエレベーター、原料タンク、製品タンク、石抜き機、真比重選別機等）

非遺伝子組換え専用利用されない選別機器についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

倉庫業者及び選別業者等

(3) 記録

入荷、入出庫、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

荷主（卸売業者、製造業者及び輸入業者等）は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

5. 卸売業者（主として大豆）の流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① サイロへの搬出入

② バルク輸送の場合の輸送

③ 選別作業（バケットエレベーター、グラビティ・セパレーター、粗選別機、石抜き機、真比重選別機、選別機器、袋詰め等）

非遺伝子組換え専用利用されない保管施設、輸送車、選別作業、機器等についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

卸売業者

(3) 記録

原料購入、原料保管、保管箇所ごとの入出庫、製品販売、袋詰め作業（品名、数量、荷姿、年月日）、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

卸売業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

6. 加工業者（グリッツ・スターチ工場）の流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 原料搬入

搬入機器を使用する前に空運転して残留物がないことを確認すること。

② 選別施設

選別機器を使用する前に空運転して残留物がないことを確認すること。

③ グリッツ・スターチの製造ライン

従前の使用原料が不分別原料であった場合、製造施設に残留物がないことを確認するとともに微粉状あるいは液状の残留が懸念される時は当該施設のクリーニングを行うこと。

④ グリッツ・スターチの保管・出荷

製品倉庫では不分別原料と保管場所を別にすること。

(2) 管理主体

グリッツ・スターチ製造業者

(3) 記録

原料購入、原料受払、製造、保管場所、製品入出庫、受渡、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

グリッツ・スターチ製造業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

7. 食品製造業者の製造段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 原料搬入

証明書による非遺伝子組換え農産物の確認

② 原料分別保管

不分別原料との明確な区分保管

③ 製造ライン

非遺伝子組換え専用利用されない製造ラインについてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

食品製造業者

(3) 記録

原材料購入（購入先、数量、製造、） 保管、出荷、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

食品製造業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

8. 証明書の発行及び保存

流通の各段階において確認が行われた旨の証明書を取引の相手方に発行し、かつ、当該証明書を受け取った者は、これを2年以上保存する。

別添

安全性審査済みの 遺伝子組換え食品の検査方法

最終改正

2019年3月28日

目次

1. 検体採取方法	7
1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取	7
1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取.....	7
1.1.1.1. 袋積みの場合.....	7
1.1.1.2. ばら積みの場合.....	8
1.1.1.2.1. サイロ搬入時.....	8
1.1.1.2.2. はしけ搬入時.....	8
1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取.....	8
1.1.1.3. 加工食品の検体採取.....	8
1.1.2. パパイアの検体採取.....	9
1.1.2.1. 生鮮パパイアの検体採取.....	9
1.1.2.2. パパイヤ加工品の検体採取.....	9
2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法	10
2.1. ダイズ穀粒の検査法	10
2.1.1. 定量 PCR 法.....	10
2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR.....	12
2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700).....	12
2.1.1.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700).....	13
2.1.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700).....	14
2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700).....	14
2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR.....	14
2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well).....	14
2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well).....	15
2.1.1.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384well).....	16
2.1.1.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well).....	17
2.1.1.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384well).....	17
2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR.....	17
2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000).....	17
2.1.1.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000).....	18
2.1.1.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000).....	18

2.1.1.3.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7000)	19
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR	19
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	19
2.1.1.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	19
2.1.1.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	20
2.1.1.4.4. 検量線の作成 (Applied Biosystems® 7500)	21
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR	21
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	21
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	23
2.1.1.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	23
2.1.1.5.4. 検量線の作成 (Roche LightCycler System)	23
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR	24
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio5)	24
2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)	24
2.1.1.6.3. PCR (QuantStudio 5)	25
2.1.1.6.4. 検量線の作成 (QuantStudio5)	25
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR	25
2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio12K Flex)	25
2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio12K Flex)	26
2.1.1.7.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)	26
2.1.1.7.4. 検量線の作成 (QuantStudio 12K Flex)	27
2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR	27
2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)	27
2.1.1.8.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)	27
2.1.1.8.3. PCR (LightCycler® 96)	28
2.1.1.8.4. 検量線の作成 (LightCycler® 96)	28
2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR	28
2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)	28
2.1.1.9.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)	29
2.1.1.9.3. PCR (LightCycler® 480)	29
2.1.1.9.4. 検量線の作成 (LightCycler® 480)	29
2.1.2. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算	30
2.1.3. 結果の判定	30
2.1.4. ELISA 法 (参考検査法)	30
2.2. トウモロコシ穀粒の検査法	32
2.2.1. 定量 PCR 法	32
2.2.1.1. <i>Cauliflower mosaic virus</i> 由来の 35S promoter が組み込まれた組換え系統の定量	33
2.2.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量	33

2.2.1.3. 結果の判定	34
2.2.2. マルチプレックス PCR 法	34
2.2.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング	35
2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	35
2.2.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	37
2.2.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	38
2.2.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	38
2.2.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング	38
2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	38
2.2.2.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	39
2.2.2.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	39
2.2.2.2.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	39
2.2.2.3. 結果の判定 (図 1 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム)	39
2.2.3. 粒単位検査法	42
2.2.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法	42
2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製	42
2.2.3.1.2. プレート情報の設定	43
2.2.3.1.3. PCR	43
2.2.3.1.4. PCR 結果の解析	43
2.2.3.2. 結果の判定	43
2.2.4. グループ検査法	43
2.2.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法	44
2.2.4.1.1. 反応液の調製	44
2.2.4.1.2. プレート情報の設定	46
2.2.4.1.3. PCR	47
2.2.4.1.4. PCR 結果の解析	47
2.2.4.1.5 結果の判定 (図 2 グループ検査法試験結果の判定スキーム)	48
2.2.4.2. 組換え系統の判別 (参考検査法)	51
2.2.4.2.1. リアルタイム PCR	51
2.2.4.2.2. プレート情報の設定	53
2.2.4.2.3. PCR	53
2.2.4.2.4. 結果の判定	54
2.3. ダイズ加工食品の検査法	54
2.3.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR	55
2.3.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	55
2.3.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	55
2.3.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	55
2.3.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	56

2.3.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR.....	56
2.3.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	56
2.3.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)	57
2.3.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384well)	57
2.3.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	58
2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	58
2.3.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR.....	58
2.3.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)	58
2.3.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)	59
2.3.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)	59
2.3.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)	59
2.3.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR.....	60
2.3.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	60
2.3.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	60
2.3.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	60
2.3.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)	61
2.3.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR	61
2.3.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	61
2.3.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	62
2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	62
2.3.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)	62
2.3.6. 測定結果の判定.....	62
2.4. トウモロコシ加工食品の検査法	66
2.4.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR.....	66
2.4.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	66
2.4.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.4.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.4.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.4.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.....	69
2.4.2.1. PCR 用反応液の調製*1 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	69
2.4.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	70
2.4.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	71
2.4.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	71
2.4.3. 測定結果の判定.....	71
2.5. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法	75
2.5.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法.....	75
2.5.1.1. CTAB 法.....	75

2.5.1.2. 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)	77
2.5.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用)	78
2.5.1.4. 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)	79
2.5.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用)	80
2.5.1.6. シリカベースレジジンタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)	81
2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法.....	82
2.5.2.1. 検体前処理.....	83
2.5.2.1.1. ダイズ加工食品.....	83
2.5.2.1.2. トウモロコシ加工食品.....	86
2.5.2.2. DNA の抽出精製.....	87
2.5.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A (ダイズ加工食品に適用)	87
2.5.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B (トウモロコシ加工食品に適用)	89
2.5.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出	90
2.5.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出	91
2.5.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存.....	92
2.5.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製.....	93
2.5.5. グループ検査のための DNA 試料液調製.....	94
2.5.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製 (NIPPON GENE GM quicker)	94
2.6. パパイヤ検査法 (55-1 系統)	95
2.6.1. 検査原則及び試料調製法	95
2.6.2. GUS 試験法.....	96
2.6.2.1. 実験操作.....	96
2.6.2.2. 結果の判定	98
2.6.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法	98
2.6.3.1. 試料前処理	99
2.6.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製	100
2.6.3.2.1. DNA の抽出精製*1.....	100
2.6.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存.....	101
2.6.3.3. リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)	102
2.6.3.3.1. PCR 用反応液の調製.....	102
2.6.3.3.2. プレート情報の設定	103
2.6.3.3.3. PCR	104
2.6.3.3.4. 結果の解析及び判定	104
(別紙 1) 内標比.....	107
(別紙 2) トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順.....	111
(参考)	113

検査方法の同等性確認方法115

別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

1. 検体採取方法

1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取

1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取

遺伝子組換え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。

* ダイズ及びトウモロコシの穀粒に関しては、1 検体（検体採取量 1 kg）のうち、500 g を粉砕し定量 PCR 検査に用い、残りの 500 g は穀粒の状態では保管する。粒単位検査法の際には、その残りの 500 g の穀粒から採取する。

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1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。

1.1.1.3. 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。

ダイズ及びトウモロコシの粉砕加工品(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。)の検体採取については、1.1.1.1.袋積みの場合に従う。

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
≦ 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
≧ 500,001	50	120	1

1.1.2. パパイヤの検体採取

遺伝子組換え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、他ロットの果実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。

1.1.2.1. 生鮮パパイヤの検体採取

生鮮パパイヤ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)
≦ 50	2	2
51 ~ 500	3	3
501 ~ 35,000	5	5
≧ 35,001	8	8

1.1.2.2. パパイヤ加工品の検体採取

パパイヤ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1.1.1.3.加工食品の検体採取の表に従い検体採取を行うこと。なお、果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を480gとする。また、パパイヤの含有量が少ない加工品について実施する場合は、製品分類ごとに複数回の前処理試行が可能となるよう適宜検体採取量を増やして採取する。

2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法

分別生産流通管理を実施しても意図せずに混入してくる遺伝子組換え食品の混入許容値は、ダイズ及びトウモロコシについては5%となっている。混入許容値を超えているかどうかの判定は、ダイズ穀粒に関しては定量PCRにて行う。また、トウモロコシ穀粒に関しては、まず、定量PCR又はマルチプレックスリアルタイムPCRを用いたスクリーニング検査を実施し、混入許容値を超えている可能性があるかと判定された場合、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。一方、ダイズ及びトウモロコシの加工食品に関しては、遺伝子によって加工過程でのDNA分解率が一定でないため、定量PCR及びマルチプレックスリアルタイムPCRを用いたスクリーニング検査で正確な判定はできない。そのため、ダイズ及びトウモロコシの加工食品においては、リアルタイムPCRを用いた定性PCRを実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。また、パパイヤに関しては、生鮮食品及び加工食品共にリアルタイムPCRを用いた定性PCRを実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。

2.1. ダイズ穀粒の検査法

これまで国内に流通する遺伝子組換えダイズに関しては、RoundupReady Soybean (40-3-2) (以下「RRS」という。)が唯一のものであったが、2002年に承認されたバイエルクロップサイエンス社のA2704-12系統の遺伝子組換えダイズLiberty Link Soybean (Event A2704-12) (以下「LLS」という。)及び2007年に承認されたモンサント社のRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下「RRS2」という。)が収穫されており、国内に流通することが予想されている。

2.1.1. 定量PCR法

TaqMan Chemistryを応用した定量PCR法を行う。同法では、プライマー対及び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、同プローブにはレポーター、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。

遺伝子組換え食品の定量は、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*1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。

ダイズを対象とした定量PCR法においては、ダイズ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) *2 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とプローブ*3 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*4) 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有量 (重量パーセント) となる。

以下に定量 PCR 法の実際を述べる。定量 PCR は、RRS 検知法は ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT (96 well 及び 384 well)、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。LLS 検知法及び RRS2 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT (96 well)、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 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、手技及び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、PCR 法で用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ・cm まで精製した超純水とする。

*1 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 (5 ng/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 (5 ng/μL) をブランク試料液 (NTC : no template control) とした、計 6 点について検量線を作成する。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 5 ng/μL の濃度に調製した溶液である。ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

RRS 検知 : GM サイズ (RRS) 陽性コントロールプラスミド

LLS 検知 : GM サイズ (LLS) 陽性コントロールプラスミド

RRS2 検知 : GM サイズ (RRS2) 陽性コントロールプラスミド

*2 レクチン遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

Le1-n02 [Le1n 02-5' (5'-GCCCTCTACTCCACCCCA-3') & Le1n 02-3' (5'-GCCCATCTG CAAGCCTTTTT-3')] 及び

Le1-Taq (5'-FAM-AGCTTCGCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3')

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

RRS 検知 : RRS-01 [RRS 01-5' (5' -CCTTTAGGATTTTCAGCATCAGTGG-3') & RRS 01-3' (5'-GACTTGTCGCGGGAATG-3')] 及び

RRS-Taq (5'-FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA-3')
LLS 検知 : KVM175 (5'-GCAAAAAGCGGTTAGCTCCT-3')、
SMO001 (5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3') 及び
TM031 (5'-FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTTCC-TAMRA-3')
RRS2 検知 : MON89788-F (5'-TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3')、
MON89788-R (5'-TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3') 及び
MON89788-P (5'-FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3')

*4 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（ダイズ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 1 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、最終頁の（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。

2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

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。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) *1 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µM）0.5 µL、水 9 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL（50 ng）又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2.5 µL、若しくは 5 ng/µL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）2.5 µL。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*2。

実際の調製は、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 TaqMan® 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 TaqMan® Universal PCR Master Mix を 1 : 1.25 の比率で混合させるとよい。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 µL 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 78.75 µL 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 µL 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 µL/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 TaqMan® 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。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、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。なお、TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに Eagle Taq Master Mix (Roche Diagnostics) 等を用いることもできる。

*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。

*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 µM、対象プローブ濃度が 0.5 µM 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 ウェルプレート及びプレートの蓋

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical 8-Cap Strips (Thermo Fisher Scientific 社) を使用する。

2.1.1.1.2. 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

(「STND」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*1、「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*2。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。

2.1.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)

装置にプレートセットし、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、45 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。

2.1.1.1.4. 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 (ΔRn) 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 ΔRn 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 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 (Cq) 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 Cq 値 (y 軸) をプロットし、各 Cq 値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。

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR

2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及

び ABI PRISM® 5700) のとおり。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*1。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2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。

*1 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)

PCR 用反応液は 20 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) *1 10 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µM) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.4 µL、水 7.2 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2 µL (40 ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2 µL*2、若しくは 5 ng/µL ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2 µL。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*3。

実際の調製は、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 TaqMan® 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*4を先に調製しておき、これと TaqMan® Universal PCR Master Mix を 1 : 1.25 の比率で混合させるとよい。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 µL 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*5の微量遠沈管に 63 µL 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 µL 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 µL/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ケーションを用いて行

う*6。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 TaqMan® 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。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、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 384 well 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 µL 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。

*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 µM、対象プローブ濃度が 0.5 µM 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

MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.2.3. 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全てを指定する。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といよい。

*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。2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well) 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は、液量の違いから、コピー数が異なるため注意する。

2.1.1.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)

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、9600 emulation 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。

2.1.1.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384well)

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり*。

* 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。

2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR

2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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

アプリケーターを用いて行う*1。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2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。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.3.2. 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*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全てを指定する。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ことよ。

*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。

2.1.1.3.3. 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°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、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。

2.1.1.3.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7000)

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり*。

* 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。

2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR

2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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*。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。

* 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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といよい。

*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。

なお、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合はトップ画面で

「Advanced Setup」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を

「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が

「TAMRA」となるよう設定する*3。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて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全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*4、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*3 Target の設定

Target 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といよい。

*4 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。

2.1.1.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

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、Ver.1.5.1 以前のソフトウェアの場合、反応条件の設定において RUN Mode を 9600 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。Ver.2.0以降のソフトウェアの場合は ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお下降部分は 100%のまま使用。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.4.4. 検量線の作成 (Applied Biosystems® 7500)

