

(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）
食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）	食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）
（総則関係）～（附則）（略）	（総則関係）～（附則）（略）
別添 添加物 1－1～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 添加物 1－1～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
目次	目次
1. 検体採取方法..... <u>8</u>	1. 検体採取方法..... <u>7</u>
1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取..... <u>8</u>	1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取..... <u>7</u>
1.1.1. <u>ダイズ及びトウモロコシ</u> の穀粒の検体採取..... <u>8</u>	1.1.1. <u>ダイズ及びトウモロコシ</u> の穀粒の検体採取..... <u>7</u>
1.1.1.1. 袋積みの場合..... <u>8</u>	1.1.1.1. 袋積みの場合..... <u>7</u>
1.1.1.2. ばら積みの場合..... <u>9</u>	1.1.1.2. ばら積みの場合..... <u>8</u>
1.1.1.2.1. サイロ搬入時..... <u>9</u>	1.1.1.2.1. サイロ搬入時..... <u>8</u>
1.1.1.2.2. はしけ搬入時..... <u>9</u>	1.1.1.2.2. はしけ搬入時..... <u>8</u>
1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取..... <u>9</u>	1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取..... <u>8</u>
1.1.2. <u>ダイズ及びトウモロコシ</u> の加工食品の検体採取..... <u>9</u>	1.1.1.3. 加工食品の検体採取..... <u>8</u>
1.1.3. <u>パパイヤ</u> の検体採取..... <u>10</u>	1.1.2. <u>パパイヤ</u> の検体採取..... <u>9</u>
1.1.3.1. 生鮮 <u>パパイヤ</u> の検体採取..... <u>10</u>	1.1.2.1. 生鮮 <u>パパイヤ</u> の検体採取..... <u>9</u>
1.1.3.2. <u>パパイヤ</u> 加工品の検体採取..... <u>10</u>	1.1.2.2. <u>パパイヤ</u> 加工品の検体採取..... <u>9</u>
2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法..... <u>11</u>	2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法..... <u>10</u>
2.1. <u>ダイズ</u> 穀粒の検査法（ <u>分別生産流通管理の判定に係る検査法</u> ）..... <u>11</u>	2.1. <u>ダイズ</u> 穀粒の検査法..... <u>10</u>
2.1.1. 定量 PCR 法..... <u>11</u>	2.1.1. 定量 PCR 法..... <u>10</u>
2.1.1.1. <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> を用いた定量 PCR..... <u>13</u>	2.1.1.1. <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> を用いた定量 PCR..... <u>12</u>
2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>13</u>	2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>12</u>
..... <u>13</u> <u>12</u>
2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>14</u>	2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>13</u>
..... <u>14</u> <u>13</u>
2.1.1.1.3. PCR（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>15</u>	2.1.1.1.3. PCR（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>14</u>
2.1.1.1.4. 検量線の作成（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>15</u>	2.1.1.1.4. 検量線の作成（ <u>ABI PRISM® 7700</u> 及び <u>ABI PRISM® 5700</u> ）..... <u>14</u>

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR.....	<u>16</u>
2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	<u>16</u>
2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)	<u>16</u>
2.1.1.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>17</u>
2.1.1.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>18</u>
2.1.1.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>18</u>
2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR.....	<u>19</u>
2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)	<u>19</u>
2.1.1.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)	<u>19</u>
2.1.1.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)	<u>20</u>
2.1.1.3.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7000)	<u>20</u>
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR.....	<u>20</u>
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	<u>20</u>
2.1.1.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	<u>20</u>
2.1.1.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	<u>22</u>
2.1.1.4.4. 検量線の作成 (Applied Biosystems® 7500)	<u>22</u>
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR.....	<u>22</u>
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	<u>22</u>
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	<u>24</u>
2.1.1.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	<u>24</u>
2.1.1.5.4. 検量線の作成 (Roche LightCycler System)	<u>25</u>
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR.....	<u>25</u>
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)	<u>25</u>
2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)	<u>25</u>
2.1.1.6.3. PCR (QuantStudio 5)	<u>26</u>
2.1.1.6.4. 検量線の作成 (QuantStudio 5)	<u>26</u>
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR.....	<u>27</u>
2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)	<u>27</u>
2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)	<u>27</u>
2.1.1.7.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)	<u>28</u>
2.1.1.7.4. 検量線の作成 (QuantStudio 12K Flex)	<u>28</u>
2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR.....	<u>28</u>
2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)	<u>28</u>
2.1.1.8.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)	<u>28</u>
2.1.1.8.3. PCR (LightCycler® 96)	<u>29</u>
2.1.1.8.4. 検量線の作成 (LightCycler® 96)	<u>29</u>
2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR.....	<u>29</u>
2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)	<u>29</u>
2.1.1.9.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)	<u>30</u>

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR.....	<u>14</u>
2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	<u>14</u>
2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)	<u>15</u>
2.1.1.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>16</u>
2.1.1.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>17</u>
2.1.1.2.5. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	<u>17</u>
2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR.....	<u>17</u>
2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)	<u>17</u>
2.1.1.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)	<u>18</u>
2.1.1.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)	<u>18</u>
2.1.1.3.4. 検量線の作成 (ABI PRISM® 7000)	<u>19</u>
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR.....	<u>19</u>
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	<u>19</u>
2.1.1.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	<u>19</u>
2.1.1.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	<u>20</u>
2.1.1.4.4. 検量線の作成 (Applied Biosystems® 7500)	<u>21</u>
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR.....	<u>21</u>
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	<u>21</u>
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	<u>23</u>
2.1.1.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	<u>23</u>
2.1.1.5.4. 検量線の作成 (Roche LightCycler System)	<u>23</u>
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR.....	<u>24</u>
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)	<u>24</u>
2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)	<u>24</u>
2.1.1.6.3. PCR (QuantStudio 5)	<u>25</u>
2.1.1.6.4. 検量線の作成 (QuantStudio 5)	<u>25</u>
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR.....	<u>25</u>
2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)	<u>25</u>
2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)	<u>26</u>
2.1.1.7.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)	<u>26</u>
2.1.1.7.4. 検量線の作成 (QuantStudio 12K Flex)	<u>27</u>
2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR.....	<u>27</u>
2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)	<u>27</u>
2.1.1.8.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)	<u>27</u>
2.1.1.8.3. PCR (LightCycler® 96)	<u>28</u>
2.1.1.8.4. 検量線の作成 (LightCycler® 96)	<u>28</u>
2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR.....	<u>28</u>
2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)	<u>28</u>
2.1.1.9.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)	<u>29</u>

2.1.1.9.3. PCR (LightCycler® 480)	30
2.1.1.9.4. 検量線の作成 (LightCycler® 480)	30
2.1.2. 試料の遺伝子組換え 農産物 含有率の計算	31
2.1.3. 結果の判定	31
2.1.4. ELISA 法 (参考検査法)	31
2.2. ダイズ穀粒の検査法 (遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法)	33
2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法	33
2.2.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR	34
2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	34
2.2.1.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	36
2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	36
2.2.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	37
2.2.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR	37
2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	37
2.2.1.2.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	37
2.2.1.2.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	38
2.2.1.2.4. PCR 結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)	38
2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR	38
2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)	38
2.2.1.3.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)	39
2.2.1.3.3. PCR (QuantStudio 5)	39
2.2.1.3.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 5)	39
2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR	39
2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)	39
2.2.1.4.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)	40
2.2.1.4.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)	40
2.2.1.4.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 12K Flex)	40
2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR	40
2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)	40
2.2.1.5.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)	41
2.2.1.5.3. PCR (LightCycler® 96)	41
2.2.1.5.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96)	41
2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR	42
2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)	42
2.2.1.6.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)	42
2.2.1.6.3. PCR (LightCycler® 480)	42
2.2.1.6.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 480)	42
2.2.2. 結果の判定	43

2.1.1.9.3. PCR (LightCycler® 480)	29
2.1.1.9.4. 検量線の作成 (LightCycler® 480)	29
2.1.2. 試料の遺伝子組換え 食品 含有率の計算	30
2.1.3. 結果の判定	30
2.1.4. ELISA 法 (参考検査法)	30

(新設)

2.3. トウモロコシ穀粒の検査法 (分別生産流通管理の判定に係る検査法).....	48	2.2. トウモロコシ穀粒の検査法.....	32
2.3.1. 定量 PCR 法.....	48	2.2.1. 定量 PCR 法.....	32
2.3.1.1. <i>Cauliflower mosaic virus</i> 由来の P35S が組み込まれた組換え系統の定量.....	49	2.2.1.1. <i>Cauliflower mosaic virus</i> 由来の 35S promoter が組み込まれた組換え系統の定量.....	33
2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量.....	50	2.2.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量.....	33
2.3.1.3. 結果の判定.....	50	2.2.1.3. 結果の判定.....	34
2.3.2. マルチプレックス PCR 法.....	50	2.2.2. マルチプレックス PCR 法.....	34
2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング.....	51	2.2.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング.....	35
2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	51	2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	35
2.3.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	54	2.2.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	37
2.3.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	54	2.2.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	38
2.3.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	54	2.2.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	38
2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング.....	55	2.2.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング.....	38
2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) ...	55	2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) ...	38
2.3.2.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) ..	55	2.2.2.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) ...	39
2.3.2.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	55	2.2.2.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	39
2.3.2.2.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	56	2.2.2.2.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	39
2.3.2.3. 結果の判定 (図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム) ..	56	2.2.2.3. 結果の判定 (図 1 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム) ..	39
2.3.3. 粒単位検査法.....	58	2.2.3. 粒単位検査法.....	42
2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法.....	58	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.....	42
2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製.....	58	2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製.....	42
2.3.3.1.2. プレート情報の設定.....	59	2.2.3.1.2. プレート情報の設定.....	43
2.3.3.1.3. PCR.....	59	2.2.3.1.3. PCR.....	43
2.3.3.1.4. PCR 結果の解析.....	59	2.2.3.1.4. PCR 結果の解析.....	43
2.3.3.2. 結果の判定.....	59	2.2.3.2. 結果の判定.....	43
2.3.4. グループ検査法.....	59	2.2.4. グループ検査法.....	43
2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法.....	60	2.2.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法.....	44
2.3.4.1.1. 反応液の調製.....	60	2.2.4.1.1. 反応液の調製.....	44
2.3.4.1.2. プレート情報の設定.....	62	2.2.4.1.2. プレート情報の設定.....	46
2.3.4.1.3. PCR.....	63	2.2.4.1.3. PCR.....	47
2.3.4.1.4. PCR 結果の解析.....	63	2.2.4.1.4. PCR 結果の解析.....	47
2.3.4.1.5. 結果の判定 (図 5 グループ検査法試験結果の判定スキーム)	64	2.2.4.1.5. 結果の判定 (図 2 グループ検査法試験結果の判定スキーム)	48
2.3.4.2. 組換え系統の判別 (参考検査法)	67	2.2.4.2. 組換え系統の判別 (参考検査法)	51
2.3.4.2.1. リアルタイム PCR.....	67	2.2.4.2.1. リアルタイム PCR.....	51
2.3.4.2.2. プレート情報の設定.....	69	2.2.4.2.2. プレート情報の設定.....	53
2.3.4.2.3. PCR.....	69	2.2.4.2.3. PCR.....	53
2.3.4.2.4. 結果の判定.....	70	2.2.4.2.4. 結果の判定.....	54
2.4. トウモロコシ穀粒の検査法 (遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法)	70	(新設)	
2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法.....	70		

2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR.....	71		
2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	71		
2.4.1.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	73		
2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	73		
2.4.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	73		
2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR.....	74		
2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	74		
2.4.1.2.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	74		
2.4.1.2.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	75		
2.4.1.2.4. PCR 結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)	75		
2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR.....	75		
2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)	75		
2.4.1.3.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)	75		
2.4.1.3.3. PCR (QuantStudio 5)	76		
2.4.1.3.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 5)	76		
2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR.....	76		
2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)	76		
2.4.1.4.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)	76		
2.4.1.4.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)	77		
2.4.1.4.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 12K Flex)	77		
2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR.....	77		
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)	77		
2.4.1.5.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)	78		
2.4.1.5.3. PCR (LightCycler® 96)	78		
2.4.1.5.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96)	78		
2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.....	78		
2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)	78		
2.4.1.6.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)	79		
2.4.1.6.3. PCR (LightCycler® 480)	79		
2.4.1.6.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 480)	79		
2.4.2. 結果の判定.....	79		
2.5. ダイズ加工食品の検査法.....	85	2.3. ダイズ加工食品の検査法.....	54
2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR.....	85	2.3.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR.....	55
2.5.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	85	2.3.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) ..	55
2.5.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	86	2.3.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	55
2.5.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	86	2.3.1.3. PCR (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	55
2.5.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	86	2.3.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)	56
2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR.....	87	2.3.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR.....	56
2.5.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	87	2.3.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	56

