

JAS 分析試験ハンドブック

遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

改訂第 2 版

基本操作編

平成 14 年 6 月 20 日



独立行政法人 農林水産消費技術センター

i) はじめに

遺伝子組換え農産物含有可能食品について、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS法）の遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成12年3月31日農林水産省告示第517号）に基づき、表示の義務化が平成13年4月から導入されることとなった。表示は分別生産流通管理（IPハンドリング）に基づいて行われるが、IPハンドリングが正しく行われているかどうかの目安として、農林水産消費技術センターにおいて、遺伝子組換え食品の表示の遵守点検を行うこととなる。本マニュアルは、この検査分析方法の標準化のために作成したものである。

試験は、PCR法による組換え遺伝子の定性検出法による。本編では、遺伝子組換え食品分析のための試験法を示してある。

試験の流れを下に示し、これに沿って記述していく。

1. 試料の買い上げ、整理
2. 試料の前処理及びサンプリング
3. DNA抽出
4. PCR増幅及びゲル電気泳動
5. 結果の判定

ii) 試験における一般事項

PCRでは、微量の銑型DNAであっても増幅されるので目的外のDNA（特にPCR産物）の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面等から分泌されているDNaseの混入を防止しなければならない。そのため、本マニュアルのコンタミネーション防止編を参照し、適切な操作を行うが、特に次のような配慮も必要である。

（1）溶液類は、熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は、電気伝導率0.0056 mS/m（25以下になるように脱イオン化されたものを用い、滅菌水は、純水を121、15分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

（2）チップやチューブ類は必ず使い捨てとし、洗ったものを再使用しない。

（3）マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び1.5 mLと0.2 mL等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌をし、その後、乾燥器に入れ完全に乾かしてから用いる。あるいは、可能なものについては乾熱滅菌を行う。

（4）DNAを操作するときは、必要に応じてクリーンベンチを使用するとともに、実験台上をエタノールで消毒し、必ずゴム手袋をはめ、作業中も頻繁にエタノールで消毒すること。ゴム手袋はパウダーなしのものを用いるか、パウダーを洗い落としてから使用する。

（5）滅菌水やTE緩衝液にDNaseが混入すると被害が広がるので、この2つの溶液は実験者ごとに別々に作製し、頻繁に（少なくとも月に一回程度）作り直す。

iii) 試薬の管理

遺伝子関連の実験では、強力な変異原性物質等を用いる場合もあるので、試薬や廃液の管理をしっかり行う必要がある。試薬管理マニュアル及び試薬調製編を参照し適切な管理を行うこと。

1 試料の買い上げ、整理

市販品は本マニュアル分析試料取り扱い編に従う。
市販品は、通常、一商品につき3点の買い上げを行う。

2 試料の前処理及びサンプリング

本マニュアル個別品目編による。

3 DNA 抽出

抽出は、買い上げた1点の試料につき1点とする。すなわち買い上げ点数だけ抽出が行われる。

シリカスピンカラムを使用した方法、イオン交換カラムを使用した方法又は、CTAB を使用した方法により DNA を抽出する。PCR に適した DNA の抽出ができ、また、環境保全や実験従事者の健康面を考慮し、シリカスピンカラム又はイオン交換樹脂カラムを使用する方法が望ましい。以下に、シリカスピンカラムを使用した方法として QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit、イオン交換樹脂カラムとして QIAGEN 社 Genomic tip 20/G を使用した方法を示す。DNeasy Plant Maxi kit 及び Genomic-tip 20/G に限定するものではなく、手順についても、これに限定するものではない。しかし、同程度の品質（注1）の DNA が抽出できることを確認した上で試験を行わなければならない。

準備

使用器具は必ず滅菌して用いる。

操作にあたっては、ゴム手袋を使用する等コンタミネーションに注意すること。

3.1 DNeasy Plant Maxikit による DNA の抽出

3.1.1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を高塩濃度緩衝液によりシリカゲルに吸着させ、低濃度緩衝液又は滅菌水を用いて溶出する。

3.1.2 出典

Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Quantification Methods using Novel Reference Molecules for Detection of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International (in press) で用いられた DNA の抽出方法と同一である。

