

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

個別品目編

(定性試験用)

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

遺伝子組換え食品の品質表示は、その適用範囲が非常に広い。また、新たな組換え体等に対応するため、毎年見直しがされる。

遺伝子関連技術は、日進月歩の状態であり、本マニュアルに記載してある遺伝子組換え食品の試験方法についても、分析技術の向上と品質表示基準の見直しに対応するため、常に見直しをしておく必要がある。特に、個別品目についての分析方法は、常により良い方法を模索し、適切な検査を行う必要がある。

ここにあげられている試験方法は、表紙に記載した日付において、各品目から分析可能な DNA の抽出を行うために適切と思われる方法である。試料の粉碎には、試料に滅菌水等を加えてホモジナイズする方法又は、試料をフリーズドライ等により乾燥させて粉碎する方法が考えられるが、本マニュアルでは、主に、試料に滅菌水を加えてホモジナイズする方法を記載している。なお、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。

ii) 適用範囲

本編は、表示のモニタリングに資するため、食品からの遺伝子組換え体の定性 PCR における試料の前処理の方法及び抽出方法について記述している。ダイズ、トウモロコシ及びジャガイモの農産物及び加工食品に適用できる。

1 使用機器

粉碎机：試料の粉碎に用いる。粉碎机には、水分を含む試料に適した粉碎机と、乾燥試料に適した粉碎机があるので、試料の性状にあわせて選択する。また、粉碎机には、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机等があるが、粉碎机はコンタミネーション防止のために、粉碎容器及びカッター等が分解でき、洗浄が充分行える粉碎机を用いる。さらに望ましくは、滅菌できるものが良い。粉碎容器及び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。

本マニュアルでは、水分を含む試料に適した粉碎机として、(株)日本精機製作所製エースホモジナイザー又は、同等品を想定している。粉碎容器及びカッターは洗浄後滅菌して用いる。乾燥試料に適した粉碎机は、粉碎容器及びカッター等が、超音波洗浄可能なものとする。粉碎容器及びカッター等は、超音波洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。

乳鉢及び乳棒：洗浄後滅菌して用いる。

2 農産物

2.1 ダイズ(枝豆及びダイズもやしを含む。)

(1) ダイズ

試料一パックを乾燥試料に適した粉砕器に入れ全量を粉砕する。十分に細かくなったものを抽出に供する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

(2) ダイズもやし

試料一パックを 1 cm 程度に切断し、水分を含む試料に適した粉砕器に移し、試料重量と同じ重量の滅菌水を加えて粉砕する。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(3) 枝豆

試料一パック(皮付きのものは皮付きのまま)(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。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、50 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

2.2 トウモロコシ

試料一パックを乾燥試料に適した粉砕器に移し、粉砕する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.2 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、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

2.3 ジャガイモ

植物防疫法上、生のジャガイモは、日本に入っていない。

3.1 ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズ Roundup Ready Soy (40-30-2 系統)を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、DNeasy PlantMaxikit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法も、適用可能であり、試料採取量は、各項目に示した。

3.1.1 豆腐・油揚げ類

(1) 豆腐

試料一パック（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、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) 油揚げ

試料一パック（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、プロテイナーゼ処理を行う。

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。

3.1.2 凍豆腐、おから及びゆば

(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、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) おから

試料一パック（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からを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(3) ゆば

試料に試料重量の5倍量の滅菌水を加え、20分後に水分を含む試料に適した粉碎器に移し粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、150 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.3 納豆

ざる（注1）に一パックを開け、流水（水道水）で15分間洗浄して、表面のぬめりを除く。滅菌水で十分にすすいだ後、重量を測定し水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

（注1）台所用品の水切りネットを使い捨てで使用すると、便利である。

3.1.4 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。

3.1.5 みそ

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.6 ダイズ煮豆

（1）水煮ダイズ

試料一パック（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、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、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.7 ダイズ缶詰及びダイズ瓶詰

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.8 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採り、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.9 ダイズいり豆

試料一パックを乾燥試料に適した粉碎器に採り、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、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.10 「3.1.1」から「3.1.9」までに掲げるものを主な原材料とするもの