2.5.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)	87	2.3.2.2. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 384 well)	57
2.5.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) ...	88	2.3.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) ...	57
2.5.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	88	2.3.2.4. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	58
2.5.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	89	2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)	58
2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR.....	89	2.3.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR.....	58
2.5.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)	89	2.3.3.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7000)	58
2.5.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)	90	2.3.3.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7000)	59
2.5.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)	90	2.3.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)	59
2.5.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)	90	2.3.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)	59
2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR.....	90	2.3.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR.....	60
2.5.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	90	2.3.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)	60
2.5.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	91	2.3.4.2. プレート情報の設定 (Applied Biosystems® 7500)	60
2.5.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	91	2.3.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)	60
2.5.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)	91	2.3.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)	61
2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR.....	91	2.3.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR.....	61
2.5.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	91	2.3.5.1. PCR 用反応液の調製 (Roche LightCycler System)	61
2.5.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	92	2.3.5.2. キャピラリー情報の設定 (Roche LightCycler System)	62
2.5.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	92	2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)	62
2.5.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)	93	2.3.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)	62
2.5.6. 測定結果の判定.....	93	2.3.6. 測定結果の判定.....	62
2.6. トウモロコシ加工食品の検査法.....	97	2.4. トウモロコシ加工食品の検査法.....	66
2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR.....	97	2.4.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR.....	66
2.6.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	97	2.4.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	66
2.6.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	99	2.4.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.6.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	99	2.4.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.6.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	99	2.4.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)	68
2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.....	100	2.4.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.....	69
2.6.2.1. PCR 用反応液の調製*1 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	100	2.4.2.1. PCR 用反応液の調製*1 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	69
2.6.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	101	2.4.2.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	70
2.6.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	102	2.4.2.3. PCR (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	71
2.6.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	102	2.4.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)	71
2.6.3. 測定結果の判定.....	102	2.4.3. 測定結果の判定.....	71
2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法.....	106	2.5. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法.....	75
2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法.....	106	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.....	75
2.7.1.1. CTAB 法.....	106	2.5.1.1. CTAB 法.....	75
2.7.1.2. 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)	108	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)	77
2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイ		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)	109
2.7.1.4. 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)	110
2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用)	111
2.7.1.6. シリカベースレジエンタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)	112
2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法.....	113
2.7.2.1. 検体前処理.....	114
2.7.2.1.1. ダイズ加工食品.....	114
2.7.2.1.2. トウモロコシ加工食品.....	117
2.7.2.2. DNA の抽出精製.....	118
2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A (ダイズ加工食品に適用)	118
2.7.2.2.2. 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)	120
2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出.....	121
2.7.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出.....	122
2.7.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存	123
2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製.....	124
2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製.....	125
2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製 (NIPPON GENE GM quicker)	125
2.8. パパイヤ検査法 (55-1 系統)	126
2.8.1. 検査原則及び試料調製法.....	126
2.8.2. GUS 試験法.....	127
2.8.2.1. 実験操作.....	127
2.8.2.2. 結果の判定.....	129
2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法.....	129
2.8.3.1. 試料前処理.....	130
2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製.....	131
2.8.3.2.1. DNA の抽出精製*1	131
2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存.....	132
2.8.3.3. リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)	133
2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製.....	133
2.8.3.3.2. プレート情報の設定.....	134

ズに適用)	78
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)	79
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)	80
2.5.1.6. シリカベースレジエンタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System)	81
2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法.....	82
2.5.2.1. 検体前処理.....	83
2.5.2.1.1. ダイズ加工食品.....	83
2.5.2.1.2. トウモロコシ加工食品.....	86
2.5.2.2. DNA の抽出精製.....	87
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)	87
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)	89
2.5.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出.....	90
2.5.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出.....	91
2.5.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存	92
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.....	93
2.5.5. グループ検査のための DNA 試料液調製.....	94
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)	94
2.6. パパイヤ検査法 (55-1 系統)	95
2.6.1. 検査原則及び試料調製法.....	95
2.6.2. GUS 試験法.....	96
2.6.2.1. 実験操作.....	96
2.6.2.2. 結果の判定.....	98
2.6.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法.....	98
2.6.3.1. 試料前処理.....	99
2.6.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製.....	100
2.6.3.2.1. DNA の抽出精製*1	100
2.6.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存.....	101
2.6.3.3. リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)	102
2.6.3.3.1. PCR 用反応液の調製.....	102
2.6.3.3.2. プレート情報の設定.....	103

2.8.3.3.3. PCR.....	135	2.6.3.3.3. PCR.....	104
2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定.....	135	2.6.3.3.4. 結果の解析及び判定.....	104
(別紙1) 内標比.....	138	(別紙1) 内標比.....	107
(別紙2) トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順.....	144	(別紙2) トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順.....	111
(参考)	146	(参考)	113
検査方法の同等性確認方法.....	148	検査方法の同等性確認方法.....	115
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	
1.1.1.1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取		1.1.1.1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取	
遺伝子組換え 農産物 が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な 一定量* を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。		遺伝子組換え 食品 が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な 一定量* を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。	
* 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 1 kg)のうち、500 g を粉砕し検査に用い、残りの 500 g は穀粒の状態 で保管する 。 トウモロコシ穀粒の粒単位検査法又はグループ検査法 の際には、その残りの 500 g の穀粒から採取する。		* 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 1 kg)のうち、500 g を粉砕し 定量 PCR 検査に用い、残りの 500 g は穀粒の状態 で保管する 。 粒単位検査法 の際には、その残りの 500 g の穀粒から採取する。	
1.1.1.1.1. (略)		1.1.1.1.1. (略)	
1.1.1.1.2. ばら積みの場合		1.1.1.1.2. ばら積みの場合	
1.1.1.2.1.・1.1.1.2.2. (略)		1.1.1.2.1.・1.1.1.2.2. (略)	
1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取		1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取	
既 にはしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1 はしけを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各 5 カ所、計 15 カ所から、計 10 kg 以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎		す ではしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1 はしけを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各 5 カ所、計 15 カ所から、計 10 kg 以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎	

検体（1 kg 以上）とする。

1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取

遺伝子組換え食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、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。検体採取に際しては、他ロットの加工食品が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

ただし、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。）の検体採取については、1.1.1.1. 袋積みの場合に従う。

(略)

1.1.3. パパイアの検体採取

(略)

1.1.3.1. 生鮮パパイアの検体採取

(略)

1.1.3.2. 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1.1.2.ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取の表に従い検体採取を行うこと。なお、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たにもかかわらず、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入がある場合において、適切に分別生産流通管理を実施したとみなせる混入許容値は、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かと判定された場合、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

に1検体（1 kg 以上）とする。

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。

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。）の検体採取については、1.1.1.1. 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. パパイアの検体採取

(略)

1.1.2.1. 生鮮パパイアの検体採取

(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1.1.1.3 加工食品の検体採取の表に従い検体採取を行うこと。なお、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ざる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かと判定された場合、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

一方、分別生産流通管理を実施した非遺伝子組換えダイズ穀粒及びトウモロコシ穀粒について、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入があるかどうかの判定は、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施する。

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よって、加工食品の原材料であるダイズ又はトウモロコシについて、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入が許容値を超えているかどうかの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。

パパイヤに関しては、生鮮食品及び加工食品共にリアルタイム 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 (分別生産流通管理の判定に係る検査法)

遺伝子組換えダイズに関しては、国内に流通する RoundupReady Soybean (40-3-2) (以下「RRS」という。)、Liberty Link Soybean (Event A2704-12) (以下「LLS」という。)及び Roundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下「RRS2」という。) を対象とする。

2.1.1. 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、同プローブにはレポーター、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。

遺伝子組換え農産物の定量は、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 (以下「Le1」という。) を内在性遺伝子としている。検査の際には、まず Le1 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 Le1 のコピー数を求める。また、同時に、同一 DNA 試

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で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共にリアルタイム 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年に承認された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. 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、同プローブにはレポーター、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 (以下「レクチン遺伝子」という。) 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*3 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 Le1 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*4）でさらに除して得られた値に 100 を乗じたものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の含有率（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、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。LLS 検知法及び RRS2 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 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 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

標準プラスミド DNA（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 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

（略）

*3 （略）

*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 Le1）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

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*3 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*4）でさらに除して得られた値に 100 を乗じたものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の含有率（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、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。LLS 検知法及び RRS2 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 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 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れた増幅産物をプラスミド上に連結したものを（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

（略）

*3 （略）

*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

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、最終頁の（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。

2.1.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1.1. 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 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µM）0.5 µL、水 9 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng) 、 検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2.5 µL 又は 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 ウェル併行で行うものとし、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

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。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、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。なお、TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに FastGene™ QPCR

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、最終頁の（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。

2.1.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1.1. 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 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µM）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 ウェル併行で行うものとし、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

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。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、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。なお、TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに Eagle Taq Master Mix

Probe Mastermix (日本ジェネティクス社) 等を用いることもできる。

*2～*5 (略)

2.1.1.1.2. 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、検体の配置及び種類並びに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・*2 (略)

2.1.1.1.3.・2.1.1.1.4. (略)

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR

2.1.1.2.1. (略)

2.1.1.2.2. 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 µM) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.4 µL、水 7.2 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2 µL (40 ng)、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2 µL^{*2} 又は 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 ウェル併行で行うものとし、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 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

(Roche Diagnostics) 等を用いることもできる。

*2～*5 (略)

2.1.1.1.2. 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・*2 (略)

2.1.1.1.3.・2.1.1.1.4. (略)

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR

2.1.1.2.1. (略)

2.1.1.2.2. 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 µM) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 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 ウェル併行で行うものとし、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 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～*6 (略)

2.1.1.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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・*2 (略)

2.1.1.2.4.・2.1.1.2.5. (略)

2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR

2.1.1.3.1. (略)

2.1.1.3.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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。

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～*6 (略)

2.1.1.2.3. 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・*2 (略)

2.1.1.2.4.・2.1.1.2.5. (略)

2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR

2.1.1.3.1. (略)

2.1.1.3.2. 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・*2 (略)

2.1.1.3.3.・2.1.1.3.4. (略)

2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR

2.1.1.4.1. (略)

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

*1 (略)

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

なお、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、u トップ画面で「Advanced Setup」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する*3。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*4、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*3・*4 (略)

2.1.1.4.3. 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°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、59°C 1 分を 1

*1・*2 (略)

2.1.1.3.3.・2.1.1.3.4. (略)

2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR

2.1.1.4.1. (略)

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

*1 (略)

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

なお、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合はトップ画面で「Advanced Setup」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*3。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*4、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*3・*4 (略)

2.1.1.4.3. 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°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、59°C 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、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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。

*ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。なお下降部分は 100% のままで使用する。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.4.4. (略)

2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR

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

PCR 用反応液は 20 μL /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 μL 、対象プライマー対溶液(各プライマー、25 μM) 0.4 μL 、対象プローブ(10 μM) 0.4 μL 、水 9.8 μL 、 MgCl_2 溶液 (25 mM) 2.4 μL 及び 10 ng/ μL DNA 試料液 5 μL (50 ng)、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 5 μL ^{*2} 又は 5 ng/ μL ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液 : NTC) 5 μL 。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 キャピラリー併行で行うものとし、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 MgCl_2 溶液、水、対象プライマー対 及び 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} を先に調製しておく、これと LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、 MgCl_2 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 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 μL 、DNA 試料液に対し 36 μL とする。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 6 μL (検量線用標準プラスミド溶液及び NTC) 又は 12 μL (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。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。

サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、Ver.1.5.1 以前のソフトウェアの場合、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。

Ver.2.0 以降のソフトウェアの場合は ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。なお下降部分は 100% のままで使用する。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.4.4. (略)

2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR

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

PCR 用反応液は 20 μL /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 μL 、対象プライマー対溶液(各プライマー、25 μM) 0.4 μL 、対象プローブ(10 μM) 0.4 μL 、水 9.8 μL 、 MgCl_2 溶液 (25 mM) 2.4 μL 、10 ng/ μL DNA 試料液 5 μL (50 ng)、又は 検量線用標準プラスミド DNA 溶液 5 μL ^{*2}、若しくは 5 ng/ μL ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液 : NTC) 5 μL 。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 キャピラリー併行で行うものとし、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 MgCl_2 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} を先に調製しておく、これと LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、 MgCl_2 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 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 μL 、DNA 試料液に対し 36 μL とする。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 6 μL (検量線用標準プラスミド溶液及び NTC) 若しくは 12 μL (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。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 [社](#)) 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°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 ~ *6 (略)

2.1.1.5.2. ~ 2.1.1.5.4. (略)

2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR

2.1.1.6.1. (略)

2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)

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、測定の初期設定、[プローブ特性並びに](#)検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを開始する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter [を](#)「FAM」、Quencher [を](#)「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、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、検体の配置及び種類を指定する。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 (「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液²、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液) を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1・*2 (略)

2.1.1.6.3.・2.1.1.6.4. (略)

*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°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 ~ *6 (略)

2.1.1.5.2. ~ 2.1.1.5.4. (略)

2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR

2.1.1.6.1. (略)

2.1.1.6.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)

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、測定の初期設定、検体の配置及び種類 [並びにプローブ特性](#) である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを開始する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter [が](#)「FAM」、Quencher [が](#)「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、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、検体の配置及び種類を指定する。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 (「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液²、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液) を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1・*2 (略)

2.1.1.6.3.・2.1.1.6.4. (略)

2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR

2.1.1.7.1. (略)

2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1・*2 (略)

2.1.1.7.3.・2.1.1.7.4. (略)

2.1.1.8. (略)

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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、シーリング用アプリケーションを用いて行う*。最後に、プレート遠心機で 1500 ~~X~~ g、2 分間スピンドウンする。

* (略)

2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR

2.1.1.7.1. (略)

2.1.1.7.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)

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、測定の初期設定、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1・*2 (略)

2.1.1.7.3.・2.1.1.7.4. (略)

2.1.1.8. (略)

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおり。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、シーリング用アプリケーションを用いて行う*。最後に、プレート遠心機で 1500g、2 分間スピンドウンする。

* (略)

2.1.1.9.2.～2.1.1.9.4. (略)

2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算

未知 DNA 試料液につき検量線作成で用いた Th を使用して Cq 値を求め、内標遺伝子及び組換え遺伝子につき、それぞれの検量線から各 3 ウェル*とも内在性遺伝子のコピー数を内挿し、それにより得られる値の平均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。次に、次式に従って、対象遺伝子組換え農産物含有率を求める。

対象遺伝子組換え農産物含有率 (%) =

$$[\text{組換え遺伝子のコピー数} / (\text{内在性遺伝子のコピー数} \times \text{内標比})] \times 100$$

* 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、2.1.1.5.4.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。

2.1.3.・2.1.4. (略)

2.2. ダイズ穀粒の検査法 (遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法)

本検査法により検体陽性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性のあるもの、検体陰性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性がないものとして取扱うこととする。

2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、ダイズに普遍的に存在する内在性遺伝子として Le1、RRS 及び LLS に共通して存在する組換え配列として *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter (以下「P35S」という。)並びに RRS2 を検知する検知試験 3 試験を行う。PCR 装置は、ABI PRISM® 7900HT (96 well)、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。