3.1.3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

3.1.4 装置

スイング式遠心機：50 mL のポリプロピレンチューブを 3,000xg で遠心可能なもの。

冷却遠心機：2 mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000 µL 容等を用いる。（注2）

恒温水槽

試験管ミキサー

3.1.5 試薬

QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit

3.1.6 抽出操作

3.1.6.1 DNeasyPlant Maxi kit による DNA の抽出 A

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、20 μ L の RNase (kit 添付品)及び、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、10 mL の AP1 buffer (65) を直接添加し、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、試験管ミキサーを用いて撹拌する。
- (2) 65 の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。)
- (3) 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。
- (4) 1,000-5,000 μ L 容の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 容チューブに移す。
- (5) チューブに、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、2.5 mL の AP2 buffer を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times g で室温で 35 分間遠心分離する。
- (7) 1,000-5,000 μ L 容の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、QIAshredderspin column (lilac) に負荷する。
- (8) 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。
- (9) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000 μ L 容の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。
- (10) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、1,000-5,000 μ L 容の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。
- (11) 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、10.2 mL の AP3/Et-OH buffer を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、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。
- (12) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times g で室温で 15 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。
- (13) 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、カラムに 12 mL の AW buffer 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。
- (14) カラムを新しい 50 mL チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、カラムに温めておいた 1 mL 滅菌水 (65) を加える。
- (15) 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。
- (16) 100-1,000 μ L 容の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。100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。
- (17) 上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (18) 遠心分離器を使用し、12,000 \times g で、4 、15 分間遠心分離後、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (19) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、500 μ L の 70% エタノールを添加し、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。
- (20) 遠心分離器を使用し、12,000 \times g で、4 、3 分間遠心分離後、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (21) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、100 μ L の TE (pH 8.0) 緩衝液を加え沈殿物を溶解させる。(備考参照)
- (22) 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晩 (12-24 時間) 冷蔵庫に静置する。

(23) 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 分、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 抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20 ℃以下で保存すること。

3.1.6.2 DNeasyPlant Maxi kit による DNA の抽出 B

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、0.5-10 μL 容のマイクロピペットを用いて、10 μL の RNase (kit 添付品)及び、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、5 mL の AP1buffer (65 ℃)を直接添加し、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、試験管ミキサーを用いて撹拌する。
- (2) 65 ℃の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。)
- (3) チューブに、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、1.8 mL の AP2 buffer を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (4) 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。
- (5) 1,000-5,000 μL 容の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、QIAshredderspin column (lilac) に負荷する。
- (6) 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。
- (7) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、上清を 4mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (8) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、3.4mL を採取し新しい 50mL チューブに移す。
- (9) 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、5.1 mL の AP3/Et-OH buffer を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌する。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。
- (10) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。
以下の操作 (11) ~ (21) については、「3.1.6.1 DNA の抽出 A」の(13)~(23)とそれぞれ読みかえ、操作する。

3.1.7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

抽出後の DNA 溶液は、0.5-10 μL 容のマイクロピペットを用いて、5 μL を採り、TE 緩衝液を加えて 50 μL にし 200 ~ 300 nm の範囲で紫外吸光スペクトルを測定し、230、260 及び 280 nm の吸光度を測定する(注3)(注4)。1 O.D. 260nmを 50ng/μLDNA 溶液(注5)として DNA 濃度を算出し、滅菌水により PCR 用の溶液(10 ng/μL)を調製する。濃度が薄い場合は再度抽出を行う。再抽出した DNA も濃度が薄い場合には、そのまま用いる。

3.1.8 抽出される DNA の純度

本法により、ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、O.D.260 nm/ O.D.280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 程度になる。

3.1.9 記録

希釈倍率と吸光度値及び吸光度の比を記録する。また、PCR 用 DNA 溶液を得るために特別に行った操作があれば、詳細に記録すること。

3.1.10 備考

「3.1.6.1 DNAの抽出A」の操作(21)は、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TE 100 µL、トウモロコシ及びトウモロコシ加工食品においては、TE50µL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。

得られたDNA溶液を、エタノール沈殿等を行い濃縮する。

最初からDNA抽出をやり直し、「3.1.6.1 DNAの抽出A」の操作(21)で、DNAの融解に用いるTEを20 µL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。

