

- 衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 13) 野口秋雄, 中村公亮, 坂田こずえ, 小林友子, 大森清美, 笠原正輝, 高畠令王奈, 橘田和美, 穂山浩, 近藤一成, 手島玲子: 遺伝子組換えパパイヤ55-1系統特異的検知法の妥当性評価, 第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 14) 近藤一成, 坂田こずえ, 小櫃冴未, 中村公亮, 野口秋雄, 手島玲子: フロクマリン類の *in vitro* 光毒性について, 第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 15) 野口秋雄, 穂山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 布藤聡, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発 (第二報), 第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 16) 小林友子, 中村公亮, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 峯岸恭孝, 真野潤一, 高畠令王奈, 橘田和美, 手島玲子: 遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討, 第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 17) 中村公亮, 南竹優美, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 真野潤一, 高畠令王奈, 橘田和美, 穂山浩, 川上浩, 手島玲子: 遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモDNAの断片長について, 第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 18) 真野潤一, 高畠かおり, 峯岸恭孝, 二宮健二, 布藤聡, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 高畠令王奈, 橘田和美: 遺伝子組換えトウモロコシグループテストリング法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立, 第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 19) 西辻泰之, 菊池洋介, 真野潤一, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 高畠令王奈, 橘田和美: プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイムPCRアレイ法への適用, 第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 20) 中村公亮, 穂山浩, 河野徳昭, 吉松嘉代, 野口秋雄, 近藤一成, 真野潤一, 橘田和美, 手島玲子: 日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ (Kefeng系統) 混入に関する検知技術の開発について (第2報), 日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会、函館、(2012. 6)
- 21) 高畠令王奈, 則武寛通, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 真野潤一, 橘田和美: 加工品を含む複数のスイートコーン試料からのDNA抽出法の検討, 日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会、函館、(2012. 6)
- 22) 森田英利, Tulika Srivastava, 中野章代, 高畑宗明, 高木孝士, 西山英利, 藤 英博, 大島健志朗, Todd D. Taylor, 五十君静信, 服部正平. *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属における線毛および鞭毛の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察。日本乳酸菌学会。(2012. 7)
- 23) 伊東 篤志, 田口朋之, 茂木豪介, 田名網健雄, 穂山浩, 近藤浩, 手島玲子, 佐々木 伸大, 山田晃世, 小関良宏. DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発. 日本食品化学学会 第18回総会・学術大会 (函館) (2012.6)
- 24) 中島治, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子 ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について 日本薬学会第133年会、横浜 (2013.3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許所得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

分担研究報告書(平成24年度)

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

分担研究者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中に混入する可能性のある非食用遺伝子組換え(GM: Genetically Modified)生物を検知する技術としては、食品から抽出・精製したDNAを、リアルタイムPCRを使用し高感度に検出する方法が挙げられる。本年度では、リアルタイムPCR法を用いてジャガイモ加工食品中に混入する可能性のある未承認非食用GMジャガイモを検知する方法を開発するため、GM表示対象のジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片長の検出下限値を解析した。その結果、全ての加工食品において51~101bpであった。この結果から、増幅断片長を51~101bp以下に設計することで、標的遺伝子を検出できることが示唆された。開発した未承認非食用GMジャガイモ検知法を使用して、市販のジャガイモ加工食品の実態調査を行った結果、GMジャガイモの混入は認められなかった。昨年度に引き続き、非食用バイオテクノロジーの開発状況のデータベース検索サイトを立ち上げ、一般公開した。

協力研究者

中村公亮、近藤一成(国立医薬品食品衛生研究所) <試薬>

川上浩、南竹優美(共立女子大学大学院)

A. 研究目的

リアルタイムPCR法を用いてジャガイモ加工食品中に混入する可能性のある非食用未承認GMジャガイモを検知する方法を開発するための基礎的な検討として、GM表示対象のジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片化の程度を解析する。また非食用GM体データベースWeb検索用サイトを開発し、インターネットより一般公開する。

B. 研究方法

1. 試料・試薬・機器

<試料>

厚生労働省が定めたGM食品表示対象のジャガイモ加工食品に含まれる生鮮及び加工食品(Figure 1)を参考に、都内のスーパーやインターネットで購入した生鮮ジャガイモ10品種(男爵・メイクイン、インカのめざめ、インカのひとみ、北あかり、ノーザンルビー、紅あかり、こがね丸、シャドークイーン、インカルージュ)、ポテトスナック4製品、冷凍ジャガイモ3製品、乾燥ジャガイモ3製品、ジャガイモデンプン製品7製品、調理済みジャガイモ惣菜食品4製品、ジャガイモデンプンを加工し

た加工食品4製品を購入した。

DNAの抽出・精製には、QIAGEN製イオン交換樹脂タイプキット(Genomic-tip 100/G)(Ca. No.10243)を用いた。DNAの抽出・精製時に用いた分解酵素は、(株)ニッポンジーン製 $\alpha$ -amylase(高濃度品)(Cat. No.316-04751)、QIAGEN製20 mg/mL Proteinase K(GM表示対象のジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片化の程度を解析する。また非食用GM体データベースWeb検索用サイトを開発し、インターネットより一般公開する。DNAの抽出・精製時に用いた緩衝液はQIAGEN製Genomic DNA Buffer Set(Cat. No.19060)を使用した。イソプロパノールとエタノールは、和光純薬工業(株)のものを用いた。DNA電気泳動解析に使用したアガロースは、タカラバイオ(株)製LO3「TAKARA」(Cat. No.5003)を用い、緩衝液には、ナカライテスク(株)のトリス-酢酸-EDTA緩衝原液(Cat. No.32666)を用いた。サンプルの添加液>Loading Buffer)は、タカラバイオ(株)製(Cat. No.RR001A)を用いた。標準DNAサイズマーカーは、タカラバイオ(株)製100bpラダー(Cat. No.3407A)と1kbラダー(Cat. No.3412A)を用いた。DNAの検出に用いたエチジウムブロミドは、(株)ニッポンジーン製10 mg/mL EtBr Solution(Cat. No.315-90051)を用いた。定性PCR

には、ライフテクノロジーズ(株)製 AmpliTaq Gold (Cat. No.00058004340-01)を用いた。リアルタイム PCR には、ライフテクノロジーズ(株)製 TaqMan®Universal PCR Master Mix (Cat. No.58003365-01)を用いた。プライマーは、ファスマック製のものを用いた。ベクター作成には、New England Biolabs 製 10x Agarase I buffer(#B0202S)、Agarase I(#M0392S)、T4 DNA Ligase(#M0202M)、プロメガ(株)製 pGEM-T Easy Vector、TOYOBO 製 COMPETENT high DH5  $\alpha$ を用いた。プラスミド精製には、QIAprep Spin Miniprep Kit(50) (Cat. No.27104)を用いた。実験に使用した水は、日本ミリポア(株)製 Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を用いた。その他の試薬は、全て特級品を用いた。

