

(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） 1・2 （略）</p> <p>（加工食品） 1～4 （略） 5 表示の方式 （1）～（3） （略） （4） 栄養成分表示</p> <p>① <u>栄養成分表示に用いる食品表示基準別表第9の第1欄に掲げる栄養成分名又は熱量は、以下のとおり表示することができる。</u> <u>熱量にあつては、「エネルギー」</u> <u>たんぱく質にあつては、「蛋白質」、「たん白質」、「タンパク質」、「たんぱく」、「タンパク」</u> <u>ミネラルにあつては、元素記号</u> <u>（例）カルシウムにあつては「Ca」、鉄にあつては「Fe」、ナトリウムにあつては「Na」</u> <u>ビタミン（ナイアシン、パントテン酸、ピオチン及び葉酸を除く。）にあつては、ビタミン名の略語</u> <u>（例）ビタミンAにあつては、「V. A」、「VA」</u></p> <p>②～⑨ （略）</p> <p>（生鮮食品）～（附則） （略）</p> <p>別添 添加物 1－1 簡略名又は類別名一覧表</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） 1・2 （略）</p> <p>（加工食品） 1～4 （略） 5 表示の方式 （1）～（3） （略） （4） 栄養成分表示</p> <p>① <u>表示に用いる名称は、熱量にあつては、「エネルギー」、たんぱく質にあつては、「蛋白質」「たん白質」「タンパク質」「たんぱく」「タンパク」、カルシウムにあつては、「Ca」、鉄にあつては、「Fe」、ナトリウムにあつては、「Na」、ビタミンAにあつては、「V. A」（その他のビタミンも同様）と表示することができる。</u></p> <p>②～⑨ （略）</p> <p>（生鮮食品）～（附則） （略）</p> <p>別添 添加物 1－1 簡略名又は類別名一覧表</p>								
<table border="1"><thead><tr><th data-bbox="165 1235 636 1294">物質名</th><th data-bbox="636 1235 1104 1294">簡略名又は類別名</th></tr></thead><tbody><tr><td data-bbox="165 1294 636 1407">（略） アセチル化リン酸架橋デンプン <u>亜セレン酸ナトリウム</u></td><td data-bbox="636 1294 1104 1407">（略） 加工デンプン <u>亜セレン酸Na</u></td></tr></tbody></table>	物質名	簡略名又は類別名	（略） アセチル化リン酸架橋デンプン <u>亜セレン酸ナトリウム</u>	（略） 加工デンプン <u>亜セレン酸Na</u>	<table border="1"><thead><tr><th data-bbox="1126 1235 1597 1294">物質名</th><th data-bbox="1597 1235 2067 1294">簡略名又は類別名</th></tr></thead><tbody><tr><td data-bbox="1126 1294 1597 1407">（略） アセチル化リン酸架橋デンプン</td><td data-bbox="1597 1294 2067 1407">（略） 加工デンプン</td></tr></tbody></table>	物質名	簡略名又は類別名	（略） アセチル化リン酸架橋デンプン	（略） 加工デンプン
物質名	簡略名又は類別名								
（略） アセチル化リン酸架橋デンプン <u>亜セレン酸ナトリウム</u>	（略） 加工デンプン <u>亜セレン酸Na</u>								
物質名	簡略名又は類別名								
（略） アセチル化リン酸架橋デンプン	（略） 加工デンプン								

β-アポ-8'-カロテナール (略)	アポカロテナール、アポカロテナール色素、 カロチノイド、カロチノイド色素、カロテ ノイド、カロテノイド色素 (略)
-----------------------	--

β-アポ-8'-カロテナール (略)	アポカロテナール、アポカロテナール色素、 カロチノイド、カロチノイド色素、カロテ ノイド、カロテノイド色素 (略)
-----------------------	--

別添 添加物 1-2 同種の機能の添加物を併用した場合における簡略名の例 ~ 別添 添加物 2-2 天然香料基原物質リスト (略)

別添 添加物 1-2 同種の機能の添加物を併用した場合における簡略名の例 ~ 別添 添加物 2-2 天然香料基原物質リスト (略)

別添 添加物 2-3
一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用される品目リスト

別添 添加物 2-3
一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用される品目リスト

品 名		簡略名又は	基原・製法・本質	用 途	備 考
名 称	別 名	類別名			
アカキャベツ色素 ~ カウベリー色素 (略)					
果汁 (以下略)	フルーツジュ ース (以下略)			着色料	Fruit juice (以下略)
カゼイン ~ ローガンベリー色素 (略)					

品 名		簡略名又は	基原・製法・本質	用 途	備 考
名 称	別 名	類別名			
アカキャベツ色素 ~ カウベリー色素 (略)					
果汁 (以下略)	フルーツジュ ース (以下略)	着色料	着色料	着色料	Fruit juice (以下略)
カゼイン ~ ローガンベリー色素 (略)					

別添 栄養成分等の分析方法等 ~ 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 栄養成分等の分析方法等 ~ 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

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. 検体採取方法

1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取

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. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取
(略)

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

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

1.1.1.1. ~ 1.1.1.2. (略)

1.1.1.1. ~ 1.1.1.2. (略)

1.1.1.3. 加工食品の検体採取

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。

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。）検体採取については、1.1.1.1.の袋積

トウモロコシ及び大豆の粉砕加工品（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。）コーンスターチは検査対象外）検体採取

みの場合に従う。

それ以外の加工食品

以下の表に従って検体採取を行う。

(略)

1.1.2. ～ 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
(略)	(略)	(略)	(略)

* 果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を480 g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 (40-3-2) (以下「RRS」という。) が唯一のものであったが、2002年に承認され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 (Event A2704-12) (以下「LLS」という。) 及び2007年に承認されたモンサント社のRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下「RRS2」という。) が収穫

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

以下の表に従って検体採取を行う。

(略)

1.1.2. ～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
(略)	(略)	(略)	(略)

* 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

2.1. 大豆

これまで国内に流通する遺伝子組換え(GM) 大豆に関しては、RoundupReady Soybean (40-3-2) (以下「RRS」という。) が唯一のものであったが、2002年に承認され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大豆Liberty Link Soybean (Event A2704-12) (以下「LLS」という。) 及び2007年に承認されたモンサント社のRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下RRS2) が収穫されて

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 (略)

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

ダイズを対象とした定量PCR法においては、ダイズに普遍的に存在するレクチン遺伝子を内在性遺伝子としている。検査の際には、まずレクチン遺伝子を標的とするプライマー対 (Le1-n02) とプローブ (Le1-Taq)^{*2}を使用し定量PCRを行い、DNA試料液中のレクチン遺伝子のコピー数を求める。また、同時に、同一DNA試料液について、組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ^{*2}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^{*3}）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} 標準プラスミドDNA溶液

内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特異的プライマー対により増幅さ

おり、国内に流通することが予想されている。

2.1.1. ELISA法 (略)

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

大豆を対象とした定量PCR法においては、大豆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) 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^{*2}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^{*3}）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%含量となる。

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 (96well及び384well)、ABI PRISM[™] 7000、AB 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 (96well) 及びAB 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17MΩ/cmまで精製した超純水とする。

^{*1} 標準プラスミドDNA溶液

内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特異的プライマー対により増幅さ

れた増幅産物をプラスミド上に連結したもの（標準プラスミドDNA）を、ColE1/TE溶液（5 ng/μL）で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては20、125、1,500、20,000、250,000コピーの5段階希釈液に加え、標準プラスミドDNAの含まれていないColE1/TE溶液（5 ng/μL）をブランク試料液（NTC：no template control）とした、計6点について検量線を作成する。なお、ColE1/TE溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド（ColE1 プラスミド）をTE緩衝液で5 ng/μLの濃度に調製した溶液である。ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

RRS検知：GMダイズ（RRS）陽性コントロールプラスミド

LLS検知：GMダイズ（LLS）陽性コントロールプラスミド

RRS2検知：GMダイズ（RRS2）陽性コントロールプラスミド

*2 レクチン遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

Le1-n02 [Le1n 02-5' (5' -GCCCTCTACTCCACCCCA-3') & Le1n 02-3' (5' -GCCCATCTG CAAGCCTTTT-3')] 及び Le1-Taq (5' -FAM-AGCTTCGCCGCTCCTCAACTTCAC -TAMRA -3')

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

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

RRS-Taq (5' -FAM-CGCAACCGCCGCAAAATCC-TAMRA-3')

LLS検知：KVM175 (5' -GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT-3')、

SM0001 (5' -ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3') 及び

TM031 (5' -FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTCC-TAMRA-3')

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

MON89788-R (5' -TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3') 及び

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

*4 内標比

純粋な遺伝子組換え体の種子を対象に定量PCRを実施し、得られる組換え遺伝子のコピー数と内在性遺伝子（ダイズの場合レクチン遺伝子）のコピー数との比を求めたもの。この内標比は各組換え作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。各プライマー対及びプローブを用いて測定を行った組換え作物系統ごとの内標比は別紙 1 に規定する。なお、内標比は定量PCR法に使用する機種によって異なるため、混入率の算出時には必ず使用した機種につき規定されている内標比を用いること。また、使用する試薬によっても影響を受ける可能性が考えられるため、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. ABI PRISM[®] 7700及びABI PRISM[®] 5700を用いた定量PCR

れた増幅産物をプラスミド上に連結したもの（標準プラスミドDNA）を、ColE1/TE溶液（5ng/μL）で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては20、125、1,500、20,000、250,000コピーの5段階希釈液に加え、標準プラスミドDNAの含まれていないColE1/TE溶液（5ng/μL）をブランク試料液（NTC：no template control）とした、計6点について検量線を作成する。なお、ColE1/TE溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド（ColE1 プラスミド）をTE緩衝液で5ng/μLの濃度に調製した溶液である。

RRS検知：GMダイズ（RRS）陽性コントロールプラスミド

LLS検知：GMダイズ（LLS）陽性コントロールプラスミド

RRS2検知：GMダイズ（RRS2）陽性コントロールプラスミド

*2 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

RRS検知：RRS-01及びRRS-Taq

LLS検知：KVM175、SM0001及びTM031

RRS2検知：MON89788-F、MON89788-R及びMON89788-P

*3 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（大豆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. ABI PRISM[™] 7700及びABI PRISM[™] 5700を用いた定量PCR

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

PCR用反応液は25 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。
[TaqMan[®] Universal PCR Master Mix \(Thermo Fisher Scientific社\)](#) *1 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、水9 µL、20 ng/µL DNA試料液2.5 µL (50 ng) 又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 µL、**若しくは**5 ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL。試験は、1 DNA試料液当たり3ウェル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81 µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に**攪拌**し、**攪拌**後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*4の微量遠沈管に78.75 µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からプレートの蓋*5をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで専用ローラーを用いて完全にウェルを密閉する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 [TaqMan[®] Universal PCR Master Mix](#)
(略)

*2 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*5 96ウェルプレート及びプレートの蓋
MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate ([Thermo Fisher Scientific社](#)) 及びMicroAmp[®] Optical 8-Cap Strips ([Thermo Fisher Scientific社](#)) を使用する。

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、

2.1.2.1.1. 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。
Universal PCR Master Mix*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、あるいは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。

調製の実際は、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*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、真上からプレートの蓋*5をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで専用ローラーを用いて完全にウェルを密閉する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 Universal PCR Master Mix
(略)

*2 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*5 96ウェルプレート及びプレートの蓋
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate ([Life Technologies社](#)) 及びMicroAmp Optical Caps, 8caps/strips (Flat) ([Life Technologies社](#)) を使用する。

2.1.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM[™] 7700及びABI PRISM[™] 5700)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、

検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「STND」：検量線用標準プラスミドDNA溶液^{*1}、「NTC」：ブランク試料液、「UNKN」：DNA試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された3ウェルをReplicateとして指定する^{*2}。またプローブ特性に関しては、「STND」、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについてReporterが「FAM」、Referenceが「ROX」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する。

^{*1} 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

^{*2} Replicate としての指定
(略)

2.1.2.1.3. PCR (ABI PRISM[®] 7700及びABI PRISM[®] 5700) (略)

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 (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*。

* 実際はThを引いた後、「Amplification Plot」ウインドウ上にある、「Update Calculations」ボタンを押すことで、検量線は自動作成される。この検量線は「Analysis」タブから「Standard Curve」を選択することで表示させる。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.2.2. 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 μ 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 \(Thermo Fisher Scientific社\)](#) ^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.5 μ L、対象プロ

検体の配置と種類及び、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「STND」：検量線用標準プラスミドDNA溶液^{*1}、「NTC」：ブランク試料液、「UNKN」：DNA試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された3ウェルをReplicateとして指定する^{*2}。またプローブ特性に関しては、「STND」、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについてReporterが「FAM」、Referenceが「ROX」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する。

^{*1} 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

^{*2} Replicate としての指定
(略)

2.1.2.1.3. PCR (ABI PRISM[™] 7700及びABI PRISM[™] 5700) (略)

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 (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の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター作成のJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 定量的PCR編」に記載されている方法を準用する。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に対して得られた近似直線を検量線とする*。

* 実際はThを引いた後、「Amplification Plot」ウインドウ上にある、「Update Calculations」ボタンを押すことで、検量線は自動作成される。この検量線は「Analysis」タブから「Standard Curve」を選択することで表示させる。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.2.2. ABI PRISM[™] 7900HT 96well及び384wellを用いた定量PCR

2.1.2.2.1. PCR用反応液の調製 (ABI PRISM[™] 7900HT 96well)

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、水 9 μ L、20ng/ μ L

ープ溶液 (10 μmol/L) 0.5 μL、水9 μL、20 ng/μL DNA試料液2.5 μL (50 ng) 又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 μL、若しくは5 ng/μL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 μL。試験は、1 DNA試料液当たり3ウェル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量は余剰分を考慮し、1 DNA試料液 (3ウェル分) 当たり81 μLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に**攪拌**し、**攪拌**後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*4の微量遠沈管に78.75 μLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 μL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 μL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う*5。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*6を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix
(略)

*2 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*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ャー
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*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。

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。

調製の実際は、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ャーを用いて行う*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、ABI PRISM Optical Cover 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。

*1 Universal PCR Master Mix
(略)

*2 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*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ャー
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies社) 及びABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad
ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies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20 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。
TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) *1 10 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.4 µL、水7.2 µL、20 ng/µL DNA試料液2 µL (40 ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2 µL*2、**若しくは**5 ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2 µL。試験は、1 DNA試料液当たり3ウェル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*4を先に調製しておき、これと**TaqMan® Universal PCR Master Mix**を1 : 1.25の比率で混合させると良い。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66 µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に**攪拌**し、**攪拌**後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5の微量遠沈管に63 µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を7 µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を20 µL/wellとして384ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う*6。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 **TaqMan® Universal PCR Master Mix**
(略)

*2 検量線用標準プラスミドDNA溶液

ABI PRISM® 7900HT 384 well を用いた試験においては、反応液に添加する検量線用標準プラスミドDNA溶液の液量を2 µLとしている。このため、対応するコピー数は、16、100、1,200、16,000、200,000となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

*3 定量PCR用反応液の調製
(略)

*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 分注必要数
(略)

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

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。
Universal PCR Master Mix *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、あるいは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。

調製の実際は、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 Universal PCR Master Mixに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*4を先に調製しておき、これと 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*5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*6。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 Universal PCR Master Mix
(略)

*2 検量線用標準プラスミドDNA溶液

ABI PRISM™ 7900HT 384well を用いた試験においては、反応液に添加する検量線用標準プラスミドDNA溶液の液量を2µLとしている。このため、対応するコピー数は、16、100、1,200、16,000、200,000となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

*3 定量PCR用反応液の調製
(略)

*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1.25µmol/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。

*5 分注必要数
(略)