(注1) 同程度の品質とは、抽出したDNA溶液のO.D.260 nm/O.D.230 nm比だけでなく、個別品目編に記載した多くの品目に対し、PCRに適したDNAの抽出ができることをいう。さらに、当センターでは、当該農産物からDNAを抽出し、定量PCR編に基づき内在性遺伝子の定量を行い、比較することにより確認している。

(注2) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注3) DNAは、230nmで吸収極小を示し、260nmで吸収極大を示す。また、タンパク質等不純物は、280nm付近に吸収を示す。

(注4) 抽出されるDNA量によって、適宜、希釈量を変更する。

(注5) Sambrook, J., Russel, D. W. "Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd Ed. (volume 3)", Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, A8.20. (ISBN 0-87969-577-3(pbk), ISBN 0-87969-576-5 (cloth))

3.2 QIAGEN Genomic-tip20/GによるDNAの抽出

3.2.1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNAを低塩濃度緩衝液によりイオン交換樹脂カラムに吸着させ、高濃度緩衝液を用いて溶出する。

3.2.2 出典

製品添付のプロトコルを「組換えDNA技術応用食品の検査法について」(厚生労働省食発第110号平成13年3月27日及び厚生労働省食発第158号平成13年5月25日)を参考に、改変している。

3.2.3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

3.2.4 装置

スイング式冷却遠心機：50mLのポリプロピレンチューブを3,000xgで遠心可能なもの。

冷却遠心機：2mLマイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000µL容等を用いる。(注1)

恒温水槽

試験管ミキサー

3.2.5 試薬

イオン交換樹脂カラム：QIAGEN社 QIAGEN Genomic-tip 20/G (Cat. No. 10223)

RNase A : QIAGEN 社 RNase A (Cat. No. 19101)

Proteinase K : QIAGEN 社 QIAGEN Proteinase K (Cat. No. 19131 又は 19133)

G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液 (注 2)

3.2.6 抽出操作 : QIAGEN Genomic-tip20/G による DNA の抽出

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて 7.5 mL の G2 緩衝液、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、200 μ L の QIAGEN Proteinase K 及び、10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、20 μ L の RNase A 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、試験管ミキサーを用いて撹拌する。
- (3) 50 の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。)
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times g で 4 で 15 分間遠心分離する。
- (5) 15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、1,000-5,000 μ L 容の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。
- (6) チューブをフラッシュ遠心する。
- (7) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (8) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (9) tip に、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。
- (10) (9) のカラムの洗浄操作を、さらに 2 回行う。
- (11) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、750 μ L の QF 緩衝液(50 を加え、DNA を溶出する (溶出 1))。
- (12) tip を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、750 μ L の QF 緩衝液(50)を加え、DNA を溶出する。(溶出 2))
- (13) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、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。
- (14) 遠心分離器(アングルロータ)を使用し、12,000 \times g で、4 、15 分間遠心分離後、200-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (15) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1,000 μ L の 70%エタノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。
- (16) 遠心分離器 (アングルロータ) を使用し、12,000 \times g で、4 、3 分間遠心分離し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (17) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブに 50 μ L の TE (pH 8.0)を加え、沈殿物を 65 で 15 分間振とう溶解させる。
- (18) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、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。
- (19) 指先でチューブをはじき、(12-24 時間) 冷蔵庫に静置する。

(20) 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 分、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 抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20℃以下で保存すること。

3.2.7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

3.1.7 に同じ。

3.2.8 抽出される DNA の純度

本法により、ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、O.D.260 nm/ O.D.280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 程度になる。

3.2.9 記録

3.1.9 に同じ。

3.2.10 備考

3.1.10 に同じ。但し、「3.1.6.1 DNA の抽出 A」の操作(21)は、「操作(17)」に読みかえる。

(注1) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注2) 製品添付のプロトコールに従い作製する。Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Cat. No. 13323)又は、Genomic DNA bufferset(Cat.No.19060)を購入しても良い。

3.3 CTAB を用いた DNA の抽出

3.3.1 試験の概要

抽出緩衝液中に試料を溶解し、夾雑物及びタンパク質の除去、RNase 処理を行い、DNA を抽出する。CTAB を溶出液とすることで、多糖類等が抽出されるのを避けている。

3.3.2 出典

Murray, M.G., Thompson, W., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA., Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325(1980)を一部改変している。

