

行政院所屬各機關因公出國人員出國報告書

(出國類別：考察)

赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)及日本農  
林水產省獨立行政法人食品總合研究所(NFRI)考察  
基因改造食品之檢驗

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局

出國人職稱：薦任技士

姓名：吳宗熹<sup>1</sup>、林澤揚<sup>1</sup>、林旭陽<sup>2</sup>

出國地點：日本

出國期間：1:九十一年七月七日至八月三日

2:九十一年七月二十八日至八月二十四日

報告日期：九十一年十一月八日

I0-C09102707

系統識別號 C09102707

## 公務出國報告提要

頁數 95 含附件 是

## 報告名稱

基因改造食品之調查與研究

## 主辦機關

行政院衛生署藥物食品檢驗局

## 聯絡人/電話

陳婉麗/02-26531300

## 出國人員

吳宗喜	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	技士
林澤揚	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	技士
林旭陽	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	技士

## 出國類別

考察

## 出國地區

日本

## 出國期間

民國 91 年 07 月 07 日 - 民國 91 年 08 月 24 日

## 報告日期

民國 91 年 11 月 08 日

## 分類號/目

I0/綜合(科學類) I0/綜合(科學類)

## 關鍵詞

基因改造食品, 定量PCR

內容摘要: 基因改造食品之管理與檢驗為現今全球所關切之食品衛生安全議題之一，歐洲、澳洲及日本、韓國等亞洲國家亦陸續制訂與相關法規或準則，並且開始對基因改造食品實施控管與監測。我國主管基因改造食品之機構為衛生署，由食品衛生處職司行政管理，藥物食品檢驗局負責檢驗方法開發與檢驗工作，食品衛生處並已於90年2月22日公告基因改造之黃豆及玉米的查驗登記與標示等相關規定，將於明(92)年1月1日起開始實施第一階段農產品形態基因改造黃豆及玉米之標示制度。有鑑於此，藥物食品檢驗局特別派員赴日本「厚生勞動省-國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science)」及日本「農林水產省-獨立行政法人食品總和研究所」考察研習相關檢驗技術。主要研習重點為基因改造食品之定性與定量檢測，同時蒐集有關檢驗方法及相關資訊，並建立藥檢局與日本政府實驗室之交流。此次考察研習後除習得基因改造作物檢驗技術外，並藉由實際至超級市場考察得以瞭解目前日本市售加工食品包裝標示情形，透過參與日本民間與政府合辦之公眾研討會，觀摩日本政府如何推廣基因改造食品之宣教工作，加強民眾對基因改造新技術之瞭解，消弭社會大眾對基因改造食品之錯誤認知，日方所累積的經驗及相關資訊對我國在推行基因改造食品標示制度及研擬相關管理政策時，無疑是最佳的參考學習教材。此次赴日考察，不但建立與日本政府實驗室之交流管道，日後期望透過繼續加強實驗合作的模式，使雙方在基因改造食品檢驗之領域得以達到相互支援共同成長之目標，並使我國在此領域順利與世界接軌。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

# 赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)及日本農林水產省獨立行政法人食品總和研究所(NFRI)考察基因改造食品之檢驗

## 摘 要

基因改造食品之管理與檢驗為現今全球所關切之食品衛生安全議題之一，歐洲、澳洲及日本、韓國等亞洲國家亦陸續制訂與相關法規或準則，並且開始對基因改造食品實施控管與監測。我國主管基因改造食品之機構為衛生署，由食品衛生處職司行政管理，藥物食品檢驗局負責檢驗方法開發與檢驗工作，食品衛生處並已於90年2月22日公告基因改造之黃豆及玉米的查驗登記與標示等相關規定，將於明(92)年1月1日起開始實施第一階段農產品形態基因改造黃豆及玉米之標示制度。有鑑於此，藥物食品檢驗局特別派員赴日本「厚生勞動省-國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science)」及日本「農林水產省-獨立行政法人食品總和研究所」考察研習相關檢驗技術。主要研習重點為基因改造食品之定性與定量檢測，同時蒐集有關檢驗方法及相關資訊，並建立藥檢局與日本政府實驗室之交流。此次考察研習後除習得基因改造作物檢驗技術外，並藉由實際至超級市場考察得以瞭解目前日本市售加工食品包裝標示情形，透過參與日本民間與政府合辦之公眾研討會，觀摩日本政府如何推廣基因改造食品之宣教工作，加強民眾對基因改造新技術之瞭解，消彌社會大眾對基因改造食品之錯誤認知，日方所累積的經驗及相關資訊對我國在推行基因改造食品標示制度及研擬相關管理政策時，無疑是最佳的參考學習教材。此次赴日考察，不但建立與日本政府實驗室之交流管道，日後期望透過繼續加強實驗合作的模式，使雙方在基因改造食品檢驗之領域得以達到相互支援共同成長之目標，並使我國在此領域順利與世界接軌。

<b>Part I :</b> .....	<b>3</b>
摘    要.....	4
壹、目的.....	6
貳、過程.....	6
參、心得.....	12
肆、建議.....	16
伍、附件.....	19
<b>Part II :</b> .....	<b>20</b>
摘    要.....	21
壹、目的.....	23
貳、過程.....	24
參、心得與建議.....	43
肆、附件.....	49
<b>Part III :</b> .....	<b>50</b>
摘    要.....	51
壹、目的.....	54
貳、過程.....	54
參、感想與建議.....	91
肆、附件.....	95



# Part I

赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)

考察研習基因改造食品之檢驗

服務機關：衛生署藥物食品檢驗局

姓名：吳宗熹

職稱：薦任技士

出國地點：日本

出國期間：九十一年七月七日至八月三日

# 赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)

## 考察研習基因改造食品之檢驗

### 摘 要

基因改造食品之管理與檢驗為現今全球所關切之食品衛生安全議題之一，歐洲、澳洲及日本、韓國等亞洲國家亦陸續制訂與相關法規或準則，並且開始對基因改造食品實施控管與監測。我國主管基因改造食品之機構為衛生署，由食品衛生處職司行政管理，藥物食品檢驗局負責檢驗方法開發與檢驗工作。為有效管理基因改造食品以及維護國民「知」與「選擇」的權利，確保國民飲食安全與健康，我國將於陸續對特定基改食品實施標示政策，九十二年一月起將針對基因改造大豆與玉米實施標。有鑑於此，藥物食品檢驗局特別派員赴日本國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science) 研習相關檢驗技術。主要研習重點為基因改造食品之定性與定量檢測，同時蒐集有關檢驗方法及相關資訊，並建立藥檢局與日本政府實驗室之交流。經四星期之研習歷程，順利習得基因改造食品之定性與定量檢測技術，同時蒐集有關檢驗方法及資訊，並攜回相關參考物質。除此，藉由此次研習，亦建立與日本政府職司基因改造食品檢驗研究實驗室間之交流。

目次：壹、目的.....	6
貳、過程.....	6
參、心得.....	12
肆、建議.....	16
伍、附件.....	19

## 壹、目的

基因改造食品之管理與檢驗為現今全球所關切之食品衛生安全議題之一，歐洲、澳洲及日本、韓國等亞洲國家亦陸續制訂與相關法規或準則，並且開始對基因改造食品實施控管與監測。我國主管基因改造食品之機構為衛生署，由食品衛生處職司行政管理，藥物食品檢驗局負責檢驗方法開發與檢驗工作。為有效管理基因改造食品以及維護國民「知」與「選擇」的權利，確保國民飲食安全與健康，我國將於陸續對特定基改食品實施標示政策，九十二年一月起將針對基因改造大豆與玉米實施標。有鑑於此，藥物食品檢驗局特別派員赴日本國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science) 研習相關檢驗技術。主要研習重點為基因改造食品之定性與定量檢測，同時蒐集有關檢驗方法及相關資訊，並建立藥檢局與日本政府實驗室之交流。

## 貳、過程

此次赴日研習行程共計 28 日，扣除去返日與假日，實際研習天數為 20 天。研習的機關為日本厚生省國立醫藥品食品衛生研究所，地點位於東京世田谷區。研習內容包括基因改造大豆 (Roundup Ready) 定量試驗、基因改造玉米 (MON 810、MON 863、T25、GA21、Event 176、Bt11) 定量試驗、各種作物與產品之 DNA 抽取方法 (玉米、大豆、小麥、蕎麥、稻米、花生、馬鈴薯及加工馬鈴薯)、日本政府基因改造食品檢驗研究之權責歸屬與分工情形、基因改造食品檢驗研究之策略與流程以及日本其他相關訊息等。研習行程內容整理如下述：

### 七月七日（日）：啟程

上午九點搭乘長榮航空班機啟程赴日，中午一點抵達日本成田機場。下午三點半抵達東京，由 NIHS 食品部第三室室長穗下榻 TOKYU STAY YOGA 旅館。

### 七月八日（一）：

考察首日。拜會 NIHS 食品部部長、主任研究官、第一室室長、第二室室長以及食品部第三室人員。食品部第三室的成員有有九位，正式的國家公務員有室長龜山浩博士、主任研究官宮原誠博士、厚生勞動技官渡邊敬浩博士，另有研究助理和久井千世子修士、研究助理張替直輝修士、研究助理坂

企業派駐人員佐藤修士。其中負責 GMO 檢驗研究業務的是龜山浩博士、渡邊敬浩博士與和久井千世子小姐。

### 七月九日（二）：

了解食品部第三室職責任務以及討論駐留期間考察研習計劃與內容。食品部第三室任務範圍為食品中天然毒素之檢驗研究，目前該室進行的工作項目包含【1】基因改造食品之檢驗研究、【2】食品中過敏原之檢驗研究和【3】放射線照射食品之研究等。其中負責基因改造食品檢驗研究的人員為室長穗

久井千世子小姐。

而目前該室從事之基因改造食品檢驗研究包含【1】各新品系 GM 玉米之定量方法（DOW 1507、MON 863、NK 603 等）之開發與建立、【2】各品系 GM 玉米（Bt 11、Event 176、GA 21、MON 810、T25、）與 Round up Ready GM 大豆之定量方法（ABI 7700 與 ROCHE LightCycler）確認---實驗室聯合研究、【3】其他機型定量方法開發（ABI 7000 與 ABI 7900）與實驗室聯合研究、【4】NEW LEAF、NEW LEAF Plus GM potato 定量方法之開發與建立、

【5】市售加工馬鈴薯食品中 NEW LEAF Y GM potato 之檢測，與【6】其他新 GM 作物之檢驗研究（GM wheat 等）。

七月十日（三）：

1. 利用 Roche LightCycler 機器進行 New version GM Soybean 定量 PCR（附件一）
2. 利用 Roche LightCycler 機器進行 New version GM maize 定量 PCR（附件二）
3. 研讀馬鈴薯 DNA 萃取方法流程（附件三）

七月十一日（四）：

1. 八種日本本土品系馬鈴薯 DNA 萃取（附件四）
2. 研讀「Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques」（附件五）。此為日本官方之基因改造食品檢驗方法該檢驗方法目前已公佈於厚生勞動省網站。厚生勞動省網站公佈之日文版檢驗方法為更新之第二版，英文版仍為第一版，更新之英文第二版尚未完成編寫。網址為 [www.mhlw.go.jp/english/topics/food/sec05-1a.html](http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food/sec05-1a.html) 。

七月十二日（五）：

1. 馬鈴薯 DNA 萃取：
  - a. Non GM potato (DANSHSKU) 、 b. 0.1% NewLeaf Y 、 c. 1% NewLeaf Y 、 d. 0.1% NewLeaf plus 以及 e. 1% NewLeaf plus 五個樣品（附件六）。

七月十三~十四日（六、日）： 假日

七月十五日 (一):

1. 重複七月十二日馬鈴薯 DNA 抽取 (附件六)。
2. 儀器參觀與操作見習---德國 Retch MM200 磨粉機 (附件七)。
3. 了解日本基因改造馬鈴薯檢驗相關事宜 (附件八)。

七月十六日 (二):

New leaf Y and New leaf plus GM potato 定性之 detection PCR (附件九)。

七月十七日 (三):

New leaf Y and New leaf plus GM potato 定性之 confirmation PCR (附件九)。

七月十八日 (四):

1. 研讀並整理「Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques」  
(附件五)。
2. 整理馬鈴薯 DNA 萃取之 protocol (附件三)。

七月十九日 (五):

利用 QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 抽取穀類之 DNA (附件十)，包括：

1. Barley 大麥
2. Rice 稻米
3. Buckwheat 蕎麥
4. Bt11Corn 玉米
5. T25 Corn 玉米
6. MON 810 Corn 玉米
7. Event 176 Corn 玉米
8. Round up Ready Soybean 大豆

結果如附件十一。

七月二十~二十一日（六、日）： 假日

七月二十二日（一）：

1. 利用 ABI 7000 進行 MON 810 玉米的 blinder test（附件十二）。
2. 整理 QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 之 DNA 萃取標準流程（附件十）。

七月二十三日（二）：

1. 儀器參觀與操作見習---德國 Retch ZM100 磨粉機（附件十三）。
2. 認識食品中過敏原之檢驗研究現況與日本政府之政策(附件十四)。
3. 以 ABI 7000 進行 MON 810 玉米的 blinder test 結果分析（附件十二）。

七月二十四日(三)：

1. 見習利用德國 Retch GM100 磨粉機進行花生磨粉和以丙酮萃取去油脂（附件十五）。
2. 整理食品中過敏原之檢驗研究現況與日本政府之政策(附件十四)。

七月二十五日(四)：

1. 食品部第三室 GMO 研究成員至筑波獨立法人食品總合研究所（NFRI）參加實驗室聯合評估執行會議。藥檢局亦參加此次聯合評估，現正進行中（附件十六）。
2. 整理 QIAGEN Genomic Tips Kit 之 DNA 萃取標準流程（附件十七）。
3. 研讀 ABI 7000 機器之實驗室聯合評估方法與說明。



**七月二十六日(五)：**

1. 本日為國立醫藥品食品研究所開放民眾參觀日。
2. 利用 QIAGEN Genomic Tips Kit 萃取加工馬鈴薯之 DNA(附件十八)。

**七月二十七~二十八日(六~日)：** 假日

**七月二十九日(一)：**

1. 食品部第三室 GMO 研究成員至筑波獨立法人食品總合研究所 (NFRI) 參加實驗室聯合評估執行會議。
2. 隨同食品部第三室人員至筑波獨立法人食品總合研究所 (NFRI) 參訪，並與本局派赴食品總合研究所考察研習人員林澤揚技士及林旭陽技士會面。

**七月三十日(二)：**

1. 加工馬鈴薯定性試驗--- detection PCR (附件十八)。
2. 見習以 ABI 7900 機器進行定量 PCR。

**七月三十一日(三)：**

1. 見習以 ABI 7700 機器進行定量 PCR。
2. 與日方人員討論基因改造食品檢驗研究相關議題。

**八月一日(四)：**

1. 與日方人員討論基因改造食品檢驗研究相關議題。
2. 整理考察研習期間所獲得之書面資料。
3. 整理包裝向日方索取之相關樣品。

八月二日(五)： 研習考察最終日

1. 清理考察研習期間所使用或操作之儀器、器材等。
2. 向日方人員告別辭行。

八月三日： 歸國

整理行李。於下午 2 點半離開下榻旅館。自行搭車至成田機場，搭乘晚上 8 點 05 分長榮班機歸國，於晚間十一點抵達中正機場。

## 參、心得

### 一、政府可向廠商取得完整之資訊與標準品

日本政府可以要求進口商或生產商交送關於基因改造作物完整詳細之資料與標準品，政府於取得廠商檢附之資料與標準品後，列為極度機密文件物件，送交研究單位進行安全性評估與檢驗方法研擬研究。在日研習期間，嘗就基因改造馬鈴薯檢驗方法開發之科學性疑慮，請教日方人員。當時為求解說便利，日方人員取出一本 A4 紙張格式、約莫五十頁之訂冊資料，翻閱其內圖示並解答吾人疑問。該份關於孟山都公司基因改造馬鈴薯之資料，相當完整詳細，包含基因改造馬鈴薯各外來轉殖基因片段之完整序列、轉殖片段之結構以及進行轉殖之質體等。該份資料列屬極度機密，每一頁皆浮印有「極度機密」與「攜出禁止」字樣，我亦僅被允許短暫視閱，無法影印其內任何部分。經我詢問日方人員該資料如何獲取？僅得「此由日本政府交予，至如何取得則無所悉」之保留性回答。至於標準品方面，日方人員亦曾出示準備磨粉萃取 DNA 之新品系基因改造玉米 (MON 863 與 TC 1507) 數顆，雖其量少，然全為廠商交付之完整穀粒。詢之取得管道

與方式，則回覆與前揭同，亦為保留性答覆。

## 二、日本基因改造食品之檢驗政策與檢驗方法研發、擬定之任務歸屬

日本目前無量產販售之本土基因改造農產作物，根據日方人員說辭，日本政府目前並無核准本土性基因改造農產品之計劃。是故，日本現行基因改造食品之檢驗與檢驗方法研發擬定係針對進口之基因改造食品。如附件十九圖示，所有輸入之基因改造食品，均需先經安全性評估，未經安全性評估或經評估不合格者，禁止使用於食品，並需開發定性之檢驗方法。定性之檢驗方法必須包含偵測與確認兩種。經安全性評估評為合格者，可作為食品使用，惟必須符合含量限制，因此需開發定量之檢驗方法。定性與定量之方法開發研擬，在厚生勞動省國立醫藥品食品衛生研究所，即為食品部第三室之職責，在農林水產省則屬獨立法人食品總合研究所味覺機能分析研究室之任務。國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室為檢驗研究單位，專注執行檢驗研究、方法研擬與方法測試等，毋須與基因改造食品進口商或生產商直接接觸。所有檢驗研究之必要資訊與樣品均由日本政府（行政機關）向廠商交涉取得，另該室亦不負責一般查驗或相關之檢驗工作，僅對未核准之基因改造食品負檢測之責。

## 三、國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室之基因改造食品檢驗現況

(1) 人員：目前食品部第三室從事基因改造食品檢驗研究者僅三人，其中兩人具國家公務員身分（室長龜山浩博士與厚生勞動技官渡邊敬浩博士），另一人為研究助理。若僅由人力上評析，負責基因改造食品之檢驗研究與方法開發確實不足，然該室與獨立法人食品總合研究所之味覺機能分析研究室（室長日野明寬博士）分工合作，互相支援，共同擔負日本基因

改造食品之檢驗研究與方法建立。食品總合研究所內從事基因改造食品檢驗研究之人員眾多，半數為民間企業派駐人員，人力充足。國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室亦有企業派員不定期前往執行相關檢驗研究工作。

(2) 環境：國立醫藥品食品衛生研究所原為二次大戰時日本陸軍所有之房屋營舍，建築物老舊，實驗室空間狹窄。但實驗所需儀器設備樣樣俱全。食品部第三室負責基因改造食品檢驗研究，即設置有 ABI 5700、ABI 7700、ABI 7900、ABI 7000 與 Roche Light Cycler 定量 PCR 機器各乙部、ABI 3700 PCR 機器數部、基因改造食品檢驗研究電泳之專用抽氣櫃、紫外光顯影照相系統、定量檢驗專用操作台與隔離櫃、MM 200、GM 200 與 ZM 100 等各型大小磨粉機、桌上型離心機數台，真空抽乾機等等。此外，食品部設有一公用儀器室，擺設冷凍櫃、冷藏櫃、各型高速離心機、冷凍乾燥機以及各型大小培養箱等等，供部內各實驗室共同使用。

(3) 工作狀況：國立醫藥品食品衛生研究所為一研究單位，非屬行政機關，原則上所內各研究人員為上下班制，因工作性質不同，故其作息亦異於行政單位朝九晚五之型態。該所研究人員多於上午九點後十點前上班，午間用餐時間視工作進度自行安排，通常為中午十二時半以後至下午兩點。並由於研究工作性質必要，人員下班離開實驗室時間多在晚間九點以後。研究工作人員無需職司行政方面事宜，完全專注於研究工作，故食品部第三室人員從事基因改造檢驗研究時，對於實驗上各細節均能逐一測試驗證，尋求最佳最精確之方法與結果。以設計、開發定量之檢驗方法為例，首先依照廠商所提供以及自行蒐集所得資訊，針對特定之轉殖基因序列，利用電腦軟體尋找出所有可能之引子與探針組合 (primers and probe sets)，初步篩選剔除不適合之組合，剩餘之組合即進行測試。比較結果找出效果

較佳者後，再針對 PCR 之各項條件，諸如 annealing 溫度、annealing 時間、反應 cycle 數、鎂離子濃度等等，一次修改一個項目，逐項測試，至找出最佳之反應條件為止。整各研究過程可謂相當嚴密精實，當然所需之實驗時間亦多，然由於第三室基因改造食品檢驗研究所專用之儀器數量多且完備，進行實驗不會因某部機器已有人使用而阻礙另一人進行實驗，而且每人一天亦能執行一項以上實驗，實驗效率極高。此外，該室進行基因改造食品檢驗研究有一特色值得吾人師法，即資訊交流迅速。當日之實驗結果於下班離開實驗室前就整理紀錄完畢，並即以電子郵件傳送至食品總合研究所，食品總合研究所之實驗結果亦然，如此第二天上班，於工作之初即可先行了解對方之實驗結果，以了解最新之訊息和驗證比較雙方之實驗數據，並可據以設計下一步應進行或是修正進行中或準備進行之實驗。如此可以避免單方面進行無謂的試驗實驗，節省成本並縮短取得精確實驗結論之時間。

(4) 基因改造食品檢驗方法研擬之策略：除如前揭實驗設計與進行實驗之方式外，試驗所得最佳結果之檢驗條件尚需進行盲樣測試，已確認該方法之再現性外，必須再進行大規模之實驗室聯合評估，以驗證該檢驗方法。亦即相同的檢體、以按相同的檢驗方法、材料與儀器，於不同的實驗室由不同人操作，亦能獲得一致的檢驗結果。過去日方已經進行過一次基因改造食品檢驗之實驗室聯合評估。現在日本正準備執行另一次實驗室聯合評估，此乃針對改良之檢驗方法而為。本次實驗室聯合評估參與實驗室共計四十六間，包括日本、韓國各公立實驗室，我國則僅藥物食品檢驗局參加該計劃。本次實驗室聯合評估標的機型包含 ABI 7700、ABI 7000 與 Roche LightCycler 三種，食品總合研究所負責執行 ABI 7700 與 ABI 7000 部分，國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室則負責執行 Roche LightCycler 部分，整個聯合評估之統合亦由國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室負

責，整個計劃預定將於今年十一月完成。

#### 四、日本之食品中過敏原檢驗研究與標示現況

國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室現亦負責食品中過敏原之檢驗研究與方法建立。由於近年來，日本人民因食物引發之過敏症日益頻繁，嚴重影響日本人民身體健康與生活品質，因此，日本政府根據臨床統計資料，定出五種主要引起過敏之食物與十九種次要引起過敏之食物，再依研究結果定出各種引起過敏症食物之過敏原，並據此研擬食品中限量及檢驗方法。目前已完成五種主要過敏原之檢驗方法擬定，方法包括 ELISA、PCR 與 Western blotting 三種，日本政府現正在審議階段，據悉明年日本將會實施食品中五種主要過敏原之標示。此外，十九種次要過敏原之檢驗研究仍持續進行。食品中過敏原之檢驗研究非本次考察研習之主題，惟於食品第三室考察研習期間，亦能稍有接觸了解該項議題。過敏症亦為本國人民健康之大礙，為維護國人健康，政府應主動著手防護國民接觸過敏原。食品中過敏原多已確知，而現今科技之發達，檢驗食品中過敏原之技術亦非艱難，故將過敏原之檢驗偵測與標示制度付諸實施，於維護國民健康，增進國民生活品質上，良有實益。

### 肆、建 議

#### 一、完整充分之基因改造食品相關資訊之取得，以及其法律基礎

日本政府運用公權力，由行政機關向進口商或生產商交涉取得基因改造作物完整詳細之資訊與適量標準樣品，供安全性評估單位與檢驗研究單

位進行研究實驗。此對於順利進行研究與建立檢驗方法，助益頗大。我國在研擬檢驗方法或執行檢驗工作前，由行政機關要求廠商檢送完整詳細之資訊與適量標準樣品，實有必要。

為實現管制、監督基因改造食品，確保國人健康，並且滿足國人自由選擇之權利之目的，獲取詳實之基因改造食品相關資訊，並藉以開發建立可靠有效之檢驗方法，為政府執行適當、必需之公行政作所必要，乃屬政府當然之職權。因此，如何在基於依法行政之原則下，適用現行法源基礎與法律規範，循之擬制法規命令，要求廠商於查驗登記之際，併交付完整之基因改造食品資訊與適量之標準檢體，以利檢驗工作順利完成，檢驗結果確實無謬？抑或在符合法律保留原則前提下，尋求一法律授權依據，使國家檢驗研究機關及其人員在開發檢驗方法與執行檢驗研究，應用未取得擁有所有權或智慧財產權廠商授權，而自行循管道取得之材料與資訊時，不至遭廠商訴以侵權並請求損害賠償，確保國家執行檢驗研究之適法性以及工作之順利進行？

現代先進科技所發展之產品，多屬個人或少數特定人之智慧結晶。在私法自治原則下，本於個人主義，人亦有權擁有所謂之智慧財產權。擁有智慧財產權者得排除他人（包括政府以公權力）對其權利之侵害，亦得請求所生損害之賠償。然而，為確保國民健康，並且於民主政體下，國家機關必須針對所謂新開發之科技產品，諸如基因改造食品等等，進行事前的檢驗與事後的監測。一方面確保新產品對人類健康無虞，另一方面檢視廠商之標示確實，以供國民得依其所好自由選用。因此，私人捍衛其智慧財產權權益與政府行使檢驗之公權力的法律角力，可能是將來一個爭議頗大的議題。基於此理由，應及早針對此議題，商請法律學者與法律實務專家，進行法規、判例與學說研整。

## 二、檢驗研究人員工作專精化，與實驗室設備充足化

精確之檢驗方法建立，研究人員需投注相當精力。日本國立藥品食品衛生研究所食品部第三室專職檢驗研究與方法建立，雖其從事基因改造食品檢驗研究之人員僅三人，其實驗效率與研究成果卓然。本局檢驗研究人員業務除包括一般查驗登記、市場調查及研究、方法開發建立等工作外，亦需負責各項儀器採購案等事務。此乃本局業務組織編制使然，但若能在業務上做適當調配，使人員在一定期間內得以專注於研究工作，研究成果之提昇以及研究工作順利完成，應為可期。

良好之實驗環境與適當必要之儀器，為研究、檢驗工作順利進行之要因。日本國立藥品食品衛生研究所食品部第三室基因改造食品檢驗研究所需儀器完備，雖其實驗室老舊擁擠，然人員亦得有足夠空間操作實驗。本局除於基因改造食品檢驗研究所需之儀器仍有缺乏外，實驗儀器設置場所分散，實驗操作空間不足，嚴重影響實驗進行。建議將來能針對尚需增置之儀器編列經費，並於實驗室環境空間規劃上，有適當之調配，將基因改造食品檢驗研究之儀器設備集中，並規劃充足的人員操作空間，以助研究及檢驗工作順利進行。

## 三、增加實驗室間合作交流

目前我國政府基因改造食品檢驗研究工作之權責單位為藥物食品檢驗局第五組所屬之基因改造食品檢驗研究小組，國內雖有學校或研究機構等數個實驗室亦從事或參與本基因改造食品之檢驗研究工作。藥檢局身為主導基因改造食品檢驗研究之機關，與其他實驗室之交流卻不夠密切積極。



與其他實驗室間合作與交流，不特有助於迅速獲得相關資訊、即時調整研究方向、提增研究成果，並有相互督促之效。建議未來能拓展與其他實驗室間之交流及合作，或積極整合國內基因改造食品檢驗研究。

#### 四、未來食品衛生安全的新課題－食品過敏原之檢驗研究與標示

此次至日本國立醫藥品食品衛生研究所考察研習基因改造食品檢驗研究，亦察知日方正研擬五種主要食品過敏原之檢驗方法與標示方法，並將於明年起，實施標示政策。察日方此項作為，乃肇因於日本食因性過敏症盛行，民眾普遍苦於過敏症狀，每年之醫療資源耗於此者亦甚鉅，故開發檢驗方法、制定應標示限量以及標示辦法，使日本民眾得以慎選飲食，避免觸發過敏症狀，以保身體無恙，生活適然。過敏症亦為困擾多數本國人之疾，其中，因食物引發之過敏症亦佔多數。鑒於日本政府為維護人民健康之作為，我國亦應效法。將來應規劃食品過敏原之檢驗與標示之政策。

#### 肆、 附 件

## 附件一

### New version GM Soybean 定量 PCR (LightCycler, Roche)

緣起：1.使用 Roche LightCycler 進行定量時 coefficient value (內標比) 常偏離 1 許多<sup>1,2</sup>。  
2. NTC problems<sup>3,4</sup>。

目的：驗證廠商<sup>5</sup>新開發之方法<sup>6</sup>。  
嘗試修正調整試驗 PCR 反應配方及反應條件，使結果最佳化--NTC 無反應訊號，與 coefficient value 接近 1 (by LightCycler, Roche)。

#### 實驗：

1. Endogenous gene Lectin Standard plasmids (NTC、20、125、1,500、20,000、250,000 copies / 2.5  $\mu$ L) 6 支
2. Specific GM gene-RRS<sup>7</sup> Standard plasmids (NTC、20、125、1,500、20,000、250,000 copies / 2.5  $\mu$ L) 6 支
3. Specific GM gene-CaMV<sup>8</sup> Standard plasmids (NTC、20、125、1,500、20,000、250,000 copies / 2.5  $\mu$ L) 6 支
4. Roundup Ready soybean sample (100%) 3 repeats 9 支

#### The compositions of reaction solution

	Final conc.
MgCl <sub>2</sub>	4.0 mM
F-primer	0.5 $\mu$ M
R-primer	0.5 $\mu$ M
Taqman probe	0.2 $\mu$ M
FastStart DNA Master Hybridization probe	$\times$ 1
Template DNA	50 ng

<sup>1</sup> 以 ABI 進行定量 coefficient value 都接近 1。

<sup>2</sup> For Roche 尤其在 GM maize, coefficient value 都很高。

<sup>3</sup> 先前使用 salmon sperm DNA 作為 NTC 時，NTC 有 20% 機率產生訊號。

<sup>4</sup> Dilutions are made by NTC solution (In this case, plasmid ColE1 is used. Previous tests used salmon sperm DNA)

<sup>5</sup> NIPPON GENE Co

<sup>6</sup> Use plasmid ColE1 derived from E coli as NTC。


<sup>7</sup> Roundup Ready Soybean (structural gene)

<sup>8</sup> CaMV promoter (regulator gene)


## 附件一

The program of PCR

95°C 10 min

95°C 10 sec 

60°C 20 sec 50 cycles

72°C 10 sec 

40°C 30 sec

結果：

Fit Points Noise Band =0.1

### Fit Points

	Leln		CaMV		CoV
slope	-3.357		-3.44		
error reet		AVE		AVE	
RRS	1.48E+04	1.49E+04	1.77E+04	1.73E+04	
RRS	1.48E+04	STDV	1.74E+04	STDV	
RRS	1.52E+04	211.266	1.67E+04	507.642	
		CV(%)		CV(%)	
		1.42		2.94	

### Second Derivative Maximum

	Leln		CaMV		CoV
slope	-3.316		-3.43		
error reet		AVE		AVE	
RRS	1.41E+04	1.40E+04	1.61E+04	1.62E+04	
RRS	1.39E+04	STDV	1.65E+04	STDV	
RRS	1.40E+04	95.394	1.60E+04	240.208	
		CV(%)		CV(%)	
		0.68		1.48	