***6** 384ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

[MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode](#) (Thermo Fisher Scientific社) 及び [MicroAmp® Optical Adhesive Film](#) (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.1.2.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM[™] 7900HT 96well及び384well)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*1。設定したDetectorをSet upタブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「Standard」: 検量線用標準プラスミドDNA溶液²、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液)をTask欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

***1** Detector の設定

(略)

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定

(略)

2.1.2.2.4. PCR (ABI PRISM[™] 7900HT 96 well及び384 well)

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 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、[9600](#) emulationモードのチェックを入れておく。また、96ウェルと384ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

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

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

***6** 384ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

[ABI PRISM384-Well Clear Optical Reaction Plate with Barcode](#) (Life Technologies社) 及び [ABI PRISM Optical Adhesive Cover](#) (Life Technologies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。

2.1.2.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM[™] 7900HT 96well及び384well)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*1。設定したDetectorをSet upタブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「Standard」: 検量線用標準プラスミドDNA溶液²、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液)をTask欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

***1** Detector の設定

(略)

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定

(略)

2.1.2.2.4. PCR (ABI PRISM[™] 7900HT 96well及び384well)

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分間加熱し、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、[9,600](#) emulationモードのチェックを入れておく。また、96ウェルと384ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

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

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*。

* 実際はThを引いた時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.2.3. 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 \(Thermo Fisher Scientific社\)](#)^{*1} 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、水9 µL、20 ng/µL DNA試料液2.5 µL (50 ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 µL、若しくは5 ng/µL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL。試験は1 DNA試料液当たり3ウェル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81 µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に**攪拌**し、**攪拌**後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*4}の微量遠沈管に78.75 µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を25 µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、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ターを用いて行う^{*5}。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、[MicroAmp[®] Optical Film Compression Pad](#)^{*6}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 [TaqMan[®] Universal PCR Master Mix](#)
(略)

Startを3に、Endを15に設定する。Thの厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター作成のJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 定量的PCR編」に記載されている方法を準用する。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に対して得られた近似直線を検量線とする*。

* 実際はThを引いた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。

2.1.2.3. 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25µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*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。

調製の実際は、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ターを用いて行う^{*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、[ABI PRISM[™] Optical Cover](#) 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。

*1 Universal PCR Master Mix
(略)

*2 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*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)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*1。設定したDetectorをWell Inspectorに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「Standard」: 検量線用標準プラスミドDNA溶液²、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液) をTask欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

*1 Detector の設定
(略)

*2 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

2.1.2.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 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、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 定量PCR用反応液の調製
(略)

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

*4 分注必要数
(略)

*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 (Life Technologies社) 及びABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies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 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies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)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*1。設定したDetectorをWell Inspectorに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「Standard」: 検量線用標準プラスミドDNA溶液²、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液) をTask欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

*1 Detector の設定
(略)

*2 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

2.1.2.3.3. PCR (ABI PRISM™ 7000)

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 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、9,600 emulationモードのチェックを入れておく。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.1.2.3.4. 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 (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*。

* 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。

2.1.2.4. 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25 μ 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)^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、水9 μ L、20 ng/ μ L DNA試料液2.5 μ L (50 ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 μ L、若しくは5 ng/ μ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 μ 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*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81 μ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*4}の微量遠沈管に78.75 μ Lずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 μ 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 μ L/wellと

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 (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の厳密な引き方は、[独立行政法人農林水産消費安全技術センター作成のJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル定量的PCR編」に記載されている方法を準用する](#)。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に対して得られた近似直線を検量線とする*。

* 実際はThを引き、「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。

2.1.2.4. Applied Biosystems 7500 (AB 7500) を用いた定量PCR

2.1.2.4.1. PCR用反応液の調製 (AB 7500)

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix^{*1} 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、水9 μ L、20ng/ μ L DNA試料液2.5 μ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液2.5 μ L、若しくは5ng/ μ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 μ 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*2。

調製の実際は、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 μ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*4}の微量遠沈管に78.75 μ Lずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を8.75 μ 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 μ L/wellとして96ウェルプレート上のウェ

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^{*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。

***1** [TaqMan®](#) Universal PCR Master Mix
(略)

***2** 定量PCR用反応液の調製
(略)

***3** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

***4** 分注必要数
(略)

***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) (略)

***1** Detector の設定
Detectorは各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくこととよい。

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

2.1.2.4.3. 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分間加熱し、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。

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

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

るに分注する。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^{*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。

***1** Universal PCR Master Mix
(略)

***2** 定量PCR用反応液の調製
(略)

***3** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

***4** 分注必要数
(略)

***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 ([Life Technologies](#)社) 及びABI PRISM Optical Adhesive Cover ([Life Technologies](#)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 System) (略)

***1** Detector の設定
Detectorは各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくことと良い。

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

2.1.2.4.3. PCR (Applied Biosystems 7500 System)

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分間加熱し、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9,600 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。

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

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*。

* 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。

2.1.2.5. 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 μ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes⁴¹ 2 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.4 μ L、対象プローブ (10 μ mol/L) 0.4 μ L、水9.8 μ L、MgCl₂溶液 (25 mM) 2.4 μ L、10 ng/ μ L DNA試料液5 μ L (50 ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液5 μ L^{*2}、若しくは5 ng/ μ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液: NTC) 5 μ L。試験は、検量線用標準プラスミドDNA溶液、及びNTCに対し1キャピラリー、1 DNA試料液に対し2キャピラリー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^{*3}。

実際の調製は、反応液の調製及びPCRで生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめLC-FastStart DNA Master Hybridization ProbesにMgCl₂溶液、水並びに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液^{*4}を先に調製しておき、これとLC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl₂溶液、水の混合液を8:7の比率で混合させるとよい。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1キャピラリー当たり19.8 μ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*5}の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及びNTCに対し18 μ L、DNA試料液に対し36 μ Lとする。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を6 μ L (検量線用標準プラスミド溶液及びNTC) 若しくは12 μ L (DNA試料液) 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心す

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の厳密な引き方は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター作成のJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 定量的PCR編」に記載されている方法を準用する。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*。

* 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。

2.1.2.5. 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 μ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes⁴¹ 2 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 0.4 μ L、対象プローブ (10 μ mol/L) 0.4 μ L、水 9.8 μ L、MgCl₂溶液 (25mM) 2.4 μ L、10ng/ μ L DNA試料液 5 μ L (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液 5 μ L^{*2}、若しくは5ng/ μ L ColE1/TE溶液 (ブランク試料液: NTC) 5 μ L。試験は、検量線用標準プラスミドDNA溶液、及びNTCに対し1キャピラリー、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^{*3}。

調製の実際は、反応液の調製及びPCRで生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめLC-FastStart DNA Master Hybridization ProbesにMgCl₂溶液、水並びに対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液^{*4}を先に調製しておき、これとLC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、MgCl₂溶液、水の混合液を8:7の比率で混合させるとよい。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1キャピラリー当たり19.8 μ Lが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*5}の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及びNTCに対し18 μ L、DNA試料液に対し36 μ Lとする。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を6 μ L (検量線用標準プラスミド溶液及びNTC) 若しくは12 μ L (DNA試料液) 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。

る。このようにして調製した混合溶液を20 µL/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作^{*6}を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

***1** LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) に内包されている LC-FastStart Enzyme (1a red cap) とLC-FastStart Reaction Mix HybProbe (1b colorless cap) とを混合し、調製する。調製したLC-FastStart DNA Master Hybridization Probesは、4℃で一週間の保存が可能である。また、本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液
(略)

***3** 定量PCR用反応液の調製
(略)

***4** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

***5** 分注必要数
(略)

***6** 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカラーセル遠心機を使用し行うか、又は汎用の遠心機を使用する場合には700×g以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作の如何に関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカラーセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

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

***1** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

***2** Replicateの指定
(略)

2.1.2.5.3. PCR (Roche LightCycler System)
(略)

***1** 加温、冷却速度
(略)

このようにして調製した混合溶液を20µL/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作^{*6}を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

***1** LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes

LC-FastStart Enzyme (1a red cap) とLC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes (1b colorless cap) とを混合し、調製する。調製したLC-FastStart DNA Master Hybridization Probesは、4℃で一週間の保存が可能である。また、本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。

***2** 検量線用標準プラスミドDNA溶液
(略)

***3** 定量PCR用反応液の調製
(略)

***4** 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
(略)

***5** 分注必要数
(略)

***6** 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカラーセル遠心機を使用し行うか、あるいは汎用の遠心機を使用する場合には700×g以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作の如何に関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカラーセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

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

***1** 検量線用標準プラスミドDNA溶液の設定
(略)

***2** Replicateの指定
(略)

2.1.2.5.3. PCR (Roche LightCycler System)
(略)

***1** 加温、冷却速度
(略)

*2 データの取り込み設定
(略)

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

* 検量線のError値が0.2以上になる場合には以下の検討を行う。Crossing Lineの調整幅 (Crossing Lineを移動させる範囲) を0.1から0.2の間とし、手動でCrossing Lineを移動させる。移動させながら検量線のError値が最小となるようなCrossing Lineを設定し、その時点で得られる数値を解析値とする。上記解析を行ってなお検量線のError値が0.2以上になる場合には、検量線から大きく外れている検量線用標準DNA溶液1点を解析対象から外し、同様の解析を行う。以上の解析を行ってもError値が0.2以上になる場合にはその解析条件下での最小Error値を示した時点の数値を解析値とする。

2.1.2.6. 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 96 well (Thermo Fisher Scientific社)、LightCycler® 96 (Roche Diagnostics社) 及びLightCycler® 480 96 well (Roche Diagnostics社)] については、「2.1.2.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well及び384 well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96 well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 Diagnostics社) を用いる。

2.1.3. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算
(略)

* Roche LightCycler System を用いた場合には、1 DNA試料液当たり各3ウェルではなく、2キャピラリーで実施するので、2.1.2.5.4. 項で得られた2キャピラリー分のデータの平均値を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。

2.1.4. 結果の判定
(略)

2.2. トウモロコシ穀粒の検査法

トウモロコシでは、異なった発現タンパク質を持つ組換え系統が存在する上、同一の発現タンパク質が発現する組換え系統であっても、組換え系統毎にタンパク質

*2 データの取り込み設定
(略)

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

* 検量線のError値が0.2以上になる場合には以下の検討を行う。Crossing Lineの調整幅 (Crossing Lineを移動させる範囲) を0.1から0.2までの間とし、手動でCrossing Lineを移動させる。移動させながら検量線のError値が最小となるようなCrossing Lineを設定し、その時点で得られる数値を解析値とする。上記解析を行ってなお検量線のError値が0.2以上になる場合には、検量線から大きく外れている検量線用標準DNA溶液1点を解析対象から外し、同様の解析を行う。以上の解析を行ってもError値が0.2以上になる場合にはその解析条件下での最小Error値を示した時点の数値を解析値とする。

(新設)

2.1.3. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算
(略)

* Roche LightCycler System を用いた場合には、1DNA試料液当たり各3ウェルではなく、2キャピラリーで実施するので、2.1.2.4.3. 項で得られた2キャピラリー分のデータの平均値を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。

2.1.4. 結果の判定
(略)

2.2. トウモロコシ検査法

トウモロコシでは、異なった発現たんぱく質を持つ組換え系統が存在する上、同一の発現タンパク質が発現する組換え系統であっても、組換え系統毎にタンパク質

の発現量が異なるため、多種の遺伝子組換えトウモロコシが混入している穀粒では、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める目的でELISA法を用いることはできない。したがって、リアルタイムPCR法が有効な分析手法となる。また、今般、トウモロコシ穀粒の一粒中に複数系統の組換えDNA配列が存在するスタック品種が多種開発されていることから、トウモロコシ穀粒を一粒単位、又はグループ単位で検査する必要がある。

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

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

2.2.1. 定量PCR法

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-Ta_q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

組換えトウモロコシ系統Event176、Bt11、T25、NK603、MON863、TC1507、MON810、DAS-59122-7、MON88017及びMON89034には、共通してCauliflower mosaic virus由来の35S promoter (P35S) 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除きダイズの定量PCR法で示された方法と同一である。内在性遺伝子として、スターチシンターゼIIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対SSIIb-3とプローブSSIIb-Ta_qを使用する。また、検量線用標準プラスミドDNA溶液としてGMトウモロコシプラスミドセットを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプロ

の発現量が異なるため、多種の遺伝子組換えトウモロコシが混入している穀粒では、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める目的でELISA法を用いることはできない。したがって、定量PCR法が有効な分析手法となる。また、今般、トウモロコシ穀粒の一粒中に複数系統の組換えDNA配列が存在するスタック品種が多種開発されていることから、トウモロコシ穀粒を一粒単位で検査する必要がある。

これらスタック品種が混入した場合、2.2.1.項の定量PCR法では実際の混入率よりも高い数値となるため、分別生産流通管理を行っている非遺伝子組換えトウモロコシにおいて混入率が5%を超え、スタック品種の混入が疑われた場合は、2.2.2.の粒単位検査法を実施する。

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

2.2.1. 定量PCR法

上述のように、トウモロコシでは分析対象が複数系統存在するため、まずスクリーニングを実施し、得られた結果に基づき、さらに系統ごとの分別定量を行い、組換え系統ごとの定量値を合計して、結果の判定を行う。なお、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-Ta_q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大豆の場合と同様に算出し、2.1.3.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. スクリーニング

2.2.1.1.1. Cauliflower mosaic virus由来の35S promoterが組み込まれた組換え系統の定量

組換えトウモロコシ系統Event176、Bt11、T25、NK603、MON863、TC1507及びMon810には、共通してCauliflower mosaic virus由来の35S promoter (P35S) 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除き大豆の定量PCR法で示された方法と同一である。内在性遺伝子として、スターチシンターゼIIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対SSIIb-3とプローブSSIIb-Ta_qを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブはP35S-1とP35S-Ta_qであり、別紙に規定された内標比を用いて、最終的にP35S配列が組み込まれた遺伝子組

ープはP35S-1とP35S-Taq^{*2}であり、別紙 1 に規定された内標比を用いて、最終的にP35S配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率を算出する。

*1 SSIIB遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIB-3 [SSIIB 3-5' (5' -CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3') & SSIIB 3-3' (5' -GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3')] 及び SSIIB-Taq (5' -FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3')

*2 P35Sを標的とするプライマー対とプローブ

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

P35Sを用いた際の内標比はMON810を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中にP35S配列が1コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を過小評価する可能性が低い。なお、P35S-Taqは、他のプローブの半分の濃度（終濃度：0.1µmol/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. GA21、MIR604、MIR162の定量

組換え系統GA21、MIR604、MIR162は、P35S配列が組み込まれていない。したがって、本系統の含有率を確認するため、P35S配列を分析するものと同一のDNA試料液について、別にGA21に特異的な反応、MIR604に特異的な反応、MIR162に特異的な反応を用い、2.2.1.1.項と同様の方法で各系統の含有率を求める。GA21の分析にはプライマー対GA21-3とプローブGA21-Taq*を、検量線用標準プラスミドDNA溶液としてGMトウモロコシプラスミドセットを用いる。MIR604の分析には、プライマー対MIR604-1とプローブMIR604-Taq*を、検量線用標準プラスミドDNA溶液としてGMトウモロコシ (MIR604) プラスミドセットを用いる。MIR162の分析には、プライマー対MIR162-1とプローブMIR162-Taq*を、検量線標準プラスミドDNA溶液としてGMトウモロコシ (MIR162) プラスミドセットを用いる。なお、MIR604の分析を行う際には、MIR604特異的反応及びSSIIB特異的反応の両方でリアルタイムPCRの反応温度条件を以下のとおりとする。50℃、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、60℃ 1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。