3.3.3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

3.3.4 装置

冷却遠心機：2mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000µL 容等を用いる(注1)。

恒温水槽

試験管ミキサー

3.3.5 試薬

試薬調製編を参照のこと。

3.3.6 抽出操作

(1) 試料の溶解

試料適量を乳鉢に採取(注2)(注3)し、石英砂少々、CTAB抽出液2 mLを加え、磨碎して、1.5 mLチューブへ移す(注4:プロテイナーゼ処理)。

60℃、30分間インキュベートした後、14,000rpm、3分間遠心分離(注5)する。

上清約700 µLを採取して、新しいチューブへ移す。

(2) PCI除タンパク処理

試料溶液に等量のPCIを加え、2分間激しく振り、14,000rpm、15分間遠心分離(注6)する。

上層を新しいチューブに採取する。

(3) CIA処理

試料溶液に等量のCIAを加え、2分間激しく振り(注7)、14,000rpm、3分間遠心分離する。

上層を新しいチューブに採取する。

(4) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え(注8)、30秒間チューブを転倒混和した後、12,000rpm、3分間遠心分離(注9)する。

上清を捨てる。

アルコール洗浄:70%エタノール800 µLを加え、転倒混和し、3分間静置した後、12,000rpm、3分間遠心分離する。

上清を捨て(注10)、5分間真空乾燥(注11)する。

(5) DNAの溶解とRNAの除去

TE100µl、RNase A(10mg/mL)2µLを加え、DNAを溶解する。

室温又は37℃で30min静置し、400 µLのCTAB抽出液を加える。

(6) 再CIA処理

500 µlのCIAを加えて軽く混和する。12,000rpm、15分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

(7) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え(注7)、30秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、12,000rpm、3分間遠心分離(注8)する。

上清を捨て(注10)、5分間減圧乾燥(注11)する。

(8) DNAの溶解

滅菌水100 µLを加え、DNAを溶解する(DNA溶液)。溶液は小分けして-20℃以下で凍結保存する(注12)(注13)。

3.3.7 抽出DNAの確認及び抽出DNA量の計算

3.1.7に同じ。

3.3.8 抽出されるDNAの純度

ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、O.D.260nm/O.D.280nm比が1.8~2.0程度になる。

3.3.9 記録

3.1.9に同じ。また、「3.3.6 抽出操作」時の下記の点も記録する。

(2) PCI除タンパク処理のチューブの様子

(4) アルコール沈殿の試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、遠心分離し、上清を捨てたときの沈殿の様子

3.3.10 備考

なし。

- (注1) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。
- (注2) 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。
- (注3) 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。
- (注4) プロテイナーゼ処理：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ことが予想される試料については、プロテイナーゼ K (20 mg/mL) 溶液を各チューブあたり 20 μ L 程度加えると中間層を減らすことができる。
- (注5) 遠心機は Centrifuge5417R(Eppendorf 社製) の場合を想定。約 16,000 \times g。一般には、最大遠心でよい。
- (注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。遠心分離はすべて室温で行う。低温で行うと、CTAB が沈殿して失敗する。
- (注7) 水層からフェノールを除くための操作。
- (注8) DNA を沈殿させるわけだが、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。
- (注9) 約 13,000 \times g。
- (注10) 上清を採取してから、フラッシュ遠心 (5,000 ~ 12,000rpm、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。
- (注11) 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。
- (注12) 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。
- (注13) 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。

4 PCR 増幅及びゲル電気泳動

4.1 試験の概要

抽出 DNA を鋳型とし、DNA ポリメラーゼ、遺伝子組換え体に特異的なプライマー対を用い、PCR を行う。その後、電気泳動、紫外線照射下での可視化を行い、予想される長さの PCR 産物が得られるか否かにより、試料中に遺伝子組換え体が含まれていたかを判定する。同時に、抽出した DNA が PCR 増幅に適していることを確認するために、各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、目的の PCR 産物が得られることを確認する。

エチジウムブロミドについて

この試薬は、2本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な変異原性がある。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。廃液は、必ず処理した後に捨てること。