また、本法は、標準試料液を用いた $\Delta\Delta Cq$ 法にて行う。 $\Delta\Delta Cq$ 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値*1 と各標的遺伝子 (本法では組換え遺伝子) における Cq 値の差 [$\Delta Cq = Cq(\text{標的遺伝子}) - Cq$

2.1.1.9.2.～2.1.1.9.4. (略)

2.1.2. 試料の遺伝子組換え食品含有率の計算

未知 DNA 試料液につき検量線作成で用いた Th を使用して Cq 値を求め、内標遺伝子及び組換え遺伝子につき、それぞれの検量線から各 3 ウェル*とも内在性遺伝子のコピー数を内挿し、それにより得られる値の平均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。次に、次式に従って、対象遺伝子組換え食品含有率を求める。

対象遺伝子組換え食品含有率 (%) =

$$[\text{組換え遺伝子のコピー数} / (\text{内在性遺伝子のコピー数} \times \text{内標比})] \times 100$$

* 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、2.1.2.5.4.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。

2.1.3.・2.1.4. (略)

(新設)

(内在性遺伝子)]を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差 [$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{DNA 試料液}) - \Delta Cq(\text{標準試料液})$] を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、 ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液^{*2}を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、Le1 検知試験用：100,000 コピー/ μL 、P35S 検知試験用：50 コピー/ μL 及び RRS2 検知試験用：50 コピー/ μL を使用する。GM ダイブ混入判定用プラスミドセットとして、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。

2.2.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

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

PCR 用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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^{*2,3} (各プライマー、25 μM) 0.5 μL 、対象プローブ溶液^{*2,3} (10 μM) 0.5 μL 、水 6.5 μL 及び 10 ng/ μL DNA 試料液 5 μL (50 ng)、標準プラスミド DNA 溶液 5 μL 又は 5 ng/ μL ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液：NTC) 5 μL ^{*4}。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ごと、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

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、検知試験ごとに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。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 μL が適当である (下記表参照)。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 46.4 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 μL 加え、十分に攪拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、 ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること^{*6}。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ターを用いて行う*7。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、遠心して）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*8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。

<u>マスターミックス</u>	<u>必要量</u>	<u>1 検知試験</u>
	<u>1 ウェル当たり</u>	<u>当たり</u>
	<u>(μ L)</u>	<u>(μ L)</u>
<u>TaqMan® Universal PCR Master Mix</u>	<u>12.5</u>	<u>130.0</u>
<u>対象プライマー対溶液</u>	<u>0.5</u>	<u>5.2</u>
<u>(各プライマー、25 μM)</u>		
<u>対象プローブ溶液 (10 μM)</u>	<u>0.5</u>	<u>5.2</u>
<u>水</u>	<u>6.5</u>	<u>67.6</u>
<u>合計</u>	<u>20.0</u>	<u>208.0</u>

*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。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、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 Le1 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' -GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'))] 及び
Le1-Taq (5' -FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCACTTAC -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

P35S 検知 :

P35S-1 [P35S 1-5' (5' -ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3') & P35S 1-3' (5' - CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3')] 及び P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCCT-TAMRA -3')

RRS2 検知 :

MON89788-F (5' -TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3')、 MON89788-R (5' -TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3') 及び MON89788-P (5' -FAM-CTGAAGGCGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3')

*4 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。

*5 分注必要数

標準プラスミド DNA 溶液(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。

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、 ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、RRS2 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で Le1 検知試験を行うことに留意する。

*7 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。

*8 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、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.1.1.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）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 2 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。

* 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とい。

2.2.1.1.3. 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、59°C 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。

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量 (ΔR_n) をプロットした増幅曲線 (Amplification Plot) 上で、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 ΔR_n 部を選択し、Threshold line (Th) を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を Cq 値とする。

* 通常、Th 値は 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。

2.2.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1.PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM®

7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社)

は使用しない。

2.2.1.2.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*1 の場合は、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*2。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、検体の配置及び種類を指定する。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 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）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 2 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 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し、新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*2 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とい。

2.2.1.2.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

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 2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合、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。

*ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。なお下降部分は 100% のままで使用する。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.2.4. PCR 結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.2.1.3.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、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、検体の配置及び種

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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target 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とい。

2.2.1.3.3. PCR (QuantStudio 5)

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 2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.3.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 5)

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社)

は使用しない。

2.2.1.4.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign

画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target 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とい。

2.2.1.4.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)

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 2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.4.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 12K Flex)

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1.PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。ただし、*7 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーター及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること^{*1,2}。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーターについては、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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.2.1.5.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設

定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.2.1.5.3. PCR (LightCycler® 96)

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレート¹を切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は 2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。[Start]をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.2.1.5.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96)

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル (Cq) 値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット (色素) に依存する。

2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること^{*1,2}。

*1 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については、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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.2.1.6.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類 (「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液) を選択する。

2.2.1.6.3. PCR (LightCycler® 480)

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出し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 2.2.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.2.1.6.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 480)

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq 値とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.2.2. 結果の判定

DNA 試料液における Le1 検知試験及び標準プラスミド DNA 溶液における全ての検知試験で Cq 値が得られていること、かつ、ブランク試料液における全ての検知試験で Cq 値が得られていないことを確認した後、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 1 →図 2 →図 3) に従って判定する。

(図 1) リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム (ダイズ)

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値* [ΔCq (DNA 試料液) = Cq (P35S 又は RRS2) - Cq (Le1)]、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値 [ΔCq (標準プラ

スミド DNA 溶液) = $C_q(\text{P35S 又は RRS2}) - C_q(\text{Le1})$] とする。次に、得られた ΔC_q 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験 1 ウェルごとの $\Delta\Delta C_q$ 値 [$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q(\text{DNA 試料液}) - \Delta C_q(\text{標準プラスミド DNA 溶液})$] を算出し、以下の判定を行う。

- (1) 得られた $\Delta\Delta C_q$ 値が 0 以下の場合 [$\Delta\Delta C_q \leq 0$]、そのウェルは「+」と判定する。
- (2) 得られた $\Delta\Delta C_q$ 値が 0 より大きい場合 [$\Delta\Delta C_q > 0$] 又は DNA 試料液における P35S 検知試験若しくは RRS2 検知試験において C_q 値が得られず ΔC_q 値が算出できない場合、そのウェルは「-」と判定する。

* ΔC_q 値を算出するに当たっての各検知試験 (Le1、P35S 及び RRS2) のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

(図 2) リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム (ダイズ)

DNA 試料液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

- (1) 2 ウェル共に「+」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陽性と判定する。
- (2) 2 ウェル共に「-」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

* 該当する検知試験に加え、Le1 検知試験も再度実施する必要があることに留意する。

(図 3) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム (ダイズ)

得られた結果から以下の判定を行う。

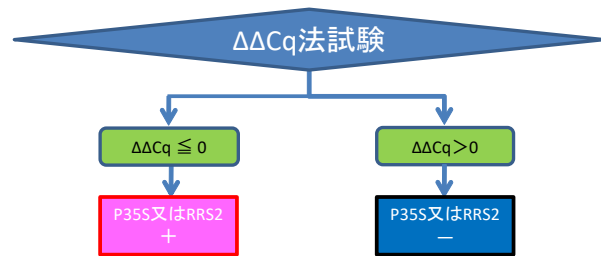
- (1) P35S 検知試験及び RRS2 検知試験のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液 (合計 4 ウェル) において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。
- (2) P35S 検知試験及び RRS2 検知試験の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液 (合計 4 ウェル) において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体からの「2.7.1.ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し

* 得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

* P35S 検知試験又は RRS2 検知試験で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液(合計 4 ウェル)において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も Le1 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図1 リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム(ダイズ)

$$\Delta Cq = Cq * (P35S \text{ 又は } RRS2) - Cq * (Le1)$$
$$\Delta \Delta Cq = \Delta Cq (\text{DNA 試料液}) - \Delta Cq (\text{標準プラスミド DNA 溶液})$$

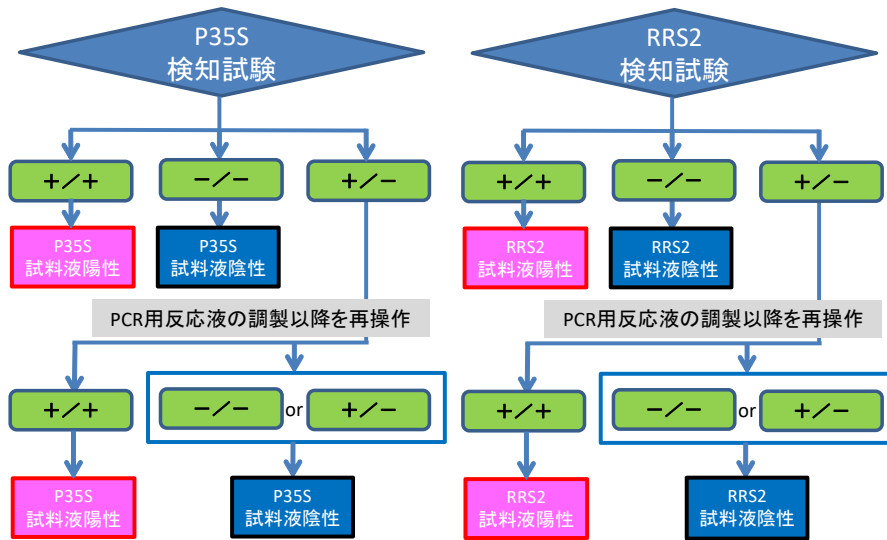


* DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

(新設)

図2 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)

(新設)



(新設)

図3-1 2併行抽出試験結果の判定スキーム(ダイズ)

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製 以降を再操作 [※]
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性		

※試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の再操作は不要とする

図3-2 2併行抽出試験結果の判定スキーム(DNA再抽出時)(ダイズ)

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	

(新設)

2.3. トウモロコシ穀粒の検査法 (分別生産流通管理の判定に係る検査法)

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 2.3.1.項の定量 PCR 又は 2.3.2.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、2.3.3.項の粒単位検査法又は 2.3.4 項のグループ検査法を実施する。

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。

2.3.1. 定量 PCR 法

検体の粉碎試料 (500 g) につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る (3DNA 試料/1 検体)。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 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、starch synthase IIb (以下「SSIIb」という。) 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、2.1.2.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。P35S が組み込まれた組換え系統及び GA21 については、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT (96 well 及び 384 well)、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。MIR604 及び MIR162 については、ABI PRISM® 7900 HT (96 well)、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。

2.3.1.1. *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 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 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が、PCR 用反応液の調製における TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに用いることができる試薬については、「FastGene™ QPCR Probe Mastermix (日本ジェネティクス社)」を「FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics 社)」^{*1} に読み替えること。 内在性遺伝子として、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^{*2} 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ーブは P35S-1 と P35S-Ta_q^{*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。

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

検体の粉碎試料 (500 g) につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る (3DNA 試料/1 検体)。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、2.1.2.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^{*1} 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ーブは P35S-1 と P35S-Ta_q^{*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 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。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい攪拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、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 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')

*3 P35S を標的とするプライマー対とプローブ

(略)

2.3.1.2. 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様の 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、2.3.1.1.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、検量線用標準プラスミド 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 特異的反應及び SSIib 特異的反應の両方でリアルタイム PCR の反應温度条件を以下のとおりとする。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應を開始する。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反應を行う。

* (略)

2.3.1.3. 結果の判定

(略)

2.3.2. マルチプレックス PCR 法

(新設)

*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

(略)

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様の DNA 試料液について、別に GA21 に特異的な反應、MIR604 に特異的な反應、MIR162 に特異的な反應を用い、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 特異的反應及び SSIib 特異的反應の両方でリアルタイム PCR の反應温度条件を以下のとおりとする。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應を開始する。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反應を行う。

* (略)

2.2.1.3. 結果の判定

(略)

2.2.2. マルチプレックス PCR 法

2.3.1 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、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSI**b** 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 P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator (以下「TNOS」という。)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 SSI**b** 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 $\Delta\Delta Cq$ 法にて行う。 $\Delta\Delta Cq$ 法は、分析試料及び判定基準となる標準試料それぞれの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 [$\Delta Cq = Cq(\text{標的遺伝子}) - Cq(\text{内在性遺伝子})$] を算出し、得られる分析試料の ΔCq 値と標準試料の ΔCq 値の差 [$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(\text{標準試料})$] を用いて判定を行う。 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%を超える可能性があるかと判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810 粉末試料^{*2} から抽出した DNA 試料液 (20 ng/ μ L) を用い、分析試料と同時に測定する。

*1・*2 (略)

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

2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (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 社)^{*1}、対象プライマーとして SSI**b** 3-5' (50 μ M)^{*2}、SSI**b** 3-3' (50 μ M)^{*2}、P35S 1-5' (50 μ M)^{*3}、P35S 1-3' (50 μ M)^{*3}、NOS ter 3-5' (50 μ M)^{*4}、NOS ter 2-3' (50 μ M)^{*4}、対象プローブとして SSI**b**-TaqV (10 μ M)^{*5}、P35S-Taq (10 μ M)^{*6}、NOS-Taq (10 μ M)^{*7}、水及び 20 ng/ μ L DNA 試料液又は水 (ブランク試料液 : NTC) を下記の表のとおりに混合する。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する^{*8}。

(略)

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

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、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 I**b** (SSI**b**) 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 SSI**b** 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%を超える可能性があるかと判定する。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・*2 (略)

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 用反応液の調製 (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}、対象プライマーとして SSI**b** 3-5' (50 μ M)^{*2}、SSI**b** 3-3' (50 μ M)^{*2}、P35S 1-5' (50 μ M)^{*3}、P35S 1-3' (50 μ M)^{*3}、NOS ter 3-5' (50 μ M)^{*4}、NOS ter 2-3' (50 μ M)^{*4}、対象プローブとして SSI**b**-TaqV (10 μ M)^{*5}、P35S-Taq (10 μ M)^{*6}、NOS-Taq (10 μ M)^{*7}、水、20 ng/ μ L DNA 試料液又は水 (ブランク試料液 : NTC) を下記の表のとおりに混合する。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する^{*8}。

