

## 承認組換え生物の検知技術の開発

研究分担者 野口 秋雄 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

### 研究要旨：

我が国に輸入される安全性承認済みの遺伝子組換え(GM)作物の種類は増加の一途を辿っている。なかでもトウモロコシは品種数が多く、表示の妥当性を検証するために多くの検査法が開発されているが、現在消費者庁から通知されている検査法は新開発 GM 品種には対応しておらず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。そこで本研究では、これらの問題を解決する新たな GM トウモロコシ検査法を開発を行う。本年度は、新開発 GM 品種を検出でき、かつ実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法を開発を行った。新開発 GM 品種を検出するために、GM 品種に広く存在している組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象とした。また、実験操作の簡便化のために、表示義務の閾値である GM 混入率 5%の判定には multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子(SSIIb)と組換え遺伝子(P35S および tNOS)の Cq 値あるいは Ct 値の差を用いた。プラスミドや genomic DNA を用いた実験から、本スクリーニング検査法は十分な定量性と検出感度を有していることが示され、ABI PRISM™ 7900HT では $\Delta C_t$  閾値を 4.7、LightCycler® 96 では $\Delta C_q$  閾値を 6.0 と決定した。本スクリーニング検査法は、新開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことで、スクリーニング検査の精度を向上させることができると期待される。

### A. 研究目的

近年、多種多様な遺伝子組換え(GM)作物が開発され、我が国に輸入される安全性承認済みの GM 作物の種類は増加の一途を辿っている。我が国においては、安全性承認済みの GM ダイズおよびトウモロコシは重量割合で 5%を超えた場合、その旨の表示が義務づけられており、表示の妥当性を検証するための定量法が消費者庁より通知されている。特にトウモロコシは品種数が多く、多くの検査法を必要とする。GM トウモロコシの検査は、(1)スクリーニング検査、(2)系統特異的定量法による検査、(3)粒単位検査の手順で行うことになっている。しかし、現行の(1)および(2)では新規に開発された数種類の GM 品種を検出することができず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。スクリーニングによる新開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことは、検査の精度を向上させるために必要不可欠である。そこで本研究では、新開発 GM 品種を検出できるシステムを導入し、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法を開発を行った。

### B. 研究方法

#### B-1. 試料

非組換え(non-GM)トウモロコシならびに GM トウモロコシ MON810、GA21、NK603、MON863、MON89034 および MON88017 の種子は MONSANT 社、Bt11、Event176、MIR162、MIR604 および 3272 の種子は Syngenta Seed 社、TC1507 および DAS59122 の種子は PIONEER 社から入手した。

#### B-2. DNA 抽出

トウモロコシ種子の粉砕には Mixer Mill MM200 (Retsch)を用いた。トウモロコシ粉末試料からの DNA 抽出精製は、シリカ膜タイプカラムの DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN)を用い、以下の手順で行った。粉末試料 1 g に 100 mg/mL RNase 10  $\mu$ L および Buffer AP1 5 mL を添加し、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した(15 分ごとに攪拌した)。次いで試料に Proteinase K (QIAGEN) 200  $\mu$ L を加え、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した(15 分ごとに攪拌した)。保温後、Buffer AP2 1.8 mL を添加し、よく攪拌した後、氷水中に 15 分間静置した。スイング式遠心分離器にて遠心分離し(2,300 $\times$ g、室温、15 分間)、上清を 4.2 mL 採取し、QIAshredder Maxi spin column に負荷した。