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり*。

* 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。

2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR

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

PCR 用反応液は 20 μ 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*¹ 2 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ M) 0.4 μ L、対象プローブ (10 μ M) 0.4 μ L、水 9.8 μ L、MgCl₂ 溶液 (25 mM) 2.4 μ L、10 ng/ μ L DNA 試料液 5 μ L (50 ng)、又は検量線用標準プラスミド DNA 溶液 5 μ L*²、若しくは 5 ng/ μ L ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液 : NTC) 5 μ 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、1 DNA 試料液に対し 2 キャピラリー併行で行うものとし、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*³。

実際の調製は、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 MgCl₂ 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*⁴を先に調製しておき、これと LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl₂ 溶液、水の混合液を 8 : 7 の比率で混合させるとよい。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 μ 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*⁵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 μ L、DNA 試料液に対し 36 μ L とする。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 6 μ L (検量線用標準プラスミド溶液及び NTC) 若しくは 12 μ 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

で調製した混合溶液を 20 μL /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*6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

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) に内包されている LC-FastStart Enzyme (1a red cap) と LC-FastStart Reaction Mix HybProbe (1b colorless cap) とを混合し、調製する。調製した LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes は、4°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 μL 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。

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、1 DNA 試料液当たり 2 キャピラリー併行で行う。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 μM 、対象プローブ濃度が 0.5 μM 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、専用のカローセル遠心機を使用し行うか、又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ローセルに装填する。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。

2.1.1.5.2. 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（カローセル上の配置）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°C と設定し、Maximum Position にはカロ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。対応するコピー数は、40、250、3,000、40,000、500,000 である。

*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。

2.1.1.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカローセルをセットし、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°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°C 15 秒、59°C 30 秒 (1°C /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°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°C /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°C 30 秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

2.1.1.5.4. 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。

2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR

2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio5)

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*。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。

* 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)

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、測定 of 初期設定、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Plate 画面で測定する DNA

試料液の **Samples** を作成し名称を入力する。設定した **Target** を登録した後、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全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を **Task** 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する **Sample** のチェックボックスを入力する。

*1 Target の設定

Target 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といよい。

*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。

2.1.1.6.3. PCR (QuantStudio 5)

装置にプレートセットし、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。RUNが終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.6.4. 検量線の作成 (QuantStudio5)

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり*。

* 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。

2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR

2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio12K Flex)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*。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。

* 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio12K Flex)

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、測定 of 初期設定、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて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全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1 Target の設定

Target 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ことよい。

*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。

2.1.1.7.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)

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。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.7.4. 検量線の作成 (QuantStudio 12K Flex)

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり*。

* 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。

2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR

2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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、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、プレート遠心機で 1500×g、2 分間スピンドアウンする。

*96 ウェルプレート及びシール

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche Diagnostics 社) 及び LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics 社) を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.1.1.8.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し {Gene} に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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、「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) を Type 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、Name に名称を入力しておく。また Standard では Concentration の欄にコピー数を入力する。

2.1.1.8.3. PCR (LightCycler® 96)

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートに切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Formatで[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で以下の反応条件を設定する。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とする。[Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.1.1.8.4. 検量線の作成 (LightCycler® 96)

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。

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル (Cq) 値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルのCq 値を算出する*1。

次に、各々の検量線用標準プラスミドDNA 溶液のコピー数の常用対数値 (x 軸) に対するCq 値 (y 軸) をプロットした線形回帰直線を検量線とする*2。

*1 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット (色素) に依存する。

*2 実際は[Analysis]で Add Analysis から Abs Quant を選択した時点で検量線は自動作成される。Negative control から増幅がないこと、検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.99 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)

PCR 用反応液は 25µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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、シーリング用アプリケーションを用いて行う*。最後に、プレート遠心機で 1500g、2 分間スピンドアウンする。

* 96 ウェルプレート及びシール

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche Diagnostics 社) 及び LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics 社) を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.1.1.9.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類 (「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液、「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) を選択する。また、Standard では Concentration の欄にコピー数を入力する。

2.1.1.9.3. PCR (LightCycler® 480)

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出し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。RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.1.1.9.4. 検量線の作成 (LightCycler® 480)

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。2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cp (Cross point) 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 Cp 値 (y 軸) をプロットし線形又は非線形 (多項式) 回帰線として自動的に表示し、検量線とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cp 値が表示される。Negative Control が増幅していない (Cp 値を算出していない) ことを確認の後、検量線においては「Error.」の値を確認し、0.2 未満であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.2. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算

未知 DNA 試料液につき検量線作成で用いた Th を使用して Cq 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、対象遺伝子組換え食品含有率を求める。

対象遺伝子組換え食品含有率 (%) =

$$\left[\frac{\text{組換え遺伝子のコピー数}}{\text{内在性遺伝子のコピー数} \times \text{内標比}} \right] \times 100$$

* Roche LightCycler System を用いた場合には、1 DNA 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、2.1.2.5.4.項で得られた 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。

2.1.3. 結果の判定

1 検体の粉砕試料 (500g) につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る (3DNA 試料/1 検体)。各 DNA 試料について、定量 PCR 法により得られた RRS の含有率に LLS の含有率と RRS2 の含有率を加えた平均値が 5%を超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。

2.1.4. ELISA 法 (参考検査法)

参考検査法として、試料中の CP4EPSPS タンパク質を検知する ELISA 法を用いることができる。CP4EPSPS タンパク質は Roundup Ready 組換え体において発現しており、同法では検体中の Roundup Ready 組換え体の混入率の定量が可能である (注意: 本法では RRS2 及び LLS の混入率は定量できないため、分別生産流通管理の判定はできない。なお、RRS2 が交差反応性を示すことは確認されている。)

1) Romer Labs Inc.社製 AgraQuant® RUR ELISA Soya Grain GMO Chek™ による方法

100mesh (編み目の一目の長さ 150 μm) のふるいを通した粉末試料 0.5g を用いて、Romer Labs Inc.社製 AgraQuant® RUR ELISA Soya Grain GMO Chek™ 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。

試料又は標準試料*0.5 g をポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 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×g で 15 分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液 280 μL に抽出液 20 μL を加え攪拌し希釈液とする。さらに、Soya Assay 緩衝液 380μL

に希釈液 20 μ 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 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温する。その後、希釈済洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈済 RUR 大豆複合体液 100 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温する。さらに、希釈済洗浄バッファーで 3 回洗浄する。次に、発色液 100 μ L を加え、室温で 10 分間放置した後、反応停止液 100 μ 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。

2) EnviroLogix Inc.社製 QualiPlate™ Kit for Roundup Ready® による方法

40mesh (編み目の一目の長さ 425 μ m) のふるいを通した粉末試料 20~50 g を用いて、EnviroLogix Inc.社製 QualiPlate™ Kit for Roundup Ready®の説明書 (Rev.11-03-15)末尾 Testing Roundup Ready Soy Bulk Grain or Flour 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。

所定の濃度に調製した標準試料*1.0g をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に正確に量り採り、蒸留水 (あるいは脱イオン水) 50mL を加え、ボルテックスミキサーを用い 30 秒間混合した後、1 時間静置する。振とうした後、5,500 \times g で 5 分間遠心し、上清を標準ストック液とする。0.25mL ずつマイクロチューブに分注し、霜取り機能なしの冷凍庫で -20 $^{\circ}$ C 保管することで 6 か月間安定的である。

試料 20~50g を容器に正確に量り採り、蒸留水 (あるいは脱イオン水) 1g 当たり 5mL を加え (試料 20g の場合 100mL) 、ボルテックスミキサーを用い 20~30 秒間混合した後、1 時間静置する。振とうした後、5,500 \times g で 5 分間遠心し、浮遊の油脂層を除いた水層上清を抽出液とする。抽出液 20 μ L と洗浄バッファー液 980 μ L を混合攪拌し 50 倍希釈し、試料液とする。抽出・希釈は試験当日に行う。

各標準ストック液を解凍して 100 μ L を分取し、洗浄バッファー液 400 μ L を加え、5 倍希釈し、参照標準液とする。解凍した標準液は 48 時間以内に使用する。使用する全ウェルに Enzyme Conjugate 液を 50 μ L ずつ加える。次いで、適宜のウェルに試料液、参照標準液、及びブランクとして洗浄バッファー液を 50 μ L 加え、20~30 秒間プレートを回転させ内容液を混合する。プレートにパラフィルムをかぶせ、室温 (18~27 $^{\circ}$ C) で 45 分間保温する (可能なら 200rpm で回転振とうさせておく。)。その後、洗浄バッファー緩衝液 1 ウェル当たり 300 μ L で 4 回洗浄する。次に、Substrate 100 μ L を加え、20~30 秒間プレートを回転させ内容液を混合する。プレートに新しいパラフィルムをかぶせ、室温で 15 分間保温する。(可能なら回転振とう) Stop Solution 100 μ 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 (副波長 600~650 nm) 、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。

*標準試料は、別売されている標準大豆を使用してもよい。European Commission Joint Research Centre の提供するカタログ番号 ERM-BF410ap~ERM-BF410ep を購入して使用してもよい。また、RR2 を基準として測定する場合には、The American Oil Chemists' Society (AOCS)の提供するカタログ番号 AOCS 0906-A~AOCS 0906-B を購入して使用してもよい。

2.2. トウモロコシ穀粒の検査法

トウモロコシでは、異なった発現タンパク質を持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、リアルタイム PCR 法が有効な分析手法となる。また、今般、トウモロコシ穀粒の一粒中に複数系統の組換え DNA 配列が存在するスタック品種が多種開発されていることから、トウモロコシ穀粒を一粒単位、又はグループ単位で検査する必要がある。

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 2.2.1.項の定量 PCR 又は 2.2.2.項のマルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いたスクリーニング検査を実施する。スタック品種が混入した場合、スクリーニング検査では実際よりも混入率が高く見積もられてしまうため、分別生産流通管理を行っている非遺伝子組換えトウモロコシにおいて混入率が 5%を超える可能性がある場合は、2.2.3.項の粒単位検査法又は 2.2.4 項のグループ検査法を実施する。

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

2.2.1. 定量 PCR 法

検体の粉碎試料 (500g) につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る (3DNA 試料/1 検体)。上述のように、トウモロコシでは分析対象系統数が多数存在する。このため、多くの系統が共通して持つ *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (P35S) とそれを持たない系統に特異的な反応を用いてスクリーニングを実施し、結果の判定を行う。なお、ゲノム内に P35S が複数導入されている系統については、混入率が過大に算出される。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ダイズの場合 (2.1.2.項参照) と同様に算出し、2.1.2.項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。

2.2.1.1. *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、NK603、MON863、TC1507、MON810、DAS-59122-7、MON88017 及び MON89034 には、共通して *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (P35S) 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、プローブを除きサイズの定量 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-Ta^q*¹を使用する。また、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Ta^q*²であり、別紙 1 に規定された内標比を用いて、最終的に P35S 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。

*1 SSIIb 遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIb-3 [SSIIb 3-5' (5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3') &
SSIIb 3-3' (5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3')] 及び
SSIIb-Ta^q (5'-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3')

*2 P35S を標的とするプライマー対とプローブ

P35S-1 [P35S 1-5' (5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3') &
P35S 1-3' (5'- CCTCTCCAAA TGAAATGAACTTCCT-3')] 及び
P35S-Ta^q (5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3')

P35S 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。同系統は組換え遺伝子中に P35S 配列が 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-Ta^q は、他のプローブの半分の濃度（終濃度：0.1µM）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）。

2.2.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量

組換え系統 GA21、MIR604、MIR162 は、P35S 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、P35S 配列を分析するものと同じの DNA 試料液について、別に GA21 に特異的な反応、MIR604 に特異的な反応、MIR162 に特異的な反応を用い、2.2.1.1.項と同様の方法で各系統の含有率を求める。GA21 の分析にはプライマー対 GA21-3 とプローブ GA21-Ta^q*を、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを用いる。MIR604 の分析には、プライマー対 MIR604-1 とプローブ MIR604-Ta^q*を、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシ (MIR604) プラスミドセット

を用いる。MIR162 の分析には、プライマー対 MIR162-1 とプローブ MIR162-Taq* を、検量線標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシ (MIR162) プラスミドセットを用いる。なお、MIR604 の分析を行う際には、MIR604 特異的反応及び SSIb 特異的反応の両方でリアルタイム PCR の反応温度条件を以下のとおりとする。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、45 サイクルの増幅反応を行う。

* 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

GA21 検知 : GA21-3 [GA21-3-5' (5'-GAAGCCTCGGCAACGTCA-3') & GA21-3-3' (5'-ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3')] 及び
GA21-Taq (5'-FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA-3')
MIR604 検知 : MIR604-1 [MIR604 primer F (5'-GCGCACGCAATTCAACAG-3') & MIR604 primer R (5'-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3')] 及び
MIR604 probe (5'-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA-3')
MIR162 検知 : MIR162-1 [MIR162-f1 (5'-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG-3') & MIR162-r1 (5'-TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA-3')] 及び
MIR162-p1 (5'-FAM-TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCCA-TAMRA-3')

2.2.1.3. 結果の判定

各 DNA 試料 (3DNA 試料/1 検体) について定量 PCR を行った結果、P35S 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、MIR604、MIR162 の含有率を加えた値の平均値が 4.5% を超えた場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

2.2.2. マルチプレックス PCR 法

2.2.1 項の定量 PCR 法の代わりに、より簡便なマルチプレックス PCR 法にて混入率が 5% を超える可能性があるかを判定するスクリーニングが可能である。本法は、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、starch synthase IIb (SSIb) 遺伝子、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として、*Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (P35S) 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator (TNOS) を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法にて行う。本法は、複数セットのプライマー対とプローブを PCR 液に添加することで、複数の標的遺伝子を同時に検出することができ、通常のシングルプレックスリアルタイム PCR 法に比べて一度に多検体を処理できる。なお、本スクリーニング検査では SSIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されている

ため、これらの遺伝子量の合計（P35S+TNOS）に相当する蛍光値が得られる。混入率が5%を超える可能性があるかどうかの判定は、標準試料を用いた ΔCq 法にて行う。 ΔCq 法は、内在性遺伝子における Cq 値*1と標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差 [$\Delta Cq = Cq(\text{標的遺伝子}) - Cq(\text{内在性遺伝子})$] を用いて行う。 ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があり、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。得られた分析試料の ΔCq 値が、判定基準となる標準試料の ΔCq 値以上である場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は5%を超える可能性があるかと判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810 粉末試料*2から抽出したDNA溶液（20ng/ μ L）を用い、分析試料と同時に測定する。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本検査方法では表記を Cq 値に統一する。

*2 4%(w/w) MON810 粉末試料

Maize GMO Standard ERM-BF413gk (10% MON810) (IRMM/ERM、Sigma-Aldrich 社から購入可能) 0.4 g と Maize GMO Standard ERM-BF413ak (Blank MON810) (IRMM/ERM、Sigma-Aldrich 社から購入可能) 0.6 g を混合し、分析試料と同様の方法でDNA抽出精製を行う。

2.2.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング

2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

PCR 用反応液は 10 μ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) *1、対象プライマーとして SSIIB 3-5' (50 μ M) *2、SSIIB 3-3' (50 μ M) *2、P35S 1-5' (50 μ M) *3、P35S 1-3' (50 μ M) *3、NOS ter 3-5' (50 μ M) *4、NOS ter 2-3' (50 μ M) *4、対象プローブとして SSIIB-TaqV (10 μ M) *5、P35S-Taq (10 μ M) *6、NOS-Taq (10 μ M) *7、水、20 ng/ μ L DNA 試料液又は水（ブランク試料液：NTC）を下記の表のとおりに混合する。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*8。

混合溶液用	必要量 1 ウェル当たり (μ L)	1DNA 試料 当たり (μ L)
FastStart Universal PM (ROX)	5	17
50 μ M SSIIB 3-5'	0.016	0.05
50 μ M SSIIB 3-3'	0.016	0.05