* 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

GA21検知：GA21-3 [GA21-3-5' (5' -GAAGCCTCGGCAACGTCA-3') & GA21-3-3' (5' - ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3')] 及び GA21-Taq (5' -FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA- 3')

MIR604検知：MIR604-1 [MIR604 primer F (5' -GCGCACGAATTCAACAG-3') & MIR604 primer R (5' -GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3')] 及び

換えトウモロコシの含有率を算出する。

(新設)

* P35S-1とP35S-Taq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35S promoter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：0.1µmol/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）。

2.2.1.1.2. GA21の定量

組換え系統GA21は、P35S配列が組み込まれていない。したがって、本系統の含有率を確認するため、P35S配列を分析するものと同一のDNA試料液について、別にGA21に特異的なプライマー対GA21-3とプローブGA21-Taqを用い、2.2.1.1.1.と同様の方法でGA21遺伝子のコピー数を算出し、GA21の含有率を求める。

MIR604 probe (5' -FAM- AGGCGGAAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA- 3')
MIR162検知 : MIR162-1 [MIR162-f1 (5' -GCGCGGTGCATCTATGTTACTAG-3') &
MIR162-r1 (5' -TGCCTTATCTGTTGCCTCAGA-3')] 及び
MIR162-p1 (5' -FAM- TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCGCCA-TAMRA- 3')

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にGA21、MIR604、MIR162の含有率を加えた値が4.5%を超える場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

(削る)

(削る)

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、

2.2.1.1.3. 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にGA21の含有率を加えた値が4.5%を超える場合、さらに、別に2回の抽出を行い、計3回の抽出より得られたDNA試料液について、それぞれトウモロコシ組換え系統特異的定量を行う。

2.2.1.2. トウモロコシ組換え系統特異的定量

2.2.1.2.1. Event176、Bt11、T25及びMon810の定量

GA21については、2.2.1.1.2.と同様の方法で行う。組換え系統Event176、Bt11、T25及びMon810については、定量用プライマー対とプローブとして、それぞれE176-2とE176-Taq、Bt11-3とBt11-Taq、T25-1とT25-Taq及びM810-2とM810-Taqを用い、2.2.1.1.1.項と同様の方法^{*1} ^{*2}でEvent176、Bt11、T25、Mon810の各遺伝子のコピー数を算出し、Event176、Bt11、T25、Mon810の系統別含有率を求める。

^{*1} Roche LightCycler Systemを用いてBt11を対象とする測定を行う場合は、反応液組成 (MgCl₂濃度) が異なるため、注意する。組成を以下に示す。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes 2μL、対象プライマー対溶液 (25μmol/L) 0.4μL、対象プローブ溶液 (10μmol/L) 0.4μL、水 11.4μL、MgCl₂溶液 (25mM) 0.8μL、10ng/μL DNA試料液 5μL (50ng)、又は検量線用標準プラスミドDNA溶液 5μL、若しくは5ng/μL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液 : NTC) 5μL

^{*2} AB 7500を用いてトウモロコシ組換え系統特異的定量試験を行うことはできない。

2.2.1.3. 結果の判定

2.2.1.1.で得られたGA21、及び2.2.1.2.で得られたEvent 176、Bt11、T25及びMon810の含有率について、1DNA試料液ずつ総和を算出する。それらの平均が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)

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 (SS IIb) 遺伝子、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として、Cauliflower mosaic virus由来の35S promoter (P35S) 及び*Agrobacterium tumefaciens*由来のnopaline synthase遺伝子のterminator (TNOS) を同時に検出するマルチプレックスリアルタイムPCR法にて行う。本法は、複数セットのプライマー対とプローブをPCR液に添加することで、複数の標的遺伝子を同時に検出することができ、通常のシングルプレックスリアルタイムPCR法に比べて一度に多検体を処理できる。なお、本スクリーニング検査では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 ΔCq 法にて行う。 ΔCq 法は、内在性遺伝子におけるCq値^{*1}と標的遺伝子 (本法では組換え遺伝子) におけるCq値の差 [$\Delta Cq = Cq(\text{標的遺伝子}) - Cq(\text{内在性遺伝子})$] を用いて行う。 ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があり、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。得られた分析試料の ΔCq 値が、判定基準となる標準試料の ΔCq 値以上である場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は5%以上である可能性があると判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810粉末試料^{*2}から抽出したDNA溶液 (20 ng/ μ L) を用い、分析試料と同時に測定する。

*1 Cq値

ABI PRISM® 7900HT 96 wellではCt値、LightCycler® 96 及びLightCycler® 48 0ではCq値と表記されている。本法では表記をCq値に統一する。

*2 4%(w/w) MON810粉末試料

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

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

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

PCR用反応液は10 μ L/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。
FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) ^{*1} 5 μ L、
対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 μ mol/L) 0.016 μ L^{*2}、SSIIb 3-3' (50 μ mol/L) 0.016 μ L^{*2}、P35S 1-5' (50 μ mol/L) 0.05 μ L^{*3}、P35S 1-3' (50 μ mol/L) 0.05 μ L^{*3}、NOS ter 3-5' (50 μ mol/L) 0.06 μ L^{*4}、NOS ter 2-3' (50 μ mol/L) 0.06 μ L^{*4}、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 μ mol/L) 0.08 μ L^{*5}、P35S-Taq (10 μ mol/L) 0.1 μ L^{*6}、NOS-Taq (10 μ mol/L) 0.12 μ L^{*7}、水3.448 μ L、20 ng/ μ L DNA試料液1 μ L又は蒸留水 (ブランク試料液 : NTC) 1 μ L。試

験は、1 DNA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、1 DNA試料液（3ウェル分）当たり34 µLが適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*10の微量遠沈管に30.6 µLずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を3.4 µL加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を10 µL/wellとして96ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシール*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。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*12。

*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 µmol/L) 0.032 µLを用いてもよい。

*3 P35S 1-5' 及びP35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

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

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

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

*4 NOS ter 3-5' 及びNOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

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

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

*5 SSIIb-TaqV

蛍光色素としてVICで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*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-CCCACATCCCTTCGCAAGACCCTTCCT-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 µmol/L、SSIIb 3-3' 0.2 µmol/L、P35S 1-5' 0.625 µmol/L、P35S 1-3' 0.625 µmol/L、NOS ter 3-5' 0.75 µmol/L、NOS ter 2-3' 0.75 µmol/L、SSIIb-TaqV 0.2 µmol/L、P35S-Taq 0.25 µmol/L、NOS-Taq 0.3 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

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad(Thermo Fisher Scientific社) を使用する。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため避けること。

ol/L) 0.05 μL ^{*3}、NOS ter 3-5' (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.06 μL ^{*4}、NOS ter 2-3' (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.06 μL ^{*4}、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.08 μL ^{*5}、P35S-Taq (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.1 μL ^{*6}、NOS-Taq (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.12 μL ^{*7}、水3.448 μL 、20 ng/ μL DNA試料液1 μL 又は蒸留水 (ブランク試料液 : NTC) 1 μL 。試験は、1 DNA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、1 DNA試料液 (3ウェル分) 当たり34 μL が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数^{*10}の微量遠沈管に30.6 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を3.4 μL 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 1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。

*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 $\mu\text{mol/L}$) 0.032 μL を用いてもよい。

*3 P35S 1-5' 及びP35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

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

P35S 1-3' : 5' -CCTCTCAAATGAAATGAACTCCT-3'

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

*4 NOS ter 3-5' 及びNOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

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

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

*5 SSIIb-TaqV

蛍光色素としてVICで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*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 μmol/L、SSIIb 3-3' 0.2 μmol/L、P35S 1-5' 0.625 μmol/L、P35S 1-3' 0.625 μmol/L、NOS ter 3-5' 0.75 μmol/L、NOS ter 2-3' 0.75 μmol/L、SSIIb-TaqV 0.2 μmol/L、P35S-Taq 0.25 μmol/L、NOS-Taq 0.3 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。

*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ーケーター

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

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行

う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された3ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また、プローブ特性に関しては、VICにはSSIIb、FAMにはP35S+TNOSを割り当てる*。

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

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

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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秒間、59℃ 1分30秒間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

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

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

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

2.2.2.3. 結果の判定

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

2.2.3. 粒単位検査法

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

なお、遺伝子組換え穀粒の粒数が92粒（試験有効粒数90粒）中に3以上9以下の

2.2.2. 粒単位検査法

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

なお、遺伝子組換え穀粒の粒数が92粒（試験有効粒数90粒）中に3以上9以下の

場合はさらに2回目の92粒の粒単位検査法を行い、1回目と2回目の総和184粒（試験有効粒数180粒）における遺伝子組換え穀粒の粒数を定量し、混入率を求める。
本法の適用機種はLightCycler® 96である*。

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

2.2.3.1. マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた定性検知法

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

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

2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製

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

場合はさらに2回目の92粒の粒単位検査法を行い、1回目と2回目の総和184粒（試験有効粒数180粒）における遺伝子組換え穀粒の粒数を定量し、混入率を求める。
本法の適用機種はABI PRISM™ 7900、ABI 7500である*。

* その他のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7000、LightCycler™ 480等が適用可能であると考えられるが、使用する機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、粒単位検査法用標準プラスミドDNA溶液を用いて事前にPCR用反応液の調製法、PCR条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.2.2.1. マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた定性検知法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは2.2.1.1.項と同様である。ただし、スターチシンターゼIIb（SSIIb）遺伝子検知用プローブは蛍光色素としてVICを標識したプローブSSIIb-TaqVを用いる。

各粒由来DNA試料液につき1ウェル（92試料、92ウェル）、またPCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものを2ウェル分、粒単位検査法用標準プラスミドDNA溶液として2ウェル分、の合計96ウェルで分析を行う。

2.2.2.1.1. 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。Universal PCR Master Mix*1 12.5µL、対象プライマー対としてSSIIb-3（25 µmol/L） 0.5µL*2、GA21-3（25µmol/L） 0.25µL*2、P35S-1（25µmol/L） 0.25 µL*2、対象プローブとしてSSIIb-TaqV（10µmol/L） 0.5µL*3、GA21-Taq（10µmol/L） 0.25µL*3、P35S-Taq（10µmol/L） 0.25µL*3、を混合し、水で全量22.5 µLに調製後、粒由来各DNA試料液2.5µLを添加する。分注操作終了後、真上からシール*4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ターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく*5。

*1 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。

2.2.3.1.2. プレート情報の設定
2.2.2.2.2. 項と同様に行う。

2.2.3.1.3. PCR
2.2.2.2.3. 項と同様に行う。

2.2.3.1.4. PCR結果の解析
解析はPCR装置付属のソフトウェアで行い、LightCycler® 96においては、SSIIb及びP35S+TNOSのMinimal EPFを0.1に設定する。SSIIb検知試験及びP35S+TNOS検知試験の両方において38未満のCq値が得られたDNA試料液は、遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。一方、SSIIb検知試験において38未満のCq値が

- *2 対象プライマー対としてSSIIb-3、GA21-3、P35S-1を用いる。
- *3 対象プローブとして、蛍光色素としてVICを標識しているSSIIb-TaqV、蛍光色素としてFAMを標識しているGA21-Taq、P35S-Taqを用いる。SSIIb-TaqVは以下のとおりである。（プローブは水で溶解する。）
5' -VIC-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-TAMRA-3'
- *4 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
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies社) 及びABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies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。
- *5 ABI PRISM™ 7900の場合は、プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies) を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.2.1.2. 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（「UNKN」：DNA試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、SSIIb-TaqVは、Reporterが「VIC」、Quencherが「TAMRA」、P35S-Taq及びGA21-TaqはReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

* 蛍光色素のDetector を登録する際に、「SSIIb」は「VIC」、「GA21&P35S」は「FAM」に設定する。

2.2.2.1.3. 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。
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秒間、59℃ 1分30秒間を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。

2.2.2.1.4. PCR結果の解析
各粒由来DNA試料液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。
第一に目視でAmplification plot上で15サイクル以降に指数関数的な増幅

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

2.2.3.2. 結果の判定

2.2.3.1.4.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

トウモロコシ穀粒試料からランダムサンプリングを行い、穀粒20粒からなるグループを10グループ用意する。2.5.5に記載の方法で各グループからDNA試料液を調製し、各グループに遺伝子組換え穀粒が含まれているか否かをリアルタイムPCR

曲線が確認されたDNA試料液を遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。一方、15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線が確認されないDNA試料液を非遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。

なお上記判定により遺伝子組換え穀粒と判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの顕著な増加が観察でき、ROX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、各DNA試料液のSSIIbのAmplification plot上で15サイクル以降に指数関数的な増幅曲線が確認されない場合には、当該DNA試料液に対してマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法以降の操作を行い、それでも同様の結果の場合には、そのDNA試料液での結果を無効とする。SSIIbの増幅曲線が確認されるDNA試料液における試験は有効と判断され、92粒のDNA試料液中で90粒のDNA試料液以上におけるSSIIbの増幅曲線が確認される場合は、本試験は成立する。その後、SSIIbの増幅曲線が確認されたDNA試料液の結果から遺伝子組換え穀粒と非遺伝子組換え穀粒の数を測定する。89粒のDNA試料液以下におけるSSIIbの増幅曲線が確認された場合は、本試験は不成立として、改めて92粒のランダムサンプリングを行い、1.の粒単位粉砕から試験を実施する。

なお、マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法では、ABI PRISM™ 7900及びABI 7500以外のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7000、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、粒単位検査法用標準プラスミドDNA溶液を用いて事前にPCR用反応液の調製法、PCR条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.2.2.2. 結果の判定

2.2.2.1.4.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。

（新設）

で判定する。遺伝子組換え穀粒を含むグループの数から、遺伝子組換え穀粒の混入率を評価する。10グループ中遺伝子組換え穀粒を含むグループが7以上の場合は、さらに2回目の10グループの分析を行い、1回目と2回目の総和である20グループ中で遺伝子組換え穀粒を含むグループの数を決定し、混入率を評価する。本法の適用機種はABI PRISM® 7900、Applied Biosystems® 7500である。

2.2.4.1. マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた定性検知

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

2.2.4.1.1. 反応液の調製

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

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

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

Applied Biosystems® 7500を使用する場合は、50×ROX Passive Reference溶液の添加量を0.05 µLにする。分注操作終了後、真上からシールし^{*6}、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリ

ング用アプリケーションを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく*7。

*1 DirectAce qPCR Mix No ROXの混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には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 対象プライマー対の配列は、以下のとおりとする。

対象プライマー対	プライマー名	塩基配列 5' - 3'
P35S-1	P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT
	P35S 1-3'	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT
NOS ter-2	NOS ter 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTCTG
	NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTTCCTATCGCGT
IPC-1	IPC 1-5'	CCGAGCTTACAAGGCAGGT
	IPC 1-3'	TGGCTCGTACACCAGCATACTAG
SSIIb-3	SSIIb 3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC
	SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA

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

対象プローブ	塩基配列 5' - 3'
P35S-TaqFB	CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT
NOS-TaqFB	AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA
IPC-TaqFB	TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC

SSIb-TaqHB	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA
------------	---------------------------

- *4 DNA試料液を添加する際は、ピペッティングによる混合を入念に行う。
- *5 IPC用プラスミド溶液は、ニッポンジーン社から購入可能である (Cat No. 315-08241)。
- *6 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター
 MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。
- *7 ABI PRISM® 7900の場合は、プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific社) を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.4.1.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行う。設定を行う項目は、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、SSIb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。

* HEX検出を行うためには、あらかじめ市販のHEX-キャリブレーションプローブを用いて使用するリアルタイムPCR装置にHEX dye登録を行う。登録操作は、リアルタイムPCR装置の取り扱い説明書に従う。HEXキャリブレーションプローブは、ニッポンジーン社から購入可能である (Cat No. 318-06771)

