

表1 リアルタイム PCR に用いたプライマー・プローブ

target	name	sequence (5'-3')	length (bp)
SSIIb	SSIIb3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC	114
	SSIIb3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA	
	SSIIb-TaqV	VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA	
	SSIIb-Taq	FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA	
P35S	P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	101
	P35S 1-3'	CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT	
	P35S-Taq	FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA	
tNOS	NOS ter 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151
	NOS ter 3-5'	GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC	
	NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT	108
	NOS-Taq	FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA	

表2 コントロールプラスミドを用いた定量性の評価

plasmid DNA	R ²	E (%)
<i>ABI PRISM</i> TM 7900HT		
pUC-SSIIb ^a	0.9946	97.6
pUC-P35S ^b	0.9921	96.3
pUC-tNOS ^b	0.9933	100.3
<i>LightCycler</i> [®] 96		
pUC-SSIIb ^c	0.9977	95.0
pUC-P35S ^d	0.9991	92.3
pUC-tNOS ^d	0.9992	95.5

^a Ct, ^b ΔCt, ^c Cq, ^d ΔCq 値に対する評価.

ΔCt, ^b ΔCq 値に対する評価.

表3 genomic DNA 希釈試料を用いた定量性の評価

genomic DNA	R ²	E (%)
<i>ABI PRISM</i> TM 7900HT		
MON810 ^a	0.9912	98.2
TC1507 ^a	0.9920	100.5
DAS59122 ^a	0.9981	100.5
MIR162 ^a	0.9995	99.8
3272 ^a	0.9976	95.0
<i>LightCycler</i> [®] 96		
MON810 ^b	0.9985	100.2
TC1507 ^b	0.9997	92.7
DAS59122 ^b	0.9945	99.6
MIR162 ^b	0.9981	103.2
^a 3272 ^b	0.9998	102.9

表4 コントロールプラスミドを用いた検出限界の評価

plasmid DNA	pUC-SSIIb				pUC-P35S				pUC-tNOS			
	1.25	2.5	5	10	1.25	2.5	5	10	1.25	2.5	5	10
<i>ABI PRISM</i> TM 7900HT												
positive/total	15/21	20/21	21/21	21/21	12/21	19/21	21/21	21/21	10/21	15/21	20/21	21/21
positive rate (%)	71.4	95.2	100.0	100.0	57.1	90.5	100.0	100.0	47.6	71.4	95.2	100.0
RSD (%)	3.1	2.8	2.1	1.3	15.2	12.9	9.1	8.4	10.0	11.7	10.7	13.7
<i>LightCycler</i> [®] 96												
positive/total	16/21	21/21	21/21	21/21	16/21	18/21	20/21	21/21	12/21	16/21	21/21	20/21
positive rate (%)	76.2	100.0	100.0	100.0	76.2	85.7	95.2	100.0	57.1	76.2	100.0	100.0
RSD (%)	3.2	2.4	3.4	1.5	7.7	13.9	5.5	5.8	13.2	13.7	5.6	9.0

表5 genomic DNA 希釈試料を用いた検出限界の評価

genomic DNA	MON810				MIR162				TC1507				DAS59122				3272			
GM content (%)	0.025	0.05	0.10	0.15	0.025	0.05	0.10	0.15	0.025	0.05	0.10	0.15	0.025	0.05	0.10	0.15	0.025	0.05	0.10	0.15
<i>ABI PRISM™ 7900HT</i>																				
positive/total	11/21	17/21	19/21	21/21	17/21	17/21	20/21	21/21	7/21	17/21	19/21	21/21	11/21	15/21	18/21	21/21	17/21	18/21	19/21	21/21
positive rate (%)	81.0	100.0	100.0	100.0	81.0	81.0	95.2	100.0	33.3	81.0	90.5	100.0	52.4	71.4	85.7	100.0	81.0	85.7	90.5	100.0
RSD (%)	19.6	11.9	22.0	12.5	7.9	6.6	8.3	7.6	7.3	5.8	8.9	12.1	13.4	5.0	12.3	10.0	12.3	7.6	9.8	9.9
<i>LightCycler* 96</i>																				
positive/total	12/21	17/21	21/21	21/21	10/21	19/21	20/21	21/21	12/21	14/21	20/21	20/21	9/21	16/21	21/21	21/21	16/21	17/21	21/21	21/21
positive rate (%)	57.1	81.0	100.0	100.0	47.6	90.5	95.2	100.0	57.1	66.7	95.2	95.2	42.9	76.2	100.0	100.0	76.2	81.0	100.0	100.0
RSD (%)	7.4	10.8	7.2	8.0	6.6	8.3	9.7	5.8	12.1	13.4	11.7	8.2	12.2	8.2	8.1	9.4	6.5	7.7	10.4	9.5