## 附件一

Fit Points Noise Band =0.1

### Fit Points

	Leln		RRS		CoEV
slope	-3.357		-3.736		
error reet		AVE		AVE	
RRS	1.48E+04	1.49E+04	1.77E+04	1.83E+04	
RRS	1.48E+04	STDV	1.89E+04	STDV	
RRS	1.52E+04	211.266	1.83E+04	615.007	
		CV(%)		CV(%)	
		1.42		3.36	

### Second Derivative Maximum

	Leln		RRS		CoEV
slope	-3.316		-3.439		
error reet		AVE		AVE	
RRS	1.41E+04	1.40E+04	1.83E+04	1.87E+04	
RRS	1.39E+04	STDV	1.89E+04	STDV	
RRS	1.40E+04	95.394	1.88E+04	337.095	
		CV(%)		CV(%)	
		0.68		1.81	

1. **CoEV** 都接近 1。
2. 此次試驗 NTC 都沒有起來。(這是第一次使用 **CoIE1** 作為 NTC)

---

<sup>9</sup> 每次定量 error reet 值必須小於 0.2，否則需要調整 baseline 至小於 0.2。

附件二

GA21 内 定 1 (020710 tony) - 020527 抽出 DNA

Fit Points の Noise Band の 0.2

Fit Points

	SSIIb		GA21		内標比
slope	-3.206		-3.321		
error reet	0.145 AVE		0.119 AVE		
GA21smple	1.33E+04	1.33E+04	2.59E+04	2.56E+04	1.93
GA21smple	1.38E+04	STDV	2.63E+04	STDV	
GA21smple	1.27E+04	531.131	2.46E+04	901.795	
		CV (%)		CV (%)	
		4.00		3.52	

Second Derivative Maximum

	SSIIb		GA21		内標比
slope	-1.866		-3.05		
error reet	0.359 AVE		0.171 AVE		
GA21smple	5.90E+03	5.16E+03	2.94E+04	2.87E+04	5.57
GA21smple	4.84E+03	STDV	2.80E+04	STDV	
GA21smple	4.73E+03	645.446	2.87E+04	660.101	
		CV (%)		CV (%)	
		12.52		2.30	

## 附件二

Event176 內 1 (020703wakui) -020527 抽出 DNA

Fit Points の Noise Band の 0.2

Fit Points

	SSIIb	Event176	內標比
slope	-3.206	-3.379	
error reet	0.145 AVE	0.0953 AVE	
Event 176 smple	2.44E+04	2.38E+04	5.28E+04 5.04E+04 `2.12
Event 176 smple	2.27E+04 STDV	4.43E+04 STDV	
Event 176 smple	2.44E+04	958.610	5.41E+04 5331.654
	CV (%)	CV (%)	
	4.02	10.58	

Second Derivative Maximum

	SSIIb	Event176	內標比
slope	-1.866	-3.256	
error reet	0.359 AVE	0.0792 AVE	
Event 176 smple	1.53E+04	1.48E+04	5.65E+04 5.28E+04 3.57
Event 176 smple	1.28E+04 STDV	5.18E+04 STDV	
Event 176 smple	1.62E+04	1781.469	5.01E+04 3329.324
	CV (%)	CV (%)	
	12.06	6.31	

結果：

1. Fit point 比 Second Derivative Maximum 得到之 CV 值好 (closer to 1)。
2. NTC 在本次試驗只有在 Endogenous gene-SSIIb 出現 PCR 反應訊號，在 Event 176 和 GA21 都沒有出現，所以應該是 contamination。
3. 本次試驗結果與前次 (只有 PCR program 不同)<sup>4</sup>比較，CV 值較好<sup>5</sup>。

<sup>4</sup> 95°C 10 min, (95°C 15 sec, 60°C 20 sec, 72°C 10 sec) × 50 cycles, 40°C 30 min

<sup>5</sup> A. For GA21 fit point：前次試驗 CV=2.55，本次為 1.93。

B. For GA21 Second Derivative Maximum：前次試驗 CV=3.34，本次為 5.57。

C. For Event 176 fit point：前次試驗 CV=2.82，本次為 2.12。

D. For Event 176 Second Derivative Maximum：前次試驗 CV=3.25，本次為 3.57

### 附件三

#### DNA 萃取-馬鈴薯(QIAGEN DNeasy Plant Mini)

操作前，以 70%酒精擦拭工作檯以及秤重天秤

秤取樣品 200 mg (powder)

加入於 65°C 預熱之 AP1 試劑 1.2 mL

加入 RNase A stock solution 10  $\mu$  L

混合均勻 (touch mixer)

置於 65°C，15 分鐘 (期間倒置混合兩次)

加入 AP2 試劑 400  $\mu$  L

冰浴 5 分鐘

離心 5 分鐘 (10,000  $\times$  g)

取上層液 (約 1.2 mL) 至新的試管，再離心 5 分鐘 (10,000  $\times$  g)

取上層液 500  $\mu$  L 至 QIAshredder spin column，離心 2 分鐘 (10,000  $\times$  g)。  
將溶出液 (flow through) 移至新試管 (若有沉澱物，避免將之移至試管中)。  
再取上層液 500  $\mu$  L 至原 QIAshredder spin column，離心 2 分鐘 (10,000  $\times$  g)。  
將溶出液移加入 (若有沉澱物，避免將之移至試管中) 前一溶出液試管。

取上層液 1 mL 至新的試管，加入加入 1.5 倍體積之 AP3 試劑 (使用前先加入 96-100%酒精)，混合 10 秒。(2.5 mL)

取 500  $\mu$  L 至 mini spin column，離心 1 分鐘 (10,000  $\times$  g) 後，將溶出液倒棄。  
重複此步驟至全部之萃取液完全經由 mini spin column 吸附。

加 500  $\mu$  L AW 試劑至 mini spin column，離心 1 分鐘 (10,000  $\times$  g) 後，將溶出液倒棄。

重複此步驟一次。

### 附件三

將前步驟之 mini spin column 離心 15 分鐘 ( $10,000 \times g$ )，使 AW 試劑完全無殘留。

將 mini spin column 取出，套入新的 collection tube (2 mL, QIAGEN)

加入經  $65^{\circ}\text{C}$  預熱之滅菌水  $50 \mu\text{L}$ ，於室溫下靜置 5 分鐘後，離心 1 分鐘 ( $10,000 \times g$ )，再加入經  $65^{\circ}\text{C}$  預熱之滅菌水  $50 \mu\text{L}$ ，重複上述步驟。

將溶出液收集至滅菌之微量離心管 ( $100 \mu\text{L}$ )，為萃取 DNA 原液。

測量 DNA 濃度：取 DNA 原液  $5 \mu\text{L}$  加入滅菌水  $95 \mu\text{L}$  ( $20\times$  dilution)

Basically, DNA extraction in potato usually can obtain  $100\text{ng} / \mu\text{L}$



## 附件四

### 八種品系馬鈴薯 DNA 萃取

品系名<sup>1</sup>：

1. DANSYAKU 男爵
2. NOURIN 農林一號
3. SATAKA
4. KONAFUBUKI
5. TOUYA
6. MEIKUIN
7. WASESHINO
8. TOYASHINO

DNA conc. of each extraction :

	260 nm / 280 nm	Conc. (ng / $\mu$ L)
DANSYAKU 男爵	1.471	50
NOURIN 農林一號	1.483	43
SATAKA	1.541	57
KONAFUBUKI	1.480	37
TOUYA	1.615	63
MEIKUIN	1.615	63
WASESHINO	1.528	81
TOYASHINO	1.571	77

---

<sup>1</sup> DANSYAKU 和 MEIKUIN 爲日本主要的品種

## Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques

### 1. Sampling Methods

#### 1.1 Sampling of Foods Produced by Recombinant DNA Techniques

##### 1.1.1 Sampling of Corn Kernels and Soybeans

On the assumption that corn kernels or soybeans produced by recombinant DNA techniques exist inhomogeneously, obtain a representative sample from a lot in accordance with lot size, type of packing (bulk or sacked) and packaging style of the lot. Take notice that corn kernels or soybeans from other lots do not commingle when you obtain a sample. To obtain a sample, use utensils, containers and packaging materials that are disposable or cleaned thoroughly.

Mix a sample well until it becomes homogenous, and weigh out certain amount of grains\* that you need for tests. Then, grind them until they become homogeneous with equipments (e.g. grinding machine).

\*Approximately 500g of corn kernels or soybeans are needed for a quantitative test.

##### 1.1.1.1. Sampling Sacked Grains

Obtain samples according to the following table.

Lot Size	Number of Sacks to be Unpacked	Amount of Sample (Kg)	Number of Samples	
			Qualitative	Quantitative
□ 15	2	1	1	3
16 ~ 25	3	1	1	3
26 ~ 90	5	1	1	3
91 ~ 150	8	1	1	3

## 附件五

151 ~ 280	13	1	1	3
281 ~ 500	20	1	1	3
501 ~ 1,200	32	1	1	3
1,201 ~ 3,200	50	1	1	3
3,201 ~ 10,000	80	1	1	3
10,001 ~ 35,000	125	1	1	3
35,001 ~ 150,000	200	1	1	3
150,001 ~ 500,000	315	1	1	3
□500,001	500	1	1	3

### 1.1.1.2. Sampling Bulk Grains

#### 1.1.1.2.1 Sampling Silos During Loading

When foods are loaded into silos, regard a silo as a lot and obtain a representative sample of a lot with tools (e.g. auto-sampler). Draw corn kernels or soybeans for 15 times at appropriate intervals in order that the total amount weighs more than 10 Kg. Then, divide the grains homogeneously and use a portion (more than 1 Kg) as a sample per silo.

Regarding corn kernels or soybeans that have already been loaded into silos, obtain a sample in the same way when they are reloaded into another silo.

#### 1.1.1.2.2 Sampling Barges During Loading

When foods are loaded into barges (including domestic vessels), regard a barge as a lot and obtain a representative sample of a lot with tools (e.g. auto-sampler). Draw grains for 15 times at appropriate intervals in order that the total amount weighs more than 10 Kg. Then, divide the grains homogeneously and use a portion (more than 1 Kg) as a sample per barge.

#### 1.1.1.2.3 Sampling Barges After Loading

When foods have already been loaded into barges, regard a barge as a lot and obtain a representative sample of a lot by drawing corn kernels or soybeans from 15 points (every 5 points from the high, middle, and lower layer of the barge) in order that the total amount

---

## 附件五

weighs more than 10 Kg. Then, divide the grains homogeneously and use a portion (more than 1 Kg) as a sample per barge.

### 1.1.2. Sampling of Papaya

Regarding sampling of papayas, obtain a sample according to the following table.

Lot Size	Number of Packages to be Unpacked	Amount of Sample (Number of Pieces)	Number of Sample
□ 50	2	2	1
51 ~ 500	3	3	1
501 ~ 35,000	5	5	1
□ 35,001	8	8	1

### 1.2 Sampling of Processed Foods

Regarding sampling of processed foods, obtain a sample according to the following table.

#### 1.2.1. Ground Corn and Soybean (e.g. corn grits, corn flour, corn meal)

Obtain samples according to the table in "1.1.1.1. Sampling Sacked Grains".

#### 1.2.2. Processed Foods other than 1.2.1.

Obtain samples according to the following table.

Lot Size	Number of Packages to be Unpacked	Amount of Sample (g)	Number of Samples	
			Qualitative	Quantitative
□ 15	2	120	1	3
16 ~ 50	3	120	1	3
51 ~ 150	5	120	1	3
151 ~ 500	8	120	1	3
501 ~ 3,200	13	120	1	3
3,201 ~ 35,000	20	120	1	3
35,001 ~ 500,000	32	120	1	3
□ 500,001	50	120	1	3

## 附件五

2. Tests for foods produced by recombinant-DNA techniques whose safety assessments are not reviewed

2.1 Test methods

2.1.1 Test of corn (CBH351)


The lateral flow method is used in the test of corn kernels. This method is also used in the test of ground food products such as corn grits, corn flour and corn meal (hereinafter referred to as "corn semi-products"), in which proteins newly expressed by genetic modification are not subjected to physical and chemical changes.

The qualitative PCR method is used for other corn processed food products.


Corn semi-products are tested by the lateral flow method and then subjected to the identification test using the qualitative PCR method.

2.1.1.1 Detection of CBH351 in corn grains

2.1.1.1.1 Lateral flow method

The commercially available kit, Trait  Bt9 Corn Grain Test Kit (Part 7000003) manufactured by Strategic Diagnostics Inc.(SDI), is used. The procedures described below are basically the same as directed in the kit's explanatory leaflet. When an experiment is performed in a laboratory, RO water purified using a reverse osmotic membrane or distilled water should be used unless otherwise specified.

2.1.1.1.1.1 Testing procedures

Grind kernels randomly selected from a sample, and place the ground corn\* in an open-mouthed jar with a lid (a jar holds approximately 500 mL). Add 288 mL of water and shake the jar for 10-20 seconds to thoroughly wet all the mixture. If there is no free liquid at this stage, add a small amount of water, shake the jar, and check for the presence of the free liquid. Repeat this procedure until a few mL of free liquid develop. Transfer 0.5 mL of the free liquid to a 1.5-mL sample tube provided with the test kit, and place a Trait  Bt9 Test Strip vertically into the sample tube.

\* Normally, grind 230 g of corn kernels (if the 230 g of kernels are made up of fewer than 800 kernels, grind 800 kernels).

2.1.1.1.1.2 Judgment of results

## 附件五

10 minutes after placing the test strip\*, observe the result window of the test strip. If two red lines appear on the result window, the result is positive; if only a control line appears, the result is negative; and if no line appears, the test is invalid

\* If the strip is placed in the tube for more than 10 minutes, the red lines may deepen and hinder an accurate judgment.

### 2.1.1.2 Detection of CBH351 in processed corn products

In accordance with "Extraction and purification of DNA from processed food products" (2.2.3), extract one sample in duplicate. Subject the obtained DNA solution to qualitative PCR under the conditions specified below.

#### 2.1.1.2.1 Qualitative PCR

Qualitative PCR is the method to amplify some parts of the extracted DNA by use of primers and to detect the amplified DNA by electrophoresis.

\* As a very small amount of template DNA is amplified in PCR reaction, it is very important to avoid contamination of DNA other than the target DNA (particularly PCR byproducts). Moreover, DNase, secreted from the human skin surface, must be prevented from entering the PCR reaction mixture as it decomposes DNA. Therefore, disposable tubes and tips must be autoclaved at 121°C for                    or more just prior to use. As for the water used in qualitative PCR, unless otherwise specified, use RO water purified using a reverse osmotic membrane or super-purified water prepared by deionizing distilled water to 17 MW/cm by Milli-Q etc., and then autoclaved at 121°C for 20 minutes or more.

##### 2.1.1.2.1.1 PCR amplification

The PCR reaction mixture is prepared as follows in a PCR reaction tube: add 2.5  $\mu$ L of DNA sample solution adjusted at                    in an ice bath to a mixture including PCR buffer\*1, 0.20 mmol/L dNTP, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ mol/L 5' and 3' primers\*2 and 0.625-units Taq DNA polymerase\*3, to bring the total volume to 25  $\mu$ L. Place the reaction tube in a PCR amplifier\*4. After starting the reaction by keeping the mixture at 95°C for 10 minutes, maintain the temperature of the mixture at 95°C for 0.5 minutes, at 60°C for 0.5 minutes, and then at 72°C for 0.5 minutes as one cycle, and repeat this cycle for 40 times. Stop the reaction by keeping the mixture at 72°C for 7 minutes and store the mixture at 4°C as the PCR amplified reactant. As the blank reactant, both of the PCR reaction mixtures without primers or the DNA sample solution should be subjected to PCR reaction. To confirm the extraction of DNA, subject a mixture including a

## 附件五

positive-control (to detect reference gene) primer pair\*5 instead of the primer pairs for detection of CBH351 to PCR reaction for each DNA sample solution.

\*1 PCR buffer

Use a PCR Buffer II (manufactured by PE Biosystems) or a buffer producing an equivalent result.

\*2 Primer pair for detection of CBH351

F-primer (CaM03-5'): 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3'): 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'

\*3 Taq DNA polymerase

Use an AmpliTaq Gold DNA Polymerase (manufactured by PE Biosystems) or a polymerase producing an equivalent result.

\*4 PCR amplifier

Use a GeneAmp PCR System 9600 (manufactured by Perkin Elmer Co., Ltd.) or a system producing an equivalent result.

\*5 Primer pair for positive control (to detect reference gene)

F-primer (Zein n-5'): 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3'): 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

### 2.1.1.2.1.2. Agarose gel electrophoresis

The PCR amplified reactant is separated by agarose gel electrophoresis to identify the amplified DNA band.

#### 2.1.1.2.1.2.1 Preparation of agarose gel

Add TAE buffer\*1 to the required quantity of agarose, and heat the mixture to dissolve the agarose. Then, add 5  $\mu$ L of ethidium bromide (10 mg/mL)\*2 per 100 mL of the above solution, cool the mixture to approximately 50°C, pour it into a gel maker, and cool and solidify it at room temperature to make a gel\*3. Although it is desirable to use the gel

## 附件五

immediately after preparation, it can be preserved in the buffer for several days. The concentration of the gel (1.0% - 4.0%) should be decided based on the band length of the goal product, as it depends on the length of the DNA to be electrophoresed.

### \*1 TAE buffer

Prepare a solution having final concentrations for 40 mmol/L Tris-acetic acid and 1 mmol/L EDTA with distilled water, and use the solution as the TAE buffer.

### \*2 Ethidium bromide

Ethidium bromide is a fluorescent agent that enters the interstices of the double-stranded DNA and has a strong carcinogenic and toxic effect. Wear gloves and a mask during handling.

### \*3 Pre-staining

Pre-staining is used here. Without the additional ethidium bromide here, post-staining of gel following completion of electrophoresis can be used as directed in 2.1.1.2.1.2.3.

#### 2.1.1.2.1.2.2 Electrophoresis

Set the prepared gel in an electrophoresis bath filled with TAE buffer. Add 7.5  $\mu$ L of PCR amplified reactant to a proper quantity of gel-loading buffer, and inject the mixture into the well of gel. If sample injection into the gel takes too long, the DNA will diffuse, resulting in a vague pattern. Next, perform electrophoresis at a constant voltage of 100 V until the BPB in the gel-loading buffer advances to the 1/2-2/3 position of the gel.

#### 2.1.1.2.1.2.3 Staining of gel (post-staining)

When pre-staining is used, the procedures specified in this section are not necessary. Transfer the electrophoresed gel to a container containing a sufficient amount of TAE buffer to soak the gel thoroughly. Add 5  $\mu$ L of ethidium bromide (10 mg/mL) per 100 mL buffer, place the container on a shaker, and perform staining for 30 minutes while shaking the container mildly.

#### 2.1.1.2.1.3 Gel image analysis

Place the stained electrophoretic gel on a piece of \* spread on the stage of a gel image analyzer, and radiate ultraviolet rays (312 nm). Identify the electrophoretic pattern on the display of the gel image analyzer. Judge the presence of the goal band by





## 附件五

Sample No. 9 will be subjected to a third extraction.

\* "+" means "positive", "-" means "negative", and "/" means "no test."

\* The CBH identification primer pair is as follows:

F-primer (Cry9C-5'): 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3'): 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

### 2.1.1.3 Detection of CBH351 in corn semi-products (corn grits, corn flour, corn meal etc.)

Test the sample by the lateral flow method as directed in 2.1.1.1.1, except using 230 g of the sample without grinding. If the result is positive, extract DNA from the sample in duplicate as directed in 2.2.1 and subject the DNA extract to the qualitative PCR described in 2.1.1.2.1. When the PCR amplified reactant from one extract displays a 157-bp PCR amplified band in the positive-control (detecting reference gene) primer pair lane, and a 170-bp PCR amplified band is found in the CBH351 detection primer lane, judge the sample to be CBH351-positive.

### 2.1.2 Detection of papaya (55-1)

For raw papayas and their processed food, perform qualitative PCR as described in 2.1.1.2.1, except use the 55-1 detection primer pair (NosC-5', CaMVN-3') that produces (detects) a 207-bp amplified band, the papain primer pair (papain-5', papain-3') that produces (detects) a 211-bp amplified band for positive control (detecting reference gene), and the 55-1 identification primer (for 2nd screening) pair (CaM3-5', GUSn-3') that produces (detects) a 250-bp amplified band.

#### 55-1 Detection primer pair

F-primer (NosC-5'): 5'-TTA CGG CGA GTT CTG TTA GG-3'

R-primer (CaMVN-3'): 5'-CAT GTG CCT GAG AAA TAG GC-3'

#### Papain-gene detection primer pair

F-primer (papain-5'): 5'-GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA-3'

R-primer (papain-3'): 5'-CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC-3'

#### 55-1 Identification primer pair

F-primer (CaM 3-5'): 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (GUS n-3'): 5'-TCG TTA AAA CTG CCT GGC AC-3'

## 附件五

### 2.1.3 Detection of New Leaf Y potato (including processed food)

Perform Qualitative PCR as directed in 2.1.1.2.1, using a detection primer pair that produces (detects) a 225-bp amplified band for detection of New Leaf Y and a Pss primer pair (detects the Patatin gene universally existing in potato) that produces (detects) a 216-bp amplified band for positive control (to detect reference gene). For the confirmation test of New Leaf Y presence, use a confirmation primer pair that produces (detects) a 161-bp amplified band for detection of PVY-cp gene.

New Leaf Y detection primer pair

F-primer (p-FMV05-5') : 5'-AAA AGA GCT GTC CTG ACA GC-3'

R-primer (PVY02-3') : 5'-TCC TCC TGC ATC AAT TGT GT-3'

Pss primer pair (for detection of the patatin gene)

F-primer (Pss01n-5') : 5'-TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT-3'

R-primer (Pss01n-3') : 5'-GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCG A-3'

PVY-cp gene detection primer pair

F-primer (PVY01-5') : 5'-GAA TCA AGG CTA TCA CGT CC-3'

R-primer (PVY01-3') : 5'-CAT CCG CAC TGC CTC ATA CC-3'

### 2.2 Extraction and purification of DNA

Unless otherwise specified, the water used in the extraction and purification of DNA is RO water purified using a reverse osmotic membrane, or ultra-purified water produced by deionizing distilled water to 17 MW /cm using a Milli-Q and autoclaving at 121°C for 20 minutes or more.

#### 2.2.1 Extraction and purification of DNA from corn kernels and soybeans

The CTAB method, which uses a mixture of the surfactant cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and phenol/chloroform in extraction and purification, is applicable to various areas, leaves virtually no PCR inhibitors, and provides high-purity DNA. However, it has the disadvantages of using harmful reagents such as phenol and chloroform and requiring complicated purification procedures. Currently marketed DNA extraction kits eliminate such disadvantages. They include a silica-gel membrane type, a silica-base resin type, an ion-exchange resin type and a magnet-adsorptive bead type. All of these allow the extraction and purification of DNA usable in PCR from corn kernels and soybeans. This

## 附件五

section describes purification using the CTAB method, a silica-gel membrane-type kit (QIAGEN DNeasy Planet Mini) or a silica-base resin-type kit (Promega Wizard DNA Clean-Up System).

### 2.2.1.1 CTAB method

Place 2 g of uniformly ground sample into a polypropylene centrifuge tube (50 mL), add 15 mL of CTAB buffer\*1, and homogenize the mixture. Add 30 mL of CTAB buffer while washing the edge of the tube and the tip of the homogenizer, mix them by overturning the tube, and leave the mixture at 55°C for 30 minutes. Stir the mixture, place 600  $\mu$ L of the homogeneous suspension in a micro centrifuge tube (1.5 mL), add 500  $\mu$ L of phenol/chloroform mixtures\*2, mix them by overturning, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube. Here, be careful not to disturb the medium layer. Add 500  $\mu$ L of a chloroform/isoamyl alcohol mixtures\*3, mix by overturning, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube. Add the same volume of isopropyl alcohol (room temperature), mix by overturning, perform centrifugation at 7,500 x g and room temperature for 10 minutes, and throw away the supernatant by decantation. Gently add 500  $\mu$ L of 70% ethanol along the wall of the tube, perform centrifugation at 7,500 x g and room temperature for 1 minute, and suck out as much ethanol as possible without touching the precipitate. Then, vacuum-dry the precipitate for 2-3 minutes, being careful not to dry it completely. Add 50  $\mu$ L of TE buffer\*4, mix fully, and leave the mixture at room temperature for 15 minutes. During this process, overturn the tube occasionally to dissolve the precipitate completely. Add 5  $\mu$ L of RNase A and leave the mixture at 37°C for 30 minutes. After adding 200  $\mu$ L of CTAB buffer, add 250  $\mu$ L of chloroform/isoamyl alcohol mixture, mix them by overturning, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube without disturbing the medium layer. Add 200  $\mu$ L of isopropyl alcohol, mix by overturning, centrifuge the mixture at 7,500 x g and room temperature for 10 minutes, and throw away the supernatant by decantation. Next, gently add 200  $\mu$ L of 70% ethanol along the wall, perform centrifugation at 7,500 x g and room temperature for 1 minute, and suck out as much ethanol as possible, without touching the precipitate. Vacuum-dry the precipitate for 2-3 minutes, being careful not to dry it completely. Add 50  $\mu$ L of water to the precipitate, mix, and leave the mixture at room temperature for 15 minutes. During this process, overturn the tube for mixing occasionally to dissolve the precipitate completely. Use this solution as the DNA sample stock solution.

## 附件五

### \*1 CTAB buffer

Place 8 mL of 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 20 mL of 1 mol/L Tris/HCl (pH 8.0), and 56 mL of 5 mol/L salt solution in a beaker, add enough water to bring the volume to approximately 150 mL, add 4 g of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) while stirring, and dissolve it completely. Add enough water to bring the total volume to 200 mL, and autoclave the solution. Use the solution as the CTAB buffer.

### \*2 Phenol/chloroform mixtures

Mix 1 mol/L Tris/HCl (pH 8.0) saturated phenol with chloroform/isoamyl alcohol at 1:1 (v/v), and use this as the phenol/chloroform mixture.

### \*3 Chloroform/isoamyl alcohol mixtures

Mix chloroform and isoamyl alcohol at 24:1 (v/v), and use this as the chloroform/isoamyl alcohol mixture.

### \*4 TE buffer

Prepare a solution having final concentrations of 10 mmol/L Tris/HCl (pH 8.0) and 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) with water, and use this solution as the TE buffer.

#### 2.2.1.2 Silica-gel membrane-type kit method

Place 2 g of uniformly ground sample in a polypropylene centrifuge tube (50 mL), add 10 mL of AP1 buffer previously warmed at 65°C and 20  $\mu$ L of RNase A, mix vigorously with a vortex mixer to pulverize lumps of the sample, and leave the mixture at 65°C for 15 minutes. During this process, shake the sample by overturning the centrifugal tube 2-3 times. Add 3250  $\mu$ L of AP2 buffer, leave the mixture on ice for 5 minutes, and centrifuge it at 3,000 x g or more for 5 minutes. Then, apply 500  $\mu$ L of the supernatant to a QI Ashredder spin column, and perform centrifugation at 10,000 x g or more for 4 minutes and place the eluate in a micro centrifuge tube (15 mL). After repeating this procedure, add 1.5 times the eluate volume of AP3 buffer/ethanol mixture\*1. Apply 500  $\mu$ L of this solution to a Mini spin column, and perform centrifugation at 10,000 x g or more for 1 minute. Apply 500  $\mu$ L of the remaining solution to the same Mini spin column, perform centrifugation under the same conditions, and dispose of the eluate. Repeat the same procedures until all of the solution is used. Apply 500  $\mu$ L of AW buffer to the column, perform centrifugation at 10,000 x g or more for 1 minute, and dispose of the eluate. Apply the AW buffer again and repeat the same procedures. After disposing of the eluate, subject the Mini spin column to centrifugation at 10,000 x g or more for 15 minutes to dry it.

## 附件五

Transfer the Mini spin column to a centrifuge tube of the kit, add 70  $\mu$ L of previously warmed water, leave the mixture for 5 minutes, and centrifuge it at 10,000 x g or more for 1 minute to elute DNA. Add water again and repeat the same procedures. Put the obtained eluates together, and use this as the DNA sample stock solution.

\*1 AP3 buffer/ethanol mixture

Mix AP3 buffer and ethanol (96%-100%) at 1:2 and use this as the AP3 buffer/ethanol mixture.

### 2.2.1.3. Silica-based resin-type kit method

Place 2 g of uniformly ground sample in a polypropylene centrifuge tube (50 mL), add 17.2 mL of extraction buffer\*1, 2 mL of 5 mol/L guanidine-HCl, and 0.8 mL of 20 mg/mL Proteinase K, mix them vigorously using a vortex mixer, and keep the mixture at 55°C - 60°C for 3 hours while shaking the tube. Cool the mixture to room temperature and centrifuge it at 3,000 x g for 10 minutes. If the supernatant is turbid, transfer a portion of it to a micro centrifuge tube (1.5 mL) and further centrifuge it at 14,000 x g for 10 minutes. Place 500  $\mu$ L of the obtained clear supernatant and 1 mL of DNA Clean-Up Resin in a micro centrifuge tube (1.5 mL), and mix them by overturning. Connect an injection syringe to the upper end of a Mini column, and attach them to a manifold (aspirator\*2). After confirming that the cock of the manifold is closed, apply the mixture to the Mini column through the injection syringe. Open the cock, remove the solvent completely by aspiration, and add 2 mL of 80% isopropyl alcohol through the syringe to wash the column. Remove the syringe, attach the Mini column to a micro centrifuge tube (1.5 mL), and centrifuge at 1,000 x g and room temperature for 2 minutes to dry the column. Transfer the Mini column to another micro centrifuge tube (1.5 mL), and drip it with 50  $\mu$ L of water previously warmed to 65°C - 70°C. After 1 minute, centrifuge it at 1,000 x g or more and room temperature for 1 minute to elute the DNA, and use the obtained eluate as the DNA sample stock solution.

\*1 Extraction buffer

10 mmol/L Tris-HCl buffer solution (pH 7.5) containing 150 mM sodium chloride (NaCl); 2 mmol/L EDTA; and 1% SDS.

\*2 Aspirator

If an aspirator is not available, centrifugation can be substituted.

### 2.2.2 Extraction and purification of DNA

## 附件五

Remove the seeds from the papayas, cut the flesh into 10 mm cubes, and freeze-dry them. Grind the frozen flesh using a mixing mill. Perform extraction and purification of DNA on the sample, in accordance with the CTAB or silica-gel membrane-type kit (QIAGEN DNeasy Plant Mini) methods.