2.2.4.1.3. PCR

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95°Cで10分間加温した後、95°C 15秒間、65°C 1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。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Ct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。

2.2.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）

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

2.2.2.3. 参考検査法

参考検査法として遺伝子組換えトウモロコシ系統判別マルチプレックス定性PCRの検査法を示す。

2.2.2.1.4.において遺伝子組換え穀粒と判定したDNA試料液について定性PCRを行い、系統を判別する。

2.2.4.2.1. リアルタイムPCR

反応液は1ウェル当たり10 μL/wellとし、96ウェルプレートに調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) *1 5 μL、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*2 (各プライマー2.5 μmol/L、プローブ1 μmol/L) 2 μL、水2 μL、20 ng/μL DNA試料液、陽性コントロールDNA試料液*3、又は 5 ng/μL ColE1/TE溶液 (ブランク試料液) 1 μLを混合する*4。分注操作終了後、プレートに真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う*5。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*6を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。プレートをPCR増幅装置*7にセットする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前に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 μmol/L、対象プローブ濃度が1 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。
各プライマー対の塩基配列は以下のとおりとする。

標的	プライマー名	塩基配列 5' - 3'
Bt11系統	Bt11 3-5'	AAAAGACCACAACAAGCCGC
	Bt11 3-3'	CAATGCGTTCTCCACCAAGTACT
Event176系統	E176 2-5'	TGTTACCAGCAGCAACCCAG
	E176 2-3'	ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT
GA21系統	GA21 3-5'	GAAGCCTCGGCAACGTCA

2.2.2.3.1. PCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR緩衝液*1、0.2mmol/L dNTP、1.5mmol/L塩化マグネシウム、プライマー対混合液*2並びに1.25units Taq DNAポリメラーゼ*3を含む液に、2.3.4.で調製したDNA試料液2.5μL (25ng) *4を氷中で加え、全量を25μLにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置*5にセットする。反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 30秒間、65°C 60秒間、72°C 60秒間を1サイクルとして、10サイクルのPCR増幅を行う。続けて95°C 30秒間、60°C 60秒間、72°C 60秒間を1サイクルとして、27サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72°C で7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCRのブランク反応液として、必ずプライマー対混合液を加えないもの及びDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。

*1 PCR緩衝液

PCR buffer II (ライフテクノロジー・ジャパン社製、塩化マグネシウムを含まないもの) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2 プライマー対混合液の各プライマー対最終濃度及び塩基配列は以下のとおりである。

NK603

F-primer(M810 1-5') : 0.2μmol/L : 5'-GAG TTT CCT TTT TGT TGC TCT C-3'

R-primer(NK603 1-3') : 0.2μmol/L : 5'-GCT GCT TGC ACC GTG AAG -3'

Event176

F-primer(Event176 1-5') : 0.05μmol/L : 5'-GTA GCA GAC ACC CCT CTC CAC A-3'

R-primer(cryIA 1-3') : 0.2μmol/L : 5'- TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

T25

F-primer(T25 2-5') : 0.1μmol/L : 5'-GGC ATG ATG TTG GTT TTT GGC AAA G-3'

R-primer(T25 2-3') : 0.1μmol/L : 5'-AAT TCG AGC TCG GTA CCC CT-3'

GA21

F-primer(GA21 1-5') : 0.1μmol/L : 5'-ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG-3'

R-primer(GA21 1-3') : 0.1μmol/L : 5'-TCT CCT TGA TGG GCT GCA-3'

MON863

F-primer(M863 1-5') : 0.2μmol/L : 5'-GAT GAC CTG ACC TAC CAG A-3'

R-primer(M863 1-3') : 0.2μmol/L : 5'-GCA CAC ACA TCA ACC AAA TT-3'

MON810

F-primer(M810 1-5') : 0.2μmol/L : 5'-GAG TTT CCT TTT TGT TGC TCT C-3'

R-primer(cryIA 1-3') : 0.2μmol/L : 5'- TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

ssIIb

F-primer(ssIIb 1-5') : 0.045μmol/L : 5'-CTC CCA ATC CTT TGA CAT CTG C-3'

R-primer(ssIIb 1-3') : 0.045μmol/L : 5'-TCG ATT TCT CTC TTG GTG ACA GG-3'

	<u>GA21 3-3'</u>	<u>ATCCGGTTGGAAAGCGACTT</u>
<u>MON810系統</u>	<u>M810 2-5'</u>	<u>GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA</u>
	<u>M810 2-3'</u>	<u>GGATGCACTCGTTGATGTTG</u>
<u>MON863系統</u>	<u>M863 1-5'</u>	<u>TGACCCTACTTGTTCGGATGG</u>
	<u>M863 1-3'</u>	<u>GCATTGTAGTGCCACCTTC</u>
<u>NK603系統</u>	<u>NK603 1-5'</u>	<u>GGCCAGCAAGCCTTGTAGC</u>
	<u>NK603 1-3'</u>	<u>ATCCCGACTCTTCTCAAGCATA</u>
<u>T25系統</u>	<u>PM1</u>	<u>TCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGA</u>
	<u>revPM1</u>	<u>TACGACATGATACTCCTTCCAC</u>
<u>TC1507系統</u>	<u>TC1507 1-5'</u>	<u>TGAGTTGATCCAGTTACTGCCA</u>
	<u>TC1507 1-3'</u>	<u>ATGTTAGTCGCAACGAAACCG</u>
<u>MIR604系統</u>	<u>MIR604 primer F</u>	<u>GCGCACGCAATTCAACAG</u>
	<u>MIR604 primer R</u>	<u>GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT</u>
<u>MON88017系統</u>	<u>M88017 1-5'</u>	<u>ATCGTGTGACAACGCTAGCA</u>
	<u>M88017 1-3'</u>	<u>CATATTGACCATCATACTATTGCT</u>
<u>DAS-59122-7系統</u>	<u>DAS59122-7-rblf</u>	<u>GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC</u>
	<u>DAS59122-7-rblr</u>	<u>CCTTAATCTCCGTCATGATCAG</u>
<u>MON89034系統</u>	<u>MON89034 primer1</u>	<u>TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT</u>
	<u>MON89034 primer2</u>	<u>CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTAAA</u>
<u>MIR162系統</u>	<u>MIR162-f1</u>	<u>GCGCGGTGCATCTATGTTACTAG</u>

TC1507

F-primer(TC1507 1-5') : 0.1μmol/L : 5'-TTG ACA GGT TTG AGT TGA TTC CAG-3'

R-primer(TC1507 1-3') : 0.1μmol/L : 5'-CCA AGA ACT CAT GTT AGT CGC AA-3'

Bt11

F-primer(Bt11 1-5') : 0.2μmol/L : 5'- CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C-3'

R-primer(cryIA 1-3') : 0.2μmol/L : 5'- TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TTC-3'

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliQ Gold DNA ポリメラーゼ (ライフテクノロジーズジャパン社製)

又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4 DNA試料液の濃度は10ng/mLに調製して使用する。

*5 PCR増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (ライフテクノロジーズジャパン社製) 又は同等

の結果が得られるものを用いる。

	<u>MIR162-r1</u>	<u>TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA</u>
<u>トウモロコシSSIIb</u>	<u>SSIIb 3-5'</u>	<u>CCAATCCTTTGACATCTGCTCC</u>
	<u>SSIIb 3-3'</u>	<u>GATCAGCTTTGGGTCCGGA</u>

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

<u>標的</u>	<u>プローブ名</u>	<u>塩基配列 5' - 3'</u>
<u>Bt11系統</u>	<u>Bt11-2-Taq</u>	<u>CGACCATGGACAACAACCCAAACATCA</u>
<u>Event176系統</u>	<u>E176-Taq</u>	<u>CCGACGTGACCGACTACCACATCGA</u>
<u>GA21系統</u>	<u>GA21-2-Taq</u>	<u>AAGGATCCGGTGCATGGCCG</u>
<u>MON810系統</u>	<u>M810-Taq</u>	<u>AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAA</u>
<u>MON863系統</u>	<u>MON863-Taq</u>	<u>CACCCCAAAGTGTACCAAGCTTCCGA</u>
<u>NK603系統</u>	<u>NK603-Taq</u>	<u>ATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGCGGC</u>
<u>T25系統</u>	<u>FBP3</u>	<u>TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCG</u>
<u>TC1507系統</u>	<u>TC1507-Taq</u>	<u>ACTCGAGTAAGGATCCGTCGACCTGCAG</u>
<u>MIR604系統</u>	<u>MIR604 probe</u>	<u>AGGCGGGAACGACAATCTGATCATG</u>
<u>MON88017系統</u>	<u>M88017-1-Taq</u>	<u>TGCCGGAGTATGACGGTGACGATATATCA</u>
<u>DAS-59122-7系統</u>	<u>DAS59122-7-rbls probe</u>	<u>TTTAAACTGAAGCGGGAACGACAA</u>
<u>MON89034系統</u>	<u>MON89034 probe</u>	<u>ATCCCCGAAATTATGTT</u>
<u>MIR162系統</u>	<u>MIR162-p1</u>	<u>TCTAGACAATTCAGTACATTAACGTCGCCA</u>

トウモロコシSSIIb	SSIIb-Taq	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA
-------------	-----------	---------------------------

*3 陽性コントロールDNA試料

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

*4 反応液の調製

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

*5 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*6 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad(Thermo Fisher Scientific社) を使用する。Applied Biosystems® 7500の場合は不要である。20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

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

(削る)

2.2.2.3.2. 系統判別

ブランク反応液を除く全てのレーンでSSIIb (151bp) のPCR増幅バンドが検出されていることを確認する。次にDNA分子量標準を基に、SSIIb以外の検出されたPCR増幅バンドの予定長を概算する。検出されたPCR増幅バンドの遺伝子組換えトウモロコシ系統を判別する*。ブランク反応液を除く全てのレーンでSSIIbの増幅バンドが検出されなかった場合は、電気泳動以降の操作をやり直す。再度、同様の結果が得られた場合は、改めてPCR増幅以降の操作を実施して判別を行う。

* 各遺伝子組換えトウモロコシ系統のPCR増幅バンドの予定長

--	--	--

<u>Targetted GM</u>	<u>Name</u>	<u>Amplicon (bp)</u>
<u>NK603</u>	<u>M810 1-5'</u> <u>NK603 1-3'</u>	<u>444</u>
<u>Event176</u>	<u>Event176 1-5'</u> <u>cryIA 1-3'</u>	<u>343</u>
<u>T25</u>	<u>T25 2-5'</u> <u>T25 2-3'</u>	<u>311</u>
<u>GA21</u>	<u>GA21 1-5'</u> <u>GA21 1-3'</u>	<u>270</u>
<u>MON863</u>	<u>M863 1-5'</u> <u>M863 1-3'</u>	<u>234</u>
<u>MON810</u>	<u>M810 1-5'</u> <u>cryIA 1-3'</u>	<u>199</u>
<u>ssIIb</u>	<u>ssIIb 1-5'</u> <u>ssIIb 1-3'</u>	<u>151</u>
<u>TC1507</u>	<u>TC1507 1-5'</u> <u>TC1507 1-3'</u>	<u>131</u>
<u>Bt11</u>	<u>Bt11 1-5'</u> <u>cryIA 1-3'</u>	<u>110</u>

2.2.4.2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行う。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する。設定したDetectorをSet upタブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類を「Unknown」と指定する。またPassive Referenceを「ROX」と設定する。

(新設)

2.2.4.2.3. 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、60℃ 1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulationモードのチェックを入れておく。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

(新設)

2.2.4.2.4. 結果の判定

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

(新設)

2.3. ダイズ加工食品の検査法

(新設)

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*。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。

* RoundupReady Soybean (40-3-2) (以下、RRS) 及びLiberty Link Soybean (Event A2704-12) (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。

Le1検知: Le1-n02 [Le1n 02-5' (5' -GCCCTCTACTCCACCCCA-3') & Le1n 02-3' (5' -GCCCATCTGC AAGCCTTTT-3')] 及び Le1-Taq (5' -FAM-AGCTTCGCGCTTCCTCAACTTAC-TAMRA-3')
P35S検知: P35S-1 [P35S 1-5' (5' -ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3') & P35S 1-3' (5' - CCTCTCCAAATGAAATGAACTCCT-3')] 及び P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTCCT-TAMRA -3')
RRS2検知: MON89788-F (5' -TCCCGCTCTAGCGCTCAAT-3')、 MON89788-R (5' -TCGAGCAGGAC CTGCAGAA-3') 及び MON89788-P (5' -FAM-CTGAAGCGGGAACGACAATCTG-TAMRA-3')

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 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、水9 µL、20 ng/µL DNA試料液2.5 µL (50 ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL*2。分注操作終了後、真上からプレートの蓋*3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ウェルプレート及びプレートの蓋

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

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについてReporterが「FAM」、Referenceが「ROX」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する。

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

装置にプレートをセットし、装置の蓋の温度 (cover temperature) が105°C

付近になったことを確認した後、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th) として0.2に設定する。ただし、Thがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようThを適宜設定する。そのThから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38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) ダイズ陽性対照試験にて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38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38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25 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) *1 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.5 µL、水9 µL、20 ng/µL DNA試料液2.5 µL (50 ng) 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL *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 *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。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。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。

*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

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

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

PCR用反応液は20 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) *1 10 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µmol/L) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.4 µL、水7.2 µL、20 ng/µL DNA試料液2 µL (40 ng)、又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2 µL*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 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。

*3 384ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*。設定したDetectorをSet upタブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液) をTask欄において指定する。また、Passive Referenc

e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が良い。

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

装置にプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 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、960 0 emulationモードのチェックを入れておく。また、96ウェルと384ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.3.2.5. 測定結果の解析と判定 (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、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th) として0.2に設定する。ただし、Thがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようThを適宜設定する。そのThから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。

2.3.3. ABI PRISM® 7000を用いた定性PCR

2.3.3.1. PCR用反応液の調製（ABI PRISM® 7000）

PCR用反応液は25 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific社）*1 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µmol/L）0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.5 µL、水9 µL、20 ng/µL DNA試料液2.5 µL（50 ng）又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL*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*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。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。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 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

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate(Thermo Fisher Scientific社)及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社)を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific社)を使用する。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.3.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性はDetector Manager画面上でReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」となるよう設定する*。設定したDetectorをWell Inspectorに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA試料液）をTask欄において指定する。また、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

* Detector の設定

Detectorは各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくが良い。

2.3.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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、960 0 emulationモードのチェックを入れておく。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.3.3.4. 測定結果の解析と判定 (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、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th) として0.2に設定する。ただし、Thがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようT

h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を用いた定量PCR

2.3.4.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ 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) *¹ 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μ mol/L) 0.5 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L) 0.5 μ L、水9 μ L、20 ng/ μ L DNA試料液2.5 μ L (50 ng) 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC) 2.5 μ 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*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 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

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate(Thermo Fisher Scientific社)及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社)を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、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が良い。

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、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th) として0.2に設定する。ただし、Thがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようThを適宜設定する。そのThから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。

2.3.5. Roche LightCycler Systemを用いた定性PCR

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

PCR用反応液は20 μ L/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC- FastStart DNA Master Hybridization Probes*1 2 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μ mol/L）0.4 μ L、対象プローブ（10 μ mol/L）0.4 μ L、水9.8 μ L、MgCl₂溶液（25 mM）2.4 μ L、10 ng/ μ L DNA試料液5 μ L（50 ng）又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）5 μ L*2。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*3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 LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes

LC-FastStart Enzyme (1a red cap) とLC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes (1b colorless cap) とを混合し、調製する。調製したLC-FastStart DNA Master Hybridization Probesは、4°Cで一週間の保存が可能である。また、本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。

*2 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 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカラーセル遠心機を使用し行うか、又は汎用の遠心機を使用する場合には700×g以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作のいかんに関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカラーセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