#### <機器>

粉碎機は、岩谷産業(株)製ミルサー720G-Yを用いた。電子天秤は、ザルトリウスメカトロニクス(株)製BP 210 Sを用いた。恒温槽は、タイテック(株)製ドライサーモユニットDTU-1B、AOSHENG 製 MiniT-100、ASONE 製 IC-150MA、タイテック(株)製 Bio ShakerBR-43FLを用いた。冷却遠心機は、トミー製 MX-305、Eppendorf 製 centrifuge5702R、centrifuge5415Rを用いた。高圧遠心機は、(株)スクラム製 miVac DNA concentratorを用いた。卓上遠心機は、フナコシ(株)製 KR-1000、PC-100、KURABO 製 DISKBOYを用いた。96 ウェルプレート遠心機は、METALFUGE 製を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-5 と Scientific Industries 製 VORTEX GENIE-2 (G-560)を用いた。マグネチックホットスターラーは、三田村理研工業(株)製 MRKを用いた。電気泳動装置は、(株)アドバンス製 Mupid IIを用いた。ゲルイメージ解析装置は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだものを用いた。UV ボードは、UVP 製 Benchtop2 UV Transilluminatorを用いた。分光光度計は、Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop 1000を用いた。サーマルサイクラーは、ライフテクノロジーズ(株)製 GeneAmp PCR System 9700を用いた。リアルタイム PCR は、ライフテクノロジーズ(株)製 ABI PRISM™ 7900HTを用いた。

2.ジャガイモ製品からの DNA の抽出・精製  
生鮮ジャガイモの試料には、水でよく洗浄し、皮を剥いた上で芽の付近を中心に約 30 g を採取し、ミルサーにかけて粉碎したものを使用した。ジャガイモ加工食品は、製品毎に前処理を行ったものを試料とした。すなわち、冷凍ジャガイモは、冷凍された固い状態のものをそのままミルサーにかけて粉碎し、乾燥ジャガイモは、そのままミルサーにかけて粉碎し、ジャガイモデンプン(片栗粉)は、粉碎せず、まわりに飛散しないよう注意しながらそのまま用い、ジャガイモ加工食品(ベビーフード等)は、可能な限りジャガイモのみを採取しミルサーで粉碎し、ジャガイモデンプン加工品(春雨)は、はさみでミルサーの容器に入る大きさにハサミでカットしてミルサーにかけて粉碎したものを試料とした。

前処理を行った各試料は、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip 100/G)を用い、付属のプロトコールを改変し以下の通り DNA の抽出・精製を行った。試料は、ポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に約 6~10 g 量り採り、G2 緩衝液 20 mL、 $\alpha$ -amylase 20  $\mu$ L、cellulase 500  $\mu$ L と RNaseA 20  $\mu$ L を加えた。サンプルがチューブの底に残存しないようボルテックスミキサーで激しく混合し、50°C で 1 時間保温した。保温している間、2~3 回遠沈管反転させて混和した。さらに、Proteinase K 200  $\mu$ L を加え、再び 50°C で 1 時間保温した。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで、3,000 x g、4°C で 20 分間遠心分離し、得られた上清を、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。一回の遠心で上清がうまく採取できない場合は、3,500 x g、4°C で 10 分間遠心分離し、できる限り採取した。次いで、チップを QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、QF 緩衝液 3 mL を負荷し、DNA を溶出した。次いで、イソプロパノールを 3 mL 添加してよく混合した。マイクロチューブ(1.5 mL 容)4~6 本に均等になるように移し、遠沈管を遠心分離機で軽く遠心し残りも均等になるようにマイクロチューブに移した。13,000 x g、4°C で 20 分間遠心し、上清を廃棄した後、70% (v/v)エタノール 1

mLを加え、さらに 13,000 x g、4°Cで 10 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿を減圧乾燥機にかけて乾燥させた。水 30 µLを一つのマイクロチューブに加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を別のマイクロチューブに移し入れ、よく混合し、この作業を繰り返し全てのマイクロチューブから沈殿物を溶解させ、抽出 DNA 原液とした。

### 3. サーマルサイクラーを用いた定性 PCR 法

#### (1) プライマーの設計

ジャガイモの内在性遺伝子 (UGPase (GenBank accession no.U20345.1)) 検出用のプライマーは、Primer Express 2.0 を用いて設計した。プライマーの設計方法は、3'-末端が G か C であること、5 つ連続した塩基配列がなく、GC コンテンツが 50~60% で、Tm 値が Annealing 温度 ±2°C 以内であることを基準とした。また、増幅断片長は 51 bp になるよう設計したものと 101~701 bp までの 100 bp 間隔で 7 箇所設計したものをを用いた (Table 1)。

#### (2) PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製した。組成は以下のとおりである。AmpliTaq Gold PCR Master Mix 12.5 µL と 0.5 µL 対象プライマー対溶液を混合し、水で全量 20 µL に調製した。先にウェルに DNA 試料液 5 µL を底に付けるように添加し、その後調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。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についても同時に調製した。

#### (3) PCR 増幅条件

設計したプライマーを用いて PCR による鋳型 DNA の増幅を行った。装置にチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。95°C 10 分間の条件で保持した後、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 7 分間の条件で保持した。

#### (4) 電気泳動及び画像解析

定性 PCR 後の解析には、PCR 反応液を 3%(w/v) アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ(株)製のアガロースを 3 g 電子天秤で量

りとり、蓋付きビーカー (500 mL 容) の中で 1x TAE Buffer 100 mL に電子レンジで加熱しながら溶解させた。加熱させた後、溶液はマグネチックスターラーで攪拌した。光に当てて観察してアガロースが溶けていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。室温まで冷却後、臭化エチジウム溶液 10 µL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型にゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの裏やキムワイブなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコムを用いて作成した。冷蔵庫で 30 分ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し試料とした。3%(w/v) アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 µL (20 ng)、1k bp マーカーを 5 µL (20 ng)、試料 5 µL を入れ電気泳動 (100 V、15 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置にて行った。

### 4. リアルタイム PCR 法の適用性評価 (ABI PRISM™ 7900HT)

#### (1) リアルタイム PCR 用反応液の調製

リアルタイム PCR 反応液は 25 µL/well として調製した。組成は以下のとおりである。Universal Master Mix 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µL を混合し、水で全量 20 µL に調製後、DNA 試料液 5 µL を添加した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないコントロール試料についても同時に調製した。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉した。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った。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、96 ウェルプレートの縁を軽く叩いて気泡を抜き、軽く 20 秒程遠心機にかけた。96 ウェルプレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad を茶色の面が上になるよう、96 ウェルプレートの上

面にセットした。

## (2) リアルタイム PCR 増幅条件

リアルタイム PCR 装置に 96 ウェルプレートを設定し、0.5M 酢酸ナトリウム溶液を加え、水中で 5 分間冷却後、反応とデータの取り込みを開始した。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 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒間、60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。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った。ベースラインは 3~15 サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための  $\Delta Rn$

threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。指数関数的な増幅が確認され Ct 値が 48 未満の場合、陽性であると判定した。Ct 値が得られない場合は、陰性であると判定した。

## 5. プライマー・プローブ設計

GM ジャガイモのコンストラクトに汎用されるアグロバクテリウム由来ノパリンシンターゼターミネーター (Tnos) やカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーター (P35S) を検出するプライマー・プローブの設計は Primer Express 2.0 を用いた。プライマーの設計は、3' 末端が G か C であること、5 つ連続した塩基配列がなく、GC 含有量が 50~60% で、Tm 値が Annealing 温度  $\pm$  2°C 以内であることを基準とした。また、プローブの設計は、5' 末端に G を含まないこと、GC コンテンツが 30~70% で、Tm 値が 60~70°C であることを基準とした。増幅断片長は、ジャガイモ内在性遺伝子 UGPase は 67 bp、Tnos は 69 bp、P35S は 65 bp に設定した。

