

JAS 分析試験ハンドブック

遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

改訂第2版

定量的 PCR 編

平成14年6月20日



独立行政法人 農林水産消費技術センター

1.1 定量的検知技術について

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

1.1.1 遺伝子組換え(GM)農作物の育成・栽培の実態

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

1) 系統と品種

開発され安全性が確認された GM 農作物は、開発された際の系統名等 (Event176, Bt11, MON810 等) で呼ばれている。この系統とは、育種上の用語で最初に遺伝子組換え体として作出された際に付けられる個体番号である。同じ組換え遺伝子を同じ植物培養組織に導入しても、染色体のどの部位に何カ所挿入されるか (コピー数) は特定できないため、多くの組換え体 (クローン) が分離取得される。その個体毎 (系統) に増殖され、特性評価、安全性評価が実施され、一度安全性が確認された系統の後代は改めて安全性確認の必要性はない。しかしながら、一つの系統では様々な気候で栽培することが困難であるために、開発者はこの系統を片親として従来品種との交雑を行って実際に栽培する品種を育成し、商品化している。

大豆の場合は、閉花性の植物であることから、在来優良系統との交配、自殖を人為的に繰り返して遺伝子をホモ(homozygous)で持つ GM 品種が育成されている。除草剤の影響を受けない大豆 (ラウンドアップ・レディー大豆) は、米国内で 1,000 品種以上が販売、栽培されていると聞いている。

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

れらを考慮することは現実的でないと考えられる。

2) GM 農作物の栽培と流通

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

1. 1. 2 遺伝子組換え体を検知するために必要な情報・試料

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

1. 1. 3 遺伝子組換え体の検知技術の現状

1) PCR 法を用いた組換え DNA の検知

組換え遺伝子の検知法としては PCR 法がある。PCR 法は分子生物学の基礎的研究から遺伝子診断、犯罪捜査まで使われている DNA 増幅技術であり、基本的な知識は、多くの入門書があるので、それを参照してもらいたい (中山, 1996, 島本, 1999)。

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

ていれば可能であるが、DNA が残っていることは考えられない精製植物油や醤油、糖類などを除いて、加工工程の条件によって DNA の状態は異なり、抽出法に左右されるであろう。

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

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

2) 組換え蛋白質の検知

農作物の組織から特定の一つの蛋白質を検知するには、検知したい蛋白質の抗体を利用した方法がある。測定対象の抗原となる蛋白質と特異的な抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素を化学的に結合させた二次抗体で検知する ELISA 法が向いている。しかし、検知対象の蛋白質が高温、酸等により変性すると抗体との特異性がなくなるため、加工食品中の組換え遺伝子由来の蛋白質を検知することはできない。

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

1. 1. 4 本マニュアル記載の検知技術の特徴

1) PCR プライマー

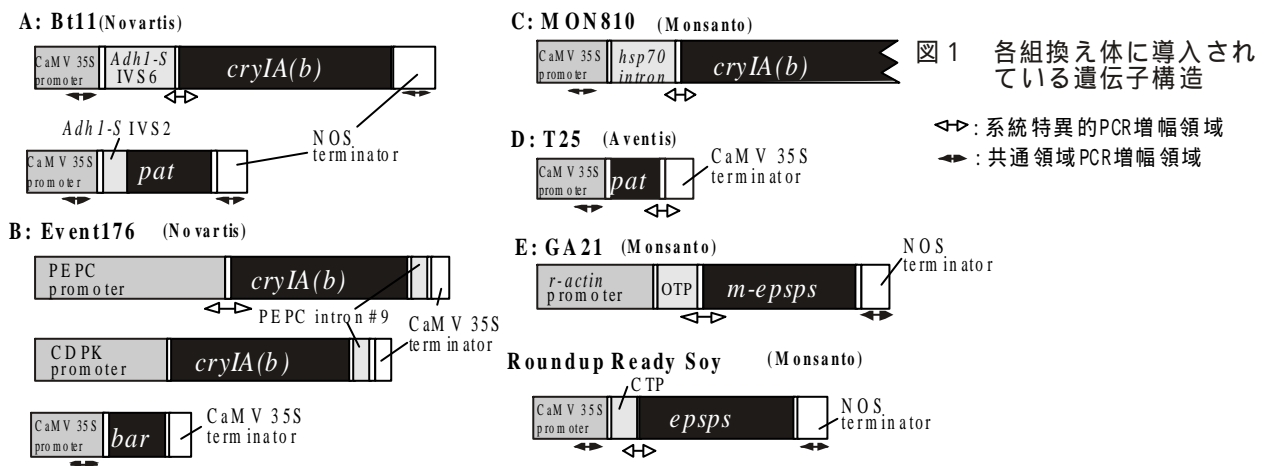
本分析マニュアルで使用する PCR プライマーは、厚生労働省、農林水産省から公開されている安全性評価の資料の閲覧と、DNA データベース（国立遺伝学研究所の DDBJ、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>）を利用して、各 GM 農作物に導入されている組換え DNA の塩基配列を元に、プライマー設計の基本的なルールに従って作製したものである。その特異性については、他の組換え系統、イネ、大麦、小麦由来のゲノム DNA に対して非特異的バンドが観察されないものを選択してある。また、PCR 反応を行う際には、コントロールとして対象農作物に必ず含まれる DNA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

