

(別紙)

### 食品表示基準について（新旧対照表）

改正後（新）	改正前（旧）
<p>食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）</p> <p>（総則関係）～（附則）（略）</p> <p>別添 添加物 1－1～別添 アレルゲンを含む食品の検査方法（略）</p> <p>別添 機能性表示食品</p> <p>第1 総論</p> <p>1 対象となる食品</p> <p>容器包装に入れられた食品全般（サプリメント形状の加工食品、サプリメント形状の加工食品以外の加工食品（以下「その他加工食品」という。）及び生鮮食品）が対象となる。</p> <p>機能性表示食品制度の運用上、サプリメント形状の加工食品とは、天然由来の抽出物であって、分画、精製、化学的反応等により本来天然に存在するものと成分割合が異なっているもの又は化学的合成品を原材料とする錠剤、カプセル剤、粉末剤、液剤等の形状の食品をいう。ただし、錠剤、粉末剤及び液剤については、社会通念上、サプリメントとして認識されずに食されているものもあることから、当該食品の一日当たりの摂取目安量に鑑み過剰摂取が通常考えにくく、健康被害の発生のおそれのない合理的な理由のある食品については、サプリメント形状の加工食品ではなく、その他加工食品として取り扱ってもよいものとする。なお、カプセル剤形状の食品については、サプリメント形状の加工食品として取り扱う。</p> <p>なお、以下の食品については、機能性表示食品の対象から除くこととする。</p> <p>① 特別用途食品及び栄養機能食品</p> <p>消費者が食品を選択する際、複数の機能性表示食品制度に基づく表示が記載されていると、それぞれの記載がいずれの制度に基づく表示であるのか混乱を招くおそれがある。当該混乱を防止するため、また、各制度の趣旨の違いに鑑み、従来の機能性表示食品制度に基づく食品（特定保健用食品と栄養機能食品）及び特定保健用食品を除く特別用途食品との併用は認められない。</p> <p>② アルコールを含有する飲料</p> <p>アルコール飲料（アルコール分1度未満のものを含む。以下同じ。）を除外食品とする趣旨は、当該食品の摂取による健康への悪影響を否定できないため、これ</p>	<p>食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）</p> <p>（総則関係）～（附則）（略）</p> <p>別添 添加物 1－1～別添 アレルゲンを含む食品の検査方法（略）</p> <p>別添 機能性表示食品</p> <p>第1 総論</p> <p>1 対象となる食品</p> <p>容器包装に入れられた食品全般（サプリメント形状の加工食品、サプリメント形状の加工食品以外の加工食品（以下「その他加工食品」という。）及び生鮮食品）が対象となる。</p> <p>機能性表示制度の運用上、サプリメント形状の加工食品とは、天然由来の抽出物であって、分画、精製、化学的反応等により本来天然に存在するものと成分割合が異なっているもの又は化学的合成品を原材料とする錠剤、カプセル剤、粉末剤、液剤等の形状の食品をいう。ただし、錠剤、粉末剤及び液剤については、社会通念上、サプリメントとして認識されずに食されているものもあることから、当該食品の一日当たりの摂取目安量に鑑み過剰摂取が通常考えにくく、健康被害の発生のおそれのない合理的な理由のある食品については、サプリメント形状の加工食品ではなく、その他加工食品として取り扱ってもよいものとする。なお、カプセル剤形状の食品については、サプリメント形状の加工食品として取り扱う。</p> <p>なお、以下の食品については、機能性表示食品の対象から除くこととする。</p> <p>① 特別用途食品及び栄養機能食品</p> <p>消費者が製品を選択する際、複数の機能性表示制度に基づく表示が記載されていると、それぞれの記載がいずれの制度に基づく表示であるのか混乱を招くおそれがある。当該混乱を防止するため、また、各制度の趣旨の違いに鑑み、従来の機能性表示制度に基づく食品（特定保健用食品と栄養機能食品）及び特定保健用食品を除く特別用途食品との併用は認められない。</p> <p>② アルコールを含有する飲料</p> <p>アルコール飲料（アルコール分1度未満のものを含む。以下同じ。）を除外食品とする趣旨は、当該食品の摂取による健康への悪影響を否定できないため、これ</p>

を防止する点にある。この趣旨からすれば、文言上「飲料」であっても、必ずしも最終製品が飲料の形態をとるもののみならず、アルコールを含有する飲料を使用し、アルコールが残存した固形の食品も機能性表示食品の対象とすることは望ましくない。ただし、摂取に際し、十分な加熱（煮沸等）を前提とし、アルコールの摂取につながらないことが確実な食品（例：保存性を高めるため、酒精を添加したうどん）は除く。

③ 栄養素の過剰な摂取につながる食品

「過剰な摂取」とは、食品特性も踏まえて判断されるべきものであるが、例えば、当該食品を通常の食事に付加的に摂取すること及び同種の食品に代替して摂取することにより、当該栄養素の一日当たりの摂取量が、厚生労働大臣が定める食事摂取基準（健康増進法第16条の2。以下「食事摂取基準」という。）で定められている目標量を上回ってしまう等、当該栄養素を必要以上に摂取するリスクが高くなる場合等をいう。

2 （略）

3 機能性表示食品の対象者

「疾病に罹患していない者（未成年者、妊産婦（妊娠を計画している者を含む。）及び授乳婦を除く。）」を対象とすること。

なお、「疾病に罹患していない者」とは、境界域までの者をいう。例えば、診断基準で軽症以上と判定される者は該当しない。

具体的には、  
①・② （略）

4 機能性関与成分

機能性関与成分とは、特定の保健の目的（疾病リスクの低減に係るものを除く。）に資する成分をいう。その考え方は、以下のとおりである。

① 表示しようとする機能性に係る作用機序について、*in vitro*試験及び*in vivo*試験、又は臨床試験（ヒトを対象とする摂取試験（以下「ヒト試験」という。））により考察されているものであり、直接的又は間接的な定量確認及び定性確認が可能な成分である。

ただし、機能性の科学的根拠の一部を説明できる特定の成分が判明しているものの、当該特定の成分のみでは機能性の全てを説明することができない「エキス（基原原料を抽出し、濃縮したもの）及び分泌物」（以下「エキス等」という。）を機能性関与成分とする場合、表示しようとする機能性に係る作用機序については、少なくとも1つ以上の指標成分（機能性関与成分の同等性を確保するための指標であり、エキス等に含まれる定性確認及び定量確認が可能な特定の成分）が*in vitro*試験及び*in vivo*試験、又は臨床試験（ヒト試験）により考察されているものであり、かつ、当該指標成分についての定性確認及び定量確認、並びにエキス等全体についての定性確認を行う必要がある。

を防止する点にある。この趣旨からすれば、文言上「飲料」であるも、必ずしも最終製品が飲料の形態をとるもののみならず、アルコールを含有する飲料を使用し、アルコールが残存した固形の食品も機能性表示食品の対象とすることは望ましくない。ただし、摂取に際し、十分な加熱（煮沸等）を前提とし、アルコールの摂取につながらないことが確実な食品（例：保存性を高めるため、酒精を添加したうどん）は除く。

③ 栄養素の過剰な摂取につながる食品

「過剰な摂取」とは、食品特性も踏まえて判断されるべきものであるが、例えば、当該食品を通常の食事に付加的に摂取すること及び同種の食品に代替して摂取することにより、当該栄養素の一日当たりの摂取量が、厚生労働大臣が定める食事摂取基準（健康増進法第16条の2）で定められている目標量を上回ってしまう等、当該栄養素を必要以上に摂取するリスクが高くなる場合等をいう。

2 （略）

3 「疾病に罹患していない者（未成年者、妊産婦（妊娠を計画している者を含む。）及び授乳婦を除く。）」を対象とすること

「疾病に罹患していない者」とは、境界域までの者をいう。例えば、診断基準で軽症以上と判定される者は該当しない。

具体的には、  
①・② （略）

4 機能性関与成分

機能性関与成分とは、特定の保健の目的（疾病リスクの低減に係るものを除く。）に資する成分をいう。その考え方は、以下のとおりである。

① 表示しようとする機能性に係る作用機序について、*in vitro*試験及び*in vivo*試験、又は臨床試験により考察されているものであり、直接的又は間接的な定量確認及び定性確認が可能な成分である。

なお、エキスは単一の植物を基原としたものを対象とし、菌（原生生物を含む。）を基原とするエキス及び植物を基原とするエキスに対し菌（原生生物を含む。）による発酵等の加工を加えたものは対象外とする。

作用機序については、既存情報を収集し、評価することが基本となるが、情報収集の手法は研究レビュー（システムティックレビューをいう。以下同じ。）である必要はない。

- ② 食事摂取基準に摂取基準が策定されている栄養素を含め、食品表示基準別表第9の第1欄に掲げる成分は対象外とする。

## 5 科学的根拠

機能性表示食品に求められる科学的根拠の水準は、我が国の消費者の意向、科学的な観点等を十分に踏まえ、消費者の誤認を招くものではなく、消費者の自主的かつ合理的な食品選択に資するものである必要がある。科学的根拠は、この観点から、以下の方法で安全性及び機能性を説明されたものであることとする。具体的な手順は、「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン」（平成27年3月30日消食表第141号消費者庁食品表示企画課長通知）を参照のこと。

(1) (略)

(2) 機能性について

最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）の実施、又は最終製品若しくは機能性関与成分に関する研究レビューにより評価することが必要となる。

## 6 届出資料を作成するに当たっての留意事項

届出をしようとする者は、機能性表示食品制度届出データベース（以下「届出データベース」という。）にログインし、必要事項の入力及び資料の添付をして消費者庁長官に届け出ること。その際、次の事項に留意し、誤りのないよう記載すること。

なお、機能性表示食品として届出が公表された食品（撤回されていない食品に限る。）と同一性を失わない程度の変更が行われた食品を届け出の場合は、届出が公表された食品の届出番号が分かる資料及び当該食品と同一性を失わない程度の変更であることが分かる資料を提出すること。

また、事業者団体等の確認を経た届出資料を提出する場合は、届出資料の確認を行った事業者団体等の名称を記載し、事業者団体等が確認したことが分かる資料を提出すること。

(1) 安全性の根拠に関する情報

届出しようとする食品の安全性について、食経験及び最終製品に含有する機能性関与成分と医薬品との相互作用等の観点から、届出者の責任において自ら評価するものである。食経験の評価をまず行い、食経験に関する情報が不十分

作用機序については、既存情報を収集し、評価することが基本となるが、情報収集の手法は研究レビュー（システムティックレビューをいう。以下同じ。）である必要はない。

- ② 健康増進法第16条の2第1項の規定に基づき厚生労働大臣が定める食事摂取基準に基準が策定されている栄養素を含め、食品表示基準別表第9の第1欄に掲げる成分は対象外とする。

## 5 「科学的根拠」を有すること

機能性表示食品に求められる科学的根拠の水準は、我が国の消費者の意向、科学的な観点等を十分に踏まえ、消費者の誤認を招くものではなく、消費者の自主的かつ合理的な食品選択に資するものである必要がある。科学的根拠は、この観点から、以下の方法で安全性及び機能性を説明されたものであることとする。具体的な手順は、「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン」（平成27年3月30日消食表第141号消費者庁食品表示企画課長通知。以下「機能性届出ガイドライン」という。）を参照のこと。

(1) (略)

(2) 機能性について

最終製品を用いた臨床試験の実施、又は最終製品若しくは機能性関与成分に関する研究レビューにより評価することが必要となる。

## 6 届出資料を作成するに当たっての留意事項

届出をしようとする者は、機能性表示食品制度届出データベース（以下「届出データベース」という。）にログインし、必要事項の入力及び資料の添付をして消費者庁長官に届け出ること。その際、次の留意事項に注意し、誤りのないよう記載すること。

(1) 安全性の根拠に関する情報

届出しようとする食品の安全性について、食経験及び最終製品に含有する機能性関与成分と医薬品との相互作用等の観点から、届出者の責任において自ら評価するものである。食経験の評価をまず行い、食経験に関する情報が不十分

である場合には既存情報による安全性の評価を行う。食経験及び既存情報による安全性の評価でも不十分な場合には、安全性試験を実施して、安全性の評価を行うこととしている。

エキス等について安全性の評価を行う際には、届出をしようとする食品と安全性に関する科学的根拠を得た際に用いられた食品について、エキス等の規格の評価、パターン分析等によるエキス等の同等性の評価を行うことが必要である。また、届出をしようとする食品が、錠剤、カプセル剤形状の食品の場合には、崩壊性試験及び溶出試験による最終製品としての同等性の評価を行い、その分析結果を示す必要がある。

なお、全ての食品について、医薬品と機能性関与成分の相互作用の評価が必要であり、複数の機能性関与成分による機能を表示する場合には、機能性関与成分同士の相互作用についても評価をする必要がある。

## (2) 機能性の根拠に関する情報

機能性に関する情報として届出が必要となるものは、(i)最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）の実施又は(ii)最終製品若しくは機能性関与成分に関する研究レビューによる資料である。(i)については、その実施に当たり研究計画の事前登録が行われていること、また、結果についてはその内容を誰もが適切に評価できるよう、国際的にコンセンサスの得られた指針（以下「国際指針」という。）に基づき報告されていることが必要である。ただし、研究計画の事前登録及び報告に係る国際指針への準拠において、平成28年3月31日までに開始された研究については、省略できるものとする。また、(ii)については、恣意的な論文抽出による不適正な機能性表示を防ぐ観点から、査読付き論文（サプリメント形状の加工食品の場合は臨床試験（ヒト試験）、その他加工食品又は生鮮食品の場合は臨床試験（ヒト試験）又は観察研究）を対象とした定性的又は定量的研究レビューにより、表示しようとする機能性について「totality of evidence」（関連研究について、肯定的・否定的内容及び研究デザインを問わず検討し、総合的観点から肯定的といえるか判断）の観点から肯定的と判断できるものであり、国際指針に基づき報告されていることが必要である。平成28年3月31日までに届け出られたもののうち、(ii)が査読付き論文として公表されておらず、当該資料の記載が必ずしも国際指針に十分に準拠できていないもので、その後国際指針に準拠した資料と差し替えていないものについては、速やかに国際指針に準拠した資料と差し替えることが必要である。

なお、機能性表示食品については、主観的な指標によってのみ評価可能な機能性の表示も対象となり得るため、(i)及び(ii)のいずれにおいても主観的な指標を評価指標とすることは差し支えないが、その指標は日本人において妥当性が得られ、かつ、当該分野において学術的に広くコンセンサスが得られたものでなければならない。

またエキス等について機能性の科学的根拠を評価する際には、届出をしよう

である場合には既存情報による安全性の評価を行う。食経験及び既存情報による安全性の評価でも不十分な場合には、安全性試験を実施して、安全性の評価を行うこととしている。

なお、全ての食品について、医薬品と機能性関与成分の相互作用の評価が必要であり、複数の機能性関与成分による機能を表示する場合には、機能性関与成分同士の相互作用についても評価をする必要がある。