10 μ M SSI II b-TaqV	0.08	0.27
50 μ M P35S 1-5'	0.05	0.17
50 μ M P35S 1-3'	0.05	0.17
10 μ M P35S-Taq	0.1	0.34
50 μ M NOS ter 3-5'	0.06	0.20
50 μ M NOS ter 2-3'	0.06	0.20
10 μ M NOS-Taq	0.12	0.41
水	3.448	11.74
20 ng/ μ L DNA 試料液	1	3.4
合計	10.0	34.0

実際の調製は、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 FastStart Universal Probe Master (Rox) に対象プライマー、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。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 34 μ L が適当である（上記表参照）。混合時にはピペッティングで十分に攪拌し、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^{*9}の微量遠沈管に 30.6 μ 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 3.4 μ L 加え、ピペッティングで十分に攪拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 10 μ 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^{*10}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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）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^{*11}。

*1 FastStart Universal Probe Master (Rox)

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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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 SSI**II**b 3-5'及び SSI**II**b 3-3'

配列は以下のとおりである。

SSI**II**b 3-5' : 5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'

SSI**II**b 3-3' : 5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'

代わりに対象プライマー対として SSIb-3 (25 μM) 0.032 μL を用いてもよい。

***3 P35S 1-5' 及び P35S 1-3'**

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5' : 5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

P35S 1-3' : 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対として P35S-1 (25 μM) 0.1 μL を用いてもよい。

***4 NOS ter 3-5' 及び NOS ter 2-3'**

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5' : 5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'

NOS ter 2-3' : 5'-CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT-3'

***5 SSIb-TaqV**

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

***6 P35S-Taq**

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3'

***7 NOS-Taq**

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'

***8 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。

***9 分注必要数**

標準試料液 (1 点) 及びブランク試料液 (1 点) の計 2 点に DNA 試料液の数を加えた数。

***10 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

***11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad**

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.2.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

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（「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：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 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またプローブ特性に関しては、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Reference を「ROX」と設定する。

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

2.2.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

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 分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 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。

2.2.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 (ΔR_n) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、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 ΔR_n 部を選択し、Threshold line (Th) を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を C_q 値とする。各々の DNA 試料液における SSIIb 及び P35S+TNOS の平均 C_q 値 (3 ウェル分) を算出し、SSIIb における平均 C_q 値と P35S における平均 C_q 値の差 [$\Delta C_q = C_q(\text{P35S+TNOS}) - C_q(\text{SSIIb})$] を算出する。

* 通常、Th 値は 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

2.2.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

PCR 用反応液の調製は、2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*^{1,2}。

*1 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

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche Diagnostics 社) 及び LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics 社) を使用する。な

お、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.2.2.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

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

(「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: 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 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また、プローブ特性に関しては、VIC には SSIIb、FAM には P35S+TNOS を割り当てる*。

* あらかじめ Detection Format にて VIC と FAM を選択しておく。

2.2.2.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

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 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

2.2.2.2.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

解析は PCR 装置付属のソフトウェアで行う*。各々の DNA 試料液における SSIIb 及び P35S+TNOS の平均 Cq 値 (3 ウェル分) を算出し、SSIIb における平均 Cq 値と P35S における平均 Cq 値の差 [$\Delta Cq = Cq(P35S+TNOS) - Cq(SSIIb)$] を算出する。

* LightCycler® 96 においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。

2.2.2.3. 結果の判定 (図 1 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム)

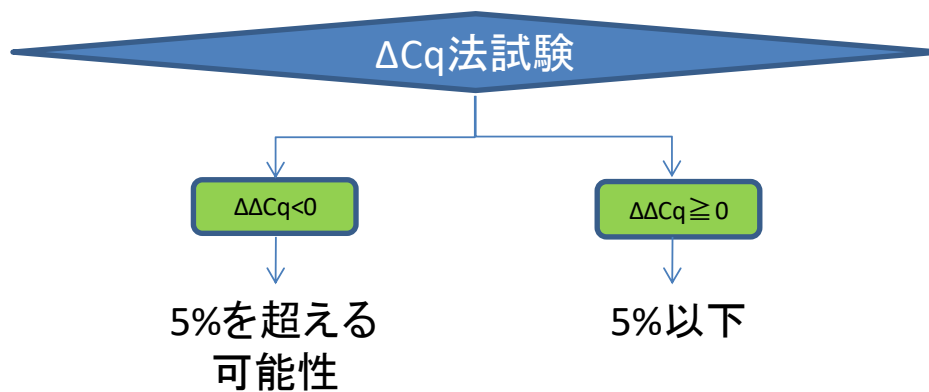
混入率が 5% を超える可能性があるかどうかの判定は、分析試料と標準試料の ΔCq 値を比較して行う。すなわち、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値以上である場合 [$\Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{標準試料}) \geq 0$]、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5% 以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合 [$\Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{標準試料}) < 0$]、分析試料における遺伝子組

換えトウモロコシの混入率は5%以上である可能性があるとは判定する。混入率が5%以上である可能性があるとは判定された場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

図1 マルチプレックスPCR法 試験結果の判定スキーム

$$\Delta Cq = Cq^*(P35S+TNOS) - Cq^*(SSIIb)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{4\%標準試料})$$



*Cq値は3ウェルの平均値を用いる

2.2.3. 粒単位検査法

トウモロコシ穀粒試料から 92 粒をランダムサンプリングし、以下の手順に従って遺伝子組換え穀粒を検知する。試験有効粒数 90 粒におけるその粒数を定量し、遺伝子組換え穀粒の混入率を求める。

なお、遺伝子組換え穀粒の粒数が 92 粒（試験有効粒数 90 粒）中に 3 以上 9 以下の場合はさらに 2 回目の 92 粒の粒単位検査法を行い、1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）における遺伝子組換え穀粒の粒数を定量し、混入率を求める。

本法の適用機種は LightCycler® 96 である*。

- * その他のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7900、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられるが、使用する機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.2.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは 2.2.2.2 項と同様である。

各粒由来 DNA 試料液につき 1 ウェル（92 試料、92 ウェル）、また PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものを 2 ウェル分、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液として 2 ウェル分、の合計 96 ウェルで分析を行う。

2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液組成及び調製方法は 2.2.2.1.1 項及び 2.2.2.2.1 項と同様である。ただし、PCR 用マスターミックスとして、2×DirectAce qPCR Mix No ROX（ニッポンジーン社）*を 1 反応液（全量 10µL）当たり 5µL 用いる。

* DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube

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。使う直前に転倒混和及びタッピングによって混合した後、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。ABI PRISM® 7900、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000 などの ROX が必要なリアルタイム PCR 機器を使用する場合は、本試薬に添付されている ROX を添付のマニュアルに従い適量を添加する。

2.2.3.1.2. プレート情報の設定

2.2.2.2.2.項と同様に行う。

2.2.3.1.3. PCR

2.2.2.2.3.項と同様に行う。

2.2.3.1.4. PCR 結果の解析

解析は PCR 装置付属のソフトウェアで行い、LightCycler® 96 においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。SSIIb 検知試験及び P35S+TNOS 検知試験の両方において 38 未満の Cq 値が得られた DNA 試料液は、遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。一方、SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られ、P35S+TNOS 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られなかった DNA 試料液は、非遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。また、SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られなかった場合は、当該 DNA 試料液に対してマルチプレックスリアルタイム PCR を用いた粒単位の定性検知法以降の操作を再度行い、それでも同様の結果の場合には、その DNA 試料液での結果を無効とする。SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られた DNA 試料液における試験は有効と判断され、92 粒の DNA 試料液中で 90 粒以上の DNA 試料液で有効とされた場合は、本試験は成立する。その後、有効とされた DNA 試料液の結果から遺伝子組換え穀粒と非遺伝子組換え穀粒の数を測定する。89 粒以下の DNA 試料液で有効とされた場合は、本試験は不成立として、改めて 92 粒のランダムサンプリングを行い、2.5.4.項のトウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製から試験を再度実施する。

2.2.3.2. 結果の判定

2.2.3.1.4. PCR 結果の解析で得られた結果において、92 粒（試験有効粒数 90 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 2 以下であれば、適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。

遺伝子組換え穀粒の粒数が 3 以上 9 以下で、2 回目を行った場合は、1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 9 以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたものとして取り扱うこととする。

1 回目の結果における遺伝子組換え穀粒の粒数が 10 以上の試料、又は 1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 10 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

2.2.4. グループ検査法

トウモロコシ穀粒試料からランダムサンプリングを行い、穀粒 20 粒からなるグループを 10 グループ用意する。2.5.5 に記載の方法で各グループから DNA 試料液を調製

し、各グループに遺伝子組換え穀粒が含まれているか否かをリアルタイム PCR で判定する。遺伝子組換え穀粒を含むグループの数から、遺伝子組換え穀粒の混入率を評価する。10 グループ中遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 以上の場合は、さらに 2 回目の 10 グループの分析を行い、1 回目と 2 回目の総和である 20 グループ中で遺伝子組換え穀粒を含むグループの数を決定し、混入率を評価する。本法の適用機種は ABI PRISM® 7900、Applied Biosystems® 7500 である。

2.2.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter (P35S) 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator (TNOS) を標的とするマルチプレックスリアルタイム PCR を用いて遺伝子組換え穀粒を検出する。これを遺伝子組換え検出反応とする。また、各 DNA 試料から PCR を行うことができることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子スターチシンターゼ IIb (SSIIB) 遺伝子の検出と人為的に添加した微量のプラスミドの検出 (Internal Positive Control, IPC) を、マルチプレックスリアルタイム PCR で行う。これを対照反応とする。遺伝子組換え検出反応、対照反応ともに、各 DNA 試料液につき 1 ウェル、また陽性コントロールとして GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えるものを 1 ウェル、陰性コントロールとして水を加えるものを 1 ウェル、合計 12 ウェルで分析を行う。

2.2.4.1.1. 反応液の調製

ABI PRISM® 7900 を使用する場合は、以下のとおり、反応液を調製する。

遺伝子組換え検出反応： 1 ウェル当たり 2×DirectAce qPCR Mix No ROX^{*1} 12.5 µL、対象プライマー対として P35S-1^{*2} (25 µM) 0.5 µL、NOS ter-2^{*2} (25 µM) 0.5 µL、対象プローブとして P35S-TaqFB^{*3} (10 µM) 0.25 µL、NOS-TaqFB^{*3} (10 µM) 0.25 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を一度に調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする^{*4}。

対照反応： 1 ウェル当たり DirectAce qPCR Mix No ROX^{*1} 12.5 µL、対象プライマー対として IPC-1^{*2} (25 µM) 0.5 µL、SSIIB-3^{*2} (25 µM) 0.5 µL、対象プローブとして IPC-TaqFB^{*3} (10 µM) 0.25 µL、SSIIB-TaqHB^{*3} (10 µM) 0.25 µL、IPC 用プラスミド溶液^{*5} 1 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする^{*4}。

Applied Biosystems® 7500 を使用する場合は、50×ROX Passive Reference 溶液の添加量を 0.05 µL にする。分注操作終了後、真上からシールし*6、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく*7。

*1 DirectAce qPCR Mix No ROX の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。使う直前には転倒混和及びタッピングによって混合した後、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。

*2 対象プライマー対の配列は、以下のとおりとする。

対象プライマー対	プライマー名	塩基配列 5'—3'
P35S-1	P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT
	P35S 1-3'	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT
NOS ter-2	NOS ter 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG
	NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT
IPC-1	IPC 1-5'	CCGAGCTTACAAGGCAGGTT
	IPC 1-3'	TGGCTCGTACACCAGCATACTAG
SSIIb-3	SSIIb 3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC
	SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA

*3 対象プローブの塩基配列は以下のとおりとする。P35S-TaqFB、TNOS-TaqFB、IPC-TaqFB は、5'側を FAM、3'側を Black hole quencher1 で標識することとする。SSIIb-TaqHB は、5'側を HEX、3'側を Black hole quencher1 で標識することとする。

対象プローブ	塩基配列 5'—3'
P35S-TaqFB	CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT
NOS-TaqFB	AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA
IPC-TaqFB	TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC
SSIIb-TaqHB	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA

*4 DNA 試料液を添加する際は、ピペッティングによる混合を入念に行う。

*5 IPC 用プラスミド溶液は、ニッポンジーン社から購入可能である (Cat No. 315-08241)。

*6 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

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

2.2.4.1.2. 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う。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900 を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」*、Quencher が「Non Fluorescent」のもの 2 つを設定する。設定した Detector を Set up タブ (ABI PRISM® 7900) 又は Well Inspector (Applied Biosystems® 7500) に登録した後、測定を行うウェル全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Passive Reference は「ROX」と設定する。

Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの 2 つを設定する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて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全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Select the dye to use as the Passive Reference は「ROX」と設定する。

次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「Unknown」を指定する。なお、Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、Task 欄に「U」を指定する。

* HEX 検出を行うためには、あらかじめ市販の HEX-キャリブレーションプローブを用いて使用するリアルタイム PCR 装置に HEX dye 登録を行う。登録操作

は、リアルタイム PCR 装置の取り扱い説明書に従う。HEX キャリブレーションプローブは、ニッポンジーン社から購入可能である (Cat No. 318-06771)

2.2.4.1.3. PCR

装置にプレートを設定し、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°Cで10分間加温した後、95°C 15秒間、65°C 1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。

ABI PRISM® 7900を使用する場合は、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。

Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが1.5.1以前の場合は、RUN Modeを9600 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。

Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが2.0以降の場合は、ramp rateの変更が必要で温度が上昇していく部分のramp rateを100%から64%に変更する。なお、下降部分は100%のまま使用し、RUNが終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.4.1.4. PCR 結果の解析

Threshold lineの設定は、P35S、TNOS、IPCについては0.256、SSIIbについては0.064とする。Baselineについては、Manual baseline modeで3-15サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視でAmplification plot上で15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線がThreshold lineと交わるCq値が40以下の場合に陽性と判定する。

まず、対照反応におけるIPC及びSSIIbの検出を判定する。鋳型DNAとしてGMトウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えた反応でIPC、SSIIbともに陽性であること、水を加えた反応でIPCが陽性、SSIIbが陰性であることを確認する。異なる結果が得られた場合には、PCRがうまく実施されていない可能性があるため、PCR以降の実験を再度行うこととする。穀粒グループ由来の各DNA試料について、IPCとSSIIbのいずれかが陰性の場合には、DNAの溶出がうまくいっていない可能性があるため、別の20粒を再度サンプリングして、DNAの溶出及びPCR分析を行う。IPCとSSIIbの両方が陽性のDNA試料について、P35S、TNOSの検出について陽性か陰性かを判定し、陽性の場合にはグループ(20粒)の中に遺伝子組換えの穀粒が含まれると判定する。

なお、マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた定性検知法では、ABI PRISM® 7900及びApplied Biosystems® 7500以外のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、LightCycler® 96、

LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられる。使用するリアルタイム PCR 機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