## 6. Tnos と P35S の検出限界評価

### (1) プラスミドに組み込む DNA の精製

2% (w/v) アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5  $\mu$ L、1k bp マーカーを 5  $\mu$ L、試料全量を入れ電気泳動 (100 V、15 分程度) を行った。ゲル撮影装置 Diana を用いて電気泳動結果を確認した。ゲルからの DNA の切り出しは、UV を照射する UV ボード上で行った。切り出した DNA はマイクロチューブ (1.5 mL 容) にいれ、-80°C に保存した。ゲルに 180  $\mu$ L の水と 23  $\mu$ L の 10 x Agarase I buffer を加えて 65°C 10 分

間溶解した。40°C 程度まで冷却し 5  $\mu$ L の Agarase I を加え、1 時間 40°C でアガロースを分解した。20  $\mu$ L の 12000 x g、4°C で 10 分間遠心した。上清を新しいマイクロチューブ (1.5 mL 容) に移し、エタノールを上清液の 2.5 倍量加えて -80°C に 5 分間おいた。12000 x g、4°C で 10 分間遠心にかけて上清を捨てた。70% (v/v) エタノールを 1000  $\mu$ L 加え 12000 x g、4°C で 10 分間遠心し、10  $\mu$ L の水で溶かし DNA 試料とした。

### (2) 大腸菌の形質転換

pGEM-T Easy Vector (プロメガ(株)製) を用いて対象となる DNA をベクターに組み込んだ。まず、PCR チューブに 2xT4 DNA Ligase Buffer を 5  $\mu$ L、pGEM-T Easy Vector を 1  $\mu$ L、DNA を 3  $\mu$ L、最後に T4 DNA Ligase を 1  $\mu$ L 入れピペットで混合させた。室温中で 1 時間反応させ、これを反応後 3  $\mu$ L を無菌チューブに入れ、コクピテントセル (DH5 $\alpha$ ) 30  $\mu$ L と混合させた。30 分間氷冷後、42°C 45 秒間ヒートショックさせた。1 分間氷冷し、SOC medium を 300  $\mu$ L 加えた。37°C で 1 時間培養し、これを菌液とした。IPTG、X-Gal、カルベニシリンを含有する寒天培地に菌液を 100  $\mu$ L 重層し、37°C で 1 晩培養した。培養後、白いコロニーに滅菌した爪楊枝を付着させ、カルベニシリン含有 LB 培養液 10 mL に植菌し遠沈管内でよく混合した。これを 37°C で 1 晩培養した。

### (3) プラスミド精製

培養後の菌体は 3000 x g、4°C で 15 分間遠心し回収した。250  $\mu$ L の P1 Buffer (QIAGEN) を加えた後、よく混合し溶解後、250  $\mu$ L の P2 Buffer (QIAGEN) を加えた。350  $\mu$ L の N3 Buffer (QIAGEN) を加えて混合し、13000 x g、4°C で 10 分遠心させた。遠心で得られた上清をピペットでスピнкаラム (QIAGEN) に移した。60 秒間軽く遠心し、溶出させた溶液は再度カラムに移し遠心後、溶出液は廃棄した。0.75 mL の PE Buffer (QIAGEN) を加えてスピнкаラムを洗浄し、60 秒間遠心した。マイクロチューブ (1.5 mL 容) にカラムを移し、50  $\mu$ L の水を加え、1 分間ほど放置し、6000 x g、4°C で 5 分間遠心し溶

出液をプラスミド溶液とした。

#### (4)検知法の定量限界及び検出限界の評価

精製した UGPase、Tnos、P35S の増幅断片を組み込んだプラスミドの濃度は、吸光度より測定した。この測定値を基に、以下の計算式を用いて溶液の濃度(コピー数/ $\mu\text{L}$ )を算出した。算出した濃度から、希釈系列(2,500,000、250,000、25,000、2,500、250、25、12.5、2.5、1.25、0.25(copy/ $\mu\text{L}$ ))を作成し、リアルタイム PCR による定量限界及び検出限界の解析を行った。

濃度計算式:

濃度(copy/ $\mu\text{L}$ ) = プラスミドの濃度(g/ $\mu\text{L}$ ) / プラスミドの分子量(g/mol) × アボガドロ数 (copy/mol)

アボガドロ数 =  $6.02 \times 10^{23}$

### 6. データベース検索ソフトの開発と公開

データベース検索サイトは、FileMaker ServerII ソフトを用いて開発した。インターネットを利用した一般公開は、株式会社エミックのホスティングサービスを利用した。

### C. 研究結果

#### 1. ジャガイモ加工食品から精製した DNA の評価

生鮮ジャガイモ 10 品種、ポテトスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品は、粉碎後、DNA 抽出・精製を行い、検体とした。その検体は、分光光度計を用いて吸光度を測定することにより、DNA 収量及び精製度を算出した。結果は、Table 2 に示す。全ての生鮮ジャガイモ・加工食品から DNA を抽出することが可能であった。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品からの DNA 収量は多かったが、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品からの DNA 収量は少なかった。

抽出した DNA の吸光度を測定し、その精製度を Figure 2 に示した。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジ

ャガイモ惣菜食品については、タンパク質の混入指数(A260/A280)と塩などの混入指数(A260/A230)の値は 2 付近であったため、高い精製度であることが示唆された。ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品については、A260/A280 は 1.3~1.4 で、A260/A230 は 0.4~0.7 であることから高い精製度が得られなかった。

#### 2. ジャガイモ加工食品から抽出した DNA の断片長の評価

ジャガイモ加工食品中に含有する DNA の断片長について解析を行った。設計した定性 PCR 用プライマーを用いて、51、101、201、301、401、501、601、701 bp の断片長で増幅可能であるかを評価した。結果を Figure 3 に示す。生鮮ジャガイモについては 51~701 bp まで全ての断片長の増幅産物が得られた。一方、Table 3 に示すようにジャガイモスナック菓子や冷凍ジャガイモは製品によって差はあるものの、全て製品において 401 bp まで増幅産物を得られた。乾燥ジャガイモに関しては 1 つの製品が 701 bp まで得られたものの下限は 301 bp であった。ジャガイモデンプンや調理済みジャガイモ惣菜食品は製品によって差はあるものの下限は 101 bp であった。ジャガイモデンプンを加工した加工食品(春雨)の下限は 51 bp であった。

#### 3. プライマー・プローブ設計

ジャガイモ加工食品より精製される DNA の断片長(51~101 bp)を考慮し、UGPase を標的に、増幅断片長を 67 bp になるようプライマー・プローブ(以下、UGPase と略す。)を設計した。まず、男爵とマークインで標的配列の情報を得るためシーケンス解析を行ったところ品種間で塩基配列に差を検出した。よって、スクリーニングに使用する UGPase の標的配列は、Figure 4 に示すように、男爵、マークインの他に 8 種類のジャガイモ品種間に相同性の高い UGPase の配列領域を見出し、UGPase 検出用プライマー・プローブを設計した。次いで、Tnos 検出用のプライマー・プローブの設計を行った。Figure 5 で示すように、アグロバクテリウムゲノム

(GenBank no.V00087.1)の Tnos 配列を基に設計した。増幅断片長は 69 bp とした。P35S 検出用のプライマー・プローブは、Figure 6 に示すように GM Papaya Rainbow 品種のゲノム配列(GenBank no.FJ467933.1)に含まれる P35S を基に設計を行った。増幅断片長は 65 bp とした。

#### 4. 作成したプラスミドの特異性と感度の評価

UGPase、Tnos、P35S 検出用プライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、それぞれの検出特異性と検出感度について解析を行った。