## (2) 機能性の根拠に関する情報

機能性に関する情報として届出が必要となるものは、(i)最終製品を用いた臨床試験の実施又は(ii)最終製品若しくは機能性関与成分に関する研究レビューによる資料である。(i)については、その実施に当たり研究計画の事前登録が行われていること、また、結果についてはその内容を誰もが適切に評価できるよう、国際的にコンセンサスの得られた指針（以下「国際指針」という。）に基づき報告されていることが必要である。ただし、研究計画の事前登録及び報告に係る国際指針への準拠については、食品表示基準の施行後1年を超えない日までに開始された研究については、省略できるものとする。また、(ii)については、恣意的な論文抽出による不適正な機能性表示を防ぐ観点から、査読付き論文（サプリメント形状の加工食品の場合は臨床試験、その他加工食品又は生鮮食品の場合は臨床試験又は観察研究）を対象とした定性的又は定量的研究レビューにより、表示しようとする機能性について「totality of evidence」（関連研究について、肯定的・否定的内容及び研究デザインを問わず検討し、総合的観点から肯定的といえるか判断）の観点から肯定的と判断できるものであり、国際指針に基づき報告されていることが必要である。ただし、(ii)が査読付き論文として公表されていない場合、食品表示基準の施行前に一定のレベル以上で実施された研究レビューを活かす観点から、当該資料の記載が必ずしも国際指針に十分に準拠できていない場合でも届け出ることができるもので、この場合、食品表示基準の施行後1年を超えない日までに国際指針に準拠した資料と差し替えることとする。

なお、機能性表示食品については、主観的な指標によってのみ評価可能な機能性の表示も対象となり得るため、(i)及び(ii)のいずれにおいても主観的な指標を評価指標とすることは差し支えないが、その指標は日本人において妥当性が得られ、かつ、当該分野において学術的に広くコンセンサスが得られたものでなければならない。

とする食品と機能性に関する科学的根拠を得た際に用いられた食品について、エキス等の規格の評価、パターン分析等によるエキス等の同等性の評価を行うことが必要である。さらに、届出をしようとする食品が、錠剤、カプセル形状の食品の場合には、崩壊性試験及び溶出試験による最終製品としての同等性の評価を行い、分析結果を示すことが必要である。なお、(ii)について、機能性に関する科学的根拠を得た際に使用されたエキス等のサンプルが入手できない等により、同等性の評価が十分行えない場合には、最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）の実施により機能性の評価を行う必要がある。

最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）又は研究レビューにおいて、実際に販売しようとする製品の試作品（製造原理等は同等だが、量産用ではなく、小ロット用の製造ラインで製造したもの等）を用いて評価を行った場合は、両者の間に同一性が失われていないことについて、届出資料中に考察されている必要がある。

(i)及び(ii)の実施者については特に定めないが、機能性表示食品の届出に用いた資料についての責任は、届出者が負うものとする。

### (3) 生産・製造及び品質の管理に関する情報

機能性表示食品の届出に当たっては、生産・製造における衛生及び品質の観点から、安全性を確保していることを説明する資料として(i)生産・製造及び品質管理の体制、及び(ii)食品中の機能性関与成分等の分析の資料が必要となる。

この項目において示した生産・製造及び品質管理の体制については、実施されていなければ、機能性の表示ができないというのではなく、実施の有無を明らかにし、消費者の食品の選択に資する情報と位置付けるものである。一方、サプリメント形状の加工食品については、適正製造規範（GMP）に基づく製品管理が強く望まれる。

なお、エキス等を機能性関与成分とする食品（食品形態が液剤の場合は除く。）の品質管理については、機能性の担保の観点から、崩壊性試験、溶出試験及び製剤均一性試験を実施し、製剤としての同等性を確認し、同等性担保の基準となる試験結果を提出すること。

機能性関与成分の分析については、原則として第三者の分析機関での成績書を届出資料に添付する。

### (4) (略)

### (5) その他必要な事項

「その他必要な事項」として届け出ることが必要な情報は以下のとおりである。

①～⑦ (略)

⑧ 届出日から60日経過後の販売状況

最終製品を用いた臨床試験又は研究レビューにおいて、実際に販売しようとする製品の試作品（製造原理等は同等だが、量産用ではなく、小ロット用の製造ラインで製造したもの等）を用いて評価を行った場合は、両者の間に同一性が失われていないことについて、届出資料中に考察されている必要がある。

(i)及び(ii)の実施者については特に定めないが、機能性表示食品の届出に用いた資料についての責任は、届出者が負うものとする。

### (3) 生産・製造及び品質の管理に関する情報

機能性表示食品の届出に当たっては、生産・製造における衛生及び品質の観点から、安全性を確保していることを説明する資料として(i)生産・製造及び品質管理の体制、(ii)食品中の機能性関与成分等の分析の資料が必要となる。

この項目において示した生産・製造及び品質管理の体制については、実施されていなければ、機能性の表示ができないというのではなく、実施の有無を明らかにし、消費者の食品の選択に資する情報と位置付けるものである。一方、サプリメント形状の加工食品については、適正製造規範（GMP）に基づく製品管理が強く望まれる。

機能性関与成分の分析については、原則として第三者の分析機関での成績書を届出資料に添付する。

### (4) (略)

### (5) その他必要な事項

「その他必要な事項」として届け出ることが必要な情報は以下のとおりである。

ア～キ (略)

(新設)

(6)・(7) (略)

第2 表示事項及び表示の方法

1 (略)

2 科学的根拠を有する機能性関与成分及び当該成分又は当該成分を含有する食品が有する機能性

(1) 可能な機能性表示の範囲は、以下のとおり。

① (略)

② 本制度では認められない表現例としては、以下のものが考えられる。

ア・イ (略)

ウ 科学的根拠に基づき説明されていない機能性に関する表現

(例) 限られた免疫指標のデータを用いて身体全体の免疫に関する機能があると誤解を招く表現、*in vitro* 試験や*in vivo* 試験で説明された根拠のみに基づいた表現、抗体や補体、免疫系の細胞などが増加するといった*in vitro* 試験や*in vivo* 試験で科学的に説明されているが、生体に作用する機能が不明確な表現 等

(2) また、機能性を表示するに当たっては、以下の点についても具体的に表示すること。

① 「届出表示」と冠し、届け出た内容を表示する。その際、当該機能性関与成分に基づく科学的根拠なのか、当該機能性関与成分を含有する食品（最終製品）に基づく科学的根拠なのか、その科学的根拠が最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）に基づくものなのか、研究レビューによるものなのかが分かる表現にする。なお、当該成分に基づく科学的根拠を有する場合は、当該食品自体に機能性があるという科学的根拠を有するものではないということが明確になる表現とする。また、研究レビューによる場合は、「報告されている」ということが明確になる表現とする。具体的な表現例は以下のとおり。

ア 最終製品を用いた臨床試験（ヒト試験）で科学的根拠を説明した場合 (略)

イ・ウ (略)

② (略)

③ 生鮮食品については、機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量に占める割合を表示してもよい。

(例) 「本品にはA（機能性関与成分）が含まれ、Aを▲mg/日摂取すると、Bの機能がある（機能性）ことが報告されています。本品を○個食べると機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量の△%を摂取できます。」

※ △については、二日当たりの機能性関与成分の量の50%以上の値

(6)・(7) (略)

第2 表示事項及び表示の方法

1 (略)

2 科学的根拠を有する機能性関与成分及び当該成分又は当該成分を含有する食品が有する機能性

(1) 可能な機能性表示の範囲は、以下のとおり。

① (略)

② 本制度では認められない表現例としては、以下のものが考えられる。

ア・イ (略)

ウ 科学的根拠に基づき説明されていない機能性に関する表現

(例) 限られた免疫指標のデータを用いて身体全体の免疫に関する機能があると誤解を招く表現、*in vitro* 試験や動物を用いた*in vivo* 試験で説明された根拠のみに基づいた表現、抗体や補体、免疫系の細胞などが増加するといった*in vitro* 試験や*in vivo* 試験で科学的に説明されているが、生体に作用する機能が不明確な表現 等

(2) また、機能性を表示するに当たっては、以下の点についても具体的に表示すること。

① 「届出表示」と冠し、届け出た内容を表示する。その際、当該機能性関与成分に基づく科学的根拠なのか、当該機能性関与成分を含有する食品（最終製品）に基づく科学的根拠なのか、その科学的根拠が最終製品を用いた臨床試験に基づくものなのか、研究レビューによるものなのかが分かる表現にする。なお、当該成分に基づく科学的根拠を有する場合は、当該食品自体に機能性があるという科学的根拠を有するものではないということが明確になる表現とする。また、研究レビューによる場合は、「報告されている」ということが明確になる表現とする。具体的な表現例は以下のとおり。

ア 最終製品を用いた臨床試験で科学的根拠を説明した場合 (略)

イ・ウ (略)

② (略)

③ 生鮮食品については、機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量に占める割合を表示してもよい。

(例) 「本品にはA（機能性関与成分）が含まれ、Aを▲mg/日摂取すると、Bの機能がある（機能性）ことが報告されています。本品を○個食べると機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量の△%を摂取できます。」

※ △については、一日当たりの機能性関与成分の量の50%以上の値

### 3 一日当たりの摂取目安量当たりの機能性関与成分の含有量

消費期限又は賞味期限（生鮮食品の場合は販売期間）を通じて含有する値を食品表示基準別記様式2又は別記様式3の次（枠外）に、「機能成分関与成分」である旨を冠し、一定の値又は下限値及び上限値により表示する（例：機能性関与成分 ○○（機能性関与成分名） △△g）。

また、エキス等を機能性関与成分とする場合は、基原について消費者が理解しやすい名称を用い、含有する指標成分の値を表示する（例：機能性関与成分 ●●（エキス名）（■ ■（指標成分名）として▲▲mg、★ ★（指標成分名）として◆◆mg））。

なお、当該一定の値にあつては分析値がこれを下回らないもの、当該下限値及び上限値にあつては分析値がこの範囲内でなければならない。

生鮮食品や単一の農林水産物のみを原材料とした加工食品（例えば、乾しいたけ、煮干、押麦、ストレートジュース、緑茶）においては、含有量にばらつきが生じることがあり得る。そのため、ばらつきを生じさせない対策をとることが望まれるが、どうしても表示値を下回る可能性がある場合は、「○○（機能性関与成分）の含有量が一定の範囲内に収まるよう、栽培・出荷等の管理を実施しています。しかし、△△は生鮮食品ですので、○○（ばらつきの要因）などによって、○○（機能性関与成分）の含有量が、表示されている量を下回る場合があります。」等の注意書きを付すものとする。

### 4 一日当たりの摂取目安量

「一日当たりの摂取目安量」と冠し、消費者庁長官に届け出た内容を表示する。その際、「一日摂取目安量」と簡略して表示すること、「一日当たり○gを目安にお召し上がりください。」等の文章で表示することを可能とする。

なお、生鮮食品においては、1個、1切れといった表示をする場合、個体差があり一定しないことも考えられるため、グラム表示を併記してもよい。また、表示しようとする機能性について、機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量に占める割合を記載する場合は、「○個（機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量の△%を摂取できます。）」と表示する必要がある。

※ △については、二日当たりの機能性関与成分の量の50%以上の値

5～7 （略）

### 8 摂取をする上での注意事項

摂取をする上での注意事項である旨を冠し、医薬品等との飲合せ、過剰摂取を防止するための注意喚起等を表示する。なお、文字のフォントを大きくする、四角で囲む、色を付ける等、他の表示事項よりも目立つよう表示することが望ましい。

9・10 （略）

### 3 一日当たりの摂取目安量当たりの機能性関与成分の含有量

消費期限又は賞味期限（生鮮食品の場合は販売期間）を通じて含有する値を別記様式2又は別記様式3の次（枠外）に、「機能成分関与成分」である旨を冠し、一定の値又は下限値及び上限値により表示する（例：機能性関与成分 ○○（機能性関与成分名） △△g）。なお、当該一定の値にあつては分析値がこれを下回らないもの、当該下限値及び上限値にあつては分析値がこの範囲内でなければならない。

なお、生鮮食品や単一の農林水産物のみを原材料とした加工食品（例えば、乾しいたけ、煮干、押麦、ストレートジュース、緑茶）においては、含有量にばらつきが生じることがあり得る。そのため、ばらつきを生じさせない対策をとることが望まれるが、どうしても表示値を下回る可能性がある場合は、「○○（機能性関与成分）の含有量が一定の範囲内に収まるよう、栽培・出荷等の管理を実施しています。しかし、△△は生鮮食品ですので、○○（ばらつきの要因）などによって、○○（機能性関与成分）の含有量が、表示されている量を下回る場合があります。」等の注意書きを付すものとする。

### 4 一日当たりの摂取目安量

「一日当たりの摂取目安量」と冠し、消費者庁長官に届け出た内容を表示する。その際、「一日摂取目安量」と簡略して表示すること、「一日当たり○gを目安にお召し上がりください。」等の文章で表示することを可能とする。

なお、生鮮食品においては、1個、1切れといった表示をする場合、個体差があり一定しないことも考えられるため、グラム表示を併記してもよい。また、表示しようとする機能性について、機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量に占める割合を記載する場合は、「○個（機能性が報告されている一日当たりの機能性関与成分の量の△%を摂取できます。）」と表示する必要がある。

※ △については、一日当たりの機能性関与成分の量の50%以上の値

5～7 （略）

### 8 摂取をする上での注意事項

摂取をする上での注意事項である旨を冠し、医薬品等との飲合せ、過剰摂取を防止するための注意喚起等を表示する。なお、文字のフォントを大きくする、四角で囲む、色を付ける等、他の表示事項よりも目立つよう表示することが望ましい。

9・10 （略）

第3 表示が禁止される表現等表示に当たっての留意事項

1～3 (略)

4 食品表示基準別表第9の第1欄に掲げる栄養成分の機能を示す用語  
(略)

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 (略)

別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

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 96 well及び384 well)  
.....16

2.1.1.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well及び384 well) .....17

第3 表示が禁止される表現等表示に当たっての留意事項

1～3 (略)

4 別表第9の第1欄に掲げる栄養成分の機能を示す用語  
(略)

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 (略)

別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

(新設)



2.1.1.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7900HT 96 well及び384 well) .....	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 (QuantStudio 5) .....	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 (QuantStudio 5) .....	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 (QuantStudio 12K Flex) .....	25
2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K 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) .....	27
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 96 well及び384 well)	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 (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.....	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
.....	102
2.6.3.3.1. PCR用反応液の調製.....	103
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

(略)

1.1.1.1. ・1.1.1.2. (略)

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  
(略)

1.1.2. パパイアの検体採取

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。

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

(略)

1.1.1.1. ・1.1.1.2. (略)

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。

大豆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。）検体採取については、1.1.1.1. の袋積みの場合に従う。

それ以外の加工食品  
(略)

1.1.2. パパイアの検体採取

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。

1.1.2.1. (略)

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。

(削除)

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として判定された場合、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 (4 0-3-2) (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 (E

1.1.2.1. (略)

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 (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

\*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ELISA及び定量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として判定された場合、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にて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ともにリアルタイム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 (4 0-3-2) (以下、「RRS」という。)が唯一のものであったが、2002年に承認されている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 (E

vent 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。

### (削除)

#### 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を行う。本法においては、標準物質として標準プラスミドDNA溶液<sup>1</sup>を使用する。標準プラスミドDNA溶液に含まれるDNAの量はコピー数として規定されており、そのため、定量PCRの結果はコピー数として求められる。

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)<sup>\*2</sup>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

ean (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。)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. ELISA法