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

反応に際しては、キャピラリー情報の設定を行わなければならない。具体的にはサンプルリスト作成画面上で、調製したキャピラリーの配置（カラーセル上の配置）に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA試料液）をType欄において指定する。また、Seek Temperatureを30°Cと設定し、Maximum Positionにはカラーセルに装填したキャピラリーの最大位置番号を入力する。

2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)

装置にカ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 加温、冷却速度

ここに示している以外、加温、冷却の速度は20℃ /秒とする。

*2 データの取り込み設定

データの取り込み設定の実際は、サイクルプログラムデータ画面において、59℃ 30秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

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

反応が終了していることを確認した後、「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」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。

2.4. トウモロコシ加工食品の検査法

(新設)

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*) 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。

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10 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) *1 5 µL、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 µmol/L) 0.016 µL*2、SSIIb 3-3' (50 µmol/L) 0.016 µL*2、P35S 1-5' (50 µmol/L) 0.05 µL*3、P35S 1-3' (50 µmol/L) 0.05 µL*3、NOS ter 3-5' (50 µmol/L) 0.06 µL*4、NOS ter 2-3' (50 µmol/L) 0.06 µL*4、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 µmol/L) 0.08 µL*5、P35S-Taq (10 µmol/L) 0.1 µL*6、NOS-Taq (10 µmol/L) 0.12 µL*7、水3.448 µL、20 ng/µL DNA試料液1 µL又は蒸留水 (ブランク試料液 : NTC) 1 µL *8。試験は、1 DNA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*9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*10し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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*11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。

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

SSIb 3-3' : 5' -GATCAGCTTTGGGTCGGA-3'

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

*3 P35S 1-5' 及びP35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

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

P35S 1-3' : 5' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

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

*4 NOS ter 3-5' 及びNOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

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

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

*5 SSIb-TaqV

蛍光色素としてVICで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*6 P35S-Taq

蛍光色素としてFAMで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCT-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-AGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCGCAA-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

SSIb 3-5' 0.2 µmol/L、SSIb 3-3' 0.2 µmol/L、P35S 1-5' 0.625 µmol/L、P35S 1-3' 0.625 µmol/L、NOS ter 3-5' 0.75 µmol/L、NOS ter 2-3' 0.75 µmol/L、SSIb-TaqV 0.2 µmol/L、P35S-Taq 0.25 µmol/L、NOS-Taq

0.3 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。

*10 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate(Thermo Fisher Scientific社)及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社)を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific社)を使用する。なお、20回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「N TC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA試料液)の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、SSIIbは、Reporterが「VIC」、Quencherが「TAMRA」、P35S+TNO SはReporterが「FAM」、Quencherが「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Referenceを「ROX」と設定する。

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

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

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30秒間、59°C 1分30秒間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において9600 emulationモードのチェックを入れておく。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.4.1.4. 測定結果の解析と判定 (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+TNO S) 検知試験において目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えトウモロコシ陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、ΔRnのノイズ幅の

最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th) として0.2に設定する。ただし、Thがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようThを適宜設定する。そのThから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multi component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 µL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。
FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) *1 5 µL、対象プライマーとしてSSIIb 3-5' (50 µmol/L) 0.016 µL*2、SSIIb 3-3' (50 µmol/L) 0.016 µL*2、P35S 1-5' (50 µmol/L) 0.05 µL*3、P35S 1-3' (50 µmol/L) 0.05 µL*3、NOS ter 3-5' (50 µmol/L) 0.06 µL*4、NOS ter 2-3' (50 µmol/L) 0.06 µL*4、対象プローブとしてSSIIb-TaqV (10 µmol/L) 0.08 µL*5、P35S-Taq (10 µmol/L) 0.1 µL*6、NOS-Taq (10 µmol/L) 0.12 µL*7、水3.448 µL、20 ng/µL DNA試料液1 µL又は蒸留水（ブランク試料液：NTC）1 µL*8。試験は、1 D

NA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⁹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¹⁰し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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 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 SSIb 3-5' 及びSSIb 3-3'

配列は以下のとおりである。

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

SSIb 3-3' : 5' -GATCAGCTTTGGGTCGGA-3'

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

*3 P35S 1-5' 及びP35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

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

P35S 1-3' : 5' -CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

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

*4 NOS ter 3-5' 及びNOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

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

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

*5 SSIb-TaqV

蛍光色素としてVICで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*6 P35S-Taq

蛍光色素としてFAMで標識している。配列は以下のとおりである。

5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCT-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-AGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCGCAA-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 µmol/L、SSIIb 3-3' 0.2 µmol/L、P35S 1-5' 0.625 µmol/L、P35S 1-3' 0.625 µmol/L、NOS ter 3-5' 0.75 µmol/L、NOS ter 2-3' 0.75 µmol/L、SSIIb-TaqV 0.2 µmol/L、P35S-Taq 0.25 µmol/L、NOS-Taq 0.3 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。

*10 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリークレーター

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

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

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、VICにはSSIIb、FAMにはP35S+TNOSを割り当てる*。

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

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

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30秒間、59°C 1分30秒間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

2.4.2.4. 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。

2.5. ダイズ及びトウモロコシからのDNA抽出精製法 （略）

2.5.1 ダイズ及びトウモロコシ穀粒からのDNA抽出精製法

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製するCTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。市販のDNA抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販のDNA抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシ、ダイズ等の穀粒からPCRに利用可能なDNAを抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB法とシリカゲル膜タイプキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit

2.3. DNA抽出精製法 （略）

2.3.1 トウモロコシ及び大豆穀粒からのDNA抽出精製法

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製するCTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。市販のDNA抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販のDNA抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシ、大豆等の穀粒からPCRに利用可能なDNAを抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB法とシリカゲル膜タイプキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit

並びにNIPPON GENE GM quicker) を用いた方法、シリカベースのレジンタイプのキット (Promega Wizard DNA Clean-up System) を用いた方法を記す。なお、シリカゲル膜タイプキット法は、使用するキット及び適用する試料によって操作方法が異なるため注意する。

2. 5. 1. 1. CTAB法 (略)

*1 CTAB緩衝液
(略)

*2 (略)

*3 フェノール/クロロホルム混合液
(略)

*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液
(略)

*5 TE緩衝液
(略)

*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)

均質に粉砕した試料2 gをポリプロピレン製遠沈管 (50 mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液^{*1}10 mLとRNase A 20 µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで15分間加温する。その間2、3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。P3緩衝液^{*2} 3, 250 µL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^{*3}。次いでその上清 500 µL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 (15 mL容) に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の1. 5倍量のAW1緩衝液^{*4}を加える。その混合液500 µLをmini spin columnに負荷し、10, 000×g以上で1分間^{*5}遠心する。残りの混合液のうち、さらに500 µLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いでAW2緩衝液^{*6} 500 µL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70 µL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^{*7}とする。

*1 AP1緩衝液

並びにNIPPON GENE GM quicker) を用いた方法、シリカベースのレジンタイプのキット (Promega Wizard DNA Clean-up System) を用いた方法を記す。なお、シリカゲル膜タイプキット法は、使用するキット及び適用する試料によって操作方法が異なるため注意する。

2. 3. 1. 1. CTAB法 (略)

*1 CTAB緩衝液
(略)

*2 (略)

*3 フェノール/クロロホルム混合液
(略)

*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液
(略)

*5 TE緩衝液
(略)

*6 (略)

2. 3. 1. 2. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用)

均質に粉砕した試料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^{*1}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。AP2緩衝液^{*2} 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^{*3}。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AP3緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}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^{*6}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AW緩衝液^{*7} 500µLを負荷し、10, 000×g以上で1分間^{*8}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^{*9}とする。

*1 AP1緩衝液

(略)

*2 P3緩衝液

(略)

*3 遠心後の上清

(略)

*4 AW1緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW1緩衝液とする。

*5 遠心時間

(略)

*6 AW2緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW2緩衝液とする。

*7 (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)

均質に粉砕した試料 1 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液^{*1} 10 mLとRNase A 20 µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間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 7 mLを、ポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移す。P3緩衝液^{*2} 2,500 µL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^{*3}。得られた上清のうち8 mLを新しい15 mLチューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、500 µL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（15 mL容）に移す。その溶出液の1.5倍量のAW1緩衝液^{*4}を加える。混合液 500 µLをmini spin columnに負荷し、10,000×g以上で1分間^{*5}遠心する。残りの混合液のうち、さらに500 µLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いでAW2緩衝液^{*6} 500 µL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 70 µL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^{*7}とする。

(略)

*2 AP2緩衝液

(略)

*3 遠心後の上清

(略)

*4 AP3緩衝液

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

*5 AP3緩衝液・エタノール混液

AP3緩衝液^{*4}とエタノール（96-100%）を1:2で混合したものをAP3緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

(略)

*7 AW緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW緩衝液とする。

*8 (略)

2.3.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: 大豆に適用)

均質に粉砕した試料 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^{*1} 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。AP2緩衝液^{*2} 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^{*3}。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AP3緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}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^{*6}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AW緩衝液^{*7} 500µLを負荷し、10,000×g以上で1分間^{*8}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^{*8}とする。

*1 AP1緩衝液
(略)

*2 P3緩衝液
(略)

*3 遠心後の上清
(略)

*4 AW1緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものをAW1緩衝液とする。

(削る)

*5 遠心時間
(略)

*6 AW2緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものをAW2緩衝液とする。

*7 (略)

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)

(略)

*1 GE1緩衝液
(略)

*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30~60秒間攪拌する。

*3 GE2緩衝液
(略)

*4 (略)

*5 (略)

*6 (略)

*7 GB3緩衝液を添加し、続いてエタノール (100%) を添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

*8 (略)

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)

*1 AP1緩衝液
(略)

*2 AP2緩衝液
(略)

*3 遠心後の上清
(略)

*4 AP3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。

*5 AP3緩衝液・エタノール混液

AP3緩衝液*4 とエタノール (96-100%) を1:2で混合したものをAP3緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間
(略)

*7 AW緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものをAW緩衝液とする。

*8 (略)

2. 3. 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)

(略)

*1 GE1緩衝液
(略)

*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30~60秒間攪拌する。

*3 GE2緩衝液
(略)

*4 (略)

*5 (略)

*6 (略)

*7 GB3緩衝液を添加し、続いてエタノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

*8 (略)

2. 3. 1. 5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: 大豆に適用)

(略)

*1 GE1緩衝液
(略)

*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50 mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30~60秒間攪拌する。

*3 GE2緩衝液
(略)

*4 (略)

*5 (略)

*6 (略)

*7 GB3緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

*8 (略)

2. 5. 1. 6. シリカベースレジソタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)

(略)

*1 抽出用緩衝液
150 mmol/L NaCl、2 mmol/L EDTA及び1% SDSを含む10 mmol/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

食品表示基準第3条2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、1 g を採取し、ダイズ加工食品においては「2. 5. 2. 2. 1. DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの

(略)

*1 GE 1 緩衝液
(略)

*2 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスに対して50mL容チューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに30~60秒間攪拌する。

*3 GE2緩衝液
(略)

*4 (略)

*5 (略)

*6 (略)

*7 GB3緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

*8 (略)

2. 3. 1. 6. シリカベースレジソタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)

(略)

*1 抽出用緩衝液
150mM 塩化ナトリウム、2mmol/L EDTA及び1% SDSを含む10mmol/L Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5)

*2 (略)

(新設)

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、2 g を採取し、「2.5.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNA の抽出」に従う。CTABを用いる方法の場合は、各項目に示した試料量を採取し、「2.5.2.2.4. CTABを用いたDNA の抽出」に従う。なお、DNA抽出は1試料当たり2併行で行う。

加工食品においては、その加工工程でDNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能なDNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

2.5.2.1. 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, RRS2) を検知するための前処理を示す。

① 豆腐・油揚げ類

①-1 豆腐

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、120 mg 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。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K処理を行う。厚揚げの場合、中の柔らかい部分のみを豆腐と同様に処理しても良い。

② 凍豆腐、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、200 mg 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、100 mg 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砕器に移し粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、150 mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

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、200 mgを採取し、Proteinase K処理を行う。

* 台所用品の水切りネットを使い捨てにして使用するとよい。

④ 豆乳類

試料をよく振って混合したものを直接、抽出に供する。なお、CTABを用いる方法による場合は、50 µLを採取する。石英砂を加える必要はない。

⑤ みそ

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、200 mg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、200 mg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、200 mg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、100 mg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、100 mg を採取し、Proteinase K処理を行う。

⑩ ①から⑨までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑩-1 液体

「④ 豆乳類」に従う。

⑩-2 液体以外

ダイズのみ（又はダイズ以外）分離が可能なものについては分離し、原材料に従い①から⑨までの各項目を参照する。

分離が困難なものについてはそのまま、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、100 mg を採取し、Proteinase K処理を行う。

⑪ 大豆（調理用）を主な原材料とするもの

ダイズのみ（又はダイズ以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのまま、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、100 mg を採取し、Proteinase K処理を行う。

⑫ 大豆粉を主な原材料とするもの

⑪に同じ。

⑬ 大豆たん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、250 mg を採取し、Proteinase K処理を行う。

⑬-2 その他

⑪に同じ

⑭ 枝豆を主な原材料とするもの

⑩に同じ。

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

⑮ 大豆もやしを主な原材料とするもの

⑩に同じ。

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

2.5.2.1.2. トウモロコシ加工食品

遺伝子組換えトウモロコシの定性スクリーニング検査を行うための前処理を示す。

① コーンスナック菓子

①-1 コーンチップス

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

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砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、400 mg を採取する。

② コーンスターチ

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

③ ポップコーン

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料の3倍の重さの滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

④ 冷凍とうもろこし

試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量）を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕す

る。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

⑤ どうもろこし缶詰及びどうもろこし瓶詰

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。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

⑥ コーンフラワーを主な原材料とするもの

コーンフラワーのみ（又はコーンフラワー以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのままの、試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、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、200 mg を採取する。

⑦ コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。）

⑥に同じ。

⑧ どうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの

⑥に同じ。

⑨ ①から⑤までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑥に同じ。試料1パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、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、200 mg を採取する。

2.5.2.2. DNAの抽出精製

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

均質に粉碎した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAPI緩衝液*1 10 mLとRNase A 20 µLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間15分ごとに3回、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌する。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沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を7 mL採取し、新しい15 mL（又は50 mL）容チューブに移す。

チューブに、P3緩衝液*2 2.5 mLを添加後、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌後、氷水中に15分間静置する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で35分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を8 mL採取し、QIA shredder spin column (lilac) に負荷する。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7.5 mL採取し、上清を新しい50 mLチューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌した後、マイクロピペットを用いて6.8 mLを採取し、新しい50 mLチューブに移す。AW1緩衝液*3 10.2 mLを添加し、ボルテックスミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌した後、デカンテーションにより溶液全量をDNeasy spin column (colorless) に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で15分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムにAW2緩衝液*4 12 mLを加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g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℃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、2 mLのサンプルチューブに移す。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり10回転倒混和後、5分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000×gで4℃、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール500 μLを添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。遠心分離器を使用し、12,000×gで4℃、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100 μL を加え、沈殿物を溶解させる*5。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 時間掛けても不溶物が認められる場合は、12,000×gで4℃、3分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA試料原液とする。なお、沈殿も-20℃以下で保存すること。

*1 AP1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant 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 AW1緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものをAW1緩衝液とする。

*4 AW2緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW2緩衝液とする。

*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100 μ L、トウモロコシ及びトウモロコシ加工食品においては、水50 μ Lで行うと良い。

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

① 得られたDNA 溶液を、エタノール沈殿等を行い濃縮する。

② 最初からDNA 抽出をやり直し、DNA の融解に用いる水を20 μ L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）