2) 定量 PCR 法

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

(1) PCR 用標準物質

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



(2) 内標比の考え方

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

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

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

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

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

(3) 加工食品への適用

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

1.1.5 検知技術の問題点

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

(2001.3.31 作成、2001.4.25 修正)

(注)「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について(通知)」(H13.3.19 改正 12 食流第 1775 号)において、意図せざる混入について、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が5%以下であることとする。」と定めている。

(参考図書)

- 1) 中山広樹(1996),バイオ実験イラストレイテッド、第3巻本当にふえるPCR、秀潤社
- 2) 島本功他(1999), 核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法、秀潤社
- 3) 松岡猛他(1999), 食衛誌, 40:149-157
- 4) Matsuoka, T. et al. (2000) J. Food Hyg. Soc. Japan, 41 : 137-143
- 5) Koppel, E.etal.(1997)Mitt . Gebiete Lebensm. Hyg.,88:164-175
- 6) Ehlers, B.etal.(1997)Bundesgesundhbl . 4/97
- 7) Matsuoka, T. et al.(2001) J. Food Hyg. Soc. Japan, 42(2) : 137-143

1.2 試験の概要

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

2 出典

この定量的 PCR 法は、Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Quantification Methods using Novel Reference Molecules for Detection of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International (in press) 及び Shindo Y., Kuribara H., Matsuoka T., Futo S., Sawada C., Shono J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Validation Studies of Real-time PCR Analyses for Line Specific Quantification of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. Journal of AOAC International (in press) による。(注1)

3 適用範囲

組換えトウモロコシ Bt11, Event176, T25, MON810 及び GA21 の5系統あるいは組換え大豆 RoundupReady Soy (40-3-2 系統) について、系統ごとのあるいは総量としての、非組換え体に対する組換え体の混入率測定に適用する。

対象品目は、ダイズ、デント種トウモロコシ乾燥品、トウモロコシ半加工品(トウモロコシグリッツ、トウモロコシフラワー及びトウモロコシミール)である。

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

なお、加工食品で得られる値は、Validate されていない。(注2)

4 装置

4.1 試料の前処理及び DNA の抽出

粉碎器: 0.50 mm 程度に粉碎できるものを使用する(注3)。

その他の装置は、基本操作編「3.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出」の「3.1.4 装置」による。

4.2 定量

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

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

5 試薬

5.1 試料の前処理及び DNA の抽出

試薬は、基本操作編「3.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出」の「3.1.5 試薬」による。

5.2 定量

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

《ダイズ用》

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

《トウモロコシ用》

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

《ダイズ用標準プラスミド》

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

《トウモロコシ用標準プラスミド》

GM トウモロコシプラスミドセット : (株)ニッポンジーン(#319-04981)又は、(株)ファスマック (#PM-2)、若しくは同バルク品。

共に以下の濃度である。

- 20 copies/ 2.5 µL
- 125 copies/ 2.5 µL
- 1,500 copies/ 2.5 µL
- 20,000 copies/ 2.5 µL
- 250,000 copies/ 2.5 µL

- ・NTC (No Template Control)用サケ精子 DNA 溶液 (5 ng/ μL に滅菌水で調製したもの) : 上記標準プラスミド添付品あるいは、(株)ニッポンジーン(#316-04991)又は、(株)ファスマック(#NC-1)

6 操作

6.1 試料の前処理及び試料の抽出

6.1.1 試料の前処理

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

(1) 粉碎

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

(2) 混合

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

6.1.2 DNA の抽出

DNA の抽出は、1点につき1抽出行う。

ダイズ粉碎物は、1.0 g を抽出に供し、基本操作編「3.1.6 抽出操作」の「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従い DNA を抽出する。

トウモロコシ及びトウモロコシ半加工品粉碎物は、1.0 g を抽出に供し、基本操作編「3.1.6 抽出操作」の「3.1.6.2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B」に従い DNA を抽出する。