試料中のCP4EPPSPSタンパク質を検知する手法である。CP4EPPSPSタンパク質はRRSにおいて発現している為、同法では検体中のRRS混入率の定量が可能である。

100mesh (編み目の一目の長さ150µm) のふるいを通過した粉末試料0.5gを用いて、SDI社製GMO Soya Test Kit Ver.2.1の説明書に記載された手法に従って試験する。以下に方法について記述する。

試料又は標準品0.5gをポリプロピレン製遠沈管 (15ml容) に正確に量り採り、Soya Extraction 緩衝液 4.5mlを加え、ボルテックスミキサーを用い10秒間混合した後、2,500×gで15分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液 280µLに抽出液 20µL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 20µL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%であるため、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100µLずつ加え、37℃で1時間保温する。その後、Wash緩衝液で3回洗浄し、Reconstituted and Diluted Soya Conjugate Mix 100µLを加え、37℃で1時間保温する。さらに、Wash緩衝液で3回洗浄する。次に、Color Reagent 100µLを加え、室温で10分間放置した後、Stop Solution 100µL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。

#### 2.1.2. 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設計されている。また、同プローブにはリポーター、クエンチャー両色素が結合しており、DNAポリメラーゼによる増幅産物の伸長反応に伴い加水分解を受けると、蛍光を放射する。蛍光強度は、PCRサイクル数に対し指数関数的に増強し、また一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数は、鋳型DNA量に依存する。したがって、一定の蛍光強度に達したPCRサイクル数を比較することで、鋳型DNA量が求められる。

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を行う。本法においては、標準物質として標準プラスミドDNA溶液<sup>1</sup>を使用する。標準プラスミドDNA溶液に含まれるDNAの量はコピー数として規定されており、そのため、定量PCRの結果はコピー数として求められる。

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)<sup>\*2</sup>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～\*3 （略）

\*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。

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

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

PCR用反応液は25µL/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 12.5µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25µM）0.5µL、対象プローブ溶液（10µM）0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL（50ng）又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5µL、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液（ブランク試料液：NTC）2.5µL。試験は、1DNA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、

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及びRoche LightCycler® System、又は同等の性能を有する装置を用いて行う。LLS検知法及びRRS2検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）及びApplied Biosystems® 7500を用いて行う。また、使用する機種により、試薬、反応液組成、反応条件、手技並びに解析手法が異なるため、検査に際しては、以下機種ごとに記載された各項に従い、必ず使用する機種に適した方法を用いること。なお、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～\*3 （略）

\*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、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。

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

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

PCR用反応液は25µL/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 12.5µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25µmol/L）0.5µL、対象プローブ溶液（10µmol/L）0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL（50ng）又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5µL、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液（ブランク試料液：NTC）2.5µL。試験は、1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*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81µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*4</sup>の微量遠沈管に78.75µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からプレートの蓋<sup>\*5</sup>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1.25µM、対象プローブ濃度が0.5µM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・\*5 (略)

2.1.1.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700)  
(略)

2.1.1.1.3. 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

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81µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*4</sup>の微量遠沈管に78.75µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からプレートの蓋<sup>\*5</sup>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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

#### \*2 定量PCR用反応液の調製

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

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

\*4・\*5 (略)

2.1.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700)  
(略)

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

装置にプレートをセットし、装置の蓋の温度 (Cover temperature) が105°C付近になったことを確認した後、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30秒、59°C 1分を1サ

イクルとして、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 ( $\Delta Rn$ ) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、検量線用標準プラスミドDNA溶液及びDNA試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している  $\Delta Rn$ 部を選択し、Threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line はStartを3に、Endを15に設定する。Th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値 (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\*。

\* (略)

#### 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 $\mu$ 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<sup>21</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、Micro Amp® Optical Film Compression Pad<sup>22</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

イクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

#### 2.1.2.1.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700)

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

\* (略)

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

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

PCR用反応液は25 $\mu$ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社)<sup>21</sup> 12.5 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L、水9 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液2.5 $\mu$ L (50ng) 又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 $\mu$ L、若しくは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 $\mu$ L。試験は、1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する<sup>22</sup>。

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<sup>23</sup>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良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA試料液 (3ウェル分) 当たり81 $\mu$ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>24</sup>の微量遠沈管に78.75 $\mu$ Lずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 $\mu$ L加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 $\mu$ L/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う<sup>25</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレート

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

**\*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20µL/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 10µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µM) 0.4µL、対象プローブ溶液 (10µM) 0.4µL、水7.2µL、20ng/µL DNA試料液2µL (40ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2µL\*2、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2µL。試験は、1DNA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。

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** 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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

**\*2** 定量PCR用反応液の調製

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

**\*3** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

**\*4** 分注必要数

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

**\*5** 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (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。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。

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

PCR用反応液は20µL/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 10µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.4µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.4µL、水7.2µL、20ng/µL DNA試料液2µL (40ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2µL\*2、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2µL。試験は、1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*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<sup>\*4</sup>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66µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup>の微量遠沈管に63µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を7µL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20µL/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<sup>\*6</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

#### \*1 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 （略）

#### \*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1.25µM、対象プローブ濃度が0.5µM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・\*6 （略）

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

\*1 （略）

\*2 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定

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<sup>\*4</sup>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良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA試料液（3ウェル分）当たり66µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup>の微量遠沈管に63µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を7µL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20µL/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<sup>\*6</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

#### \*1 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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注するときは、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

\*2 （略）

#### \*3 定量PCR用反応液の調製

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

#### \*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

\*5・\*6 （略）

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

\*1 （略）

\*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では、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)  
(略)

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

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\*。

\* (略)

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ションを用いて行う<sup>21</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、Micro Amp® Optical Film Compression Pad<sup>22</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

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。2.1.2.2.2. 項に記載したように、96ウェルを使用する場合と、384ウェルを使用する場合では、液量の違いから、コピー数が異なるため注意する。

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

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

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 (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミドDNA溶液のコピー数の対数值 (x軸) に対するCt値 (y軸) をプロットし、各Ct値に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* (略)

2.1.2.3. ABI PRISM® 7000を用いた定量PCR

2.1.2.3.1. 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。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) <sup>\*1</sup> 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5µL、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL。試験は1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*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良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA試料液 (3ウェル分) 当たり81µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*4の微量

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

**\*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。

**2.1.1.3.2.** プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)  
(略)

遠沈管に78.75µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.7  
5µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。こ  
のようにして調製した混合溶液を25µL/wellとして96ウェルプレート上のウェル  
に分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。  
このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーション  
を用いて行う<sup>55</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレート  
の縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical F  
ilm Compression Pad<sup>56</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットす  
る。

**\*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、混合が確実にされるよ  
うに注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う  
直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、  
溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、  
以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

**\*2** 定量PCR用反応液の調製

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

**\*3** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

**\*4** 分注必要数

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

**\*5** 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (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。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。

**2.1.2.3.2.** プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)  
(略)

#### 2.1.1.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

(略)

#### 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\*。

\* (略)

#### 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、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。

#### 2.1.2.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

(略)

#### 2.1.2.3.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7000)

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

\* (略)

#### 2.1.2.4. Applied Biosystems® 7500を用いた定量PCR

##### 2.1.2.4.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) \*1 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5µL、若しくは5ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL。試験は1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*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良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA試料液 (3ウェル分) 当たり81µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数\*4の微量遠沈管に78.75µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、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。

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

\* 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<sup>\*1</sup>。設定したDetectorをWell Inspectorに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。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<sup>\*2</sup>、「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA試料液）をTask欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

用いて行う<sup>\*5</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

\*1 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、混合が確実にされるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

\*2 定量PCR用反応液の調製

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

\*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

\*4 分注必要数

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

\*5 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (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。

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



#### \*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。

#### \*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、「AssignTargets 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。

#### \*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)

装置にプレートセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃30秒、59℃1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。なお、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

#### \*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。

#### \*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。

(新設)

(新設)

#### 2.1.2.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

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。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。

する。なお下降部分は100%のままで使用する。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\*。

\* (略)

#### 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 $\mu$ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes<sup>\*1</sup> 2 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ M) 0.4 $\mu$ L、対象プローブ (10  $\mu$ M) 0.4 $\mu$ L、水9.8 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub>溶液 (25mM) 2.4 $\mu$ L、10ng/ $\mu$ L DNA試料液5 $\mu$ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液5 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、若しくは5ng/ $\mu$ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 5 $\mu$ L。試験は、検量線用標準プラスミドDNA溶液、及びNTCに対し1キャピラリー、1DNA試料液に対し2キャピラリー**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<sup>\*3</sup>。

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MgCl<sub>2</sub>溶液、水並びに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液<sup>\*4</sup>を先に調製しておき、これとLC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl<sub>2</sub>溶液、水の混合液を8 : 7の比率で混合させるとよい。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 $\mu$ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup>の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及びNTCに対し18 $\mu$ L、DNA試料液に対し36 $\mu$ Lとする。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を6 $\mu$ L (検量線用標準プラスミド溶液及びNTC) 若しくは12 $\mu$ L (DNA試料液) 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合

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

内性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 ( $\Delta Rn$ ) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、検量線用標準プラスミドDNA溶液及びDNA試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している  $\Delta Rn$ 部を選択し、Threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液 (NTC) で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base LineはStartを3に、Endを15に設定する。Thと検量線用標準プラスミドDNA溶液の蛍光シグナルが交差した点をThreshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準プラスミドDNA溶液のコピー数の対数値 (x軸) に対するCt値 (y軸) をプロットし、各Ct値に対して得られた近似直線を検量線とする\*。

\* (略)

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

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

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

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MgCl<sub>2</sub>溶液、水並びに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液<sup>\*4</sup>を先に調製しておき、これとLC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl<sub>2</sub>溶液、水の混合液を8 : 7の比率で混合させるとよい。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 $\mu$ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup>の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及びNTCに対し18 $\mu$ L、DNA試料液に対し36 $\mu$ Lとする。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を6 $\mu$ L (検量線用標準プラスミド溶液及びNTC) 若しくは12 $\mu$ L (DNA試料液) 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合

溶液を20 $\mu$ L/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作\*6を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

\*1・\*2 (略)

\*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、1DNA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 $\mu$ M、対象プローブ濃度が0.5 $\mu$ M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・\*6 (略)

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

2.1.1.5.3. PCR (Roche LightCycler System)  
(略)

2.1.1.5.4. 検量線の作成 (Roche LightCycler System)  
(略)

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 (QuantStudio 5)

PCR用反応液は25 $\mu$ 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。

溶液を20 $\mu$ L/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作\*6を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

\*1・\*2 (略)

\*3 定量PCR用反応液の調製

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

また、Roche LightCycler Systemを用いた定量PCRにおいては、試験を検量線用標準プラスミドDNA溶液、及びNTCに対し1キャピラリー、1DNA試料液当たり2キャピラリー並行で行う。装置にかけられるキャピラリーの総数、及び1度の反応につき内在性遺伝子並びに組換え遺伝子の両方を測定することから、1回の測定当たり測定可能なDNA試料液の最大数は5となる。

\*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

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

\*5・\*6 (略)

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

2.1.2.5.3. PCR (Roche LightCycler System)  
(略)

2.1.2.5.4. 検量線の作成 (Roche LightCycler System)  
(略)

2.1.2.6. その他のリアルタイムPCR装置を用いた定量PCR

その他のリアルタイムPCR装置 [例えば、QuantStudio® 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific社)、QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System 96well (Thermo Fisher Scientific社)、LightCycler® 96 (Roche Diagnostics社) 及びLightCycler® 480 96well (Roche Diagnostics社)] については、「2.1.2.2. ABI PRISM® 7900HT 96well及び384wellを用いた定量PCR」と同じ条件で定量PCRを実施できる。ただし、PCR用反応液の調整は96wellのものに限る。また、LightCycler® 96及びLightCycler® 480 96 wellのPCR用反応液の調整には、TaqMan® Universal PCR Master Mixの代わりにEagle Taq Master Mix (Rox) (Roche Diagn

\* 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、測定の初期設定、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。

2.1.1.6.3. PCR (QuantStudio 5)

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃30秒、59℃1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。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 (QuantStudio 5)

ostics社) を用いる。

(新設)

(新設)

(新設)

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. QuantStudio12K Flexを用いた定量PCR

(新設)

##### 2.1.1.7.1. PCR用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)

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 (QuantStudio 12K 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、測定の初期設定、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。

\*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。

2.1.1.7.4. 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

(新設)

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

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1500×g、2分間スピンドウンする。

\* 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ウェルプレートを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25µL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

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ターを用いて行う\*。最後に、プレート遠心機で1500g、2分間スピンドウンす

(新設)

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℃、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。

(略)

#### 2.1.3. 結果の判定

1 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)。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150µm) のふるいを通過した粉末試料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\*0.5gをポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に正確に量り採り、Soya Extraction 緩衝液 4.5mLを加え、ボルテックスミキサーを用い10秒間混合した後、2,500×gで15分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液 280µLに抽出液 20µL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 20µL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100µLずつ加え、37°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100µLを加え、37°Cで1時間保温する。さらに、希釈済洗浄バ

#### 2.1.3. 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Ct値を求め、内標遺伝子及び組換え遺伝子につき、それぞれの検量線から各3ウェル\*とも内在性遺伝子のコピー数を内挿し、それにより得られる値の平均を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。次に次式に従って、対象遺伝子組換え食品含有率を求める。

(略)

#### 2.1.4. 結果の判定

3試料につき各1回の抽出を行い、ELISA法又は定量PCR法により得られたRRSの含有率にLLSの含有率とRRS2の含有率を加えた値が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。

(新設)

ッファーで3回洗浄する。次に、発色液100μLを加え、室温で10分間放置した後、反応停止液100μL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425μm）のふるいを通過した粉末試料20～50g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×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℃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×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20μLと洗浄バッファー液980μL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100μLを分取し、洗浄バッファー液400μL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50μL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50μL加え、20～30秒間プレートを回転させ内容を混合する。プレートにパラフィルムをかぶせ、室温（18～27℃）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300μLで4回洗浄する。次に、Substrate 100μLを加え、20～30秒間プレートを回転させ内容を混合する。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 100μL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600～650nm）、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 (略)

### 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  
(略)

\*1 (略)

\*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 TGAAATGAACTCCT-3')] 及び P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCT-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-Taqは、他のプローブの半分の濃度 (終濃度 : 0.1 $\mu$ M) 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. (略)

### 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が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. トウモロコシ 穀粒の検査法 (略)

### 2.2.1. 定量PCR法

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、2.1.3. 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  
(略)

\*1 (略)

\*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 TGAAATGAACTCCT-3')] 及び P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCT-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-Taqは、他のプローブの半分の濃度 (終濃度 : 0.1 $\mu$ mol/L) で使用するため、反応液の調製の際には留意する (定量機器にRoche LightCycler Systemを用いる場合には、これに当たらず、他のプローブと同濃度で使用する)。

2.2.1.2. (略)