(略)

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。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（上記表参照）。混合時にはピペッティングで十分に攪拌し、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⁹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 試料液を 3.4 μL 加え、ピペッティングで十分に攪拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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ャーを用いて行う。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。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¹¹。

*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。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい攪拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、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 ~*11 (略)

2.3.2.1.2. 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、検体の配置及び種類並びに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、「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、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS 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。

* (略)

2.3.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) (略)

2.3.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

(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。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（上記表参照）。混合時にはピペッティングで十分に攪拌し、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⁹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、ピペッティングで十分に攪拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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ャーを用いて行う。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。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¹¹。

*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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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 ~*11 (略)

2.2.2.1.2. 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（「NTC」：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、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS 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。

* (略)

2.2.2.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) (略)

2.2.2.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

(略)

2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

PCR 用反応液の調製は、2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。ただし、*10 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及び*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること^{*1,2}。

*1・*2 (略)

2.3.2.2.2. 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、検体の配置及び種類並びに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 SSIb、FAM には P35S+TNOS を割り当てる*。

* (略)

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

(略)

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

(略)

2.3.2.3. 結果の判定 (図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム)

(略)

(略)

2.2.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

PCR 用反応液の調製は、2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり^{*1,2}。

*1・*2 (略)

2.2.2.2.2. 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 SSIb、FAM には P35S+TNOS を割り当てる*。

* (略)

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

(略)

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

(略)

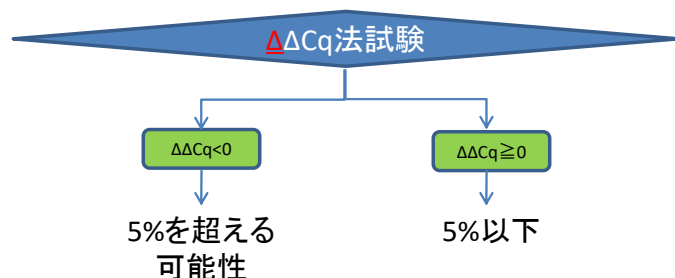
2.2.2.3. 結果の判定 (図 1 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム)

(略)

図4 マルチプレックスPCR法 試験結果の判定スキーム

$$\Delta Cq = Cq^*(P35S+TNOS) - Cq^*(SSIIb)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(4\% \text{標準試料})$$



*Cq値は3ウェルの平均値を用いる

2.3.3. 粒単位検査法
(略)

2.3.3.1. 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 2.3.2.2.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。

2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液組成及び調製方法は 2.3.2.1.1.項及び 2.3.2.2.1.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)*を 1 反応液 (全量 10 μL) 当たり 5 μL 用いる。

* (略)

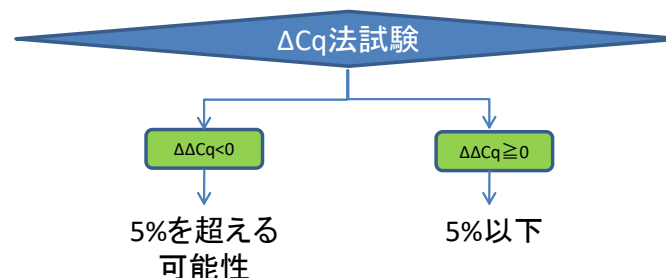
2.3.3.1.2. プレート情報の設定

2.3.2.2.2.項と同様に行う。

図1 マルチプレックスPCR法 試験結果の判定スキーム

$$\Delta Cq = Cq^*(P35S+TNOS) - Cq^*(SSIIb)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{分析試料}) - \Delta Cq(4\% \text{標準試料})$$



*Cq値は3ウェルの平均値を用いる

2.2.3. 粒単位検査法
(略)

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)*を 1 反応液 (全量 10 μL) 当たり 5 μL 用いる。

* (略)

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。

2.3.3.1.3. PCR

2.3.2.2.3.項と同様に行う。

2.3.3.1.4. 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、2.7.4.項のトウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製から試験を再度実施する。

2.3.3.2. 結果の判定

2.3.3.1.4. PCR 結果の解析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ものとして取り扱うこととする。

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。

2.3.4. 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。2.7.5 項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 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

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 試料液調製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. PCR 結果の解析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ものとして取り扱うこととする。

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 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。

2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

Cauliflower mosaic virus 由来の P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の 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 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。

2.3.4.1.1. 反応液の調製 (略)

2.3.4.1.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900 を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前^{*1}の場合は、Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」^{*2}、Quencher が「Non Fluorescent」のもの 2 つを設定する。設定した Detector を Set up タブ (ABI PRISM® 7900) 又は Well Inspector (Applied Biosystems® 7500) 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、SSIib 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、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「Unknown」を指定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target

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 を用いた定性検知法

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 (略)

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900 を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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 (ABI PRISM® 7900) 又は Well Inspector (Applied Biosystems® 7500) 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、SSIib 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。

Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、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

を作成し、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Targetを登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて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。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、SSIIB検出のためにReporterが「HEX」、Quencherが「Non Fluorescent」のものを設定する。Select the dye to use as the Passive Referenceは「ROX」と設定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類はTask欄に「U」を指定する。

- *2 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）

2.3.4.1.3. PCR

装置にプレートセットし、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。

ABI PRISM® 7900を使用する場合は、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。

Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが1.5.1以前²の場合は、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。

- * ソフトウェアのバージョンが2.0以降の場合は、ramp rateの変更が必要で温度が上昇していく部分のramp rateを100%から64%に変更する。なお、下降部分は100%のまま使用する。RUNが終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.3.4.1.4. PCR結果の解析 (略)

2.3.4.1.5 結果の判定（図5 グループ検査法試験結果の判定スキーム）

設定する。設定したTargetを登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて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。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、SSIIB検出のためにReporterが「HEX」、Quencherが「Non Fluorescent」のものを設定する。Select the dye to use as the Passive Referenceは「ROX」と設定する。

次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類はTask欄に「Unknown」を指定する。なお、Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが2.0以降の場合は、Task欄に「U」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。

ABI PRISM® 7900を使用する場合は、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。

Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが1.5.1以前の場合は、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。

Applied Biosystems® 7500を使用しソフトウェアのバージョンが2.0以降の場合は、ramp rateの変更が必要で温度が上昇していく部分のramp rateを100%から64%に変更する。なお、下降部分は100%のまま使用する。RUNが終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.4.1.4. PCR結果の解析 (略)

2.2.4.1.5 結果の判定（図2 グループ検査法試験結果の判定スキーム）

2.3.4.1.4. PCR 結果の解析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ものとして取り扱うこととする。

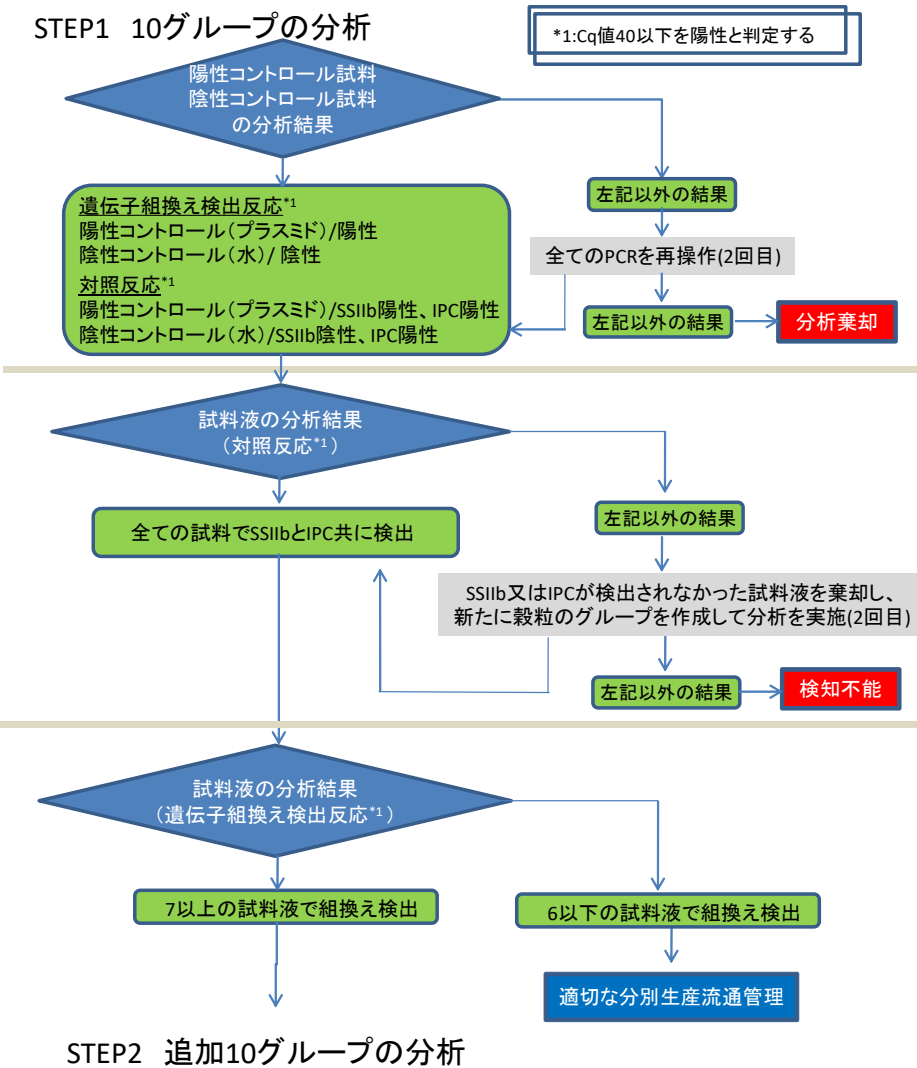
1 回目と 2 回目の総和 20 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 13 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

2.2.4.1.4. PCR 結果の解析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ものとして取り扱うこととする。

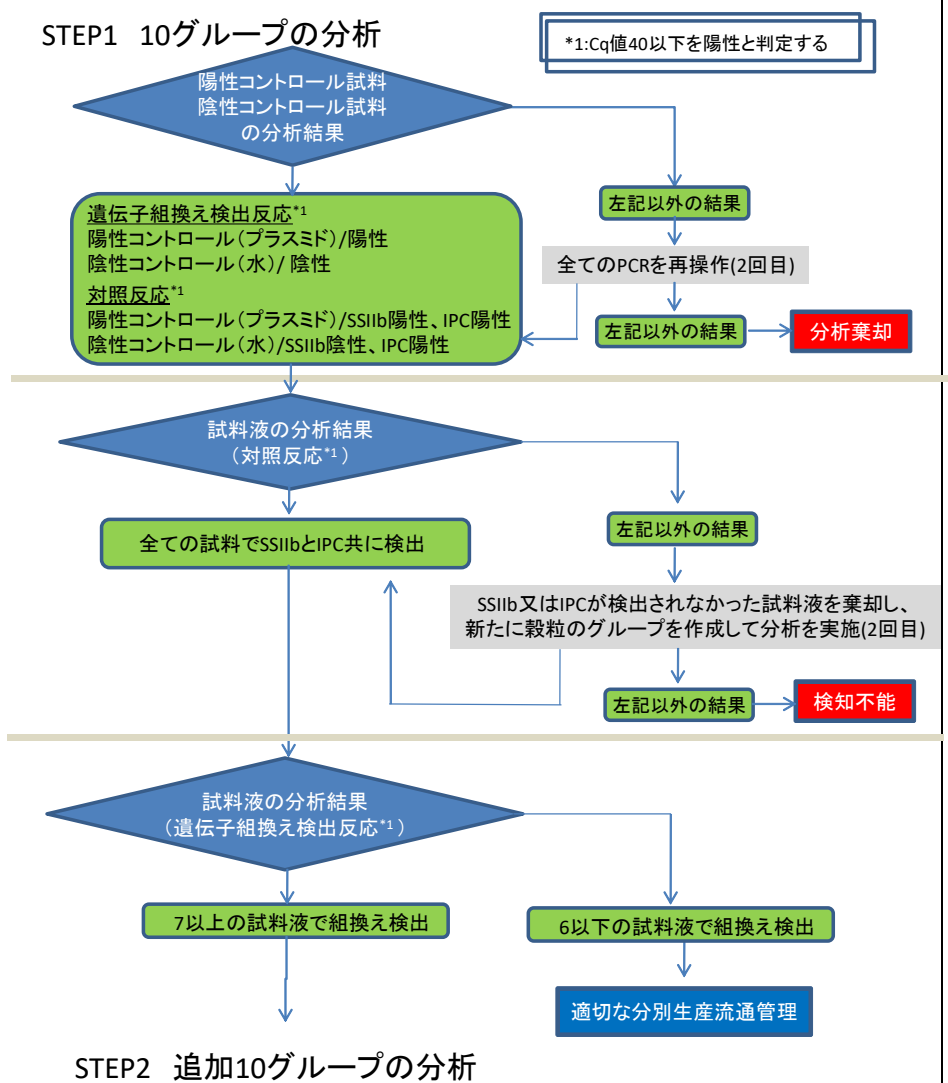
1 回目と 2 回目の総和 20 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 13 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

図5 グループ検査法試験結果の判定スキーム



(略)

図2 グループ検査法試験結果の判定スキーム



(略)

2.3.4.2. 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。2.7.5.項で生じる粗抽出液から2.7.6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。

2.3.4.2.1. リアルタイムPCR (略)

2.3.4.2.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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。

2.3.4.2.3. PCR

2.3.4.2.4. 結果の判定

2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）

本検査法により検体陽性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性のあるもの、検体陰性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性がないものとして取扱うこととする。

2.4.1. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

本法では、1検体につきDNAを2併行抽出したそれぞれのDNA試料液に対し、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子としてSSIIb、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P35S及びAgrobacterium tumefaciens由来のTNOSを検知する検知試験3試験を行う。PCR装置は、ABI PRISM® 7900HT (96 well)、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96及びLightCycler® 480を用いて行う。