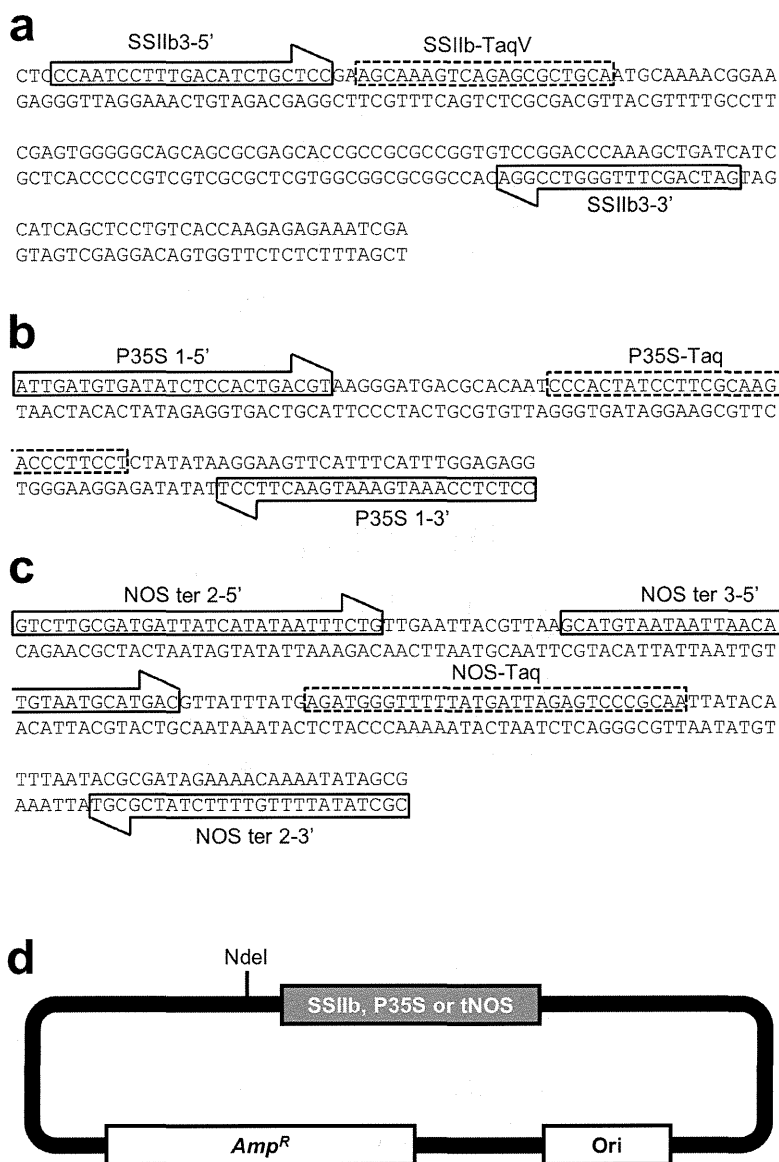


図1 コントロールプラスミドのインサート配列および模式図

(a) pUC-SSIIb, (b) pUC-P35S, (c) pUC-tNOS のインサート配列. (d) コントロールプラスミドの模式図. リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブを矢印および破線ボックスで示す. *Amp^R*, ampicillin resistance gene. Ori, origin of replication.