### 2.2.1.3. 結果の判定

3試料につき、各1回の抽出を行い、得られたDNA試料液について 定量PCR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がGA21、MIR604、MIR162の含有率を加えた値が4.5%を越える場合は、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 (SSIIb) 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。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 $\Delta Cq$ 法にて行う。 $\Delta Cq$ 法は、内在性遺伝子における $Cq$ 値<sup>\*1</sup>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。 $\Delta Cq$ 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 $\Delta Cq$ 値は低くなる。得られた分析試料の $\Delta Cq$ 値が、判定基準となる標準試料の $\Delta Cq$ 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 $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 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<sup>\*2</sup>から抽出したDNA溶液 (20ng/ $\mu$ L) を用い、分析試料と同時に測定する。

\*1・\*2 (略)

#### 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 $\mu$ 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) <sup>\*1</sup>、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 $\mu$ M) <sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50 $\mu$ M) <sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50 $\mu$ M) <sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50 $\mu$ M) <sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50 $\mu$ M) <sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50 $\mu$ M) <sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 $\mu$ M) <sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10 $\mu$ M) <sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10 $\mu$ M) <sup>\*7</sup>、水、20ng/ $\mu$ 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、1DNA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<sup>\*8</sup>。

混合溶液用	必要量	
	1ウェル当たり ( $\mu$ L)	1DNA試料当たり ( $\mu$ L)
FastStart Universal PM (ROX)	5	17

### 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 (SSIIb) 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。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 $\Delta Cq$ 法にて行う。 $\Delta Cq$ 法は、内在性遺伝子における $Cq$ 値<sup>\*1</sup>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。 $\Delta Cq$ 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 $\Delta Cq$ 値は低くなる。得られた分析試料の $\Delta Cq$ 値が、判定基準となる標準試料の $\Delta Cq$ 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 $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 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%以上であ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<sup>\*2</sup>から抽出したDNA溶液 (20ng/ $\mu$ L) を用い、分析試料と同時に測定する。

\*1・\*2 (略)

#### 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用反応液の調整 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

PCR用反応液は10 $\mu$ 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) <sup>\*1</sup> 5 $\mu$ L、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.016 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.016 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.05 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.05 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.06 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.06 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 $\mu$ mol/L) 0.08 $\mu$ L<sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10 $\mu$ mol/L) 0.1 $\mu$ L<sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10 $\mu$ mol/L) 0.12 $\mu$ L<sup>\*7</sup>、水3.448 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液1 $\mu$ L又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 1 $\mu$ L。試験は、1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する<sup>\*8</sup>。

50 μM SSIb 3-5'	0.016	0.05
50 μM SSIb 3-3'	0.016	0.05
10 μM SSIb-TaqV	0.08	0.27
50 μM P35S 1-5'	0.05	0.17
50 μM P35S 1-3'	0.05	0.17
10 μM P35S-Taq	0.1	0.34
50 μM NOS ter 3-5'	0.06	0.20
50 μM NOS ter 2-3'	0.06	0.20
10 μM NOS-Taq	0.12	0.41
水	3.448	11.74
20 ng/μL 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、1DNA試料液（3ウェル分）当たり34μL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<sup>\*9</sup>の微量遠沈管に30.6μLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を3.4μL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10μL/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<sup>\*10</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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<sup>\*11</sup>。

\*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。

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。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液<sup>\*9</sup>を先に調製しておき、これとFastStart Universal Probe Master (Rox)を1:1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA試料液（3ウェル分）当たり34μLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*10</sup>の微量遠沈管に30.6μLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を3.4μL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10μL/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<sup>\*11</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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<sup>\*12</sup>。

\*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注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

\*2 SSIb 3-5' 及びSSIb 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 (25μM) 0.032μL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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'  
代わりに対象プライマー対としてP35S-1 (25μM) 0.1μLを用いてもよい。

\*4~\*7 (略)

\*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。

(削除)

\*9 分注必要数  
(略)

\*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  
(略)

\*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

2.2.2.1.2. ~2.2.2.1.4. (略)

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<sup>\*1,2</sup>。

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 (25μmol/L) 0.032μL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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'  
代わりに対象プライマー対としてP35S-1 (25μmol/L) 0.1μLを用いてもよい。

\*4~\*7 (略)

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

\*9 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液  
SSIIb 3-5' 0.2μmol/L、SSIIb 3-3' 0.2μmol/L、P35S 1-5' 0.625μmol/L、P35S 1-3' 0.625μmol/L、NOS ter 3-5' 0.75μmol/L、NOS ter 2-3' 0.75μmol/L、SSIIb-TaqV 0.2μmol/L、P35S-Taq 0.25μmol/L、NOS-Taq 0.3μmol/Lとなるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、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。

\*10 分注必要数  
(略)

\*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  
(略)

\*12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

2.2.2.1.2. ~2.2.2.1.4. (略)

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用反応液の調整 (LightCycler® 96及びLightCycler® 480)  
PCR用反応液は10μL/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) <sup>\*1</sup> 5μL、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50μmol/L) 0.016μL<sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50μmol/L) 0.016μL<sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50μmol/L) 0.05μL<sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50μmol/L) 0.05μL<sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50μmol/L) 0.06μL<sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50μmol/L) 0.06μL<sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10μmol/L) 0.08μL<sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10μmol/L) 0.1μL<sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10μmol/L) 0.12μL<sup>\*7</sup>、水3.448μL、20ng/μL DNA試料液1μL又は

蒸留水（ブランク試料液：NTC）1μL。試験は、1DNA試料液当たり3ウェル並行で行うものとし、PCR用反応液は3ウェル分を同時に調製する\*8。

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。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液\*9を先に調製しておき、これとFastStart Universal Probe Master (Rox)を1：1.25の比率で混合させると良い。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA試料液（3ウェル分）当たり34μL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\*10の微量遠沈管に30.6μLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を3.4μL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10μL/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\*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。

(削除)

\*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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

(削除)

\*2 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 (25μmol/L) 0.032μLを用いてもよい。

(削除)

\*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' -ATGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

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

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

(削除)

\*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' -CGCTATATTTGTTTCTATCGCGT-3'

(削除)

\*5 SSIIb-TaqV

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

\*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  
(略)

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

2.2.2.2.2. ~ 2.2.2.2.4. (略)

### 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 $\Delta Cq$ 値を比較して行う。すなわち、分析試料の $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 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 $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 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して判定する。混入率が5%以上である可能性があるとして判定された場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

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

\*9 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 $\mu$ mol/L、SSIIb 3-3' 0.2 $\mu$ mol/L、P35S 1-5' 0.625 $\mu$ mol/L、P35S 1-3' 0.625 $\mu$ mol/L、NOS ter 3-5' 0.75 $\mu$ mol/L、NOS ter 2-3' 0.75 $\mu$ mol/L、SSIIb-TaqV 0.2 $\mu$ mol/L、P35S-Taq 0.25 $\mu$ mol/L、NOS-Taq 0.3 $\mu$ mol/Lとなるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、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。

\*10 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。

\*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  
(略)

(新設)

2.2.2.2.2. ~ 2.2.2.2.4. (略)

### 2.2.2.3. 結果の判定

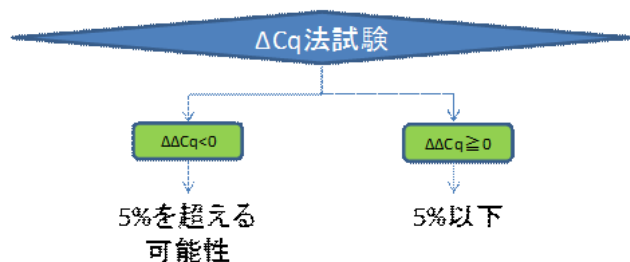
混入率が5%を超える可能性があるかどうかの判定は、分析試料と標準試料の $\Delta Cq$ 値を比較して行う。すなわち、分析試料の $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 値以上である場合 [ $\Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{標準試料}) \geq 0$ ]、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は5%以下であると判定し、分析試料の $\Delta Cq$ 値が標準試料の $\Delta Cq$ 値より小さい場合 [ $\Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{標準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

$$\Delta Cq = Cq^*(P355+TNOS) - Cq^*(SSIIb)$$

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



\*Cq値は3ウェルの平均値を用いる

2.2.3. 穀粒単位検査法  
(略)

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  
(略)

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。

(新設)

2.2.3. 穀粒単位検査法  
(略)

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  
(略)

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) \*1を1反応液 (全量10μL) 当たり5μL用いる。

\*1 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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。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.～2.2.3.1.4. (略)

#### 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

(略)

##### 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

(略)

##### 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<sup>\*1</sup> 12.5μL、対象プライマー対としてP35S-1<sup>\*2</sup> (25μM) 0.5μL、NOS ter-2<sup>\*2</sup> (25μM) 0.5μL、対象プローブとしてP35S-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μM) 0.25μL、NOS-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μM) 0.25μL、DirectAce qPCR Mix付属50×ROX Passive Reference溶液0.5μLを混合し、水で22.5μL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2.5μLずつ添加し、全量で25μLにする<sup>\*4</sup>。

対照反応：1ウェル当たりDirectAce qPCR Mix No ROX<sup>\*1</sup> 12.5μL、対象プライマー対としてIPC-1<sup>\*2</sup> (25μM) 0.5μL、SSIIb-3<sup>\*2</sup> (25μM) 0.5μL、対象プローブとしてIPC-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μM) 0.25μL、SSIIb-TaqHB<sup>\*3</sup> (10μM) 0.25μL、IPC用プラスミド溶液<sup>\*5</sup> 1μL、DirectAce qPCR Mix付属50×ROX Passive Reference溶液0.5μLを混合し、水で22.5μL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2.5μLずつ添加し、全量で25μLにする<sup>\*4</sup>。

Applied Biosystems® 7500を使用する場合は、50×ROX Passive Reference溶液の添加量を0.05μLにする。分注操作終了後、真上からシールし<sup>\*6</sup>、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<sup>\*7</sup>。

2.2.3.1.2.～2.2.3.1.4. (略)

#### 2.2.3.2. 結果の判定

2.2.3.1.4. 項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と判断する。

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

(略)

##### 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

(略)

##### 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<sup>\*1</sup> 12.5μL、対象プライマー対としてP35S-1<sup>\*2</sup> (25μmol/L) 0.5μL、NOS ter-2<sup>\*2</sup> (25μmol/L) 0.5μL、対象プローブとしてP35S-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μmol/L) 0.25μL、NOS-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μmol/L) 0.25μL、DirectAce qPCR Mix付属50×ROX Passive Reference溶液0.5μLを混合し、水で22.5μL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2.5μLずつ添加し、全量で25μLにする<sup>\*4</sup>。

対照反応：1ウェル当たりDirectAce qPCR Mix No ROX<sup>\*1</sup> 12.5μL、対象プライマー対としてIPC-1<sup>\*2</sup> (25μmol/L) 0.5μL、SSIIb-3<sup>\*2</sup> (25μmol/L) 0.5μL、対象プローブとしてIPC-TaqFB<sup>\*3</sup> (10μmol/L) 0.25μL、SSIIb-TaqHB<sup>\*3</sup> (10μmol/L) 0.25μL、IPC用プラスミド溶液<sup>\*5</sup> 1μL、DirectAce qPCR Mix付属50×ROX Passive Reference溶液0.5μLを混合し、水で22.5μL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2.5μLずつ添加し、全量で25μLにする<sup>\*4</sup>。

Applied Biosystems® 7500を使用する場合は、50×ROX Passive Reference溶液の添加量を0.05μLにする。分注操作終了後、真上からシールし<sup>\*6</sup>、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<sup>\*7</sup>。

\*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～\*7 (略)

#### 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、「AssignTargets 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。

\* (略)

#### 2.2.4.1.3. 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

\*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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

\*2～\*7 (略)

#### 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、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。

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。

次に検体の配置と種類を指定する。検体の種類はTask欄に「Unknown」を指定する。

\* (略)

#### 2.2.4.1.3. 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。95℃で10分間加温した後、95℃ 15秒間、65℃ 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%のままで使用する。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C<sub>q</sub>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

は以下のとおりである。95℃で10分間加温した後、95℃ 15秒間、65℃ 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。

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。

#### 2.2.4.1.4. 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C<sub>t</sub>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ていたと判定する。

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

2.2.4.1.4. 項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

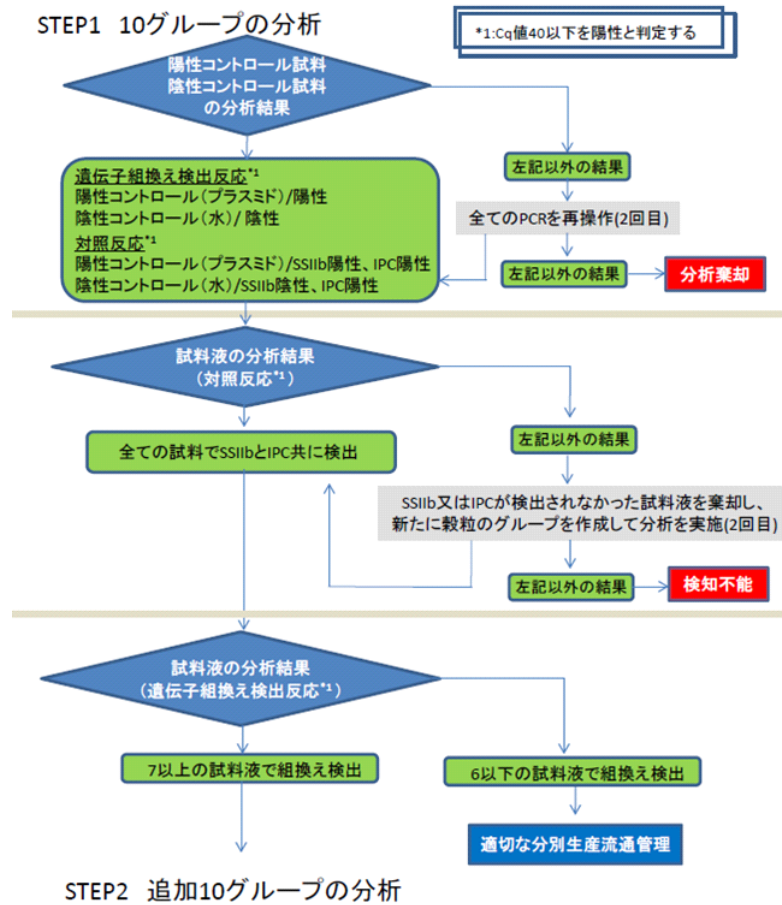
われたと判断する。

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。

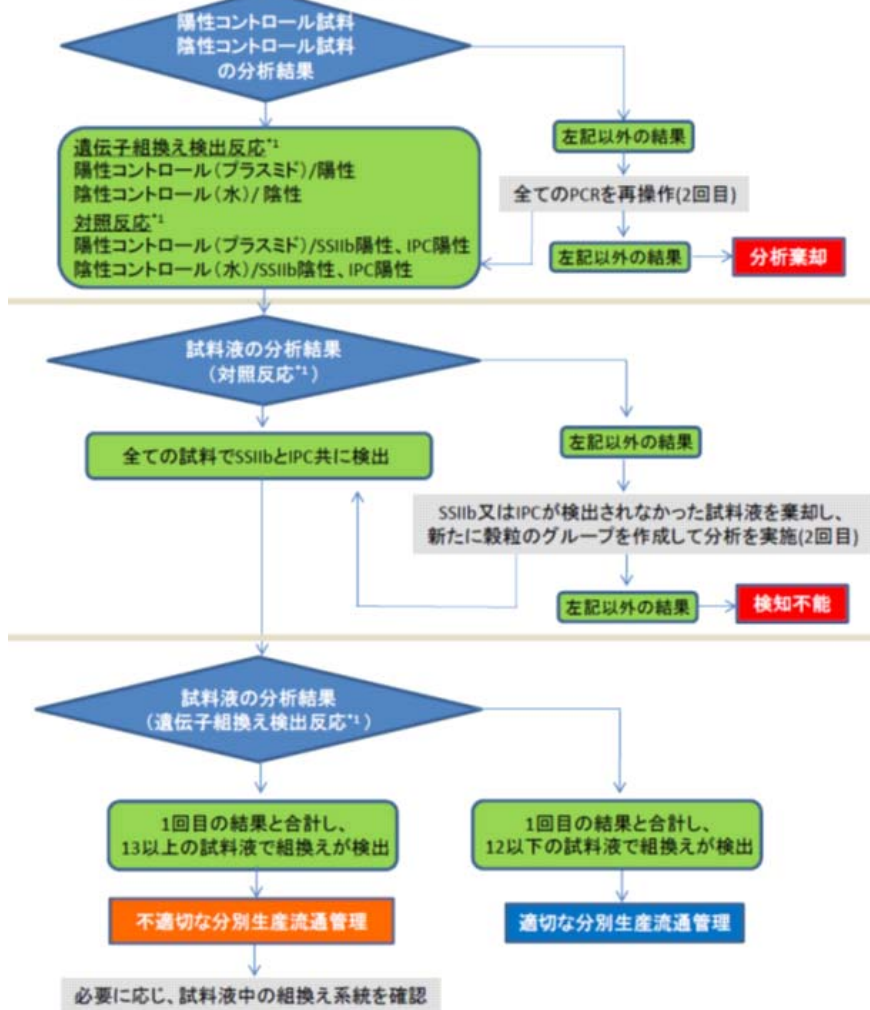
断する。遺伝子組換え穀粒を含むグループが7グループ以上で、2回目を行った場合は、1回目と2回目の総和20グループにおける遺伝子組換えの検出が12以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。1回目と2回目の総和20グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが13以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