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液^{*1} 5 mLとRNase A 10 μ Lを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで1時間加温する。その間15分ごとに3回、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌する。チューブに、P3緩衝液^{*2} 1.8 mLを添加後、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌後、氷水中に15分間静置する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times 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4.2 mL採取し、QIA shredder spin column (lilac) に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \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4 mL採取し、上清を新しい50 mLチューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌した後、マイクロピペットを用いて3.4 mLを採取し、新しい50 mLチューブに移す。AW1緩衝液^{*3} 5.1 mLを添加し、ボルテックスミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌した後、デカンテーションにより溶液全量をDNeasy spin column (colorless) に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times 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^{*4} 12 mL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 \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、2 mLのサンプルチューブに移す。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり10回転倒混和後、5 分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000 \times gで4°C、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール500 μ L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℃、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）100 μLを加え、沈殿物を溶解させる。指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し、最後に一晚（12-24時間）冷蔵庫に静置する。目視で不溶物がないことを確認し、これをDNA抽出溶液とする。24時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×gで4℃、3分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA試料原液とする。なお、沈殿も-20℃以下で保存すること。

*1 API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 AW1緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW1緩衝液とする。

*4 AW2緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものをAW2緩衝液とする。

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

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、G2緩衝液^{*1} 7.5 mLを加え、試験管ミキサーで激しく混合する。さらにチューブに、G2緩衝液7.5 mL、Proteinase K 200 μL、及びRNase A 20 μLを加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、ボルテックスミキサーを用いて攪拌する。50℃の恒温水槽中で1時間保温する。その間15分ごとに3回、ボルテックスミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌する。シングル式遠心分離器を使用し、3,000×gで4℃で15分間遠心分離する。15 mL容チューブ又は50 mL容チューブに、マイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。チューブをフラッシュ遠心する。QIAGEN Genomic-tip 20/Gに、QBT緩衝液^{*2} 1 mLを負荷し平衡化する。上清を2 mLずつQIAGEN Genomic-tip 20/Gに負荷し、全量を自然流下させる。QIAGEN Genomic-tip 20/Gに、QC緩衝液^{*3} 2 mLを負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。このカラムの洗浄操作を、更に2回行う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを1.5 mL容チューブに移し、あらかじめ50℃に温めておいたQF 緩衝液^{*4} 750 μLを加え、DNAを溶出する（溶出1）。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを新しい1.5 mL容チューブに移し、あらかじめ50℃に温めておいたQF 緩衝液 750 μLを加え、DNA を溶出する（溶出2）。溶出1及び溶出2の液

量を量り、それぞれに等量のイソプロパノールをそれぞれ添加し、上下にゆっくり10回転倒混和後、5分間室温で静置する。12,000×gで4℃、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。70 %エタノール1 mLを添加し、上下にゆっくり10回転倒混和する。12,000×gで4℃、3分間遠心分離し、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。溶出2のチューブに水50 μLを加え、沈殿物を65℃で15分間振とう溶解させる。次いで、溶出2のチューブの液を全量、溶出1のチューブに入れ、DNAを65℃で15分間振とう溶解する。指先でチューブをはじき、12-24時間冷蔵庫に静置する。目視で不溶物がないことを確認し、これをDNA抽出溶液とする。24時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×gで4℃、3分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA 試料原液とする。なお、沈殿も-20℃以下で保存すること。

*1 G2緩衝液

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

*2 QBT緩衝液

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

*3 QC緩衝液

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

*4 QF緩衝液

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

2.5.2.2.4. CTABを用いたDNA の抽出

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

3,000×g、3分間遠心分離する。上清を捨て^{*9}、5分間真空乾燥^{*10}する。TE 100 μl、RNase A (10 mg/mL) 2 μlを加え、DNAを溶解する。室温又は37°Cで30分間静置した後、CTAB抽出液400 μlを加える。CIA 500 μlを加えて軽く混和する。13,000×g、15分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え^{*8}、30秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、13,000×g、3分間遠心分離する。上清を捨て^{*9}、5分間減圧乾燥^{*11}する。滅菌水100 μlを加え、DNAを溶解する。溶液は小分けして-20°C以下で凍結保存する^{*11,12}。

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

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

*3 CTAB抽出液：0.1 mol/L Tris-HCl、0.02 mol/L EDTA、1.4mol/L NaCl、2 % CTAB、1 % ポリビニルピロリドンK30、0.2% 2-メルカプトエタノール。メルカプトエタノールはオートクレーブ滅菌の後、十分に冷めたら加える。

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

*5 通常は最大遠心でよい。

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

*7 水層からフェノールを除くための操作。

*8 DNA を沈殿させる。ただし、試料溶液の塩濃度や糖類の量によって条件が変わることもある。

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

*10 遠心濃縮機又は小型のデシケータを使う。乾燥の具合は目視で確認する。

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

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

2. 5.3. DNA試料原液中のDNAの純度の確認及びDNA試料液の調製と保存 (略)

2. 3.2. 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)

*1 (略)

*2 (略)

*3 (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

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

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

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

*3 48ウェルユニプレート (Whatman) 又は同等品を用いる。

*4 組織溶解液の組成は20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、5 mmol/L EDTA、400 mmol/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 75 mm幅のビニールテープの代わりに、LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics社)、MicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) 及びこれらの同等品を使用してもよい。

*6 スイング式遠心分離器がない場合は、破片などの不溶物をなるべく吸い込まないようにして上清を回収する。

(削る)

*1 (略)

*2 (略)

*3 (略)

2. 3.3. トウモロコシ粒単位のDNA抽出精製法

2.3.3.1. 粒単位の粉砕

トウモロコシ穀粒500gから92粒をランダムサンプリングし、各粒の表面に付着している他の穀粒由来の破片を洗浄する。ランダムサンプリングした検体試料92粒を、蒸留水で洗浄後、次いで1% SDS水溶液で洗浄除去する。再び蒸留水で洗浄する。SDSを完全に洗い流すために、最後の蒸留水による洗浄は繰り返して行う。40℃の恒温槽で40分間乾燥させる。各粉砕用チューブ*1に検体試料1粒とメタルコーン*1個を順に入れ、しっかりふたをして粉砕器専用ラック*1にのせ、粉砕器*2を用いて粉砕 (2,500rpm、60秒間) する。均一に粉砕するために専用ラックを反転させて再度粉砕操作を行い、粉砕試料とする。

*1 粉砕用チューブはST-0350F-0 (安井器械社製) 又はその同等品、メタルコーンはMC-0316 (安井器械社製) 又はその同等品、粉砕器専用ラックはTR-348FP (安井器械社製) を用いる。

*2 粉砕器はMULTI-BEADS SHOCKER® MB701 (安井器械社製) 又はその同等品を用いる。

2.3.3.2. 粒単位のDNA抽出

以下のシリカゲル膜タイプキット法A (QIAGEN DNeasy96 Plant kit) 又はシリカゲル膜タイプキット法B (NIPPON GENE GM quicker 96) に従って、92粒毎の粉砕試料からDNA抽出を行う。

2.3.3.2.1. シリカゲル膜タイプキット法A (QIAGEN DNeasy96 Plant kit)

粉砕試料の入った各粉砕用チューブにBuffer AP1 Premix 1mLずつ添加する^{*1} ^{*2}。各粉砕用チューブを粉砕器専用ラックに移し、粉砕器にセットする。粉砕器専用ラックを固定するため、カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めした後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で粉砕試料とBuffer AP1 Premixを混合する。その後、粉砕用チューブをチューブ用ラック^{*3}に移し、65℃の恒温層（又はWater Bath等^{*4}）で30分間、保温する。保温中は10分ごとにラックごと10回反転させ、混合する^{*5}。

各粉砕用チューブにBuffer AP2を、170μLずつ添加し^{*6}、フタを閉めた後にチューブ用ラックごと5回反転させ、混合する。チューブ用ラックを-20℃の冷凍庫で30分間静置する。

各粉砕用チューブを粉砕器専用ラックに移し、遠心機^{*7}にセットする。室温下、2,900rpmで20分間の遠心^{*8}の後、沈殿物の浮遊を防ぐため、慎重に粉砕器専用ラックを取り出す。各粉砕用チューブ内の上清を、マイクロピペットを用いて600μL、事前にラベルしておいた1.5mL容チューブに採取する。上清の入った1.5mL容チューブを更に微量高速冷却遠心機で4℃、10,000×g以上、5分間の条件下で遠心する^{*9} ^{*10}。再度その上清400μLを、マイクロピペットを用いて、事前にラベルした2mL容チューブに採取する。

次いで、バキュームポンプ、Vacuum Regulator、QIAvacをホースで連結し、QIAvac内にCollection Microtubesを、QIAvac上にDNeasy 96 Plateをセットする^{*11} ^{*12}。

Buffer AP3 600μL^{*13}を、上清の入った2mL容チューブに添加する^{*14}。これをAP3 混合液とする。Vortexで3秒間混合した後、DNeasy 96 Plateの各ウェルにAP3 混合液を、マイクロピペットを用いて1mLずつ添加し^{*15}、シールで密閉する^{*16}。バキュームポンプの電源を入れ、Vacuum Regulatorの弁を閉めて吸引を行う。全てのAP3 混合液がカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け圧力を開放してから、ポンプの電源を切る。Collection Microtubesに溜まった溶出液は廃棄する^{*17}。DNeasy 96 Plateの全ウェルにBuffer AWを800μLずつ添加する^{*18}。先の操作と同様にシールをして^{*16}吸引を行う。

全てのBuffer AWがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Collection Microtubesに溜まった溶出液は廃棄する^{*17}。

DNeasy 96 Plate各ウェルに99.5%エタノール（特級）を800μLずつ添加する^{*19}。添加後、先の操作と同様にシールをして吸引を行う。全てのエタノールがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Collection Microtubesを取り出し、溶出液ごと廃棄する。新しいCollection Microtubesをセットし、DNeasy 96 Plateは再度シールをして密閉し、30分間吸引してカラムを乾燥させる^{*20}。乾燥後、端からシールをはがし、Vacuum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。その後、Collection Microtubeは

取り除く。

DNA採取用のElution Microtubesを取り付け、DNeasy 96 Plate各ウェルにあらかじめ65°Cに保温しておいたDWを75μLずつ添加し^{*21}、シールして密閉する^{*16}。室温で5分間、静置した後、先の操作と同様に吸引を行う。全てのDWがカラムを通過したことを確認したら、逆流を防ぐため端からシールを慎重にはがし、Vacum Regulatorの弁を開け、ポンプの電源を切る。吸引後、Elution Microtubesに溜まった溶出液はそのままにしておき、再度、あらかじめ65°Cに保温しておいたDWを75μLずつ添加し^{*21}、シールして密閉する。室温で5分間、静置した後、吸引を行う。この溶出液（150μL）をDNA 試料液^{*22}とする。

^{*1} あらかじめ65°Cに温めておいたBuffer AP1 1mLに対してRNase A 1μLを加え、Buffer AP1 Premixを必要量調製する。Buffer AP1 Premixを添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容専用チップコンビチッププラスは1回の充てんで10回までの連続分注が可能である。

^{*2} 粉碎チューブは事前に全てのフタを緩めておき、Buffer AP1 Premixを加える直前にフタを空け、1本添加する度にフタを閉めるとコンタミネーションを極力防止できる。以後の操作も同様に行う。また、フタに粉末試料が付着している場合、フタをあける際に粉末試料が飛散することが考えられる。飛散を防ぐため、ベンチ台で軽くタッピングして試料を落とす。Buffer AP1 Premixを添加する際にも、粉末が飛散するのを防ぐため、慎重にチューブの壁に添加する。この時、チップの先が壁に接触した場合はチップを交換する。

^{*3} チューブ用ラックはTR-03（安井器械社製）又はその同等品を用いる。

^{*4} Water Bathを用いる場合、紙ラックごとチャックつきのビニール袋に入れて密閉し、水の混入やラベル消失を防ぐ。

^{*5} 粉末試料がチューブの底に溜まらないようになるまで混合する。

^{*6} Buffer AP2を添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ（1mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。1mL容コンビチッププラスは2回の充てんで5回までの連続分注が可能である。

^{*7} 遠心機はMETALFUGE® MBG101（安井器械社製）又はその同等品を用いる。

^{*8} 遠心中に、番号（No. 1～No. 92）をラベルした1.5mL容チューブ及び2mL容チューブを用意しておく。

^{*9} 上清を採取する際は、沈殿物や上層の膜状の物ができている場合もあるので、それらを取らないように慎重に行う。

^{*10} 回転数は14,000×gを推奨。

- *11 バキュームポンプはDA-60D（実効排気速度：60 L/分、到達圧力：3.3 kPa）（ULVAC社製）又はその同等品を用い、Vacuum Regulatorは（キアゲン社製）又はその同等品を用いる。
- *12 DNeasy 96 PlateはA1のウェルが左上にくるようにセットする。DNeasy 96 Plateの排出口とCollection Microtubesの注入口がしっかりと連結するよう、Collection MicrotubeとQIAvacの間に専用の板等を挟み底上げする。また、QIAvac内が密閉できないと溶出が正確に行われなため、隙間ができていないか確認しておく。
- *13 採取できた上清が400μLに満たない場合は、実際に採取した上清量に対して1.5倍量のBuffer AP3を添加する。
- *14 Buffer AP3を添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで16回までの連続分注が可能である。
- *15 添加する際、DNeasy 96 PlateはQIAvac上にセットされた状態で行う。またA1ウェルにNo.1のAP3混合液を添加し、A2にNo.2、A3にNo.3となるよう左上から右下に向かって順にAP3混合液を添加する。
- *16 シールで各ウェルが密閉されていない場合、コンタミネーションや低収量の原因となるため、しっかりと密閉できていることを確認する。
- *17 チューブをビニールテープで束ねておく、又は指で固定しながら廃棄するとチューブの離脱を防げる。溶出液を廃棄する際は、Collection Microtubesごとデカンテーションで廃棄する。この際、廃液がCollection Microtubesに付着するが、キムワイプ等でふき取る。
- *18 Buffer AWを添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで12回までの連続分注が可能である。
- *19 エタノールを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで12回までの連続分注が可能である。
- *20 エタノールの残存は、2.2.2.項に記述のPCR法への反応阻害が考えられる。その阻害を防ぐため、乾燥操作前にDNeasy 96 Plateの排出口をキムワイプに押し付けてよく拭き取る。十分に乾燥を行うことが望ましい。
- *21 DWを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ（2.5mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラスまたはその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加

する。2.5mL容コンビチッププラスは1回の充てんで33回までの連続分注が可能である。

*22 DNA試料液は、各チューブにCollection Microtube capsを取りつけ、2.2.2.項の検査法に使用するまで4℃で保存する。

2.3.3.2.2. シリカゲル膜タイプキット法B (NIPPON GENE GM quicker 96)

粉碎試料の入った各粉碎用チューブにGE1 Buffer Premix 1.5mLずつ添加する*1 *2。各粉碎用チューブを粉碎机専用ラックに移し、粉碎机にセットする。粉碎机専用ラックを固定するため、カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で粉碎試料とGE1 Buffer Premixを混合する。その後、粉碎用チューブをチューブ用ラック*3に移し、室温で10分間、静置する。

各粉碎用チューブにGE2-K Buffer を、180μLずつ添加し*4、フタを閉めた後に粉碎机専用ラックに移し、粉碎机にセットする。カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15秒間の条件下で混合する。