まず特異性について検討した。コメ、トマト、パパイヤ、ナス、ピーマン、ヒヨコマメ、コムギ、アマ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、テンサイ、ワタ及びジャガイモの 14 種の作物から精製したゲノム DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行った。その結果、コメからはコメ由来のコメ内在性アクチンプロモーター(AINT)が、コムギとアマ、テンサイからは抗生物質耐性遺伝子 neomycin phosphotransferase II (NPT II) が、ダイズからは Tnos が、トウモロコシからはトウモロコシ由来ユビオチンプロモーター(Pubi)と NPT II が検出された。ジャガイモに関しては、UGPase のみ検出され、Tnos や P35S は検出されなかった。

次に、感度について検討を行った。プラスミドを用いて希釈系列を作成し、リアルタイム PCR の鋳型とし、それぞれを検出するプライマー・プローブを用いた検知法の検出感度を解析した。UGPase については 16 回の反復試験、Tnos と P35S については 10 回の反復試験を行った。その結果、全ての試験より UGPase は 2,500 コピーまで、Tnos・P35S は 12.5 コピーまで検出された (Table 4)。Ct 値は、Tnos と P35S に比べて UGPase を高く検出したが、RSD の値はすべて 3.2%以下と低かった。定量限界をプラスミドの希釈系列の濃度と Ct 値より求めたところ、UGPase は 250 コピー ( $R^2=0.996$ )、Tnos・P35S は 12.5 コピー (Tnos,  $R^2=0.993$ ; P35S,  $R^2=0.998$ ) であった (Figure 7)。

#### 5. 実態調査

開発したリアルタイム PCR 検知法を用いて、市販されているジャガイモ食品への GM ジャガイモの混入に関する実態調査を行った。全ての検体は、2 試験ずつ行い判定した。その結果、15 検体中、27-①(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-1(シチューの素)、T-2(缶スープ)、31-②(春雨)の 5 製品で Tnos が、33-①(冷凍ジャガイモ)、K-3(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-2(缶スープ)、31-①(春雨)の 5 製品で P35S が検出された。得られた Ct 値は 38 以上と高く、いずれも GM ジャガイモではなくバクテリアやウイルスの混入による汚染の可能性が示唆された (Table 5)。

#### 6. データベース検索ソフトの開発と公開

昨年に引き続き、データベース検索サイトは、FileMaker ServerII を用いたホスティングサービスを利用し、インターネットより国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部のホームページから公開した。

(アドレス: <http://gmdb.nihs.go.jp/>)

#### D. 考察

現在、世界では多くの GM ジャガイモが開発されていることが報じられているが、日本で安全性が承認されているものは、米国産害虫抵抗性の GM ジャガイモのニューリーフみである。ニューリーフ・ジャガイモ (SPBT02-5 系統、Bt-6 系統、SEMT15-15 系統、SEMT15-02 系統、RBMT15-101 系統、RBMT21-350 系統)を検出するための定性 PCR 法の標的増幅産物は、111 bp 又は 117 bp に設定されており、その検知法は公定法として報告されている。加えて、我が国で未承認の GM ジャガイモの中で海外で作出実績のある品種は 3 種類程度存在する。そこで、意図しないこれらの GM ジャガイモのジャガイモ加工食品への混入をより高い精度で検査するための、GM ジャガイモ検知法の開発が求められていた。

GM 表示対象であるジャガイモ加工食品を Figure 1 に定義した。まず、GM ジャガイモの混入を検査するための新しい検知法を開発するにあたり、ジャガイモ加工食品から得られる DNA の評価を行った。ジャガイモデ

ンポンとジャガイモデンプンを加工した加工食品から得られる DNA の低い精製度は、DNA の回収量の低さに起因するものと考えられた。ジャガイモデンプンより加工された食品は、サンプルを溶解させるために使用する緩衝液(G2 バッファー)に難溶であるため、他の加工食品のサンプリング量の 6~8 割(6~8 g)に抑えたためと考えられた。また、ジャガイモデンプンは、製造工程において物理的に DNA が分解されるような工程が多く非常に加工度の高い製品である。そのため、ジャガイモデンプンを使用した加工食品より DNA を抽出しにくいと考えられた。その他のジャガイモ加工食品からは、1 g あたりのサンプリング量から 1 µg 以上の DNA を得ることが可能であることが示唆された。DNA の精製度については、その製造工程の複雑化によって低く見積もられることが考えられた。ジャガイモ加工食品から抽出精製される DNA 断片長に関して調査を行った結果、ジャガイモスナック菓子、冷凍ジャガイモや乾燥ジャガイモは製品によって差はあるものの全て 301~401 bp まで増幅産物を得られた。一方で、ジャガイモデンプンやジャガイモデンプンを加工した製品は 51~101 bp まで増幅産物を確認することが可能であった。つまり、製造加工工程における熱、冷却、圧力、粉碎、乾燥及びその他の物理的な加工工程の要素によって 51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆された。上記の考察を踏まえ、プロモーターやターミネーター領域などの組換え DNA セグメント、作物の内在性遺伝子を検知するリアルタイム PCR 法により、GM ジャガイモの検出は可能であることが示唆された。

GM ジャガイモ混入に関する擬陽性判定を防ぐため、F. 健康危険情報 なし

GM ジャガイモ検知法は、ジャガイモ内在性遺伝子検知法よりも高感度であることが求められる。本研究では、検出限界(LOD)は、UGPase については 2,500 コピー、Tnos・P35S については 12.5 コピーであることが示唆された (Table 4)。Figure 7 に示すように定量下限(LOQ)は、UGPase では 250 コピー、Tnos、P35S では 12.5 コピーであった。Tnos と P35S の検出感度は UGPase よりも高いことから、GM ジャガイモのスクリーニング法に適合していることが示唆された。

市販されているジャガイモ加工食品に意図しない GM ジャガイモの混入を検査するため、開発した GM ジャガイモのスクリーニング法を用いて検査を行った。その結果、検査した全てのジャガイモ加工食品に GM ジャガイモは検出されず、Tnos や P35S の検査で高い Ct 値(38 以上)を検出した製品については、食品へのパクリアやウイルスの汚染によることが考えた。

## E. 結論

本研究では、特異的、且つ高感度な GM ジャガイモをスクリーニングする検出技術を開発することができた。我が国の GM 表示対象であるジャガイモ加工食品 6 種(ポテトスナック、冷凍ジャガイモ、乾燥ジャガイモ、ジャガイモデンプン、調理済みジャガイモ惣菜食品、ジャガイモデンプンを加工した食品)から抽出・精製された DNA は、50~100 bp 程度まで断片化されていることが示唆され、リアルタイム PCR を用いて標的配列を検出することが可能であることが示唆された。GM ジャガイモに汎用される Tnos(過去データによると AV43-6-G7 系統には Tnos は含まれないとされているが、今回新たな調べにより全ての GM ジャガイモに Tnos が含まれるとされた)及び P35S を特異的に検出するリアルタイム PCR 法を用い GM ジャガイモの混入を検査することが可能であることが示唆された。開発した方法を用いてジャガイモ加工食品の GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った結果、GM ジャガイモの混入は認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2013, in press.
- 2) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K.,



- Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2013, in press.
- 3) Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 2013, in press.
- 4) Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136(2), 895-901, 2013
- 5) Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19(3), 215-222, 2012
- 6) Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 53(4), 157-165, 2012
- 7) Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research*, 94, 89-97, 2012
- 8) Mano J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K. Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516, 2012
2. 学会発表
- 1) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Apple procyanidins inhibit development of collagen-induced arthritis via down-regulation of Th17 response. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.2)
- 2) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
- 3) Morimoto, K., Katayama, S., Fukumoto, T., Nakamura, K., Nakamura, S. Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)