スイング式遠心分離器にかけ(2,300×g, 室温, 5 分間), 素通り液 3.4 mL を回収した。この溶液に Buffer AP3/E 5.1 mL を添加し, よく攪拌した後, DNeasy Maxi spin column に負荷した。スイング式遠心分離器にかけ(2,300×g, 室温, 5 分間), 素通り液を廃棄した。カラムに Buffer AW 12 mL を加え, スイング式遠心分離器にかけた(2,300×g, 室温, 15 分間)。カラムを新しいチューブに移し, あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え, 室温で 5 分間静置した。スイング式遠心分離器にかけ(2,300×g, 室温, 10 分間), 溶出液を回収した。等量のイソプロパノールを添加し, 上下にゆっくり 10 回転倒混和後, 室温で 5 分間静置した。遠心分離を行い(12,000×g, 4°C, 15 分間), 沈殿物を 70% (v/v) エタノール 500 μL でリンスし, 遠心分離した(12,000×g, 4°C, 3 分間)。上清を丁寧に廃棄し, 沈殿を風乾後, 蒸留水 100 μL に溶解させた。タッピングにて攪拌後, 4°C で一晩静置し, DNA 試料原液とした。

DNA 試料原液の 260 nm の吸光度の値 1 を 50 ng/μL として DNA 濃度を算出した。得られた DNA 濃度から, DNA 試料原液をリアルタイム定量 PCR 試験に必要な 20 ng/μL に滅菌蒸留水で希釈して DNA 試料液とし, 使用するまで -30°C で凍凍保存した。

### B-3. コントロールプラスミドの作製

スクリーニング試験に用いるリアルタイム PCR を評価するために, 内在性遺伝子 *starch synthase* IIb (*SSIIb*), 組換え遺伝子 cauliflower mosaic virus 35S promoter (*P35S*) および *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminator (*tNOS*) の部分配列を組み込んだコントロールプラスミドを作製した。PCR にて各部分配列を増幅し, pUC19 の *HincII* サイトに組み込んだ(pUC-*SSIIb*, pUC-*P35S* および pUC-*tNOS*) (図 1)。増幅した配列に PCR エラーが無いことを確認したのち, 各プラスミドを *NdeI* で処理し, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてアガロースゲルから抽出・精製した。さらに, エタノール沈殿を行い, 乾燥後の沈殿を Tris/ethylenediaminetetraacetic acid (TE) 溶液に溶解した。各プラスミドのコピー数は, 後述する singleplex リアルタイム PCR にて定量し, TE 溶液にて希釈試料を調製した。

### B-4. リアルタイム PCR

スクリーニング試験は *SSIIb*, *P35S* および *tNOS* を検出するプライマー・プローブを用い(表 1), multiplex リアルタイム PCR にて実施した。機種は ABI PRISM™ 7900HT (Life Technologie) およ

び LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を使用した。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, *SSIIb*3-5′/*SSIIb*3-3′ (各 0.08 μM), *P35S*1-5′/*P35S*1-3′ (各 0.25 μM), *NOS* ter 3-5′/*NOS* ter 2-3′ (各 0.3 μM), *SSIIb*-TaqV (0.08 μM), *P35S*-Taq (0.1 μM), *NOS*-Taq (0.12 μM) を混合し, DNA 試料液またはブランク試料液(蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応条件は以下の通りである。50°C で 2 分間保温した後, 95°C で 10 分間加温し, ホットスタート法で反応を開始した。その後, 95°C, 30 秒, 59°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして, 45 サイクルの増幅反応を行った。定量試験では, singleplex リアルタイム PCR を行った。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, 対象プライマー対溶液(各 0.5 μM), 対象プローブ溶液(0.2 μM, *SSIIb* に対しては *SSIIb*-Taq を使用した)を混合し, DNA 試料液, 標準プラスミド DNA 溶液 [GM トウモロコシプラスミドセット -ColE1/TE- ((株)ニッポンジーン); 20, 125, 1,500, 20,000, 250,000 copies/2.5 μL] またはブランク試料液(蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応条件は以下の通りである。50°C で 2 分間保温した後, 95°C で 10 分間加温し, ホットスタート法で反応を開始した。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った。PCR 反応は, 各 DNA 試料液あたり 3 ウェル併行して行い, 平均値を求めた。

### B-5. 測定結果の解析

ABI PRISM™ 7900HT においては, ベースラインは 3 サイクルから 15 サイクルで設定し,  $\Delta R_n$  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 として 0.2 に設定した。得られた *SSIIb* と *P35S* および *tNOS* の  $C_t$  値 (ABI PRISM™ 7900HT) あるいは  $C_q$  値 (LightCycler® 96) の差 ( $\Delta C_q$  値あるいは  $\Delta C_t$  値) で評価した。

