

トウモロコシ (*Bt10*) の検査方法

トウモロコシ穀粒又はトウモロコシ半製品について、定性 PCR 法で行う。なお、DNA 抽出精製は、シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) を用いる。

1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、各抽出 DNA 試料液を用いて定性 PCR 法を実施する。

1. DNA 抽出精製

1.1. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)

均質に粉碎した試料 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。AP2 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 AP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}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^{*6}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。最終的に混合液がすべ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} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}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 に温めておいた滅菌蒸留水 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 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

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

*2 AP2 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、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 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、あるい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

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

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。

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

DNA 試料原液の適量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し¹、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ²) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

¹ 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

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

2. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動により分離した後に、その増幅産物を検知する方法である^{1 2}。Bt10 の検出は検出用プライマーを用いた定性 PCR と陽性対照用プライマーを用いた定性 PCR の 2 試験を行い判定する。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

• Bt10 検出用プライマー対

F-primer (JSF5) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG GTT ACT CA-3'

R-primer (JSR5) : 5'-ACA CGG AAA TGT TGA ATA CTC ATA CTCT-3'

• 陽性対照用のプライマー対

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

^{*1}PCR 法では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅産物が検知されうる。したがって、目的外の DNA（特に PCR 増幅産物）の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべ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など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

^{*2}また、独立行政法人農林水産消費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 コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

2.1. PCR 用反応液の調製

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}、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 μmol/L 5'および3'プライマー並びに 0.8 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*2}を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 5.0 μL（DNA として 50 ng）を氷中で加え、全量を 25 μL にする。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II（Life Technologies 社、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 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ（Life Technologies 社）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2. PCR 増幅

PCR 用反応試料管を PCR 増幅装置¹にセットする。反応条件は次の通りである。94 °C に 10 分間保ち反応を開始させた後、94 °C で 25 秒間、62 °C で 30 秒間、72 °C で 45 秒間を 1 サイクルとして、40 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、必ずプライマー対を加えないものおよび DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。また、試料から DNA が抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、Bt10 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対を用い、同様に PCR 増幅を行う。

* PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies 社製) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

2.3.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液^{*1}を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に 100 mL 当たり 5 μ L のエチジウムブロミド溶液^{*2} (10 mg/mL) を加え、ゲルを 50°C 前後まで冷やした後ゲルメーカーに流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する^{*3}。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、目的とする PCR 増幅産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (1.0~4.0%) を決める。

^{*1} TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

^{*2} エチジウムブロミド溶液

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

^{*3} 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.3.3. に従って、ゲルを後染色しても良い。

2.3.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる Bromophenol blue (BPB) がゲルの 1/2 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.3.3. ゲルの染色 (後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30 分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。

2.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線 (312 nm) を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的の PCR 増幅バンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

2.5. 結果の判定

陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、Bt10 検出用プライマー対を用いたレーンで 117 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 用反応液を調製し、Bt10 確認用プライマー対¹を用い PCR 増幅を行う²。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、151 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は Bt10 系統陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において、陽性対照用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも陽性対照用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて 2 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出 1	陽性対照用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出 2	陽性対照用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-

検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号 9 の例の場合には、2 回目の抽出を行う。

+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

^{*1} Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt10LS-5') : 5'-GCC ACA ACA CCC TCA ACC TCA -3'

R-primer (Bt10LS-3') : 5'-GAA GTC GTT GCT CTG AAG AAC AT-3'

^{*2} Bt10 確認用プライマー対を用いる場合の PCR 条件は以下の通りである。94℃に 10 分間保ち反応を開始させた後、94 °C で 25 秒間、65 °C で 30 秒間、72 °C で 45 秒間を 1 サイクルとして、40 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。

トウモロコシ (CBH351) の検査方法

トウモロコシの穀粒については、ラテラルフロー法で行う。また、コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、遺伝子組換えにより新たに発現されるタンパク質が物理化学的な変化を受けていない粉砕加工品（以下、「トウモロコシ半製品」という。）についても、ラテラルフロー法で行う。

その他のトウモロコシ加工品については定性 PCR 法で行う。

なお、トウモロコシ半製品については、ラテラルフロー法で行った後、定性 PCR 法による確認試験を行う。

1. トウモロコシ穀粒からの CBH351 トウモロコシの検知

1.1. ラテラルフロー法

市販の Test Kit は、Strategic Diagnostics 社 (SDI) 製 Trait・Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012) を用いる方法である。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。なお、実験室で実験を行う場合には、水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を用いることを推奨する。