### 2.2.2.1 CTAB method

Place 20 mg of the ground sample in a micro centrifuge tube (1.5 mL), add 150  $\mu$ L of CTAB buffer, and homogenize the mixture using a micro mixer. Add 450  $\mu$ L of CTAB buffer while washing the inside of the tube, mix the solution by overturning, and leave it at 55°C for 30 minutes. Add 500  $\mu$ L of phenol/chloroform mixture, mix the solution by overturning, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube without disturbing the medium layer. Add 500  $\mu$ L of chloroform/isoamyl alcohol mixture, mix by overturning, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube. Add the same quantity of isopropyl alcohol (room temperature), mix the solution by overturning, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 10 minutes, and discard the supernatant by decantation. Gently add 500  $\mu$ L of 70% ethanol along the wall of the tube, centrifuge the precipitate at 7,500 x g and room temperature for 1 minute, and suck out as much of the ethanol as possible without touching the precipitate. Then, vacuum-dry the precipitate for 2-3 minutes, being careful not to dry the precipitate completely. Add 50  $\mu$ L of TE buffer, mix the solution well, and leave it at room temperature for 15 minutes. During this process, overturn the tube occasionally to completely dissolve the precipitate. Add 5  $\mu$ L of RNase A, and leave the mixture at 37°C for 30 minutes. After adding 200  $\mu$ L of CTAB buffer, add 250  $\mu$ L of chloroform/isoamyl alcohol mixture, mix the solution by overturning the tube, suspend the mixture mildly using a mixer, centrifuge it at 7,500 x g and room temperature for 15 minutes, and transfer the water layer (upper) to another micro centrifuge tube. During this process, be careful not to disturb the medium layer. Add 200  $\mu$ L of isopropyl alcohol, mix the solution by overturning the tube, perform centrifugation at 7,500 x g and room temperature for 10 minutes, discard the supernatant by decantation, and remove the isopropyl alcohol using a pipette. Gently add 200  $\mu$ L of 70% ethanol along the tube wall, perform centrifugation at 7,500 x g and room temperature for 1 minute, and suck out as much ethanol as possible without touching the precipitate. Then, vacuum-dry the precipitate for 2-3 minutes, being careful not to dry the precipitate completely. Add 50  $\mu$ L of water, mix the solution, and leave it at room temperature for 15 minutes. During this process, overturn the tube occasionally to dissolve the precipitate completely. Use the solution as the DNA sample stock solution.

## 附件五

### 2.2.2.2 Silica-gel membrane-type kit method

Place 80 mg of ground sample in a micro centrifuge tube (2 mL), and perform extraction and purification on the sample using a silica-gel membrane kit (QIAGEN DNeasy Plant Mini) as directed below. Add 400  $\mu$ L of AP1 buffer previously warmed to 65°C and 4  $\mu$ L of RNase A of the kit, use a homogenizer to mix them fully and pulverize lumps of the sample, and leave it at 65°C for 15 minutes. During this process, overturn the tube several times to shake it. Then, add 130  $\mu$ L of AP2 buffer, leave the mixture on ice for 5 minutes, and perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 5 minutes. Apply the supernatant to a QIAshredder spin column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 2 minutes, and transfer the eluate to a micro centrifuge tube (2 mL). Add 1.5 times the eluate volume of AP3 buffer/ethanol mixture to the centrifuge tube and stir the mixture for 10 seconds using a vortex mixer. Apply 500  $\mu$ L of the mixture to a Mini spin column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 5 minutes,\* and discard the eluate. Apply 500  $\mu$ L of the remaining mixture to the same Mini spin column, perform centrifugation under the same conditions, and discard the eluate. Repeat the same procedures until all of the mixture is used up. Add 500  $\mu$ L of AW buffer to the column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 5 minutes, and discard the eluate. Add the AW buffer again and repeat the same procedures. After throwing away the eluate, perform centrifugation at 10,000 x g or more for 15 minutes to dry the Mini spin column. Transfer the Mini spin column to the kit's centrifuge tube, add 50  $\mu$ L of previously warmed water, leave the tube for 5 minutes, and perform centrifugation at 10,000 x g for 1 minute to elute DNA. Add water again and repeat the same procedures. Put the obtained eluates together, and use this mixture as the DNA sample stock solution.

\* If there are deposits in the solution, the column may become clogged. In such a case, prolong the centrifugation time to 10 minutes for complete elution.

### 2.2.3 Extraction and purification of DNA from processed food

The extraction and purification of DNA from processed food products prescribed in Attached Table 2, which are provided in Article 8 of Notification No. 517 of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2000), is performed as directed in the JAS analytical test handbook, "Genetically Modified Food Test and Analysis Manual for Individual Products," issued by IAI Center for Food Quality, Labeling, and Consumer Services. Extraction and purification of DNA from tacos and tortillas (restricted to products processed using heat), potato (including processed food) and canned papaya are performed as specified below.



## 附件五

### 2.2.3.1 Extraction and purification of DNA from tacos and tortillas (restricted to products processed using heat)

Freeze-dry the sample and grind it using a mixing mill etc. Place 1 g of the ground sample in a polypropylene centrifuge tube (50 mL), and perform extraction and purification of DNA using an ion-exchange resin type of DNA extraction and purification kit

, as specified below. Add 4 mL of G2 buffer\*1 to the sample, mix the solution vigorously using a vortex mixer, add a further 4 mL of G2 buffer, 100  $\mu$ L of Proteinase K\*2, and 10  $\mu$ L of RNase A, mix the solution by shaking, and leave it at 50°C for 2 hours. During this process, overturn the centrifuge tube 2-3 times to mix. Then, perform centrifugation at 3,000 x g or more and low temperature (4°C) for 15 minutes, transfer the supernatant to a polypropylene centrifuge tube (15 mL), and centrifuge it mildly again. Then, apply the supernatant by dividing it into 2-mL portions in a QIAGEN Genomic-tip 20/G equilibrated with 1 mL of QBT buffer\*1. Wash the tip 3 times with 2 mL of QC buffer\*1, transfer the tip to another centrifuge tube, add 1 mL of QF buffer\*1 previously warmed to 50°C two times, and elute the DNA. Transfer the eluate to a centrifuge tube, add 0.7 times the eluate volume of isopropyl alcohol, mix the solution fully, centrifuge the mixture at 10,000 x g or more and low temperature (4°C) for 15 minutes, and discard the supernatant. Add 1 mL of 70% ethanol and perform centrifugation at 10,000 x g or more and low temperature (4°C) for 5 minutes. After throwing away the supernatant, dry the precipitate using an aspirator, add 100  $\mu$ L of water, leave it at 65°C for 5 minutes, dissolve the DNA by pipetting, and use the solution as the DNA sample stock solution.

\*1 G2, QBT, QC, and QF buffers are included in the kit. If they are not enough, they can be prepared as directed in the kit's explanatory leaflet.

\*2 Use QIAGEN's proteinase or that having an equivalent effect.

Grind the sample using a mixing mill etc. and place 200mg of the ground sample in a polypropylene centrifuge tube (15 mL). If the water content of the sample is high, perform centrifugation at 8,000 x g for 15 minutes and discard the supernatant. Perform extraction and purification of DNA on the sample using a silica-gel membrane-type kit (QIAGEN DNeasy Plant Mini), as directed below.

Add 1.5 mL of AP1 buffer previously warmed to 65°C and 10  $\mu$ L of RNaseA to the sample, mix them vigorously using a vortex mixer to pulverize lumps of sample, and leave the mixture at 65°C for 15 minutes. During this process, shake the sample by overturning the tube for several times. Then, add 400  $\mu$ L of AP2 buffer, leave the tube on ice for 5

## 附件五

minutes, and perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 5 minutes. Transfer the supernatant to another centrifuge tube, apply 500  $\mu$ L of the supernatant to a QIAshredder spin column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 2 minutes, and transfer the eluate to the kit's centrifuge tube. Repeat these procedures until all of the supernatant has been applied. Divide the obtained eluate into 2 equal parts, transfer them to separate centrifuge tubes (2 mL), add 1.5 times the eluate quantity of AP3 buffer/ethanol mixture to each tube, and stir them for 10 seconds using a vortex mixer to obtain a solution. Apply 500  $\mu$ L of the obtained solution to a Mini spin column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 1 minute, and discard the eluate. Of the remaining solution, apply a further 500  $\mu$ L to the same Mini spin column, perform centrifugation under the same conditions, and discard the eluate. Repeat the same procedures until all of the solution is used up. Next, add 500  $\mu$ L of AW buffer to the column, perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 1 minute, and discard the eluate. Add the AW buffer again and repeat the same procedures. After discarding the eluate, dry the Mini spin column by centrifugation at 10,000 x g or more for 15 minutes. Transfer the Mini spin column to the kit's centrifuge tube, add 50  $\mu$ L of previously warmed water, leave the column for 5 minutes, and perform centrifugation at 10,000 x g and room temperature for 1 minute to eluate the DNA. Add water again, perform the same procedures, put the obtained eluates together, and use the eluate as the DNA sample stock solution.

### 2.2.3.3 Extraction and purification of DNA from canned papaya

Wash the sample fully with water, freeze-dry it, and grind it using a mixing mill. Place 2 g of the ground sample in a polypropylene centrifuge tube (50 mL) and perform extraction and purification of DNA on it using an ion-exchange resin-type DNA extraction and purification kit (QIAGEN Genomic-tip), as directed below.

Add 7.5 mL of G2 buffer to the sample, mix them vigorously using a vortex mixer, add further 7.5 mL of G2 buffer, 200  $\mu$ L of QIAGEN Proteinase K, and 20  $\mu$ L of RNase A, mix them by shaking, and leave the mixture at 50°C for 2 hours. During this process, overturn the tube 2-3 times to mix. Perform centrifugation at 3,000 x g or more and low temperature (4°C) for 15 minutes, transfer the supernatant to a polypropylene centrifuge tube (15 mL), and centrifuge it mildly again. Apply the supernatant by dividing it into 2-mL portions in a QIAGEN Genomic-tip 20/G equilibrated with 1 mL of QBT buffer. Wash the tip with 2 mL of QC buffer 3 times, transfer it to another centrifuge tube, and add 1 mL of QF buffer previously warmed to 50°C twice, and eluate the DNA. Transfer the eluate to a centrifuge tube, add a 0.7 times the eluate volume of isopropyl alcohol, mix them fully, perform centrifugation at 10,000 x g or more and low temperature (4°C) for 15 minutes, discard the supernatant, add 2 mL of 70% ethanol, and perform centrifugation

## 附件五

again at 10,000 x g or more and low temperature (4°C) for 5 minutes. Discard the supernatant, dry the precipitate with an aspirator, add 100  $\mu$ L of water, leave the solution at 65°C for 5 minutes, dissolve the DNA by pipetting, and use the solution as the DNA sample stock solution.

### 2.2.4 Determination of the purity of DNA in DNA sample stock solutions and storage of DNA sample solution

Dilute a proper amount of DNA sample by 10 times with TE buffer, determine the UV absorption spectrum of this dilution at 200-300 nm, and record its absorbencies at 260 nm and 280 nm (O.D. 260 and O.D. 280\*). Using the value for O.D. 260 as 50 ng/ $\mu$ L DNA, calculate the concentration of DNA and O.D. 260/O.D. 280. If the ratio is 1.7-2.0, the DNA is fully purified. Based on the determined DNA concentration, dilute the DNA stock solution with water to a concentration required for subsequent PCR reaction, dispense the solution in 20  $\mu$ L portions into micro tubes, freeze it, and store it at -20°C for use as the DNA sample solution. Use the sample solution immediately after melting. The remaining sample should not be used and must be discarded. Unless the concentration of the DNA sample stock solution reaches that required for PCR, use it as the DNA sample solution without dilution.

\* Regard the value for O.D. 260 as the absorbance derived from DNA, and the value for O.D. 280 as the absorbance derived from impurities such as proteins.

## 3. A Method for the foods produced by recombinant-DNA techniques whose safety assessments were reviewed

### 3.1. Soybeans

#### 3.1.1 ELISA-Method

The ELISA Method is used for detecting CP4EPSPS protein in a sample. Take 0.1 g of a ground sample sieved through a 100-mesh sieve (the mesh length is 150  $\mu$ m), subject them to the GMO Soya RUR Test Kit manufactured by SDI whose method is explained in the leaflet. The method is described as follows:

Measure 0.1 g of both a sample and a standard sample into centrifuging tubes made of polypropylen (50 mL). Add 20 mL of Soya Extraction buffer and, mix for at least 1 minute with a vortex mixer, and then let the mixture settle for five minutes until a clear supernatant appears. Use the supernatant as a sample solution. As the scope of the standard curve is 0-2.5% for SDI Kit, it is necessary to prepare also 1/10 dilution (diluted with Soya Extraction Buffer) in order to interpolate the quantitative value within the scope for a

## 附件五

sample solution. Put 100  $\mu$ L of each sample solution into Wells and incubate them at room temperature for one hour. Then wash the Wells four times with Wash buffer, add 100  $\mu$ L of the RUR Conjugate 1 and incubate them at room temperature for 30 minutes. Again wash the Wells four times with Wash buffer. Then add 100  $\mu$ L of the RUR Conjugate 2, and incubate it at room temperature for 30 minutes, then wash the Wells four times. Add 100  $\mu$ L of Color Reagent and incubate them at room temperature for 30 minutes. Add 100  $\mu$ L of the Stop Solution to stop color development. Read the absorbance of the developed color at 450 nm using a microtiter plate reader, and determine the GMO content by using the standard curve of the reference standard sample\*. Duplicate the test and average the two data.

\*extra-cost options

### 3.1.2. Quantitative PCR Method

Here the quantitative PCR method is used with Taqman Chemistry. In this method a luminescent origo-nucleotide probe is used. In this method, a luminescent origo-nucleotide probe, which anneals in the DNA sequence between the both primer pairs and has two dyes (reporter and quencher) is used. When this probe is hydrolysed by the 5'-nuclease activity of the DNA polymerase, the reporter dye is separated from the quencher dye and emits luminescence. The strength of luminescence shows exponential increase for the PCR cycle. Therefore, by comparing the PCR cycle number which has reached a certain luminescence, the amount of original DNA can be obtained. The quantitative analysis of GM products is to determine the amount of recombinant gene compared to the internal standard which is an universally present gene in the non-GMOs. In the case of soybeans, use the lectin-gene that is ubiquitous in soybeans as the internal standard. The number of copies of the lectin-gene in the DNA-sample is obtained by quantitative PCR which uses a primer pair (Le1-n02) detecting the lectin-gene and a probe (Le1-Taq). At the same time, the number of copies of the GM DNA recombinant gene in a sample is obtained by another quantitative PCR using a primer pair (RRS-01) and probe (RRS-Taq). The percentage of GMO in a sample is obtained from the following way.

- Divide the number of recombinant gene copies by the number of the lectin-gene copies.
- Divide this value again by the Internal standard ratio\*(which is determined previously), and multiply the result by 100.

In the following paragraphs we will describe the quantitative PCR. As for the water used in Quantitative PCR for 5.1.2., 5.2.2., unless otherwise specified, use water, which is purified

## 附件五

RO water purified using a reverse osmotic membrane or deionizing distilled water to 17 MΩ/cm by Milli-Q and is autoclaved at 121°C for 20 minutes or more.

\*Internal standard ratio: the ratio of the number of target recombinant gene to the number of internal standard gene (e.g. in the case of Soybeans, lectin gene) in seeds detected by a certain quantitative PCR. The internal standard ratio is provided separately for each primer pair and probe.

### 3.1.2.1 Making the standard solution for the standard curve

Prepare a GM plasmid DNA solution of which the number of copies has already been determined, using salmon sperm DNA solution (5ng/μL), and dilute GM plasmid DNA solution so that plasmid DNA in 2.5 μL makes standard curve (e.g. 10, 125, 1,500, 20,000, 250,000 copies)\*. Use the dilution as the standard solution for the standard curve.

\* Dilution of the DNA solution

### 3.1.2.2 Preparation of the solution for the PCR reaction

The composition of 25 μL solution for the PCR reaction is the following:

- 12.5 μL of Universal PCR Master Mix \*1
- 0.5 μmol/L (12.5 pmol) of Primer
- 0.2 μmol/L (5pmol) of Probe
- 2.5 μL (50ng) of 20ng/μL DNA sample solution or 2.5 μL of the standard solution for the standard curve, or 2.5 μL of 5ng/μL the salmon sperm DNA solution (blank experimental solution)

In order to minimize the differences between the PCR reactions, prepare PCR reaction solution for 3wells per each DNA sample solution\*2. Firstly prepare the mixture (Master Mix) of the Universal PCR Master Mix with the primer pair and the probe, which are a little more than quantity required, then mix up Master Mix with the each DNA sample and/or the blank sample in different centrifuge tubes. Divide this mix solution of 25 μL into each well on a plate and put the lid of the plate on. At this time, to be impartial, close alternately from both sides. Then, using a special roller, seal up the wells. Lastly observe the bottom of the wells, and if there are bubbles, knock lightly a rim of the plate to dissolve the bubbles.

## 附件五

### \*1 Universal Master Mix

This solution has high viscosity. Therefore, when adding to and mixing with other solutions, it is necessary to make sure that they are thoroughly mixed. If not, the PCR reaction possibly might not work well. Therefore after mixing it with a vortex for about 3 seconds just before usage, centrifuge lightly, and use after the solution has amassed at the bottom of the tube. When dividing the mixture into the wells, remember stirring and centrifuging will be difficult after this, put it into the bottom of the well accurately.

### \*2 Preparation of the solution for the quantitative PCR reaction

Take the reagents from the refrigerator, and if necessary, melt them at room temperature, then keep them on ice. If use the same tip successively for dividing, the usual handling will not work from the second time onward because the air is cooled in the pipette. It is necessary to read up on how to use the pipette at low temperatures in the manual of the pipette before starting the procedure.

#### 3.1.2.3 Quantitative PCR

ABI PRISM7700 or 5700 is used for the quantitative PCR. Set the plate onto the device. Check that the Cover temperature is around 105°C, begin the reaction and the reading of the data. The conditions for the reaction are as follows: After maintaining it at 50. C for 2 minutes, keep it at 95. C for 10 minutes. After starting the reaction with a hot start method, conduct 40 cycles of amplification reaction (30 seconds at 95. C and 1 minute at 59. C for 1 cycle). After the end of the reaction, analyse the results.

#### 3.1.2.4. Drawing the standard curve

The standard curve for the internal standard gene and the recombinant gene can be obtained from the following way:

On the amplification curve plotting the increasing amount of luminescent signals (DRn), select the DRn part where luminescent signals from both of the standard solution for the standard curve and DNA sample solution amplify exponentially, and draw a threshold line (Th). At this time, a threshold line (Th) must not cross the non-specific amplified curve from the blank sample solution. The exact drawing of a threshold line (Th) is performed as directed in the JAS analytical test handbook, "Genetically Modified Food Test and Analysis Manual for Individual Products," issued by IAI Center for Food Quality, Labeling, and Consumer Services of MAFF (the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). Use the point, where the Th and the luminescent signal of the standard solution for the standard curve cross, as the "threshold cycle" (Ct). Next, plot the Ct value (y-axis) for the

## 附件五

logarithm of copies of the (each) standard solutions for standard curve (x-axis). Use the approximate straight line obtained from each Ct as the standard curve.

### 3.1.2.5. Calculation of the content of the foods produced by recombinant-DNA techniques in samples

Obtain the Ct for unknown DNA sample, by using the Th of the standard curve. For each of the internal standard gene and recombinant gene, calculate the numbers of original genes' copies for all 3 Wells from the standard curve. Use the average of these values is to be the number of copies of the original internal standard gene and original recombinant gene. Calculate the amount of GMO contained in the products from following formula:

The GMO content in the products (%) = [(number of copies of the original recombinant gene) / (number of copies of the original internal standard genes x internal standard ratio)] x 100

In the case of soybeans, relevant GM variety is only "Round Up Ready Soybean", the value calculated from the number of copies of Le1 and RRS genes shows the percentage GMO in the product.

### 3.1.3 Judgment of result

Extract 3 times for each IP handling samples. If the average of the amount of GMO by ELISA or Quantitative PCR is more than 5%, the IP handling has possibly failed.

## 3.2 Corn

In case of corn, use only the quantitative PCR, not ELISA to quantify. Because not only there are various GM varieties which have different objective proteins, but also the expression amounts of the proteins in each GM variety are different even if a single kind of protein manifests for each GM variety.

### 3.2.1 Quantitative PCR method

As there are some GM varieties for corn, firstly subject to the screening, and quantify each GM variety separately based on the screening results, and judge from the result of total of the quantitative value for each GM variety. In the case of corn, use the starch synthase IIb (SSIb) gene as the universally present 'internal standard' gene. Calculate the amount of GMO content using following numbers formula as shown in 3.1.2.5.

- The number of copies of starch synthase IIb (SSIb) gene (obtained from the

## 附件五

primer pair SSIIb and probe SSIIb-Taq, which detects starch synthase IIb (SSIIb) gene).

The number of copies of target recombinant gene (obtained from the primer pair and probe, which detects target recombinant gene,)

### 3.2.1.1 Screening

#### 3.2.1.1.1. The Quantification of GM varieties inserted 35S promoter derived from the Cauliflower mosaic virus

As the GM varieties, Event 176, Bt11, T25 and Mon810, are inserted the 35S promoter (CaM) derived from the Cauliflower mosaic virus, concerning the mixtures in these varieties, it is possible to infer the approximate amount of GM contained from an index of these DNA contents. The method for the quantification is the same method as the quantitative PCR method described for the soybeans apart from the primer and the probe. Use starch synthase IIb (SSIIb) gene as internal standard gene, and the primer pair SSIIb and the probe SSIIb-Taq, which detect starch synthase IIb (SSIIb) gene. The primer pair and the probe for target gene is P35S-1 and P35S-Taq\*, respectively. The amount of GM inserted the 35S promoter (CaM) is calculated using a internal standard ratio that has been defined in the Annex.

\*The internal standard ratio in case of using P35S-1 and P35S-Taq, refer to calculated value for Mon810. Mon810 is the GM variety which is produced widest in the United States, there is only one copy of the 35S promoter in a recombinant DNA of Mon810, then there is little possibility in underestimating the amount of GMO in a sample. The concentration of P35S-Taq is 0.1  $\mu$  mol/L (2.5 pmol).

#### 3.2.1.1.2 Determination of GA21

GA21 GM variety is not inserted CaM gene. Therefore, it is necessary to quantify the content of this variety using the same DNA sample, which is used for the determination of CaM gene. The amount of GA21 is obtained from calculating the number of copies of GA21 with same method as described in 3.2.1.1.1., using GA21-3 and GA21-Taq (GA21 specific primer and probe, respectively), for the same sample as analyzing CaM.

#### 3.2.1.1.3 Judgment of the Results

Each sample is extracted once and subject to quantitative PCR. If the sums of the amount of GMO inserted CaM gene sequence and the amount of GA21 is higher than 4.5%, extract more twice. In this case, perform Specific determination of GM corn varieties for each DNA sample solution (from 3 times extraction).



## 附件五

### 3.2.1.2. Specific determination of GM corn varieties

#### 3.2.1.2.1. Determination of Event 176, Bt 11, T25 and Mon 810

As quantitative primer and probe, use E-176-2 and E 176-Taq, Bt 11-3 and Bt 11-Taq, and T25-1 and T25-Taq, and M810-2 and M810-Taq, for GM varieties of Event 176, Bt 11, T25 and Mon 810, respectively. The number of copies of the varieties Event 176, Bt 11, T25 and Mon 810 are obtained by the same method as described in 3.2.1.1. Then determine the content of Event 176, Bt 11, T25 and Mon 810.

#### 3.2.2 Judgement of the Results

Calculate the total amount for each DNA sample solution of GA21, Event 176, Bt 11, T25 and Mon 810 obtained under 3.2.1.1.2. If the average of each total for a sample is more than 5%, the IP handling of the sample has possibly failed.

(Annex) Internal Ratio.

Food	Varieties	Internal Ratio	Standard	Remarks
Soybeans	Roundup Ready Soybean	0.95		Le1-n02 and Le1-Taq, RRS-01 and RRS-Taq
Corn	Not specified (Screening)	0.39		SSIIb and SSIIb-Taq, P35S-1 and P35S-Taq
Corn	GA21	1.40		SSIIb and SSIIb-Taq, GA21-3 and GA21-Taq
Corn	Event176	2.05		SSIIb and SSIIb-Taq, E176-2 and E176-Taq
Corn	Bt11	0.50		SSIIb and SSIIb-Taq, Bt11-3 and Bt11-Taq
Corn	T25	0.34		SSIIb and SSIIb-Taq, T25-1 and T25-Taq
Corn	Mon810	0.38		SSIIb and SSIIb-Taq, Mon810-2 and Mon810-Taq

(For your information)

## 附件五

1 You can purchase AP1/AP2 buffer and RNase A separately used in "2.2.1.2 Silica-gel membrane-type kit method" from QIAGEN (Forefront Tower II, 3-13-1 Kachidoki Chuo-Ward Tokyo 104-0054 Japan, Tel: +81-3-5547-0811, Fax: +81-3-5547-0818).

2 You can purchase GM standard plasmid DNA used in "3.1.2.1 Making the standard solution for the standard curve" from NIPPON Gene (1-29 Tonya-cho Toyama-City Toyama 930-0982 Japan, Tel: +81-76-451-6548, Fax: +81-76-451-6547).

3 You can purchase the primer pairs and the probes used in "3.1.2.2 Preparation of the solution for the PCR reaction" from NIPPON GENE and FASMAC (5-1-3 Midorigaoka, Atsugi-City, Kanagawa 243-0041 Japan, Tel: +81- 46-295-8787, Fax: +81- 46-294-3738).

---

[Top](#)

---

[Index / Home](#)

## 附件六

### 基因改造馬鈴薯定 DNA 萃取

樣品：

1. Non-GM : DANSHAKU 男爵
2. GM : 0.1% NewLeaf plus、1% NewLeaf plus、0.1% NewLeaf Y, and 1% NewLeaf plus

DNA extraction ( 2 copies ) :

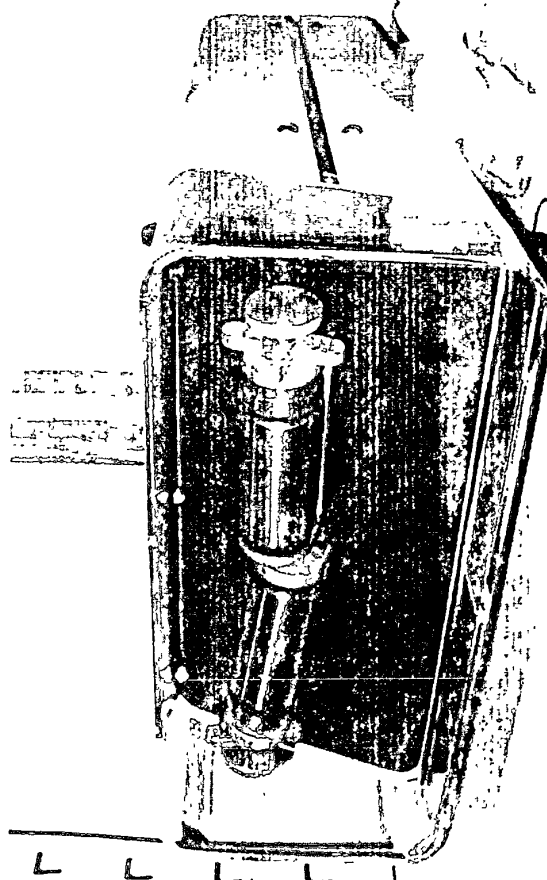
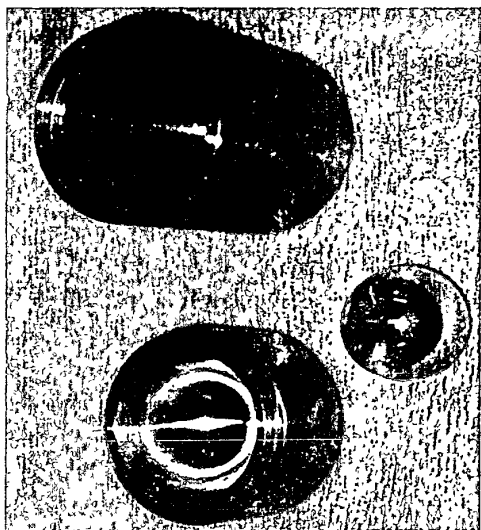
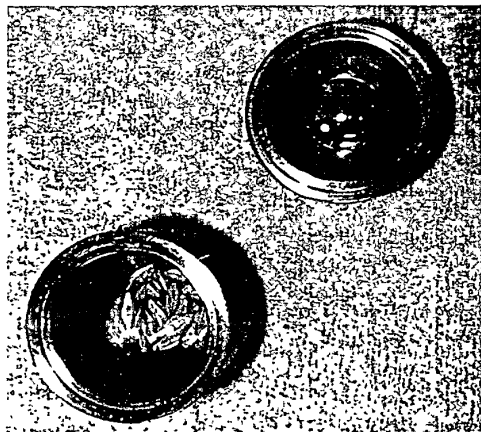
DNA conc. of each extraction :

	230 nm	260 nm	280nm	320 nm	260 nm / 280 nm	Conc. ( ng / $\mu$ L
DANSYAKU 男爵 No.1	0.097	0.144	0.096	0.021	1.532	144
DANSYAKU 男爵 No.2	0.091	0.141	0.094	0.020	1.5	141
0.1% NewLeaf plus No.1	0.081	0.119	0.081	0.019	1.469	119
0.1% NewLeaf plus No.2	0.074	0.117	0.079	0.016	1.481	117
1% NewLeaf plus No.1	0.064	0.096	0.063	0.011	1.524	96
1% NewLeaf plus No.2	0.074	0.108	0.074	0.018	1.459	108
0.1% NewLeaf Y No.1	0.068	0.105	0.069	0.012	1.522	105
0.1% NewLeaf Y No.2	0.061	0.089	0.060	0.011	1.483	89
1% NewLeaf Y No.1	0.062	0.095	0.063	0.012	1.508	95
1% NewLeaf Y No.2	0.054	0.086	0.055	0.007	1.564	86

Dilute each extracted DNA by H<sub>2</sub>O to obtain ~100  $\mu$  L 10 ng /  $\mu$  L DNA solutions.

Store the original DNA solutions at -20°C.

附件七



Retsch  
MM 200  
磨粉機

## 附件八

### 基因改造馬鈴薯在日本

據聞 MONSATO 公司出品之 3 種品系基因改造馬鈴薯<sup>1</sup>即將停產，這邊亦證實該傳聞。惟何以日本仍極力研擬定量定性方法？是否為因應日本研發種植之本土品種基因改造馬鈴薯？

關於此問題，經詢問，獲得解答如下：

1. 儘管 MONSATO 公司將停產其基因改造馬鈴薯，日本政府仍對基因改造馬鈴薯設定限制(0.05%)，並擬定檢驗方法。「It's all the government reason!」, Said by Dr. Watanabe.
2. 日本對 3 種品系基因改造馬鈴薯進行安全性評估<sup>2</sup>，已完成兩種<sup>3</sup>，另一種還在評估中。預期 3 種品系都將可合法於日本市場販售，只要輸入之基因改造馬鈴薯合於規定之 0.05%GM 含量限制。
3. 日本沒有自行開發基因改造馬鈴薯。
4. 所有輸入日本的馬鈴薯（含基因改造與非基因改造），必須是加工過之馬鈴薯產品<sup>4</sup>，整顆完整、可以發芽生長的馬鈴薯不能進口。因此，基本上，日本不會有基因改造馬鈴薯的栽種。
5. MONSATO 公司已經改變策略，將基因改造馬鈴薯之栽種從美洲，移轉至俄國、南亞的印度和中亞地區種植。目前日本有大量的馬鈴薯產品自俄國進口，所以檢驗或仍有必要。
6. 現已有定性的方法，定量的方法正在研究中。
7. 關於 0.05%GM 含量限制，定性方法並無必要做到可測得 0.05%以下，但目前方法應該可以達到此目標。理由是 New Leaf 和 New Leaf plus 已經通過日本安全性評估，預期將來 New Leaf Y 也會通過，所以將來日本政府毋須對 GM potato 做定性，只要針對 0.05%GM 含量限制做定量即可。
8. 關於定性，有兩個階段（PCR reactions），第一階段 PCR（for detection）使用兩組 primer sets<sup>5</sup>，第二階段 PCR（for confirmation）使用一組 primer sets<sup>6</sup>。日本官方方法，明訂第一階段檢出陽性之檢體，方需再進行第二階段確認<sup>7</sup>。

---

<sup>1</sup> New Leaf、New Leaf Y and New Leaf plus.