### B-6. スクリーニング検査法の評価

定量性の評価は, コントロールプラスミド (pUC-*SSIIb*: 50~10,000 copies/μL, pUC-*P35S*, *tNOS*: 15~750 copies/μL\*, \*7,500 copies/μL pUC-*SSIIb* にて希釈) および各種 GM 品種から抽出した genomic DNA を non-GM 品種の genomic DNA で希釈した試料 (genomic DNA 希釈試料; 混入率 0.15~10%) を用いて行った。検出限界の算出は, コントロールプラスミド (pUC-*SSIIb*: 1.25~10

copies/ $\mu$ L, pUC-P35S, tNOS: 1.25~10 copies/ $\mu$ L\*, \*7,500 copies/ $\mu$ L pUC-SSIIb にて希釈) および genomic DNA 希釈試料 (混入率 0.025~0.15%) を用いて行った。pUC-SSIIb に対する評価は  $C_t$  値あるいは  $C_q$  値にて行い, その他は  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値にて行った。

## C. 研究結果

### C-1. tNOS プライマー・プローブの検討

新開発 GM 品種の検出のために, GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出する反応系を用いることにした。tNOS を検出するプライマー・プローブは既に開発されているが, 増幅鎖長が 151 bp と他のもの (SSIIb: 114 bp, P35S: 101 bp) に比べて長い。そこで増幅鎖長を揃えるために, 以前から使われている NOS ter 2-5' の代わりとして新たに NOS ter 3-5' (108 bp) を設計した (表 1)。両者を比較した結果, PCR 効率 ( $E$ ) に関して NOS ter 3-5' ( $E = 96.1\%$ ) を使用した場合のほうが, NOS ter 2-5' ( $E = 94.5\%$ ) を使用した場合に比べ高かった。そのため, 本研究では tNOS の検出には NOS ter 3-5' を使用することにした。

### C-2. プライマー・プローブ濃度の検討

我が国の標準定量法を参照し, 通常の singleplex リアルタイム PCR で使用するプライマー・プローブ濃度で ABI PRISM™ 7900HT にて multiplex リアルタイム PCR を行ったところ, P35S を 1 コピー有する MON810 では混入率 1%, tNOS を 1 コピー有する MIR162 では混入率 10% までしか検出できなかった (図 2)。そこで, プライマー・プローブ濃度を検討した結果, “B. 研究方法 / B-4. リアルタイム PCR” に記述した条件において両者とも混入率 0.1% においても検出可能であった (図 2)。以降のスクリーニング検査法では, この条件のプライマー・プローブ濃度にて行うことにした。

### C-3. スクリーニング検査法の評価

本研究のスクリーニング検査法では  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値にて GM 混入率 5% 以下であるかを判定する。そのため,  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値の定量性を評価する必要がある。コントロールプラスミドを用いた検討から, 両機種ともに  $C_t$  値あるいは  $C_q$  値において pUC-SSIIb では 50~10,000 copies/ $\mu$ L,  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値において pUC-P35S, tNOS では 15~750 copies/ $\mu$ L の範囲で高い直線性 ( $R^2 = 0.9921\sim 0.9992$ ) と PCR 効率 ( $E = 92.3\sim 100.3\%$ ) が得られた (表 2)。また, genomic DNA 希釈試料を用いた検討から, 両機種ともに  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値において 0.15~10% の範囲で高い直線性 ( $R^2 = 0.9912\sim 0.9998$ ) と PCR 効率 ( $E$

= 92.7~103.2%) が得られた (表 3)。一方, コントロールプラスミドを用いた検討から, 両機種ともに検出限界は  $C_t$  値あるいは  $C_q$  値において pUC-SSIIb では 2.5 copies/ $\mu$ L,  $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値に対し pUC-P35S, tNOS では 5 copies/ $\mu$ L であった (表 4)。また, genomic DNA 希釈試料を用いた検討から, 検出限界は ABI PRISM™ 7900HT では  $\Delta C_t$  値において 0.10~0.15%, LightCycler® 96 では  $\Delta C_q$  値においてすべて 0.10% であった (表 5)。