- 4) Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, (2012.10)
- 5) 中村公亮、穠山浩、松岡英樹、中島翔平、神田智正、近藤一成、手島玲子：リンゴプロシアニジン(ACT)の経口摂取によるコラーゲン誘導性関節炎の発症遅延効果、日本薬学会第133年会、横浜、(2013.3)
- 6) 中島治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子：ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について、日本薬学会第133年会、横浜、(2013.3)
- 7) 近藤一成、小櫃冨未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子：PCR-RFLP法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法、日本薬学会第133年会、横浜、(2013.3)
- 8) 中村公亮、穠山浩、野口秋雄、小林友子、坂田こずえ、近藤一成、大森清美、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、手島玲子：パパイヤ加工品の遺伝子組換えパパイヤ含有に関する総合的評価法、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 9) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、小林友子、大森清美、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ55-1系統特異的検知法の妥当性評価、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 10) 近藤一成、坂田こずえ、小櫃冨未、中村公亮、野口秋雄、手島玲子：フロクマリン類の *in vitro* 光毒性について、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 11) 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発(第二報)、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 12) 小林友子、中村公亮、近藤一成、野口秋雄、小櫃冨未、峯岸恭孝、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、手島玲子：遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 13) 中村公亮、南竹優美、近藤一成、野口秋雄、小櫃冨未、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、川上浩、手島玲子：遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモDNAの断片長について、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 14) 真野潤一、高畠かおり、峯岸恭孝、二宮健二、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：遺伝子組換えトウモロコシグループテストティング法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 15) 西辻泰之、菊池洋介、真野潤一、福留真一、遠藤繁、林田拓也、川上裕之、栗本洋一、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイムPCRアレイ法への適用、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 16) 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、吉松嘉代、野口秋雄、近藤一成、真野潤一、橘田和美、手島玲子：日欧で検出された安全性未審査遺

伝子組換えコメ (Kefeng系統) 混入に関する  
検知技術の開発について (第2報)、日本食品  
化学学会 第18回 総会・学術大会、函館、  
(2012. 6)

- 17) 高島令王奈、則武寛通、野口秋雄、中村公亮、  
近藤一成、穂山浩、手島玲子、真野潤一、橘  
田和美: 加工品を含む複数のスイートコー  
ン試料からのDNA抽出法の検討、日本食品化  
学学会 第18回 総会・学術大会、函館、  
(2012. 6)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

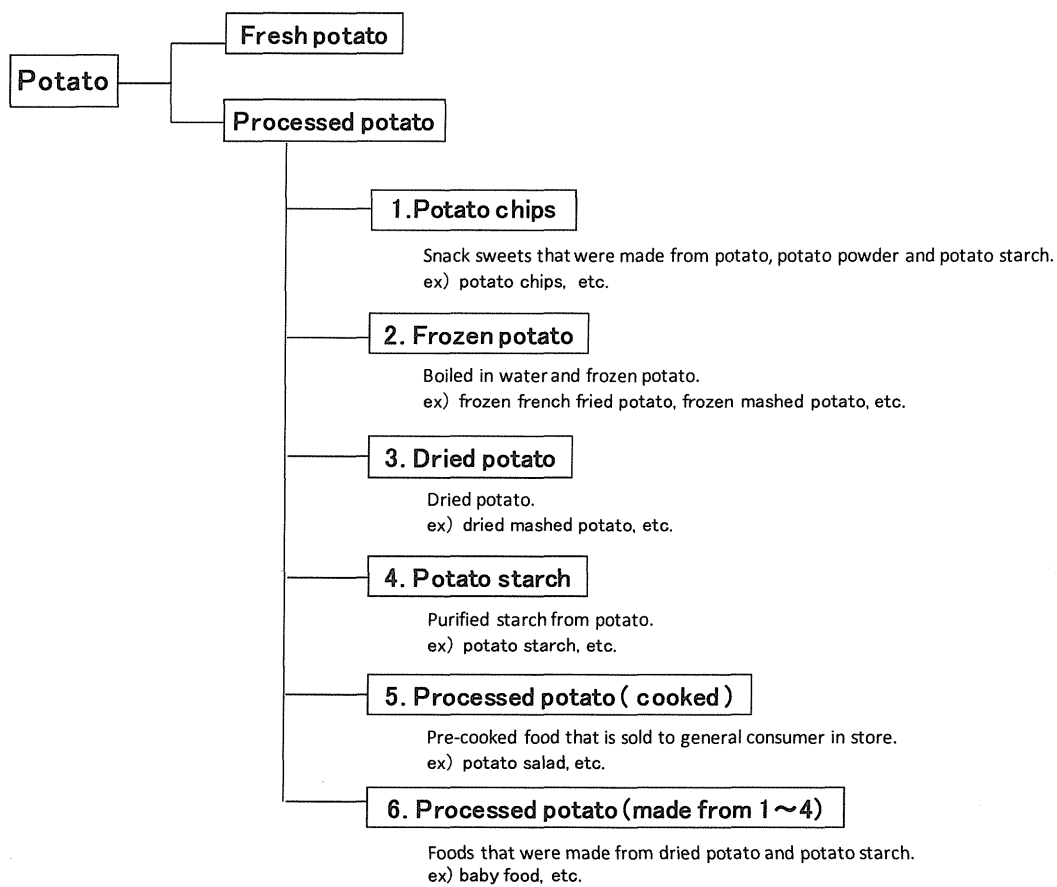
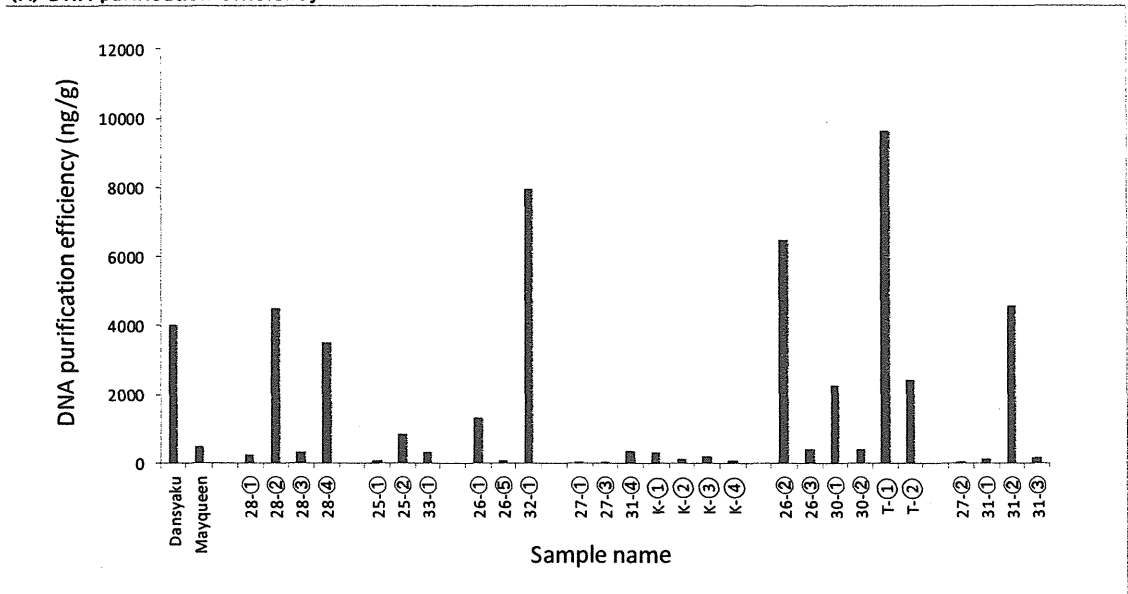