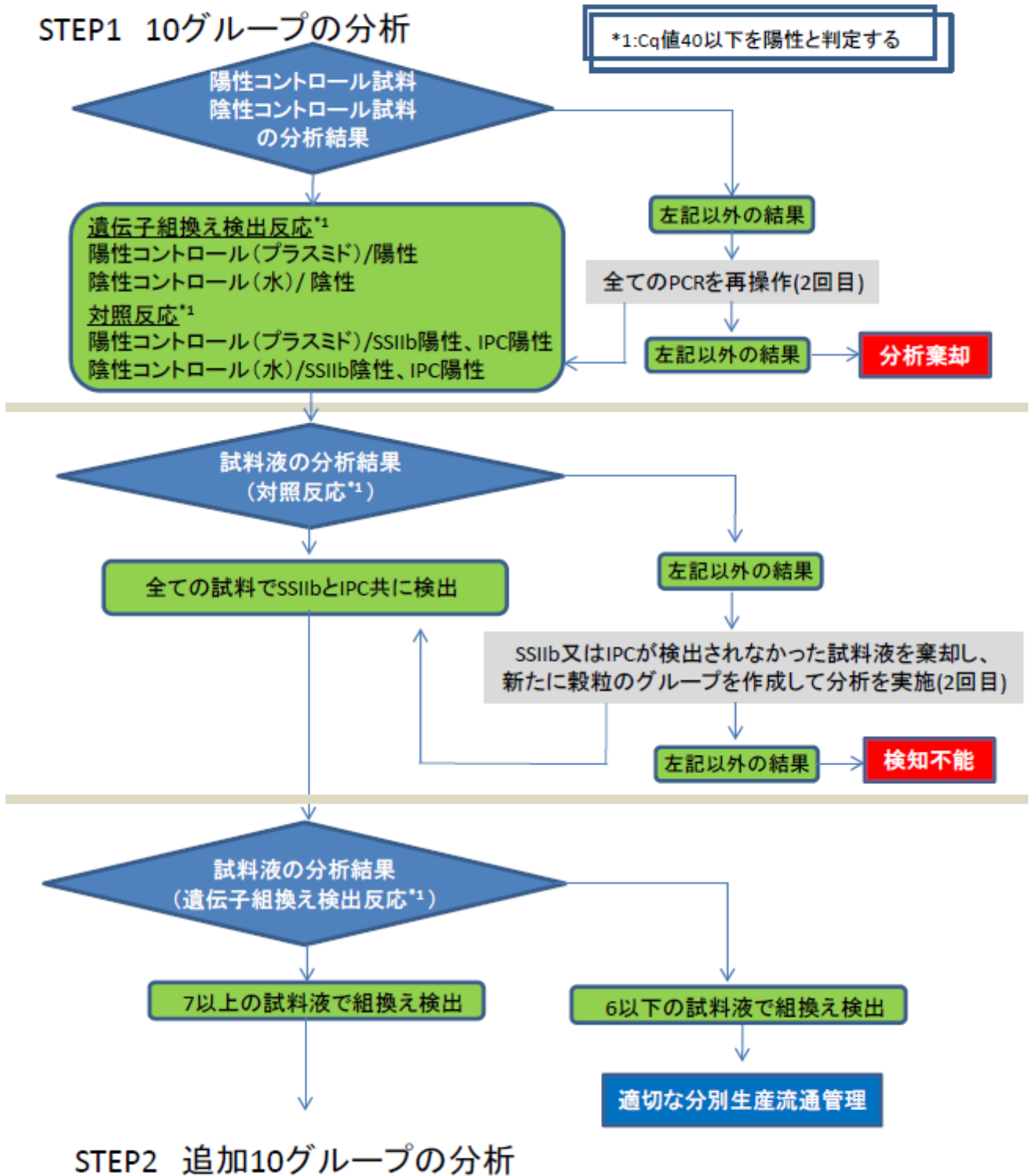
2.2.4.1.5 結果の判定 (図 2 グループ検査法試験結果の判定スキーム)

2.2.4.1.4. PCR 結果の解析で得られた結果において、10 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 6 以下であれば、適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。

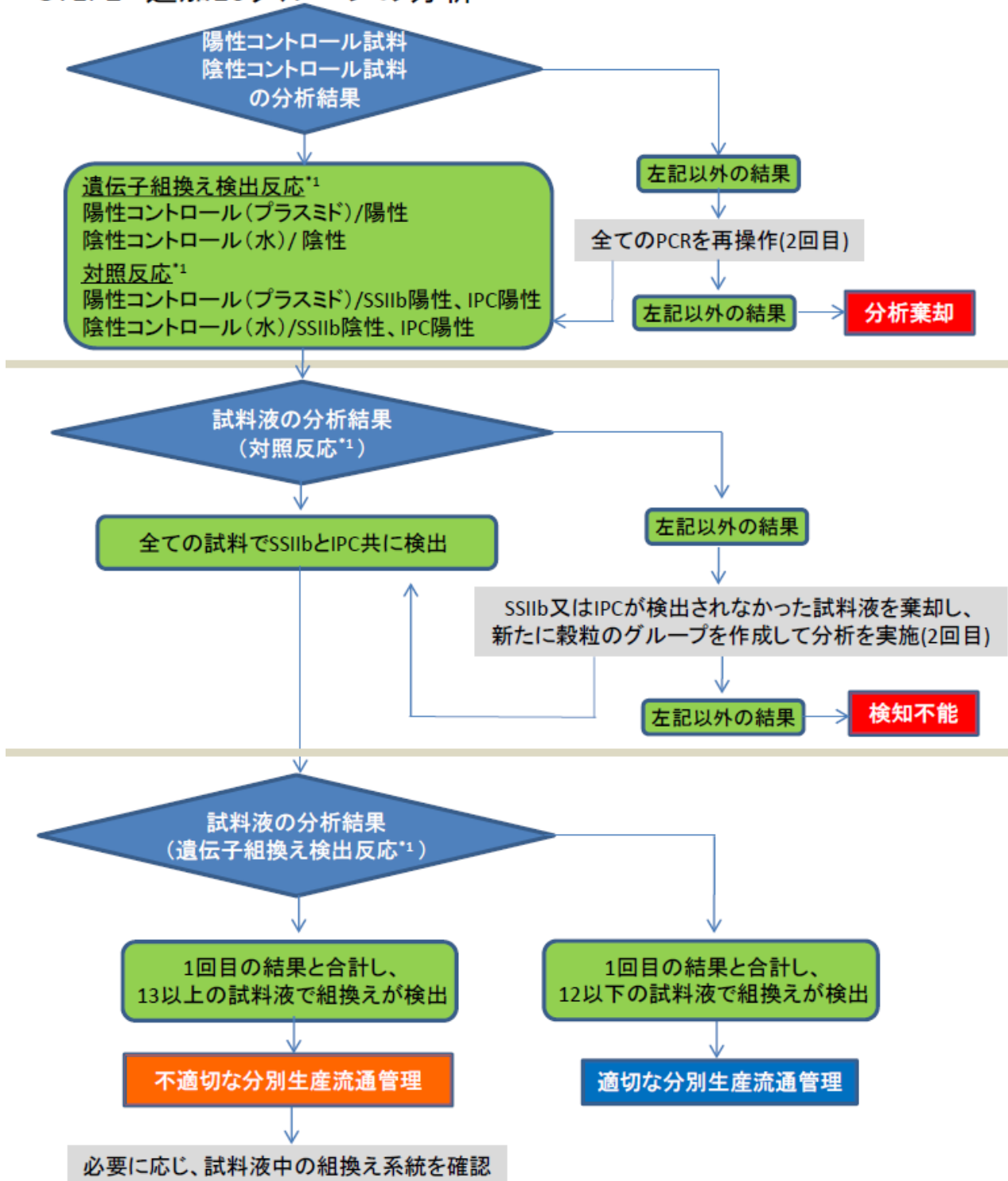
遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 グループ以上で、2 回目を行った場合は、1 回目と 2 回目の総和 20 グループにおける遺伝子組換えの検出が 12 以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたものとして取り扱うこととする。

1 回目と 2 回目の総和 20 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 13 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

図2 グループ検査法試験結果の判定スキーム



STEP2 追加10グループの分析



2.2.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）

グループ検査において遺伝子組換え穀粒を含むと判定されたグループについて、最終的に組換え系統を確定する方法を参考検査法として示す。2.5.5.項で生じる粗抽出液から2.5.6項に記載の方法でDNAを精製し、リアルタイムPCRで分析する。

2.2.4.2.1. リアルタイムPCR

反応液は1ウェル当たり10 µL/wellとし、96ウェルプレートに調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific社）*1 5 µL、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*2（各プライマー2.5 µM、プローブ1 µM）2 µL、水2 µL、20 ng/µL DNA試料液、陽性コントロールDNA試料液*3、又は5 ng/µL ColE1/TE溶液（ブランク試料液）1 µLを混合する*4。分注操作終了後、プレートに真上からシールし、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*5。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*6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。プレートをPCR増幅装置*7にセットする。

*1 TaqMan® 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。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、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 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が2.5 µM、対象プローブ濃度が1 µM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。

各プライマー対の塩基配列は以下のとおりとする。

標的	プライマー名	塩基配列 5'–3'
Bt11系統	Bt11 3-5'	AAAAGACCACAACAAGCCGC
	Bt11 3-3'	CAATGCGTTCTCCACCAAGTACT
Event176系統	E176 2-5'	TGTTCCACCAGCAGCAACCAG
	E176 2-3'	ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT
GA21系統	GA21 3-5'	GAAGCCTCGGCAACGTCA
	GA21 3-3'	ATCCGGTTGGAAAGCGACTT
MON810系統	M810 2-5'	GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA
	M810 2-3'	GGATGCACTCGTTGATGTTTG
MON863系統	M863 1-5'	TGACCCTACTTGTTCCGGATGG

	M863 1-3'	GCATTTGTAGGTGCCACCTTC
NK603系統	NK603 1-5'	GGCCAGCAAGCCTTGTAGC
	NK603 1-3'	ATCCCGACTCTCTTCTCAAGCATA
T25系統	PM1	TCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGA
	revPM1	TACGACATGATACTCCTTCCAC
TC1507系統	TC1507 1-5'	TGAGTTGATTCCAGTTACTGCCA
	TC1507 1-3'	ATGTTAGTCGCAACGAAACCG
MIR604系統	MIR604 primer F	GCGCACGCAATTCAACAG
	MIR604 primer R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT
MON88017系統	M88017 1-5'	ATCGTGTGACAACGCTAGCA
	M88017 1-3'	CATATTGACCATCATACTCATTGCT
DAS-59122-7系統	DAS59122-7-rb1f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC
	DAS59122-7-rb1r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG
MON89034系統	MON89034 primer1	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
	MON89034 primer2	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA
MIR162系統	MIR162-f1	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
	MIR162-r1	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA
トウモロコシSSIIb	SSIIb 3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC
	SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGA

各プローブの塩基配列は以下のとおりとする。MON89034 検出用を除き、5'側が FAM、3'側が TAMRA で標識されたものを使用する。MON89034 検出用については、5'側が FAM、3'側が Non Fluorescent Quencher 及び Minor Groove Binder で標識されたもの (Thermo Fisher Scientific 社製) を使用する。

標的	プローブ名	塩基配列 5'-3'
Bt11系統	Bt11-2-Taq	CGACCATGGACAACAACCCAAACATCA
Event176系統	E176-Taq	CCGACGTGACCGACTACCACATCGA
GA21系統	GA21-2-Taq	AAGGATCCGGTGCATGGCCG
MON810系統	M810-Taq	AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAA
MON863系統	MON863-Taq	CACCCCAAAGTGTACCAAGCTTTCCGA
NK603系統	NK603-Taq	ATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGCGGC
T25系統	FBP3	TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTGCG
TC1507系統	TC1507-Taq	ACTCGAGTAAGGATCCGTCGACCTGCAG
MIR604系統	MIR604 probe	AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG
MON88017系統	M88017-1-Taq	TGCCGGAGTATGACGGTGACGATATATPCA
DAS-59122-7系統	DAS59122-7-rb1s probe	TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA
MON89034系統	MON89034 probe	ATCCCGGAAATTATGTT
MIR162系統	MIR162-p1	TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCCA
トウモロコシSSIIb	SSIIb-Taq	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA

*3 陽性コントロール DNA 試料

Bt11、Event176、GA21、MON810、SSIIb については、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを使用する。それ以外の反応については、Institute for Reference Materials and Measurements 又は American Oil Chemists' Society で製造されている遺伝子組換え農産物の標準物質から DNA を調製して使用する。

*4 反応液の調製

対象プライマー対と対象プローブの混合溶液を 96 ウェルプレート各ウェルにあらかじめ添加したものを作製・保管しておき、そこに DNA 試料液、TaqMan® Universal PCR Master Mix、水の混合液を連続分注ピペットで添加する方法で調製してもよい。この場合、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液を含む 96 ウェルプレートは、FastGene 圧着シール (FastGene 社 FG-DM100HC) 又は同等のもので密封し、冷凍庫で保管する。分析の直前にこのプレートを冷凍庫から取り出し、常温に戻して、軽く遠心を行ってから反応液の調製に使用する。

*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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) を使用する。Applied Biosystems® 7500 の場合は不要である。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。

*7 本法の適用機種は ABI PRISM® 7900HT、Applied Biosystems® 7500 である。

2.2.4.2.2. 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う。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。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全てを指定する。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、検体の種類を「Unknown」と指定する。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

2.2.4.2.3. PCR

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 分間加熱し、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、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.2.4.2.4. 結果の判定

Threshold line の設定は 0.256、Baseline については、Manual baseline mode で 3-10 サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視で Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線が Threshold line と交差する場合に、陽性と判定する。各種組換え系統を検出する反応の結果から、トウモロコシ穀粒グループに含まれていた系統を特定する。内在性遺伝子 SSIIb が陰性の場合、リアルタイム PCR をやり直す。

2.3. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 回併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子レクチン遺伝子 (Le1) を検知するダイズ陽性対照試験、並びに *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (P35S) 及び Roundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下、RRS2) を検知する遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験を行う*1。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、定量 PCR による正確な判定はできない。そのため、ダイズ加工食品においては、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR*2 を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法ののっとして、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 RoundupReady Soybean (RRS、40-3-2 系統) 及び Liberty Link Soybean (LLS、A2704-12 系統) は P35S 配列を有しているが、RRS2 は P35S 配列を含まない。そのため、P35S 及び RRS2 を検知する試験にて、遺伝子組換え食品混入の有無を判定する。内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブは以下のとおりである。

Le1 検知 : Le1-n02 [Le1n 02-5' (5'-GCCCTCTACTCCACCCCA-3') & Le1n 02-3' (5'-GCCCATCTGC AAGCCTTTTT-3')] 及び

Le1-Taq (5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3')

P35S 検知 : P35S-1 [P35S 1-5' (5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3') & P35S 1-3' (5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3')] 及び

P35S-Taq (5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3')

RRS2 検知 : MON89788-F (5'-TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3')、

MON89788-R (5'-TCGAGCAGGAC CTGCAGAA-3') 及び

MON89788-P (5'-FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3')

*2 最終頁に掲載した「検査方法の同等性確認方法」ののっとして、同等性が確認された DNA 抽出キット、リアルタイム PCR 装置、マスターミックスを使用してもよい。

2.3.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR

2.3.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)

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。

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) *1 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µM) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.5 µL、水 9 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng) *2 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL*3。分注操作終了後、真上からプレートの蓋*4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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 TaqMan® 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。使う直前に転倒混合及びタッピングにより混合した後、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 DNA 試料液の濃度が 20ng/µL に満たない場合は、原液を 2.5µL 使用する。

*3 定性 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。

*4 96 ウェルプレート及びプレートの蓋

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical 8-Cap Strips (Thermo Fisher Scientific 社) を使用する。

2.3.1.2. 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 (「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「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。

2.3.1.3. 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、45 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。

2.3.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照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及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光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。まず、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 ΔRn 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 Threshold line (Th) として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.3.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR

2.3.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成は 2.3.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*1。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.3.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)

PCR 用反応液は 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) *1 10 μL 、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μM) 0.4 μL 、対象プローブ溶液 (10 μM) 0.4 μL 、水 6.7 μL 、20 ng/ μL DNA 試料液 2.5 μL (50 ng) *2、又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 μL *3。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ケーションを用いて行う*4。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 TaqMan® 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。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、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 DNA 試料液の濃度が 20ng/ μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。

*3 定性 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。

*4 384 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

MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.3.2.3. 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*。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全てを指定する。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 (「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) を Task 欄において指定する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* 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といよい。

2.3.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)

装置にプレートを設定し、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、9600 emulation 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。

2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照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及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光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。まず、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 ΔRn 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 Threshold line (Th) として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.3.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR

2.3.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成は 2.3.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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ャーを用いて行う*1。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 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ャー

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.3.3.2. 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*。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全てを指定する。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（「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）を **Task** 欄において指定する。また **Passive Reference** を「ROX」と設定する。