図2 グループ検査法試験結果の判定スキーム



(新設)

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）  
（略）

（新設）

2.2.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）  
（略）

#### 2.2.4.2.1. リアルタイムPCR

反応液は1ウェル当たり10 $\mu$ L/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<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) \*1 5 $\mu$ L、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 $\mu$ M、プローブ1 $\mu$ M) 2 $\mu$ L、水2 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液、陽性コントロールDNA試料液\*3、又は5ng/ $\mu$ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液) 1 $\mu$ L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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前に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 $\mu$ M、対象プローブ濃度が1 $\mu$ M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。

(略)

\*3~\*7 (略)

2.2.4.2.2. ~2.2.4.2.4. (略)

#### 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り、同等性が確認された装置も用いることができる。

#### 2.2.4.2.1. リアルタイムPCR

反応液は1ウェル当たり10 $\mu$ L/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<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) \*1 5 $\mu$ L、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 $\mu$ mol/L、プローブ1 $\mu$ mol/L) 2 $\mu$ L、水2 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液、陽性コントロールDNA試料液\*3、又は5ng/ $\mu$ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液) 1 $\mu$ L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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

##### \*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 $\mu$ mol/L、対象プローブ濃度が1 $\mu$ mol/Lとなるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

各プライマー対の塩基配列は以下のとおりとする。

(略)

\*3~\*7 (略)

2.2.4.2.2. ~2.2.4.2.4. (略)

#### 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、2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。

\*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。

(略)

\*2 最終頁に掲載した「検査方法の同等性確認方法」ののによって、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25µL/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 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µM) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µM) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng) \*2又は滅菌水 (ブランク試料液: NTC) 2.5µL \*3。分注操作終了後、真上からプレートの蓋<sup>24</sup>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 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 (略)

2.3.1.2. (略)

\* RoundupReady Soybean (40-3-2) (以下、RRS) 及びLiberty Link Soybean (Event A 2704-12) (以下、LLS) 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。

(略)

(新設)

### 2.3.1. ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700を用いた定性試験

#### 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 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液: NTC) 2.5µL \*2。分注操作終了後、真上からプレートの蓋<sup>23</sup>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試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2ウェル並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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

(新設)

\*2 定量PCR用反応液の調製

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

\*3 (略)

2.3.1.2. (略)



#### 2.3.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700)

装置にプレートを設定し、装置の蓋の温度 (cover temperature) が105℃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℃ 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。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C<sub>q</sub>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、 $\Delta Rn$ 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<sub>q</sub>値が得られるか否かを解析する。

#### 2.3.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700)

装置にプレートを設定し、装置の蓋の温度 (cover temperature) が105℃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℃、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、40サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

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

遺伝子組換えダイズ検知試験2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とC<sub>t</sub>値の確認、及び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、 $\Delta Rn$ 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<sub>t</sub>値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

- (1) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれかで2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。
- (2) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。
- (3) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験のうち一方で2ウェル並行全てで38未満のC<sub>t</sub>値が得られず、もう一方で2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合、又は遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えダイズ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えダイズ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目

## 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25µL/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<sup>\*1</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad<sup>\*2</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。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。

(削除)

(削除)

<sup>\*1</sup> 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション  
(略)

<sup>\*2</sup> MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

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

PCR用反応液は20µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。

視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、ダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで38未満のCt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」以降の操作を行い、それでもダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで38未満のCt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。

## 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25µL/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) <sup>\*1</sup> 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL<sup>\*2</sup>。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う<sup>\*3</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad<sup>\*4</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験2試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2ウェル並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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

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

<sup>\*3</sup> 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  
(略)

<sup>\*4</sup> MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

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

PCR用反応液は20µL/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 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ M) 0.4 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ M) 0.4 $\mu$ L、水6.7 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液2.5 $\mu$ L (50ng) \*2、又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 $\mu$ L \*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/ $\mu$ Lに満たない場合は、原液を2.5 $\mu$ 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 (略)

2.3.2.3.・2.3.2.4. (略)

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C<sub>q</sub>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、 $\Delta$ Rn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<sub>q</sub>値が得られるか否かを解析する。

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) \*1 10 $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 $\mu$ mol/L) 0.4 $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10 $\mu$ mol/L) 0.4 $\mu$ L、水7.2 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液2 $\mu$ L (40ng)、又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2 $\mu$ L \*2。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 \*3。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試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2ウェル並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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

(新設)

\*2 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。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されない<sup>1</sup>ので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法 (通常、ふきとめと呼ばれる操作) を理解して使用すること。

\*3 (略)

2.3.2.3.・2.3.2.4. (略)

2.3.2.5. 測定結果の解析と判定 (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とC<sub>t</sub>値の確認、及び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、 $\Delta$ Rn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<sub>t</sub>値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果

### 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25µL/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<sup>\*1</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad<sup>\*2</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。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。

の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれかで2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験のうち一方で2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られず、もう一方で2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合、又は遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えダイズ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えダイズ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、ダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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」以降の操作を行い、それでもダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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。

### 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25µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TagMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) <sup>\*1</sup> 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL<sup>\*2</sup>。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う<sup>\*3</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad<sup>\*4</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験2試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2ウェル並行して行うものとする。

(削除)

(削除)

\*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  
(略)

\*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

2.3.3.2.・2.3.3.3. (略)

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。

\*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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

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

\*3 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  
(略)

\*4 MicroAmp® Optical Film Compression Pad  
(略)

2.3.3.2.・2.3.3.3. (略)

2.3.3.4. 測定結果の解析と判定 (ABI PRISM® 7000)

遺伝子組換えダイズ検知試験2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とCt値の確認、及び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、 $\Delta R_n$ のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる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Ct値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれかで2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝

子組換えダイズ検知試験2試験のうち一方で2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られず、もう一方で2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合、又は遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えダイズ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えダイズ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、ダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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」以降の操作を行い、それでもダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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。

#### 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25µL/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<sup>\*</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。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。

(削除)

(削除)

#### 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

PCR用反応液は25µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) \*1 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25µmol/L) 0.5µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.5µL、水9µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL (50ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5µL\*2。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う<sup>\*3</sup>。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。DNA試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験2試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2ウェル並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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

##### \*2 定性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。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法（通

\* 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  
(略)

#### 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℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 30秒、59℃ 1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、RUN Modeを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。

常、ふきとめと呼ばれる操作) を理解して使用すること。

\*3 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  
(略)

#### 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、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 (「Standard」：検量線用標準プラスミドDNA溶液、「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良い。

#### 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℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 30秒、59℃ 1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、RUN Modeを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。

#### 2.3.4.4. 測定結果の解析と判定 (Applied Biosystems® 7500)

遺伝子組換えダイズ検知試験2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とCt値の確認、及び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、 $\Delta Rn$ 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Ct値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果

### 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 $\mu$ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC- FastStart DNA Master Hybridization Probes<sup>\*1</sup> 2 $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 $\mu$ M）0.4 $\mu$ L、対象プローブ（10 $\mu$ M）0.4 $\mu$ L、水12.3 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub>溶液（25mM）2.4 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液2.5 $\mu$ L（50ng）<sup>\*2</sup>又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 $\mu$ L<sup>\*3</sup>。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作<sup>\*3</sup>を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。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 （略）

\*2 DNA試料液の濃度が20ng/ $\mu$ Lに満たない場合は、原液を2.5 $\mu$ L使用する。

の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれかで2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) ダイズ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験のうち一方で2ウェル並行全てで43未満のCt値が得られず、もう一方で2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合、又は遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えダイズ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えダイズ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、ダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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」以降の操作を行い、それでもダイズ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt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。

### 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 $\mu$ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC- FastStart DNA Master Hybridization Probes<sup>\*1</sup> 2 $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 $\mu$ mol/L）0.4 $\mu$ L、対象プローブ（10 $\mu$ mol/L）0.4 $\mu$ L、水9.8 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub>溶液（25mM）2.4 $\mu$ L、10ng/ $\mu$ L DNA試料液5 $\mu$ L（50ng）又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）5 $\mu$ L<sup>\*2</sup>。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作<sup>\*3</sup>を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。DNA試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験2試験及びダイズ陽性対照試験をそれぞれ2キャピラリー並行して行うものとする。

\*1 （略）

（新設）



\*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 (略)

2.3.5.2. (略)

2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカラーセルをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95℃、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℃ 15秒、59℃ 30秒 (1℃ /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℃ 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・\*2 (略)

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 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。

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

\*3 (略)

2.3.5.2. (略)

2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカラーセルをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95℃、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℃ 15秒、59℃ 30秒 (1℃ /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℃ 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・\*2 (略)

2.3.5.4. 測定結果の解析と判定 (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。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2キャピラリー) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) ダイズ陽性対照試験にて2並行全てで48未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれかで2並行全てで48未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) ダイズ陽性対照試験にて2並行全てで48未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2並行全てで48未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) ダイズ陽性対照試験にて2並行全てで48未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えダイズ検知試験2試験のうち一方で2並行全てで48未満のCt値が得られず、もう一方で2並行全てで一致した結果が得られない場合、又は遺伝子組換えダイズ検知試験2試験いずれも2並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えダイズ陰性と判定する。なお、上記判定により

### 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

遺伝子組換えダイズ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、ダイズ陽性対照試験にて少なくとも一方のキャピラリーで48未満のCt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」以降の操作を行い、それでもダイズ陽性対照試験にて少なくとも一方のキャピラリーで48未満のCt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。

（新設）

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)

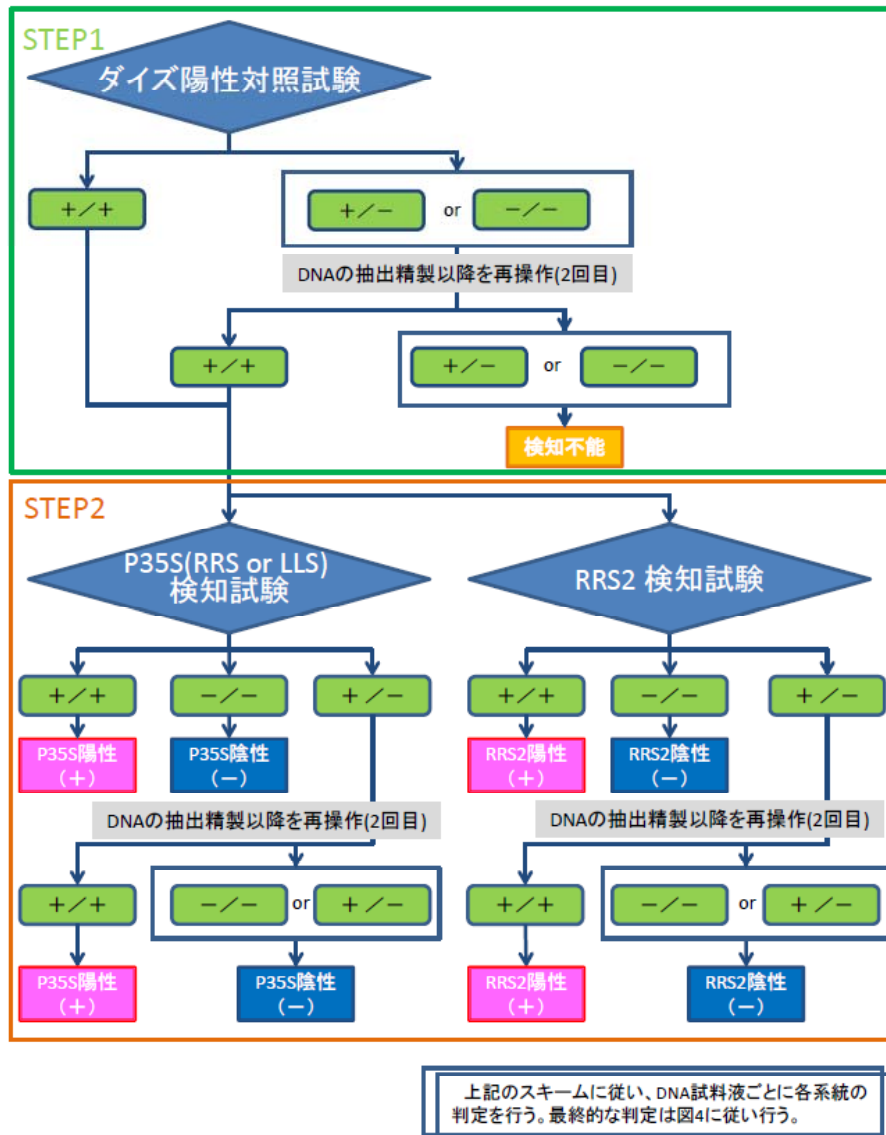


図4 2併行抽出試験結果の判定スキーム(ダイズ)



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		RR52	
	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<sup>\*1</sup>) 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<sup>\*2</sup>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」ののっとり、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10µL/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) <sup>\*1</sup> 5µL、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50µM) 0.016µL<sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50µM) 0.016µL<sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50µM) 0.05µL<sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50µM) 0.05µL<sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50µM) 0.06µL<sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50µM) 0.06µL<sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10µM) 0.08µL<sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10µM) 0.1µL<sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10µM) 0.12µL<sup>\*7</sup>、水1.948µL、20ng/µL DNA試料液2.5µL<sup>\*8</sup>又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 2.5µL<sup>\*9</sup>。試験は、1DNA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<sup>\*10</sup>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<sup>\*11</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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<sup>\*12</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