Figure 1. Fresh and processed potato products under GM food labeling regulation

(A) DNA purification efficiency



(B) Absorbance ratio

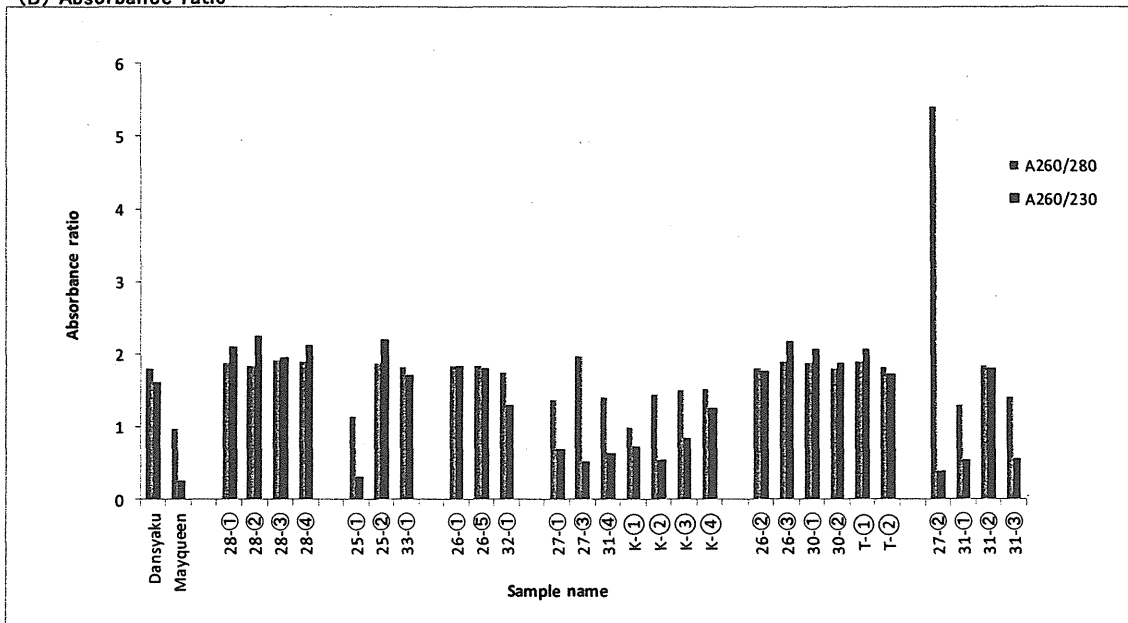


Figure 2. DNA purification from potato products

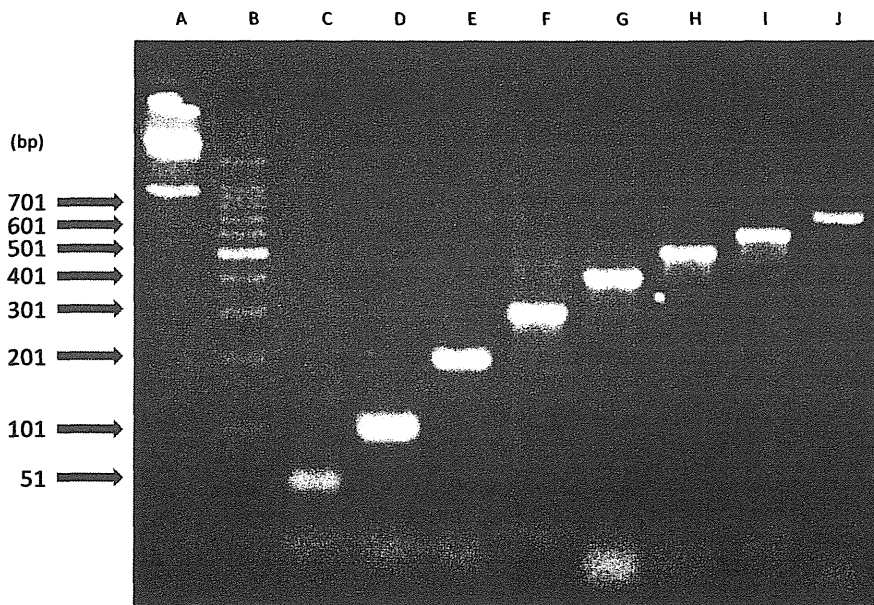


Figure 3. Results of dansyaku DNA PCR  
 lane A, 1kb DNA Ladder Marker; lane B, 100bp DNA Ladder Marker; lane C, UGP-50; lane D, UGP-100; lane E, UGP-200;  
 lane F, UGP-300; lane G, UGP-400; lane H, UGP-500; lane I, UGP-600; lane J, UGP-700.