また、本法は、標準試料液を用いた $\Delta\Delta Cq$ 法にて行う。 $\Delta\Delta Cq$ 法は、DNA試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子におけるCq値*1と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）におけるCq値の差 $[\Delta Cq = Cq(\text{標的遺伝子}) - Cq$

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。

2.2.4.2.1. リアルタイムPCR (略)

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。

2.2.4.2.3. PCR

2.2.4.2.4. 結果の判定

(新設)

(内在性遺伝子)]を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差 [$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{DNA 試料液}) - \Delta Cq(\text{標準試料液})$]を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、 ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液^{*2}を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、SSIIb 検知試験用：200,000 コピー/ μL 、P35S 検知試験用：100 コピー/ μL 及び TNOS 検知試験用：100 コピー/ μL を使用する。GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセットとして、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。

2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

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

PCR 用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 社) ^{*1} 12.5 μL 、対象プライマー対溶液^{*2,3} (各プライマー、25 μM) 0.8 μL 、対象プローブ溶液^{*2,3} (10 μM) 0.25 μL 、水 6.45 μL 及び 10 ng/ μL DNA 試料液 5 μL (50 ng)、標準プラスミド DNA 溶液 5 μL 又は 5 ng/ μL ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液：NTC) 5 μL ^{*4}。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ごと、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

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、検知試験ごとに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、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。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 μL が適当である (下記表参照)。混合時には転倒混和等により十分に攪拌し、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 46.4 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 μL 加え、十分に攪拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、 ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること^{*6}。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

リケーターを用いて行う*7。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、遠心して）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*8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。

<u>マスターミックス</u>	<u>必要量</u>	<u>1 検知試験</u>
	<u>1 ウェル当たり</u>	<u>当たり</u>
	<u>(μ L)</u>	<u>(μ L)</u>
<u>FastStart Universal Probe Master (Rox)</u>	<u>12.5</u>	<u>130.0</u>
<u>対象プライマー対溶液</u> <u>(各プライマー、25 μM)</u>	<u>0.8</u>	<u>8.32</u>
<u>対象プローブ溶液 (10 μM)</u>	<u>0.25</u>	<u>2.6</u>
<u>水</u>	<u>6.45</u>	<u>67.08</u>
<u>合計</u>	<u>20.0</u>	<u>208.0</u>

*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。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい攪拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、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 を標的とするプライマー対とプローブ

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

P35S 検知 :

P35S-1 [P35S 1-5' (5' -ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3') & P35S 1-3' (5' - CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3')] 及び P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCCT-TAMRA -3')

TNOS 検知 :

NOS ter 3-5' (5' -GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3')、 NOS ter 2-3' (5' -CGCTATATTTTGTCTATCGCGT-3') 及び NOS-Taq (5' -FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3')

*4 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。

*5 分注必要数

標準プラスミド DNA 溶液(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。

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、 ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、TNOS 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で SSIb 検知試験を行うことに留意する。

*7 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。

*8 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、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.4.1.1.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）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 2 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。

* 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よ。

2.4.1.1.3. 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、59°C 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。

2.4.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

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、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 (T) を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を Cq 値とする。

* 通常、Th 値は 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。

2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1.PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.4.1.2.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*1 の場合は、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*2。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、検体の配置及び種類を指定する。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 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）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 2 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 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、トップ画面で「**Advanced Setup**」を選択し、新規プレートファイルを起動する。**Experiment Properties** 画面で「**What type of experiment do you want to set up**」を「**Standard Curve**」、「**Which reagents do you want to use to detect the target sequence**」を「**TaqMan® Reagents**」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は **Plate Setup** 画面内の「**Define Targets and Samples**」画面で **Target** を作成し、**Reporter** を「FAM」、**Quencher** を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「**Define Targets and Samples**」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の **Samples** を作成し名称を入力する。設定した **Target** を登録した後、「**Assign Targets and Samples**」画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を **Task** 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する **Sample** のチェックボックスを入力する。「**Select the dye to use as the Passive Reference**」は「ROX」と設定する。

*2 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とい。

2.4.1.2.3. 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 2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合、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。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。なお下降部分は 100% のままで使用する。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.2.4. PCR 結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 結果の解析は、2.4.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 5)

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.4.1.3.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 5)

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、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、検体の配置及び種類を指定する。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 (「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液) を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target 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とい。

2.4.1.3.3. PCR (QuantStudio 5)

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 2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.3.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 5)

PCR 結果の解析は、2.4.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製 (QuantStudio 12K Flex)

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.4.1.4.2. プレート情報の設定 (QuantStudio 12K Flex)

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて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、検体の配置及び種類を指定する。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 (「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液) を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target 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とい。

2.4.1.4.3. PCR (QuantStudio 12K Flex)

装置にプレートセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は 2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN が終了して解析画面 (Analysis) に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.4.4. PCR 結果の解析 (QuantStudio 12K Flex)

PCR 結果の解析は、2.4.1.1.4. PCR 結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。

2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96)

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること^{*1,2}。

*1 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については、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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.4.1.5.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 96)

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。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 (「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液) を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.4.1.5.3. PCR (LightCycler® 96)

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は 2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。[Start]をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.4.1.5.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 96)

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル (Cq) 値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット (色素) に依存する。

2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 480)

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1.PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること^{*1,2}。

*1 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については、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 MicroAmp® Optical Film Compression Pad (Thermo Fisher Scientific 社) は使用しない。

2.4.1.6.2. プレート情報の設定 (LightCycler® 480)

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類 (「Negative

Control] : ブランク試料液、「Unknown」 : DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液) を選択する。

2.4.1.6.3. PCR (LightCycler® 480)

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出し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 2.4.1.1.3. PCR (ABI PRISM® 7900HT 96 well) のとおりである。RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.4.1.6.4. PCR 結果の解析 (LightCycler® 480)

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.4.2. 結果の判定

DNA 試料液における SSIib 検知試験及び標準プラスミド DNA 溶液における全ての検知試験で Cq 値が得られていること、かつ、ブランク試料液における全ての検知試験で Cq 値が得られていないことを確認した後、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 6 →図 7 →図 8) に従って判定する。

(図 6) リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム (トウモロコシ)

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値* [ΔCq (DNA 試料液) = Cq (P35S 又は TNOS) - Cq (SSIib)]、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値 [ΔCq (標準プラスミド DNA 溶液) = Cq (P35S 又は TNOS) - Cq (SSIib)] とする。次に、得られた ΔCq 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験 1 ウェルごとの $\Delta\Delta Cq$ 値 [$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ (DNA 試料液) - ΔCq (標準プラスミド DNA 溶液)] を算出し、以下の判定を行う。

- (1) 得られた $\Delta\Delta Cq$ 値が 0 以下の場合 [$\Delta\Delta Cq \leq 0$]、そのウェルは「+」と判定する。
- (2) 得られた $\Delta\Delta Cq$ 値が 0 より大きい場合 [$\Delta\Delta Cq > 0$] 又は DNA 試料液における P35S 検知試験若しくは TNOS 検知試験において Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合、そのウェルは「-」と判定する。

* ΔCq 値を算出するに当たっての各検知試験（SSIIb、P35S 及び TNOS）のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

（図 7）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）
DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

- （1）2 ウェル共に「+」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陽性と判定する。
- （2）2 ウェル共に「-」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。
- （3）上記（1）と（2）以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記（1）と（2）以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

* 該当する検知試験に加え、SSIIb 検知試験も再度実施する必要があることに留意する。

（図 8）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）
得られた結果から以下の判定を行う。

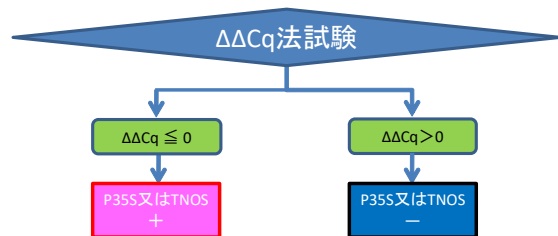
- （1）P35S 検知試験及び TNOS 検知試験のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。
- （2）P35S 検知試験及び TNOS 検知試験の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。
- （3）上記（1）と（2）以外の場合、再度検体からの「2.7.1.ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記（1）と（2）以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

* P35S 検知試験又は TNOS 検知試験で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も SSIIb 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図6 リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム(トウモロコシ)

$$\Delta Cq = Cq * (P35S \text{ 又は } TNOS) - Cq * (SSIIb)$$

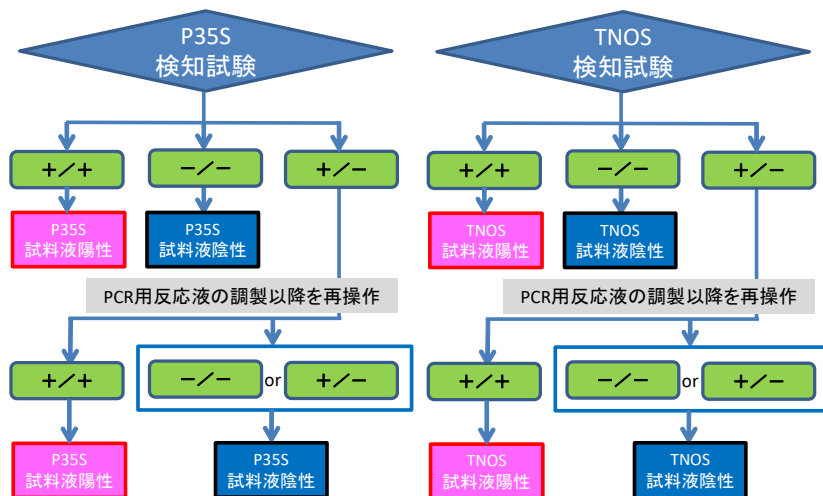
$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{DNA試料液}) - \Delta Cq(\text{標準プラスミドDNA溶液})$$



* DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

(新設)

図7 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(トウモロコシ)



(新設)

(新設)

図8-1 2併行抽出試験結果の判定スキーム(トウモロコシ)

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		TNOS		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作※
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性		

※試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の再操作は不要とする

図8-2 2併行抽出試験結果の判定スキーム(DNA再抽出時)(トウモロコシ)

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組み合わせ				検知結果
	P35S		TNOS		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性		

2.5. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 回併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子 Le1 を検知するダイズ陽性対照試験、並びに *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 及び 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^{*1}。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^{*2} 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。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法の¹とって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 RRS 及び 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') &

(新設)

2.3. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 回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^{*1}。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^{*2} 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。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法の¹とって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 RoundupReady Soybean (RRS、40-3-2 系統) 及び Liberty Link Soybean (LLS、A2704-12 系統) 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 AAGCCTTTTT-3')]] 及び

Le1-Taq (5' -FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3')

P35S 検知 : P35S-1 [P35S 1-5' (5' -ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3')

P35S 1-3' (5' - CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3')] 及び

P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3')

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

MON89788-R (5' -TCGAGCAGGAC CTGCAGAA-3') 及び

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

*2 (略)

2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR

2.5.1.1. 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 µM) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.5 µL、水 9 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL^{*3}。分注操作終了後、真上からプレートの蓋^{*4} 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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 ~ *4 (略)

2.5.1.2. 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、検体の配置及び種類並びに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。

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

(略)

Le1n 02-3' (5' -GCCCATCTGC AAGCCTTTTT-3')]] 及び

Le1-Taq (5' -FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3')

P35S 検知 : P35S-1 [P35S 1-5' (5' -ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3')

P35S 1-3' (5' - CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3')] 及び

P35S-Taq (5' -FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3')

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

MON89788-R (5' -TCGAGCAGGAC CTGCAGAA-3') 及び

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

*2 (略)

2.3.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR

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 µM) 0.5 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.5 µL、水 9 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL^{*3}。分注操作終了後、真上からプレートの蓋^{*4} 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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 ~ *4 (略)

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)

(略)

2.5.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)
(略)

2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR

2.5.2.1. 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 2.5.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*1。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 Pad²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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1・*2 (略)

2.5.2.2. 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 µM) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.4 µL、水 6.7 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 又は滅菌水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 µL^{*3}。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*4。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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 ~ *4 (略)

2.5.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートに対応するように気を付けながら、検体の種類 (「NTC」: ブラン

2.3.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700)
(略)

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 2.3.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*1。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 Pad²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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1・*2 (略)

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 µM) 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µM) 0.4 µL、水 6.7 µL 、 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 、 又は滅菌水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 µL^{*3}。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*4。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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 ~ *4 (略)

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

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。

* (略)

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

2.5.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)
(略)

2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR

2.5.3.1. 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 2.5.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*1。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 Pad² 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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1・*2 (略)

2.5.3.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。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。次に検体の配置及び種類を指定する。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。

* (略)

2.5.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

「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。

* (略)

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

2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well)
(略)

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 2.3.1.1 PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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*1。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 Pad² 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 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1・*2 (略)

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。

* (略)

2.3.3.3. PCR (ABI PRISM® 7000)

(略)

2.5.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 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 2.5.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.5.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は 2.5.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

* (略)

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

(略)

2.5.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

(略)

2.5.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 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 2.5.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR

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

PCR 用反応液は 20 µL/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 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µM) 0.4 µL、対象プローブ (10 µM) 0.4 µL、水 12.3 µL、MgCl₂ 溶液 (25 mM) 2.4 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL^{*3}。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^{*4} 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

(略)

2.3.3.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7000)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 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 2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

2.3.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.3.4.1. PCR 用反応液の調製 (Applied Biosystems® 7500)

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は 2.3.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) のとおりである。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

* (略)

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

(略)

2.3.4.3. PCR (Applied Biosystems® 7500)

(略)

2.3.4.4. 測定結果の解析 (Applied Biosystems® 7500)

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 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 2.3.2.5. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well) の記載のとおりとする。

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 µL/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 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 µM) 0.4 µL、対象プローブ (10 µM) 0.4 µL、水 12.3 µL、MgCl₂ 溶液 (25 mM) 2.4 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (50 ng)^{*2} 又は滅菌水 (ブランク試料液 : NTC) 2.5 µL^{*3}。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^{*4} 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 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 キャピラリー併行して行うものとする。

*1 ~*4 (略)