## 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<sup>\*1</sup>) 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。

\* 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。

(新設)

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

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

PCR用反応液は10µL/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) <sup>\*1</sup> 5µL、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50µmol/L) 0.016µL<sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50µmol/L) 0.016µL<sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50µmol/L) 0.05µL<sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50µmol/L) 0.05µL<sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50µmol/L) 0.06µL<sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50µmol/L) 0.06µL<sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10µmol/L) 0.08µL<sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10µmol/L) 0.1µL<sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10µmol/L) 0.12µL<sup>\*7</sup>、水3.448µL、20ng/µL DNA試料液1µL又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 1µL<sup>\*8</sup>。試験は、1DNA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<sup>\*9</sup>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<sup>\*10</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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<sup>\*11</sup>を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

\*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、遠心機でスピンドアウンして、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 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' -GATCAGCTTTGGGTCGGA-3'

代わりに対象プライマー対としてSSIIb-3 (25 $\mu$ M) 0.032 $\mu$ L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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

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

\*4~\*7 (略)

\*8 DNA試料液の濃度が20ng/ $\mu$ Lに満たない場合は、原液を2.5 $\mu$ L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

SSIIb 3-5' 0.2 $\mu$ M、SSIIb 3-3' 0.2 $\mu$ M、P35S 1-5' 0.625 $\mu$ M、P35S 1-3' 0.625 $\mu$ M、NOS ter 3-5' 0.75 $\mu$ M、NOS ter 2-3' 0.75 $\mu$ M、SSIIb-TaqV 0.2 $\mu$ M、P35S-Taq 0.25 $\mu$ M、NOS-Taq 0.3 $\mu$ M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・\*12 (略)

2.4.1.2.・2.4.1.3. (略)

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

\*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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

\*2 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' -GATCAGCTTTGGGTCGGA-3'

代わりに対象プライマー対としてSSIIb-3 (25 $\mu$ mol/L) 0.032 $\mu$ L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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対としてP35S-1 (25 $\mu$ mol/L) 0.1 $\mu$ Lを用いてもよい。

\*4~\*7 (略)

(新設)

\*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。

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

\*9 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 $\mu$ mol/L、SSIIb 3-3' 0.2 $\mu$ mol/L、P35S 1-5' 0.625 $\mu$ mol/L、P35S 1-3' 0.625 $\mu$ mol/L、NOS ter 3-5' 0.75 $\mu$ mol/L、NOS ter 2-3' 0.75 $\mu$ mol/L、SSIIb-TaqV 0.2 $\mu$ mol/L、P35S-Taq 0.25 $\mu$ mol/L、NOS-Taq 0.3 $\mu$ mol/Lとなるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

\*10・\*11 (略)

2.4.1.2.・2.4.1.3. (略)

2.4.1.4. 測定結果の解析と判定 (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とCt値の確認、及び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

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、 $\Delta Rn$ 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。

#### 2.4.2. 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<sup>\*1</sup> (LightCycler® 96及びLightCycler® 480)

PCR用反応液は10 $\mu$ 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) <sup>\*2</sup> 5 $\mu$ L、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 $\mu$ M) 0.016 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、SSIIb 3-3' (50 $\mu$ M) 0.016 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、P35S 1-5' (50 $\mu$ M) 0.05 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、P35S 1-3' (50 $\mu$ M) 0.05 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、NOS ter 3-5' (50 $\mu$ M) 0.06 $\mu$ L<sup>\*5</sup>、NOS ter 2-3' (50 $\mu$ M) 0.06 $\mu$ L<sup>\*5</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 $\mu$ M) 0.08 $\mu$ L<sup>\*6</sup>、P35S-Taq (10 $\mu$ M) 0.1 $\mu$ L<sup>\*7</sup>、NOS-Taq (10 $\mu$ M) 0.12 $\mu$ L<sup>\*8</sup>、水1.948 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液2.5 $\mu$ L<sup>\*9</sup>又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 $\mu$ L。試験は、1DNA試

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、 $\Delta Rn$ 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Ct値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで38未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで38未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCt値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えトウモロコシ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えトウモロコシ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、トウモロコシ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで38未満のCt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」以降の操作を行い、それでもトウモロコシ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで38未満のCt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。

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

##### 2.4.2.1. PCR用反応液の調整 (LightCycler® 96及びLightCycler® 480)

PCR用反応液は10 $\mu$ 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) <sup>\*1</sup> 5 $\mu$ L、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.016 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、SSIIb 3-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.016 $\mu$ L<sup>\*2</sup>、P35S 1-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.05 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、P35S 1-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.05 $\mu$ L<sup>\*3</sup>、NOS ter 3-5' (50 $\mu$ mol/L) 0.06 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、NOS ter 2-3' (50 $\mu$ mol/L) 0.06 $\mu$ L<sup>\*4</sup>、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 $\mu$ mol/L) 0.08 $\mu$ L<sup>\*5</sup>、P35S-Taq (10 $\mu$ mol/L) 0.1 $\mu$ L<sup>\*6</sup>、NOS-Taq (10 $\mu$ mol/L) 0.12 $\mu$ L<sup>\*7</sup>、水3.448 $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L DNA試料液1 $\mu$ L又は蒸留水 (ブラン

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<sup>\*10</sup>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<sup>\*11</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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、遠心機でスピンドアウンして、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 $\mu$ M) 0.032 $\mu$ 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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

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

#### \*5~\*8 (略)

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

(削除)

#### \*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 $\mu$ M、SSIIb 3-3' 0.2 $\mu$ M、P35S 1-5' 0.625 $\mu$ M、P35S 1-3' 0.625 $\mu$ M、NOS ter 3-5' 0.75 $\mu$ M、NOS ter 2-3' 0.75 $\mu$ M、SSIIb-TaqV 0.2 $\mu$ M、P35S-Taq 0.25 $\mu$ M、NOS-Taq 0.3 $\mu$ M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。

ク試料液 : NTC) 1 $\mu$ L<sup>\*8</sup>。試験は、1DNA試料液当たり2ウェル並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<sup>\*9</sup>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<sup>\*10</sup>し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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。

#### (新設)

#### \*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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

#### \*2 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 $\mu$ mol/L) 0.032 $\mu$ L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' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対としてP35S-1 (25 $\mu$ mol/L) 0.1 $\mu$ Lを用いてもよい。

#### \*4~\*7 (略)

#### (新設)

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

#### \*9 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 $\mu$ mol/L、SSIIb 3-3' 0.2 $\mu$ mol/L、P35S 1-5' 0.625 $\mu$ mol/L、P35S 1-3' 0.625 $\mu$ mol/L、NOS ter 3-5' 0.75 $\mu$ mol/L、NOS ter 2-3' 0.75 $\mu$ mol/L、SSIIb-TaqV 0.2 $\mu$ mol/L、P35S-Taq 0.25 $\mu$ mol/L、NOS-Taq 0.3 $\mu$ mol/Lとなるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。



\*11 (略)

2.4.2.2.・2.4.2.3. (略)

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

\*10 (略)

2.4.2.2.・2.4.2.3. (略)

2.4.2.4. 測定結果の解析と判定 (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とCq値の確認をもって行う。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

(1) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCq値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで38未満のCq値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCq値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで38未満のCq値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。

(3) トウモロコシ陽性対照試験にて2ウェル並行全てで38未満のCq値が得られ、かつ遺伝子組換えトウモロコシ検知試験にて2ウェル並行全てで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

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陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えトウモロコシ陰性と判定する。なお、上記判定により遺伝子組換えトウモロコシ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAM又はVICの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAM又はVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、トウモロコシ陽性対照試験にて少なくとも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」以降の操作を行い、それでもトウモロコシ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで38未満のCq値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

(新設)

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。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)

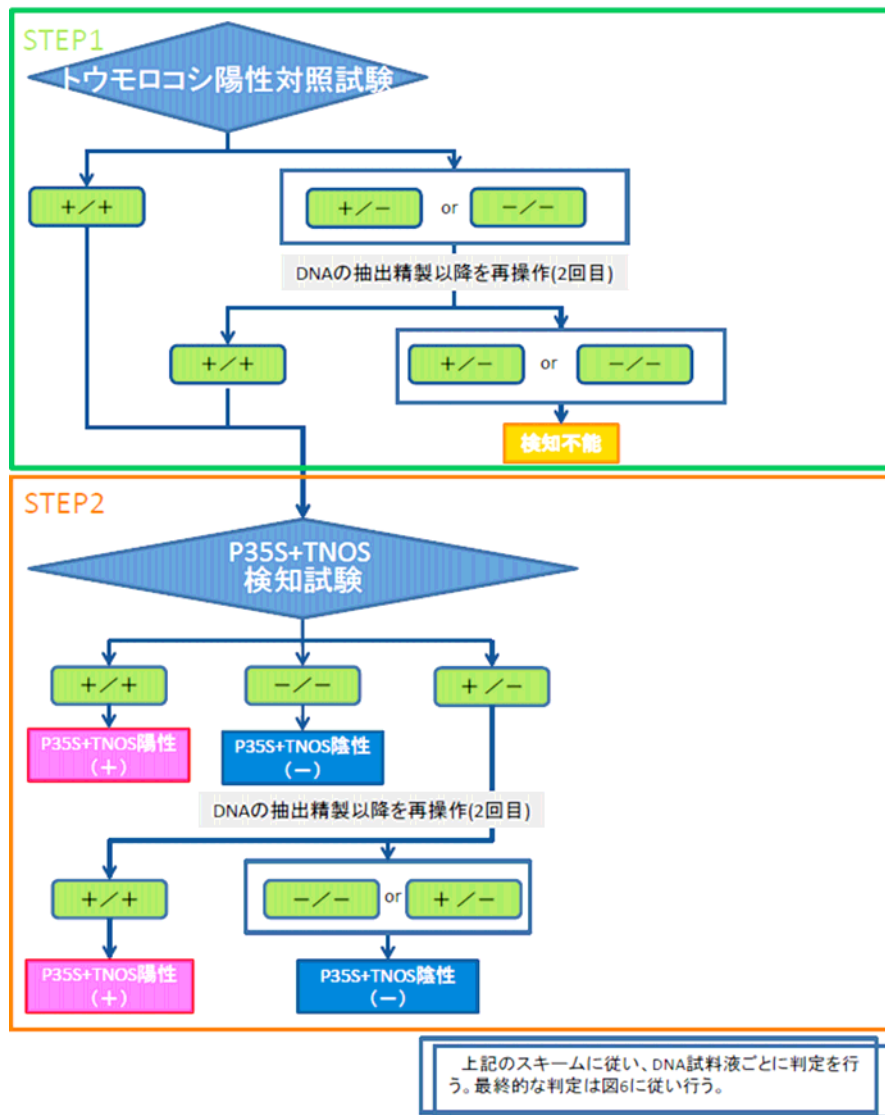
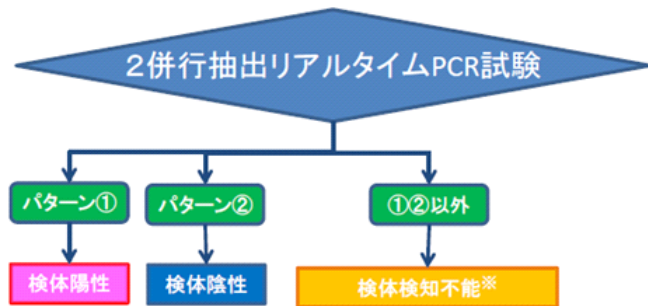


図6 2併行抽出試験結果の判定スキーム(トウモロコシ)



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

2.5. ダイズ及びトウモロコシからのDNA抽出精製法

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17MΩ・cmまで精製した超純水など、DNA、DNase等がコンタミネーションしていないものを用いること。

#### 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 (略)

##### 2.5.1.1. CTAB法

均質に粉碎された試料 2gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、CTAB緩衝液<sup>\*1</sup>15mLを入れ、ホモジナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモジナイザーの先を洗浄するようにCTAB緩衝液 30mLを加え、転倒混和後55°Cで30分間放置する<sup>\*2</sup>。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液600μLをマイクロ遠沈管 (1.5mL容) に量り採る。次いで500μLのフェノール/クロロホルム混合液<sup>\*3</sup>を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×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<sup>\*4</sup> 500μL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。500μL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。50μLのTE緩衝液<sup>\*5</sup>を加えてよく混和後、室温に15分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5μLを加え、37°Cで30分間放置する。200μLのCTAB緩衝液を加えた後、250μL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。200μL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、200μL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。50μLの水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液<sup>\*6</sup>とする。

##### \*1 CTAB緩衝液

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

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17MΩ/cmまで精製した超純水など、DNA、DNase等がコンタミネーションしていないものを用いること。

#### 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 (略)

##### 2.5.1.1. CTAB法

均質に粉碎された試料 2gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、CTAB緩衝液<sup>\*1</sup>15mLを入れ、ホモジナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモジナイザーの先を洗浄するようにCTAB緩衝液 30mLを加え、転倒混和後55°Cで30分間放置する<sup>\*2</sup>。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液600μLをマイクロ遠沈管 (1.5mL容) に量り採る。次いで500μLのフェノール/クロロホルム混合液<sup>\*3</sup>を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温遠心後、水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層に触れないように注意する。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液<sup>\*4</sup> 500μLを加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温で遠心後、水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール (室温) を加え、転倒混和後7,500×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。500μL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。50μLのTE緩衝液<sup>\*5</sup>を加えてよく混和後、室温に15分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5μLを加え、37°Cで30分間放置する。200μLのCTAB緩衝液を加えた後、250μL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。200μLのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7,500×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、200μL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。50μLの水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液<sup>\*6</sup>とする。

##### \*1 CTAB緩衝液

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

AB緩衝液とする。

\*2 (略)

\*3 フェノール/クロロホルム混合液

1M 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 (略)

\*5 TE緩衝液

各最終濃度が10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM 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 (略)

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)

均質に粉碎した試料2gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup>10mLとRNase A 20µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで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<sup>\*2</sup> 3, 250µLを加え、氷上に10分間静置した後、4, 000×g以上、4°Cの条件で20分間遠心する<sup>\*3</sup>。次いで、その上清 500µLをQIAshredder spin columnに負荷し、10, 000×g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15mL容) に移す。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<sup>\*4</sup>を加える。その混合液500µLをmini spin columnに負荷し、10, 000×g以上で1分間<sup>\*5</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500µLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が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<sup>\*6</sup> 500µLを負荷し、10, 000×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×g以上で20分間遠心する。mini spin columnを新しい2mL遠沈管に移し、あらかじめ65°Cに温めておいた水70µLを加え、5分間静置した後、10, 000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液<sup>\*7</sup>とする。

\*1~\*7 (略)

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)

均質に粉碎した試料 1gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 10mLとRNase A 20µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間5、6回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。スイング式遠心分離機を使用し、3, 000×g、室温の条件で10分間遠心後、その上清7mLを、ポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に移す。P3緩衝液<sup>\*2</sup> 2, 500µLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間激し

したものをCTAB緩衝液とする。

\*2 (略)

\*3 フェノール/クロロホルム混合液

1mol/L 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 (略)