<sup>2</sup> 即急毒性、慢毒性、致過敏性、致突變性、致癌性等評估，必須與非基因改造馬鈴薯無差異。

<sup>3</sup> New Leaf and New Leaf plus.

<sup>4</sup> 馬鈴薯條、馬鈴薯塊、馬鈴薯粉等。

<sup>5</sup> Primers for detection of endogenous gene, PSS (potato sucrose synthetase)、Primers for detection of the region between exogenous regulatory gene and exogenous structure gene

<sup>6</sup> Primers for detection of exogenous structure gene

<sup>7</sup> 為何兩階段須分別進行?以及為何須進行第二階段之確認，乃日本政府為求精確之故。

## 附件九

### 基因改造馬鈴薯定性試驗

目的：Validation of inspection for GM potato by qualitative PCR methods<sup>1</sup>

樣品：

1. Non-GM：DANSHAKU 男爵<sup>2</sup>
2. GM：0.1% NewLeaf plus、1% NewLeaf plus、0.1% NewLeaf Y, and 1% NewLeaf plus<sup>3,4</sup>

DNA extraction (2 copies)：

DNA conc. of each extraction：

	230 nm	260 nm	280nm	320 nm	260 nm / 280 nm	Conc. (ng / $\mu$ L)
DANSYAKU 男爵 No.1	0.097	0.144	0.096	0.021	1.532	144
DANSYAKU 男爵 No.2	0.091	0.141	0.094	0.020	1.5	141
0.1% NewLeaf plus No.1	0.081	0.119	0.081	0.019	1.469	119
0.1% NewLeaf plus No.2	0.074	0.117	0.079	0.016	1.481	117
1% NewLeaf plus No.1	0.064	0.096	0.063	0.011	1.524	96
1% NewLeaf plus No.2	0.074	0.108	0.074	0.018	1.459	108
0.1% NewLeaf Y No.1	0.068	0.105	0.069	0.012	1.522	105
0.1% NewLeaf Y No.2	0.061	0.089	0.060	0.011	1.483	89
1% NewLeaf Y No.1	0.062	0.095	0.063	0.012	1.508	95
1% NewLeaf Y No.2	0.054	0.086	0.055	0.007	1.564	86

Dilute each extracted DNA by H<sub>2</sub>O to obtain ~100  $\mu$ L 10 ng /  $\mu$ L DNA solutions.  
Store the original DNA solutions at -20°C.

<sup>1</sup> 日本政府對將從事 GM 作物檢驗的實驗室,依公定之檢驗方法進行檢驗能力測試 (Accuracy test)。對 GM potato (0.1% and 1% NewLeaf plus、NewLeaf Y), 現在有 15 個日本國內實驗室參與此項協同試驗。根據目前已知的結果,所有的實驗室每次均可以檢出 1%之兩種品系 GM potato,但是 0.1%並不是每個實驗室每次都可檢出。精度試驗樣品是由 Akiyama 實驗室製備的,方法如註解 4。此外,去年也對相同的 15 實驗室做 CBH351 之定性協同試驗。大豆只進行 ELISA 方法。木瓜則未進行。

<sup>2</sup> The major strain of potato eaten in Japan.

<sup>3</sup> Standard are obtained from MONSATO Co.

<sup>4</sup> Add 100% GM to Non-GM DANSHAKU potato to make 0.1% and 1% GM samples.

## 附件九

### 定性試驗 (Qualitative PCR)

#### The compositions of reaction solution<sup>5</sup>

	Final conc.
10 × PCR buffer	1 ×
MgCl <sub>2</sub>	3.0 mM
dNTP	2.0 mM
F-primer	0.2 μM
R-primer	0.2 μM
Taq polymerase <sup>6</sup>	0.625-units
Template DNA	25 ng
H <sub>2</sub> O	Fill to bring a 25 μL final reactant

#### Preparation

	Volume
10 × PCR buffer	2.5 μL
MgCl <sub>2</sub>	3 μL
dNTP	2.5 μL
F-primer	1 μL
R-primer	1 μL
Taq polymerase	0.125 μL
Template DNA (10 ng/μL)	2.5 μL
H <sub>2</sub> O	12.375 μL
Total volume	25 μL

#### The PCR program<sup>7</sup>

95°C 10 min  
 95°C 30 sec   
 60°C 30 sec 40 cycles  
 72°C 30 sec   
 72°C 7 min

<sup>5</sup> See "Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques in Japan", 2.1.1.2.1.

<sup>6</sup> AmpliTaq Gold, 5 units/μL

<sup>7</sup> See "Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques in Japan", 2.1.1.2.1

## 附件九

### Detection of New Leaf Y potato (including processed food)<sup>8</sup>

Using a detection primer pair that produces (detects) a 100 bp amplified band for detection of New Leaf Y and a Pss<sup>9</sup> primer pair (detects the Patatin gene universally existing in potato) that produces (detects) a 100 bp amplified band for positive control (to detect reference gene). For the confirmation test of New Leaf Y presence, use a confirmation primer pair that produces (detects) a 100 bp amplified band for detection of PVY-cp<sup>10</sup> gene.

#### New Leaf Y detection primer pair

F-primer (p-FMV05-5'): 5'-AAA AGA GCT GTC CTG ACA GC-3'

R-primer (PVY02-3'): 5'-TCC TCC TGC ATC AAT TGT GT-3'

#### Pss primer pair (for detection of the patatin gene)

F-primer (Pss01n-5'): 5'-TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT-3'

R-primer (Pss01n-3'): 5'-GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCG A-3'

#### PVY-cp gene detection primer pair

F-primer (PVY01-5') : 5'-GAA TCA AGG CTA TCA CGT CC-3'

R-primer (PVY01-3') : 5'-CAT CCG CAC TGC CTC ATA CC-3'

### Detection of New Leaf plus potato

Using a detection primer pair that produces (detects) a 100 bp amplified band for detection of New Leaf plus and a Pss primer pair for positive control. For the confirmation test of New Leaf plus presence, use a confirmation primer pair that produces (detects) a 100 bp amplified band for detection of PLRV-erp<sup>11</sup> gene.

#### New Leaf plus detection primer pair

F -primer (p-FMV02-5'): 5'-AAA TAA CGT GGA AAA GAG CTG TCC TGA-3'

R-primer (PLRV01-3'): 5'-AAA AGA GCG GCA TAT GCG GTA AAT CTG-3'

Pss primer pair (for detection of the patatin gene)--- The same to the New Leaf Y

---

<sup>8</sup> See "Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques in Japan", 2.1.3.

<sup>9</sup> Potato sucrose synthetase

<sup>10</sup> Potato virus V core protein

<sup>11</sup> Potato leaf roll virus replicase



## 附件九

PLRV-rep gene detection primer pair

F-primer (PLRV-rep1-5') : 5'-CTT CTT TCA CGG AGT TCC AG-3'

R-primer (PLRV-rep1-3') : 5'-TCG TCA TTA AAC TTG ACG AC-3'

Perform PCR reaction in ABI PCR system 9700

Electrophoresis

Observe the results under UV light

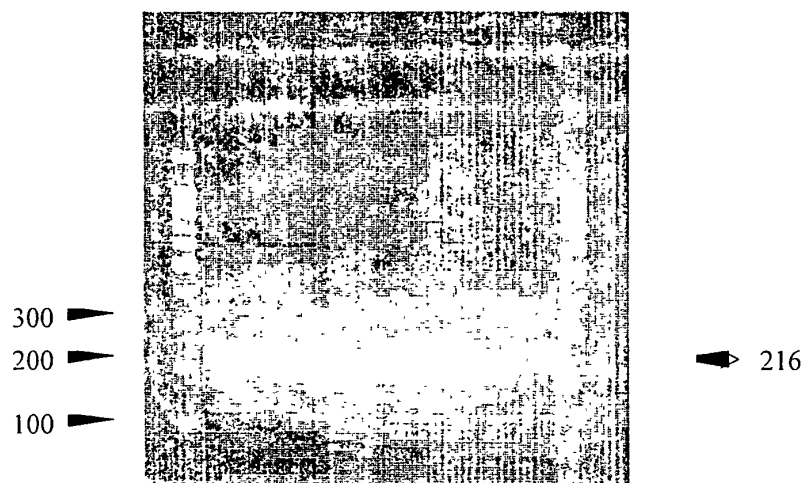
Results :

	PSS 216 bp band	Detection of New Leaf Y 225 bp	Detection of New Leaf plus 234 bp	Confirmation of New Leaf Y 161 bp	Confirmation of New Leaf plus 172 bp
DANSYAKU 男爵 No 1	+	-	-	-	-
DANSYAKU 男爵 No.2	+	-	-	-	-
0.1% NewLeaf plus No.1	+	-	+	-	+
0.1% NewLeaf plus No 2	+	-	+	-	+
1% NewLeaf plus No.1	+	-	+	-	+
1% NewLeaf plus No 2	+	-	+	-	+
0.1% New Leaf Y No 1	+	+	-	+	-
0.1% New Leaf Y No 2	+	+	-	+	-
1% New Leaf Y No 1	+	+	-	+	-
1% New Leaf Y No.2	+	+	-	+	-
H <sub>2</sub> O negative control	-	-	-	-	-

## 附件九

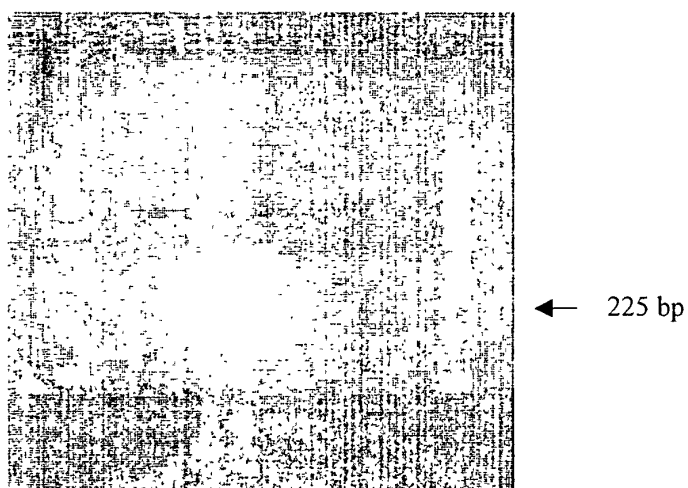
### Detection PCR

#### 1. PSS detection



From lane 1 to lane 13 : Marker 、 Non-GM1 、 Non-GM2 、 0.1% NLP1 、 0.1% NLP2 、 1% NLP1 、 1% NLP2 、 0.1% NLY1 、 0.1% NLY2 、 1% NLY1 、 1% NLY2 、 NTC and marker. All PCR reaction produces a 216 bp amplicon, except for NTC.

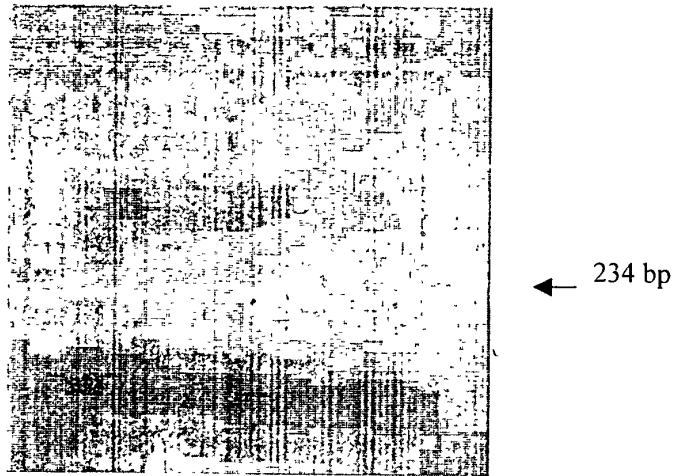
#### 2. Detection of New leaf plus



From lane 1 to lane 13 : Marker 、 Non-GM1 、 Non-GM2 、 0.1% NLP1 、 0.1% NLP2 、 1% NLP1 、 1% NLP2 、 0.1% NLY1 、 0.1% NLY2 、 1% NLY1 、 1% NLY2 、 NTC and marker. Lane 4 、 5 、 6 and 7 have 225 bp products. The other PCR reactions have no product.

## 附件九

### 3. Detection of New leaf Y



From lane 1 to lane 13 : Marker 、 Non-GM1 、 Non-GM2 、 0.1% NLP1 、 0.1% NLP2 、 1% NLP1 、 1% NLP2 、 0.1% NLY1 、 0.1% NLY2 、 1% NLY1 、 1% NLY2 、 NTC and marker. Lane 8 、 9 、 10 and 11 have 234 bp products. The other PCR reactions have no product.

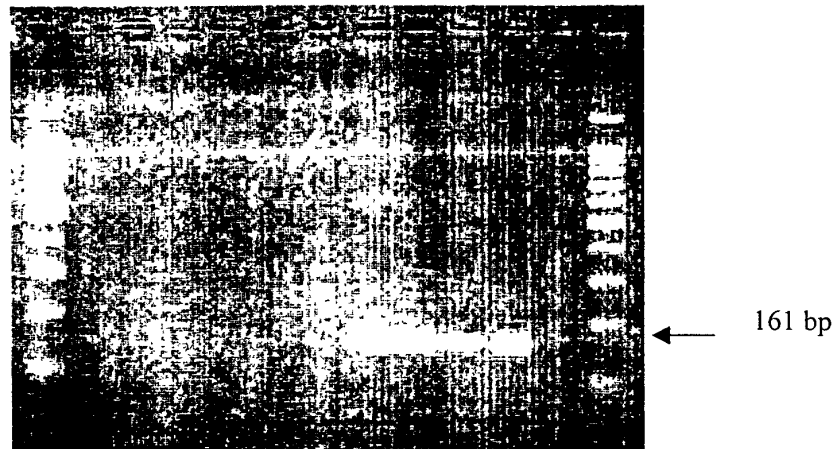
### 4. Confirmation of New leaf plus



From lane 1 to lane 13 : Marker 、 Non-GM1 、 Non-GM2 、 0.1% NLP1 、 0.1% NLP2 、 1% NLP1 、 1% NLP2 、 0.1% NLY1 、 0.1% NLY2 、 1% NLY1 、 1% NLY2 、 NTC and marker. Lane 4 、 5 、 6 and 7 have 172 bp products. The other PCR reactions have no product.

## 附件九

### 5. Confirmation of New leaf Y



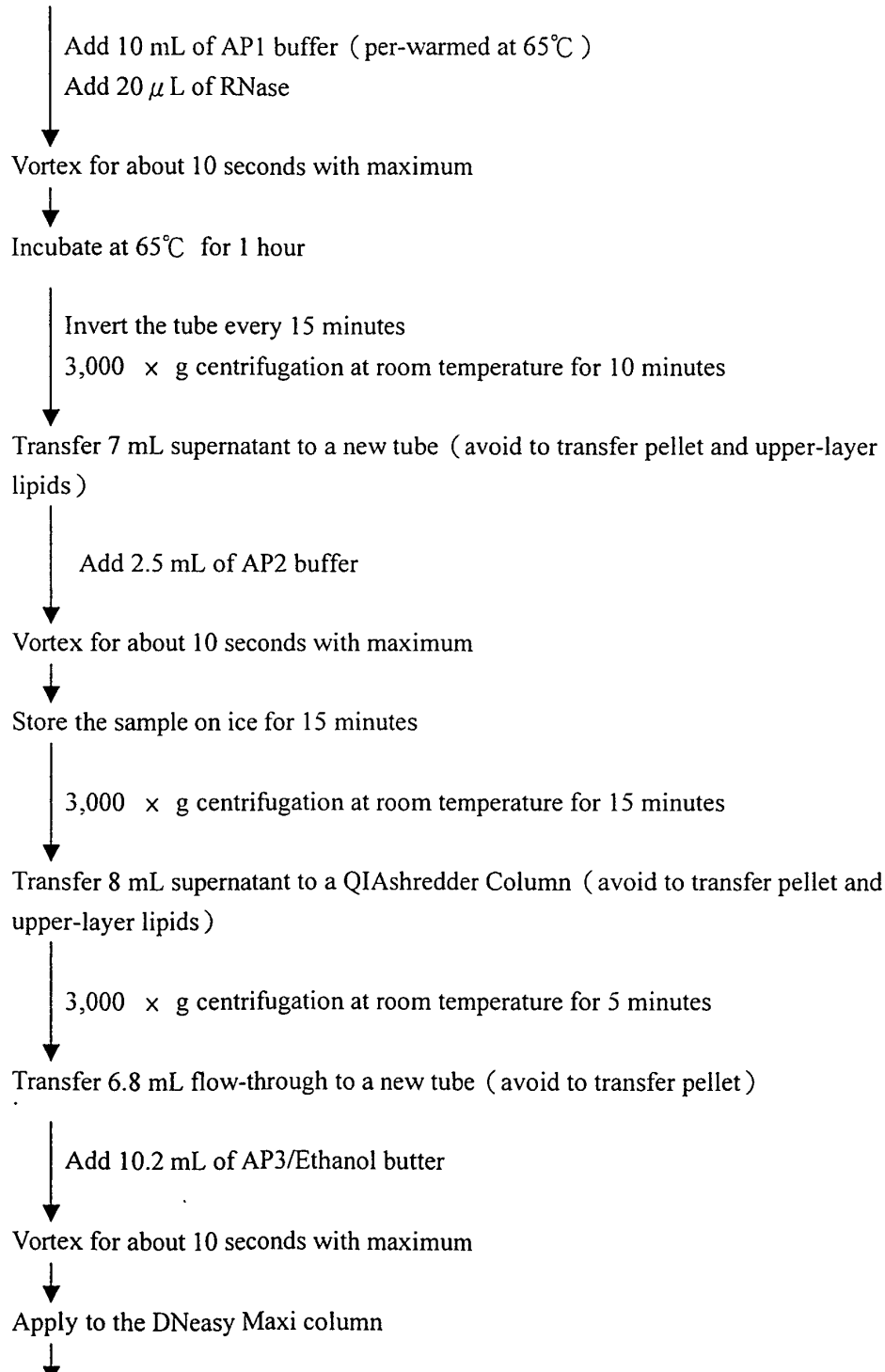
From lane 1 to lane 13 : Marker 、 Non-GM1 、 Non-GM2 、 0.1% NLP1 、 0.1% NLP2 、 1% NLP1 、 1% NLP2 、 0.1% NLY1 、 0.1% NLY2 、 1% NLY1 、 1% NLY2 、 NTC and marker. Lane 8 、 9 、 10 and 11 have 161 bp products. The other PCR reactions have no product.

附件十

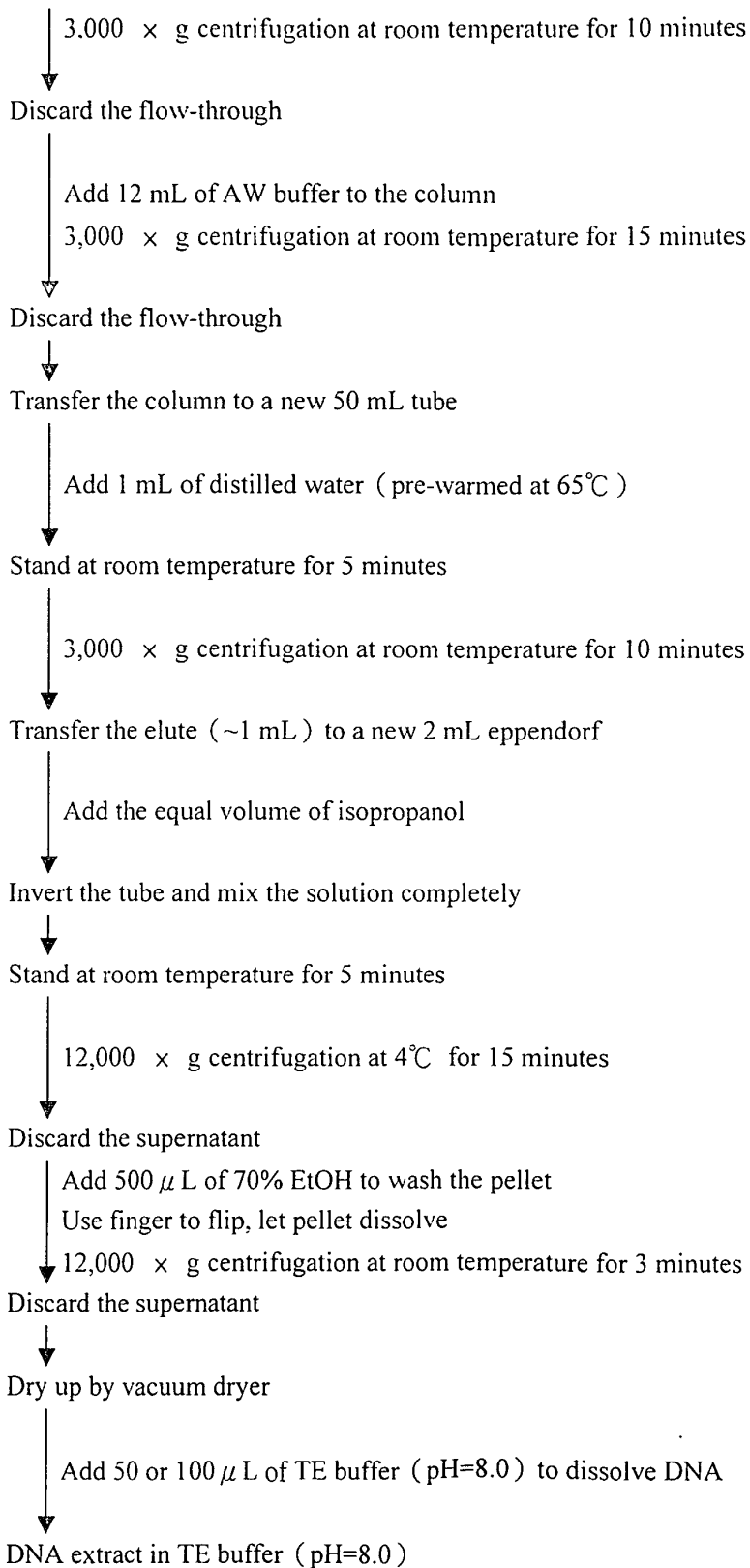
**Extraction Methods Using QIAGEN Plant Maxi Kit**

**For 2 gram samples ( for soybean and rice ) :**

Weight 2 g of sample powder, put into a 50 mL tube



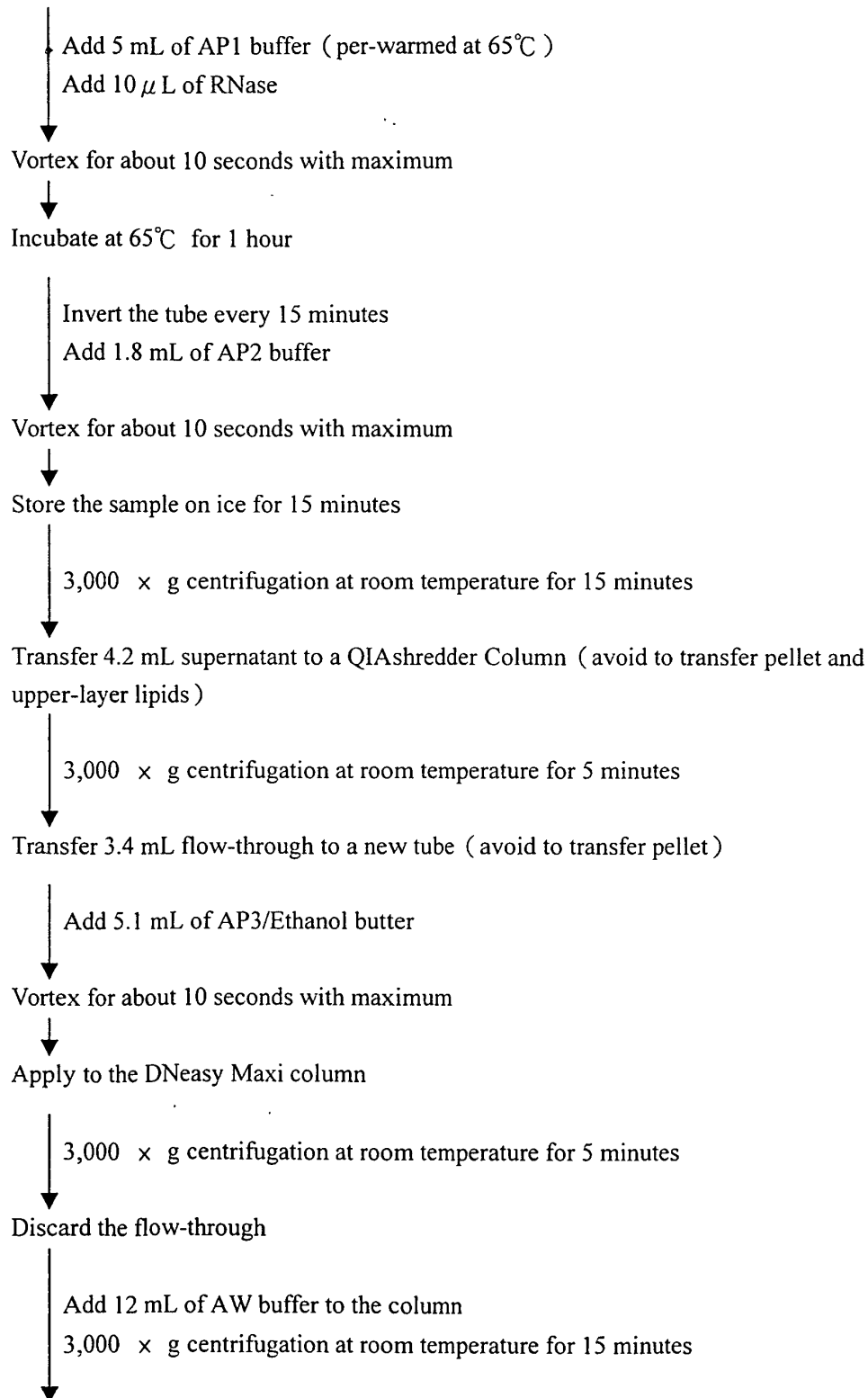
附件十



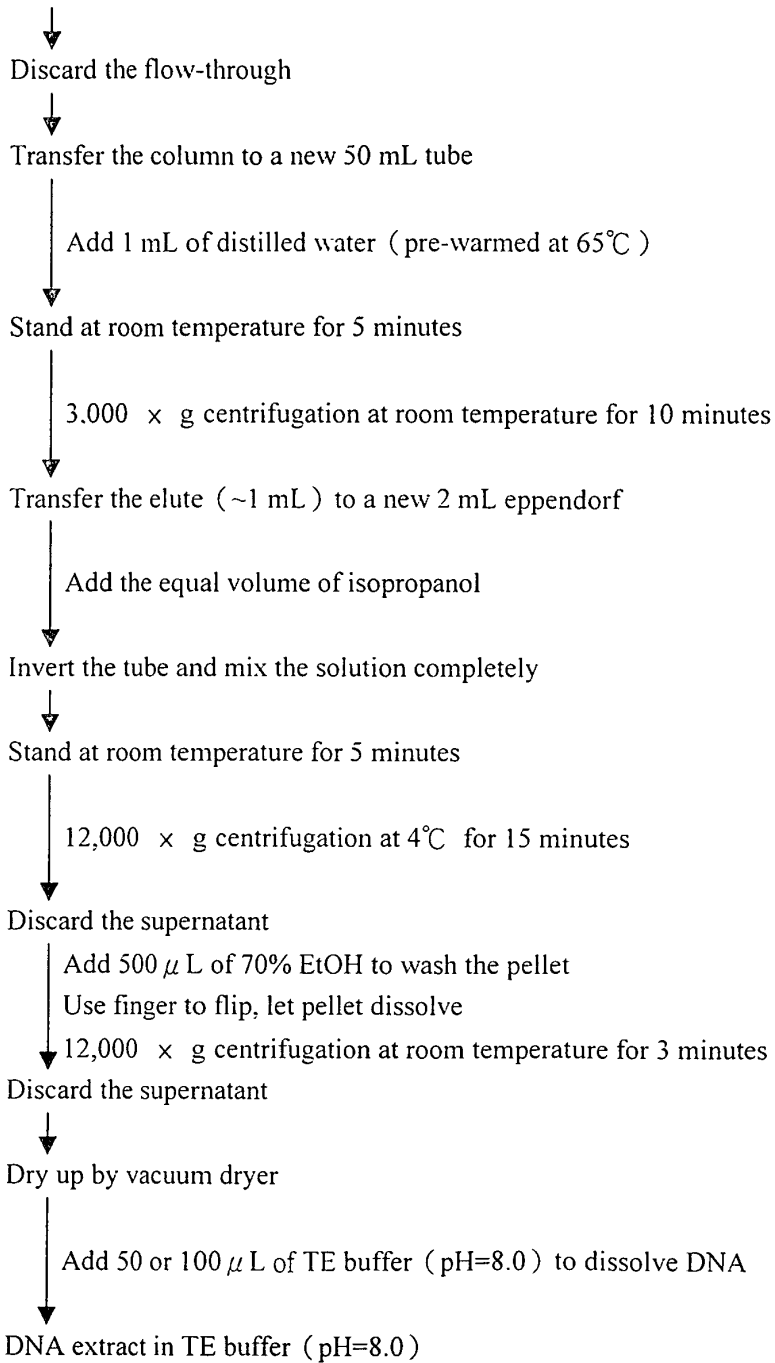
## 附件十

**For 1 gram samples ( for maize, wheat, barley and buckwheat ) :**

Weight 1 g of sample powder, put into a 50 mL tube



附件十



Translated from 「Protocol of DNA Extraction – Using for Blinder test」, Version 1.0 (Jan. 26. 2001), Japan.



## 附件十一

### Use QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit to Extract DNA of Cereals

#### Samples :

1. Barley 大麥
2. Rice 稻米
3. Buckwheat 蕎麥
4. Bt11Corn 玉米
5. T25 Corn 玉米
6. MON 810 Corn 玉米
7. Event 176 Corn 玉米
8. Round up Ready Soybean 大豆

#### Grinding and sampling :

1. Use Retch MM 200 to mill an appropriate amount of sample granules.
2. Weight 1 g or 2 g sample powder :

	Sampling weight
Barley	1 g
Rice	2 g
Buckwheat	1 g
Corn Bt11	1 g
Corn T25	1 g
Corn MON 810	1 g
Corn Event 176	1 g
Soybean Round up Ready	2 g

#### Extraction of DNA :

##### Method :

1. Use QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit
2. Use「Protocol of DNA Extraction – Using for Blinder test」, Version 1.0( Jan. 26. 2001 ) , Japan.

附件十一

The conc. and quality of extracted DNAs :

	230 nm	260 nm	280nm	320 nm	260 nm / 280 nm	Conc. ( ng / $\mu$ L
Barley	0.138	0.179	0.113	0.020	1.584	179 <sup>1</sup>
Rice	0.052	0.044	0.027	0.005	1.630	44 <sup>2</sup>
Buckwheat	0.136	0.068	0.046	0.000	1.478	68 <sup>3</sup>
Corn Bt11	0.234	0.444	0.261	-0.000	1.701	444
Corn T25	0.436	0.899	0.530	0.003	1.692	899
Corn MON 810	0.431	0.884	0.525	0.013	1.684	884
Corn Event 176	0.233	0.432	0.252	-0.006	1.714	432
Soybean Round up Ready	0.656	0.124	0.133	0.048	0.932	124 <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Extraction of DNA from 1 g of barley obtained DNA in low conc.

<sup>2</sup> Previous extraction of DNA from 1 g of rice obtained very rare DNA. In this time, extraction of DNA from 2 g of rice still obtained only a few of DNA.

<sup>3</sup> Extraction of DNA from 1 g of buckwheat also obtained a few of DNA.