1.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ穀粒から無作為に 800 粒を採取し粉砕した後、粉砕物^{*}を 500 mL 容程度の口の広い蓋付きの容器に採り、水 288 mL を加えた後、10~20 秒間、試料が全て濡れるまでよく振とうする。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、少量の水を加え、試料をよく振とうし、振とう後上澄み液が生じたかどうか観察する。振とう後、数 mL 程度の上澄み液が生じるまで水を加える。次に、試料の上澄み液 0.5 mL をキット付属の 1.5 mL 容試料管に移し、その試料管に Trait・Bt9 テストストリップを垂直に立てる。

^{*} 通常 230 g を量り採り粉砕したもの (230 g で 800 粒に満たないときは 800 粒の粉砕物)。

1.1.2. 結果の判定

テストストリップを試料管に立て、5 分経過した時点^{*}で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に 2 本現れれば陽性、コントロールラインだけが現れれば陰性と判定する。また、1 本も現れなければ、その試験は無効と判定する。

* 5 分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があります、正しく判定することができないので注意が必要。

2. トウモロコシ加工品からの CBH351 トウモロコシの検知

以下の手法に従って、一試料につき 2 回並行で抽出を行い、得られた DNA 溶液を用い、以下の条件で定性 PCR を行う。

2.1. DNA 抽出精製

2.1.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレーク（加熱加工されているものに限る）からの DNA 抽出精製

試料を凍結乾燥した後、ミキサーミル等で粉砕する。次いで粉砕試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）を用い以下のように DNA を抽出精製する。

試料に G2 緩衝液^{*1} 4 mL を加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、さらに G2 緩衝液 4 mL、Proteinase K^{*2} 100 μ L と RNase A 10 μ L を加えて、よく振って混合した後、50 $^{\circ}$ C で 2 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、3,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）15 分遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT 緩衝液^{*1} 1 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に 2 mL ずつ数回に分けて負荷する。次いで、チップを QC 緩衝液^{*1} で 2 mL ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ 50 $^{\circ}$ C に温めておいた QF 緩衝液^{*2} を 1 mL ずつ 2 回加え、DNA を溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）15 分間遠心し、上清を捨てた後、70 % エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000 \times g 以上で、低温下（4 $^{\circ}$ C）5 分間遠心する。さらに上清を捨て、残った沈殿をアスピレーターを用い乾燥した後、滅菌蒸留水 100 μ L を加え、65 $^{\circ}$ C で 5 分間放置し、ピペティングにより DNA を溶解させ、DNA 試料原液とする。

^{*1} G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液および QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

^{*2} QIAGEN 社のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

2.1.2. 上記以外のトウモロコシ加工品からの DNA 抽出精製

平成 12 年農林水産省告示第 517 号第 3 条に規定する別表 2 の加工食品からの DNA の抽出精製は、独立行政法人農林水産消費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 個別品目編」に記載されている方法を準用する。

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

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を行う。

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し^{*1}、200～320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7～2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

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

2.2. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動により分離した後に、その増幅産物を検知する方法である^{*1 *2}。CBH351 の検出は検出用プライマーを用いた定性 PCR と陽性対照用プライマーを用いた定性 PCR の 2 試験を行い判定する。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

・ CBH351 検出用プライマー対

F-primer (CaM03-5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3') : 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'

・ 陽性対照用のプライマー対

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

^{*1} PCR 法では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅産物が検知されうる。したがって、目的外の DNA (特に PCR 増幅産物) の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製し

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など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

² また、独立行政法人農林水産消費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 コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

2.2.1. PCR 用反応液の調製

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}、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2 μmol/L 5'および 3'プライマー並びに 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ²を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 2.5 μL (DNA として 25 ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にする。

^{*1} PCR 緩衝液

PCR buffer II (Life Technologies 社、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 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Life Technologies 社) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.2. PCR 増幅

PCR 用反応試料管を PCR 増幅装置^{*}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 で 0.5 分間、60°C で 0.5 分間、72°C で 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 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、必ずプライマー対を加えないものおよび DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。また、試料から DNA が抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、CBH351 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対を用い、同様に PCR 増幅を行う。

^{*} PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies 社) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

2.2.3.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液^{*1}を加え、加熱してアガロースを溶解する。ゲルを 50 °C 前後まで冷やした後に、100 mL 当たり 5 µL のエチジウムブロミド溶液^{*2} (10 mg/mL) を加えよく混合して、ゲルメーカーに流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する^{*3}。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、目的とする PCR 増幅産物のバンド長にあわせてアガロース濃度 (1.0~4.0 %) を決める。