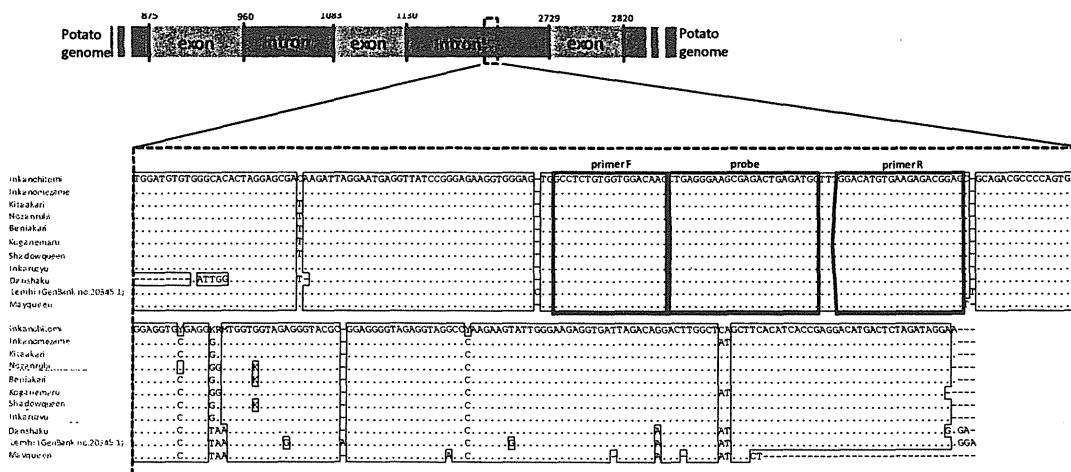


Figure 4. Sequence of primer and probe for detecting UGPase gene

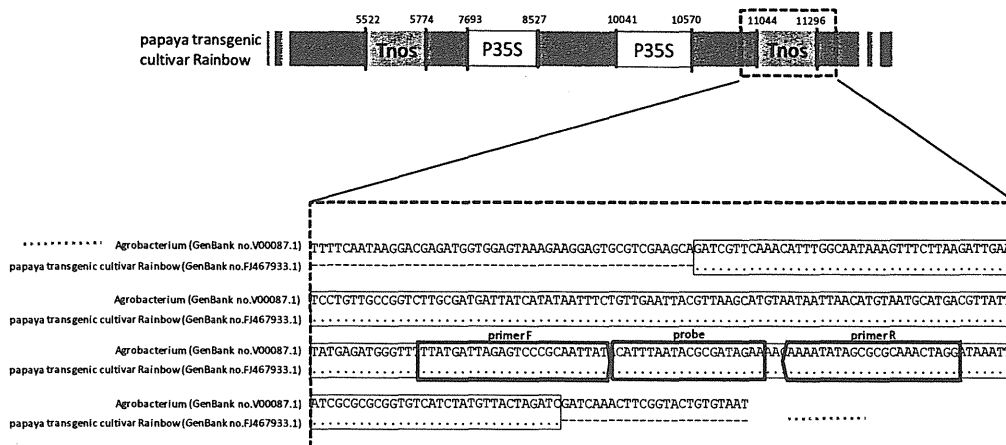


Figure 5. Sequence of Tnos used for primer and probe design

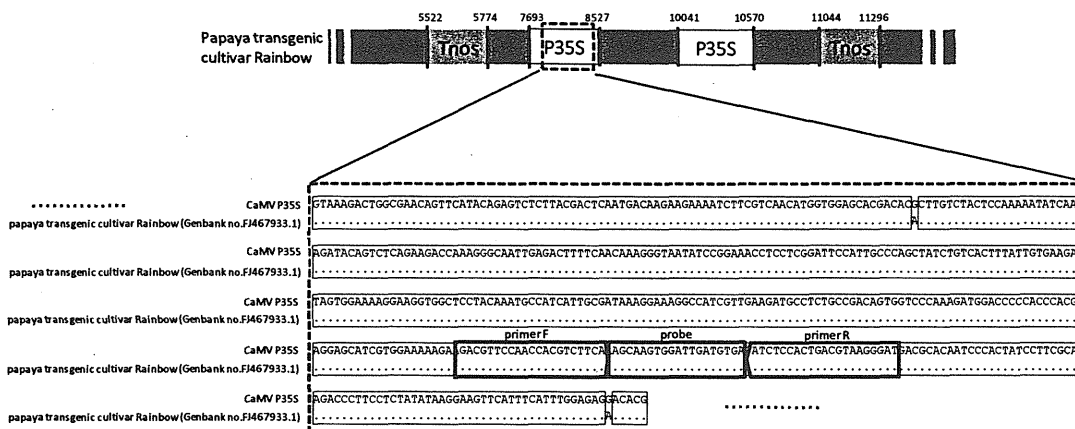


Figure 6. Sequence of P35S used for primer and probe design

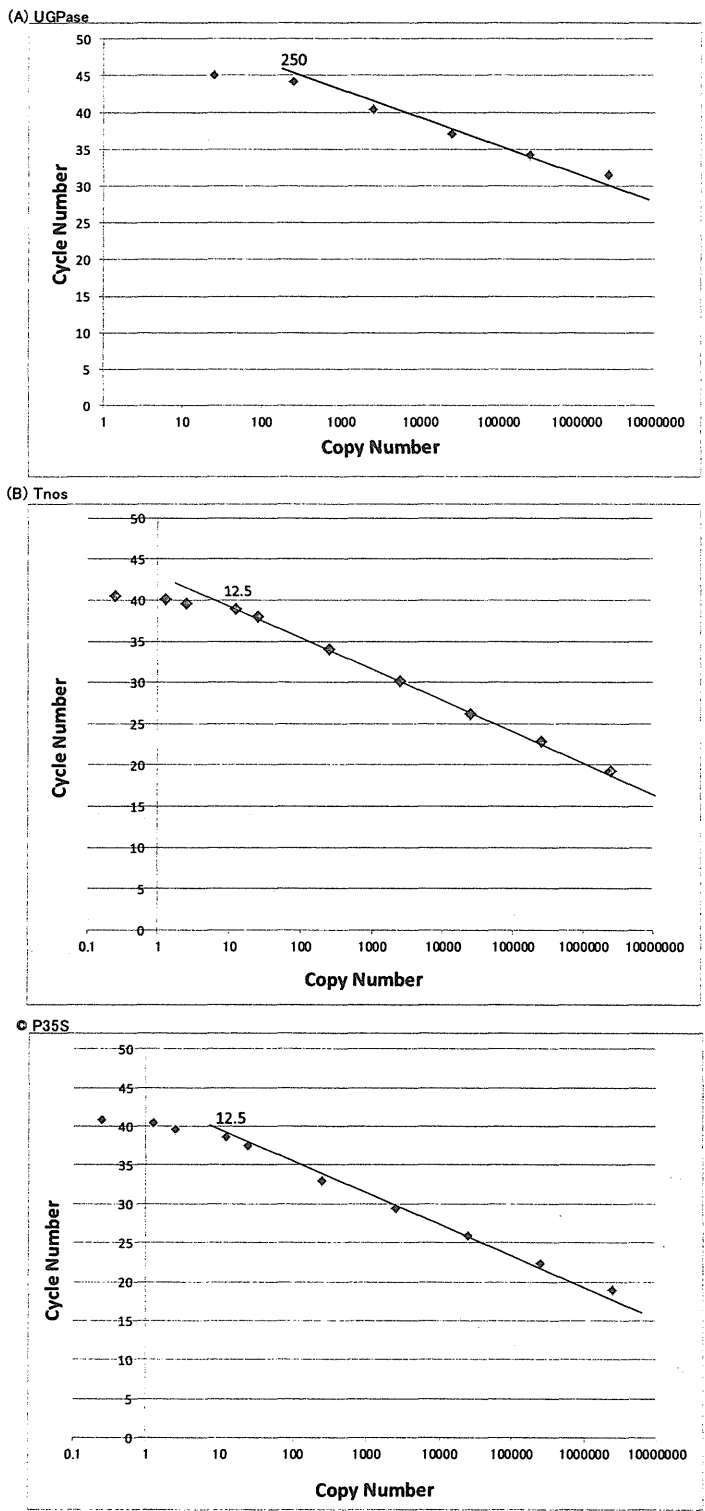


Figure 7. Limit of quantification (LOQ)



Table 1. Oligonucleotides used to in this study

Name	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon (bp)
UGP-50	TGG AGA AGG GCA ACA TTG	Sense	51
	TCA TCA GTT GGC GTC TGG ATC	Antisense	
UGP-100	ATG CTT CAC ATC ACC GAG GAC	Sense	101
	CCT GAAA AGG AAA GAC AAC CCG	Antisense	
UGP-200	TAC CTC CTC AGT ATG GCA AGG TC	Sense	201
	ACT TGT CAT ATG GCA CCA CCA C	Antisense	
UGP-300	TGC GGA GAT GAG GAT GTT GAG	Sense	301
	CCT ATC TAG AGT CAT GTC CTC GGT G	Antisense	
UGP-400	CAG TAT GGC AAG GTC TGC GTA C	Sense	401
	CAA GCC TCC ATT GAG CTT CAG	Antisense	
UGP-500	GGG TAG AGG TAG GCC CAA GAA G	Sense	501
	CTC CAG TCA ATG TGT TGC GC	Antisense	
UGP-600	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC	Sense	601
	TCA TCA GTT GGC GTC TGG ATC	Antisense	
UGP-700	TGC TTC ACA TCA CCG AGG AC	Sense	701
	CCA AGC CTC CAT TGA GCT TC	Antisense	
ymUGPase-F	GCCTCTGTGGTGGACAAG	Sense	67
ymUGPase-R	CTCCGTCTCTTCACATGTCC	Antisense	
ymUGPase-P	FAM-CTGAGGGAAGCGAGACTGAGATG-TAMRA	Sense	