<sup>4</sup> The DNA quality in this extraction is not good, and the DNA conc. is low

## 附件十二

### Quantitative PCR Performed by ABI 7000

**Purpose :** Blinder tests for validation of coefficient values in quantitative PCR performed by ABI 7000

**Introduction :** Although the coefficient values of 5 GM maize and 1 GM soybean<sup>1</sup> in ABI 5700 and ABI 7700 machines were established<sup>2</sup>, Japan government still plan to establish the coefficient values of these GM cereals in ABI 7000 and in ABI 7900 machines. The preliminary works have obtained the coefficient values of these GM cereals in ABI 7000 and in ABI 7900 machines<sup>3</sup>. Now the blinder test are undergoing to validation these new coefficient values, and to confirm methods of GMO inspections that used ABI 7000 and in ABI 7900 machines. In this experiment, 3 detection of MON 810 GM corns is performed. Sample A is judged as Non-GM. Sample B contains 5% MON 810. Sample C is 100% MON 810 corn.

**Reference materials :**

Plasmid DNA in 20、125、1,500、20,000 and 250,000 copies/ $\mu$ L

**Unknown samples :**

Unknown sample A、Unknown sample B and Unknown sample C

**Detection<sup>4</sup> :**

1. SSIIb gene ( endogenous gene )
2. MON 810 specific region
3. 35S promoter region

Each performs 3 repeats

---

<sup>1</sup> GM maize : Bt11、Event 176、T25、MON 810 and GA21. GM soybean : Round-up Ready.

<sup>2</sup> Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques, version 2, 2002/4/30

<sup>3</sup> Data are still closed

<sup>4</sup> The information of primers and of probes are closed



附件十二

PCR program :

50°C 2min  
 95°C 10 min  
 95°C 30 sec }  
 40 cycles  
 59°C 1 min }

Results :

1. Determine the threshold line of SSIb runs<sup>5</sup> :

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	增 (A)	ΔA  (%)	ΔA  条	備考	採用値
0	1	0.001	0.009	-0.323	18.229	1247.95				
1	2	0.002	0.003	-0.182	18.275	10758.63	24801.61			
2	4	0.004	0.013	-0.406	20.101	289.39	99.91			
3	8	0.008	0.416	-3.216	33.305	2.05	99.29			
4	16	0.016	0.810	-4.047	39.383	77	13.68			
5	32	0.032	0.987	-3.816	40.282	1.83	3.51			
6	64	0.064	0.994	-3.698	40.703	1.86	1.93			
7	128	0.128	0.996	-3.647	41.364	1.88	0.87			
8	256	0.256	0.996	-3.610	42.204	1.89	0.66			*
9	512	0.512	0.995	-3.612	43.414	1.89	0.03			
10	1024	1.024					0.71		Plot out	
11	2048	2.048								

<sup>5</sup> The rule to determine the threshold line is formulated by specialists of statistics in NFRI. The principles will not be introduced here.

附件十二

The threshold line of SSIIb runs is determined as 0.128.

2. Determine the threshold line of 35S runs :

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	增 (A)	ΔA  (%)	ΔA  条	備考	採用値
0	1	0.001	0.103	-0.909	19.209	12.58	2.48			
1	2	0.002	0.105	-0.918	19.264	12.27	4.76			
2	4	0.004	0.199	-0.937	19.373	11.68	57.30			
3	8	0.008	0.165	-1.433	21.944	4.99	12.77			
4	16	0.016	0.141	-1.333	22.446	5.63	36.60			
5	32	0.032	0.193	-1.811	27.969	3.57	45.15			
6	64	0.064	0.979	-3.431	37.622	1.96	0.12	2		
7	128	0.128	0.995	-3.425	38.616	1.96	1.06	2		
8	256	0.256	0.994	-3.480	39.758	1.94	1.02	2		*
9	512	0.512	0.994	-3.535	40.873	1.92	0.05	2		
10	1024	1.024	0.994	-3.552	42.128	1.92				
11	2048	2.048							Plot out	

The threshold line of 35S runs is determined as 0.256.

附件十二

3. Determine the threshold line of MON 810 specific runs :

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	增 (A)	ΔA  (%)	ΔA  条	備考	採用值
0	1	0.001	0.491	-0.737	18.556	22.78				
							35.58			
1	2	0.002	0.205	-0.857	19.541	14.67				
							49.14			
2	4	0.004	0.193	-1.146	20.880	7.46				
							63.80			
3	8	0.008	0.400	-2.317	27.369	2.70				
							10.61			
4	16	0.016	0.508	-2.612	31.016	2.41				
							19.38			
5	32	0.032	0.986	-3.457	36.570	1.95				
							1.43			
6	64	0.064	0.997	-3.384	37.409	1.97				
							0.60	1		
7	128	0.128	0.997	-3.355	38.188	1.99				
							0.64	1		
8	256	0.256	0.998	-3.387	39.262	1.97				*
							0.19	1		
9	512	0.512	0.998	-3.377	40.387	1.98				
							0.24	1		
10	1024	1.024	0.998	-3.365	41.869	1.98				
11	2048	2.048							Plot out	

The threshold line of MON 810 specific runs is determined as 0.256.

附件十二

Key in each threshold line determined to obtain the raw data of each run.

	SSIib	35S	
Unknown A	11833.24	0	
Unknown B	12346.86	264.36	
Unknown C	19164.82	9856.39	

The values are average values of 3 repeats of each run.

Use raw data to calculate the MON 810 percentages of unknown samples.<sup>6, 7, 8</sup>

	35S	MON 810 specific
Unknown A	0 %	0 %
Unknown B	5.490029 %	5.341439 %
Unknown C	131.8708 %	109.14695 %

**Conclusion :**

1. Sample unknown A is Non-GM sample.
2. Sample unknown B contains 5% MON 810.
3. Sample unknown C is 100% MON 810.

<sup>6</sup> Number of copies of the original recombinant gene / [ (number of copies of the original internal standard genes) × internal standard ratio] × 100

<sup>7</sup> See Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques, version 2, 2002/4/30

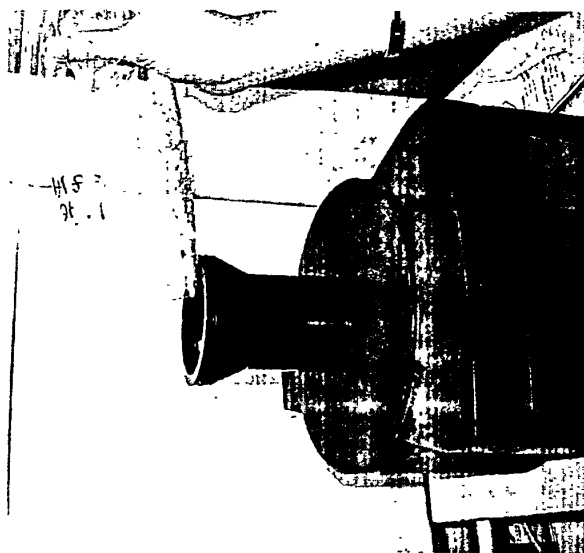
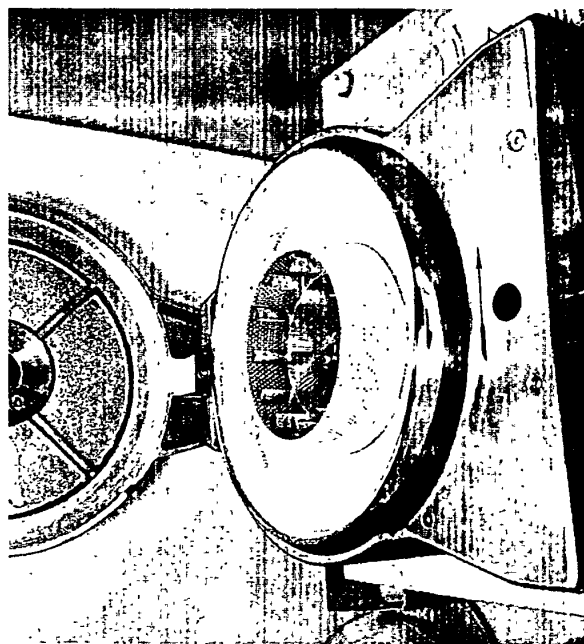
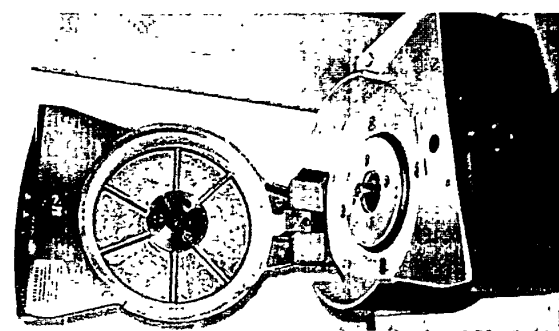
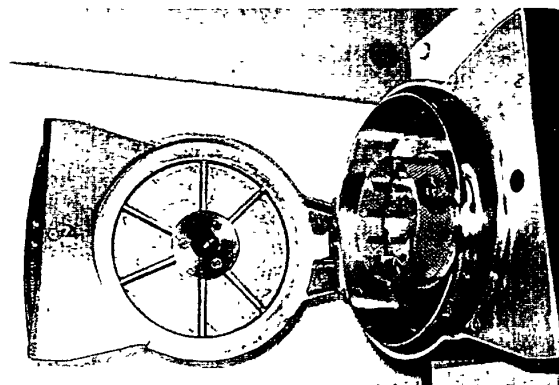
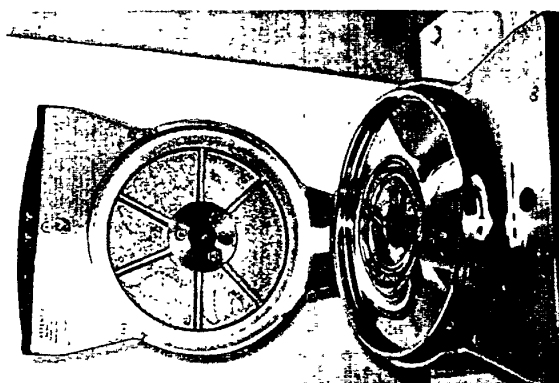
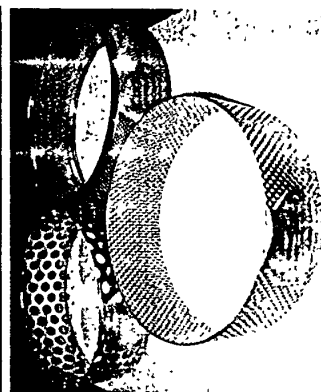
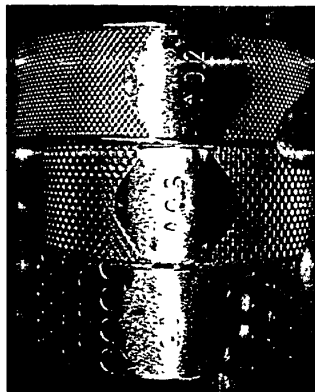
<sup>8</sup> The internal standard ratios of MON 810 specific and of 35S, which are used in these calculations are in compliance to 「Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques, version 2, 2002/4/30」. Actually, the internal standard ratios are specified for ABI 5700 and for ABI 7700, not for ABI 7000. The internal standard ratios of MON 810 and of 35S for ABI 7000 are already decided. However, they still are closed. So, the calculations used the internal standard ratios for ABI 5700/ABI 7700. Since the internal standard ratios for ABI 7000 are more or less the same to those for ABI 5700/ABI 7700, the judgments are correct.





Blade - for breaking sample

Mesh - 6 mm, 0.5 mm and 0.2 mm in pore size



Retsch  
MM 100  
磨粉機

## 附件十四

### 食品中過敏源之檢驗與標示在日本

緣起：近年來日本人之食因性過敏症（food-born allergy）罹患率逐年攀升，每年遭受食物性過敏源所擾者眾，故日本政府即著手進行食品中過敏源之檢驗，以及含過敏源食物之標示之計劃，使日本國民得對食物加以選擇，避免食用引起自身過敏之食品，以保障日本國民之健康，並降低醫療資源與社會成本之浪費。

概述：根據臨床醫師對食因性過敏症的患者所做之診斷統計資料，顯示造成食因性過敏症的食物，包含各類日本人日常食用之食品。依據統計數據，日本政府將引起過敏症之食物加以歸類。計有 1.五種主要引起過敏症之食物（primary allergenic food）、2.十九種次要引起過敏症之食物（secondary allergenic food）<sup>1</sup>及 3.其他。根據對各種食物中引發過敏症之過敏源進行研究探討，決定各種食物中主要引起過敏症之物質（major allergenic material），並依此研擬對食品中各該引起過敏症之物質之檢驗方法，及擬定食品標示辦法<sup>2</sup>。

現況：

一、五種主要引起過敏症之食物（primary allergenic food）及其主要過敏源（major allergenic material）：

1. Eggs	Albumin
2. Milk	Casein
3. Wheat	Gliadin
4. Peanut	Arah 1
5. Buckwheat <sup>3</sup>	Small molecular proteins <sup>4</sup>

二、十九種次要引起過敏症之食物（secondary allergenic food）：

1. Abalone	鮑魚
2. Cuttlefish	墨魚、烏賊
3. Salmon egg	
4. Shrimps	
5. Orange	

<sup>1</sup> <http://www.miyagehin.com/jygiou/hyouji/hyouji04.html>

<sup>2</sup> <http://www.nih.go.jp/eiken/html/hyouji.html>

<sup>3</sup> 蕎麥，日本食物「Soba」（一種麵條）的主成分，是日本人常食用之食物。

<sup>4</sup> Buckwheat 中之主要過敏源陷在尚未確認，已知是其中一群小分子蛋白質所引起。現即以之為檢測目標。

## 附件十四

6. Crab
7. Kiwi fruit
8. Beef
9. Walnut 胡桃
10. Salmon
11. Mackerel 鯖魚
12. Soybean
13. Chicken
14. Pork
15. Matshtake mushroom
16. Peach
17. Yam 山藥
18. Apple
19. Gelatin

目前對次要過敏源尚無檢驗方法，檢驗方法之研擬工作亦尚未開展。

### 三、檢驗方法<sup>5</sup>：

- A. ELISA methods are available for detection of the major allergen in these five kinds of food.
- B. PCR methods have been developed for detection of the major allergen in wheat、peanut and buckwheat<sup>6</sup>.
- C. Western blotting methods are also available for detection of the major allergen in these five kinds of food.

### 四、標示：

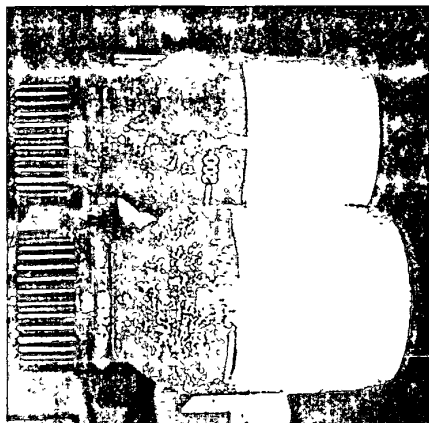
日本政府計劃自明年起開始實施對含五種主要引起過敏症食品成分的標示，即日本政府將擬定該五種主要過敏源（major allergenic material）於食品中的限量標準（ $\mu\text{g}/\text{g}^7$ ），凡是食品含該五種主要過敏源超過限量，必須將超過限量之成分標示於包裝上，但不需標示該過敏源及其含量。例如，食品中白蛋白含量超過限量，該食品必須標示成分含有雞蛋。

---

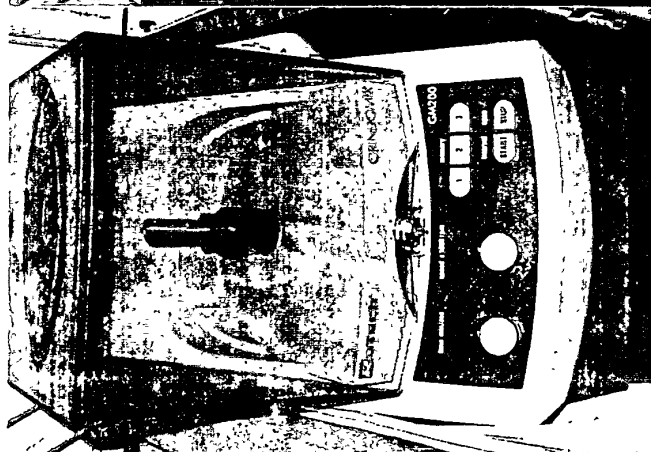
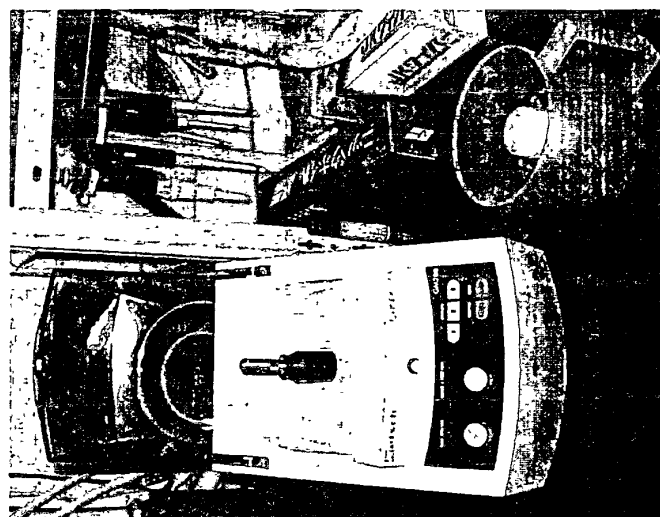
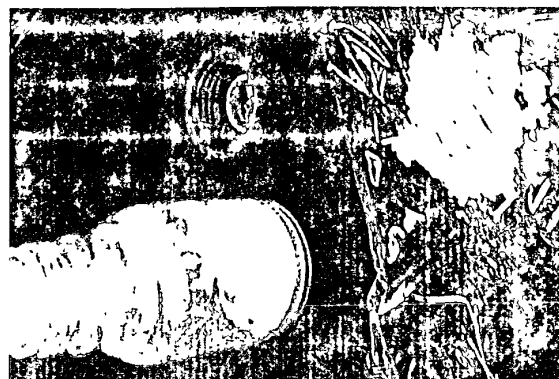
<sup>5</sup> Methods for detection of major allergenic materials have been established. The ELISA methods should be carried on in first while performing inspections. The ELISA methods are not only methods of detection but also quantitative methods. The PCR methods and the Western blotting methods are used for confirmation.

<sup>6</sup> 對雞蛋及牛奶而言，主要過敏源分別是白蛋白與酪蛋白，由於雞蛋中白蛋白或牛奶中酪蛋白含量遠超過雞或牛之其他供食用部分（雞肉或牛肉等），因此藉由此差別以 ELISA 或 Western blotting methods 可專一性地檢出源自雞蛋與牛奶之過敏源。然而 PCR 方法則無法區別，因為基因體（genome）在雞或牛任一細胞皆相同。

<sup>7</sup> Total food weight



乙醚去油  
冷凍乾燥

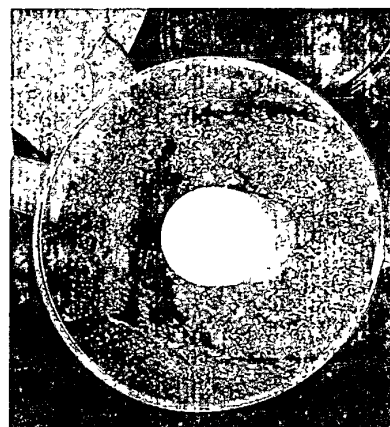


Retsch GM  
200  
磨粉機

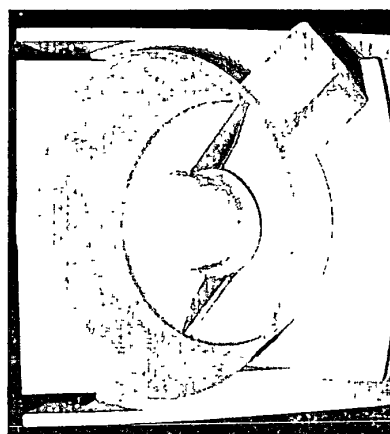
花生磨粉

乙醚去油脂

冷凍乾燥



花生磨粉



<Collaboration Studies >

機関名	担当者	7700	7900 (96well)	7900 (384well)	7000	LightCycler	定性
R&D Center	山口敏和				●		
肥試料検査所	末藤晴子	●、◎					
分析	渡井正俊	●、◎					◎
日清製粉	山川宏人						◎
国立医薬品衛生研究所	山浩	●、◎、○	●、○		●、○	○	
食品薬品安全	笠間菊子				●		◎
和光堂	小口圭子						◎
	古井聡						◎
消費技術	栗原秀夫	●、◎、○			●、○		◎
昭和産業	加藤久						◎
	吉村倫彰	●、◎				-	-
森永製菓	沼田司						◎
	本田聡	●、◎					◎
	布藤聡	●、◎、○			●、○	●、○	◎
食品環境検査協会	吉川	●、◎					◎
東京都立衛生研究所	門間公夫	△					
	吉岡慎一						
日本穀物検定協会	大島慎司						◎
食品		●、◎					◎

附件十六

ABI	齊藤	●、◎、○	●、○	○	●	●
韓国 NFRi				○	●	●
韓国?					●	
韓国 NIAB	Kim	●、◎		●	●	
韓国 NIQS	Jeong	●、◎		●	●	
KFDA	Park	●、◎	●			
日本遺伝研	酒井				●	
群馬衛研	富岡				●	
福岡 環境研	梶原				●	
三菱 BCL	島津				●	
大阪市環境研	紀				●	
静岡 環境衛生科学研究所	有田				●	
広島保健環境	豊田				●	
高知衛研	西岡靖二				●	
三重 科学技術振興	林		●			
大阪府立公衆衛研	堀			●		
神戸市環境研	田中敏嗣		●			
名古屋市衛生研究所	田村部長			●		
兵庫 衛研	寺西		●			
香川衛研	西岡千鶴				●	
台湾衛生署檢 局	林	●、◎				

附件十六

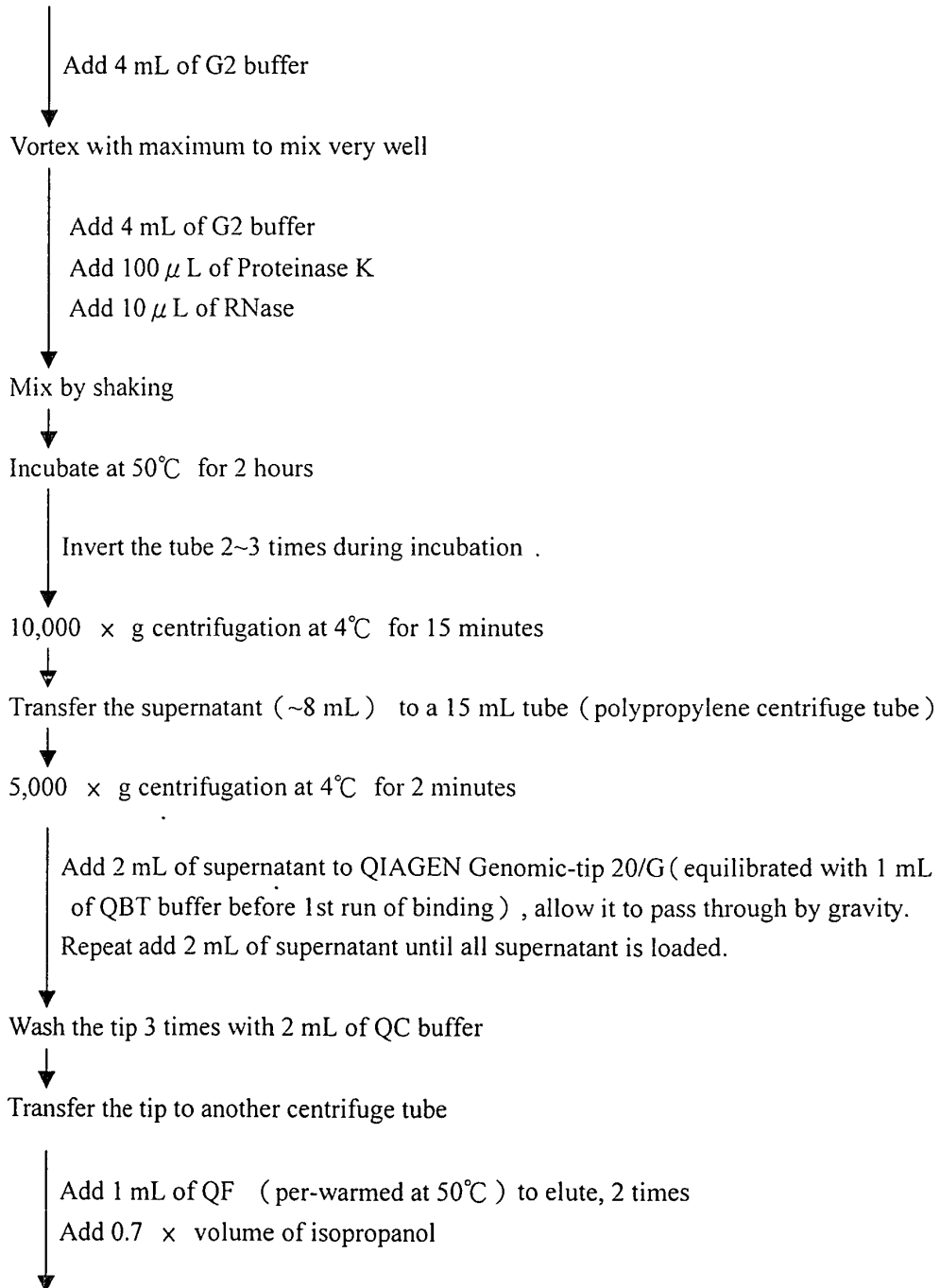
食品総合研究所	●、○	●、○	●、○	●、○	●、○	●、○
TOTAL	●; 14、◎; 14	●; 6、○; 2	●; 6、○; 1	●; 8、○; 4	●; 9、○; 3	
● : 内標比測定試 機種間差試	◎ : 試	○ : 試				
内標比 測定 必要 残 数						
機種間差試 必要 残 数						

附件十七

## Extraction Methods Using QIAGEN Genomic-tip Kit

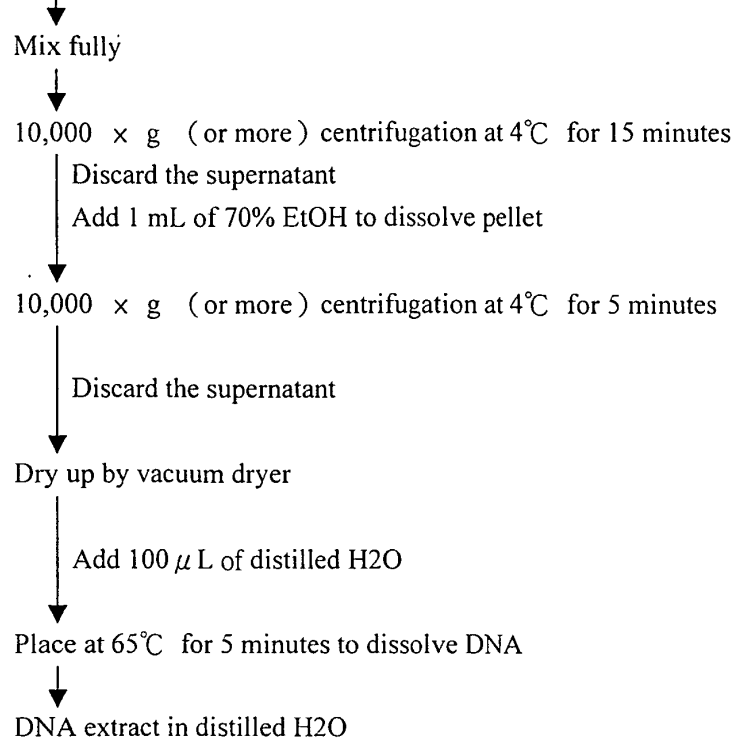
**For Tacos, Tortillas, Corn Chips and Cornflake, and processed potato food (restricted to products processed using heat) :**

Weight 1 g of frozen-dried sample powder, put into a 50 mL tube (polypropylene centrifuge tube)





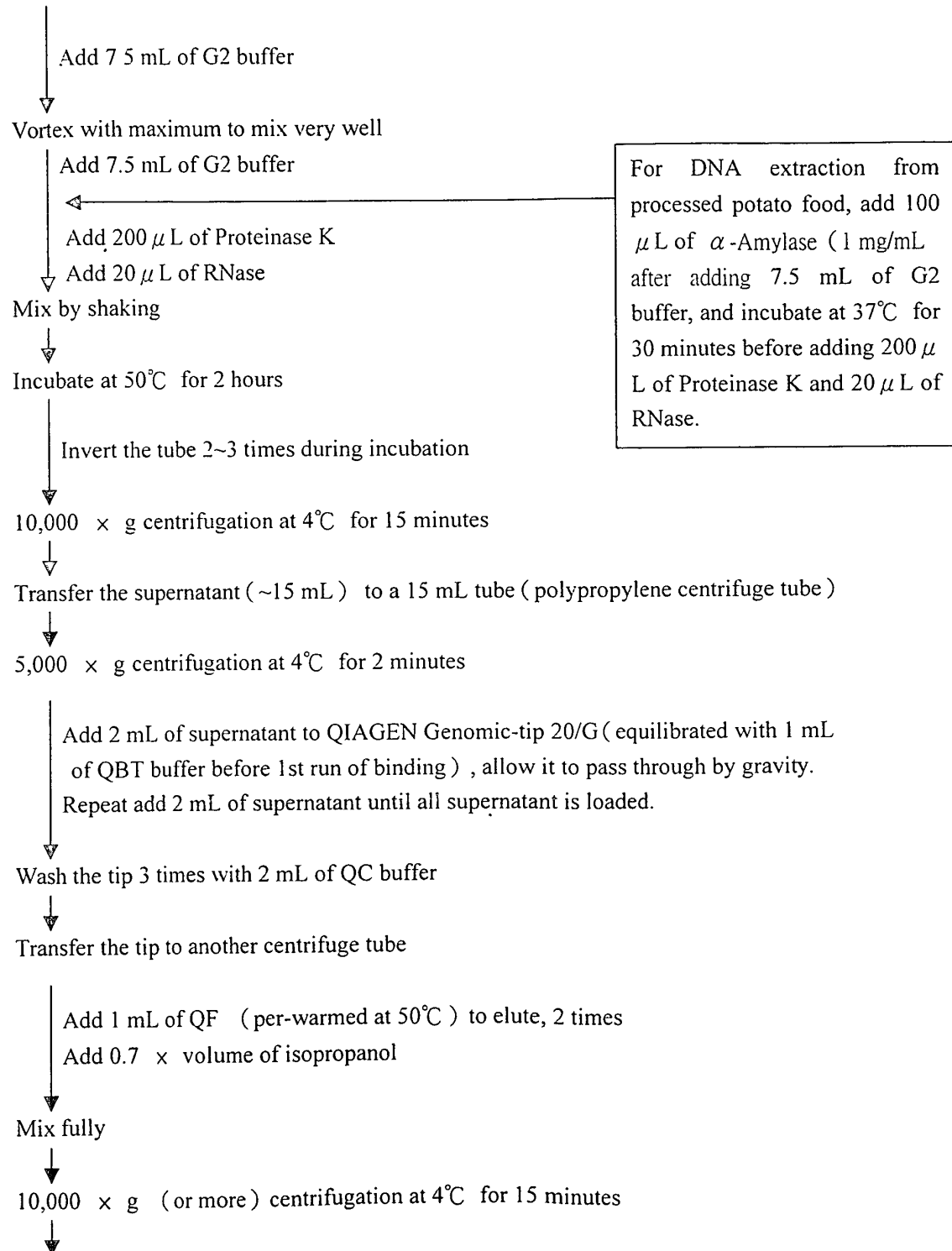
附件十七



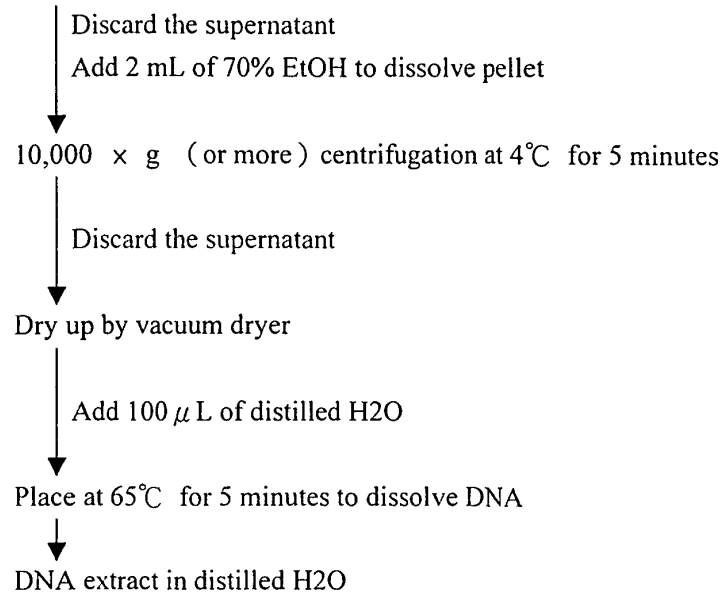
## 附件十七

### For canned papaya:

Weight 2 g of frozen-dried sample powder, put into a 50 mL tube ( polypropylene centrifuge tube )



附件十七



Translated from 「Testing for Foods Produce by Recombinant DNA Techniques」,  
Version 2.0 ( Apr. 30. 2002 ) , Japan.