* **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ことよい。

2.3.3.3. 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°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、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。

2.3.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は 2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

2.3.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.3.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は 2.3.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

2.3.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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*。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全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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 (「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) を Task 欄において指定する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* 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ことよい。

2.3.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

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、RUN Mode を 9600 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。な

お、ソフトウェアバージョン 2.0 以降は、2.1.1.4.2 プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500) を参照し設定する。

2.3.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は 2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

2.3.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR

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

PCR 用反応液は 20 μ 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*1 2 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ M) 0.4 μ L、対象プローブ (10 μ M) 0.4 μ L、水 12.3 μ L、MgCl₂ 溶液 (25 mM) 2.4 μ L、20 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (50 ng) *2 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 μ L*3。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*4を行い、混合液をキャピラリーにしっかりと充填する。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 キャピラリー併行して行うものとする。

*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°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 DNA 試料液の濃度が 20ng/ μ L に満たない場合は、原液を 2.5 μ L 使用する。

*3 定性 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。

*4 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカローセル遠心機を使用し行うか、又は汎用の遠心機を使用する場合には 700×g 以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作のいかに関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカローセルに装填する。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。

2.3.5.2. 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（カローセル上の配置）に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）を Type 欄において指定する。また、Seek Temperature を 30°C と設定し、Maximum Position にはカロ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。

2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカローセルをセットし、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°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°C 15 秒、59°C 30 秒 (1°C /秒) *1 を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。増幅反応終了後、40°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°C /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°C 30 秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

2.3.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)

反応が終了していることを確認した後に、「Fit Points 法」を用いて解析を行う。

2.3.6. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム（図 3→図 4）に従って判定する。

（図 3）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

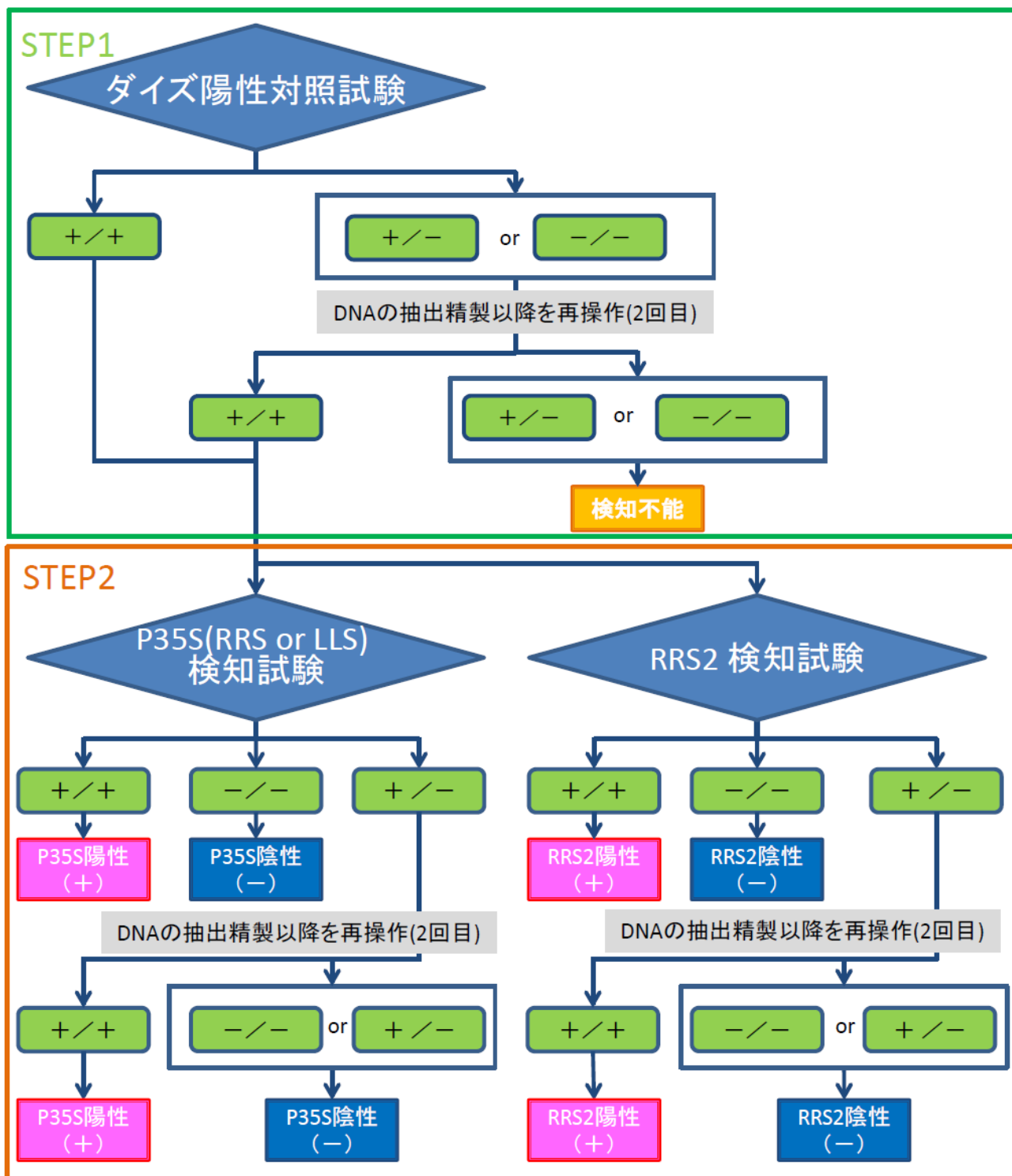
ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）について以下の(1)～(3)の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でダイズ陽性対照試験(Le1)を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) のいずれか又は両方を実施し、上記(1)と(2)以外の場合は、陰性と判定する。

(図 4) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム

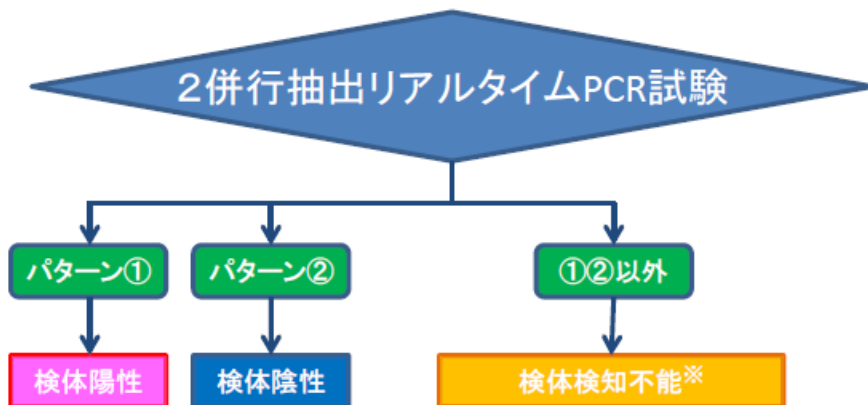
- (1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液 (合計 4 ウェル) において陽性と判定された場合は、当該検体を検体陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液のうち少なくとも一方において陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。
- (3) 一方の DNA 試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA 試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図3 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図4に従い行う。

図4 2併行抽出試験結果の判定スキーム(ダイズ)



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ			
	P35S		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+
	+	+	+	-
	+	+	-	+
	+	+	-	-
	+	-	+	+
	-	+	+	+
	-	-	+	+
②	+	-	+	-
	+	-	-	+
	+	-	-	-
	-	+	+	-
	-	+	-	+
	-	+	-	-
	-	-	+	-
	-	-	-	+
-	-	-	-	

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.4. トウモロコシ加工食品の検査法

トウモロコシ加工食品においては、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、トウモロコシ穀粒と同様に内在性遺伝子である starch synthase IIb (SSIIb) 遺伝子 (トウモロコシ陽性対照試験)、並びに遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列である *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (P35S) 及び

Agrobacterium tumefaciens 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator (TNOS)

(遺伝子組換えトウモロコシ検知試験*1) を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR を行う。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、正確な判定はできない。そのため、トウモロコシ加工食品においては、マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性 PCR*2 を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法にのっとり、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 本検査では SSIIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されているため、これらの遺伝子量の合計 (P35S+TNOS) に相当する蛍光値が得られる。

*2 最終頁に掲載した「検査方法の同等性確認方法」にのっとり、同等性が確認された DNA 抽出キット、リアルタイム PCR 装置、マスターミックスを使用してもよい。

2.4.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.4.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

PCR 用反応液は 10 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) *1 5 µL、対象プライマーとして SSIIb 3-5' (50 µM) 0.016 µL*2、SSIIb 3-3' (50 µM) 0.016 µL*2、P35S 1-5' (50 µM) 0.05 µL*3、P35S 1-3' (50 µM) 0.05 µL*3、NOS ter 3-5' (50 µM) 0.06 µL*4、NOS ter 2-3' (50 µM) 0.06 µL*4、対象プローブとして SSIIb-TaqV (10 µM) 0.08 µL*5、P35S-Taq (10 µM) 0.1 µL*6、NOS-Taq (10 µM) 0.12 µL*7、水 1.948 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL*8 又は蒸留水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL *9。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併行で行うものとする。調製の際に、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*10 を先に調製しておく、これと FastStart Universal Probe Master (Rox) 及び DNA 試料液を上記の組成で混合し、プレートに分注する。分注操作終了後、真上からシール*11 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。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*12 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。

***1 FastStart Universal Probe Master (Rox)**

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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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 SSIb 3-5'及び SSIb 3-3'**

配列は以下のとおりである。

SSIb 3-5' : 5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'

SSIb 3-3' : 5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'

代わりに対象プライマー対として SSIb-3 (25 μM) 0.032 μL を用いてもよい。

***3 P35S 1-5' 及び P35S 1-3'**

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5' : 5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

P35S 1-3' : 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対として P35S-1 (25 μM) 0.1 μL を用いてもよい。

***4 NOS ter 3-5'及び NOS ter 2-3'**

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5' : 5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'

NOS ter 2-3' : 5'-CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT-3'

***5 SSIb-TaqV**

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

***6 P35S-Taq**

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3'

***7 NOS-Taq**

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'

***8 DNA 試料液の濃度が 20ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5μL 使用する。**

***9 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。

***10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液**

SSIb 3-5' 0.2 μM、SSIb 3-3' 0.2 μM、P35S 1-5' 0.625 μM、P35S 1-3' 0.625

μM、NOS ter 3-5' 0.75 μM、NOS ter 2-3' 0.75 μM、SSIb-TaqV 0.2 μM、

P35S-Taq 0.25 μM、NOS-Taq 0.3 μM 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。

***11 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

***12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad**

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 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。

2.4.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

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 (「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Reference を「ROX」と設定する。

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

2.4.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

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 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 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。

2.4.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

遺伝子組換えトウモロコシ検知試験及びトウモロコシ陽性対照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及び C_q 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM 又は VIC) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、遺伝子組換えトウモロコシ (P35S+TNOS) 検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えトウモロコシ陽性を疑う。次いで、ベー

スラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 ΔR_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 Threshold line (Th) として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から C_q 値が得られるか否かを解析する。

2.4.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.4.2.1. PCR 用反応液の調製*1 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

PCR 用反応液は 10 μ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) *2 5 μ L、対象プライマーとして SSIIb 3-5' (50 μ M) 0.016 μ L*3、SSIIb 3-3' (50 μ M) 0.016 μ L*3、P35S 1-5' (50 μ M) 0.05 μ L*4、P35S 1-3' (50 μ M) 0.05 μ L*4、NOS ter 3-5' (50 μ M) 0.06 μ L*5、NOS ter 2-3' (50 μ M) 0.06 μ L*5、対象プローブとして SSIIb-TaqV (10 μ M) 0.08 μ L*6、P35S-Taq (10 μ M) 0.1 μ L*7、NOS-Taq (10 μ M) 0.12 μ L*8、水 1.948 μ L、20 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L*9 又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 μ L。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併行で行うものとする。調製の際に、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*10 を先に調製しておき、これと FastStart Universal Probe Master (Rox) 及び DNA 試料液を上記の組成で混合し、プレートに分注する。分注操作終了後、真上からシール*11 し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 定性 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。

*2 FastStart Universal Probe Master (Rox)

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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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。

*3 SSIIb 3-5' 及び SSIIb 3-3'

配列は以下のとおりである。

SSIIb 3-5' : 5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'

SSIIb 3-3' : 5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'

代わりに対象プライマー対として SSIIb-3 (25 μ M) 0.032 μ L を用いてもよい。

*4 P35S 1-5' 及び P35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5' : 5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

P35S 1-3' : 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対として P35S-1 (25 μM) 0.1 μL を用いてもよい。

*5 NOS ter 3-5'及び NOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5' : 5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'

NOS ter 2-3' : 5'-CGCTATATTTTGTTCCTATCGCGT-3'

*6 SSIIb-TaqV

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*7 P35S-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3'

*8 NOS-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'

*9 DNA 試料液の濃度が 20ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5μL 使用する。

*10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

SSIIb 3-5' 0.2 μM、SSIIb 3-3' 0.2 μM、P35S 1-5' 0.625 μM、P35S 1-3' 0.625 μM、NOS ter 3-5' 0.75 μM、NOS ter 2-3' 0.75 μM、SSIIb-TaqV 0.2 μM、P35S-Taq 0.25 μM、NOS-Taq 0.3 μM 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。

*11 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

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche Diagnostics 社) 及び LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics 社) を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.4.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

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 (「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、VIC には SSIIb、FAM には P35S+TNOS を割り当てる*。

* あらかじめ Detection Format にて VIC と FAM を選択しておく。

2.4.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

装置にプレートを設定し、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秒間、59°C 1分30秒間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

2.4.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

解析はPCR装置付属のソフトウェアで行う。LightCycler® 96においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。遺伝子組換えトウモロコシ (P35S+TNOS) 検知試験及びトウモロコシ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification curves 上での指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認をもって行う。

2.4.3. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 5→図 6) に従って判定する。

(図 5) リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

トウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について以下の(1)~(3)の判定を行う。トウモロコシ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でトウモロコシ陽性対照試験(SSIIb)を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)と(2)以外の場合は、陰性と判定する。

(図 6) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム

遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において陽性と判定された検体を検体陽性と判断し、少なくとも一方の DNA 試料液において陰性と判定された検体を検体陰性と判断する。また、一方の DNA 試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA 試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図5 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(トウモロコシ)