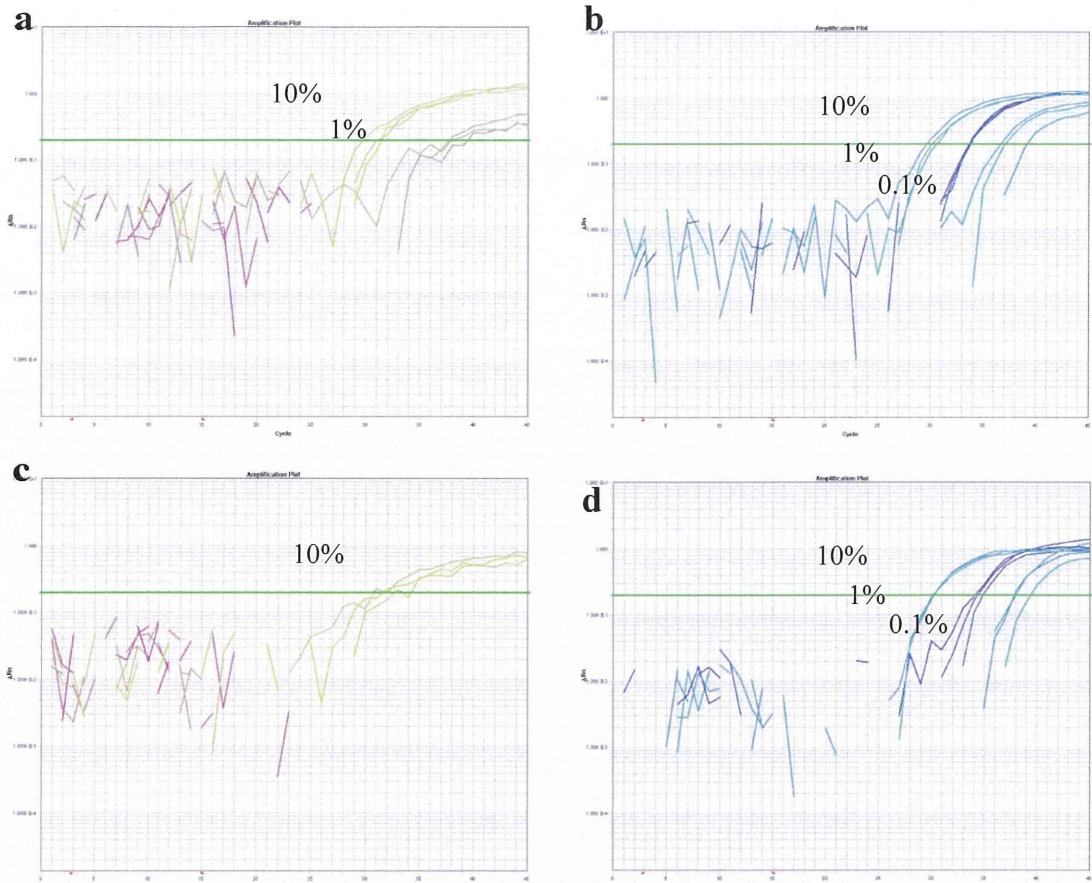


図2 multiplex リアルタイム PCR 増幅曲線

singleplex リアルタイム PCR と同条件のプライマー・プローブ濃度にて得られた (a) MON810 および (b) MIR162 における P35S および tNOS の増幅曲線. multiplex リアルタイム PCR 条件のプライマー・プローブ濃度にて得られた (c) MON810 および (d) MIR162 における P35S および tNOS の増幅曲線.