(1) 液体

「3.1.4 豆乳類」に従う。

(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3.1.1から3.1.9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、試料一パック(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からを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.11 ダイズ(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の、試料一パック(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からを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.12 ダイズ粉を主な原材料とするもの

「3.1.11」に同じ

3.1.13 ダイズたん白を主な原材料とするもの

(1) 魚肉ソーセージ

試料一パック(又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量)を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、250 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) その他

「3.1.11」に同じ

3.1.14 枝豆を主な原材料とするもの

「3.1.11」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、100mg 採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3.1.15 ダイズもやしを主な原材料とするもの

「3.1.11」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 採取することとし、プロテイナーゼ処理を行う。

3.2 トウモロコシ加工食品

遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 , Event176 , T25 , MON810 及び GA21 の5系統を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、DNeasy PlantMaxikit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3.1.6.2 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、2.0 g を採取し、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法も適用可能であり、試料採取量は、各項目に示した。

3.2.1 コーンスナック菓子

(1) コーンチップス

試料一パック（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。

(2) コーンパフ

試料一パック（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 を採取しする。

3.2.2 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。

3.2.3 ポップコーン

試料一パック（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。

3.2.4 冷凍トウモロコシ

試料一パック（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。

3.2.5 トウモロコシ缶詰及びトウモロコシ瓶詰

缶詰に含まれる水分を切った後、試料一パック（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。

3.2.6 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の、分離が困難なものについてはそのままの、試料一パック（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。

3.2.7 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。）

「3.2.6」に同じ。

3.2.8 トウモロコシ（調理用）を主な原材料とするもの

「3.2.6」に同じ。

3.2.9 「3.2.1」から「3.2.5」までに掲げるものを主な原材料とするもの

「3.2.6」に同じ。試料一パック（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。

3.3 ジャガイモ加工食品

遺伝子組換えジャガイモ New Leaf (Bt6 系統及び SPBT02-05 系統)及び New Leaf Plus (RBMT21-129、RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統)を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」を、改変が必要なものは各項目に示したように操作する。試料採取量は、各項目に示す。

3.3.1 乾燥ジャガイモ

粉末のものにあつては、試料を、そのまま 2.0 g を採取し、抽出に供する。粉末以外のものにあつては、試料一パック（又は、乾燥試料に適した粉碎器に入る量）を乾燥試料に適した粉碎器に採り、粉碎する。均質になったものから、2.0 g を採取し、抽出に供する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50℃、1 時間保温する。

3.3.2 冷凍ジャガイモ

試料一パック（一パック 500 g 以上のものは、500 g 以上）を乳鉢に採り、乳棒で粉碎する。均質になったものから、2.0 g を採取し、抽出に供する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50℃、1 時間保温する。

3.3.3 ジャガイモでん粉

試料から 10 g を採取し、そのまま抽出に供する。基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」の（1）及び（2）を次に示すように、改変して操作する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50℃、1 時間保温する。

（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、15 mL 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 15 mL 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 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 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攪拌する。**太字**は改変部分。

3.3.4 ポテトスナック菓子

試料一パックを、厚手のビニール袋に入れ、木づち等でたたき、粉末にする。ビニール袋をよく振り、混合した後、2.0 g 採取する。また、2 回目の G2 緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が 10 mL に満たない場合は 10 mL 負荷できるように、適宜 G2 緩衝液を添加し、50℃、1 時間保温する。

3.3.5 乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、ジャガイモ澱粉及びポテトスナック菓子を主な原料とするもの

ジャガイモのみ（又は、ジャガイモ以外に）分離できるものについては、分離する。試料一パックについて、次のように操作する。いわゆる「はるさめ」等の乾燥品については、0.50 mm のメッシュがとおる程度に粉碎し、「3.3.3 ジャガイモ澱粉」の操作を行う。焼成した菓子については、「3.3.4 ポテトスナック菓子」の操作を行う。その他については、「3.3.2 冷凍ジャガイモ」の操作を行う。

3.3.6 ジャガイモ（調理用）を主な原材料とするもの

液体のものは、試料パックを良く混合した後に、2.0 gを採取し、抽出に供する。

液体以外の性状のものは、ジャガイモのみ（又は、ジャガイモ以外に）分離できるものについては、分離する。試料パックについて、「3.3.2 冷凍ジャガイモ」の操作を行う。