

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

## コンタミネーション防止編

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

## 1 はじめに

遺伝子組換え食品の検査・分析には PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を用いる。この技術は、目的とする DNA を数百万倍に増幅し、検出しようとするものである。このため、わずかなコンタミネーション（contamination=汚染）があっても、間違った検出がされてしまう。このため、コンタミネーションの防止には細心の注意を払う必要がある。

遺伝子組換え食品の検査・分析はおよそ次のような流れで行われる。

サンプリング DNA 抽出 PCR 増幅 電気泳動

コンタミネーションを防ぐためには、実験室をこの流れに沿った作業動線とし、流れを逆流させないことが重要になる。また、各担当者に作業手順等について十分な知識を与え、例えば、検査が重なった場合でも電気泳動をしたその手で PCR の操作にはいるような作業手順とならないような検査計画を作らせることが重要である。

## 2 全体としての考え方

- ・コンタミネーションの原因は実験環境によるものが大きい。特に、試料の前処理において、試料を粉体とする場合は、コンタミネーションがおこりやすいため、少なくとも粉砕室と他の操作を行う部屋は別室とすること。
- ・コンタミネーションを完全に防止することはできないので、リスクを低減する方法を考える。
- ・コンタミネーションが起こったときの原因究明を含めた対処法を用意しておく。
- ・実験操作の意味を理解させると共になるべく簡単・簡便な方法を採用する。
- ・器具の使用方法について理解させると共に、なるべく Disposable（使い捨て）のものを採用する。
- ・多人数での作業を考え、作業毎の区分管理を徹底する。
- ・コンタミネーションとして特に注意するのは、DNA 分解酵素(DNase)と検出対象の DNA 断片である。DNase が混入すると必要な DNA が分解され、検査不能となる。検出対象の DNA 断片が混入すると、誤った陽性結果が得られる。
- ・オートクレーブで DNA を完全に分解することはできない。
- ・PCR のアンプリコン（PCR 産物）は要注意である。
- ・実現可能なコンタミネーション防止法を採用する。
- ・目的に応じた精度管理レベルを組織的にはっきりさせる。人によって対応が異ならないようにする。

## 3 実験操作

- ・作業毎の手洗いはコンタミネーションの防止に有効である。
- ・不要の DNA を分解させるには、次亜塩素酸処理と UV 照射が有効である。
- ・各作業は独立に行い、実験の流れを遡ってはならない。

### 3.1 サンプリング

- ・試料の粉砕には、十分な作業スペースを確保すること。実験台にラップ等を敷いて粉砕

器をその上に置き、試料を粉碎する。粉碎した試料の粉末を飛散させないように気をつける。例えば、ドラフト中で作業することも望ましい。

### 3.2 DNAの抽出

- ・溶液の入ったチューブ類は開ける前に軽く遠心し、フタについた溶液を落とす。
- ・チューブの開閉の際に飛沫が飛ばないように注意する。できれば専用のチューブオープナーを利用すると良い。
- ・実験の際は、操作をしやすいように器具試薬を机の上に配置する。

### 3.3 PCR

#### 解説

PCR は DNA の特定部分を何百万倍にも増幅する技術である。理論的には一本の DNA があれば増幅可能であり、20 回の PCR 反応後には、約 100 万倍の PCR 産物が生じ、検出が可能となる。

このため PCR においては外からの遺伝子の混入を防ぐことが重要になる。

- ・操作は隔離した部屋又はクリーンベンチで行う。
- ・PCR には専用のピペッター、チップ等を用いる。これらには明確に PCR 用と表示すること。
- ・ピペットチップは操作毎に使い捨てとする。できればフィルター付きを用いる。
- ・実験には、新しい手袋を装着する。
- ・できれば眼鏡（防護眼鏡）、帽子、マスクを着用する。
- ・作業中は話さない。咳・くしゃみをしないこと。人間の体内には DNase が含まれているため、つばが飛んでチューブにはいると DNA が分解されてしまう。
- ・試料 DNA を加える前に、他の試薬すべてを加えておく。
- ・コントロールなしで PCR を行ってはならない。
- ・次のチューブに試料を加える前に、必ず他のチューブを閉じておく。

### 3.4 電気泳動

#### 解説

PCR は DNA の特定部分を何十倍にも増幅する技術である。すなわち PCR 産物は再び PCR の鋳型となるので、コンタミネーション防止の観点からいうと、PCR 反応液は高濃度のコンタミネーション原因物質である。

電気泳動に際しては、この PCR 産物を密閉されたチューブから取り出し、ピペット操作を行う。この操作中に、PCR 産物がエアロゾルとして拡散することが考えられる。このようなエアロゾルは、空気中を長く飛散することとなり、コンタミネーションの原因となる。このため、電気泳動は、できるだけ他の作業と区分して行う必要がある。

電気泳動は、PCR 産物を他の操作（例えば nested PCR）に使うのでなければ無菌的に行う必要はない。このため、電気泳動専用の器具類は、電気泳動の作業場所において準備、使用、廃棄等を行うことができる。

- ・電気泳動は他の作業と明確に区分して行う。
- ・電気泳動には専用のピペッター、チップ等を用いる。これらには明確に電気泳動用と表示すること。
- ・PCR産物を取り扱った器具類は、他の場所に持ち出さない。
- ・電気泳動の準備に使用したチップやチューブ、パラフィルムは密封できるポリ袋（ジップロック等）に封入してからゴミとして廃棄すること。

## 4 日常管理

### 4.1 滅菌水

- ・滅菌水はコンタミネーションの原因となり易いことから、一回に使い切る量程度に小分けして、オートクレーブ滅菌を行う。

### 4.2 一般試薬

- ・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。
- ・試薬類はなるべく一回に使い切る程度に小分けして、個人管理とする。個人管理とすることで、コンタミネーションが起こったときの被害を最小限にできる。
- ・専用試薬は、その旨明示すること。
- ・不要となった試薬あるいはコンタミネーションを起こした試薬は速やかに処分する。

### 4.3 プライマー（試薬調製編を参照）

- ・プライマーの希釈・分注には最大限の注意を払う。
- ・希釈・分注に用いる器具、試薬はオートクレーブ後、未開封のものを使用する。
- ・フィルター付きチップを用いるのが望ましい。
- ・希釈したプライマーは小さなチューブに分注して保存する。
- ・チューブは一度使用したら、そのことを明示し、使用したものが責任を持って管理する。

### 4.4 オートクレーブ

#### 解説

オートクレーブは、水蒸気を利用して高温高圧の環境を作り出し、滅菌を行う装置であるが、DNAを完全に分解することはできない。このためオートクレーブ中に特異的なDNA断片が残り、それによってコンタミネーションが起こる可能性がある。

- ・専用のオートクレーブを用いる。
- ・できれば使用毎にオートクレーブ内部の洗浄を行う。

### 4.5 クリーンベンチ

#### 解説

クリーンベンチはフィルターを通した空気を実験台上に供給することで無塵の環境を作り出している。しかし、DNAがフィルターにどの程度トラップされるのかは不明である。

従って、空気を循環させながら PCR のピペット操作を行うことが良いのか悪いのか、現時点では明らかでない。このため、クリーンベンチを過信せず、できるだけクリーンな状態を保つよう心がける。

- ・ 不要な DNA を分解するために、UV ランプを点灯し、8 時間以上 UV を照射する。

#### 4.6 実験室

- ・ 定期的の実験台や試薬棚の掃除を行う。