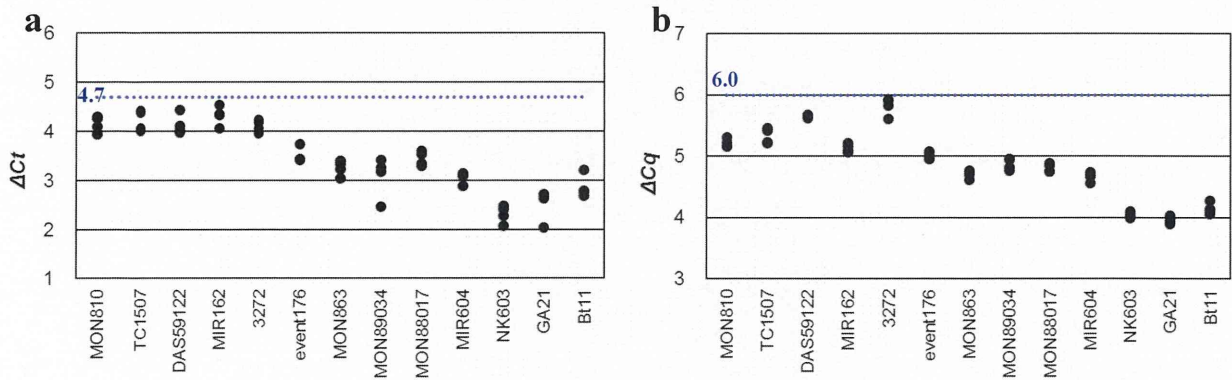


図3 GM 混入率 5% の genomic DNA 希釈試料の ΔC_t および ΔC_q 値

(a) ABI PRISM™ 7900HT では ΔC_t 閾値 = 4.7, (b) LightCycler® 96 では ΔC_q 閾値 = 6.0 と決定した.

H25研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
神奈川芳之、赤羽学、今村 知明	第1編 食品衛生管理と食の安全 第6章 フードディフェンスという概念	美研クリエイティブセンター	微生物コントロールによる食品衛生管理－食品の安全・危機管理から予測微生物の活用まで－	株式会社エヌ・ディー・エス	東京	2013	91-108
今村知明 他	食品保健	医療情報科学研究所 編集	公衆衛生がみえる	株式会社メディックメディア	東京	2014	302-319
今村知明、神奈川芳行 他	【第2版】第5章 社会における対応の現状と対策 1. アレルギーの表示の現状と対策	中村 丁次 他編	【第2版】食物アレルギーとアレルギー医学的基礎知識から代替食献立まで	第一出版	東京	2014	151-158

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G.	Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cell.	Methods Mol. Biol.	1074	151-173	2013
Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H.	Genomic adaptation of the Lactobacillus casei group.	PLOS one.	8(10)	e75073	2013
Kurokawa S, Nakamura R, Mejima M, Kozuka-Hata H, Kuroda M, Takeyama N, Oyama M, Satoh S, Kiyono H, Masumura T, Teshima R, Yuki Y	MucoRice-cholera Toxin B-subunit, a Rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of α-amylase-trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens.	J Proteome Res.	12	3372-3382	2013
Nakamura R., Teshima R.	Proteomics-based allergen analysis in plants.	J. Proteomics	93	40-49	2013
Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods.	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety,	20	161-169	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakamura, K., Sakagami, H., Asanuma-Date, K., Nagasawa, N., Nakahara, Y., Akiyama, H., Ogawa, H.	Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures.	Carbohydrate Research,	382	77-85	2013
Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R.	Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct.	Food Chemistry,	141	2618-2624	2013
Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S.	Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in <i>Pichia pastoris</i> using codon optimization.	Biotechnology and Applied Biochemistry,	60	283-288	2013
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	895-901	2013
Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K.	Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns.	Food Hygiene and Safety Science,	54	309-315	2013
Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R.	Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene.	Biological & Pharmaceutical Bulletin,	36	1454-1459	2013
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,	96	1054-1058	2013
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,	32	728-735	2013
Nakamura R., Teshima R.	Immunoproteomic analysis of food allergens.	Methods Mol Biol.	1072	725-735	2014
Kurokawa S, Kuroda M, Mejima M, Nakamura R, Takahashi Y, Sagara H, Takeyama N, Satoh S, Kiyono H, Teshima R, Masumura T, Yuki Y.	RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds.	Plant Cell Rep.	33(1)	75-87	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Hachisuka A, Yamada A, Ozeki Y, Teshima R.	Differential analysis of protein expression in RNA-binding-protein transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress.	J Proteome Res.	13(2)	489-95	2014
Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R.,	Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand.	Biological & Pharmaceutical Bulletin,	37	1-5	2014