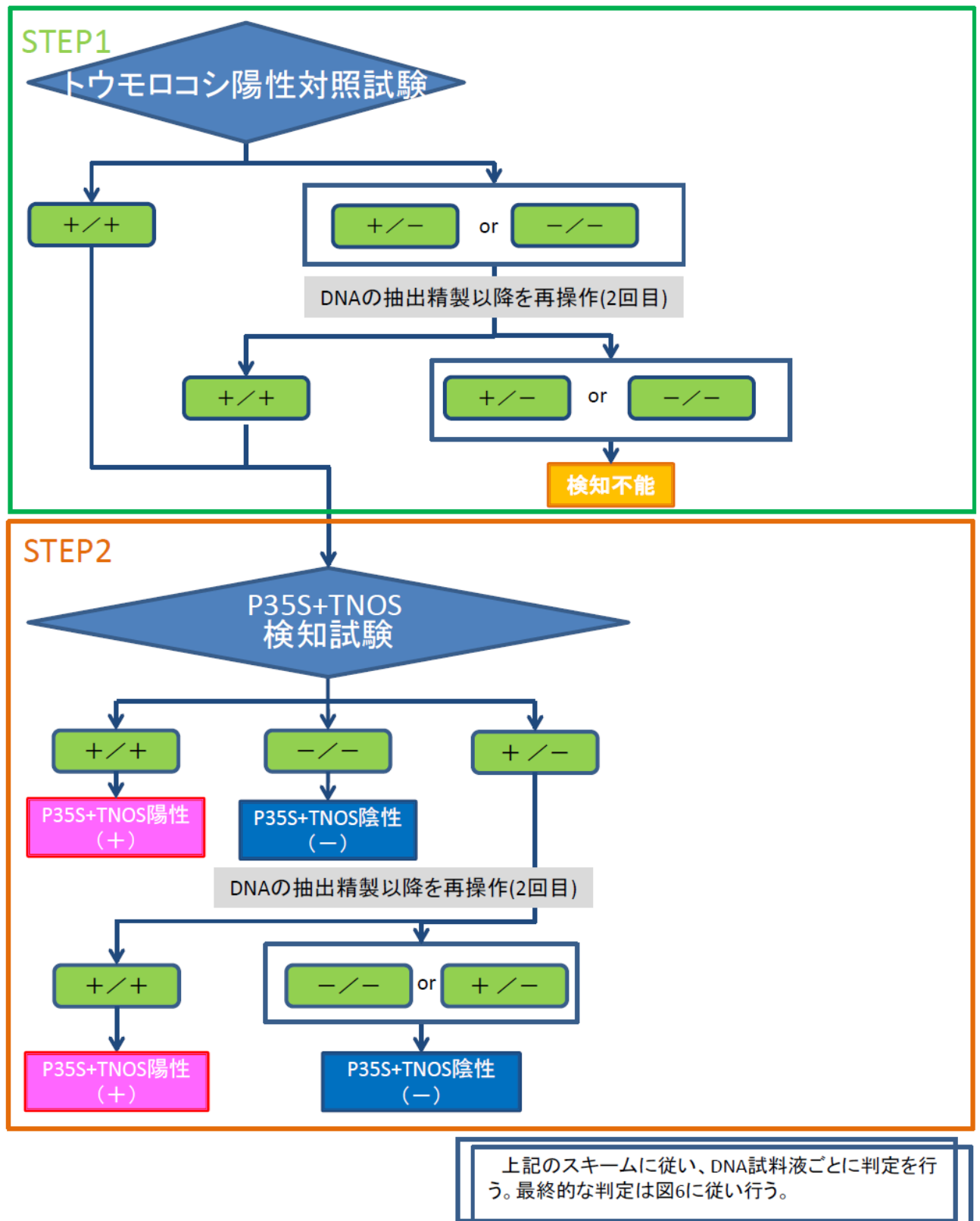
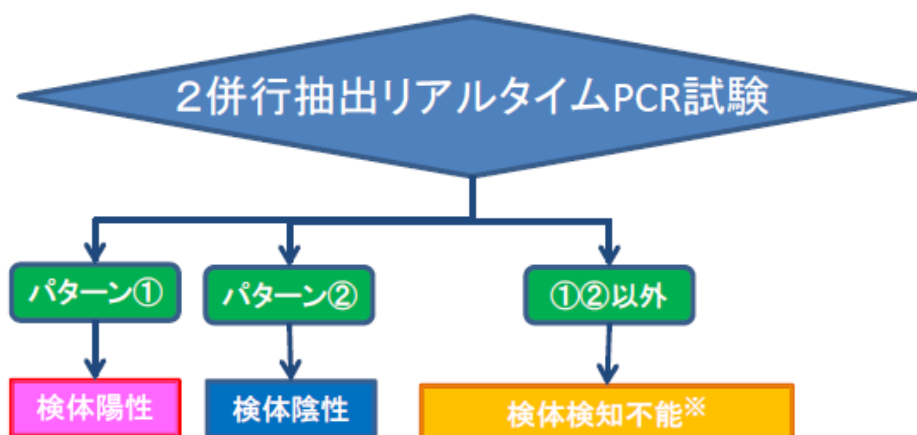


図6 2併行抽出試験結果の判定スキーム(トウモロコシ)



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ	
	P35S+TNOS	
	試料液1	試料液2
①	+	+
②	+	-
	-	+
	-	-

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.5. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」では代表的な DNA 抽出精製法を示している。現在、DNA 抽出精製キットとして様々な製品が市販されている。検査を実施する機関により扱う検体は異なり、試料中のマトリックスも大きく異なる場合がある。そのため、実施する試験や検体の種類に適した方法を用いることができる（DNA 抽出精製法の同等性確認方法は、最終頁に示したとおりである）。ただし、「2.3.6. 測定結果の判定」の際に、DNA の抽出精製以降を再操作する場合は、同じ DNA 抽出精製法を用いて、その方法で検知不能になるかを判定する。

DNA の抽出精製の際用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で $17 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 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。

2.5.1 ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法

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、トウモロコシ、ダイズ等の穀粒から 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のキット（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。

2.5.1.1. CTAB 法

均質に粉砕された試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、CTAB 緩衝液*1 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 30 mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間放置する*2。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液 600 μL をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に量り採る。次いで 500 μL のフェノール/クロロホルム混合液*3 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。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液*4 500 μL 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。等容量のイソプロパノール(室温)を加え、転倒混和後 7,500×g で 10 分間室温遠心し、デカンテーションで上清を捨てる。500 μL の 70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×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 μL の TE 緩衝液*5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 μL を加え、37°C で 30 分間放置する。200 μL の CTAB 緩衝液を加えた後、250 μL 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×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 μL のイソプロパノールを加え、転倒混和してから、7,500×g で 10 分間、室温で遠心し、デカンテーションで上清を捨てる。次いで、200 μL の 70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×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 μL 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*6 とする。

*1 CTAB 緩衝液

ビーカーに、0.5 M EDTA (pH8.0) 8 mL、1 M Tris-HCl (pH8.0) 20 mL、5 M 食塩水 56 mL を入れ、約 150 mL となるように水を加え、攪拌しながら CTAB 4 g を加えて完全に溶解する。さらに水を加え全量を 200 mL 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 15 mL の CTAB 緩衝液を加え十分に混合した後、さらに CTAB 緩衝液 30 mL 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

1 M Tris-HCl (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 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM 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 μ 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。

2.5.1.2. 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)

均質に粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 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*1 10 mL と RNase A 20 μ 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。P3 緩衝液*2 3,250 μ 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*3。次いで、その上清 500 μ 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 (15 mL 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 AW1 緩衝液*4 を加える。その混合液 500 μ L を mini spin column に負荷し、10,000 \times g 以上で 1 分間*5 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 μ 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。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW2 緩衝液*6 500 μ L を負荷し、10,000 \times g 以上で 1 分間遠心し、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 を新しい 2 mL 遠沈管に移し、あらかじめ 65 $^{\circ}$ Cに温めておいた水 70 μ 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*7 とする。

*1 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、又は別途購入したものをを用いる。

*2 P3 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、又は別途購入したものをを用いる。

*3 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。

*4 AW1 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 AW1 緩衝液とする。

*5 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。全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。

*6 AW2 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 AW2 緩衝液とする。

*7 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 70 μ 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 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。」

2.5.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 10 mL と RNase A 20 μ 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°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 \times g、室温の条件で 10 分間遠心後、その上清 7 mL を、ポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に移す。P3 緩衝液*2 2,500 μ L 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 \times g 以上、室温の条件で 35 分間遠心する*3。得られた上清のうち 8 mL を新しい 15 mL 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、500 μ 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（15 mL 容）に移す。その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液*4 を加える。混合液 500 μ L を mini spin column に負荷し、10,000 \times g 以上で 1 分間*5 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 μ 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。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW2 緩衝液*6 500 μ L を負荷し、10,000 \times g 以上で 1 分間遠心し、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 を新しい 2 mL 遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 70 μ 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*7 とする。

*1 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、又は別途購入したものを用いる。

*2 P3 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、又は別途購入したものをを用いる。

***3 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。

***4 AW1 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 AW1 緩衝液とする。

***5 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。全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。

***6 AW2 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 AW2 緩衝液とする。

***7 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 70 μ 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 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。」

2.5.1.4. 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）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液*1 6 mL と RNase A 20 μ L 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*3 750 μ L を加え、10~12 回転倒混和し*4、氷上に 10 分間静置する。5,000 \times g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心*5 する。次いでその上清*6 400 μ L を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50 μ L 及びエタノール（100%）200 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する*7。混合液 650 μ L（全量）を spin column に負荷した後、13,000 \times g 以上、4°C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4°C 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 \times g 以上、4°C の条件で 3 分間遠心する。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 μ 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*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、又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、又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 50 mL 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 4 mL 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。
- *7 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノール (100%) 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 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 μ 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。」

2.5.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用)

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、GE1 緩衝液*1 12 mL と RNase A 40 μ L 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 1,500 μ L を加え、10~12 回転倒混和し*4、氷上に 10 分間静置する。5,000 \times g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*5。次いでその上清*6 700 μ L を 2.0 mL チューブに移し、GE3 緩衝液 250 μ L 及びイソプロパノール (100%) 250 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する*7。混合液 600 μ L を spin column に負荷し、13,000 \times g 以上、4°C 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 600 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5

mL 容チューブに移し、水 50 μ 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*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、又は別途購入したものを用いる。

***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 50 mL 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、又は別途購入したものを用いる。

***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 50 mL 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 8 mL 程分取することが可能であり、4 $^{\circ}$ 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。

***7** 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。

***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 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 μ 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。」

2.5.1.6. シリカベースレジンタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)

均質に粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、抽出用緩衝液*1 17.2 mL、5 M グアニジン-塩酸 2 mL 及び 20 mg/mL Proteinase K を 0.8 mL 加え、激しくボルテックスミキサーで攪拌後、55~60 $^{\circ}$ 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 (1.5 mL 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 μ L と、DNA Clean-up Resin 1 mL をマイクロ遠沈管 (1.5 mL 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 2 mL の 80%イソプロパノ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（1.5 mL 容）に装着し、室温下 10,000×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（1.5 mL 容）に移し、あらかじめ 65～70℃ に温めておいた水 100 μL を滴下する*2。1 分間放置後、室温下 10,000×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。

*1 抽出用緩衝液

150 mM NaCl、2 mM EDTA 及び 1% SDS を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液
(pH7.5)

*2 定量 PCR 法に供する際は、水の代わりにあらかじめ 65～70℃ に温めておいた TE 緩衝液 100 μL を滴下する。

2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第 3 条第 2 項に規定する別表第 17 下欄のダイズ及びトウモロコシ加工食品からの DNA の抽出精製は、以下の手法で行う。

検体の粉碎に用いる粉碎器には、水分を含む検体に適した粉碎器と、乾燥検体に適した粉碎器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉碎器には、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器等があるが、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、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、滅菌できるものである。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。

2.5.2.1. 検体前処理に記載する方法により前処理をした後、2.5.2.2.に記載する方法により DNA を抽出精製する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、適量（例えば 1 g）を採取し、ダイズ加工食品においては「2.5.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、トウモロコシ加工食品においては「2.5.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 2 g）を採取し、「2.5.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法の場合は、各項目に示した試料量を採取し、「2.5.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出」に従う。なお、DNA 抽出は 1 試料当たり 2 併行で行う。

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。

2.5.2.1. 検体前処理

2.5.2.1.1. ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズ RoundupReady Soy (40-3-2, RRS)、Liberty Link Soybean (Event A2704-12, LLS) 及び Roundup Ready 2 Yield (Event MON89788, RRS2) を検知するための前処理を示す。

① 豆腐・油揚げ類

① -1 豆腐

検体 1 パックの固形部位（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体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、Proteinase K 処理を行う。

① -2 油揚げ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体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、Proteinase K 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。

② 凍り豆腐、おから及びゆば

② -1 凍り豆腐

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）に検体重量の 10 倍量の滅菌水を加え、10 分後に水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

② -2 おから

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）分を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

② -3 ゆば

乾燥品の場合、検体に検体重量の 5 倍量の滅菌水を加え、20 分後に水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

水分を含むゆばの場合、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉碎器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉碎器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加え粉碎する。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、120 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

③ 納豆

ざる*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検体に適した粉碎器に採り、検体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、Proteinase K 処理を行う。

* 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。

④ 豆乳類

検体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 μ L を採取する。石英砂を加える必要はない。

⑤ みそ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉碎器に入る量）を水分を含む検体に適した粉碎器に採り、検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑥ 大豆煮豆

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉碎器に入る量）を水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑦ 大豆缶詰及び大豆瓶詰

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉碎器に入る量）を水分を含む検体に適した粉碎器に採り、検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑧ きなこ

検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑨ 大豆いり豆

検体 1 パックを乾燥検体に適した粉砕器に採り粉砕する。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、Proteinase K 処理を行う。

⑩ ①から⑨までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑩-1 液体

「④ 豆乳類」に従う。

⑩-2 液体以外

ダイズのみ（又はダイズ以外）分離が可能なものについては分離し、原材料に従い①から⑨まで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、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑪ 大豆（調理用）を主な原材料とするもの

ダイズのみ（又はダイズ以外）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、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体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、Proteinase K 処理を行う。

⑫ 大豆粉を主な原材料とするもの

⑪に同じ。

⑬ 大豆たんぱくを主な原材料とするもの

⑬-1 魚肉ソーセージ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量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、250 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑬-2 その他

⑪に同じ

⑭ 枝豆を主な原材料とするもの

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、Proteinase K 処理を行う。

⑮ 大豆もやしを主な原材料とするもの

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、Proteinase K 処理を行う。

2.5.2.1.2. トウモロコシ加工食品

遺伝子組換えトウモロコシの定性スクリーニング検査を行うための前処理を示す。

① コーンスナック菓子

① -1 コーンチップス

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 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。

① -2 コーンパフ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 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。

② コーンスターチ

検体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 ポップコーン

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 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。

④ 冷凍とうもろこし

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体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。

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、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体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。

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、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む検体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。

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。）

⑥に同じ。

⑧ とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの

⑥に同じ。

⑨ ①から⑤までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑥に同じ。検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む検体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。

2.5.2.2. DNA の抽出精製

2.5.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 10 mL と RNase A 20 µL 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15分ごとに3回、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌する。シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で10分間遠心分離する。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。チューブに、P3 緩衝液*2 2.5 mLを添加後、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌後、氷水中に15分間静置する。シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で35分間遠心分離する。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。シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で5分間遠心分離する。底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、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。ボルテックスミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌した後、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。AW1 緩衝液*3 10.2 mLを添加し、ボルテックス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。シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で15分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムにAW2 緩衝液*4 12 mLを加え、シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で15分間遠心分離する。カラムを新しい50 mLチューブに移し、あらかじめ65°Cに温めておいた水1 mLを加える。5分間室温で静置後、シング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で10分間遠心分離する。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。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり10回転倒混和後、5分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000×gで4°C、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70%エタノール500 µL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。遠心分離器を使用し、12,000×gで4°C、3分間遠心分離後、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。乾燥後、水50 µLを加え、沈殿物を溶解させる。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。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試料原液とする。なお、沈殿も-20°C以下で保存すること。

***1 AP1 緩衝液**

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

***2 P3 緩衝液**

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

***3 AW1 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 AW1 緩衝液とする。

***4 AW2 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 AW2 緩衝液とする。

2.5.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B (トウモロコシ加工食品に適用)

均質に粉碎した試料適量をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 5 mL と RNase A 10 µL 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 15 分ごとに 3 回、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。チューブに、P3 緩衝液*2 1.8 mL を添加後、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 15 分間遠心分離する。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。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 5 分間遠心分離する。底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、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。ボルテックスミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、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。AW1 緩衝液*3 5.1 mL を添加し、ボルテックス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。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムに AW2 緩衝液*4 12 mL を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 15 分間遠心分離する。カラムを新しい 50 mL チューブに移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 1 mL を加える。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、室温で 10 分間遠心分離する。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。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール 500 µL 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。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離後、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。乾燥後、水 50 µL を加え、沈殿物を溶解させる。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。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 試料原液とする。なお、沈殿も -20℃以下で保存すること。