エチジウムブロミドの処理

エチジウムブロミド処理用の器具が市販されているので、それを利用する。高濃度の場合は、処理に出すこと。

4.2 出典

PCR、ダイズ及びトウモロコシのプライマーについては、Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Quantification Methods using Novel Reference Molecules for Detection of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International (in press)による。ジャガイモのプライマーについては、「組換え DNA 技術応用食品の検査法について」厚生労働省食発第 110 号平成 13 年 3 月 27 日及び厚生労働省食発第 158 号平成 13 年 5 月 25 日)による。電気泳動操作については、製品添付のプロトコールによる。

4.3 適用範囲

ダイズについては、遺伝子組換えダイズ RoundupReady Soy (40-3-2 系統) の特異的検知

トウモロコシについては、遺伝子組換えトウモロコシ Bt11, Event176, T25, MON810 及び GA21 の 5 系統の特異的検知又は、スクリーニング

ジャガイモについては、遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf (Bt6 系統及び SPBT02-05 系統) 及び NewLeafPlus(RBMT21-129 系統, RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統) の特異的検知

なお、トウモロコシのスクリーニングについては、Cauliflower mosaic virus の 35S promoter を検知している。したがって、同配列を含む他の農産物とトウモロコシを混合して原材料とする加工食品には適用できない。

4.4 装置

4.4.1 PCR

サーマルサイクラー： MJResearch 社 PTC-200 DNA Engine, 宝酒造(株)製 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applied Biosystems 社 GeneAmp system 9700 (昇温モード: MAX)、又はこれらの機器を用いて行った PCR の結果と同等であるもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000µL 容等を用いる(注1)。

4.4.2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動装置：ミュールピッド II 電気泳動装置(株式会社アドバンス製)又は、同等品。

ゲルメーカー：電気泳動装置指定品。

トランスイルミネータ

写真撮影装置

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000µL 容等を用いる(注1)。

4.5 試薬

4.5.1 PCR

DNA ポリメラーゼ：AmpliTaq™ Gold (Applied Biosystems 社)又は、同等品。

デオキシヌクレオシド三リン酸溶液：dNTP(2mmol/Leach)AmpliTaq™ Gold 添付品。

塩化マグネシウム溶液：MgCl₂(25 mmol/L) AmpliTaq™ Gold 添付品。

PCR用緩衝液：10 × PCR bufferII

プライマー対：表 4.1 (1)-(3)に示した検知対象に応じて、既製のプライマーを購入するか、合成する。既製のプライマー又はプライマー対については、(株)ニッポンジーン又は(株)ファス

マックより購入する。増幅長については、表 4. 1 (1)-(3)に示す。通常は、以下に示すプライマー又はプライマー対を購入すればよい。

《ダイズ用プライマー対》

- ・ 内在性遺伝子(*Le1*)検知用：(株)ニッポンジーン(#313-05501)又は、(株)ファスマック(#S1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ RRSspecific 検知用：同(#310-05511)又は、同(#S2-1M)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシスクリーニング用プライマー対》

- ・ 内在性遺伝子(*SSIb*)検知用：同(#315-05441)又は、同 #M1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ CaMV 35S promoter 検知用：同(#317-05521)又は、同(#C1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ GA21 specific 検知用： 同(#312-05451)又は、同 #M2-1M)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシ系統用プライマー対》

- ・ 内在性(*SSIb*)遺伝子検知用：同(#315-05441)又は、同 #M1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ GA21 specific 検知用： 同(#312-05451)又は、同 #M2-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ Bt11 specific 検知用： 同(#319-05461)又は、同 #M3-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ Event176specific 検知用： 同(#316-05471)又は、同 #M4-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ T25specific 検知用： 同(#313-05481)又は、同 #M5-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ MON810 specific 検知用： 同(#310-05491)又は、同 #M6-1M)、若しくは同バルク品。

《ジャガイモ用プライマー》(注2)

- ・ 内在性遺伝子検知用 (Pss 定性用)：(株)ニッポンジーン(#316-05231)又は、(株)ファスマック(#G5-1)、又は同バルク品、若しくは、合成品。
- ・ NewLeafspecific 検知用：
- ・ NewLeaf Plus specific 検知用：同(#312-05191)又は、同(#G1-1)、又は同バルク品、若しくは、合成品。