附件十八

Detect New Leaf Y and New Leaf plus in 「じゃがりこ<sup>1,2</sup>」

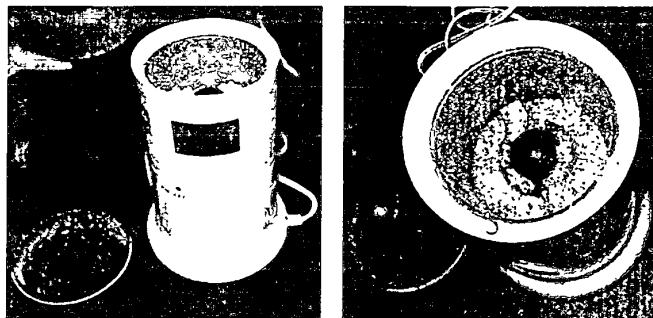
目的：To detect if this processed potato food contains New Leaf Y<sup>3</sup>

様品：じゃがりこ---サラダ



方法：

1. Grinding : Use a miller usually used to mill coffee beans.



<sup>1</sup> A stick shape snack made of potato. There are more than 4 kinds of flavors, サラダ (salad), うすしお味 (salty), チーズ (cheese)、ジャーマンポテト (Germany style) and so on.

<sup>2</sup> ジャがりも is potato in Japanese.

<sup>3</sup> Since New Leaf and New Leaf plus GM potato were pass the safety assessment in Japan, these two strains do not need to perform qualitative test now. The safety assessment of New Leaf Y is undergoing. Therefore, this GM potato is still illegal. However, New Leaf Y was detectable in a processed potato food previously. So, the Japan government wants to check if there are other processed potato products contain New Leaf Y.

## 附件十八

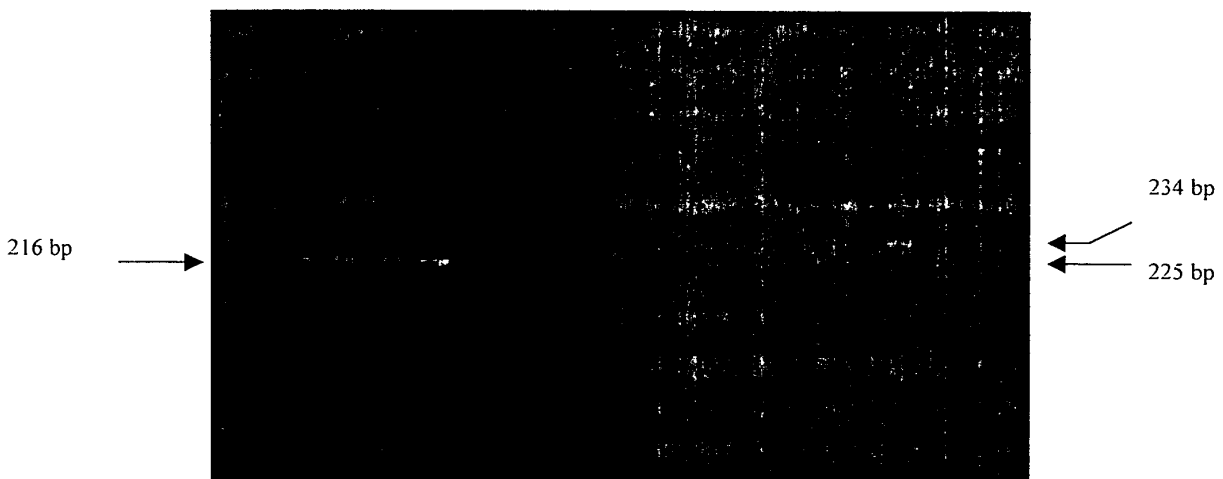
2. Sampling : 2 g
3. DNA extraction ( 2 copies ) : Use QUAGEN Genomic tips kits<sup>4</sup>

Note-- add 100  $\mu$ L of  $\alpha$ -Amylase( 1 mg/mL ) after adding 7.5 mL of G2 buffer, and incubate at 37°C for 30 minutes before adding 200  $\mu$ L of Proteinase K and 20  $\mu$ L of RNase.

DNA conc. of each extraction :

	230 nm	260 nm	280nm	320 nm	260 nm / 280 nm	Conc. ( ng / $\mu$ L
No.1	0.044	0.099	0,070	0.005	1.414	99
No.2	0.048	0.107	0.077	0.008	1.39	107

定性試験 ( Qualitative PCR )<sup>5</sup> :

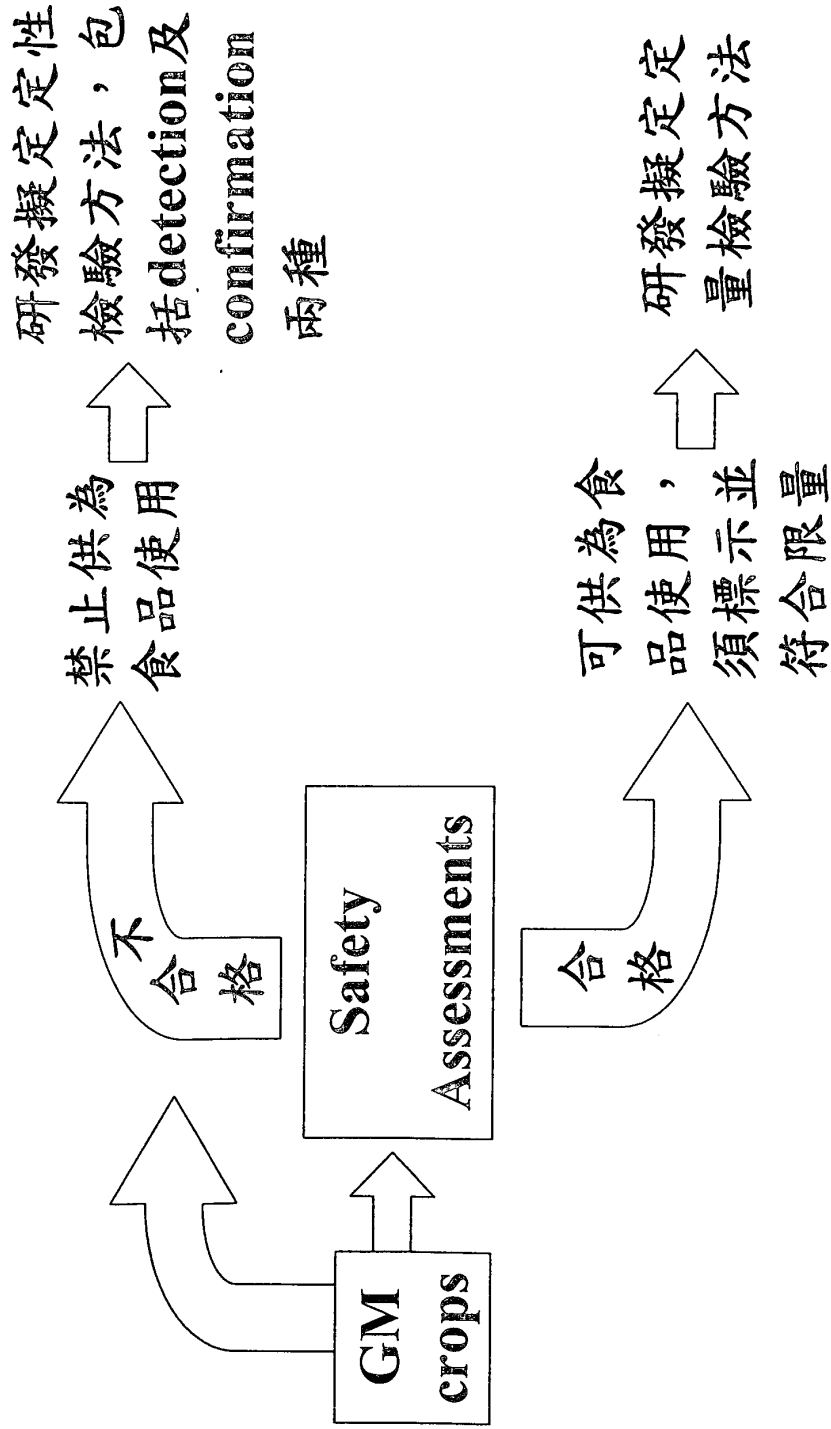


Detection of GM potato ( New Leaf Y and New Leaf plus ) in processed potato food, ジャがりこ---サラダ. Lane1 and lane 17 are markers. Lane 2, lane7 and lane 12 are sample 1. Lane 3, lane 8 and lane 13 are sample 2. Lane 4, lane 9 and lane 14 are Non GM DANSYAKU. Lane 5, lane 10 and lane 15 are 1% New Leaf plus. Lane 6, lane 11 and lane 16 are 1% New Leaf Y. Lane 2 to lane 6 detected 216 bp amplicons by Pss primer pair. Lane 7 to lane 11 shows the PCR result of New Leaf Y detection primer pair. Only 1% New Leaf Y ( lane 11 ) obtains a 225 bp band. Lane 12 to lane 16 shows the PCR result of New Leaf plus detection primer pair. Only 1% New Leaf plus ( lane 15 ) obtains a 234 bp band.

<sup>4</sup> Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques, version 2, 2002/4/30

<sup>5</sup> Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques, version 2, 2002/4/30

日本基因改造食品之檢驗與檢驗方法研發擬定



## Part II

赴日本農林水產省獨立行政法人食品總合研究所  
(NFRI)考察研習基因改造食品之檢驗

服務機關：衛生署藥物食品檢驗局

姓名：林澤揚

職稱：薦任技士

出國地點：日本

出國期間：九十一年七月七日至八月三日

## 赴日本農林水產省獨立行政法人食品總和研究所

### (NFRI)考察研習基因改造食品之檢驗

#### 摘 要

基因改造食品之管理與檢驗為全球所關切之食品衛生安全議題之一，歐洲、澳洲及亞洲國家陸續制訂有關法規或準則。我國主管基因改造食品之機構為衛生署，由食品衛生處及藥物食品檢驗局分別掌管行政管理與技術檢驗，食品衛生處並已於 90 年 2 月 22 日公告基因改造之黃豆及玉米的查驗登記與標示等相關規定，將於明(92)年 1 月 1 日起開始實施第一階段農產品形態基因改造黃豆及玉米之標示制度。有鑑於此，藥物食品檢驗局特別派員赴「日本獨立行政法人食品總和研究所」日野名寬博士實驗室考察研習相關檢測技術。主要研習重點為基因改造食品之定量檢測，同時蒐集有關檢驗之方法及資訊，建立藥檢局與日本食品總和研究所政府實驗室之交流。另外，並參與日本基因改造玉米及黃豆定量分析方法之 collaborative study，加入其工作團隊，研習 collaborative study 樣品準備之方法及流程，學習如何避免樣品之交叉污染，以作為本局日後執行相關計畫之參考。



目次：壹、目的.....	23
貳、過程.....	24
參、心得及建議.....	43
肆、附件.....	49

## 壹、目的

隨著世界人口的持續增加，糧食不足的問題也就日益嚴重，因此如何有效且快速的增加農作物產量就成為各方極欲解決的難題。自從科學家發現將基因工程技術利用於農作物性狀之改良，取代傳統之育種技術，可有效增加作物產量之後，基因改造作物 (genetically modified organism, GMO) 便被視為解決飢荒問題的救星。然而隨著消費者環保意識及食品安全意識的抬頭，存在於 GMO 背後的許多相關隱憂及問題漸漸浮上台面。為此，近年來基因改造食品的管理與檢驗已成為全球食品衛生安全議題的焦點所在，世界各先進國家如日本、歐盟、加拿大、澳洲等國家皆陸續制訂相關之法規及準則。我國主管基因改造食品之政府機構為衛生署，其中食品衛生處掌管行政方面法規及政策之研擬，藥物食品檢驗局則掌管技術檢驗與監控，食品衛生處並已於 90 年 2 月 22 日公告基因改造之黃豆及玉米的查驗登記與標示等相關規定，我國亦將於明(92)年 1 月 1 日起開始實施第一階段農產品形態基因改造黃豆及玉米之標示制度。為因應即將實施的標示制度，建立一套正確而有效率的檢測方法已是刻不容緩的任務。有鑑於此，藥物食品檢驗局特派員赴日本獨立行政法人「食品總和研究所」考察研習相關檢測技術，考察重點為基因改造食品之定性與定量檢測，學習日本所研發之檢測方法及流程步驟，並透過討論期望找出並解決藥物食品檢驗局目前在研發基因改造作物定性及定量檢測方法時所遭遇之問題。由於基因改造食品之標示制度對我國而言是一套嶄新而陌生的制度，但是對日本而言基因改造食品之標示管理制度則已實施一年有餘，因此觀察並瞭解日本市售產品實際執行標示的情形，亦為此行的重要課題之一。此外，蒐集有關檢驗方法及資訊，並建立藥物食品檢驗局與日本政府食品總和研究所實驗室間之互動，以便為日後管理制度的國際交流奠定基礎。

## 貳、過程

此次赴日本食品總和研究所(NFRI)考察研習時間為7月7日至8月3日，扣除往返及假日，實際研習時程為二十日。基於我國即將實施基改食品標示制度，而負責方法開發之藥檢局正積極發展相關檢驗技術，由於方法本身應用分子生物之技術，故在開發過程屢遭挫折，跌跌撞撞。日本政府自2001年4月1日起實施基改食品標示制度，其所建立之定性及定量檢測方法已卓然有成，足以與歐美國家相抗衡，而他們所累積的經驗就成為我們最好的效法學習之教材。此行之目的地—日野明寬博士實驗室，即是負責日本基改食品檢驗技術開發兩大實驗室之一，正可藉此機會請益專家學者，難能可貴。將研習行程整理分述如下：

### 七月七日(日)：起程

由中正機場搭乘長榮航空 BR2198 班機，於上午 9:00 出發，飛抵日本新成田機場已是下午 1:10。與我同行的還有同屬藥檢局「基因改造食品檢驗工作小組」的吳宗熹技士。吳技士與我的任務是相同的，但前往研習之單位則各異，他是至東京都「國立醫藥品食品衛生研究所食品部第三室—龜山浩博士實驗室」研習，我則是到「食品總和研究所食品味覺機能實驗室」研習。隨著飛機越來越接近日本，我心中不安的情緒也越濃烈，一想到此行身負重任但對日語卻是一竅不通，如何與日方專家正確溝通的問題不斷困擾著我，心情怎樣也輕鬆不起來，但既然已經抵達日本也只能盡力而為了。「食品總合研究所」位於茨城縣築波市之「農林園地中央」，幸有日野明寬博士親自接機，省卻我中途交通接駁的麻煩。途中日野博士問起我此行主要研習之重點為何，我也明確表示主要以 GMO 定量分析為主並請益藥檢局目前開發方法時所遭遇之問題，若時間許可也想研習 GMO 定性分析及

其他各種 GMO 作物之檢測方法。日野博士表示實驗室目前正進行日本定性及定量方法之 collaborative study (實驗室間方法聯合評估)，此工作對他們極為重要，因此每個成員都身負重任且負擔沈重，而我的到來正好可加入其團隊，一方面研習一方面分擔部分任務，這似乎在暗示未來日子將會相當忙碌。進駐到 TIH (築波國際學舍) 已是午後 5:00，園區因屬純粹之研究機構，四周圍除了專屬之餐廳外並無任何商家，入夜之後更是一片寂靜，令初來乍到的我印象深刻，而抵日的第一個夜晚就在忐忑不安的的思緒中就寢。

#### 七月八日 (一):

實驗室上班時間為 9:00，一早日野博士帶我會見研究所的幾位官員，作禮貌性之拜會，其中包括「食品總合研究所理事長—鈴木建夫博士」。接著就是介紹他的實驗室環境設備以及成員讓我認識。實驗室之研究領域區分為兩個方向，其一為「味覺機能」團隊，另一個即為「GMO」團隊，成員都很年輕。研究室是新的建築，空間頗大，但由於人員眾多因此仍嫌擁擠。定量 PCR 的機型有 ABI7700、ABI7000 各一台、Roche light-cycler 兩台、Bio-red I-cycler 一台，但是目前 GMO 定量分析仍以 ABI 之機種為主，並不使用 Bio-red I-cycler！Roche 也因為 sample tray 的 well 數目太少，而有使用上的限制。GMO 方面的實驗操作，日野博士指派「松岡猛博士」負責教導我，由他口中得知，目前實驗室已經進行到加工食品中 GMO 成分之檢測方法開發以及不同機型間檢測條件之 modification。下午與日野博士就課程內容進行討論，確定我見習的主軸以 collaborative study 之樣品配製作業流程及 GM 作物定量分析為主，大致之工作及時間分配如附件一。日野博士表示目前日本的這套官方方法已經完成 validation 並計畫提交 ISO 及 CODEX，而採用日本方法作為官方方法之國家尚有韓國，泰國及香港則是以日本方法為主體，再依據各國國情需要做小幅修改。

### 七月九日 (二):

早上即依據排定之實驗計畫進行 non-GM 玉米之磨粉工作, 樣品共計十件, 每件為 100 克, 需以專用之大型粉碎機進行粉碎, 機型如附件二(A)。一切準備妥當後機器卻出現狀況, 不聽使喚無法運作。無計可施情況下決定向鄰近實驗室調借另一部機器使用, 但往返路程將會曠日費時。磨粉需於專用之房間操作以避免粉末四散污染, 實驗台上尚有另一機型之粉碎機, 可用於粉碎少量或單顆之作物顆粒, 以便針對玉米顆粒進行純度分析, 機型如附件二(B)。空檔時詢問幾位研究人員關於本局進行定量分析時 NTC 時常會有正反應之訊號出現的問題, 幾位先生小姐都認為是操作污染所致。並建議我們以 salmon sperm DNA 取代蒸餾水作為 NTC 的 PCR 反應之 templet, 此產品為 sigma 公司所生產。而 DNA 之抽取方法則以 QIAGEN easy mini and maxi kit 及 QIAGEN genomic tip 兩種套組為主, 優點為比 CTAB 法來的方便而省時, 但缺點是太貴了。吉村倫彰先生並提供日本政府目前所規定針對 GMO 原料成分必須進行標示之加工食品種類一覽表, 如附件三, 共計三大類 (玉米、黃豆及馬鈴薯) 三十項之加工產品品目。而松岡猛博士則提供目前日本 GM 玉米及黃豆檢測標準方法之日文版資料, 我則利用實驗的空檔, 翻譯玉米及黃豆 DNA 萃取方法部分, 以便與藥檢局方法相互比對。

### 七月十日 (三):

早上新借的磨粉機器已經確定可正常運作, 隨即進行玉米磨粉, 由波田野修子小姐、築山佳苗小姐及我負責, 實驗前需以 70% 酒精仔細擦拭操作台面並覆蓋以塑膠膠膜, 每完成一件玉米樣品磨粉需秤重 2 克, 裝入無菌塑膠試管密封保存, 以便進行純度及污染試驗。每磨完一個樣品後須依據儀器清理之 SOP, 仔細去除殘餘粉末後始可進行下一玉米樣品之粉碎, 步驟繁瑣複雜, 目的只為確定不會於磨粉時造成品系間之交叉污染! 由於清理

過程極費時，一整天下來也只完成一半之工作量。但卻對操作人員之仔細與耐心印象深刻。下午請教 NIPPON GENE 公司之古井聰博士關於 NTC 的相關問題，該公司目前生產並販售日本 GMO 定量分析套組 (WAKO kit)，據他表示用於 GMO 定量分析時 NTC 之 templet DNA，使用 Col E-1DNA 會比使用 salmon sperm DNA 還好，兩者同樣於-20 度冰凍 4-5 個月，salmon sperm DNA 會有 degrade 的問題，而 Col E-1 則相當穩定。未來該公司計畫將 WAKO kit 中之 salmon sperm DNA 以 Col E-1DNA 取代之。另將今日請教之問題及答覆整理如附件四。今夜為颱風夜，夜晚時分風大雨大，不少同事因此受困於實驗室裡無法回家。

#### 七月十一日 (四)：

經過一夜的狂風驟雨，一早醒來竟是豔陽高照的氣候，這樣的颱風型態與台灣迥異，他們也很訝異台灣竟有所謂的「颱風假」。今天將持續進行玉米磨粉的工作，但負責人員只剩我及波田野修子小姐，我主要負責將顆粒粉碎及儀器零件清理，而波田野修子小姐則負責至冰庫中提取樣品，粉碎後取樣，並將粉碎機篩網以超音波清洗乾淨。粉碎機之篩網以孔徑大小區分為數種，黃豆樣品使用 0.5 孔徑篩網，玉米樣品使用 0.2 孔徑篩網。機器中篩網放置有方向性，方向相反則會造成過熱當機，需特別注意。玉米粉末秤重時也是小心翼翼，桌面擦拭及更換桌面之塑膠膠膜必須不斷重複，即使仔細若此，具以往經驗仍時常發生樣品交叉污染，可見如何避免污染是進行 GMO 定性定量分析時第一項必須克服的難題。下午花了大半時間在研究及翻譯日文版黃豆 DNA 萃取方法，若遇日文不懂之處則請教重松万由小姐及渡邊聰先生，拼拼湊湊的將其翻譯成中文版。另將今日請教幾位同事之定量分析經驗整理如附件五。午後四點半日野博士與大家舉行 meeting，討論 collaboratory study 的相關事宜，了解及掌控大家的進度及問題，此次 collaboratory study 區分為定性測試及定量測試，受限於定量測試技術門檻

高，參加單位需先評估自身檢測能力是否足以勝任。所有參加單位仍在持續變動目前仍無法正確掌握。實驗室成員工作都相當賣力，夜晚常工作至午夜，為配合大家作息我也需與大伙同進退，雖然精神體力負擔沈重，卻不禁佩服日本人的工作態度。

#### 七月十二日(五):

原定今日將進行前幾天磨粉之 QTI non-GM 玉米樣品之 DNA 抽取，由於仍有幾件樣品未完成磨粉，加上松岡猛博士必須返回他的原上班單位「獨立行政法人農林水產消費技術中心」開會，在與他討論過後決定今天仍舊進行磨粉工作。經過幾天重複相同工作，已經將整個儀器的原理及清理之 SOP 瞭然於心。無意中發現波田野修子小姐的紙本資料中有一份為此次參加 collaborative study 的所有公司單位一覽表，並詳細紀錄各單位所擁有之定量分析儀器之廠牌型號，遂向她索取此份資料以供參考，如附件六，其中赫然發現「台灣藥檢局」也名列其中，這似乎暗示藥檢局已騎虎難下不得不參加日本之 collaborative study 了。下午在組裝磨粉機時出了一點差錯，由於我的疏忽把其中的篩網方向裝反了，磨粉進行中機器不時傳出陣陣燒焦異味，緊急停機拆卸後確定為篩網異位所致，高溫導致一個樣品燒毀，還差點使機器過熱，嚇出一身冷汗！原本十個樣品遂少了一個，必須等到下星期一才拿得到預備樣品，造成大家不便深感愧疚！但卻意外獲知一項關於機器操作的小技巧，那就是粉碎玉米前，顆粒一定要在-80°C 至少冷凍 24 小時，目的為降低品溫，如不這樣做，機器也會過熱，有燒毀之虞！晚上利用時間將昨日未完成之日文版玉米 DNA 萃取方法翻譯完成，時間已是午夜時分了，打字工作只好留待假日進行了。

#### 七月十三日~七月十四日(六、日): 假日

假日的 NFRI 顯得異常的平靜，研究所的同仁們平常時候總是埋頭於工作之

中，不分晝夜，但一到假日多半會把握時間休息，並不會加班，以儲備迎接下週挑戰的能量。兩天的假日正好也讓我得以喘息，畢竟每天工作到晚上十點過後的作息時間，對一位新人而言的確需要時間適應。我也藉此時間將之前所翻譯之日文版黃豆及玉米 DNA 抽取方法繕打完成，如附件七，並 E-mail 給藥檢局同仁參考，第一手資料，希望有助於提升本局同仁的 DNA 抽取效果。此地雖為技術研發重鎮，但交通並不便利，例假日的公車班次更是少的可憐，人人都以私家轎車代步。假日的 NFRI 是不提供伙食的，三餐必須自力救濟，還好臨時向同事借到腳踏車，雖然騎至最近的 ASSE 購物中心尚有一段距離，最少三餐已有著落，免於恐懼！

#### 七月十五日 (一):

每週一是實驗室的清潔日，一早來大伙兒自動自發掃地的掃地，倒垃圾的倒垃圾，拖地的拖地，吸塵的吸塵，以最快速度完成清潔工作。我亦加入整理工作，融入大家是我的原則，當然環境要靠大家維持，畢竟天天最少都要在此待上十個小時以上。實驗室東西雖多，最少地面乾淨，沒老鼠蟑螂倒是最大的優點，即使不穿拖鞋也無妨喔！上午開始抽取上週所粉碎的玉米樣品 DNA，從早到晚努力的抽，所使用的抽取套組為 QIAGEN DNeasy MAXI kit，教導我的仍是波田野小姐(日野博士所聘用之技術員)，雖然 MAXI kit 之前我亦使用過，但方法中某些步驟經過修正，與 kit 中所附之 protocol 並不相同！整個操作過程極為謹慎，百聞不如一見(我想或許因為是“樣品交叉污染確認實驗”，所以整個操作流程更是極度小心)。將操作時之注意事項整理如附件八。

#### 七月十六日 (二):

一早日野博士即正式對藥檢局渠提出邀請，詢問我們參加 colaboratory - study 的意願！經過簡單解說整個測試 program 的內容後，他囑咐我盡快與



本局長官商量並確認此事，以利資料之彙整，也應驗了我之前的推測。定量之 colaboratory study 工作量繁重，所需時間為兩個月左右，簡單把整個 colaboratory study 所需進行之實驗說明如下：

◎總共要進行約 27 次的 ABI 7700 (96well 滿盤)定量分析，包括三部分—

1. 定量儀器準確度試驗：

(以日本 plasmid standard reference material 進行標準曲線之試驗)--約為 3 run。

2. 各種黃豆及玉米品系“內標比”試驗：

(以日本 plasmid standard reference material 進行各種基因 cv 值之試驗--約需 15 run；

3. 未知含量樣品之盲樣試驗：

(即粉末中混有不知品系、不知含量之 GM 玉米或黃豆，再以日本 plasmid standard reference material 定出其中所含各品系 GM 玉米或黃豆之含量---約需 10 run。

◎測試所用之 plasmid，primer，probe，樣品 DNA 皆由日方提供，受測單位需自備 PCR 96 wells plate，cap 及 master-mix。

下午則是將昨日未抽取完之樣品繼續完成，有了昨日經驗，實驗就很放心的交給我一人負責。至於測定昨日樣品之 DNA 濃度，也是觀察重點之一，因為在本局實驗時常發生 DNA 濃度測定困難，不準確或再現性不佳等問題，本研究室採用 Beckman 公司之 DU-7400 分光光度儀，50 $\mu$ l 之溶液量就足夠進行測量，測定後之數據顯示抽取之 DNA 濃度很高而品質亦相當好，測定之數據如附件九。

七月十七日(三)：

早上先進行昨日抽取之 DNA 的濃度測定，抽取效果亦相當不錯，測定之數

據如附件十。今天的另一任務為抽取五種 GM 品系玉米粉，分別為 MON810、Bt11、GA21、T25 及 Event176，這些樣品同樣也是要用於 colaboratory study。其實今天因為松岡猛博士要回公司開會，原本預定進行前幾日之 non-GM 玉米樣品之 PCR 定性確認因此受到耽誤！最後經過一番協商，決定請砂川美佐緒博士帶我做五種 GM 品系玉米 DNA 之製備，至於 PCR 定性污染分析則延至明天。不同於 non-GM 玉米的 DNA 製備。五種 GM 玉米是以 QIAGEN DNeasy mini kit 抽取，樣品量為 0.2 克。前段由波田野小姐帶領，但到後段則由砂川小姐親自帶領，她特別叮囑 micro-tube 的管口為造成污染的主因之一，因為操作者常會在開啟 micro-tube 蓋子時無意間碰觸到管口而不自知。測定 DNA 之濃度後確認抽取過程並無瑕疵，測定之數據如附件十一，並藉機請教她 DNA 濃度如何可以準確測定，她建議改以 TE buffer 來 elute 或稀釋 DNA 則可得到較穩定之數據。明天即將進行樣品交叉污染之 PCR 確認實驗，砂川博士並將 PCR 配方之電子檔給我，該好好準備明天實驗！