***1 AP1 緩衝液**

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

***2 P3 緩衝液**

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

***3 AW1 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 AW1 緩衝液とする。

***4 AW2 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 AW2 緩衝液とする。

2.5.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出

均質に粉碎した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、G2 緩衝液*1 7.5 mL を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。さらにチューブに、G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K 200 μL、及び RNase A 20 μL 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、ボルテックスミキサーを用いて攪拌する。50℃の恒温水槽中で 1 時間保温する。その間 15 分ごとに 3 回、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、4℃で 15 分間遠心分離する。15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、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。チューブをフラッシュ遠心する。QIAGEN Genomic-tip 20/G に、QBT 緩衝液*2 1 mL を負荷し平衡化する。上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下させる。QIAGEN Genomic-tip 20/G に、QC 緩衝液*3 2 mL を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。このカラムの洗浄操作を、更に 2 回行う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を 1.5 mL 容チューブに移し、あらかじめ 50℃に温めておいた QF 緩衝液*4 750 μL を加え、DNA を溶出する（溶出 1）。QIAGEN Genomic-tip 20/G を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、あらかじめ 50℃に温めておいた QF 緩衝液 750 μL を加え、DNA を溶出する（溶出 2）。溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに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。12,000×g で 4℃、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール 1 mL を添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。12,000×g で 4℃、3 分間遠心分離し、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。溶出 2 のチューブに水 50 μL を加え、沈殿物を 65℃で 15 分間振とう溶解させる。次いで、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。指先でチューブをはじき、12-24 時間冷蔵庫に静置する。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 試料原液とする。なお、沈殿も -20℃以下で保存すること。

*1 G2 緩衝液

QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*2 QBT 緩衝液

QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*3 QC 緩衝液

QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*4 QF 緩衝液

QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

2.5.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出

試料適量を乳鉢に採取し^{*1,2}、石英砂少々、CTAB 抽出液^{*3} 2 mL を加え、磨砕して、1.5 mL チューブへ移す^{*4}。60℃、30 分間インキュベートした後、16,000×g、3 分間遠心分離する^{*5}。上清約 700 μL を採取して、新しいチューブへ移す。等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 を加え、2 分間激しく振り、16,000×g、15 分間遠心分離^{*6}する。上層を新しいチューブに採取する。試料溶液に等量のクロロホルム:イソアミルアルコール 24:1 (CIA) を加え、2 分間激しく振り^{*7}、16,000×g、3 分間遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する。試料溶液と等量のイソプロパノールを加え^{*8}、30 秒間チューブを転倒混和した後、13,000×g、3 分間遠心分離し、上清を捨てる。70%エタノール 800 μL を加え、転倒混和し、3 分間静置した後、13,000×g、3 分間遠心分離する。上清を捨て^{*9}、5 分間真空乾燥^{*10}する。TE 100 μl、RNase A (10 mg/mL) 2 μL を加え、DNA を溶解する。室温又は 37℃で 30 分間静置した後、CTAB 抽出液 400 μL を加える。CIA 500 μL を加えて軽く混和する。13,000×g、15 分間遠心分離

し、上層を新しいチューブに採取する。試料溶液と等量のイソプロパノールを加え*8、30秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、13,000×g、3分間遠心分離する。上清を捨て*9、5分間減圧乾燥*11する。水100μLを加え、DNAを溶解する。溶液は小分けして−20℃以下で凍結保存する*11,12。

- *1 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。
- *2 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。
- *3 CTAB抽出液：100 mM Tris-HCl、20 mM EDTA、1.4 M 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。メルカプトエタノールはオートクレーブ滅菌の後、十分に冷めたら加える。
- *4 Proteinase K 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のが予想される試料については、Proteinase K (20 mg/mL) 溶液を各チューブ当たり 20 μL 程度加えると中間層を減らすことができる。
- *5 通常は最大遠心でよい。
- *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。
- *7 水層からフェノールを除くための操作。
- *8 DNA を沈殿させる。ただし、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。
- *9 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。
- *10 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。
- *11 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。
- *12 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。

2.5.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

DNA 試料原液の適当量を取り、水又は TE 緩衝液を用いて適宜希釈し*1、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 nm 及び 280 nm の吸光度 (A_{260} 及び A_{280} *2) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/μL DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{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^{*3}DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、 -20°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。

*1 試験の目的により、DNA 試料原液は水又は 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。

*2 A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

*3 定量 PCR 法に供する際は、TE 緩衝液を用いて希釈する。

2.5.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製

トウモロコシ穀粒 500 g から 92 粒をランダムサンプリングし、適当な大きさの容器に入れる。次いで 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 水溶液で 1 分間洗浄することで、各粒の表面に付着している他の穀粒由来の破片を洗浄する。その後、蒸留水による洗浄を数回行う。洗浄後の穀粒を蒸留水中に浸し、室温 ($20\sim 25^{\circ}\text{C}$) で 1 時間浸漬する^{*1}。浸漬後の穀粒に対し市販のダルマピンで 3 ヲ所穴をあけ^{*2}、1 ウェル当たり 1 粒を 48 ウェルプレート^{*3}に入れる。各ウェルに組織溶解液^{*4} 0.5 mL を添加する。75 mm 幅のビニールテープ^{*5}にて蓋をし、恒温槽にて 60°C で 1 時間保温する。その際、15 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させる。保温後、スイング式遠心分離器にて遠心分離し ($1,000\times g$, 室温, 10 分間)、上清を 0.3 mL 採取し、DNA 試料液とする^{*6}。

*1 浸漬中に穀粒が割れないように静置して行う。浸漬処理によって穀粒に穴を開けやすくする。

*2 ゴム手袋を着用して行う。実験台に紙のタオルなどを敷き、その上で作業を行う。穀粒に穴をあける際には、粒の白い部分にダルマピンを刺す。完全にダルマピンを貫通させると穀粒が割れて、指先に刺さる恐れがあるため、ピン先が 3~4 mm 程度刺さる程度に行う。ダルマピンは 1 粒当たり 1 個を使用し、使い捨てとする。詳細は別紙 2 を参照のこと。

*3 48 ウェルユニプレート (GE ヘルスケア) 又は同等品を用いる。

*4 組織溶解液の組成は 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS とする。長期間室温で保存することができるが、SDS が析出した場合は、温めて溶解してから使用する。

- *5 75 mm 幅のビニールテープの代わりに、LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics 社)、MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 社) 及びこれらの同等品を使用してもよい。
- *6 スイング式遠心分離器がない場合は、破片などの不溶物をなるべく吸い込まないようにして上清を回収する。

2.5.5. グループ検査のための DNA 試料液調製

岩谷産業社製ミルサーIMF-800DG 又は同等のフードミル*1を用いて穀粒の粉碎とDNAの溶出を行う。まず、IMF-800DG 付属のガラス製容器 (製品番号 IFM-Y7-P) を10個用意する。トウモロコシ穀粒 500 g から20粒ずつランダムサンプリングして、各ガラス製容器に入れる*2。穀粒に付着した穀粒の破片等を洗い落とすため、ガラス製容器に20 mL 程度の水を注ぎ、軽く攪拌した後、捨てる*3。各ガラス製容器に組織溶解液*4を20 mL 添加し、カッター部部品をはめ、密封する。これらをフードミル本体に順次装着し、20秒間粉碎する。10分以上静置した後、手で激しく攪拌する。さらに、10分以上静置した後、カッター部部品を静かに取り外す。上清 50 µL を1.5 mL 容プラスチックチューブに採取し、水で2倍に希釈する。ボルテックスミキサーで混合後、1,000×g 以上で*5 1分間遠心する。上清をDNA試料液としてマルチプレックスリアルタイムPCRに使用する。

- *1 トウモロコシ穀粒20粒と組織溶解液20 mL を密封した状態で粉碎・混合できるものを使用する。
- *2 不二金属工業社製穀粒係数板 (100粒サイズ用) の一部をアルミ箔等で覆ったものを使用することで、効率的にランダムサンプリングを行うことができる。
- *3 乾燥させる必要はない。
- *4 組織溶解液の組成は20 mM Tris-HCl (pH8.0)、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS とする。長期間室温で保存することができるが、SDS が析出した場合は、温めて溶解してから使用する。
- *5 一般的なスピンドウン用卓上遠心機を使用することができる。

2.5.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製 (NIPPON GENE GM quicker)

2.5.5.項におけるDNA試料液調製の過程で、トウモロコシ粉碎物と組織溶解液の混合物がガラス容器中に残存する。この上清から、以下のように精製DNA試料液を調製する。上清 600 µL を2 mL 容プラスチックチューブに採取し、RNase A 4 µL を加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後*1、室温で5分間静置する。GE2 緩衝液*2 75 µL を加え、10~12回転倒混和し*3、氷上に5分間静置する。13,000×g 以上、4°C の条件で5分間遠心*4する。次いで、その上清*5 400 µL を1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50 µL 及びエタノール (100%) 200 µL を添加した後、10~12

回転倒混和する*6。混合液 650 μL （全量）を spin column に負荷した後、13,000 $\times\text{g}$ 以上、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 μL を負荷し、13,000 $\times\text{g}$ 以上、4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times\text{g}$ 以上、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 3 分間遠心する。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 μL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 $\times\text{g}$ 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。分光光度計を用いて DNA 濃度を測定し、20 ng/ μL になるよう滅菌水で希釈する。

*1 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更に 30~60 秒間攪拌する。

*2 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、又は別途購入したものをを用いる。

*3 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。

*4 使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、「 $\times\text{g}$ 」が最大となるように遠心条件を設定する。

*5 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。

*6 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノール（100%）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。

2.6. パパイヤ検査法（55-1 系統）

2.6.1. 検査原則及び試料調製法

当検査は、生鮮パパイヤ及び種々の加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・検査対象検体は、一検体数を一単位とする。
- ・検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分を試料とする。
- ・試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉碎器等*で十分に粉碎し、均質混和して調製試料とする。
- ・検査に供する調製試料は固体や液体の性状にかかわらず、重量測定にて一定量を採取する。
- ・試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐよう実施する。

・微量測定のため、フードプロセッサー等*、容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。または、超音波洗浄器を用い、30分間の超音波処理を行う。

* レッチェ GM200 (レッチェ社製)、Millser (岩谷産業社製)、磁製乳鉢・乳棒及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.6.2. GUS 試験法

遺伝子組換え体作出の際、組換え体の指標とするため β -glucuronidase (GUS) 遺伝子が目的とする外来遺伝子に加えて導入される場合がある。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- β -D-glucuronide (X-Gluc) を基質とする。当該基質は GUS 活性により糖部分が加水分解され、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 (55-1) 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。

2.6.2.1. 実験操作

あらかじめ、200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) *1 を 1 ウェル当たり 50 μ 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。

生鮮パパイヤ果実を縦半分になり、種子を無作為に 12 粒選出する。12 粒それぞれについて、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又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*2。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、胚珠を縦半分になり切断する*3。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*4、あらかじめ 96 ウェルプレートに分注しておいた 200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に速やかに浸す。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了後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去する。続いて、基質溶液*5 を 1 ウェル当たり 50 μ 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°C、

10～15 時間*6 の条件で保温する。保温後、各ウェルに 70%エタノールを 50 μ 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*8 を算出する。

***1 200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0)**

200 mM NaH_2PO_4 と 200 mM Na_2HPO_4 を 3.3 : 6.7 (v/v) の割合で混合した溶液を 200 mM 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、一試験ごとに使い切ること (用時調製)。

***2** 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。

***3** 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。

***4** 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。

***5 基質溶液**

X-Gluc 溶液*7 が最終濃度 1 mM となるように、200 mM 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全てを採取し終えた後に調製し、一試験ごとに使い切るものとする。

***6** 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。

***7 X-Gluc 溶液**

X-Gluc 粉末 20 mg をマイクロ遠沈管 (1.5 mL) に量り取り、1 mL 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。

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

2.6.2.2. 結果の判定

検体が遺伝子組換えパパイヤ (55-1) の場合、理論的にはヘテロ品種同士を掛け合わせた組換え体の場合 75% (9 胚/12 胚)、ホモ品種同士を掛け合わせた組換え体の場合 100%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：陰性対照は、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%)。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。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 3 は、12 個の胚のうち、4 個が青色を呈した (GUS 発現率 33%) 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

2.6.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では生鮮パパイヤ及びパパイヤ加工食品を検査対象とし、DNA 抽出精製には、以下の陰イオン交換樹脂タイプカラム (QIAGEN Genomic-tip 100/G) を使用した DNA 抽出精製キットの改変法を用いる。1 検体から 2 併行で DNA を抽出し、各抽出 DNA 試料液を用いてリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。生鮮パパイヤ及びパパイヤ加工食品は以下の 7 種類の製品に細分類し、「2.6.3.1. 試料前処理」に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従って DNA 抽出精製前の試料調製を行う。

- ① 生鮮及び調味漬け製品 (生鮮パパイヤ、缶詰、漬物など乾固されていないある程度パパイヤの原型を保持している試料)
- ② 乾物製品 (乾燥パパイヤ)
- ③ 砂糖漬け乾燥製品 (ドライフルーツ)
- ④ 乾燥製品 (健康食品、お茶など)
- ⑤ 果肉含有ゲル状製品 (ジャム、ピューレなど)

- ⑥ 果汁・飲料製品 (フルーツミックスジュース、ドリンク剤など)
- ⑦ 氷菓等製品 (アイス、シャーベットなど)

2.6.3.1. 試料前処理

① 生鮮及び調味漬け製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し (生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分)、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、よく水分をきり、フードプロセッサー等で粉砕する (生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉砕する)。粉砕した試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

② 乾物製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、フードプロセッサー等で粉砕する。粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

③ 砂糖漬け乾燥製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、その重量の2倍以上の滅菌蒸留水で3回洗浄した後、等重量分の滅菌蒸留水を加え、フードプロセッサー等で粉砕する。粉砕した試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

④ 乾燥製品

フードプロセッサー等で粉砕し均質にした試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

⑤ 果肉含有ゲル状製品

フードプロセッサー等で粉砕し均質にした試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

⑥ 果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品 100 mL をメスシリンダーで量り採り、凍結乾燥用容器 (500 mL) に移し、傾けた状態で -80°C 冷凍庫中で2時間凍結させる。その後、凍結乾燥機にセットし、24時間乾燥後、試料*2 30 g を乳鉢に量りとり G2 緩衝液*1 20 mL に乳棒を用いて懸濁させる。次いで、全量をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たに G2 緩衝液*1 10 mL を追加し遠沈管に洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。

⑦ 氷菓等製品

試料 100 g を凍結乾燥用容器に量り採り、24 時間凍結乾燥する。その後、試料*2 10 g を先に G2 緩衝液*1 30 mL を入れたポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) に少しずつ加えながら懸濁させ、よく転倒混和して均質にする。

*1 G2 緩衝液は QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*2 凍結乾燥後、提示量に満たない場合は採取できる量からスタートし、その後に使用する試薬の量は変更しない。

2.6.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製

2.6.3.2.1. DNA の抽出精製*1

「2.6.3.1. 試料前処理」を行った試料に、RNase A*2 20 μ L、cellulase*3 500 μ L を加えて (なお⑤果肉含有ゲル状製品のジャム製品に限り、 α -Amylase*4 20 μ L も同時に加える)、転倒混和して均質にした後、50°C で 1 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、Proteinase K*5 200 μ L を加え 50°C で 1 時間放置する。その間も 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。酵素処理終了後、その遠沈管を 3,000 \times g、低温下 (4°C)、20 分間遠心する*6。その間、あらかじめポリプロピレン製遠沈管 (50mL) 上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液*7 4 mL を通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清 (約 25 mL~35 mL) を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する*8。このときの溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液*7 で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後*8、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液*7 1 mL を負荷し、溶出液は捨てる。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しいポリプロピレン製遠沈管 (50 mL) 上にセットし、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液*7 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。DNA 溶出液にイソプロパノール 2 mL を加えよく混合する。マイクロ遠沈管 (1.5 mL) 1 本あたり 1 mL 程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000 \times g 以上で、低温下 (4°C) 15 分間遠心する。上清を捨てる。この際、上清を極力除去する*9。次いで、各遠沈管あたり 70%エタノールを 1 mL ずつゆっくり加え、さらに 10,000 \times g 以上で、低温下 (4°C) 5 分間遠心する。上清を捨て*9、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管 (1.5 mL) 4 本分の沈殿を、あらかじめ 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とする*10。