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

2.5.5.3. PCR (Roche LightCycler System)
(略)

2.5.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)
(略)

2.5.6. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 9 → 図 10) に従って判定する。

(図 9) リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) について以下の (1) ~ (3) の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 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「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でダイズ陽性対照試験 (Le1) を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記 (1) と (2) 以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) のいずれか又は両方を実施し、上記 (1) と (2) 以外の場合、陰性と判定する。

試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) 及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 キャピラリー併行して行うものとする。

*1 ~*4 (略)

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

2.3.5.3. PCR (Roche LightCycler System)
(略)

2.3.5.4. 測定結果の解析 (Roche LightCycler System)
(略)

2.3.6. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 3 → 図 4) に従って判定する。

(図 3) リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

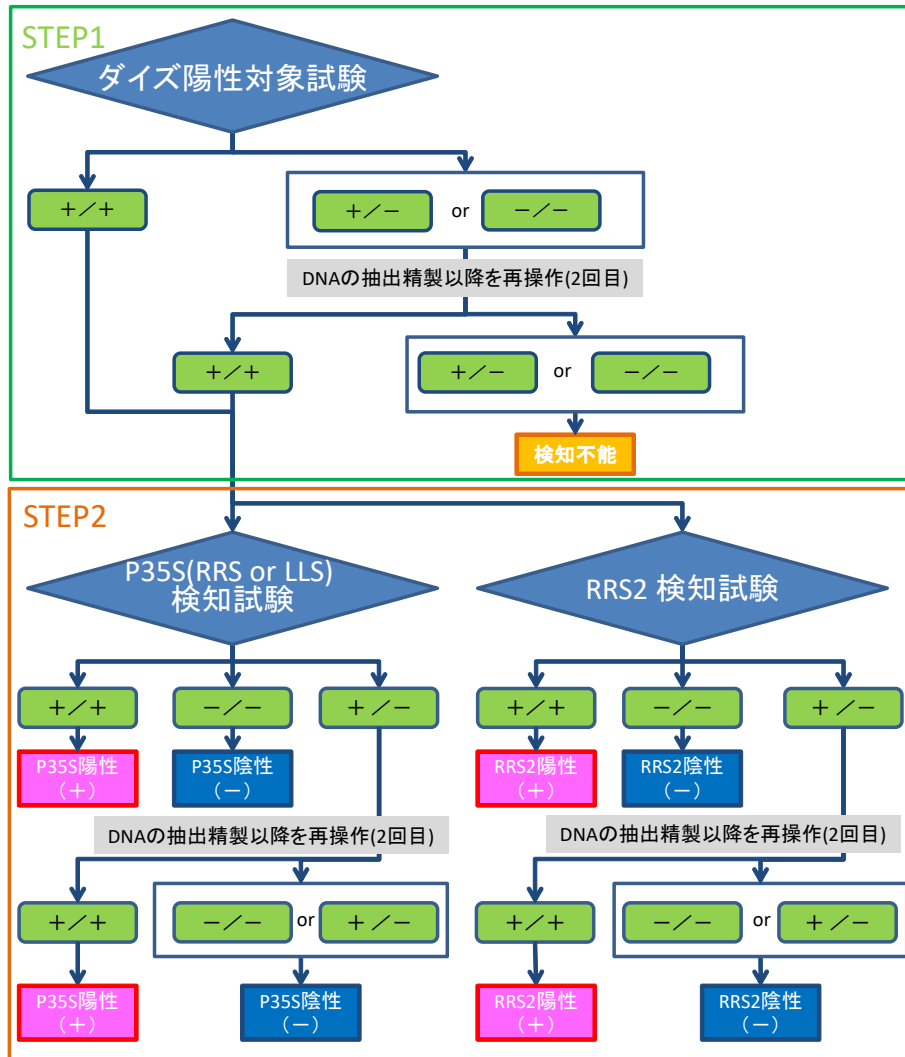
ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) について以下の (1) ~ (3) の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でダイズ陽性対照試験 (Le1) を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記 (1) と (2) 以外の場合、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験 (P35S 検知試験及び RRS2 検知試験) のいずれか又は両方を実施し、上記 (1) と (2) 以外の場合、陰性と判定する。

(図 10) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム
(略)

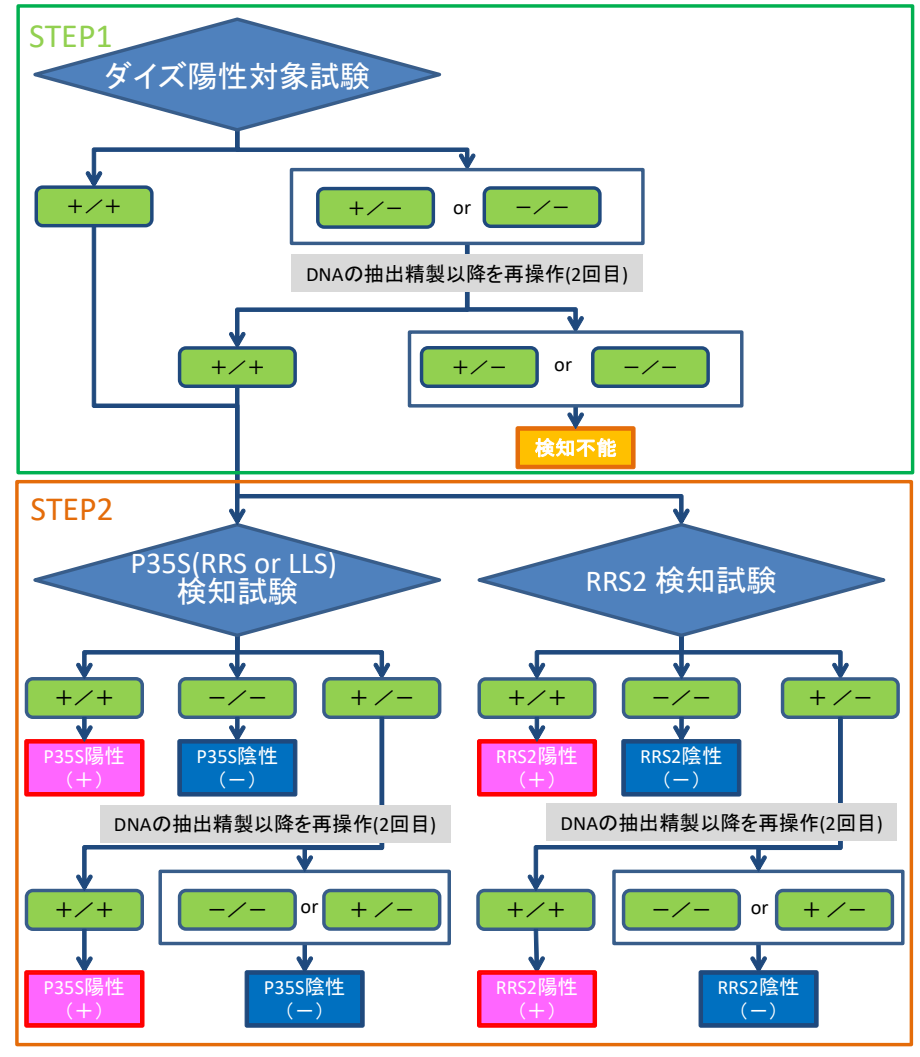
(図 4) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム
(略)

図9 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)



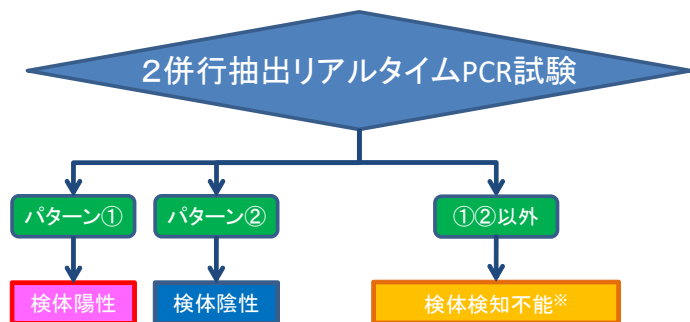
上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図10に従い行う。

図3 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図4に従い行う。

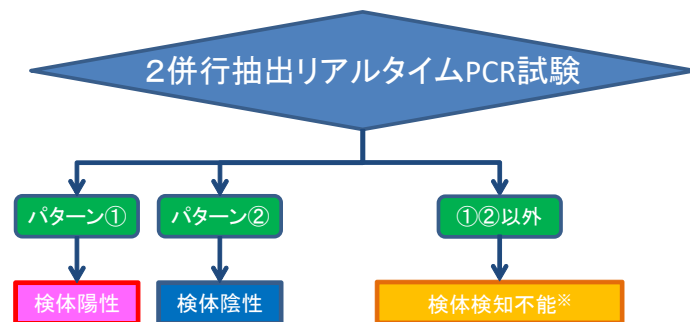
図10 2併行抽出試験結果の判定スキーム(ダイズ)



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ			
	P35S		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+
	+	+	+	-
	+	+	-	+
	+	+	-	-
	+	-	+	+
	-	+	+	+
②	-	-	+	+
	+	-	+	-
	+	-	-	+
	+	-	-	-
	-	+	+	-
	-	+	-	+
	-	+	-	-
	-	-	+	-
-	-	-	+	
-	-	-	-	

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図4 2併行抽出試験結果の判定スキーム(ダイズ)



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ			
	P35S		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+
	+	+	+	-
	+	+	-	+
	+	+	-	-
	+	-	+	+
	-	+	+	+
②	-	-	+	+
	+	-	+	-
	+	-	-	+
	+	-	-	-
	-	+	+	-
	-	+	-	+
	-	+	-	-
	-	-	+	-
-	-	-	+	
-	-	-	-	

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.6. トウモロコシ加工食品の検査法

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 SSI**IIb** 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 P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の TNOS（遺伝子組換えトウモロコシ検知試験^{*1}）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^{*2} 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。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法にのっとり、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1・*2（略）

2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（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 社)^{*1} 5 µL、対象プライマーとして SSI**IIb** 3-5' (50 µM) 0.016 µL^{*2}、SSI**IIb** 3-3' (50 µM) 0.016 µL^{*2}、P35S 1-5' (50 µM) 0.05 µL^{*3}、P35S 1-3' (50 µM) 0.05 µL^{*3}、NOS ter 3-5' (50 µM) 0.06 µL^{*4}、NOS ter 2-3' (50 µM) 0.06 µL^{*4}、対象プローブとして SSI**IIb**-TaqV (10 µM) 0.08 µL^{*5}、P35S-Taq (10 µM) 0.1 µL^{*6}、NOS-Taq (10 µM) 0.12 µL^{*7}、水 1.948 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL^{*8} 又は蒸留水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL^{*9}。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併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^{*10} 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^{*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。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad^{*12} 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。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい攪拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めてお

2.4. トウモロコシ加工食品の検査法

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 (SSI**IIb**) 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^{*1}）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^{*2} 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。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法にのっとり、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1・*2（略）

2.4.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.4.1.1. PCR 用反応液の調製（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 SSI**IIb** 3-5' (50 µM) 0.016 µL^{*2}、SSI**IIb** 3-3' (50 µM) 0.016 µL^{*2}、P35S 1-5' (50 µM) 0.05 µL^{*3}、P35S 1-3' (50 µM) 0.05 µL^{*3}、NOS ter 3-5' (50 µM) 0.06 µL^{*4}、NOS ter 2-3' (50 µM) 0.06 µL^{*4}、対象プローブとして SSI**IIb**-TaqV (10 µM) 0.08 µL^{*5}、P35S-Taq (10 µM) 0.1 µL^{*6}、NOS-Taq (10 µM) 0.12 µL^{*7}、水 1.948 µL、20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL^{*8} 又は蒸留水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL^{*9}。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併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^{*10} 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^{*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。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad^{*12} 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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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、

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～*9 (略)

*10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

SSIIb 3-5' 0.32 μM、SSIIb 3-3' 0.32 μM、P35S 1-5' 1 μM、P35S 1-3' 1 μM、NOS ter 3-5' 1.2 μM、NOS ter 2-3' 1.2 μM、SSIIb-TaqV 0.32 μM、P35S-Taq 0.4 μM、NOS-Taq 0.48 μM 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。

*11・*12 (略)

2.6.1.2. 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 及び種類並びに 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、「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+TNOS 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。

* (略)

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

(略)

2.6.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

(略)

2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.6.2.1. PCR 用反応液の調製^{*1} (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 社)^{*2} 5 μL、対象プライマーとして SSIIb 3-5' (50 μM) 0.016 μL^{*3}、SSIIb 3-3' (50 μM) 0.016 μL^{*3}、P35S 1-5' (50 μM) 0.05 μL^{*4}、P35S 1-3' (50 μM) 0.05 μL^{*4}、NOS ter 3-5' (50 μM) 0.06 μL^{*5}、NOS ter 2-3' (50 μM) 0.06 μL^{*5}、対象プローブとして SSIIb-TaqV (10 μM) 0.08 μL^{*6}、P35S-Taq (10 μM) 0.1 μL^{*7}、NOS-Taq (10 μM) 0.12 μL^{*8}、水 1.948 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL^{*9} 又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 μL。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併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^{*10} を先に調製しておき、これと FastStart Universal Probe Master (Rox) 及び DNA 試料液

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～*9 (略)

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

*11・*12 (略)

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 (「NTC」: 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+TNOS 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。

* (略)

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

(略)

2.4.1.4. 測定結果の解析 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)

(略)

2.4.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.4.2.1. PCR 用反応液の調製^{*1} (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)^{*2} 5 μL、対象プライマーとして SSIIb 3-5' (50 μM) 0.016 μL^{*3}、SSIIb 3-3' (50 μM) 0.016 μL^{*3}、P35S 1-5' (50 μM) 0.05 μL^{*4}、P35S 1-3' (50 μM) 0.05 μL^{*4}、NOS ter 3-5' (50 μM) 0.06 μL^{*5}、NOS ter 2-3' (50 μM) 0.06 μL^{*5}、対象プローブとして SSIIb-TaqV (10 μM) 0.08 μL^{*6}、P35S-Taq (10 μM) 0.1 μL^{*7}、NOS-Taq (10 μM) 0.12 μL^{*8}、水 1.948 μL 、 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL^{*9} 又は蒸留水 (ブランク試料液: NTC) 2.5 μL。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併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^{*10} を先に調製しておき、これと FastStart Universal Probe Master (Rox) 及び DNA 試料液を