#### 七月十八日(四):

早上接獲來自藥檢局確認參與 colaboratory study 之 E-mail，便立即向日野博士表明此事，他並向我解釋一些細節如：為求公正起見凡參加 colaboratory-study 者，皆不得了解及接觸“盲樣測試”樣品之配製過程，所以我可能因此無法知道樣品配製過程，也顯示日方在主辦測試時的嚴謹態度。吉村倫彰先生表示此次 colaboratory-study 所評估之方法雖然與 2000 年所辦之大致相同，reference standard plasmid 也一樣，但 primer 及 probe 已稍做更動，以求更好之 PCR 表現！昨日順利抽完五種品系玉米樣品之 DNA，原以為可立即進行 PCR 定性分析以確定樣品純度，但松岡猛博士要求我先觀察砂川博士的實驗操作，了解操作過程如何避免污染，可見各個實驗室都有相同的隱憂—DNA 交叉污染。松岡猛博士強調配製 PCR reagent

mixture 時不可以說話，若對操作過程有任何疑問必須一開始就問或者記錄下來，等操作結束再一起發問！我仔細觀察她的操作，確實每個步驟都小心翼翼，空的 micro-tube 取出之後一定先蓋上蓋子，不使時其暴露於空氣中，稀釋用的水也一定是全新的，對於操作之小細節都要求嚴格。配製完成後緊接著上機—使用 MJ research 【PTC-200 Peltier Thermal cycler】，她並要求 micro-tube 的排列必須上下左右對稱，以確保加熱效率。PCR 反應結束後由松岡猛博士教我製膠，但 loading 時，則是渡邊聰先生指導，一些重點整理如附件十二。晚餐後回到實驗室發現砂川博士、松岡猛博士、古井聰博士正在討論電泳結果，一問之下才知道今天的結果並不好，九件 non-GM 玉米竟有四件出現 35S-PCR 產物，這樣的高比例污染令大家頭痛！我請教松岡猛博士此 QTI-non GM 玉米之由來，他表示是由簽訂合作關係的種子公司所提供，他並解釋種子公司所生產的種子共分為三類，第一類為提供給農民種植的 non-GM 玉米粒，約只有 95%之純度，而第二類則是現在他們手中這一類，純度雖達 99%以上，卻依然無法避免摻雜其他品系之情形。聽大家的語氣似乎顯得相當無奈，之後還得確認是哪種品系摻雜，松岡猛博士推測為 MON 810。討論中我並提到本局在受理基因改造作物查驗登記時所遭遇 MONSANTO 公司強橫的態度，拒不提供 PCR 方法之事，他說在日本 MONSANTO 公司的態度也是一樣強橫，而日野博士在研發檢驗方法的過程確實曾與 MONSANTO 簽訂使用契約，但其言下之意似乎並非以日野博士的名義，而是以 NFRI 名義簽訂。他們並提到並非只有 MONSANTO 不友善，其實 AVENTIS 亦不友善，但這點我們倒是未遭遇！之後松岡猛博士原想 show multiplex PCR 的方法及資料給我看，但一時之間竟找不到卷宗只好作罷，他還提到目前正在研發另一新的 reference standard plasmid，包含 NK603，TC1507，MON864 及 T25 基因，之所以又重新設計 T25 之基因片段是因為舊有的 T25 基因片段無法分辨 TC1507，因而重新設

計過！結束一番討論已是半夜一點半，而松岡猛博士明天還得跟日野博士到東京開會！我與渡邊聰先生回到宿舍也已經一點半過後，宿舍已經大門深鎖，得勞煩警衛起床開門！

### 七月十九日（五）：

早上松岡猛博士與日野博士至東京都開會，實驗部分將由我獨立負責，進度為五種 GM 玉米品系（GA21、event176、T25、MON810、Bt11）之 PCR 污染確認，共使用以下六種引子：SSIIb01-3'/SSIIb01-5'；GA21-3'/GA21-5'；event 176-3'/event 176-5'；T25-3'/T25-5'；Mon810-3'/Mon810-5'；Bt11-5'/Bt11-3'，DNA template 之濃度需統一稀釋至 10 ng/uL。早上的操作砂川博士一直坐在我旁邊，以確定我的配製及操作符合要求，也指導我一些應注意之事項。早上完成 SSIIb01-3'/SSIIb01-5' primer 對 PCR 實驗，下午則進行其餘五種 primer 對的 PCR 實驗，經電泳分析後確認 SSIIb 結果正確，但五種玉米品系中有兩種污染，分別是檢測 Bt11 primer 對時，五種 GM 玉米同時都檢出，另外測 MON810 primer 對時，五種品系有兩種檢出，而且產物的反應相當強，幾乎可確認是樣品中混有其他品系玉米。經討論後預備下星期一把 DNA 重新稀釋，並使用新的 primer，把兩個污染的結果再做重覆確認！今天自己從頭到尾操作一次，如何避免污染的訣竅似乎更了然於心了。

幾項電泳分析時之要點整理如下：

1. gel 中添加 ethidium bromide 可提高靈敏度，ethidium bromide 之 stock 溶液濃度為 10 mg/mL，100 mL 之 agarose 溶液添加 5 $\mu$ L。
2. 電泳實驗的操作台必須與其他實驗之操作台分開，以免 DNA 污染。
3. gel 最好是新鮮配製，待 agarose 溶液凝固後於膠上覆蓋一層 buffer，以避免膠體表面乾燥！

我很訝異的觀察到兩件事：1、他們在微波爐加熱時完全不避諱，直接貼近

觀看爐內溶液加熱。2、對於避免 ethidium bromid 之接觸及防護並不重視，常常是一雙手套從製膠、電泳、照相所有操作過程都不再更換！而且似乎大家都知道但卻又默許，照樣沾來沾去的，我認為觀摩考察的原則為截長補短，具有潛在危險性的動作及行為還是要小心為上。由於這些樣品全都是在為 colaboratory study 做準備，所以都非常小心，務必做到百分之百確定為止，他們那種時事求是的精神實在是我們應該學習的！

七月二十日～七月二十一日（六、日）：假日

經過一週的熬夜加班，好不容易盼到假日。好好補充睡眠養精蓄銳，為下週繁重的工作預作準備。利用兩天假日把一週以來見習重點彙整，並以電子檔方式 E-mail 回藥檢局供大家參考。離此最近的 ASSE 購物中心設有一大型超級市場，販賣不少種類之黃豆及玉米類之加工產品，由於日本實施 GMO 之標示制度已逾一年，正好可藉此機會實際了解日本市售加工產品的標示制度執行成效。

七月二十二日（一）：

早上松岡猛博士先將定量分析整個實驗流程解釋一遍，並告知我需等 ABI 7700 排空才能進行 non-GM 玉米之定量分析，我則請教為何定性確認後之 non-GM 玉米還需進行定量分析，他解釋為確認玉米品系之純度，定性及定量兩種數據是提供佐證的必備資料。此次 non-GM 玉米之定量分析原本是不需要放正標準品的，但為了讓我對照了解也故加入此部分實驗，之前 PCR 定性分析所使用之 DNA templet 濃度為 10 ng / uL，但定量實驗時 DNA templet 濃度必須提高至 20 ng / uL，如此可使 detection limit 下降為定性分析的約 2.5 倍，也就是說，當定性分析之 detection limit 為 0.5% 時，則定量分析約可達 0.2% 左右，相當低。日野博士曾提及為支援此次 collaboratory studyru 將陸續會有更多人力加入工作團隊，下午就有四位新人報到，其中

三位來自韓國，都隸屬於政府單位，另一位則來自「日本草地畜產種子協會」。利用空閒時我亦請教韓方人員關於 MONSANTO 公司的態度問題，結論是 MONSANTO 公司無論在那個國家態度都是一樣強硬。至於韓方主管 GMO 的政府機關則是由包括環境保護部門、食品衛生部門、農業部門及工業發展部門等四大部會所組成。定量實驗方面重松万由小姐提供她的經驗供我參考，並指出定量試劑配製有一關鍵步驟必須特別留意，那就是『templet DNA 與定量試劑混合均勻度對定量分析的準確度影響甚鉅』，即反應液配製是決定結果正確與否的關鍵。舉例說明，若每個樣品皆需進行三重覆實驗，則一個 96 wells 的 plate 一次可進行 26 個 sample(包括 5 個 standard 樣品及一個 NTC)，此時需將 96 個反應所需量之 master mix、primer、probe 混勻後，先行以三個為一組的量分裝至 32 個 tube 中，再於各 tube 中加入各自之 templet DNA，混合均勻，再個別分裝至 3 個 well 中，各個 tube 在分裝前必須再 vortex 一次始可進行分裝，以確保混合液均勻度，此步驟在 20 copy 低濃度標準品時尤其重要。一般而言，若混合極均勻，即使是低濃度的 20 copy 及 125 copy 重複性都很好，但在她的公司三重覆有時也會出現一點偏離的情況，必須捨棄不計，取其餘二點數值平均！但在日野博士實驗室則要求三點相近，數據才會被採用！而且此次 colaboratory study 要求三重覆都必須合乎標準，不可以有一點失誤，標準極高。下午由於 meeting 時間太久，加上機器一直沒空，只好將既定定量分析順延至明天進行。

七月二十三日 (二):

進行 ABI 7700 定量實驗前大家都特別謹慎，松岡猛博士先將濃度、配方、及樣品配置表等列印出來並囑咐我須確實了解。此時正好古井聰博士正進行定量分析之試劑調配，依循前例我被要求先行觀摩古井聰博士的操作，過程禁止說話以防污染，操作過程極盡小心之能事，就連 pipetman 的移動

也必定沿著空的 well 移動，不可跨越已有樣品分注的 well。primer 也是污染主因，日本 FASMAC 公司計畫推出已溶解之 forward 及 reverse primer 溶液商業化產品，可避免實驗室因水源不潔造成之 primer 污染，這些資訊對我們而言都相當寶貴。古井聰博士的實驗在確定以 salmon sperm gene 及 colE-1 gene 作為 NTC 之 templet 時的差異，從結果的曲線顯示兩者效果相當，並不會有 PCR 反應的訊號出現。下午則由我親自上場，共分析十件 non GM 之 QTI 玉米樣品，測定之基因為 SSIIb 及 CaMV-35S 兩種，松岡猛博士全程監督似乎要驗收我的學習成果，整個下午就在配製 ABI7700 反應液中度過，實驗數據顯示結果相當好，標準曲線三重覆幾乎重疊，十件 non GM 之 QTI 玉米樣品皆無訊號，可確認並未污染，實驗記錄整理如附件十三。吉村倫彰先生主要負責 Roche Light-cycler 之操作，他告訴我 RRS 黃豆的定量可使用 Roche 及 ABI 機型，但玉米定量則最好選用 ABI 機型，因為 SSIIb 基因在 Roche 機器上不易進行 PCR 反應。而重松万由小姐則進行玉米顆粒胚乳及胚芽分離之工作，對此我相當好奇，請教此工作的目的為何，她指出玉米胚乳之染色體為三倍體而胚芽為二倍體，其實以個別論兩者的“內標比”是不同的，而她正進行胚乳及胚芽“內標比”差異的實驗，並指出此次 collaborative study 玉米樣品將只使用來自胚芽之 DNA 作測試。

#### 七月二十四日(三):

早上松岡猛博士將昨日未解釋清楚之“ABI 7700 threshold line 決定法則”解釋一遍，這套法則對本局相當重要，以往我們常常為此 threshold line 值該定在多少而困擾不已，儀器廠商也無法提出適合的答案，而松岡猛博士的這套準則適時解決了我們的困惑。理論基礎相當複雜但應用於操作上則自有一定規則依循，將這套規則整理如附件十四。他並要求我多加練習以熟悉規則，日後將應用於 collaborative study 數據處理，此外並教導我如何由 PCR 反應期間不同 dye 的螢光變化情形判定遭受污染的可能性，受益良

多。松岡猛博士則忙著翻譯此次 collaborative study 的操作手冊，並交給我一份英文版方法，囑咐我好好研讀。

#### 七月二十五日（四）：

早上日野博士詢問我藥檢局是否參加 "定性之 collaborative-study"？據他表示定性部分並不簡單，測試項目包括 "validation of detection limit test" 及 "實驗室 performance test" 兩部分，而且 detection limit 幾乎控制在檢出的最低限度附近，而且樣品數目相當多，大約五、六十個，加上 primer 數目種類為十種以上，前後加起來共幾百個 PCR 反應，而且是緊接著在 "定量之 collaborative-study" 之後進行，他並好心建議一切當以各實驗室所能負擔之工作量作考量。由於本局十月份尚有 "英國 FAPAS" 之精度試驗，請示後決定只參加定量測試部分。今天的 ABI 7700 已排滿班了，與松岡猛博士討論之後決定明天到他位於埼玉縣的上班單位 "農林水產消費技術中心" 上機，錯開與實驗室同仁爭用機器的窘境。早上時間則配製明日所需之樣品 DNA，primer 及 probe 等試藥試劑。由於藥檢局是此次測驗的參加者，為求公平起見，部分前置作業不便讓我知道，這也是他們直接了當告訴我的！

下午則撥空至 ASSE 購物中心實地考察加工食品標示制度執行情形，上週日因未攜帶相機，因此無法拍照，今天則特別記得要拍照，在相關標示產品中以黃豆類加工製品最多，其次才是玉米類，標示方式皆採負面標示「不含基因改造成分」字樣，如附件十五。日野博士曾告訴我日本人對基因改造食品極為反感，廠商若採正面標示勢必造成產品滯銷，實際觀察後的情形正好印證他的說法。而馬鈴薯產品則並未發現基因改造相關標示，僅發現部分產品標示「有機栽培」，但「有機栽培」似乎即意味「非基因改造」，因為有機栽培作物的前提之一必需為非基因改造之自然作物。

#### 七月二十六日（五）：



8:30 隨松岡猛博士驅車前往埼玉縣之「獨立行政法人農林水產消費技術中心」進行 ABI 7700 實驗，早上的交通狀況並不理想，雖行走於高速公路但一路上車行並不順暢，塞車問題頗嚴重，抵達目的地已是 10:30。「農林水產消費技術中心」位於埼玉市新規劃之都心區，此區為統一設計規劃，摩天大樓林立卻具備寬敞之休閒活動空間，充分利用有限的空間不致感覺擁擠。松岡猛博士先行帶我禮貌性拜會他的上司--條照雄 課長，稟明來意之後隨即帶我了解環境及實驗室。農林水產消費技術中心之任務為負責抽檢市售食品是否合乎衛生標準及相關管理規範，屬於市場監控的角色，因此在 GMO 議題方面與 NFRI 的技術研發角色是相輔相成的，NFRI 將研發完成之檢測方法交給農林水產消費技術中心對市售加工品進行抽驗是否含有超過限量標準之 GM 成分，並將資訊公布給社會大眾。嶄新的大樓，寬敞的空間，大量的儀器設備令我印象深刻。今天任務除了完成 ABI 7700 定量實驗外尚須完成 QTI non-GM 玉米粉末之冷凍乾燥，這些粉末將用於配製不同含量比例之 GM 樣品，松岡猛博士強調凍乾 non-GM 玉米粉末之冷凍乾燥機一定得 GM 玉米粉末區隔，否則必定污染，即使凍乾完成仍須再進行 PCR 確認純度，如此反覆不斷的確認以確保無污染。定量分析樣品包括四件 non-GM 及兩件 Bt11 樣品，偵測之基因為 SSIIb、CaMV 35S 及 MON810 三種，晚上該中心之企畫調整部長—湯川剛一郎部長與我談論起該中心組織即將有所變革，並提到最近所發佈兩項大新聞，其一為檢測出市售蒲燒鰻標示不實，廠商以低價之大陸鰻魚原料加工包裝後標示為「日本製」，謀取暴利；其二為檢測出大陸出口之冷凍菠菜農藥(chloropyrifos 陶斯松)殘餘量高出限量標準達 180 倍之多。晚上 10:00 完成實驗，驅車回到 NFRI 已經 11:30，週末夜便在忙碌的實驗中度過。

七月二十七日~七月二十八日(六、日): 假日

忙了一週，利用假日好好休息一下，並整理這一週來的資料。星期日則到

頗負盛名的「築波大學」逛逛，體驗不同國度的校園氣息，增廣見聞。算算日子，來到 NFRI 已屆三週，本局另一位同仁林旭陽技士也於星期日下午抵達 NFRI，未來一週，辛苦的研習課程將有同伴與我一起承擔。

#### 七月二十九日（一）：

今天下午將舉辦一場 collaboratory study 的說明會，來自日本各地的參測單位都會派員參加以了解測驗規則。早上實驗室的成員都忙著為下午說明會的資料作準備，我則帶著林技士認識環境，介紹實驗室成員並熟悉儀器及相關器材的擺設。下午的會議，與我同時前來日本「國立醫藥品食品衛生研究所」研習的吳宗熹技士也將出席！下午一點三十分，會議準時於二樓之會議室召開，出席的各單位廠商代表人數多達四五十人之譜。由日野明寬博士及龜山浩博士、松岡猛博士、栗原秀夫先生主持，解釋所有關於此次定性及定量 colaboratory study 的實驗細節及預定進度等事項，受測單位可利用此機會針對疑問處發問，根據所提供書面資料之時間表如下：七月底至八月中消耗品準備，八月中機器精度測試（一週），內標比測試（二週），盲樣測試（二週），試驗結果集計與解析（二週），此為概定之進度，時間上將視測驗樣品配製順利與否而有所變動。會議進行至三點半，期間與出席廠商代表交換名片並交換意見，我認為相互了解增加交流這也是此行重要的一個環節。會議後為儀器操作示範，分三組進行（ABI 7000—渡邊聰先生、ABI 7700—栗原秀夫先生、Roche Light-cycler—NIHS 的 Wakui 小姐），我及吳技士去旁聽栗原秀夫解說ABI 7700如何選定 Threshold-line 的位置，吳技士提到此法與他所了解有出入，認為最後需綜合我兩的認知，若有不清楚再行請教。由於參加者眾，整個下午實驗室都亂轟轟！下午就在儀器操作觀摩及詢答中度過，幾項資訊整理如附件十六。

#### 七月三十日（二）：

早上松岡猛博士囑咐我將上週五至農林水產消費技術中心進行之定量分析數據分析出來，並教導林旭陽技士如何選定 Threshold-line 位置的方法，以利銜接往後之研習工作，分析結果顯示四件 non-GM 玉米並無污染之情形，但另外兩件 Bt11 樣品在進行 mon 810 primer 對定量分析時出現正反應之訊號，顯示此二件 Bt11 樣品已遭 mon 810 玉米污染，計算後得知兩件之污染比例分別為 2.7% 及 2.2%，污染量相當高。由於 ABI 7700 儀器使用依舊滿檔，與松岡猛博士討論後決議明日依然前往農林水產消費技術中心進行定量實驗，下午則準備明日所需之樣品 DNA、primer 及 probe 等。

### 七月三十一日 (三):

早上的高速公路交通依舊繁忙，走走停停也花費一個半小時的行程。而此次再次造訪，條照雄課長更為我們引見該單位數名長官，其中包括理事長—大西詳三先生，他並詢問一些關於我國 GMO 方面之管理政策，如標示制度的實施時間、GMO 管理之權責單位及部門等，松岡猛博士解釋，由於 GMO 是目前各國關心之議題，因此大家都想藉各種管道收集並了解其他國家管理上之經驗，以供自己國家參考，可見 GMO 資訊交流與收集也是日本政府極為關切重視的環節。下午進行一連串之 ABI 7700 定量實驗之反應液配製及上機，分析樣品為 8 件 QTI non-GM 玉米，共分析 CaMV-35S 及 NOS 兩種基因，以確認是否污染。實驗空檔松岡猛博士為我們解釋實驗室之空間配置如何避免污染—GMO 樣品之粉碎獨立於一無菌操作台中進行，防止粉塵四散；樣品 DNA 之抽取及 ABI 7700 試藥試劑之配置各自在專用之無菌操作台中進行；PCR 反應之進行及電泳分析又獨立於另一實驗室進行，依據實驗目的區隔使用空間才可有效避免交叉污染，提高檢測之準確度，消除民眾及廠商對數據準確性之質疑。下午該單位進行內部會議，會後詢問松岡猛博士得知他們正討論一份預計釋出的「GMO 市售產品調查」報告資料，並將資料影本交給林旭陽技士，附件十七，此資料為該中心去年度（平

成 13 年) 抽驗 305 件市售玉米及黃豆加工產品，以了解廠商對 GMO 標示之執行情形。抽驗產品共計 305 件，其中包括生鮮玉米及大豆樣品計 14 件，大豆加工品計 236 件，玉米加工品計 55 件，結果檢出含 GM 成分者計 212 件，未檢出含 GM 成分者計 80 件，無法以 DNA 方法檢出者計 13 件，其中只有 1 件樣品經分析發現 GM 含量達 6%，已超過日本 5% 之限量標準而未標示，明顯違法，該單位已要求廠商改進，此份資料可作為本局日後執行類似市場調查時之參考。實驗結束已經晚上 9:00，今晚於 NFRI 將舉辦一場“啤酒大會”，藉機抒解大家實驗上的壓力，可惜我們回到 NFRI 已是將近 11:00，遺憾無緣參與盛會。

八月一日(四):

早上進行昨日 ABI 7700 資料之電腦分析，結果顯示 CaMV-35S 數據有兩件樣品呈現“正反應”而 NOS 數據則有四件樣品呈現“正反應”，意味這 8 件 QTI non-GM 玉米有四件已遭 GM 品系玉米污染，而四件中有兩件之污染源為不含有 CaMV-35S promoter 之 GA21 品系之 GM 玉米，此結果再次證明 non-GM 玉米取得的不易。下午則進行另一批玉米樣品之 ABI 7700 定量分析，由林旭陽技士負責試藥試劑之配製，我則將松岡猛博士所要求之幾項實驗操作要訣教授給林技士。下午還有一項觀察重點即如何分離玉米顆粒之胚乳及胚芽。此部分實驗由重松萬由小姐、吉村倫彰先生負責，他們先將玉米顆粒復水數小時，以鑷子去除麩皮，再以扳手敲破顆粒，續以解剖刀小心取出胚乳部位，最後將胚乳及胚芽分置入無菌試管保存，日後將對胚乳及胚芽分別進行粉碎，抽取 DNA 分析玉米顆粒之純度及是否為本次測驗所需求之 F1 世代玉米。磨碎單顆玉米所需之粉碎機有別於大型粉碎機，原先預定於完成胚乳及胚芽分離步驟後，遂進行粉碎並示範讓我瞭解，但由於需分離之樣品數目過多，時間延宕，粉碎步驟只好延至明日進行。

八月二日（五）：

今天是待在 NFRI 的最後一天了，早上日野博士即囑咐栗原秀夫先生為我準備一些 GM 玉米及黃豆定量分析之試藥試劑，以便讓我攜回藥檢局自行練習，為即將舉行之 collaborative-study 預作準備，看栗原秀夫先生百忙中還抽空為我配製試劑，尋找乾冰及包裝盒打包，並細心叮嚀我攜帶時該注意的事項，心裡一方面對於造成大家麻煩而覺得抱歉，另一方面也感激日野博士的細心及考慮周到。此外並把握時間學習觀摩胚乳及胚芽之分離工作及如何粉碎，只可惜到我離開 NFRI 為止，胚乳及胚芽之分離工作仍在持續進行，無緣見習如何進行粉碎，留下些許遺憾。午後，我與實驗室的成員們一一道別，整理打包我的行囊，結束這 28 天的研習課程，並搭乘 JR 常磐線列車出發前往東京便與吳宗熹技士會合，預計搭乘八月三日之飛機回國。

八月三日（六）：回程

夏日的東京都是如此的酷熱，街道上卻無時無刻不擠滿了人潮。日野博士曾告訴我在這個日本最大的都市中擠滿了全日本十分之一的人口，無怪乎它總是人潮擁擠。東京都複雜的地下鐵系統儘管讓此地的居民交通便利，但卻讓初來此地的我感到眼花撩亂！用完午餐稍事休息之後隨即搭乘往新成田機場的直達巴士，離開這炫麗繁榮的東京都，並搭乘長榮航空 20:00 的 BR 2195 K 班機回國。回程時大批資料讓我的行李超重，在航空公司人員的堅持下，我只好把超重的資料及行李往身上背，沈重的行囊也成為此行難忘的經驗。

## 參、心得及建議

- 一、日本政府所隸屬之 GMO 管理單位彼此責任劃分明確，權責區分，各司其職，相互支援，以達成有效管理。

關於日本政府對 GMO 的管理模式，曾請教實驗室中幾位同事，並將其整理如附件十八。目前負責日本 GMO 檢測方法開發共有二個單位，分別為隸屬於「厚生勞動省 MHLW」之「國立醫藥品食品衛生研究所 NIHS」及隸屬與「農林水產省 MAFF」之「食品總合研究所 NFRI」。NIHS 主要負責未經核准 (un-authorized) GM 作物之檢驗方法開發，而 NFRI 則負責已核准 (authorized) GM 作物之檢驗方法開發及基因改造食品標示之管理。由於 MHLW 及 MAFF 角色不同，分工時的考量就不同，MHLW 主管醫藥品等與人體健康安全直接相關之業務，而未經核准之 GM 作物被視為是對人體具有潛在性之危害，因此將「未經核准之 GM 作物之檢驗」工作交由 MHLW 所屬之 NIHS 負責，以期阻止所有具潛在危害性之 GM 作物進入日本市場。MAFF 負責農、漁業等的管理業務，而已核准之 GM 作物則被視為是對人體安全而不具危害性，但仍必須在適宜之規範下進行流通，以滿足國民知的權利，並給予民眾選擇接受 GM 作物與否之選擇權，因此將「已核准之 GM 作物之檢驗」工作交由 MAFF 所屬之 NFRI 負責，NIHS 及 NFRI 專職於各種 GM 作物之檢驗方法開發，無須負擔如查驗登記等其餘之行政工作，使任務得以單純化。此二單位再將所開發完成之方法交由「農林水產消費技術中心 CFQLCS」針對市售產品進行調查監控，以了解廠商標示之執行情形，而 CFQLCS 亦只專職於市售產品之監測工作，三者間的分工相當明確，各司其職。面對日漸加重之 GM 作物管理業務，日本之管理模式或可作為我們的參考，在此種分工的模式下，管理單位面對龐大

繁重的 GMO 管理業務一方面得以舒緩壓力，再則各單位被賦予之權力及任務不同，不致因業務類似或重疊而耗費多餘之人力、經費及時間，在各自領域中專才專用發揮所長，再將彼此之資訊整合，必要時相互支援，結合成一周延之管理網路，始可有效達成全方位之管理。

## 二、結合民間企業之人力財力，參與國家檢驗方法研發及相關業務推行

日本政府 GMO 檢驗相關任務之推動，是結合來自政府及民間企業兩者的力量合力進行，以日野博士實驗室為例，屬於 NFRI 之正式職員大約只有 6 至 8 名，但是參與此次 collaborative study 之工作人員則高達 25 人以上，其中絕大部分來自日本各地民間企業研發單位之研究人員，NFRI 無須負擔這些企業人員之薪水，研究所需之經費絕大部分亦由廠商支付，在企業界人力及財力的支援下，GMO 檢驗工作更能夠順利推行，據個人了解日本大部分之 GMO 官方檢驗方法也是在這些人員的通力合作下才得以迅速完成，因此民間力量是功不可沒的。相較國內的情況，以藥檢局極為有限的人力，必須負擔與日本相同之 GMO 檢驗工作量，自然會覺得捉襟見肘。因此，加強政府與企業之間、政府與學校單位之間的合作關係，或以專案任務委派的方式來補強本局現有人力短缺的困境，也是值得參考的解決之道。

## 三、加強政府單位與民間企業間之人才、資訊等交流，雙方互蒙其利

在日野博士實驗室裡見識到來自各個企業的人士參與檢驗方法研究開發，最令我感到好奇的就是企業為何願意不計代價的支援政府單位，兩者是否有什麼默契，或者企業可獲得何種利益！我曾請教幾位同事，以此種合作模式所開發之檢驗方法其所有權屬於何者，是否為雙方所共有？得到的答案竟是“歸政府所有，廠商不具有所有權”，而廠商的利基點為何？藉由人員

的交流，加速 GMO 相關資料之取得，包括檢驗的方法，方法開發的進度，政府管理制度的趨勢，各國之 GMO 資訊等等，這些對企業而言都是很有價值的資訊，企業便可依此盡早訂定因應措施及發展方向，早期準備以配合政策。而企業與企業界間也可藉此進行技術交流，吸取彼此的經驗，交換心得，解決各家廠商的不同問題，因此日野博士實驗室對企業而言無疑是最好的人才培訓機構。而企業在因應政府管理制度的過程中若遭遇窒礙難行處或有疑慮時，亦可藉由 NFRI 的橋樑溝通角色將其傳達至各相關管理部門，作為政府制度修正時之依據及參考，如此相互交流相互溝通，政府所制訂的管理法規就不至於與企業現況脫節，形成各唱各的調的窘況，企業也更能依循法規執行自主管理，減輕權責部門的負擔，無疑是一種雙贏的模式。反觀國內情形，廠商在面對即將執行之管理制度多半是以一種抗拒或質疑的態度面對，配合意願不高，漸漸形成雙方對立各執一詞的情形，即使有再好的管理規範，也會因為溝通不良或廠商的誤解而難以推行。所以政府在研擬管理制度時應思考增加民間企業參與法條制訂的機會，廣泛採納參考其建議，企業也應適時提供管理單位相關資訊，並以接納與配合的態度多方了解管理制度與規範，共同面對勢在必行的 GMO 管理體制，如此才能雙方互蒙其利。

#### 四、實驗室規劃

實驗室空間之規劃向來是藥檢局急需克服之問題。GMO 檢驗的難題之一就是如何避免各種品系間的交叉污染，觀摩日野博士實驗室後得知，要避免交叉污染，依不同目的區隔實驗空間是有其必要性。定性實驗、定量實驗及樣品 DNA 之抽取必須於個別之實驗檯進行，絕不混用，樣品之粉碎更需於獨立之房間中進行。正因為樣品的高污染性，寬敞的實驗空間就成為必備的條件，日方為執行此次 collaborative study，所使用的實驗室空間為目



前藥檢局五組空間的 2 至 3 倍，即使如此仍時常發生污染情形。以目前藥檢局空間利用已達飽和之情形，在空間無法擴充的前提下，更需細心做好實驗室規劃工作，有效利用現有的空間並區隔使用，以符合 GLP 實驗室要求，此為本局應該努力改進的方向。

#### 五、養成良好的實驗習慣，降低樣品及操作污染

實驗室裡的成員在實驗操作時都謹遵既定之操作步驟，極力避免樣品及 DNA 之交互干擾，已提高數據之準確性，幾點注意事項分述如下，可供本局同仁參考及學習：

1. 定性、定量、電泳分析時必須於各自獨立之專用操作台操作。
2. 定性、定量、電泳分析須使用專用之微量分注器。
3. 操作台面於使用前須以 70%酒精仔細擦拭，並鋪設保鮮膠膜。
4. 不同樣品操作前，須重複(3)之清潔防護步驟。
5. 樣品秤重前微量天秤周圍之檯面需以酒精擦拭及鋪設保鮮膠膜，樣品之添加必須於天秤外進行，不可將藥匙深入微量天平內。
6. 各種 PCR 反應試藥試劑之取汲必須配戴無粉乳膠手套，並將試藥試劑置於冰上保冷。
7. 配製試劑過程不得交談講話，以免口沫污染。
8. 實驗完成後，操作台、試管架等器具須以 70%酒精仔細擦拭、晾乾。
9. 廢棄物不得隨意丟棄，廢棄之樣品試管、微量試管皆須鎖上蓋子，避免外洩。

#### 六、良好之團隊合作及默契，方能事半功倍。

Collaboratory study 的工作量是相當繁重，經個人觀察，儘管前置準備工作

已經耗時近 4~5 個月，支援任務的人員也持續增加，但龐大的工作量仍讓大家每天必須忙到三更半夜才結束工作。為有效管理及發揮這許許多多的人力資源，GMO 工作團隊依任務不同區分為幾個小團隊，每個小團隊由一名資深人員帶領，各自負責一項任務，小組負責人不定時召集組員討論，交換心得，各小組負責人也會不定時集會，交換各組之任務概況，而日野博士則充分授權各負責人並於每星期五進行實驗室 meeting，掌握全盤進度及交辦任務。以此種由小至大，分層負責的方式把繁重之任務平均分配，共同承擔，使得工作得以順利推展。據我觀察，各組成員間不曾出現爭執的情況，只有不斷討論與集思廣益來共同面對問題，有趣的是日野博士會不定時的舉辦小型宴會以慰勉大家的辛勞、提振士氣並凝聚向心力，團隊默契在此間一覽無遺。

#### 七、建立完備之實驗操作 SOP

實驗室裡有一個專用書櫃放置各種儀器設備及實驗方法的操作 SOP，成員們在進行各項實驗之前一定會翻出相關之 SOP 依法操作。大項實驗如 ABI 7700 之上機操作，小項實驗如 DNA 濃度測定都可找到撰寫詳細之 SOP。由於有完整的操作方法紀錄可供依循，操作者可以很容易的找到並學會實驗技巧，實驗結果發現錯誤也能很快找出出錯的步驟，而各種研發技術及實驗技巧也得以在實驗室裡流傳下來，避免不同人員操作所造成之人為誤差，更不會因為人員離職造成技術斷層。