標準プラスミド溶液(注3)：(株)ニッポンジーン又は(株)ファスマックより購入する。

《ダイズ用標準プラスミド》

- ・ GM ダイズ (RRS)陽性コントロールプラスミド：(株)ニッポンジーン(#311-04941)又は、(株)ファスマック(#PS-1)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシ用標準プラスミド》

- ・ GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド：同(#314-04811)又は、同(#PM-1)、若しくは同バルク品。

《ジャガイモ用標準プラスミド》(注2)

- ・ GM ジャガイモ (NewLeaf Plus)陽性コントロールプラスミド：同(#311-05301)又は、同(#PP-1)、若しくは同バルク品。

4.5.2 ゲル電気泳動

アガロースゲル

TBE 又は、TAE 緩衝液

エチジウムブロミド

ゲルローディング緩衝液 (ブルージュース)

DNA 分子量マーカー：PCR 産物の増幅長に適したマーカーを使用する。100 bp ラダーマーカー等が適当である。

4.6 操作

4.6.1 PCR 操作

準備

使用するチューブ、チップは使い捨てとし、使用する間近に 121℃、15 分以上オートクレーブ滅菌しておくこと。

操作に当たっては、専用のゴム手袋を着用すること。

操作は氷上で行う。

(1) 必要な PCR チューブの本数

PCR は、抽出後の DNA 溶液 1 点につき 1 本ずつ行う。抽出した DNA で PCR 増幅ができることを確認するために、必ず各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、予想される長さの PCR 産物が得られることを確認する。その他、内在性遺伝子検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注 4）と、各農産物に対応した標準プラスミドを使用したポジティブコントロールを用意する（注 5）。組換え体検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注 4）を用意する。さらに、各 PCR 装置一回の反応につき、標準プラスミドを鋳型として、プライマー対を含まないネガティブコントロールを一本以上用意する（注 6）（注 7）。

(2) マスターミックスの調製

PCR 反応液の組成は「表 4.2 PCR 反応液の組成」に定める。プライマー対以外を先に混合した後に、プライマー対を混合する。PCR を行う試料数にあわせて、滅菌した 0.2 mL チューブを用意する。この本数にあわせ、全体の使用液量を決め（注 8）、表の液量と比較して適当な倍率になるように、鋳型 DNA を除く各液を混合調製する。これを反応チューブに各 22.5 μ L 分取する。

プライマー対なしのネガティブコントロールについては、別にプライマー対を含まないマスターミックスを用意する。なお、マイクロピペットの最小容量に注意すること。

(3) 試料の添加

分取したマスターミックスに鋳型 DNA 溶液 2.5 μ L を加える。

試料の添加は、抽出 DNA、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの順に行う。

(4) PCR 増幅

すべての溶液を加えたら、PCR 増幅装置にかける。PCR の温度条件は表 4.3 温度サイクルに定める。

(5) 増幅後の処理

反応終了後は冷蔵あるいは冷凍保存するかあるいは直ちに電気泳動を行う。

4.6.2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動は、「4.6.2.1 前染色によるゲル電気泳動」又は、「4.6.2.2 後染色によるゲル電気泳動」を行う。

本マニュアルではミュージッド II 電気泳動装置（株式会社アドバンス製）を用いることを想定して記述してある。

準備

この段階では、特に滅菌した器具を用いる必要はない。

危険防止のためゴム手袋を使用すること。

4.6.2.1 前染色によるゲル電気泳動

(1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3%アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液(注9)(注10)を加え、加熱してアガロースを溶解する(注11)。ゲルが均一になった時点で、100 mLあたり 50 µg エチジウムブロミドを含むようにエチジウムブロミド溶液を加える。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける(注12)。30分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く(注13)。

(2) 泳動槽の準備

DNAの泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする(注14)。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液(TBE)を満たす(注9)(注15)。

(3) 電気泳動

PCR後の試料DNA溶液 5 µLに 1 µLのゲルローディング緩衝液を加え(注16)、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時にDNA分子量マーカースも泳動する(注17)。

試料を間違いなく注入できたら、100 Vの電圧で電気泳動を行う(注18)。ゲルローディング緩衝液に含まれるBPBがゲルの1/2に進んだところで電気泳動を止める(注19)。

速やかに、泳動写真の撮影を行う(注20)。

(4) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ(注21)をしき、その上にゲルを置き紫外線で照らす(注22)。CCDカメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA分子量マーカースと比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