各粉碎用チューブを粉碎机専用ラックごと遠心機*5にセットする。室温下、2,900rpmで10分間の遠心の後、沈殿物の浮遊を防ぐため、慎重に粉碎机専用ラックを取り出す。各粉碎用チューブ内の上清を、マイクロピペットを用いて400μL、96穴プレートに採取する*6。GB3 Buffer/Isopropanol 250μLを、上清の入った96穴プレートに添加する*7。これをGB3混合液とする。ピペッティングで混合した後、コレクションプレートを取り付けたカラムプレートの各ウェルにGB3混合液を、マイクロピペットを用いて650μL (全量) ずつ添加し、室温下、2,900rpmで20分間の遠心を行う。コレクションプレートに溜まった溶出液は廃棄する*8。カラムプレートの全ウェルにGW Bufferを650μLずつ添加する*9。先の操作と同様に室温下、2,900rpmで10分間の遠心を行う。コレクションプレートに溜まった溶出液を廃棄後、再度、室温下、2,900rpmで20分間の遠心を行い、カラムを乾燥させる*10。乾燥後、DNA採取用のコレクションプレートを取り付け、カラムプレートの各ウェルにDWを50μLずつ添加し*11、室温で3分間、静置した後、室温下、2,900rpmで10分間の遠心を行う。この溶出液をDNA試料液*12とする。

*1 GE1 Buffer 1.5mLに対してRNase A 5μLを加え、GE1 Buffer Premixを必要量調製する。GE1 Buffer Premixを添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ (10mL容) を装着した連続分注機 (マルチペットプラス又はその同等品) を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容専用チップコンビチッププラスは1回の充てんで6回までの連続分注が可能である。

*2 粉碎チューブは事前に全てのフタを緩めておき、GE1 Buffer Premixを加える直前にフタをあげ、1本添加する度にフタを閉めるとコンタミネーションを極力防止できる。以後の操作も同様に行う。また、フタに粉末試料が付

着している場合、フタをあける際に粉末試料が飛散することが考えられる。飛散を防ぐため、ベンチ台で軽くタッピングして試料を落とす。GE1 Buffer Premixを添加する際にも、粉末が飛散するのを防ぐため、慎重にチューブの壁に添加する。この時、チップの先が壁に接触した場合はチップを交換する。

*3 チューブ用ラックはTR-03（安井器械社製）又はその同等品を用いる。

*4 GE2-K Bufferを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ（1mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。1mL容コンビチッププラスは1回の充てんで5回までの連続分注が可能である。

*5 遠心機はMETALFUGE® MBG101（安井器械社製）又はその同等品を用いる。

*6 96穴プレートは、各穴容量1mL以上の製品を用いる。上清を採取する際は、沈殿物や上層の膜状の物ができている場合もあるので、それらを取らないように慎重に行う。

*7 GB3 Buffer/IsopropanolはGB3 Buffer 125µLに対してIsopropanol 125µLを加え、必要量調製する。GB3 Buffer/Isopropanolを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで40回までの連続分注が可能である。

*8 溶出液を廃棄する際は、コレクションプレートごとデカンテーションで廃棄する。この際、廃液がコレクションプレートに付着するが、キムワイプ等でふき取る。

*9 GW Bufferを添加する際には、マイクロピペットまたは専用チップ（10mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。10mL容コンビチッププラスは1回の充てんで15回までの連続分注が可能である。

*10 エタノールの残存は、後に行うマルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知法への反応阻害が考えられるため、十分に乾燥を行うことが望ましい。

*11 DWを添加する際には、マイクロピペット又は専用チップ（2.5mL容）を装着した連続分注機（マルチペットプラス又はその同等品）を用いる。マルチペットプラスで溶液を添加する際、2押し目以降からチューブに添加する。2.5mL容コンビチッププラスは1回の充てんで50回までの連続分注が可能である。

*12 DNA試料は、各チューブにコレクションプレートキャップを取り付け、マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた粒単位の定性検知試験に使用するまで4°Cで保存する。

2.5.5. グループ検査のためのDNA試料液調製

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

*1 トウモロコシ穀粒20粒と組織溶解液20 mLを密封した状態で粉碎・混合できる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IMF-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 不二金属工業社製穀粒係数板（100粒ダイズ用）の一部をアルミ箔等で覆ったものを使用することで、効率的にランダムサンプリングを行うことができる。

*3 乾燥させる必要はない。

*4 組織溶解液の組成は20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、5 mmol/L EDTA、400 mmol/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 一般的なスピンドウン用卓上遠心機を使用することができる。

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

2.5.5. 項におけるDNA試料液調製の過程で、トウモロコシ粉碎物と組織溶解液の混合物がガラス容器中に残存する。この上清から、以下のように精製DNA試料液を調製する。上清600 µLを2 mL容プラスチックチューブに採取し、RNase A 4 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後^{*1}、室温で5分間静置する。GE2緩衝液^{*2} 75 µLを加え、10～12回転倒混和し^{*3}、氷上に5分間静置する。13,000×g以上、4°Cの条件で5分間遠心^{*4}する。次いで、上清^{*5} 400 µLを1.5 mLチューブに移し、GB3緩衝液50 µL及びエタノール（100%）200 µLを添加した後、10～12回転倒混和する^{*6}。混合液650 µL（全量）をspin columnに負荷した後、13,000×g以上、4°Cの条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いでGW緩衝液600 µLを負荷し、13,000×g以上、4°Cの条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnを乾燥させるため、13,000×g以上、4°Cの条件で3分間遠心する。spin columnを新たな1.5 mL容チューブに移し、水50 µLを加え3分間室温で静置した後、13,000×g以上で1分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。分光光度計を用いてDNA濃度

（新設）

（新設）

を測定し、20 ng/μLになるよう滅菌水で希釈する。

*1 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスにチューブを垂直にあて、そのまま30秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合は更に30～60秒間攪拌する。

*2 GE2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものをを用いる。

*3 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けてGE2緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加したGE2緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

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

*5 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。

*6 GB3緩衝液を添加し、続いてエタノール（100%）を添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

2.6. パパイヤ検査法（55-1系統）

2.6.1. 検査原則及び試料調製法

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

- ・検査対象検体は、一検体数を一単位とする。
- ・検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分を試料とする。
- ・試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉砕器等^{*2}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、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。又は超音波洗浄器を用い、30分間の超音波処理を行う。

* （略）

2.6.2. GUS試験法（略）

2.4. パパイヤ検査法（55-1系統）

2.4.1. 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^{*1}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、粉砕用器具^{*1}容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄器を用い、30分間の超音波処理を行う。

*1 （略）

2.4.2. GUS試験法（略）

2.6.2.1. 実験操作

あらかじめ、200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) ^{*1}を1ウェル当たり50 μL ずつ96ウェルプレートのうち必要数のウェルに分注しておく。試験には、パパイヤ1個体につき12個の胚を用いるため、必要となるウェル数は(パパイヤの個体数 \times 12)である。

生鮮パパイヤ果実を縦半分に切り、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^{*3}に切断する。切断後、切断面に露出する胚をピンセットで注意深く取り出し^{*4}、あらかじめ96ウェルプレートに分注しておいた200 mmol/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50 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 、10~15時間^{*6}の条件で保温する。保温後、各ウェルに70%エタノールを50 μL ずつ加え反応を停止する。それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS発現率^{*8}を算出する。

^{*1} 200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)

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

^{*2} (略)

^{*3} (略)

^{*4} (略)

^{*5} 基質溶液

X-Gluc溶液^{*7}が最終濃度1 mmol/L となるように、200 mmol/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、一試験毎に使い切るものとする。

^{*6} (略)

^{*7} X-Gluc溶液
(略)

2.4.2.1. 実験操作

あらかじめ200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) ^{*1}を1ウェル当たり50 μL ずつ96ウェルプレートのうち必要数のウェルに分注しておく。試験には、パパイヤ1個体につき12個の胚を用いるため、必要となるウェル数は(パパイヤの個体数 \times 12)である。

生鮮パパイヤ果実を縦半分²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 また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^{*3}に切断する。切断後、切断面に露出する胚をピンセットで注意深く取り出し^{*4}、あらかじめ96ウェルプレートに分注しておいた200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に速やかに浸す。胚を採取する過程において、種皮が白色の種子や胚珠が含まれない種子が観察される場合があるが、それらは試験に用いない。ウェルに検査に用いる全ての胚を採取し終えた後、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50 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 、10~15時間^{*6}の条件で保温する。保温後、各ウェルに70%エタノールを50 μL ずつ加え反応を停止する。それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS発現率^{*8}を算出する。

^{*1} 200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0)

200 mM NaH_2PO_4 と200 mM Na_2HPO_4 を3.3 : 6.7 (v/v) の割合で混合した溶液を200 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) とする。調製時には、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、混合後、必ずpHが7.0であることを確認する。なお、当緩衝液は、必ず試験を開始する直前に作製し、一試験ごとに使い切ること (用時調製)。

^{*2} (略)

^{*3} (略)

^{*4} (略)

^{*5} 基質溶液

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

^{*6} (略)

^{*7} X-Gluc溶液
(略)

*8 (略)

2.6.2.2. 結果の判定
(略)

試料番号	1	2	3	陰性対照
調査した胚の数	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	9	4	0
GUS発現率 (%)	0	75	33	0
判定	陰性	陽性	陽性	陰性

2.6.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

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

① ~ ⑦ (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(50 mL)に量りとり、G2緩衝液*1 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

*8 (略)

2.4.2.2. 結果の判定
(略)

試料番号	1	2	3	陰性対照
調査した胚の数	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	9	4	0
GUS発現率	0	75	33	0
判定	陰性	陽性	陽性	陰性

2.4.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

本法では生鮮パパイヤ及びパパイヤ加工食品を検査対象とし、DNA抽出精製には、以下の陰イオン交換樹脂タイプカラム (QIAGEN Genomic-tip 100/G) を使用したDNA抽出精製キットの改変法を用いる。検体からDNAを抽出し、各抽出DNA試料液を用いてリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施する。生鮮パパイヤ及びパパイヤ加工食品は以下の7種類の製品に細分類し、「2.4.3.1. 試料前処理」に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従ってDNA抽出精製前の試料調製を行う。

① ~ ⑦ (略)

2.4.3.1. 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*130 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

なお、生鮮パパイヤについては、採取したパパイヤから種子を除いた果肉部分をおよそ10mm角に切り出し、凍結乾燥を行う。次にミキサーミル等でこれらを混合し、粉砕する。粉砕試料を用い、以下のCTAB法または、シリカゲ

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2 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に量りとり、G2緩衝液^{*1} 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

③ 砂糖漬け乾燥製品

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

⑤ 果肉含有ゲル状製品

Millser等で粉砕し均質にした試料10 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に量りとり、G2緩衝液^{*1} 30 mLを加え、よく転倒混和して均質にする。

⑥ 果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品100 mLをメスシリンダーで量りとり、凍結乾燥用容器（500 mL）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^{*2} 30 gを乳鉢に量りとりG2緩衝液^{*1} 20 mLに乳棒を用いて懸濁させる。次いで全量をポリプロピレン製遠沈管（50mL）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たにG2緩衝液^{*1} 10 mLを追加し遠沈管に洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。

⑦ 氷菓等製品

ル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）を用いた方法によりDNA抽出精製を行うことも可能である。

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^{*1}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

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^{*1}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

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^{*1}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

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^{*1}30mLを加え、よく転倒混和して均質にする。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

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^{*2}30gを乳鉢に量りとり、G2緩衝液^{*1}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^{*1}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。次いで、以下の「2.4.3.2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

⑦ 氷菓等製品

試料100 g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^{*2} 10 gを先にG2緩衝液^{*1} 30 mLを入れたポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に少しずつ加えながら懸濁させ、よく転倒混和して均質にする。

*1 （略）

*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^{*1}

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

*1 （略）

*2 ニッポンジーン社（Cat. no. 318-06391）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 （略）

*4 ニッポンジーン社（Cat. no. 316-04751）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 （略）

*6 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。

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^{*2}10gを先にG2緩衝液^{*1}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。次いで、以下の「2. 4. 3. 2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製」に従いDNAを抽出精製する。

*1 （略）

*2 （略）

2. 4. 3. 2. パパイヤ試料からのDNAの抽出精製

2. 4. 3. 2. 1. DNAの抽出精製

「2. 4. 3. 1. 試料前処理」を行った試料に、RNase^{*2}20 μ L、cellulase^{*3}500 μ Lを加えて（なお、⑤果肉含有ゲル状製品のジャム製品に限り、 α -Amylase^{*4}20 μ Lも同時に加える）、転倒混和して均質にした後、50°Cで1時間放置する。その間2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、Proteinase K^{*5}200 μ Lを加え50°Cで1時間放置する。その間も2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。酵素処理終了後、その遠沈管を3,000 \times g、低温下（4°C）、20分間遠心する^{*6}。その間、あらかじめポリプロピレン製遠沈管（50mL）上にQIAGEN Genomic-tip 100/GをセットしQBT緩衝液^{*7}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^{*8}。この時の溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液^{*7}で7.5mLずつ3回洗浄した後^{*8}、あらかじめ50°Cに温めておいたQF緩衝液^{*7}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°Cに温めておいたQF緩衝液^{*7}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 \times g以上で、低温下（4°C）15分間遠心する。上清を捨てる。この際、上清を極力除去する^{*9}。次いで、各遠沈管当たり70%エタノールを1mLずつゆっくり加え、さらに10,000 \times g以上で、低温下（4°C）5分間遠心する。上清を捨て^{*9}、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5mL）4本分の沈殿を、あらかじめ50°Cに温めた滅菌蒸留水50 μ Lに溶解し、DNA試料原液とする^{*10}。

*1 （略）

*2 ニッポン・ジーン社（Cat. no. 318-06391）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 （略）

*4 ニッポン・ジーン社（Cat. no. 316-04751）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 （略）

*6 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。

可能であれば、使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、
gが最大となるように遠心条件を設定する。

- *7 (略)
- *8 (略)
- *9 (略)
- *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
(略)

- *1 (略)
- *2 (略)
- *3 (略)
- *4 (略)

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

遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 検知試験用プライマー対及びプローブ

PRSV-cp F: 5' -CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3'
PRSV-cp R: 5' -TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3'
PRSV-cp P: 5' -FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCAACAAT-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対及びプローブ

Q-Chy-1F2: 5' -CCATGCGATCCTCCCA-3'
Q-Chy-2R: 5' -CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA-3'
Q-Chy-P(new): 5' -FAM-TTCCTTCATCCATCCCCTCTTGAGA-TAMRA-3'

2.6.3.3.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 µL/wellとして調製する。組成は以下のとおりである。

TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) *1
12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各 0.4 µL、対象
プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µLを混合し、DNA試料液5 µLを添加し滅菌
蒸留水で全量25 µLに調製する。DNA試料液当たり遺伝子組換えパパイヤ (55-
1) 検知試験用リアルタイムPCRとパパイヤ陽性対照試験用リアルタイムPCRを
それぞれ2ウェル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

- *7 (略)
- *8 (略)
- *9 (略)
- *10 (略)

2.4.3.2.2. 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
(略)

- *1 (略)
- *2 (略)
- *3 (略)
- *4 (略)

2.4.3.2.3. リアルタイムPCR法 (Applied Biosystems 7900HT, Applied Biosystem
s 7500)
(略)

遺伝子組換えパパイヤ(55-1)検知試験用プライマー対及びプローブ

PRSV-cp F: 5' -CAG CCT TAG ATG CTT CAA GAA AAG A-3'
PRSV-cp R: 5' -TCC GCC TCC ATC CAG TCT ATT-3'
PRSV-cp P: 5' -FAM-TCT TCT AGC TTC CCG GCA ACA AT-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対及びプローブ*1

Q-Chy-1F2: 5' -CCA TGC GAT CCT CCC A-3'
Q-Chy-2R: 5' -CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'
Q-Chy-P: 5' -FAM-TTC CCT TCA T(BHQ1)CC ATT CCC ACT CTT GAG A-3'