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^{*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 (略)

*2 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。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい攪拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、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。

*3 ~*9 (略)

*10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

SSIIb 3-5' 0.32 μM、SSIIb 3-3' 0.32 μM、P35S 1-5' 1 μM、P35S 1-3' 1 μM、NOS ter 3-5' 1.2 μM、NOS ter 2-3' 1.2 μM、SSIIb-TaqV 0.32 μM、P35S-Taq 0.4 μM、NOS-Taq 0.48 μM 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。

*11 (略)

2.6.2.2. 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、検体の配置及び種類並びに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*。

* (略)

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

(略)

2.6.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

(略)

2.6.3. 測定結果の判定

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^{*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 (略)

*2 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。使う直前には必ず容器を反転させるなど軽く混合し、遠心機でスピンドウンして、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。

*3 ~*9 (略)

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

*11 (略)

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*。

* (略)

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

(略)

2.4.2.4. 測定結果の解析 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)

(略)

2.4.3. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 11 → 図 12) に従って判定する。

(図 11) リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

トウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について以下の(1)～(3)の判定を行う。トウモロコシ陽性対照試験で、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「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でトウモロコシ陽性対照試験 (SSIIb) を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)と(2)以外の場合、陰性と判定する。

(図 12) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム
(略)

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム (図 5 → 図 6) に従って判定する。

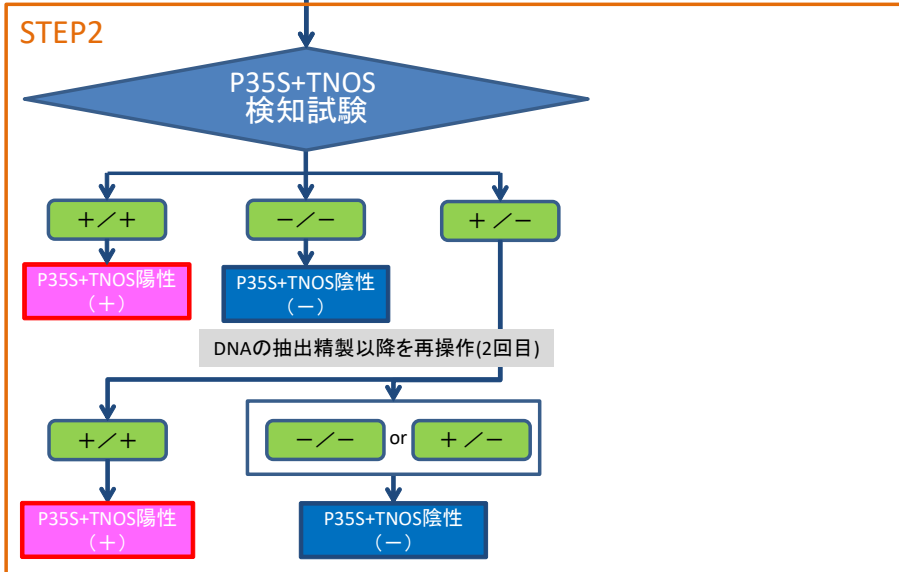
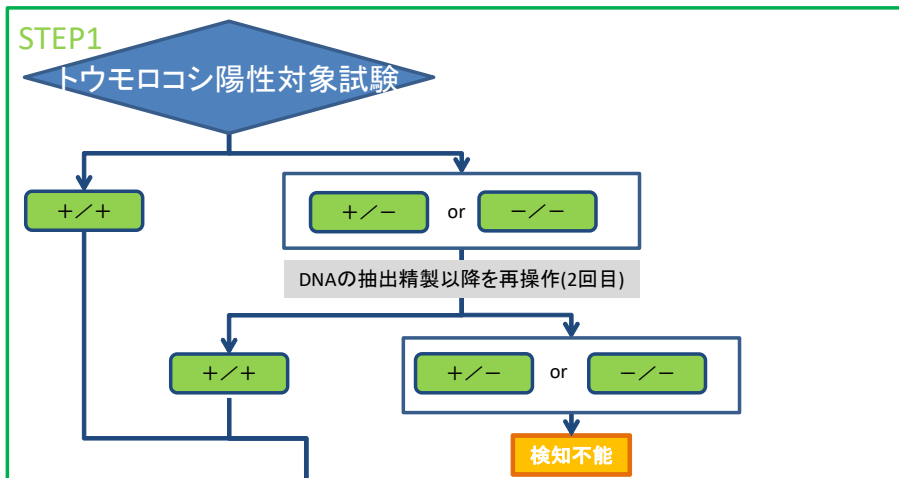
(図 5) リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

トウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について以下の(1)～(3)の判定を行う。トウモロコシ陽性対照試験で、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 の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でトウモロコシ陽性対照試験 (SSIIb) を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

- (1) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
- (2) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
- (3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)と(2)以外の場合、陰性と判定する。

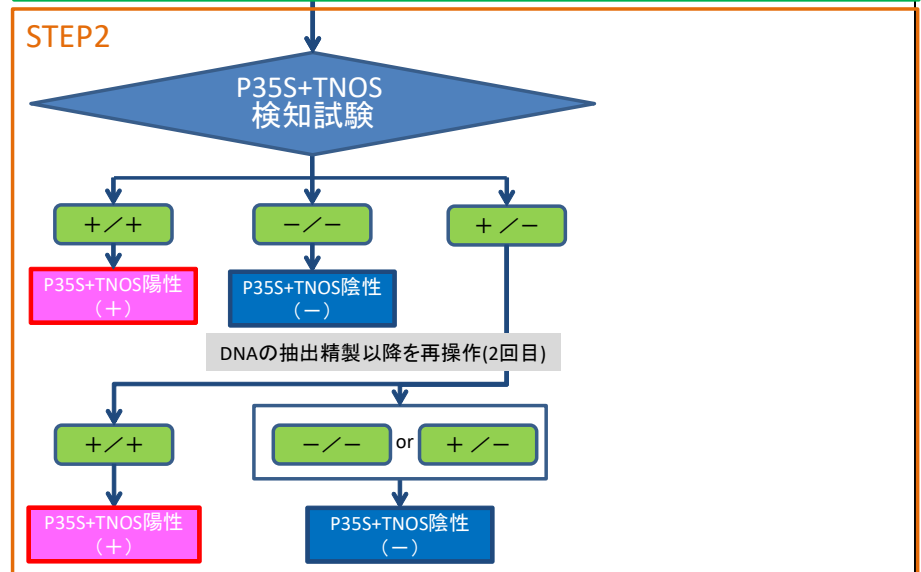
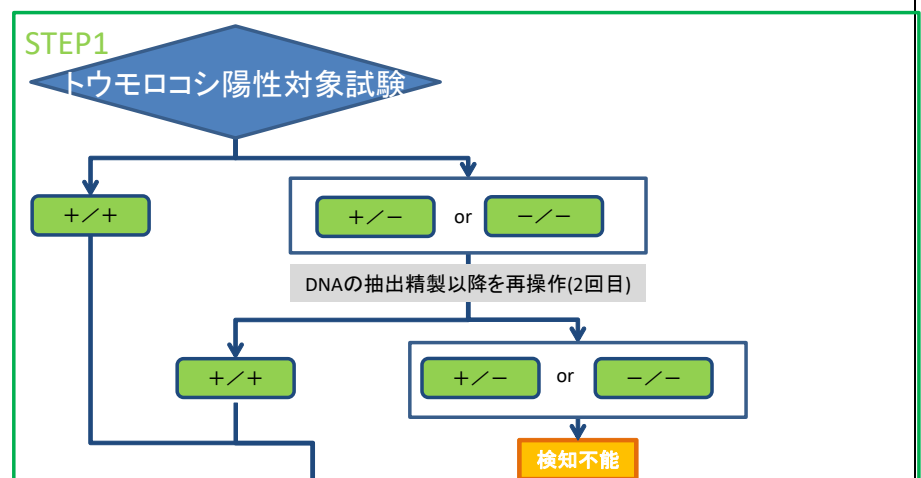
(図 6) 2 併行抽出試験結果の判定スキーム
(略)

図11 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(トウモロコシ)



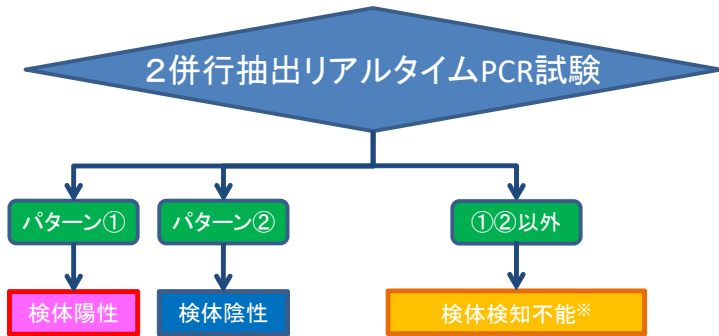
上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに判定を行う。最終的な判定は図12に従い行う。

図5 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(トウモロコシ)



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに判定を行う。最終的な判定は図6に従い行う。

図12 2併行抽出試験結果の判定スキーム(トウモロコシ)



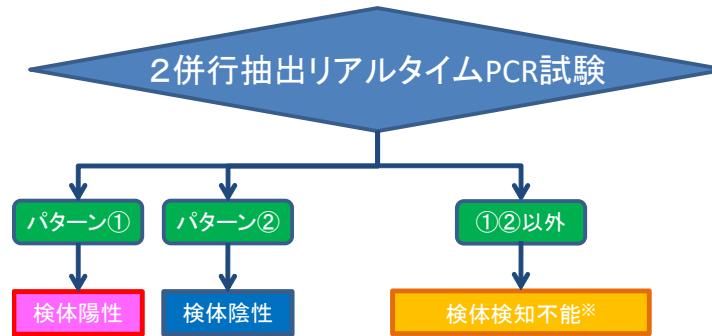
パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ	
	P35S+TNOS	
	試料液1	試料液2
①	+	+
②	+	-
	-	+
	-	-

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.7. ダイズ及びトウモロコシからのDNA抽出精製法

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」では代表的なDNA抽出精製法を示している。現在、DNA抽出精製キットとして様々な製品が市販されている。検査を実施する機関により扱う検体は異なり、試料中のマトリックスも大きく異なる場合がある。そのため、実施する試験や検体の種類に適した方法を用いることができる(DNA抽出精製法の同等性確認方法は、最終頁に示したとおりである)。ただし、各検査法において DNAの抽出精製以降を再操作する場合は、同じDNA抽出精製法

図6 2併行抽出試験結果の判定スキーム(トウモロコシ)



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ	
	P35S+TNOS	
	試料液1	試料液2
①	+	+
②	+	-
	-	+
	-	-

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.5. ダイズ及びトウモロコシからのDNA抽出精製法

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」では代表的なDNA抽出精製法を示している。現在、DNA抽出精製キットとして様々な製品が市販されている。検査を実施する機関により扱う検体は異なり、試料中のマトリックスも大きく異なる場合がある。そのため、実施する試験や検体の種類に適した方法を用いることができる(DNA抽出精製法の同等性確認方法は、最終頁に示したとおりである)。ただし、「2.3.6. 測定結果の判定」の際に、DNAの抽出精製以降を再操作する場合は、同じDNA

を用いて、その方法で検知不能になるかを判定する。

DNA の抽出精製の際用いる水は、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 M Ω ·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。

2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法 (略)

2.7.1.1. CTAB 法 (略)

2.7.1.2. 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) (略)

2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用) (略)

2.7.1.4. 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)

2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用) (略)

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

2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第 3 条第 2 項に規定する別表第 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。

検体の粉砕に用いる粉砕器には、水分を含む検体に適した粉砕器と、乾燥検体に適した粉砕器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉砕器には、刃が回転するもの、粉砕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砕する超遠心粉砕器等があるが、コンタミネーション防止のために、粉砕容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、

抽出精製法を用いて、その方法で検知不能になるかを判定する。

DNA の抽出精製の際用いる水は、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 M Ω ·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。

2.5.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法 (略)

2.5.1.1. CTAB 法 (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) (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) (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)

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) (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)

2.5.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第 3 条第 2 項に規定する別表第 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。

検体の粉砕に用いる粉砕器には、水分を含む検体に適した粉砕器と、乾燥検体に適した粉砕器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉砕器には、刃が回転するもの、粉砕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砕する超遠心粉砕器等があるが、コンタミネーション防止のために、粉砕容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、

滅菌できるものである。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。

2.7.2.1. 検体前処理に記載する方法により前処理をした後、2.7.2.2.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、適量（例えば 1 g）を採取し、ダイズ加工食品においては「2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、トウモロコシ加工食品においては「2.7.2.2.2. 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）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 2 g）を採取し、「2.7.2.2.3. 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、「2.7.2.2.4. 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。

2.7.2.1. 検体前処理

2.7.2.1.1. ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズ RRS、LLS 及び RRS2 を検知するための前処理を示す。

①～⑩（略）

⑪ 調理用の大豆を主な原材料とするもの
（略）

⑫～⑮（略）

2.7.2.1.2. 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。

①～⑦（略）

⑧ 調理用のとうもろこしを主な原材料とするもの
（略）

⑨（略）

滅菌できるものである。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. 検体前処理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、適量（例えば 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 の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、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（トウモロコシ加工食品に適用）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 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. 検体前処理

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。

①～⑩（略）

⑪ 大豆（調理用）を主な原材料とするもの
（略）

⑫～⑮（略）

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。

①～⑦（略）

⑧ とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの
（略）

⑨（略）

2.7.2.2. DNA の抽出精製

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

(略)

2.7.2.2.2. 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)

(略)

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

(略)