*1 実験を通して、液体を分注するピペットやチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。

- *2 ニッポンジーン社 (Cat. no. 318-06391) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。
- *3 Sigma-Aldrich 社 (Cat. no. C2730-50ML) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。
- *4 ニッポンジーン社 (Cat. no. 316-04751) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。
- *5 QIAGEN 社 (Cat. no. 19133) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。
- *6 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。可能であれば、使用するローター及び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。
- *7 QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液は、QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。
- *8 液体の流速が著しく減少した場合には、カラム上方から 10 ml テルモシリンジ (コード番号: SS-10SZ) のプランジャーなどを用いて穏やかに加圧させ、流速を増加させる。プランジャーを利用する場合には、プランジャーをカラムに 1 cm 程度挿し込んで抜く操作を繰り返す。この際、プランジャーを挿し込む操作は、プランジャー先端のゴム部分とカラム内壁を密着させ、空気が漏れないように行う。一方、プランジャーを抜く操作は、逆流を防ぐために、プランジャーを斜めにしてプランジャー先端のゴム部分とカラム内壁との間に隙間を空け、カラム内へ空気を入れながら行う。
- *9 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を完全に除去する。
- *10 溶解操作の際には、まず 1 本のマイクロ遠沈管に 50 μ L の滅菌蒸留水を入れ、沈殿した DNA を溶解する。次いでその DNA 溶液を次のマイクロ遠沈管に入れ、沈殿した DNA を溶解する。この操作を繰り返し、最終的に各検体から得られる DNA 溶液を 50 μ L となるようにする。

2.6.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し^{*2}、260 nm 及び 280 nm の吸光度^{*3} (A_{260} 及び A_{280}) を記録する。次いで A_{260} の値 1.0 を 50 ng/ μ L DNA と換算し、DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{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^{*4}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 10 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 50 μ L ごとにマイクロ遠沈管に分注後、 -20°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 10 ng/μL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

- *1 希釈倍率は、使用する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。
- *2 紫外外部吸収スペクトルを測定する機器がない場合には、260 nm 及び 280nm の吸光度の 2 点を測定する。
- *3 A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。
- *4 A_{260}/A_{280} の比が 1.7~2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.6.3.3. リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)

遺伝子組換えパパイヤ (55-1) の検出は、遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR とパパイヤ陽性対照試験用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR の 2 試験を行う。遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用として、パパイヤゲノム配列と Papaya Ringspot Virus coat protein (PRSV-cp) 遺伝子発現用プラスミド・ベクターの境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。また、パパイヤ陽性対照試験用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用プライマー対及びプローブ
PRSV-cp F: 5'-CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3'
PRSV-cp R: 5'-TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3'
PRSV-cp P: 5'-FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対及びプローブ
Q-Chy-1F2: 5'-CCATGCGATCCTCCCA-3'
Q-Chy-2R: 5'-CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA-3'
Q-Chy-P(new): 5'-FAM-TTCCCTTCATCCATTCCCCTTCTTGAGA-TAMRA-3'

2.6.3.3.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。組成は以下のとおりである。
TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) *1 12.5 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μM) 各 0.4 μL、対象プローブ溶液 (10 μM) 0.25 μL を混合し、DNA 試料液 5 μL を添加し滅菌蒸留水で全量 25

μLに調製する。DNA 試料液当たり遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用リアルタイム PCR とパパイヤ陽性対照試験用リアルタイム PCR をそれぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。Non-Template Control (NTC) 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*2。分注操作終了後、真上からシール*3し、完全にウェルを密閉する。密封する際、専用のシーリングアプリーターを用いて、ウェル上の MicroAmp® Optical Adhesive Film にしわが寄らないよう注意する。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 (又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心操作にて) 気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*4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。

*1 TaqMan® Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作及び採取を行う際には注意が必要である。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。使う直前には必ず軽く攪拌後、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、遠心が困難な場合は、ウェルの底に確実に入れる。遠心が可能な場合は、シールした後に遠心操作を行う。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水を 5 μL 添加する。

*3 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 (Thermo Fisher Scientific 社) 及び MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 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。

*4 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) を使用する。Applied Biosystems® 7500 では使用しない。

2.6.3.3.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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 (「NTC」: Non-Template Control、「Unknown」: DNA 試料液) の設定を行う。

またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new)共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、Passive

Reference は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。Sample Volume は 25 μ L に設定する。

Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、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（「N」：Non-Template Control、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new)共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」に設定する。なお、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。下降部分は 100%のままとする。Sample Volume は 25 μ L に設定する。

2.6.3.3.3. PCR

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 15 秒間、60°C 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行う。ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、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。

Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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。Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.6.3.3.4. 結果の解析及び判定

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験とパパイヤ陽性対照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及び Cq 値の確認並びに 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。

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験でまず目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ（55-1）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 ΔRn 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 Threshold line（Th）を選択する*1。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2 併行抽出より得られた DNA 試料液（1 抽出当たり 2 ウェル併行で測定）の合計 4 ウェル全てを用いて判定する。

パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq

値が得られた場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 陽性と判定する。パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られない場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 陰性と判定する (図 7 参照)。

パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験のどちらか一方だけで 48 未満の Cq 値が得られた場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて 2 回目*2 の DNA 抽出精製を行い、さらに「2.6.3.3. リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 試料液を用いた場合でも陽性又は陰性の判定が得られない場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 陰性と判定する (図 7 参照)。なお、上記により陽性と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。

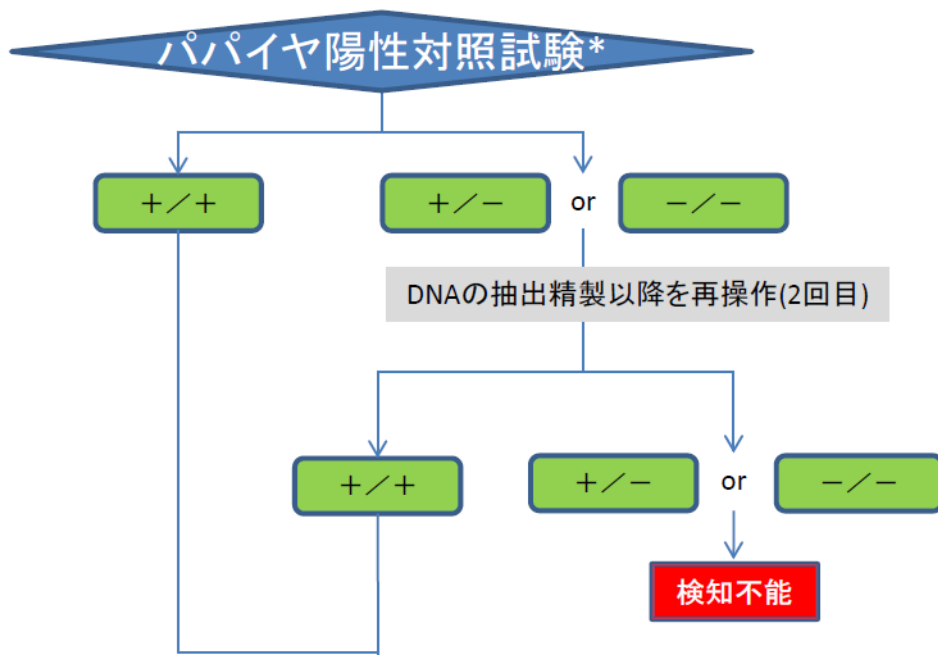
また、パパイヤ陽性対照試験の全てのウェルで 48 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて 2 回目*2 の DNA 抽出精製を行い、さらに「2.6.3.3.リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」以降の操作を行い、それでもパパイヤ陽性対照試験の全てのウェルで 48 未満の Cq 値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする (図 7 参照)。

*1 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔRn が変動することから、普遍的な Th 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 ΔRn 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 を設定する。本実験法の場合は、Th = 0.2 と設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

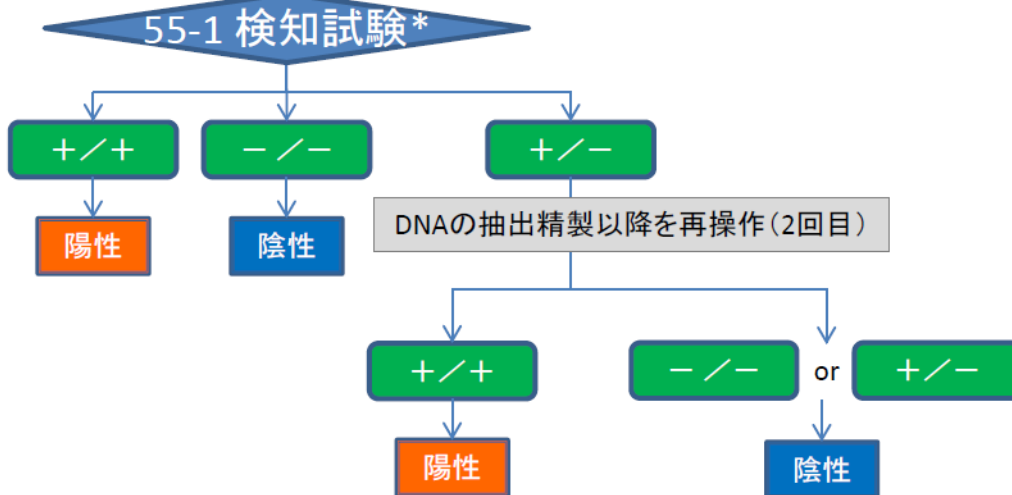
*2 DNA 抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「2.6.3.1.試料前処理」から実施する。

図7 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。

(別紙 1) 内標比

ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	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)	0.39	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

ABI PRISM® 7900HT 96well

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	0.98	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.32	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P 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	MIR604	0.44	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	MIR162	0.70	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 384well

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	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

ABI PRISM® 7000

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	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

Applied Biosystems® 7500

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.02	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	0.98	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.33	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P 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
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	MIR162	0.64	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

LightCycler® System

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	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

QuantStudio 5

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.97	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	1.08	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.51	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用

QuantStudio 12K Flex

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.00	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	1.10	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.51	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用

LightCycler® 96

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.90	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	1.11	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.29	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用

LightCycler® 480 96 well

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.96	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	1.07	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.30	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用

(別紙2) トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順

- ①ゴム手袋を着用して行う。実験台に紙のタオルなどを敷き、その上で作業を行う。穀粒に穴をあける前に、あらかじめ洗浄、浸漬を行う。



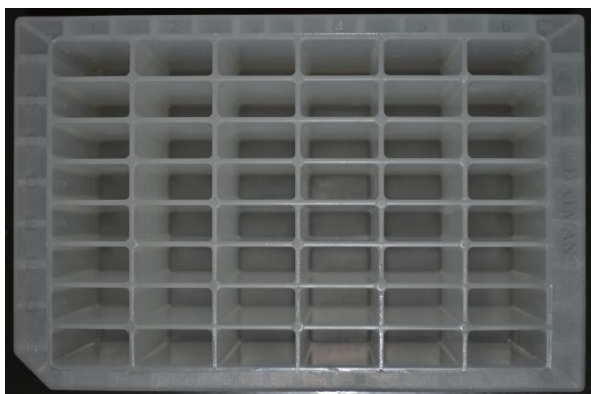
- ②穀粒に穴をあける際には、粒の白い部分にダルマピンを刺す。完全にダルマピンを貫通させると穀粒が割れて、指先に刺さる恐れがあるため、ピン先が3~4 mm 程度刺さる程度に行う。



- ③ダルマピンで3カ所穴をあける。ダルマピンは1粒当たり1個を使用し、使い捨てとする。

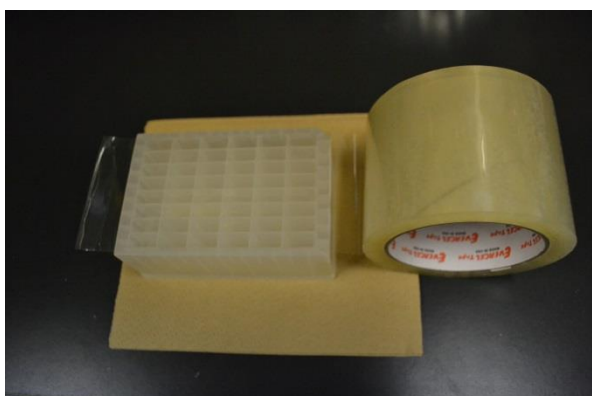


④1 ウェル当たり 1 粒を 48 ウェルプレートに入れる。



⑤各ウェルに組織溶解液 0.5 mL を添加する。

⑥75 mm 幅のビニールテープにて蓋をし、恒温槽にて 60°C で 1 時間保温する。その際、15 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させる。



⑦保温後、スイング式遠心分離器にて遠心分離し(1,000 × g, 室温, 10 分間)、上清を 0.3 mL 採取し、DNA 試料液とする。

(参考)

- (1) 2.5.1.2. 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)、2.5.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用)、2.5.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A (ダイズ加工食品に適用) 及び 2.5.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B (トウモロコシ加工食品に適用) の記述のシリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 及び QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit) に用いられる AP1 及び P3 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別に QIAGEN 社 (〒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) 2.5.1.4. 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)、2.5.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用) 及び 2.5.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製 (NIPPON GENE GM quicker) に記述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社 (〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547) から購入可能である。
- (3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算に記述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 ダイズ (LLS) プラスミドセット-ColE1/TE⁻; GM Soybean (LLS) Detection Plasmid Set-ColE1/TE⁻、GM ダイズ (RRS2) プラスミドセット-ColE1/TE⁻; GM Soybean (RRS2) 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、ニッポンジーン社 (〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック社 (〒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) 2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR、2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR、2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR、2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 及び 2.2.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブは、ニッポンジーン社 (〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック社 (〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。
- (5) 2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)、2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)、2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.4.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) 及び 2.4.2.1. PCR

用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブ (SSIIb-TaqV 以外) は、ニッポンジーン社 (〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック社 (〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。また、SSIIb-TaqV は、Thermo Fisher Scientific 社 (〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町三丁目 9 番地) から合成依頼による購入が可能である。

(6) 2.2.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液は、ニッポンジーン社 (〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547) 及びファスマック社 (〒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。

(7) パパイヤ 55-1 系統のプライマー・プローブ及び標準プラスミドは、ニッポンジーン社 (〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック社 (〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

検査方法の同等性確認方法

1. DNA抽出精製方法について

DNA抽出精製法においては、再現性よく検査に必要な純度と量が得られることが必要である。例えば、新たに用いるDNA抽出精製法を、6併行で異なる3日間行って、既存の方法と比べて最終的にリアルタイムPCRまでを実施した結果が同じであることを確認する。内在性遺伝子の検出（陽性対照試験）の結果を確認して、既存の方法を比較してCq値に差がないか確認する（少なくともCq値が1以上大きくならない。）。

2. 定性用リアルタイム PCR 装置について

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中で用いられている装置のほかにも同等の性能を有する機種を用いることができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率（特に定量する場合）などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照プラスミド（例えば、コメ用）を用意し、現行機種（ABI PRISM 7900 等）を用いて検出限界より少し高い濃度（10 回中 10 回全て検出される最低濃度）の希釈溶液を作製する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて 3 回以上行った結果、全て検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）。

3. マスターミックスについて

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のもの又は同等性が確認されたリアルタイム PCR 装置を用いて、検知対象作物試料（作物試料が入手可能な場合はそれを用い、入手できない場合は加工度が高くない加工製品等でもよい。）を用いて内在性遺伝子検出法試験を繰り返し3回以上実施する。その結果、Cq 値やエンドポイントにおいて「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のものと大きな差がないことを確認する。また、遺伝子組換え検出法部分については、市販の陽性プラスミドを希釈せずに用いて、3 回以上測定を行った結果、Cq 値やエンドポイント差が大きな差ないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）。