Table 2. DNA purified from various potato products

Category	Sample name	Sampling amount (g)	DNA concentration (ng/ $\mu$ l)	Total DNA purified (ng)	Purification efficiency (ng/g)	Absorbance			Degree of purification	
						A260	A280	A230	260/280	260/230
Raw	Dansyaku	10.0	1347.1	40411.5	4041.2	26.941	14.846	16.630	1.81	1.62
Snack food	28-①	10.0	85.1	2552.4	255.2	1.702	0.905	0.807	1.88	2.11
	28-②	10.0	1498.3	44949.0	4494.9	29.966	16.247	13.318	1.84	2.25
	28-③	10.0	108.2	3245.1	324.5	2.163	1.134	1.104	1.91	1.96
	28-④	10.0	1172.9	35186.7	3518.7	23.458	12.412	11.065	1.89	2.12
Frozen potato	25-①	10.5	39.3	1179.9	112.4	0.787	0.691	2.459	1.14	0.32
	25-②	10.5	293.6	8808.3	838.9	5.872	3.123	2.669	1.88	2.20
	33-①	10.1	111.8	3354.0	332.1	2.236	1.220	1.308	1.83	1.71
Dried potato	26-①	10.0	442.3	13269.6	1327.0	8.846	4.778	4.808	1.85	1.84
	26-⑤	10.1	33.3	998.7	98.9	0.666	0.359	0.368	1.85	1.81
	32-①	5.1	1353.0	40590.9	7959.0	27.061	15.567	20.976	1.74	1.29
Potato starch	27-①	8.0	6.2	185.4	23.1	0.124	0.090	0.180	1.38	0.69
	27-③	8.1	3.0	90.9	11.3	0.061	0.031	0.115	1.97	0.53
	31-④	8.0	95.4	2862.3	356.9	1.908	1.354	3.029	1.41	0.63
	K-①	8.0	94.4	2831.4	353.0	1.888	1.895	2.586	1.00	0.73
	K-②	8.0	35.0	1051.2	131.1	0.701	0.487	1.298	1.44	0.54
	K-③	8.1	59.3	1778.4	219.6	1.186	0.783	1.412	1.51	0.84
	K-④	8.1	25.1	753.3	93.3	0.502	0.329	0.398	1.52	1.26
	Processed potato (made from above 1 - 4)	26-②	10.6	2293.6	68809.2	6491.4	45.873	25.450	26.064	1.80
26-③	10.6	144.2	4324.8	408.0	2.883	1.519	1.329	1.90	2.17	
30-①	8.1	613.0	18390.0	2281.6	12.260	6.549	5.951	1.87	2.06	
30-②	8.0	110.9	3327.3	414.9	2.218	1.235	1.180	1.80	1.88	
T-①	10.0	3221.0	96629.1	9662.9	64.419	33.992	31.271	1.90	2.06	
T-②	10.2	835.5	25065.0	2457.4	16.710	9.145	9.659	1.83	1.73	
Processed potato (cooked)	27-②	10.3	0.8	24.0	2.3	0.016	0.003	0.041	5.41	0.39
	31-①	16.1	38.7	2323.2	144.3	0.774	0.598	1.433	1.30	0.54
	31-②	6.0	911.4	27342.9	4580.1	18.229	9.830	10.127	1.85	1.80
	31-③	16.2	44.0	2640.0	163.0	0.880	0.623	1.544	1.41	0.57

Table 3. Purified potato DNA fragmentation in processed potato product

Processed potato products	Lot no.	Amplicon size (bp) <sup>a</sup>							
		51	101	201	301	401	501	601	701
Fresh	Danshaku	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato chips	28-①	+	+	+	+	+	-	-	-
	28-②	+	+	+	+	+	+	+	+
	28-③	+	+	+	+	+	-	-	-
	28-④	+	+	+	+	+	-	-	-
Frozen potato	25-①	+	+	+	+	+	+	+	-
	25-②	+	+	+	+	+	+	+	+
	33-①	+	+	+	+	+	-	-	-
Dried potato	26-①	+	+	+	+	-	-	-	-
	26-⑤	+	+	+	+	+	-	-	-
	32-①	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato starch	27-①	+	+	+	+	+	-	-	-
	27-③	+	+	+	+	+	+	-	-
	31-④	+	+	-	-	-	-	-	-
Processed potato	26-②	+	+	+	+	-	-	-	-
	26-③	+	+	+	+	+	+	+	+
	30-①	+	+	+	+	+	-	-	-
	30-②	+	+	-	-	-	-	-	-
Processed potato starch	27-②	+	+	+	+	+	-	-	-
	31-①	+	-	-	-	-	-	-	-
	31-②	+	+	+	+	+	-	-	-
	31-③	+	-	-	-	-	-	-	-

a. PCR amplicon detected (+) and not detected (-)

Table 4. Limit of detection (LOD) for GM potato screening method

Copy number	Probability of detection(%)			Mean Ct value			SD			RSD(%)		
	UGPase	Tnos	P35S	UGPase	Tnos	P35S	UGPase	Tnos	P35S	UGPase	Tnos	P35S
2500000	16/16(0)	10/10(0)	10/10(0)	32.38	19.26	18.88	1.04	0.09	0.15	3.21	0.46	0.81
250000	16/16(0)	10/10(0)	10/10(0)	34.85	22.57	22.21	0.78	0.31	0.21	2.22	1.38	0.93
25000	16/16(0)	10/10(0)	10/10(0)	37.76	25.55	25.89	0.96	1.81	0.13	2.54	7.07	0.48
2500	16/16(0)	10/10(0)	10/10(0)	40.95	29.92	29.26	0.79	0.37	0.32	1.93	1.25	1.09
250	12/16(25)	10/10(0)	10/10(0)		33.89	32.91		0.75	0.64		2.21	1.94
25	2/16(87)	10/10(0)	10/10(0)		37.62	36.47		1.07	0.77		2.84	2.11
12.5	0/16(100)	10/10(0)	10/10(0)		38.74	37.49		1.16	0.62		3.00	1.64
2.5	0/16(100)	5/10(50)	7/10(30)									
1.25	0/16(100)	3/10(70)	4/10(60)									
0.25	0/16(100)	1/10(90)	2/10(80)									

Table 5. Results of screening test on processed potato products sold in Japan

		UGPase		Tnos		P35S		Result
		1	2	1	2	1	2	
Frozen potato	33-①	15.80	15.83	-	-	40.02	-	nonGM
Dried potato	32-①	15.54	15.61	-	-	-	-	nonGM
Potato starch	27-①	24.07	24.53	37.83	39.29	-	-	nonGM
	31-④	33.40	33.11	-	-	-	-	nonGM
	K-1	33.69	33.69	-	-	-	-	nonGM
	K-2	29.93	29.87	-	-	-	-	nonGM
	K-3	26.51	26.59	-	-	39.37	-	nonGM
	K-4	34.94	36.84	-	-	-	-	nonGM
Processed potato	30-①	23.05	23.15	-	-	-	-	nonGM
	30-②	22.34	22.35	40.01	41.22	38.88	-	nonGM
	T-1	20.31	20.22	-	41.11	-	-	nonGM
	T-2	22.93	23.07	39.76	38.1	39.89	-	nonGM
Processed potato starch	31-①	36.80	38.01	-	-	46.65	-	nonGM
	31-②	31.50	31.50	38.52	40.03	-	-	nonGM
	31-③	35.34	34.87	-	-	-	-	nonGM