4.6.2.2 後染色によるゲル電気泳動

(1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3%アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液(注9)(注10)を加え、加熱してアガロースを溶解する(注11)。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける(注12)。30分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く(注13)。

(2) 泳動槽の準備

DNAの泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする(注14)。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液(TBE)を満たす(注9)(注15)。

(3) 電気泳動

PCR後の試料DNA溶液 5 µLに 1 µLのゲルローディング緩衝液を加え(注16)、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時にDNA分子量マーカースも泳動する(注17)。

試料を間違いなく注入できたら、100 Vの電圧で電気泳動を行う(注18)。ゲルローディング緩衝液に含まれるBPBがゲルの1/2進んだところで電気泳動を止める(注19)。

速やかに、ゲルの染色に移る(注20)。

(4) ゲルの染色

ゲルが浸る量の新しい泳動緩衝液をプラスチック製容器に入れ、これに泳動後のゲルを移し入れる。ゲルを入れたら、緩衝液 100 mL当たり 50 µgの割合でエチジウムブロミド溶液を加える。容器をシェーカーに乗せて軽く振とうしながら30分ほど染色する。

(5) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ(注21)をしき、その上にゲルを置き紫外線を照射する(注

22)。CCD カメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA 分子量マーカ―と比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

4.7 PCR の成否

ネガティブコントロールからバンドがみられないことを確認し、ポジティブコントロールから予想される長さのバンドがみられることを確認する。確認後は、「5 結果の判定」から組換え体存在の有無を判定する。コンタミネーションがみられる場合は、コンタミネーション防止編を参照し速やかに適当な処置を行うこと。処置後、必要に応じて DNA の抽出をやり直し、PCR を行うこと。

4.8 特異性及び検知感度

ダイズ種子、トウモロコシ種子及びジャガイモから DNeasy Plant Maxi kit を用いて抽出した DNA 溶液を鋳型として、本編に記載された PCR を行った場合、目的とする遺伝子組換え体のみ増幅バンドがみられる。また、他の主要農作物(コメ、コムギ、オオムギ)において増幅バンドがみられない。

4.9 記録

泳動結果は画像データとして保存しておく。

4.10 備考

なし。

(注1) マイクロピペットは、一例を示している。

(注2) 遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf について、現在のところ系統検知用プライマー対は開発されていない。当面の間、遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf については、CaMV 35S promoter 検知用プライマー対を使用し、GM ダイズ (RRS)陽性コントロールプラスミド又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて、試験することとする。なお、CMV に感染した植物及び、多くの組換え体においても、PCR で増幅するので注意すること

(注3) PCR 反応のポジティブコントロール及び、遺伝子組換え農産物検知の判定のためのポジティブコントロールとして使用している。組換え体が入手できればそれを抽出して使用しても良い。

(注4) 使用している試薬に、PCR の鋳型となるようなコンタミネーションがないことを示す。

(注5) プライマー対の品質、混合等に問題がなく、PCR 反応が問題なく進行していることを示す。

(注6) 使用している試薬に、プライマー対のコンタミネーションがないことを示す。

(注7) 対象農産物の非組換え体が入手可能であったら、非組換え体から抽出した DNA 溶液を鋳型としたネガティブコントロールを用意する。組換え体検知用プライマー対に、内在性遺伝子検知用プライマー対等のコンタミネーションがないことを示すことができる。