*1 TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

*2 エチジウムブロミド溶液

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

*3 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.2.3.3. に従って、ゲルを後染色しても良い。

2.2.3.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 µL と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/2 から 3/2 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.2.3.3. ゲルの染色 (後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 µL のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30 分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。

2.2.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的の PCR 増幅バンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

2.2.5. 結果の判定

陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 用反応液を調製し、確認用プライマー対*を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、171 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は CBH351 陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において陽性対照用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも陽性対照用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて 2 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも陽性対照用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

試料番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出 1	陽性対照用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
抽出 2	陽性対照用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号 9 の例の場合には、2 回目の抽出を行う。

+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

*CBH351 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Cry9C-5') : 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3') : 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

3. トウモロコシ半製品（コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等）からの CBH351 トウモロコシの検知

試料について粉砕せず、そのまま 230 g 採る他は 1.1.ラテラルフロー法に従って行う。ラテラルフロー法により陽性の結果が得られた検体については、「2.1. DNA 抽出精製」に従い 2 回並行で DNA を抽出し、DNA 試料液を用いて更に 2.2.の定性 PCR を実施し、どちらかの抽出液由来の PCR 増幅反応液において、陽性対照用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、陽性と判定する。

トウモロコシ (*DAS59132*) の検査方法

トウモロコシ穀粒について、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) に従って、1 検体から 2 併行で DNA を抽出精製し、得られた DNA 試料液を用いて以下の定性リアルタイム PCR 法を実施する。なお、トウモロコシ陽性対照用プライマー対およびプローブは、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSI**II**b) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSI**II**b-3 とプローブ SSI**II**b-Taq を用いる。

1. DNA 抽出精製

1.1. シリカゲル膜タイプの DNA 抽出精製キット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)

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。AP2 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 AP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}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^{*6}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。最終的に混合液がすべ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} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}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 に温めておいた滅菌蒸留水 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。もう一度滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

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

*2 AP2 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、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 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、あるいは別途購入したもの

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

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

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。

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

DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存を行う。

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水あるいは TE 緩衝液を用いて適宜希釈し¹、200~320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 および 280 nm の吸光度 (A_{260} および A_{280} ²) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、20 μ L ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

¹ 試験の目的により、DNA 試料原液は滅菌蒸留水もしくは TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量および濃度域が異なるため、適宜とする。

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

2. 定性リアルタイム PCR 法 (ABI PRISMTM 7900、7500 または 7700)

2.1. 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。Universal PCR Master Mix¹ 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10 μ mol/L) 1.0 μ L²、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L³ を混合し、滅菌蒸留水で全量 20 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50 ng) を添加する。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についても同時に調製する。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、ABI PRISM Optical Cover Compression

Pad^{*5}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。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 ウェル分を同時に調製する。

*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 対象プライマー対（各プライマーは水で溶解する。）

DAS59132 検知用プライマー対は以下のとおりである。

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTGT-3'

SSIIb 検知用プライマー対は以下のとおりである。

F-primer (SSIIb 3-5') : 5'-CCA ATC CTT TGA CAT CTG CTCC-3'

R-primer (SSIIb 3-3') : 5'-GAT CAG CTT TGG GTC CGGA-3'

なお、各プライマー濃度 (25 μmol/L) を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

*3 対象プローブ（プローブは水で溶解する。）

DAS59132 検知用プローブは以下のとおりである。

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CACG-TAMRA-3'

SSIIb 検知用プローブ(SSIIb-Taq)は以下のとおりである。

5'-FAM-AGC AAA AAA AGA GCG CTG CAA-TAMRA-3'

*4 96 ウェルプレート、シールおよびシーリングアプリケーションター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate および 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 MicroAmp Optical Cover Compression Pad (ABI PRISMTM7900 の場合, 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。

2.2. 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、検体の配置と種類および、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、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

2. 3. PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取込みを開始する。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 で 15 秒、60 °C で 1 分を 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。

3. 結果の解析と判定 (図 1 参照)

DAS59132検知用試験およびトウモロコシ陽性対照用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、および、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。

まず目視で Amplification plot 上に DAS59132 の指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、DAS59132 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) 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. line) として 0.2 に設定する。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。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。