\*5 TE緩衝液

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

\*6 (略)

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)

均質に粉碎した試料2gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup>10mLとRNase A 20µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで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<sup>\*2</sup> 3, 250µLを加え、氷上に10分間静置した後、4, 000×g以上、4°Cの条件で20分間遠心する<sup>\*3</sup>。次いでその上清 500µLをQIAshredder spin columnに負荷し、10, 000×g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15mL容) に移す。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<sup>\*4</sup>を加える。その混合液500µLをmini spin columnに負荷し、10, 000×g以上で1分間<sup>\*5</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500µLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が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<sup>\*6</sup> 500µLを負荷し、10, 000×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×g以上で20分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ65°Cに温めておいた水70µLを加え、5分間静置した後、10, 000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液<sup>\*7</sup>とする。

\*1~\*7 (略)

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)

均質に粉碎した試料 1gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 10mLとRNase A 20µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間5、6回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。スイング式遠心分離機を使用し、3, 000×g、室温の条件で10分間遠心後、その上清7mLを、ポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に移す。P3緩衝液<sup>\*2</sup> 2, 500µLを加え、ボルテックスミキサーで10秒間激し

く攪拌する。氷上に15分間静置後、スイング式遠心機で3,000×g以上、室温の条件で35分間遠心する<sup>\*3</sup>。得られた上清のうち8mLを新しい15mLチューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、500μLをQIAshredder spin columnに負荷し、10,000×g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管（15mL容）に移す。その溶出液の1.5倍量のAW1緩衝液<sup>\*4</sup>を加える。混合液 500μLをmini spin columnに負荷し、10,000×g以上で1分間<sup>\*5</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500μLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が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<sup>\*6</sup> 500μLを負荷し、10,000×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×g以上で20分間遠心する。mini spin columnを新しい2mL遠沈管に移し、あらかじめ65℃に温めておいた水70μLを加え、5分間静置した後、10,000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液<sup>\*7</sup>とする。

\*1～\*7 (略)

2.5.1.4.・2.5.1.5. (略)

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

均質に粉碎した試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL容）に量り採り、抽出用緩衝液<sup>\*1</sup> 17.2mL、5M グアニジン-塩酸2mL及び20mg/mL Proteinase Kを0.8mL加え、激しくボルテックスミキサーで攪拌後、55～60℃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×gで10分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマイクロ遠沈管（1.5mL容）に移し、さらに14,000×gで10分間遠心する。得られた澄明な上清500μLと、DNA Clean-up Resin 1mLをマイクロ遠沈管（1.5mL容）に採り、転倒混和し、混合液とする。次にmini columnの上部に注射筒を付け、マニホールド（吸引装置）に装着する。マニホールドのコックを閉じ、吸引装置内部が十分に減圧になっていることを確認した後、混合液を注射筒からmini columnに負荷する。直ちにコックを開け、最速で減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで2mLの80%イソプロ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（1.5mL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（1.5mL容）に移し、あらかじめ65～70℃に温めておいた水100μLを滴下する<sup>\*2</sup>。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

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

く攪拌する。氷上に15分間静置後、スイング式遠心機で3,000×g以上、室温の条件で35分間遠心する<sup>\*3</sup>。得られた上清のうち8mLを新しい15mLチューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、500μLをQIAshredder spin columnに負荷し、10,000×g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管（15mL容）に移す。その溶出液の1.5倍量のAW1緩衝液<sup>\*4</sup>を加える。混合液 500μLをmini spin columnに負荷し、10,000×g以上で1分間<sup>\*5</sup>遠心する。残りの混合液のうち、さらに500μLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が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<sup>\*6</sup> 500μLを負荷し、10,000×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×g以上で20分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ65℃に温めておいた水70μLを加え、5分間静置した後、10,000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液<sup>\*7</sup>とする。

\*1～\*7 (略)

2.5.1.4.・2.5.1.5. (略)

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

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

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

\*2 (略)

### 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1g)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2g)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, RRS 2) 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、120mg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。

\*2 (略)

### 2.5.2. 加工食品からのDNAの抽出精製

食品表示基準第3条第2項に規定する別表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。

**試料**の粉碎に用いる粉碎器には、水分を含む**試料**に適した粉碎器と、乾燥**試料**に適した粉碎器があるので、**試料**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。更に望ましくは、滅菌できるものが良い。粉碎容器、カッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーはDNAを分解するので使用してはならない。

2.5.2.1. **項**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、1g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」、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」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2g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. **試料前処理**

##### 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, RRS 2) 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

**試料**1パック(又は水分を含む**試料**に適した粉碎器に入る量)を水分を含む**試料**に適した粉碎器に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加え粉碎する。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、120mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

##### ①-2 油揚げ

**試料**1パック(又は水分を含む**試料**に適した粉碎器に入る量)を水分を含む**試料**に適した粉碎器に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加え粉碎する。均



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、200mg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碎器に入る量）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碎器に移し粉碎する。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、200mg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碎器に入る量）分を、水分を含む検体に適した粉碎器に採り、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、100mg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碎器に移し粉碎する。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、150mg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、120mg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、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

\*（略）

## 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、50μLを採取する。石英砂を加える必要はない。

## ⑤ みそ

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、200mg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 凍豆腐、おから及びゆば

### ②-1 凍豆腐

試料に試料重量の10倍量の滅菌水を加え、10分後に水分を含む試料に適した粉碎器に移し粉碎する。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、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

### ②-2 おから

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）分を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、100mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

### ②-3 ゆば

試料に試料重量の5倍量の滅菌水を加え、20分後に水分を含む試料に適した粉碎器に移し粉碎する。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、150mg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試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

\*（略）

## ④ 豆乳類

試料をよく振って混合したものを直接、抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、50μL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、200mg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**に適した粉砕器に入る量）を水分を含む**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、200mg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、200mg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、100mg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、100mg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 (略)

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、100mg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

**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉砕器に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉砕器に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質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、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑥ 大豆煮豆

**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉砕器に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉砕器に採り粉砕する。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、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑦ 大豆缶詰及び大豆瓶詰

**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉砕器に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉砕器に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質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、200mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑧ きな粉

**試料**をそのまま抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、100mg採取し、Proteinase K処理を行う。

⑨ 大豆いり豆

**試料**1パックを乾燥**試料**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、100mg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 (略)

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、**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉砕器に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉砕器に採り、乾燥した**試料**では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む**試料**についてはそのまま粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、100mg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、**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適

した粉碎器に入る量)を、水分を含む検体に適した粉碎器に採り、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、100mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑫ (略)

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、250mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑬-2 (略)

⑭・⑮ (略)

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、検体の2倍の重さ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、300mg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、検体の2倍の重さ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、400mg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、300mg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、検体の3倍の重さの滅菌水を加えて粉碎する。均質

した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、100mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑫ (略)

⑬ 大豆たん**白**を主な原材料とするもの

⑬-1 魚肉ソーセージ

試料1パック (又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、250mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

⑬-2 (略)

⑭・⑮ (略)

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

試料1パック (又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の2倍の重さ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、300mgを採取する。

①-2 コーンパフ

試料1パック (又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の2倍の重さ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、400mgを採取する。

② コーンスターチ

試料をそのまま抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、300mgを採取する。

③ ポップコーン

試料1パック (又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の3倍の重さ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、300mg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**に適した粉碎机に入る量）を、水分を含む**検体**に適した粉碎机に採り、**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、100mg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**に適した粉碎机に入る量）を、水分を含む**検体**に適した粉碎机に採り、**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、100mg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**に適した粉碎机に入る量）を、水分を含む**検体**に適した粉碎机に採り、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碎する。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、200mgを採取する。

#### ⑦・⑧ （略）

#### 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**に適した粉碎机に入る量）を、水分を含む**検体**に適した粉碎机に採り、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碎する。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、200mg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)

均質に粉碎した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50mL容）に量り採り、あらかじめ65℃に温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 10mLとRNase A 20μLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65℃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。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7mL採取し、新しい15mL（又は50mL）容チューブに移す。チューブに、P3緩衝液\*

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、300mgを採取する。

#### ④ 冷凍とうもろこし

**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉碎机に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉碎机に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質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、100mg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、**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉碎机に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉碎机に採り、**試料**重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質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、100mg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、**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉碎机に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉碎机に採り、乾燥した**試料**では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む**試料**についてはそのまま粉碎する。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、200mgを採取する。

#### ⑦・⑧ （略）

#### 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。**試料**1パック（又は水分を含む**試料**に適した粉碎机に入る量）を水分を含む**試料**に適した粉碎机に採り、乾燥した**試料**では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む**試料**についてはそのまま粉碎する。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、200mg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)

均質に粉碎した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50mL容）に量り採り、あらかじめ65℃に温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 10mLとRNase A 20μLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65℃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。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g<sup>で</sup>、室温で10分間遠心分離する。マイクロ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7mL採取し、新しい15mL（又は50mL）容チューブに移す。チューブに、P3緩衝

<sup>2</sup> 2.5mL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、 $3,000 \times g$ 、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8mL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、 $3,000 \times g$ 、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7.5mL採取し、上清を新しい50mL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6.8mLを採取し、新しい50mLチューブに移す。AW1緩衝液<sup>\*3</sup> 10.2mL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、 $3,000 \times g$ 、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<sup>\*4</sup> 12mLを加え、スイング式遠心分離器を使用し、 $3,000 \times g$ 、室温で15分間遠心分離する。カラムを新しい50mLチューブに移し、あらかじめ65℃に温めておいた水1mL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、 $3,000 \times g$ 、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、2mL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、 $12,000 \times g$ で4℃、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール500μL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、 $12,000 \times g$ で4℃、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50μL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、 $12,000 \times g$ 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・\*4 (略)

(削除)

液<sup>\*2</sup> 2.5mL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、 $3,000 \times g$ で室温で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8mL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、 $3,000 \times g$ で室温で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7.5mL採取し、上清を新しい50mL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6.8mLを採取し、新しい50mLチューブに移す。AW1緩衝液<sup>\*3</sup> 10.2mL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、 $3,000 \times g$ で室温で15分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムにAW2緩衝液<sup>\*4</sup> 12mLを加え、スイング式遠心分離器を使用し、 $3,000 \times g$ で室温で15分間遠心分離する。カラムを新しい50mLチューブに移し、あらかじめ65℃に温めておいた水1mL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、 $3,000 \times g$ で室温で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、2mL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、 $12,000 \times g$ で4℃、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール500μL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、 $12,000 \times g$ で4℃、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100μLを加え、沈殿物を溶解させる<sup>\*5</sup>。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、 $12,000 \times g$ 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 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用いる。

\*3・\*4 (略)

\*5 希釈量

抽出されるDNA量によって、適宜、希釈量を変更する。ダイズ種子においては水100μL、トウモロコシ及びトウモロコシ加工食品においては、水50μLで行うと良い。

#### 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 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 5mLとRNase A 10µL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<sup>\*2</sup> 1.8mL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4.2mL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4mL採取し、上清を新しい50mL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3.4mLを採取し、新しい50mLチューブに移す。AW1緩衝液<sup>\*3</sup> 5.1mL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<sup>\*4</sup> 12mL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、2mL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500µL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50µL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。

PCRに必要な濃度のDNA溶液が得られなかった場合は、以下の対策を行う。

① 得られたDNA溶液を、エタノール沈殿等を行い濃縮する。

② 最初からDNA抽出をやり直し、DNAの融解に用いる水を20µLにする。

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

#### 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 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液<sup>\*1</sup> 5mLとRNase A 10µL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<sup>\*2</sup> 1.8mL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で室温で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4.2mL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で、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4mL採取し、上清を新しい50mL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3.4mLを採取し、新しい50mLチューブに移す。AW1緩衝液<sup>\*3</sup> 5.1mL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で室温で5分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムにAW2緩衝液<sup>\*4</sup> 12mLを加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×gで室温で15分間遠心分離する。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で室温で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、2mL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500µL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、TE緩衝液 (pH 8.0) 100µL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用いる。

\*3・\*4 (略)

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<sup>\*1</sup> 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°C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°C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<sup>\*2</sup> 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<sup>\*3</sup> 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°Cに温めておいたQF 緩衝液<sup>\*4</sup> 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°C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°C、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°C、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°C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°C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°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~\*4 (略)

\*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用いる。

\*3・\*4 (略)

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<sup>\*1</sup> 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°C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で4°C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<sup>\*2</sup> 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<sup>\*3</sup> 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°Cに温めておいたQF 緩衝液<sup>\*4</sup> 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°C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°C、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°C、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°C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°C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°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~\*4 (略)

#### 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<sup>\*1,2</sup>、石英砂少々、CTAB抽出液<sup>\*3</sup> 2mLを加え、磨砕して、1.5mLチューブへ移す<sup>\*4</sup>。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<sup>\*5</sup>。上清約700μL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<sup>\*6</sup>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<sup>\*7</sup>、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<sup>\*8</sup>、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800μL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<sup>\*9</sup>、5分間真空乾燥<sup>\*10</sup>する。TE 100μl、RNase A (10mg/mL) 2μL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400μLを加える。CIA 500μL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<sup>\*8</sup>、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<sup>\*9</sup>、5分間減圧乾燥<sup>\*11</sup>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<sup>\*11,12</sup>。

\*1・\*2 (略)

\*3 CTAB抽出液: 100mM Tris-HCl、20mM EDTA、1.4M 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~\*12 (略)

#### 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 (略)

#### 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 (略)

\*1・\*2 (略)

\*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20mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM EDTA、400mM 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・\*6 (略)

#### 2.5.5. グループ検査のためのDNA試料液調製 (略)

#### 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<sup>\*1,2</sup>、石英砂少々、CTAB抽出液<sup>\*3</sup> 2mLを加え、磨砕して、1.5mLチューブへ移す<sup>\*4</sup>。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<sup>\*5</sup>。上清約700μL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<sup>\*6</sup>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<sup>\*7</sup>、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ピルアルコールを加え<sup>\*8</sup>、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800μL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<sup>\*9</sup>、5分間真空乾燥<sup>\*10</sup>する。TE 100μl、RNase A (10mg/mL) 2μL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400μLを加える。CIA 500μL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ピルアルコールを加え<sup>\*8</sup>、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<sup>\*9</sup>、5分間減圧乾燥<sup>\*11</sup>する。滅菌水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<sup>\*11,12</sup>。

\*1・\*2 (略)

\*3 CTAB抽出液: 0.1mol/L Tris-HCl、0.02mol/L EDTA、1.4mol/L NaCl、2% CTA B、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~\*12 (略)

#### 2.5.3. DNA試料原液中のDNAの純度の確認及びDNA試料液の調製と保存 (略)

#### 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 (略)

\*1・\*2 (略)

\*3 48ウェルユニプレート (Whatman) 又は同等品を用いる。

\*4 組織溶解液の組成は20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、5mmol/L EDTA、400mmol/L 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・\*6 (略)

#### 2.5.5. グループ検査のためのDNA試料液調製 (略)



\*1 トウモロコシ穀粒20粒と組織溶解液20mLを密封した状態で粉砕・混合できるものを使用する。

\*2・\*3 (略)

\*4 組織溶解液の組成は20mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM EDTA、400mM 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 (略)

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)  
(略)

\*1~\*3 (略)

\*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、「×g」が最大となるように遠心条件を設定する。

\*5・\*6 (略)