### C-4. $\Delta C_t$ 閾値および $\Delta C_q$ 閾値の決定

本スクリーニング検査法にて GM 混入率 5% 以下であるかを判定するために,  $\Delta C_t$  閾値および  $\Delta C_q$  閾値を決定する必要がある。本研究では主要 GM 系統において混入率 5% の genomic DNA 希釈試料を調製し, これらの  $\Delta C_t$  および  $\Delta C_q$  から閾値の決定を行った。その結果, ABI PRISM™ 7900HT では  $\Delta C_t$  閾値 = 4.7, LightCycler® 96 では  $\Delta C_q$  閾値 = 6.0 と決定した (図 3)。

## D. 考察

安全性承認済み GM トウモロコシにおいて, 現行のスクリーニング検査法および系統特異的定量法による検査法には二つの問題点がある。問題点の一つとして, 新規に開発された数種類の GM 品種を検出できないため, それらの品種を見逃してしまうことがあげられる。特に系統特異的定量法による検査法においては, 現在主流になっている GM 品種の多くを検出できないため, 定量検査法としては致命的である。二つ目の問題点としては, GM 混入率を定量するために検量線の作成ならびに複数の検出対象に対するリアルタイム PCR が必要であるため, 実験操作に大きな労力を要することがあげられる。これらの問題点を解決するために, 本スクリーニング検査法では, GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出対象とし, multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子 SSIIb と組換え遺伝子 P35S および tNOS の  $C_t$  値あるいは  $C_q$  値の差 ( $\Delta C_t$  値あるいは  $\Delta C_q$  値) で GM 混入率 5% 以下であるかを判定することにした。プライマー・プローブ濃度について我が国の標準定量法を参照し, multiplex リアルタイム PCR を行ったところ, 検出感度が著しく低かった。これは, GM 混入率が低い試料においては P35S や tNOS に比べ SSIIb が大量に存在するため, DNA polymerase が後者の増幅反応に占有されてしまったためであると考えられる。そこで, SSIIb を検出するプライマー・プローブ濃度を低く設定することで, 高感度な検出系を構築することができた。

$\Delta C_t$  値あるいは $\Delta C_q$  値で評価する際、それぞれの検出対象の PCR 効率に大きな差がある場合には定量性が得られない。P35S および tNOS に対する $\Delta C_t$  値あるいは $\Delta C_q$  値を GM 混入率 5%前後の範囲で評価した結果、高い直線性と PCR 効率を得られたことから、本スクリーニング検査法で算出される $\Delta C_t$  値あるいは $\Delta C_q$  値は十分な定量性を有することが示された。また、コントロールプラスミドを用いた場合の検出限界は 2.5~5 copies/ $\mu$ L、genomic DNA を用いた場合の検出限界は 0.10~0.15%であったことから、本スクリーニング検査法は十分な検出感度を有することが示された。

GM 混入率 5%以下であるかを判定するための $\Delta C_t$  閾値および $\Delta C_q$  閾値は、混入率 5%の主要 GM 系統の genomic DNA 希釈試料を用いて、ABI PRISM™ 7900HT では 4.7 LightCycler® 96 では 6.0 と決定した。今後は、これらの値が妥当であるかを擬似試料を用いて検証する必要がある。

## E. 結論

本研究では、新規開発 GM 品種を検出でき、multiplex リアルタイム PCR を用いることで GM 混入率 5%以下であるかを簡便に判定する新規スクリーニング検査法を開発した。コントロールプラスミドあるいは genomic DNA 希釈試料を用いた実験から、本スクリーニング検査法は GM 混入率 5%前後で十分な定量性を有し、また十分な検出感度を有することが示された。本スクリーニング検査法は、新規開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験の労力を減らすことで、スクリーニング検査の精度を向上させることができると期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. and Mogami, T. (2013) Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus Strains in Thailand. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1-5
- (2) Nakamura, K., Akiyama, H., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A.,

Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety* **20**, 161-169

- (3) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) 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
- (4) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *J. AOAC Int.* **96**, 1054-1058.
- (5) Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., and Kitta, K. (2013) Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hyg. Saf. Sci.* **54**, 309-315.