DNA 試料液において

- (1) トウモロコシ陽性対照試験の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験ですべてのウェルで 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の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験のすべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られない場合は陰性と判定する。
- (3) トウモロコシ陽性対照試験の 2 併行すべてのウェルで 38 未満の Ct 値が得られ、かつ DAS59132 検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて 2 回目の DNA 抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイム 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の判定が得られない場合には、DAS59132 陰性と判定する。

2 併行抽出のそれぞれの抽出 DNA 試料液 (各 2 ウェル) について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出 DNA 試料液 (合計 4 ウェル) について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

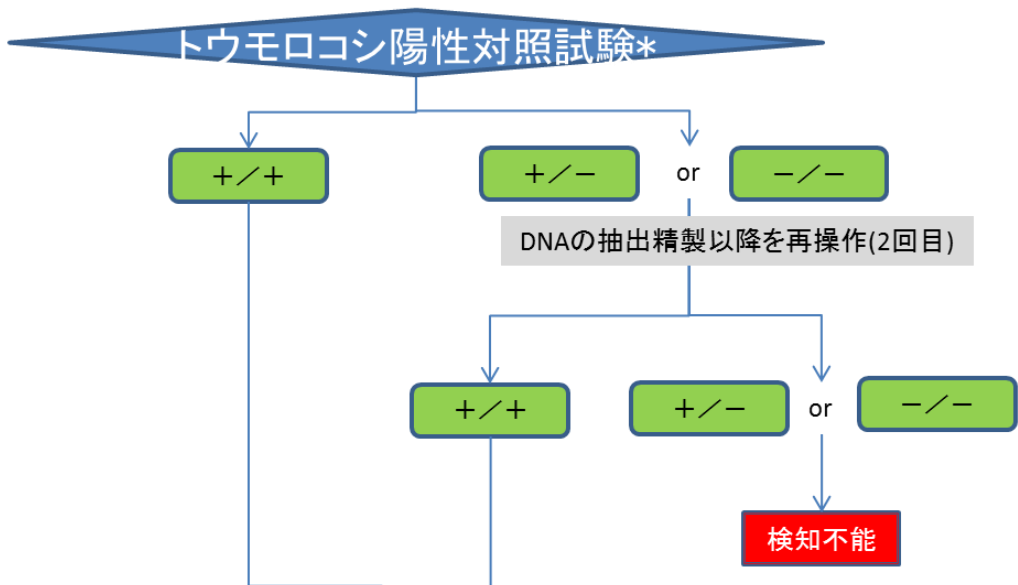
なお上記判定により DAS59132 陽性が判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROX の蛍光強度の明確な下降や FAM の蛍光強度の緩やかな上

昇がないことを確認する。

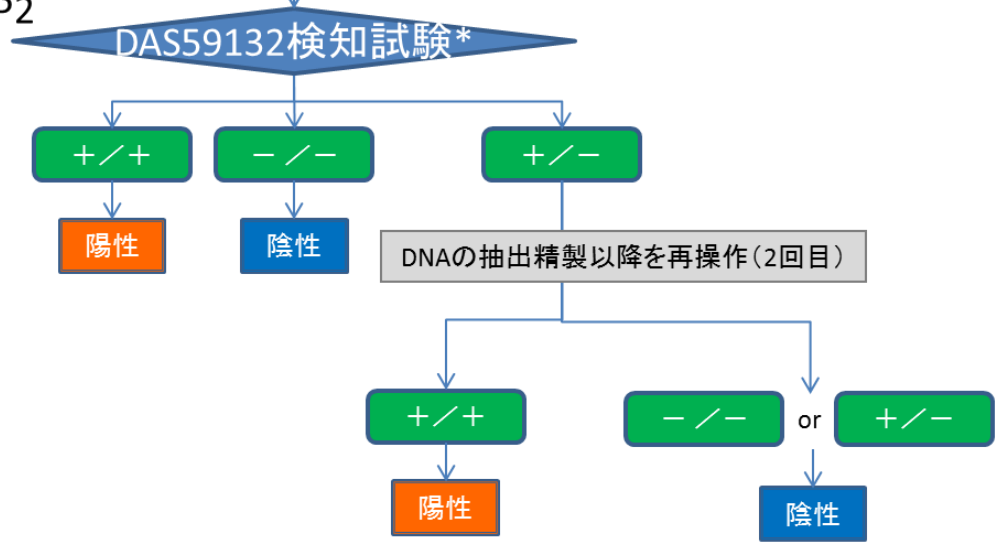
また、トウモロコシ陽性対照用試験ですべてのウェルで38未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでもすべてのウェルで38未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

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。