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砕器等\*で十分に粉砕し、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、アルカリ洗剤に一晚浸け置きする。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。

\*1 トウモロコシ穀粒20粒と組織溶解液20mLを密封した状態で粉砕・混合できるフードミルを使用する。マルチプレックスリアルタイムPCRにおける内在性遺伝子のCt値が、岩谷産業社製ミルサーIFM-800DGを使用した場合と同等であることを確認して使用する。

\*2・\*3 (略)

\*4 組織溶解液の組成は20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、5mmol/L EDTA、400mmol/L 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 (略)

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)  
(略)

\*1~\*3 (略)

\*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、gが最大となるように遠心条件を設定する。

\*5・\*6 (略)

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砕器等\*で十分に粉砕し、均質混和して調整試料とする。
- ・検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、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、粉砕用器具\*、容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晚浸け置きする。又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 (Iwatani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

(略)

### 2.6.2.1. 実験操作

あらかじめ、200mMリン酸緩衝液 (pH7.0) \*1を1ウェル当たり50μL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×12) である。

生鮮パパイヤ果実を縦半分に切り、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200mM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えた後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去する。続いて、基質溶液\*5を1ウェル当たり50μL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50μL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 200mMリン酸緩衝液 (pH7.0)

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

\*2～\*4 (略)

\*5 基質溶液

X-Gluc溶液\*7が最終濃度1mMとなるように、200mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で調製した溶液を基質溶液とする。基質溶液調製時には、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、均一な溶液として調製する。なお、基質溶液は、必ず試験に供する胚全てを採取し終えた後に調製し、一試験ごと<sup>ゴ</sup>に使い切るものとする。

\*6～\*8 (略)

2.6.2.2. (略)

## 2.6.2. GUS試験法

(略)

### 2.6.2.1. 実験操作

あらかじめ、200mmol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) \*1を1ウェル当たり50μL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×12) である。

生鮮パパイヤ果実を縦半分に切り、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200mmol/L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えた後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去する。続いて、基質溶液\*5を1ウェル当たり50μL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50μL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 200mmol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0)

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

\*2～\*4 (略)

\*5 基質溶液

X-Gluc溶液\*7が最終濃度1mmol/Lとなるように、200mmol/L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、一試験毎<sup>毎</sup>に使い切るものとする。

\*6～\*8 (略)

2.6.2.2. (略)

### 2.6.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (略)

#### 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10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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、フードプロセッサ等で粉砕する。粉砕した試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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、フードプロセッサ等で粉砕する。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

##### ④ 乾燥製品

フードプロセッサ等で粉砕し均質にした試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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

フードプロセッサ等で粉砕し均質にした試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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100mLをメスシリンダーで量り採り、凍結乾燥用容器（500mL）に移し、傾けた状態で-80℃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<sup>\*2</sup> 30gを乳鉢に量りとりG2緩衝液<sup>\*1</sup> 20mL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（50mL）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たにG2緩衝液<sup>\*1</sup> 10mL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100g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<sup>\*2</sup> 10gを先にG2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mLを入れたポリプロピレン製遠沈管（50mL）に少しずつ

### 2.6.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (略)

#### 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、Millser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10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量りとり、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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、Millser等で粉砕する。粉砕した試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量りとり、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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、Millser等で粉砕する。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量りとり、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

##### ④ 乾燥製品

Millser等で粉砕し均質にした試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量りとり、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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

Millser等で粉砕し均質にした試料10gをポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量りとり、G2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mL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100mLをメスシリンダーで量りとり、凍結乾燥用容器（500mL）に移し、傾けた状態で-80℃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<sup>\*2</sup> 30gを乳鉢に量りとりG2緩衝液<sup>\*1</sup> 20mL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（50mL）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たにG2緩衝液<sup>\*1</sup> 10mL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100gを凍結乾燥用容器に量りとり、24時間凍結乾燥する。その後、試料<sup>\*2</sup> 10gを先にG2緩衝液<sup>\*1</sup> 30mLを入れたポリプロピレン製遠沈管（50mL）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・\*2 (略)

## 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<sup>\*1</sup>

「2.6.3.1. 試料前処理」を行った試料に、RNase A<sup>\*2</sup> 20μL、cellulase<sup>\*3</sup> 500μL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<sup>\*4</sup> 20μLも同時に加える）、転倒混和して均質にした後、50℃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<sup>\*5</sup> 200μLを加え50℃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×g、低温下（4℃）、20分間遠心する<sup>\*6</sup>。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<sup>\*7</sup> 4mLを通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清（約25mL～35mL）を、平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷する<sup>\*8</sup>。このときの溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液<sup>\*7</sup>で7.5mLずつ3回洗浄した後<sup>\*8</sup>、あらかじめ50℃に温めておいたQF緩衝液<sup>\*7</sup> 1mL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（50mL）上にセットし、再度50℃に温めておいたQF緩衝液<sup>\*7</sup> 2mLを負荷し、DNAを溶出する。DNA溶出液にイソプロパノール2mLを加えよく混合する。マイクロ遠沈管（1.5mL）1本当たり1mL程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g以上で、低温下（4℃）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<sup>\*9</sup>。次いで、各遠沈管当たり70%エタノールを1mLずつゆっくり加え、さらに10,000×g以上で、低温下（4℃）5分間遠心する。上清を捨て<sup>\*9</sup>、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5mL）4本分の沈殿を、あらかじめ50℃に温めた滅菌蒸留水50μLに溶解し、DNA試料原液とする<sup>\*10</sup>。

\*1～\*10 (略)

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

\*1～\*4 (略)

加えながら懸濁させ、よく転倒混和して均質にする。

\*1・\*2 (略)

## 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<sup>\*1</sup>

「2.6.3.1. 試料前処理」を行った試料に、RNase A<sup>\*2</sup> 20μL、cellulase<sup>\*3</sup> 500μL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<sup>\*4</sup> 20μLも同時に加える）、転倒混和して均質にした後、50℃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<sup>\*5</sup> 200μLを加え50℃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×g、低温下（4℃）、20分間遠心する<sup>\*6</sup>。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<sup>\*7</sup> 4mLを通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清（約25mL～35mL）を、平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷する<sup>\*8</sup>。この時の溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液<sup>\*7</sup>で7.5mLずつ3回洗浄した後<sup>\*8</sup>、あらかじめ50℃に温めておいたQF緩衝液<sup>\*7</sup> 1mL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（50mL）上にセットし、再度50℃に温めておいたQF緩衝液<sup>\*7</sup> 2mLを負荷し、DNAを溶出する。DNA溶出液にイソプロピルアルコール2mLを加えよく混合する。マイクロ遠沈管（1.5mL）1本当たり1mL程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g以上で、低温下（4℃）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<sup>\*9</sup>。次いで、各遠沈管当たり70%エタノールを1mLずつゆっくり加え、さらに10,000×g以上で、低温下（4℃）5分間遠心する。上清を捨て<sup>\*9</sup>、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5mL）4本分の沈殿を、予め50℃に温めた滅菌蒸留水50μLに溶解し、DNA試料原液とする<sup>\*10</sup>。

\*1～\*10 (略)

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

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<sup>\*1</sup>し、200～320nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し<sup>\*2</sup>、260nm及び280nmの吸光度<sup>\*3</sup>（A<sub>260</sub>及びA<sub>280</sub>）を記録する。次いでA<sub>260</sub>の値1.0を50ng/μL DNAと換算し、DNA濃度を算出する。またA<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>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<sup>\*4</sup>。得られたDNA濃度から、滅菌蒸留水でDNA試料原液を10ng/μLに希釈して調整し、DNA試料液とする。DNA試料液は50μLごとにマイクロ遠沈管に分注後、-20℃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10ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

\*1～\*4 (略)

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

#### 2.6.3.3.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25µL/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 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50µM) 各0.4µL、対象プローブ溶液 (10µM) 0.25µLを混合し、DNA試料液5µLを添加し滅菌蒸留水で全量25µL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ケーションを用いて、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~\*4 (略)

#### 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 µL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 µLに設定する。

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

#### 2.6.3.3.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25µL/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 12.5µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50µmol/L) 各0.4µL、対象プローブ溶液 (10µmol/L) 0.25µLを混合し、DNA試料液5µLを添加し滅菌蒸留水で全量25µL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ウェル並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ケーションを用いて、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~\*4 (略)

#### 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、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」: Non-Template Control、「UNKN」: 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)ともに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 µLに設定する。

#### 2.6.3.3.3. 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。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 15秒間、60℃ 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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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C<sub>q</sub>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

#### 2.6.3.3.3. 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。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 15秒間、60℃ 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。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。

#### 2.6.3.3.4. 結果の解析と判定

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とC<sub>t</sub>値の確認及びmulticomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

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C<sub>t</sub>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C<sub>t</sub>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C<sub>t</sub>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C<sub>t</sub>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C<sub>t</sub>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1参照)。

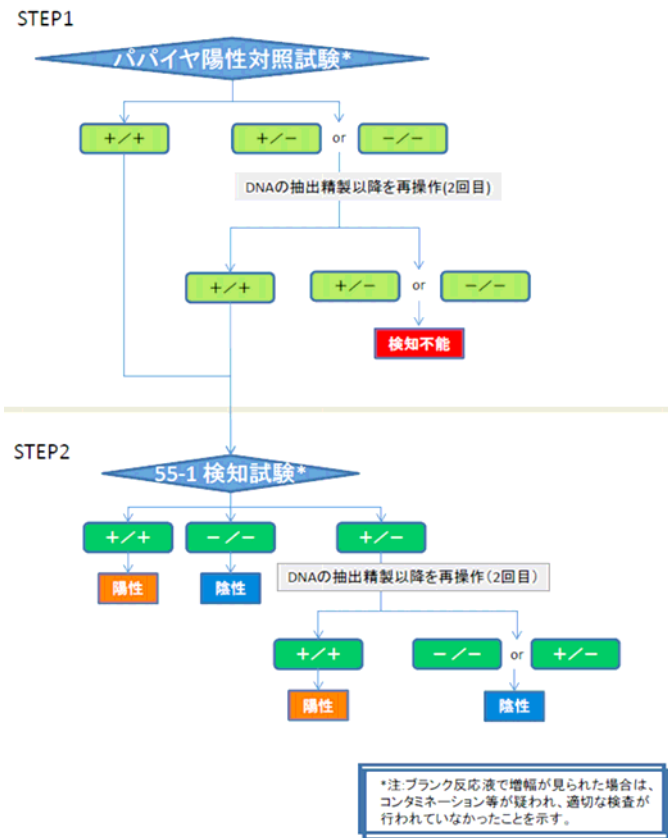
パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて48未満のC<sub>t</sub>値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験のどちらか一方だけで48未満のC<sub>t</sub>値が得られた場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目\*2のDNA抽出精製を行い、さらに「2.4.3.2.3. リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性又は陰性の判定が得られない場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 陰性と判定する (図1参照)。なお、上記により陽性と判定された結果についてmulticomponentを解析し、目

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・\*2 (略)

図7 結果の判定スキーム



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Ct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「2.4.2.3.リアルタイムPCR法」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Ct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1参照)。

\*1・\*2 (略)

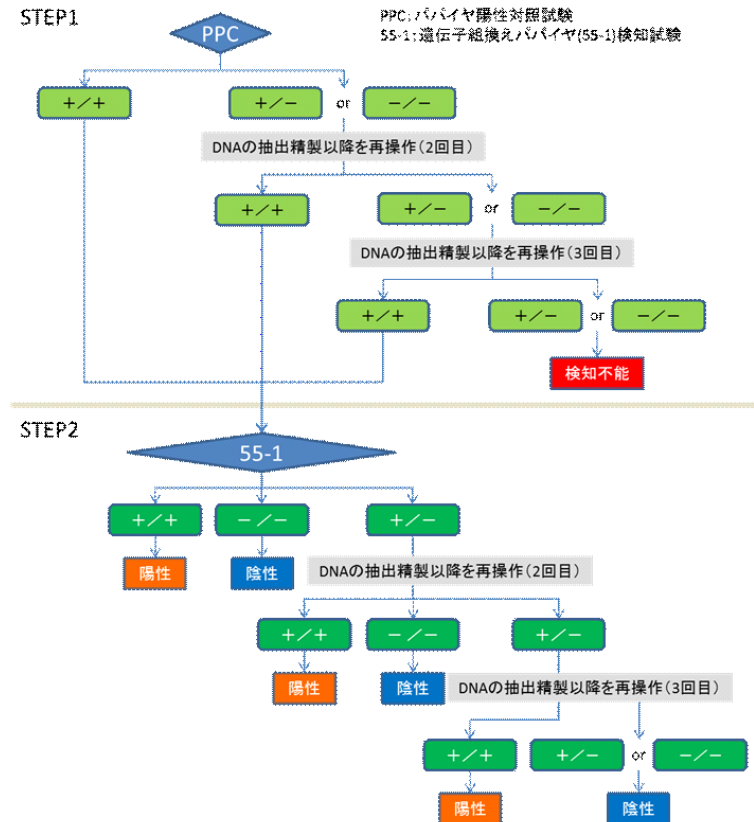


図1 結果の判定スキーム

(別紙1) 内標比

ABI PRISM® 7700 及びABI PRISM® 5700  
(略)

ABI PRISM® 7900HT 96well  
(略)

ABI PRISM® 7900HT 384well  
(略)

ABI PRISM® 7000  
(略)

Applied Biosystems® 7500  
(略)

LightCycler® System  
(略)

QuantStudio 5  
(略)

QuantStudio 12K Flex  
(略)

LightCycler® 96  
(略)

LightCycler® 480 96 well  
(略)

(別紙2) (略)

(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

(別紙1) 内標比

ABI PRISM® 7700 およびABI PRISM® 5700  
(略)

ABI PRISM® 7900HT 96well  
(略)

ABI PRISM® 7900HT 384well  
(略)

ABI PRISM® 7000  
(略)

Applied Biosystems® 7500  
(略)

LightCycler® System  
(略)

QuantStudio® 5 Real-Time PCR System (参照値)  
(略)

QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System 96 well (参照値)  
(略)

LightCycler® 96 (参照値)  
(略)

LightCycler® 480 96 well (参照値)  
(略)

(別紙2) (略)

(参考)

(1) 2.5.1.2. 項、2.5.1.3. 項、2.5.2.2.1. 項及び2.5.2.2.2. 項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



- 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2.1.2. 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。
- 0811 Fax. 03-5547-0818) から購入可能である。
- (2) 2.5.1.4.項及び2.5.1.5.項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1-29. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547) から購入可能である。
- (3) 2.1.2. 項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) 2.1.2.1.項、2.1.2.2.項、2.1.2.3.項、2.2.1.1.項及び2.2.1.2. 項に記載の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。又はその他の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. 項、2.2.2.2.1. 項、2.2.3.1.1. 項、2.4.1.1. 項及び2.4.2.1. 項に記載の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。又はその他の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」で主に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回すべ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、目を変えて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加工製品等でもよい。）を用いて内在性遺伝子検知法試験を繰り返し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

- (6) 2.2.3.1.1. 項に記載の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。又はその他のDNA合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

#### (新設)

確認する。また、遺伝子組換え検知法部分については、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)。

別添 アレルゲンを含む食品の検査方法～別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)

別添 アレルゲンを含む食品の検査方法～別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)