### 2. 学会発表

- (1) 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 最上知子, 手島玲子, 長澤栄史, 近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (2) 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ, 小林友子, 福田のぞみ, 手島玲子, 最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月

- (3) 中村公亮, 小林友子, 真野潤一, 野口秋雄, 橋田和美, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (4) 真野潤一, 西辻泰之, 菊池洋介, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子, 高畠令王奈, 橋田和美: リアルタイムPCRを用いた食品加工度評価手法の開発, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (5) 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 大森清美, 高畠令王奈, 橋田和美, 穂山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (6) 野口秋雄, 坂田こずえ, 真野潤一, 中村公亮, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 橋田和美, 穂山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (7) Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J.: Novel Monitoring Scheme for Authorized GM Maize, GMCC-13, Lisbon, 2013.11
- (8) 近藤一成, 坂田こずえ, 赤星千絵, 黒飛希美, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメ場合), 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (9) 中村公亮, 近藤一成, 小林友子, 野口秋雄, 坂田こずえ, 大森清美, 笠原正輝, 高畠令王奈, 橋田和美, 手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知法の試験室間共同試験による妥当性確認, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (10) 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, 橋田和美, 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 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (11) 中村公亮, 穂山浩, 小林友子, 野口秋雄, 高畠令王奈, 橋田和美, 橋本博之, 川上浩, 近藤一成, 手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するためのPCRプライマー設計について, 日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会, 名古屋, 2013 年 8 月
- (12) 中村公亮, 穂山浩, 河野徳昭, 小林友子, 吉松嘉代, 真野潤一, 橋田和美, 大森清美, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定, 日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会, 名古屋, 2013 年 8 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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'	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCT	
	P35S-Taq	FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCT-TAMRA	
tNOS	NOS ter 2-5'	GTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTG	151
	NOS ter 3-5'	GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC	108
	NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT	
	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 <sup>2</sup>	E (%)
<i>ABI PRISM™ 7900HT</i>		
pUC-SSIIb <sup>a</sup>	0.9946	97.6
pUC-P35S <sup>b</sup>	0.9921	96.3
pUC-tNOS <sup>b</sup>	0.9933	100.3
<i>LightCycler® 96</i>		
pUC-SSIIb <sup>c</sup>	0.9977	95.0
pUC-P35S <sup>d</sup>	0.9991	92.3
pUC-tNOS <sup>d</sup>	0.9992	95.5

<sup>a</sup> Ct, <sup>b</sup> ΔCt, <sup>c</sup> Cq, <sup>d</sup> 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 <sup>2</sup>	E (%)
<i>ABI PRISM™ 7900HT</i>		
MON810 <sup>a</sup>	0.9912	98.2
TC1507 <sup>a</sup>	0.9920	100.5
DAS59122 <sup>a</sup>	0.9981	100.5
MIR162 <sup>a</sup>	0.9995	99.8
3272 <sup>a</sup>	0.9976	95.0
<i>LightCycler® 96</i>		
MON810 <sup>b</sup>	0.9985	100.2
TC1507 <sup>b</sup>	0.9997	92.7
DAS59122 <sup>b</sup>	0.9945	99.6
MIR162 <sup>b</sup>	0.9981	103.2
<sup>a</sup> 3272 <sup>b</sup>	0.9998	102.9

ΔCt, <sup>b</sup> ΔCq 値に対する評価 .