抽出した DNA は、基本操作編「3.1.7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算」及び「3.1.8 抽出される DNA の純度」に従い、純度の確認、DNA 量の計算等を行う。その後、O.D.260 nm 吸光度より定量 PCR 用 DNA 溶液として、20ng/ μL (注5) に調製する。

「3.1.9 記録」に基づき記録すること。

6.2 定量

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

6.2.1 反応液の調製

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

使う前には、最高速で3秒ほど試験管ミキサーをかけ、スピンドウンしておく。

反応液の調製手順

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

1つのサンプル当たり3つのウェルを用い、1つのウェル当たり25 μ Lの系で反応を行う。
マスターミックスは、内在性遺伝子用と目的とする組換え体特異的遺伝子 (specific gene) 用を用意する。

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

マイクロピペットのプッシュボタンを第1ストップよりも若干深く押し下げる。

マイクロピペットを垂直に保ち、チップの先端を溶液に浸す。

プッシュボタンをゆっくり戻す。採取したい容量よりも多めに吸引される。

プッシュボタンを2～3度ゆっくりと第1ストップまで押し、溶液を出し入れしてチップになじませる。

マイクロピペットを垂直に保ち、チップの先端を溶液に浸す。

プッシュボタンをゆっくり戻す。採取したい容量よりも多めに吸引される。

チップの先端が溶液内に挿入された状態でチップ内の液面が安定するまで保持する。

チップを静かに引き上げ、マイクロピペットを垂直に保ち、分取先のチューブの内壁にチップ先端をそわせる。

プッシュボタンを第1ストップまで押し下げ、チップ内の液面が安定するまで保持する。

チップ内に残った過剰の溶液は吐き出さず、第1ストップまで押し下げた状態で、チップをチューブから抜き取る。

連続して同じ溶液を分取する際は、第1ストップまで押し下げた状態（過剰の溶液がチップ内に残った状態）から ～ の操作を繰り返す。

(1) マスターミックスの調製

TaqManTM Universal PCR Master Mix と Primer・Probe Mix を 1 . 2 5 : 1 の割合で混合しマスターミックスを調製する。

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

混合本数

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

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

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

混合量

TaqMan™ Universal PCR Master Mix 12.5×(X+a) μL

Primer・Probe Mix 10.0×(X+a) μL

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

a：補填分

調製後最高速で3秒程度試験管ミキサーしてからスピンドウンする。（注6）

（2）マスターミックスの分注

テンプレート DNA の数だけ 500 μL チューブを用意し、マジックで番号を付ける。

マスターミックスを 78.75 μL ずつ、用意したそれぞれの 500 μL チューブに分注する。

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

（3）分注液へのテンプレート DNA 添加

マスターミックスを分注したチューブにテンプレート DNA を 8.75 μL ずつ加える。

添加後最高速で3秒程度試験管ミキサーしてからスピンドウンする。（注4）

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

（4）定量 PCR 用プレートへの分注

反应用 96 ウェルプレート上の反応液の配置を決める。

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

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

最後は、専用の「ローラー付きふた閉め器」を用いて完全に閉める。

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

6.2.2 装置本体へのプレートのセット

（1）装置コントロール用 Macintosh の電源を入れる。（すでに電源が入っている場合は再起動する。（メニューバーの「Special」 「Restart」））

（2）装置本体の電源が ON になっていることを確認する。緑の READY ランプが点灯していることを確認する。

（3）装置本体の右側のカバーをあげ、サンプルを載せたプレートをセットする（ふたのつま

- みを閉めるとき、締め付けすぎないように注意。白い印が手前にきた状態でよい。)。
- (4) Mac 画面のデスクトップ上のアプリケーション “Sequence Detector” をダブルクリックして開く。
 - (5) ウェル情報を記入したシートを新規作成する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを replicate として指定しておく。
 - (6) メニューバーの「Setup」 「Sample Type Palette」でパレットが出てくるので、パレットの「Sample Type Setup」ボタンを押し、「STND」、「UNKN」、「NTC」の Reporter が「FAM」になっていることを確認する。また、Reference が「ROX」になっており、Quencher が「TAMRA」になっていることを確認する。確認後、パレットを閉じる。
 - (7) Setup 画面の「Thermal Cycler Condition」ボタンを押し、反応条件が以下のように設定されていることを確認する。[50 2分 95 10分 (95 30秒 59 1分)×40 サイクル]
 - (8) 「Sample Volume」が 25 μ L になっていることを確認する。確認後、「OK」を押して閉じる。
 - (9) 「ShowAnalysis」ボタンを押し、Analysis 画面に切り替える。
 - (10) Status の表示が、「Idle」になっており、PCR 装置のふたの温度 (Cov. Temp) が 105 付近になっていることを確認する。
 - (11) 「Run」ボタンをクリックして、反応とデータの取り込みを開始する。