2.7.2.2.4. 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°C、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 分間遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する^{*6}。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パノールを加え^{*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、13,000 × 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パノールを加え^{*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。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 ~ *12 (略)

2.7.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 (略)

2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製 (略)

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)

(略)

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)

(略)

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

(略)

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°C、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パノールを加え^{*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、13,000 × 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パノールを加え^{*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。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 ~ *12 (略)

2.5.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 (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 (略)

2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製 (略)

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

2.7.5.項における DNA 試料液調製の過程で、トウモロコシ粉砕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 \times g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心^{*4}する。次いで、その上清^{*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 \times 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 \times 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 \times 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 \times 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 濃度を測定し、20 ng/ μL になるよう滅菌水で希釈する。

*1 ~ *6 (略)

2.8. パパイヤ検査法 (55-1 系統)

2.8.1. 検査原則及び試料調製法 (略)

2.8.2. GUS 試験法 (略)

2.8.2.1. 実験操作 (略)

2.8.2.2. 結果の判定 (略)

2.8.3. 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

2.5.5. グループ検査のための DNA 試料液調製 (略)

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、トウモロコシ粉砕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 \times g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心^{*4}する。次いで、その上清^{*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 \times 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 \times 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 \times 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 \times 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 濃度を測定し、20 ng/ μL になるよう滅菌水で希釈する。

*1 ~ *6 (略)

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 (略)

2.6.2. GUS 試験法 (略)

2.6.2.1. 実験操作 (略)

2.6.2.2. 結果の判定 (略)

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、「2.8.3.1. 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。

(略)

2.8.3.1. 試料前処理

(略)

2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製

2.8.3.2.1. DNA の抽出精製^{*1}

「2.8.3.1. 試料前処理」を行った試料に、RNase A^{*2} 20 µL、cellulase^{*3} 500 µL 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 µL 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 µL 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 × 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（50 mL）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}。このときの溶出液は捨てる。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 溶出液にイソプロパノール 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 × 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 × 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、あらかじめ 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 µL に溶解し、DNA 試料原液とする^{*10}。

*1～*10 (略)

2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

(略)

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。

(略)

2.6.3.1. 試料前処理

(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 µL、cellulase^{*3} 500 µL 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 µL 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 µL 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 × 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（50 mL）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}。このときの溶出液は捨てる。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 溶出液にイソプロパノール 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 × 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 × 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、あらかじめ 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 µL に溶解し、DNA 試料原液とする^{*10}。

*1～*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 試料液の調製及び保存

(略)

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

(略)

2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製

(略)

2.8.3.3.2. 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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前²の場合は、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、 「Unknown」 : 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) 共に 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。

*ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、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 (「N」 : Non-Template Control、 「U」 : DNA 試料液) を Task 欄において指定する。またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new) 共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」に設定する。なお、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。下降部分は 100% のままとする。Sample Volume は 25 µL に設定する。

2.8.3.3.3. PCR

(略)

2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定

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及び Cq 値の確認並びに 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

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

(略)

2.6.3.3.1. PCR 用反応液の調製

(略)

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、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、 「Unknown」 : 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) 共に 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。

Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、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 (「N」 : Non-Template Control、 「U」 : DNA 試料液) を Task 欄において指定する。またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new) 共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」に設定する。なお、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100% から 64% に変更する。下降部分は 100% のままとする。Sample Volume は 25 µL に設定する。

2.6.3.3.3. PCR

(略)

2.6.3.3.4. 結果の解析及び判定

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及び Cq 値の確認並びに 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 Cq 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 ウェル併行で測定) 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 Cq 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 Cq 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 Cq 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 Cq 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 13 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 Cq 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 Cq 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「2.8.3.3.リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」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 13 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 Cq 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「2.8.3.3.リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」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 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 (図 13 参照)。

*1 (略)

*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、「2.8.3.1.試料前処理」から実施する。

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 Cq 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 ウェル併行で測定) 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 Cq 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 Cq 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 Cq 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 Cq 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 7 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 Cq 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 Cq 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「2.6.3.3.リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」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 7 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 Cq 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「2.6.3.3.リアルタイム PCR 法 (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500)」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 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 (図 7 参照)。

*1 (略)

*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。

図13 結果の判定スキーム

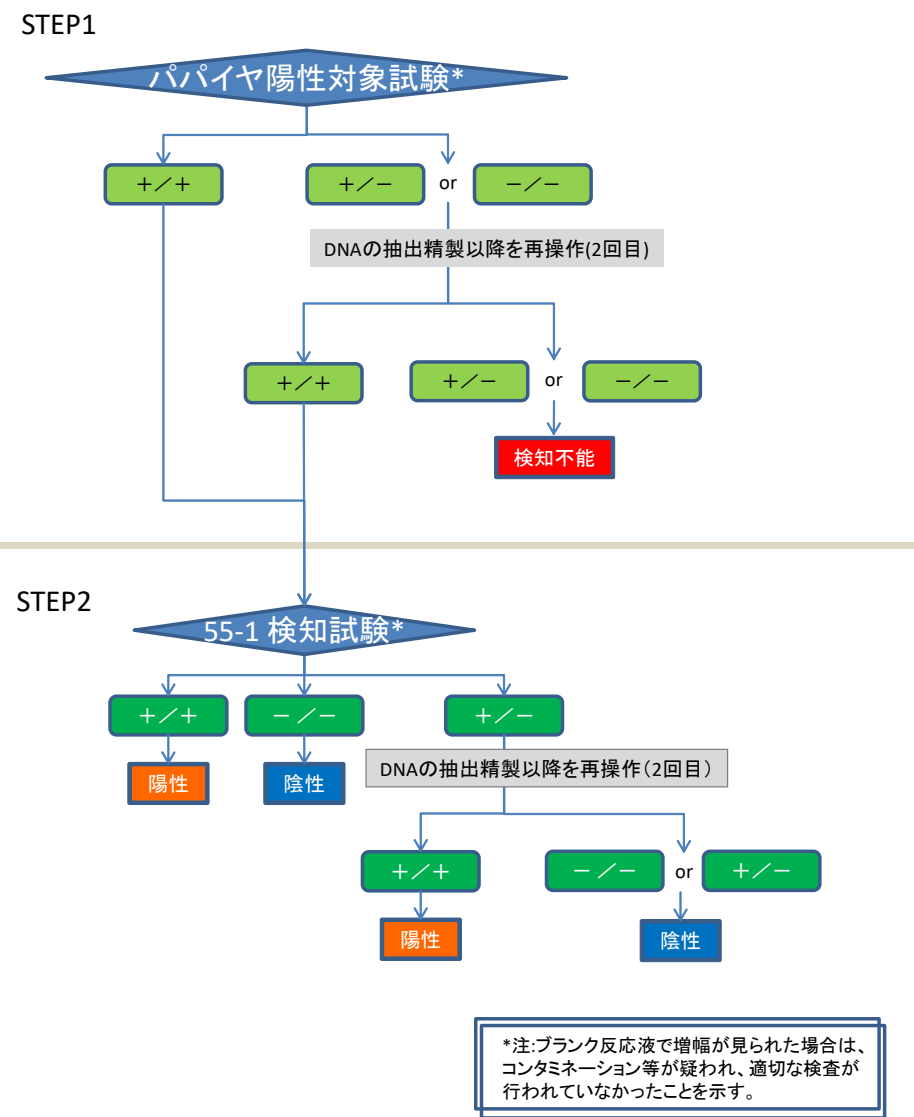
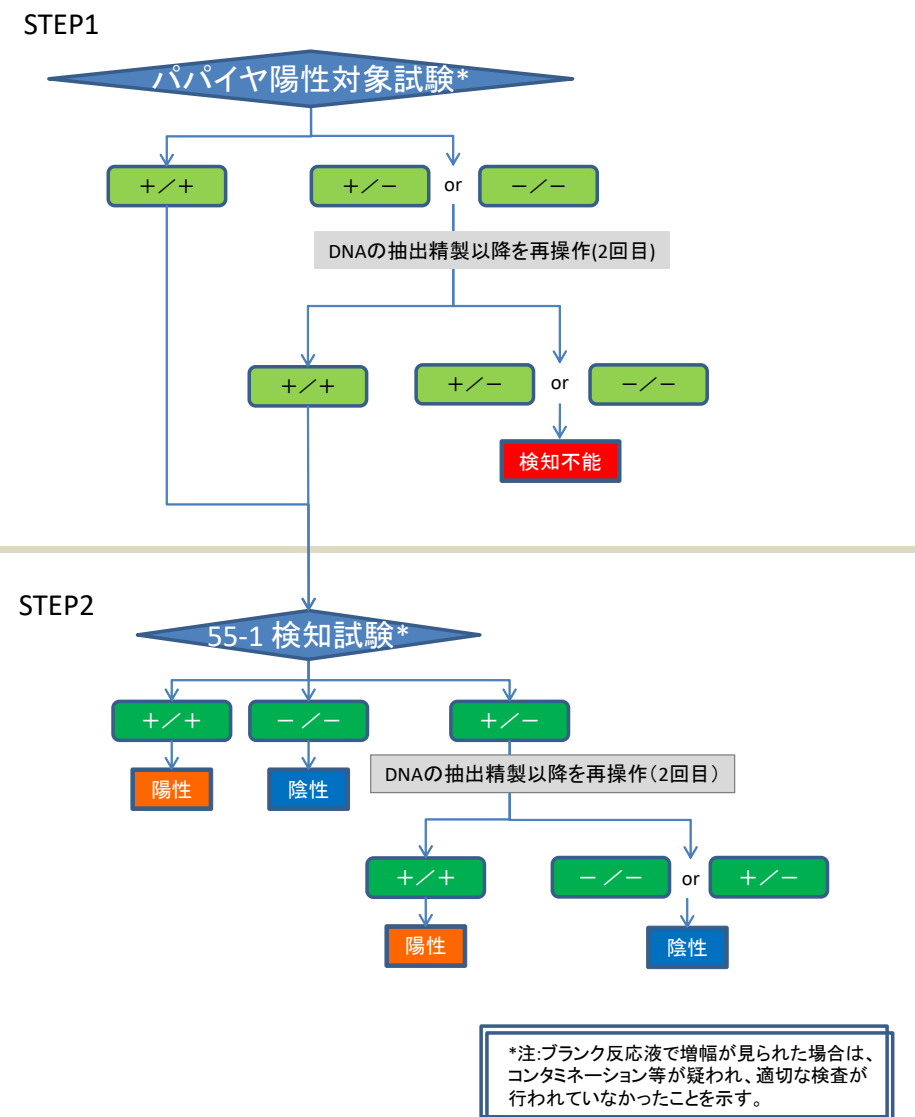


図7 結果の判定スキーム



(別紙1) 内標比

ABI PRISM® 7700 及びABI PRISM® 5700

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7900HT 96 well

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7900HT 384 well

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7000

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

Applied Biosystems® 7500

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

(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
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7900HT 96 well

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7900HT 384 well

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

ABI PRISM® 7000

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

Applied Biosystems® 7500

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

Roche LightCycler® System

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

QuantStudio 5

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>トウモロコシ</u>	<u>特定せず(スクリーニング)</u>	<u>0.43</u>	<u>SSIb-3 と SSIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>GA21</u>	<u>1.55</u>	<u>SSIb-3 と SSIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR604</u>	<u>0.44</u>	<u>SSIb-3 と SSIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR162</u>	<u>0.71</u>	<u>SSIb-3 と SSIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用</u>

LightCycler® System

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)

QuantStudio 5

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>

QuantStudio 12K Flex

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>トウモロコシ</u>	<u>特定せず(スクリーニング)</u>	<u>0.40</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>GA21</u>	<u>1.61</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用</u>
<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>0.66</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用</u>

LightCycler® 96

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>トウモロコシ</u>	<u>特定せず(スクリーニング)</u>	<u>0.41</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>GA21</u>	<u>2.17</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR604</u>	<u>0.43</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>0.59</u>	<u>SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用</u>

QuantStudio 12K Flex

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>

LightCycler® 96

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>

農産物名	対象系統	内標	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>トウモロコシ</u>	<u>特定せず(スクリーニング)</u>	<u>0.41</u>	<u>SSIIIb-3 と SSIIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>GA21</u>	<u>2.19</u>	<u>SSIIIb-3 と SSIIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR604</u>	<u>0.44</u>	<u>SSIIIb-3 と SSIIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用</u>
<u>トウモロコシ</u>	<u>MIR162</u>	<u>0.56</u>	<u>SSIIIb-3 と SSIIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用</u>

(別紙2) (略)

(参考)

- (1) 2.7.1.2. 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)、2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用)、2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A (ダイズ加工食品に適用) 及び 2.7.2.2.2. 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) 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) 2.7.1.4. 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)、2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用) 及び 2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製 (NIPPON GENE GM quicker) 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 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547) から購入可能である。

食品名	対象系統	内標比	備考
(略)	(略)	(略)	(略)
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>
<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>	<u>(新設)</u>

(別紙2) (略)

(参考)

- (1) 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)、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)、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) 及び 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) 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. 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)、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) 及び 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) 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 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547) から購入可能である。

- (3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え **農産物** 含有率の計算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) 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) 2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR、2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR、2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR、2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 及び 2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の 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。または、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) 2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法及び 2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法に記載の標準プラスミド DNA 溶液 (GM ダイズ混入判定用プラスミドセット、GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセット) 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。
- (6) 2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)、2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)、2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.6.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) 及び 2.6.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) 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。または、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。
- (7) 2.3.3.1. 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)、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。
- (3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え **食品** 含有率の計算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) 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) 2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR、2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR、2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR、2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 及び 2.2.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の 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。または、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。
- (新設)
- (5) 2.2.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well)、2.2.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480)、2.2.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.4.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM® 7900HT 96 well) 及び 2.4.2.1. PCR 用反応液の調製 (LightCycler® 96 及び LightCycler® 480) 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。または、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. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法に記載の 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

<p>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。</p> <p>(8) (略)</p> <p>検査方法の同等性確認方法 (略)</p> <p>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)</p>	<p>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。</p> <p>(7) (略)</p> <p>検査方法の同等性確認方法 (略)</p> <p>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)</p>
---	--