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			
	copy number	1.25	2.5	5	10	1.25	2.5	5	10	1.25	2.5	5
<i>ABI PRISM™ 7900HT</i>												
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® 96</i>												
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							
	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	17/21	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

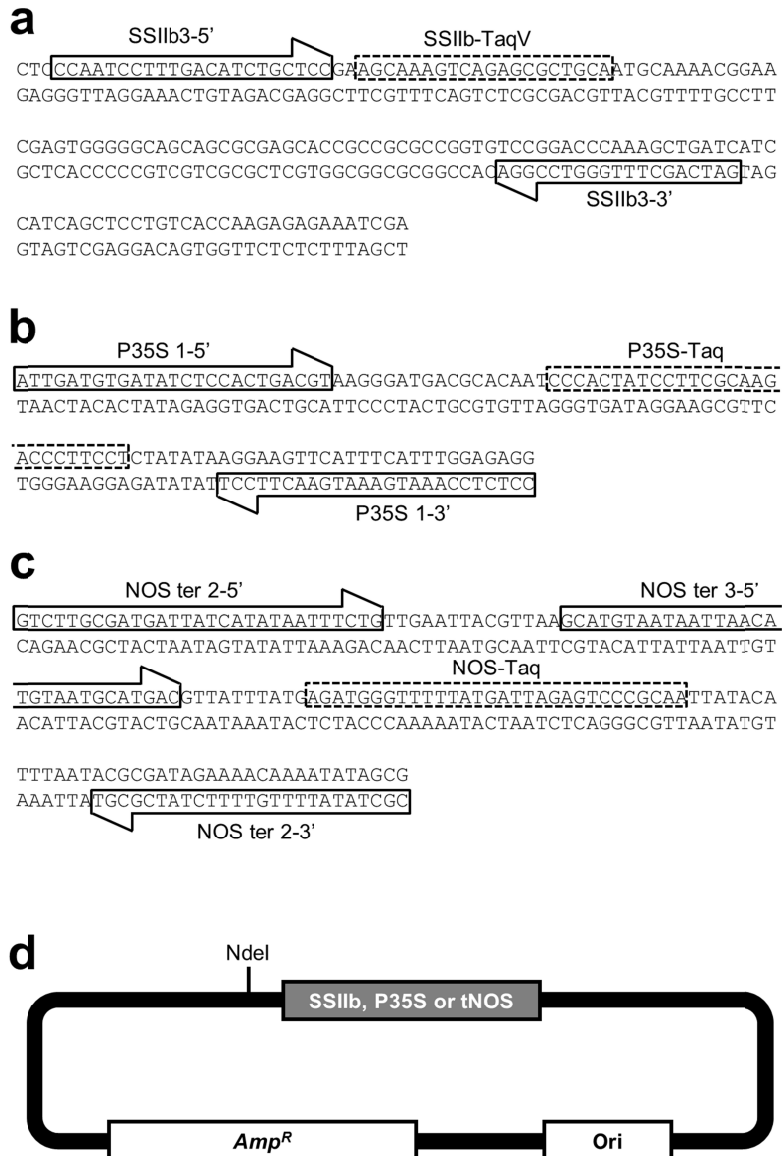


図1 コントロールプラスミドのインサート配列および模式図

(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 .