(注8) チップの壁に反応液が付着するなどして損失する溶液量を考慮し、多めに作製する。

(注9) 問題がなければ、TAE 緩衝液を使用しても良い。その場合は、電気泳動緩衝液も TAE 緩衝液を使用するのがよい。

(注10) 100mL のゲル溶液で、大2枚、小1枚の作製が可能である。

(注11) 電子レンジを用いて加熱すると簡単である。ただし、突沸の可能性もあるので、やけど等しないように取り扱いに注意すること。

(注12) このときコームの周囲に気泡が入らないよう注意する。

(注13) 注意してコームを抜き取らないと、コームを抜き取った後のウェル(ゲルの試料を入れる穴)の底に穴があきサンプルが漏れることがある。

- (注 14) 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。
- (注 15) 緩衝液は適量が良い、多すぎると電流密度が下がり泳動時間が長くなる。
- (注 16) 試料溶液 5 μ L に対しゲルローディング緩衝液 1 μ L の割合であるが、ゲルローディング緩衝液の量は、厳密である必要はない。ラボフィルム上にゲルローディング緩衝液をおき、試料溶液を採取したピペットで何回か溶液を出し入れして混合すればよい。また、試料溶液又は、ウェルの大きさ等により、泳動に供する試料溶液量を変更する場合は、試料溶液に対して 1/6 倍量のゲルローディング緩衝液を加える。この場合、泳動に供した試料溶液量を記録すること。
- (注 17) 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。
- (注 18) 電極で、水の電気分解による気泡を確認する。
- (注 19) ゲルの 1/2 と、厳密に規定するものではないが、PCR の増幅長が短いため、長時間泳動するのは好ましくない。
- (注 20) 時間が経つと DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなる。
- (注 21) 食品包装用のラップ。紫外線の波長によっては、ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないとう紫外線が吸収されてしまい、像が得られない場合がある。
- (注 22) 紫外線照射装置には、波長に各種のものがある。人体への有害性や感度面からみて、312nm 程度の波長を持つ照射装置を用いるのがよい。

5 結果の判定

結果の判定は目的の PCR 産物の有無を電気泳動結果から判定して行う。すなわち、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られ、かつ遺伝子組換え農産物に対応する長さの PCR 産物が得られた場合、遺伝子組換え農産物が検出されたとする。

内在性遺伝子に対応する PCR 産物が認められない試料については、既に抽出している DNA 溶液を用いて、再度 PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、再度 DNA の抽出を行い、PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、「検出不能」とする。

表4.1(1) プライマー対：ダイズ*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>Le1</i> 用	Le1-n02	118 bp	<i>Le1</i>	
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外のCMVに感染した植物等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOSter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の土壌細菌等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 RRS 用	RRS-01	121 bp	CTP4from <i>P. hybrida</i> - CP4EPSPS 間	

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

表4.1(2) プライマー対：トウモロコシ*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>SSIb</i> 用	SSIb	151 bp	<i>zSSIb</i>	
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外のCMVに感染した植物等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOSter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の土壌細菌等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 Event176 用	E176-2	100 bp	<i>cryIA(b)</i> - PEPC#9 intron	
組換え遺伝子 Bt11 用	Bt11-3	127 bp	<i>adh1-1S</i> - <i>cryIA(b)</i>	
組換え遺伝子 GA21 用	GA21-3	133 bp	OTP - <i>m-epsps</i>	
組換え遺伝子 T25 用	T25-1	149 bp	<i>pat</i> - 35S-ter	
組換え遺伝子 MON810 用	M810-2	113 bp	<i>hsp70</i> - <i>cryIA(b)</i>	

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

表 4 . 1 (3) プライマー対 : ジャガイモ

対象遺伝子	記号	増幅長	配 列 (5' 3')	増幅部分
内在性遺伝子 Pss 用	Pss 01n-5' Pss 01n-3'	216 bp	TGACCTGGACACCACAGTTAT GTGGATTTTCAGGAGTTCTTCGA	<i>S.tuberosum</i> sucrose synthase/sense 同 /anti-sense
組換え遺伝子 NewLeaf 用				
組換え遺伝子 NewLeaf Plus 用	p-FMV02-5' PLRV01-3'	234 bp	AAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGA AAAAGAGCGGCATATGCGGTAAATCTG	p-FMV/sense PLRV/ anti-sense

表 4 . 2 PCR 溶液の組成

	液量/tube	終濃度
滅菌水	15.375μL	
AmpliTaq™ Gold	0.125μL	0.625 U
10x PCR bufferII	2.5 μL	1 x
dNTP (2mmol/Leach)	2.5 μL	200μmol/Leach
MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.5 μL	1.5 mmol/L
プライマー対 (25 μmol/Leach)	0.5 μL	0.5 μmol/Leach
鋳型 DNA(10ng/μL)	2.5 μL	25 ng
全量	25 μL	

表 4 . 3 温度サイクル

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95	10min	1 サイクル
変性	95	30sec	40 サイクル
アニーリング	60	30sec	
伸長反応	72	30sec	
最後の伸長反応	72	7min	1 サイクル
保存	4	-	-