*1 Q-Chy-Pプローブのクエンチャー (消光物質) は、T-baseのBHQ1(black-hole quenc
her 1)を使用する。

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*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

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アケーターを用いて、ウェル上のMicroAmp® Optical Adhesive Filmにシワが寄らないよう注意する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心操作にて）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

***1** TaqMan® Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作及び採取を行う際には注意が必要である。混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難な場合は、ウェルの底に確実に入れる。遠心が可能な場合は、シールした後に遠心操作を行う。

***2** Non-Template Control (NTC)
(略)

***3** 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリアケーター
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific社) 及びMicroAmp® Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

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

2.6.3.3.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、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
(略)

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アケーターを用いて、ウェル上のABI PRISM Optical Adhesive Coverにシワ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、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

***1** TaqMan Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作及び採取を行う際には注意が必要である。混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難な場合は、ウェルの底に確実に入れる。遠心が可能な場合は、シールした後に遠心操作を行う。

***2** Non-Template Control (NTC)
(略)

***3** 96ウェルプレート、シール及びシーリングアプリアケーター
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies社) 及びABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

***4** ABI PRISM Optical Cover Compression Pad
ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies社) を使用する。Applied Biosystems 7500では使用しない。

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、ReporterがPRSV-cp P、Q-Chy-Pとともに「FAM」、QuencherがPRSV-cp Pでは「TAMRA」、Q-Chy-Pでは「Non Fluorescent」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25µLに設定する。

PCR増幅
(略)

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Ct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Ct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ウェル並行で測定) 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Ct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Ct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Ct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Ct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Ct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Ct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「2.4.3.2.3. 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 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔRn が変動することから、普遍的なThの設定の数値を示すことが困難である。従ってAmplification plot上でベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThを設定

2.4.3.2.4. 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Ct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, line) を選択する*1。そのTh, lineからCt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抽出あたり2ウェル並行で測定) の合計4ウェルすべ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Ct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Ct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Ct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Ct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Ct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Ct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また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「2.4.3.2.3. 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 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔRn が変動することから、普遍的なTh, lineの設定の数値を示すことが困難である。従ってAmplification plot上でベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh,

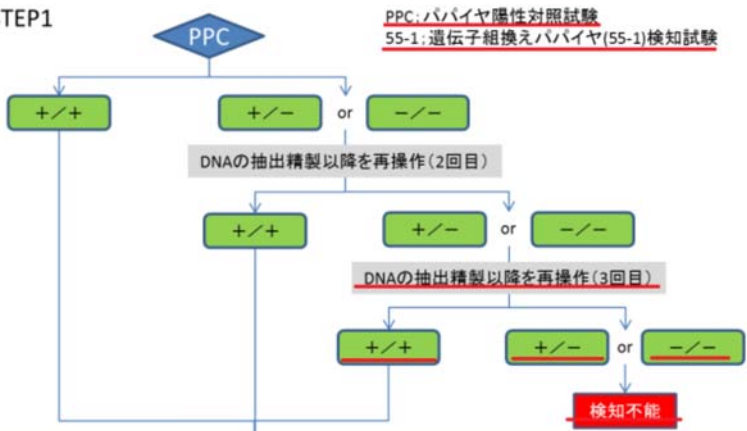
する。本実験法の場合は、 $Th = 0.2$ と設定する。ただし、 Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

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

lineを設定する。本実験法の場合は、 $Th_{line} = 0.2$ と設定する。ただし、 Th_{line} 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_{line} を適宜設定する。

*2 DNA抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「2.4.3.1. 試料前処理」から実施する。

STEP1



STEP2

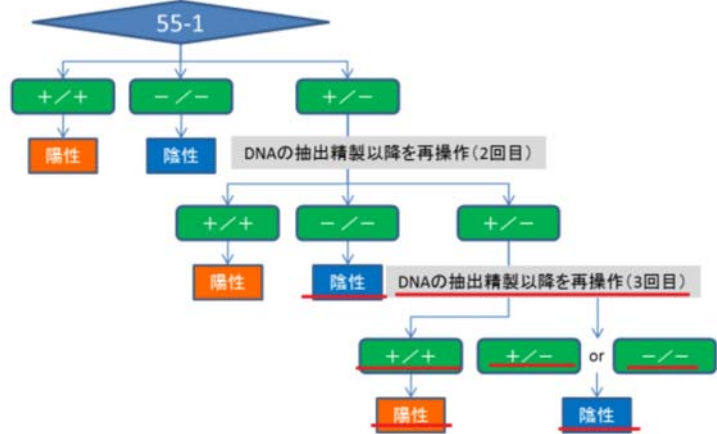
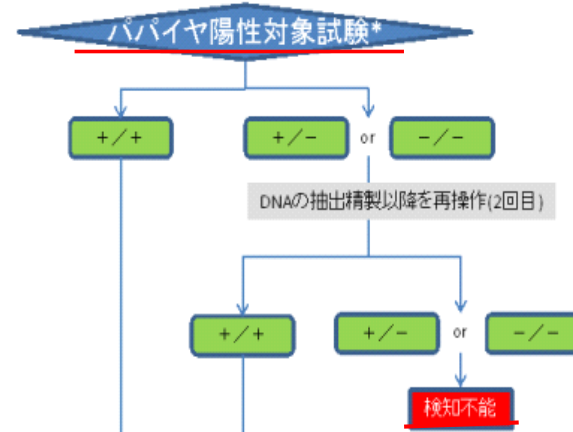


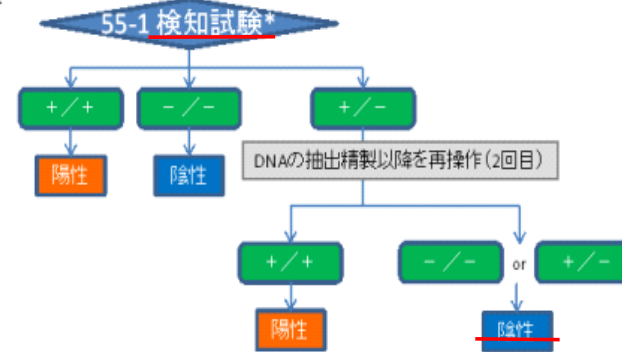
図1 結果の判定スキーム

図1 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



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

(別紙1) 内標比

ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02とLe-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.39	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.01	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用

ABI PRISM® 7900HT 96well

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
<u>ダイズ</u>	LL Soybean	0.98	Le1-n02とLe1-Taq及びKVM175, SM0001とTM031を使用
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean 2	1.32	Le1-n02とLe1-Taq及びMON89788-F, MON89788-Rと

(別紙) 内標比

ABI PRISMTM 7700及びABI PRISMTM 5700

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02とLe-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.39	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.01	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>Event176</u>	<u>2.02</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びE176-2とE176-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Bt11</u>	<u>0.44</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びBt11-3とBt11-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>T25</u>	<u>0.34</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びT25-1とT25-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Mon810</u>	<u>0.38</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びM810-2とM810-Taqを使用</u>

ABI PRISMTM 7900HT 96well

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
<u>大豆</u>	LL Soybean	0.98	Le1-n02とLe1-Taq及びKVM175, SM0001とTM031を使用
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean 2	1.32	Le1-n02とLe1-Taq及びMON89788-F, MON89788-Rと

			MON89788-Pを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.38	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	1.99	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR604</u>	<u>0.44</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びMIR604-1とMIR604-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR162</u>	<u>0.70</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びMIR162-1とMIR162-Taqを使用</u>

ABI PRISM[®] 7900HT 384well

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean	<u>1.00</u>	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.39	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.06	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用

			MON89788-Pを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.38	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	1.99	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>Event176</u>	<u>2.02</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びE176-2とE176-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Bt11</u>	<u>0.4</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びBt11-3とBt11-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>T25</u>	<u>0.34</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びT25-1とT25-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Mon810</u>	<u>0.36</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びM810-2とM810-Taqを使用</u>

ABI PRISM[™] 7900HT 384well

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean	<u>1</u>	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.39	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.06	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>Event176</u>	<u>2.12</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びE176-2とE176-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Bt11</u>	<u>0.43</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びBt11-3とBt11-Taqを使用</u>

ABI PRISM[®] 7000

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean	0.95	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.35	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	1.83	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用

Applied Biosystems[®] 7500

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	Roundup Ready Soybean	1.02	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用

<u>トウモロコシ</u>	<u>T25</u>	<u>0.37</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びT25-1とT25-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Mon810</u>	<u>0.38</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びM810-2とM810-Taqを使用</u>

ABI PRISM[™] 7000

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean	0.95	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.35	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びP35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	1.83	SSIIb-3とSSIIb-Taq及びGA21-3とGA21-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>Event176</u>	<u>1.93</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びE176-2とE176-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Bt11</u>	<u>0.41</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びBt11-3とBt11-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>T25</u>	<u>0.4</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びT25-1とT25-Taqを使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>Mon810</u>	<u>0.38</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及びM810-2とM810-Taqを使用</u>

ABI 7500

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>大豆</u>	Roundup Ready Soybean	1.02	Le1-n02とLe1-Taq及びRRS-01とRRS-Taqを使用

ダイズ	LL Soybean	0.98	Le1-n02とLe1-Taq及び KVM175, SM0001とTM031を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.33	Le1-n02とLe1-Taq及び MON89788-F, MON89788-Rと MON89788-Pを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.46	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び P35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.13	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び GA21-3とGA21-Taqを使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び MIR604-1とMIR604-Taqを使用
トウモロコシ	MIR162	0.64	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び MIR162-1とMIR162-Taqを使用

LightCycler® System

食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.01	Le1-n02とLe1-Taq及び RRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.53	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び P35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.63	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び GA21-3とGA21-Taqを使用

大豆	LL Soybean	0.98	Le1-n02とLe1-Taq及び KVM175, SM0001とTM031を使用
大豆	Roundup Ready Soybean 2	1.33	Le1-n02とLe1-Taq及び MON89788-F, MON89788-Rと MON89788-Pを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.46	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び P35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.13	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び GA21-3とGA21-Taqを使用

LightCycler System

食品名	対象系統	内標比	備考
大豆	Roundup Ready Soybean	1.01	Le1-n02とLe1-Taq及び RRS-01とRRS-Taqを使用
トウモロコシ	特定せず (スクリーニング)	0.53	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び P35S-1とP35S-Taqを使用
トウモロコシ	GA21	2.63	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び GA21-3とGA21-Taqを使用
トウモロコシ	Event176	2.6	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び E176-2とE176-Taqを使用
トウモロコシ	Bt11	0.63	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び Bt11-3とBt11-Taqを使用
トウモロコシ	T25	0.31	SSIIb-3とSSIIb-Taq及び

			T25-1とT25-Taqを使用
<u>トウモロコシ</u>	<u>Mon810</u>	<u>0.49</u>	<u>SSIIb-3とSSIIb-Taq及び</u> <u>M810-2とM810-Taqを使用</u>

QusantStudio® 5 Real-Time PCR System (参照値)

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	<u>Roundup Ready Soybean</u>	<u>0.97</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>RRS-01とRRS-Taqを使用</u>
<u>ダイズ</u>	<u>LL Soybean</u>	<u>1.08</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>KVM175, SM0001とTM031を使用</u>
<u>ダイズ</u>	<u>Roundup Ready Soybean 2</u>	<u>1.51</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>MON89788-F, MON89788-Rと</u> <u>MON89788-Pを使用</u>

(新設)

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

食品名	対象系統	内標比	備考
<u>ダイズ</u>	<u>Roundup Ready Soybean</u>	<u>1.00</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>RRS-01とRRS-Taqを使用</u>
<u>ダイズ</u>	<u>LL Soybean</u>	<u>1.10</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>KVM175, SM0001とTM031を使用</u>
<u>ダイズ</u>	<u>Roundup Ready Soybean 2</u>	<u>1.51</u>	<u>Le1-n02とLe1-Taq及び</u> <u>MON89788-F, MON89788-Rと</u> <u>MON89788-Pを使用</u>

(新設)

LightCycler® 96 (参照値)

食品名	対象系統	内標比	備考

(新設)

ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.90	Le1-n02とLe1-Taq及び RRS-01とRRS-Taqを使用
ダイズ	LL Soybean	1.11	Le1-n02とLe1-Taq及び KVM175, SM0001とTM031を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.29	Le1-n02とLe1-Taq及び MON89788-F, MON89788-Rと MON89788-Pを使用

LightCycler® 480 96 well (参照値)

(新設)

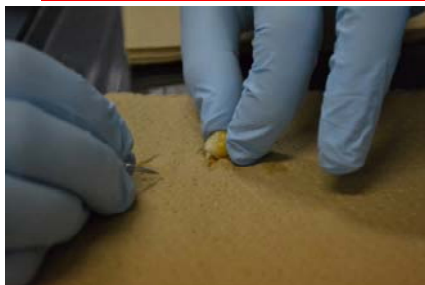
食品名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.96	Le1-n02とLe1-Taq及び RRS-01とRRS-Taqを使用
ダイズ	LL Soybean	1.07	Le1-n02とLe1-Taq及び KVM175, SM0001とTM031を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	1.30	Le1-n02とLe1-Taq及び MON89788-F, MON89788-Rと MON89788-Pを使用

(別紙2)

(新設)

トウモロコシ粒単位検査法のためのDNA試料液調製手順

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



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



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



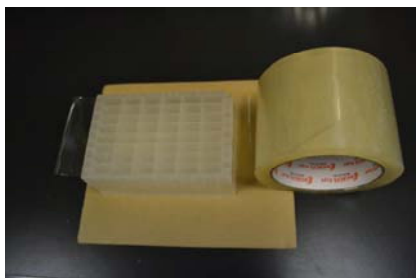
④1ウェル当たり1粒を48ウェルプレートに入れる。





⑤各ウェルに組織溶解液0.5 mLを添加する。

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



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

(参考)

- (1) 2.5.1.2.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. 03-5547-0811 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(RR

(参考)

- (1) 2.3.1.2.、2.3.1.3.、及び2.3.4.2.1.の記述のシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)に用いられるAP1及びAP2緩衝液及びRNase Aは、キットに含まれるものとは別にキアゲン(〒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) 2.3.1.4.、2.3.1.5.、及び2.3.1.2.2.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(〒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.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

S) 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) 2.2.3.1.1.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

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 (〒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 (〒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) LLS及びRRS2検知プライマー及びプローブ情報はJRC Validation Method protocolに記載のものである。

(5) 2.1.2.1.、2.1.2.2.、及び2.1.2.3.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、対象プローブは、ニッポンジーン、ファスマックから購入可能である。

(6) 2.1.2.5.に記載のLight Cycler Systemを用いた定量PCRにおいて使用する試薬類はロシュ・ダイアグノスティック (〒105-0014 東京都港区芝2-6-1. Tel. 03-5443-5287 Fax. 03-5443-7098) から購入可能である。

(7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター作成のJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」は下記ホームページから入手可能である。
<http://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/qa.html>

(8) 2.2.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、対象プローブ (SSIIb-TaqV以外) 及び粒単位検査法用標準プラスミドDNA溶液は、ニッポンジーン、ファスマックから購入可能である。

(9) 2.2.に記載のPCR用反応液の調製に用いられるSSIIb-TaqVは、ライフテクノロジーズジャパン (〒104-0032 東京都中央区八丁堀4-5-4 ダヴィンチビル Tel. 0120-477-392 Fax. 03-5566-6538) から合成依頼による購入が可能である。

(10) 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 (〒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 (〒243-0041 厚木市緑ヶ丘5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738) から購入可能予定である。

る購入が可能である。

別添 輸入される生食用かきの採取水域区分（名称）の例示 ～ 別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products （略）

別添 輸入される生食用かきの採取水域区分（名称）の例示 ～ 別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products （略）