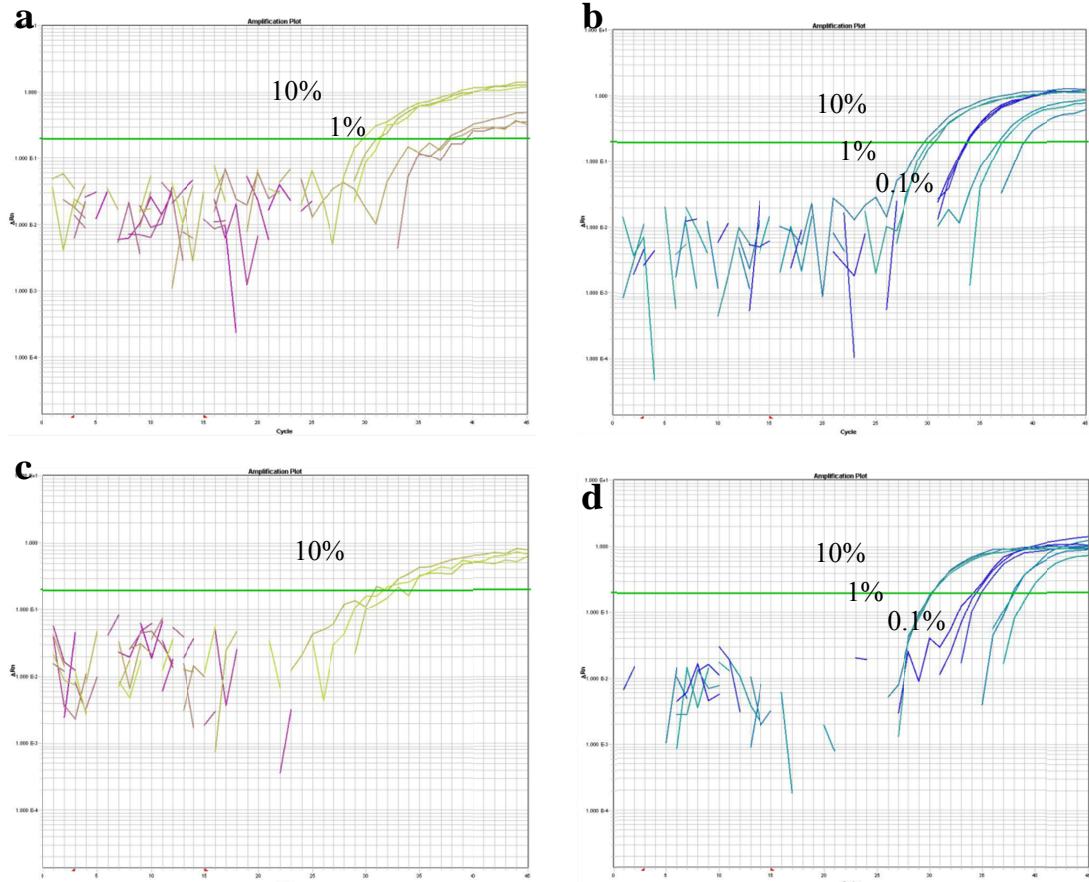


図2 multiplex リアルタイム PCR 増幅曲線

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 .

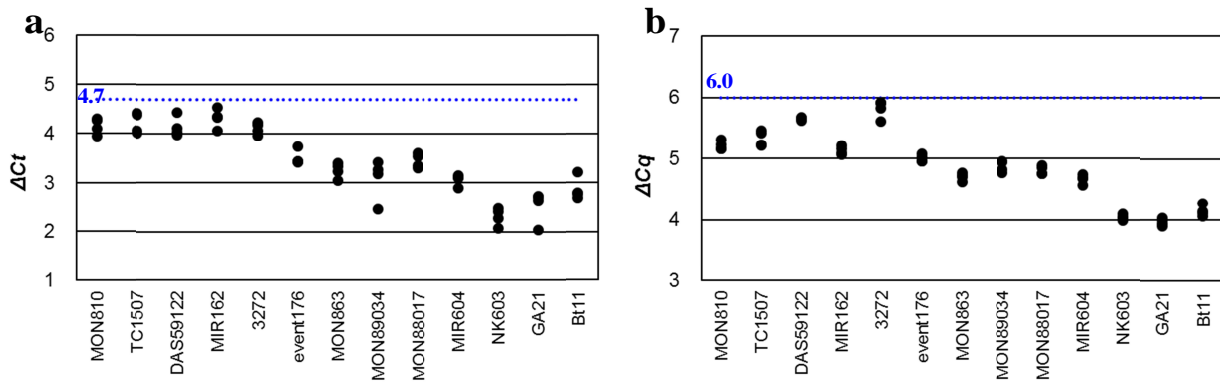


図3 GM 混入率 5% の genomic DNA 希釈試料の  $\Delta Ct$  および  $\Delta Cq$  値

(a) ABI PRISM™ 7900HT では  $\Delta Ct$  閾値 = 4.7 , (b) LightCycler® 96 では  $\Delta Cq$  閾値 = 6.0 と決定した .