7 反応後の解析

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

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

- (1) 「Remaining time」が「00:00:00」になっていることを確認して「STOP」ボタンを押す。
- (2) 開いている書類を閉じる。(念のため適当なファイル名を付けて保存する。)
- (3) 新しいシートを作成し、メニューバーの「File」 「Import」 「LabView Format Raw Data」を選択し、「SDS Runs f」内に保存されている生データを取り込む。
- (4) はじめに、内在性遺伝子を解析する。Set up 画面上で、内在性遺伝子以外のウェルを not in use に指定し、解析対象から外し、「Show Analysis」ボタンを押し、Analysis 画面に切り替える。
- (5) メニューバーの「Analysis」 「Analyze」により、データ解析を行う。「OK」ボタンを押す。
- (6) 反応に使用した全てのウェルを選び、メニューバーの「Analysis」 「Amplification Plot」を選択する。新しく開いたウィンドウで増幅の様子がチェックできる。
- (7) 「Amplification Plot」のウィンドウ上で、以下の操作を行う。
 - 1) Baseline の Start を 3 に、Stop を 15 にする。
 - 2) Mult.*Stddev の値に 2^mを入力する。最初は m = 0 とする。(つまり 1 を入力する。)
 - 3) 「Suggest」ボタンを押し、次に「Update Calculations」ボタンを押す。
 - 4) 「Analysis」 「Standard Curve」を選択し、Standard Curve の Corr. 、slope 及び

Y-intercept の値を確認し、「th.line 決定表」に th.line の値と共に記入する。mを1ずつ増加させながら同じ手順を繰り返す。このとき1つでも NTC の増幅曲線が th.line と交差する場合は備考欄に NTC と記入する。（目視で判断できない場合、Experiment Report 上で Ct 値が 40 に達したとき交差しなくなったと判断する。（以下同じ））

5) この操作は最小コピー数の Std 増幅曲線が th.line と交差しなくなるまで繰り返す。最小コピー数の Std 増幅曲線が1つでも th.line と交差しなくなったら「th.line 決定表」備考欄に plot out と記入する。Standard Curve の Corr.、slope 及び Y-intercept の値は記入する必要ない。

6) 増幅率 (A) 及び $|?A|$ を計算し、以下の条件を満たす th.line を採用する。

A 及び ?A の定義： $A=10^{(-1/slope)}$, $?A = (A_{m+1} - A_m) / A_m \times 100$

条件 1： $|?A|$ が 2 区間以上連続して 1%以下になるときの区間（最小 m 最大 m）における中点（以下 mt）での th.line を採用する。但し、mt が整数にならないときは、小数点以下を切り上げる。

但し、採用された th.line で得られた Standard Curve の Corr.の値が 0.99 以上且つ増幅率 (A) の値が 2.1 以下の条件を満たし、さらに、採用された th.line が NTC の曲線と交差しないこと。

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

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

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

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

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

(9) 適当な名前を付けファイルを保存し、閉じる。

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

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

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

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

各遺伝子組換え系統の内標比については、別表 1.に従うこと。

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

8 測定のやり直し

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

9 定量下限

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

10 記録

抽出に係る記録、様式 th.line 決定表及び様式 混入率算出表に必要事項を記入する。

11 備考

JAS ハンドブックは、一般の小売り用の食品を対象としいるため、1包装を1単位としている。ロットの非常に大きい袋積みのもや、サイロ等における検査のサンプリング方法については、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(厚生労働省 食発第110号平成13年3月27日)及び「同(一部改正)」(同、食発第158号平成13年5月25日)を参照する。

遺伝子組換えトウモロコシのスクリーニング法として、CaMV 35S promoter 検知用及び GA21 specific 検知用のプライマー及びプローブを用い、CaMV 35S promoter の測定を MON810 換算して定量し、GA21 の定量値と合算して定量する方法が厚生労働省より出されている。

(注1) 本法は、独立行政法人 食品総合研究所、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社により、特許出願中である。

(注2) 加工食品については、今後、Validate していく予定である。

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

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

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

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

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

作物名	系 統	PCR 増幅領域		
		CaMV35S promoter	NOS terminator	系統特異的定量領域
トウモロコシ	Bt11	0.91	0.96	0.50
	GA21	-	1.05	1.40
	T25	0.31	-	0.34
	Event176	0.79	-	2.05
	MON810	0.39	-	0.38
ダイズ	40-3-2 (RRS)	0.94	1.10	0.95

[様式 th.line 決定表](#)

[様式 混入率算出表](#)