#### 八、建立完備之方法開發實驗記錄

每種 GMO 檢驗方法的開發都是累積無數實驗心血的成果，研發過程的資料與數據更是方法準確性的最佳佐證，因此日野博士要求每位成員必須做好

完整的實驗記錄，作為日後發現問題的佐證資料。無論是 NFRI 的正式研究人員或者是各企業的短期支援人員，實驗過程都必須完整詳實記錄，並在結束研習之前完成一份詳細之研習報告存檔。個人就曾翻閱他們的實驗記錄，從試藥試劑配方、實驗步驟、實驗條件、實驗結果及照片都有完整記載，每個人都可調閱前人的紀錄參考。若要進行新品系 GM 作物檢驗方法開發，就可參考前人紀錄進行研發，加速研發腳步，幫助極大。實驗室成員的研究記錄如同實驗室的智庫及資產，必須小心維護與保存。

## 九、國際交流與合作

GM 的議題是國際性的議題，許多資訊不是光靠自己單打獨鬥就有辦法取得，增加與其他國家或機構交流，擴展資訊獲得的管道是很重要的。赴日期間曾拜會日本「獨立行政法人農林水產消費技術中心」，該會理事長在接見我方人員時亦把握機會詢問我國即將執行之 GMO 標示制度概況，研習期間日方及韓方人員也會與我交換有關管理及檢驗方面之議題，透過交流得以截長補短，相互學習。此次研習我們更是收穫豐富，受益於日方人員的經驗傳授，解決許多我們困擾已久的實驗瓶頸，了解日方政府的 GM 方法開發流程及管理體制，見習如何準備及進行「GMO 檢驗方法實驗室聯合評估」，獲得日方針對市售加工食品標示制度之市調資料，了解民間企業與政府單位如何互動交流並建立與日本官方實驗室良好的互動，這些收穫日後對本局在 GMO 業務之推展上將有長遠而持續性的助益。

本次赴日研習，感謝國科會提供計畫經費支持，並感謝本組施養志組長及闕麗卿博士的辛勞，撰寫並爭取研究計畫支持，亦感謝赴日期間本組同仁的鼓勵幫忙與協助，在此一併致謝。返國後於本局九十一年八月份第三次的

局務會議(八月十九日)發表此次赴日研習之「出國人員心得報告」，報告摘要如附件十九。

#### 肆、附 件

附件一

200.7.17

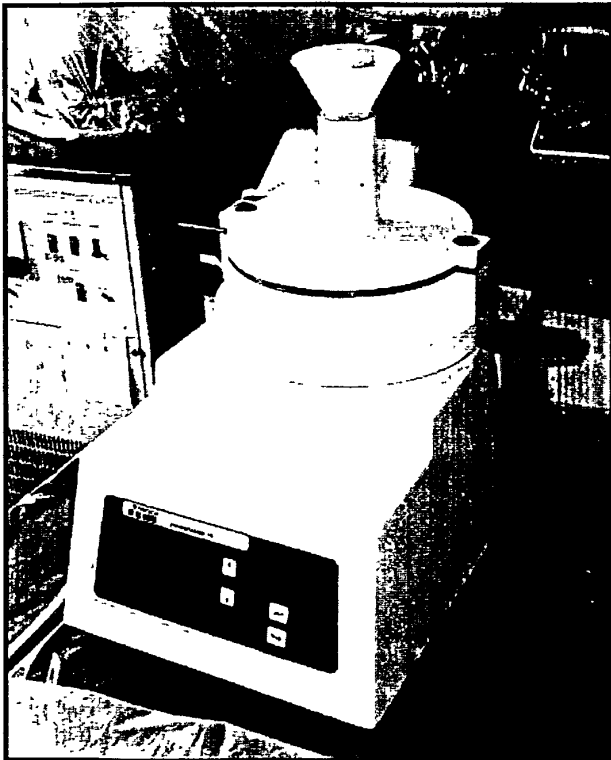
7月7日	7月8日	7月9日	7月10日	7月11日	7月12日	7月13日
	砂川		QTI 500g 71.7g		QTI 90g	
	コシノサトウ					
	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 (成田野)	砂川 栞山 成田野	
7月14日	7月15日	7月16日	7月17日	7月18日	7月19日	7月20日
	砂川 QTI 12.1		コシノサトウ CaMV-GA			
	コシノサトウ	30g	30g	30g		
			GM MONITORING GA 29 E 56	GM	GM	
	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 成田野	砂川 栞山 (成田野)	砂川 栞山 成田野	
7月21日	7月22日	7月23日	7月24日	7月25日	7月26日	7月27日
	コシノサトウ					
	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	
7月28日	7月29日	7月30日	7月31日	8月1日	8月2日	8月3日
	0.05.0 1%試料作製			1.1-1試料		
	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	
8月4日	8月5日	8月6日	8月7日	8月8日	8月9日	8月10日
	1.1-1試料		試料作製完了			
	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	砂川 井上 大島	

MONITORING

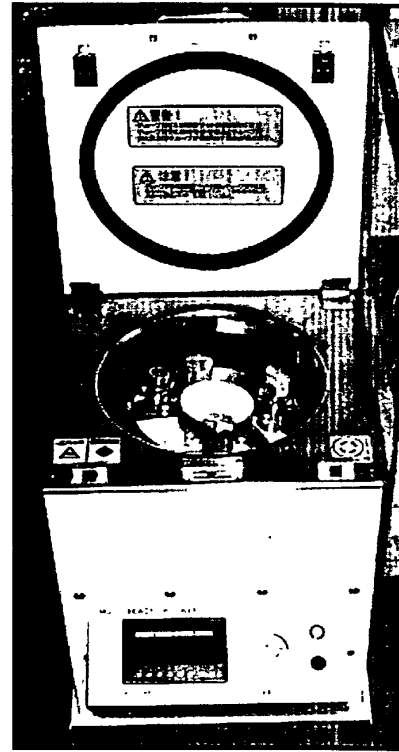
定性

7月21日	7月22日	7月23日	7月24日	7月25日	7月26日	7月27日
	Primer Probeの分注 STDの希釈及び分注 内標比用DNAの希釈及び分注  Primer Probeの分注 STDの希釈及び分注		ブラインドサンプルの抽出  ブラインドサンプルの希釈及び分注 ブラインドサンプルのナンバリング	内標比測定(食料研用7700) 内標比測定(食料研用7000) 内標比測定用試料送付準備		
	栗原 落田 青木 Dr Jeong Dr Lee	栗原 落田 青木 Dr Jeong Dr Lee	落田 青木 Dr Jeong Dr Lee	栗原 落田 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野	落田 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野	
7月28日	7月29日	7月30日	7月31日	8月1日	8月2日	8月3日
	内標比測定(食料研用7700) 内標比測定(食料研用7000) 内標比測定用試料送付  ブラインドサンプル均一性確認(ABI7700)					
	栗原 落田 大島 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野	栗原 落田 大島 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野	落田 大島 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野	栗原 落田 大島 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野 正野	落田 大島 青木 Dr Jeong Dr Lee 梶野 正野	
8月4日	8月5日	8月6日	8月7日	8月8日	8月9日	8月10日
	ブラインドサンプル均一性確認(ABI7700)  ブラインドサンプル測定用試料送付準備		ブラインドサンプル測定用試料送付			
	栗原 落田 大島 青木 Dr Lee 梶野 正野	栗原 落田 大島 青木 Dr Lee 梶野 正野	落田 大島 青木 Dr Lee 梶野 正野	栗原 落田 大島 青木 Dr Lee 梶野 正野	落田 大島 青木 Dr Lee 梶野 正野	

附件二



(A)



(B)

## Designated Processed Foods in GMO Labeling

1. Tofu
2. Frozen-tofu, yuba and other tofu
3. Natto
4. Soy milk
5. Miso paste
6. Boiled soybeans
7. Canned or bottled soybeans
8. Soy power
9. Roasted soybeans
10. Processed food made from 1~9
11. Processed food made from soybeans
12. Processed food made from soy powder
13. Processed food made from soy protein
14. Processed food made from green soybean
15. Processed food made from soybean sprout
16. Corn snack
17. Corn starch
18. Pop-corn
19. Frozen-corn
20. Canned or bottled corn
21. Processed food made from corn flour
22. Processed food made from corn grits
23. Processed food made from corn
24. Processed food made from 16~20
25. Frozen potato
26. Dried potato flakes
27. Potato starch
28. Potato snack
29. Processed food made from 25~28
30. Processed food made from potato



## 附件四

Q: 本局自行發展之 plasmid 標準參考物質，定量分析時相同 plasmid 上之不同基因，定量曲線無法重疊？

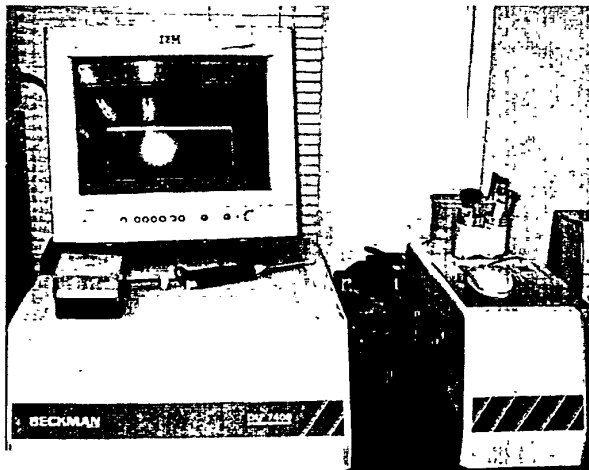
A: 此現象對準確性不致造成影響，因為日野博士所發展之 plasmid 標準參考物質也有相同現象。部分同事認為此為定量 PCR 條件不好所致，可嘗試修正並找尋更合適之 PCR 反應條件。

Q: 本局使用現有之分光光度儀測定玉米 DNA 抽出液時，數據再現性很差？

A: 該實驗室之分光光度儀機型為 BECKMAN DU-7400，所需之最低測量量為 50 uL，測得的數據都很穩定。推測原因為“石英比色槽-cuvette”規格不合所致。

Q: 請問日本方法用 Qiagen MAXI 抽 DNA 時的樣品重量為幾克？

A: 渡邊聰先生表示，一般樣品都取 1 克。



分光光度儀



石英比色槽

## 附件五

1. 重松万由小姐（日清製粉公司）表示，他們公司採用 ABI 7700 定量 PCR 機型。渡邊聰先生（House Foods 食品公司）表示，他們公司擁有兩台 ABI 7700 定量 PCR。
2. 各公司所用之定量套組即為日野博士所研發的 plasmid 系統！
3. 實驗的所有樣品，皆進行三重覆，包括 NTC，所以包括 internal control gene 及 GM gene，每一個 96 well PCR plate 只能進行約 12 個樣品，而渡邊聰先生現正進行三重覆及二重覆之間的差異性比較評估實驗。
4. ABI 7700 的主要配方為 DNA templet(2.5 uL)、maxter mix( 12.5 uL)、primer & probe mixture ( 10 uL)。
5. primer & probe mixture 皆包含於定量分析套組中！其中有各種品系之高濃度 primer 及 probe。使用時，高濃度之 primer 及 probe 經稀釋後將之全部混合，冷凍保存於-20°C。古井聰博士表示，混合好的 primer & probe mixture 若保存於-20°C，可維持 1 年不致 degrade！重松万由小姐表示該公司稀釋用之 H<sub>2</sub>O 為商業販售之無菌水。稀釋用之水，一旦經過開封的就不可使用，一定要使用全新開封的水，因為 H<sub>2</sub>O 是高污染物。

附件六

Collaboratory Study participants						
機關名稱	ABI 7700	ABI 7900	ABI 7000	Light cycler	定性	
R&D Center			◎			
肥試料試験所	◎					
分析センター (center)	◎				◎	
日清製粉					◎	
国立薬品衛生研究所	◎	◎	◎	◎	◎	
食品薬品安全センター(center)			◎			
和光堂					◎	
ニッポンジーン (nippon-gene)					◎	
消費技術センター(center)	◎		◎		◎	
昭和産業					◎	
アサヒビール (Asahi beer)	◎					
森永製菓					◎	
カルビー	◎				◎	
アスマック (FASMAC)	◎		◎	◎	◎	
食品環境検査協会	◎				◎	
東京都立衛生研究所	◎					
エスアールエル						
日本穀物検査協会					◎	
ハウス食品 (House Foods)	◎				◎	
ABI	◎	◎				
台湾 NLF	◎					
食品總和研究所	◎		◎	◎		

※台湾 NLF 定性：アガロース (agarose) TAKARA L03 相等品

## 附件七

日本之 DNeasy Plant Maxi kit DNA 抽取方法【for 黃豆】	
1	稱取適量之樣品(always 1g)，以 10-100ul pipet 加入 20ul 之 RNase，以 1000-5000ul pipet 加入 10 ml AP1 buffer(65°C)，反覆倒置 tube，並以 mixer 混勻。
2	於 65°C 水浴 1 hr，(間隔 15 min 取出 mix 一次，先激烈 shake tube，再以 mixer 於最高速 mix 10 sec)。
3	室溫，3000g 離心 10 min。
4	以 1000-5000ul pipet 吸取 7 ml 上清液至一新的 50 ml tube。
5	以 1000-5000ul pipet，取 2.5 ml 之 AP2 buffer 加入 tube 中，以 mixer 於最高速 mix 10 sec，冰浴 15min。
6	室溫，3000g 離心 35 min。
7	以 1000-5000ul pipet 吸取 8 ml 上清液至 QIA shredder spin column。
8	室溫，3000g 離心 5 min。
	以 1000-5000ul pipet 小心吸取 7.5 ml 至一新的 50 ml tube，避免吸到 pellet 及液面之 debris。
	以 mixer 於最高速 mix 10 sec，以 1000-5000ul pipet 吸取 6.8 ml 上清液至一新的 50 ml tube。
11	以 1000-5000ul pipet 吸取 10.2 ml 之 AP3/Et-OH buffer 加入其中，以 mixer 於最高速 mix 10 sec，將之倒入 Dneasy spin column。
12	室溫，3000g 離心 15 min，去除濾液。
13	以 1000-5000ul pipet 吸取 12 ml 之 AW buffe 至 column，於室溫，3000g 離心 15 min。
14	Column 移至一新的 50 ml tube，以 100-1000ul pipet 加入 1ml 之 H <sub>2</sub> O(65°C)。
15	靜置 5 min，於室溫，3000g 離心 10 min。
16	以 100-1000ul pipet，一方面測定 eluent 體積，一方面 transfer 到 2 ml 之微量離心管中，以 100-1000ul pipet 加入等量之 iso-propanol。
17	反覆倒轉微量離心管 10 次，室溫下靜置 5 min。
18	4°C，12000g 離心 15 min，以 100-1000ul pipet 移除上清液。
19	以 100-1000ul pipet 加入 500ul 之 70% ethanol，以手指輕彈之，使底部之 DNA pellet 浮至 70% ethanol 中。
20	4°C，12000g 離心 3 min，再以 100-1000ul pipet 或 10-100ul pipet 完全移除 ethanol，使 DNA pellet 乾燥之。
21	以 10-100ul pipet，加入 100ul 之 TE buffer(pH 8.0)，並使 DNA 溶解其中
22	以手指輕彈之，幫助溶解，再以離心方式使附著於微量離心管壁之溶液集中於管底，於冰箱中靜置 overnight(12-24hr)。

日本之 DNeasy Plant Maxi kit DNA 抽取方法【for 玉米】-----比較 easy	
1	稱取適量之樣品(always 1g)，以 0.5-10ul pipet 加入 10ul 之 RNase，以 1000-5000ul pipet 加入 5 ml AP1 buffer(65°C)，反覆倒置 tube，並以 mixer 混勻。
2	於 65°C 水浴 1 hr，(間隔 15 min 取出 mix 一次，先激烈 shake tube，再以 mixer 於最高速 mix 10 sec)。
3	以 1000-5000ul pipet，取 1.8 ml 之 AP2 buffer 入 tube 中，以 mixer 於最高速 mix 10 sec，冰浴 15min。靜置
4	室溫，3000g 離心 15 min。
5	以 1000-5000ul pipet 吸取 4.2 ml 上清液至 QIA shredder spin column，避免吸到 pellet 及液面之 debris。
6	室溫，3000g 離心 5 min。
	以 1000-5000ul pipet 小心吸取 4ml 濾液至一新的 50 ml tube，避免吸到 pellet。
	以 mixer 於最高速 mix 10 sec，以 1000-5000ul pipet 吸取 3.4 ml 上清液至一新的 50 ml tube。
9	以 1000-5000ul pipet 吸取 5.1 ml 之 AP3/Et-OH buffer 加入其中，以 mixer 於最高速 mix 10 sec，將之倒入 Dneasy spin column。
10	室溫，3000g 離心 5 min，去除濾液。
11	以 1000-5000ul pipet 吸取 12 ml 之 AW buffer 至 column，於室溫，3000g 離心 15 min。
12	Column 移至一新的 50 ml tube，以 100-1000ul pipet 加入 1ml 之 H <sub>2</sub> O(65°C)。
13	靜置 5 min，於室溫，3000g 離心 10 min。5250 kn70
14	以 100-1000ul pipet，一方面測定 eluent 體積，一方面 transfer 到 2 ml 之微量離心管中，以 100-1000ul pipet 加入等量之 iso-propanol。
15	反覆倒轉微量離心管 10 次，室溫下靜置 5 min。
16	4°C，12000g 離心 15 min，以 100-1000ul pipet 移除上清液。
17	以 100-1000ul pipet 加入 500ul 之 70% ethanol，以手指輕彈之，使底部之 DNA pellet 浮至 70% ethanol 中。
18	4°C，12000g 離心 3 min，再以 100-1000ul pipet 或 10-100ul pipet 完全移除 ethanol，使 DNA pellet 乾燥之。
19	以 10-100ul pipet，加入 100ul 之 TE buffer(pH 8.0)，並使 DNA 溶解其中 50
20	以手指輕彈之，幫助溶解，再以離心方式使附著於微量離心管壁之溶液集中於管底，於冰箱中靜置 overnight(12-24hr)。

◎ Step 11-20 同【黃豆 DNA 抽取方法 Step 13-22】。

## 附件八

- 1、定性操作時可使用 QIAGEN DNeasy Plant maxi kit 或 QIAGEN Genomic tip kit，但定量操作時只可使用 DNeasy maxi，據渡邊聰說，不同 Kit 抽出之 DNA，定量分析後會得到不同結果，所以 kit 套組必須一致。定性則無此顧慮！
- 2、今天之樣品即為上週所粉碎之 non GM (QTI) 玉米，起始樣品重量確定為 1 克！
- 3、一切操作皆須戴手套，樣品稱重時，天秤桌面皆以 70%乙醇擦拭，再以保鮮膜將天秤四周之桌面覆蓋，tube 添加樣品時需取出添加，藥杓不要深入天秤內，以免天秤污染。每秤完一件樣品，桌面重擦，保鮮膜重換。
- 4、抽取 DNA 時，bench 使用前亦需以 70%乙醇擦拭，再以保鮮膜將 bench 桌面覆蓋。以 Kit 抽取，一開始需先添加 RNase，以 pipet 取 10 ul 後只需將其擠於 tube 管壁即可，之後再添加 AP1，倒轉試管敲打，則所有試藥及 sample 便可充分混勻。Micro-pipet (尤其是常用之 5ml)最好要有前端之 filter，以避免 Micro-pipet 被污染，取 5 ml 時需分為 4+1ml (或 2.5×2)，以避免一次取 5 ml 的體積太大，污染到 Micro-pipet。往後之步驟凡是有用到 5 ml Micro-pipet 時皆必須注意此點。
- 5、若分次取用溶液，tip 必須更換 (亦可採用以下方法，則 tip 無須更換-----第一次取用添加時，tip 尖懸空，不要接觸 sample tube，則此 tip 可再使用第二次以節省 tip 用量。)
- 6、Maxi kit 所使用的為 50ml 離心管，需確認藥檢局是否有相等之儀器設備，轉速需達 3000 g (=3750 rpm)。
- 7、在添加 5.1 ml 之 AP3 後緊接著是 mix 10 秒鐘。若樣品有數個，

必須 one-by-one，切忌不可一次添加完數個 sample tube 後再一起震盪 mix。

- 8、所有用過之 tube 皆須索蓋，才可丟棄，避免實驗室污染。
- 9、將 DNA 溶液倒入 DNeasy spin column(白色)離心完後，需確認 column 是否仍潮濕。若是，則再離心 10 min 至 column 乾燥。
- 10、以 1ml 無菌水溶離 DNA 後需以 micro-pipet 測定體積，以便加入等量之 iso-propanol，進行 DNA 濃縮。
- 11、至於為何決定以 distill-H<sub>2</sub>O 取代 kit 所附之 AE buffer 溶離 DNA，請教渡邊聰先生後得到之解釋如下：發展方法之初，發現以 MAXI kit 抽出之 DNA 有時候進行 PCR 反應時會失敗，在尋找問題時，他們發現 AE buffer 所含之成分不明，在找不到其他步驟有何失誤下，推測為 AE buffer 中所含不明成分造成，故決定以 d-H<sub>2</sub>O 取代 kit 所附之 AE buffer。
- 12、濃縮後之 DNA 需以 70%之酒精清洗後離心，先以 200-1000 ul 之 pipet 吸去大部分酒精，之後再離心一次，殘餘極少量之酒精再以 100-200 ul 之 pipet 吸除之。(此步驟之操作，移除乙醇極為仔細，蠻佩服他們的用心及仔細，難怪 DNA 品質好。)
- 13、以真空離心機乾燥 DNA 之沈澱物 (此機器確定藥檢局沒有)。
- 14、之後將 DNA 溶於 50ul 之 TE buffer，以手指輕彈 tube，待全溶後，spin-down 一次，取出後，再以手指輕彈 tube，再確認是否有 pellet，如此反覆進行至確定無 pellet (此步驟日本方法極為重視，這或許是為什麼他們 DNA 定量定的准的原因之一吧！此步驟花了蠻多時間的！)。
- 15、操作步驟中，加入 50ul 之 TE buffer 後需於冰箱中靜置隔夜，早上取出再確定 pellet 存在與否，若然，再加入 50ul 之 TE

buffer(total 為 100ul)，續置於冰箱中，至下午再確定 pellet 是否存在，若已全溶，則可進行 DNA 濃度測定。【若第一天乾燥後之 DNA 之 pellet 就蠻大的，也可直接加入 100ul 之 TE buffer 溶解之，靜置隔夜】。

- 16、DNA 分光光度器，為 Beckman 公司出品 DU4700，為大型之機型，非藥檢局所有之小機型，cell 亦很小(50ul 就足夠，sample change 時只需把前一 sample 之 DNA 溶液吸乾，不需再以清水清洗)，放置 cell 之空間為開放式。OD280、OD260、OD230 之 program 為內建式，一次測定各種 DATA 一次完成。
- 17、DNA 品質之確定，請教松岡猛博士後，他說需 check OD280、OD260、OD230。OD280 當然是測定溶液中 protein，OD260 為 DNA，而 OD230 則為雜質- 可能為 poly-saccharide，當 photometer scan 之後，OD230、OD280 為低點，而 OD260 為高點，要確認 DNA 品質必須為 OD260/ OD280 比值介於 1.7(1.8 文獻)~2.0；且 OD260/ OD230 比值大於 1.7，則 DNA 品質可謂 good！



## 附件九

以 QIAGEN DNeasy Plant Maxi kit 抽 1g 玉米粉末之 DNA 濃度測定：

Sample ID	OD 230	OD 260	OD 280	OD 260/OD 230	OD 260/OD 280	稀釋倍數	DNA 濃度(ng/ul)
blank	-0.0062	-0.0005	-0.0013	0.07703	0.67945	1	-0.02377
C-1	0.1007	0.2170	0.1214	2.15568	1.78832	50	542.5968
C-2	0.1106	0.2251	0.1259	2.03450	1.78730	50	562.7409
B-1	0.1252	0.2514	0.1326	2.00705	1.89618	50	628.4381
B-2	0.1355	0.2723	0.1531	2.00907	1.77924	50	680.7891
D-1	0.1117	0.2120	0.1187	1.89860	1.78697	50	530.1242
D-2	0.1197	0.2248	0.1264	1.87792	1.77830	50	562.0193
E-1	0.1535	0.2967	0.1666	1.93271	1.78063	50	741.6395
E-2	0.1386	0.2724	0.1526	1.96543	1.78459	50	681.0392
F-1	0.1613	0.2929	0.1646	1.81629	1.78015	50	732.3694
F-2	0.0991	0.2376	0.1321	2.39760	1.79797	50	593.9610

## 附件十

以 QIAGEN DNeasy Plant Maxi kit 抽 1g 玉米粉末之 DNA 濃度測定：

Sample ID	OD 230	OD 260	OD 280	OD 260/OD 230	OD 260/OD 280	OD 260/OD 280	OD 260/OD 280	OD 260/OD 280	DNA 濃度 (ng/ul)
blank	-0.0010	-0.0006	-0.0002	0.63489	2.74934	2.74934	2.74934	2.74934	-0.03127
G1	0.1316	0.2442	0.1360	1.85557	1.79527	1.79527	1.79527	1.79527	610.4282
G2	0.1374	0.2729	0.1518	1.98687	1.79818	1.79818	1.79818	1.79818	682.3423
H1	0.1178	0.2459	0.1369	2.08813	1.79604	1.79604	1.79604	1.79604	614.8345
H2	0.1424	0.2965	0.1654	2.08250	1.79243	1.79243	1.79243	1.79243	741.1788
I1	0.1579	0.3248	0.1804	2.05711	1.80088	1.80088	1.80088	1.80088	812.0412
I2	0.1326	0.2732	0.1519	2.06084	1.79870	1.79870	1.79870	1.79870	683.0225
J1	0.1514	0.2996	0.1665	1.97923	1.79968	1.79968	1.79968	1.79968	749.0967
J2	0.1610	0.3169	0.1779	1.96778	1.78146	1.78146	1.78146	1.78146	792.2748

此為第二批 non GM 之 DNA 溶液，濃度亦很高！品質也很好！

# 附件十一

以 QIAGEN DNeasy Plant Mini kit 抽 0.2g 玉米粉末之 DNA 濃度測定：

Sample ID	OD 230	OD 260	OD 280	OD 260/OD 230	OD 260/OD 280	稀釋倍數	DNA 濃度
blank	0.0013	-0.0014	-0.0013	-1.12328	1.14189	1	-0.07141
Mon-1	0.3116	0.7831	0.4377	2.51340	1.78918	10	391.5317
Mon-2	0.3856	0.9136	0.5101	2.36931	1.79093	10	456.8139
GA21-1	0.3064	0.7318	0.4101	2.38803	1.78425	10	365.8769
GA21-2	0.3031	0.7190	0.4044	2.37237	1.77772	10	359.4842
Event-1	0.3061	0.7541	0.4225	2.46345	1.78468	10	377.0304
Event-2	0.2924	0.7015	0.3928	2.39876	1.78573	10	350.7348
Bt11-1	0.3820	0.8980	0.5008	2.35053	1.79323	10	448.9861
Bt11-2	0.4889	1.2059	0.6696	2.46659	1.80090	10	602.9386
T25-1	0.1889	0.5072	0.2842	2.68502	1.78465	10	253.5872
T25-2	0.1976	0.4971	0.2767	2.51650	1.79648	10	248.5697

PS :

- 1、以 Mini kit 抽 0.2g 玉米粉末，DNA 濃度蠻一致的，都維持在 350 附近或以上（此為砂川博士的經驗值）。
- 2、不同 GMO 之 DNA 抽取效果不一，比較幾種，以玉米 DNA 濃度最高！potato 及黃豆都低，potato 受限制品 polysaccharide 太多，而黃豆抽取過程麻煩，效率又不是很好，peanut 也有相同效率不佳之問題。
- 3、請教砂川博士如何克服樣品 polysaccharide 太多之問題，她說樣品可添加 amylase 反應，改善抽取效率。
- 4、因砂川博士說他做過 potato，遂藉機請教日本之 GM-potato 是否皆為進口亦或是有國內自行研發，可是她說她並不清楚！

## 附件十二

- 1、電泳分析 gel 所用之濃度為 3% ，在低分子量處分離效果較好！。
- 2、所用的 running buffer 為 1×TAE，亦可使用 1×TBE、0.5×TBE (為參考 Molecular-cloning)
- 3、使用加入 ethidium-bromide 之 gel ，其 sensitivity 好很多，competitive-PCR 則一定得用加入 ethidium-bromide 之 gel 。  
(ethidium-bromide 之 stock sol'n 濃度為 10 mg/mL，而 gel 之添加量為 5ul stock sol'n / 100 mL 之 gel sol'n。)
- 4、日野博士實驗室是使用 1×TAE buffer 所配製之 gel。
- 5、gel 最好新鮮配製，因為 ethidium-bromide 放久了會 degrade。
- 6、請注意，跑 gel 的地方最好與其他實驗室分開，若無法做到，最少必須有一固定之跑 gel 的地方，非到此處不可打開 PCR tube，以避免產物之污染。
- 7、具備專用之一套 loading gel 用之 micropipet 及 tip。
- 8、ethidium-bromide sol'n 之添加，最好低於 80°C，但由於 3%之 gel 及溶液變稠及硬化，所以一般都是加熱完就添加搖勻！
- 9、使用之齒梳為 25 孔，每片大 gel 約需 30mL 之 agarose 溶液。
- 10、sample loading 量為 5uL 加入 2uL 之 loading-buffer。Marker loading 量亦為 5uL。
- 11、使用之 marker 為 two-dye，bottom-dye 只需跑到 gel 的一半處即可，100V 約費時 20 min 左右。
- 12、sample loading 量為 5uL，加 loading-buffer 總共 7uL，必須一次取完，所以 pipet 必須押至第二段再吸取樣品，極費力！

## 附件十三

※以 ABI 7700 偵測 non-GM 玉米樣品時 96 孔反應盤配置圖：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>SSIIb</b>	<b>A</b>	<b>NTC</b> (Salmon sperm gene)			<b>20 copy</b>			<b>125 copy</b>			<b>1.5k copy</b>	
	<b>B</b>	<b>20k copy</b>			<b>250k copy</b>			<b>b1</b>			<b>c1</b>	
	<b>C</b>	<b>d1</b>			<b>e1</b>			<b>g1</b>			<b>h1</b>	
	<b>D</b>	<b>i1</b>			<b>E1</b>			<b>F1</b>			<b>G1</b>	
<b>CaMV-35S</b>	<b>E</b>	<b>NTC</b> (Salmon sperm gene)			<b>20 copy</b>			<b>125 copy</b>			<b>1.5k copy</b>	
	<b>F</b>	<b>20k copy</b>			<b>250k copy</b>			<b>b1</b>			<b>c1</b>	
	<b>G</b>	<b>d1</b>			<b>e1</b>			<b>g1</b>			<b>h1</b>	
	<b>H</b>	<b>i1</b>			<b>E1</b>			<b>F1</b>			<b>G1</b>	

※ABI 7700 分析條件：

<b>50°C 2min</b>	
<b>95°C 10 min</b>	
<b>95°C 30 sec</b>	}
<b>59°C 1 min</b>	
<b>40 cycles</b>	
<b>25°C 2 min</b>	

※ABI 7700 定量分析說明：

- 1、以上之實驗為偵測十件 QTI-non GM sample (**b1、c1、d1、e1、g1、h1、i1、E1、F1、G1**)。
- 2、偵測之兩種基因為 SSIIb internal-control gene 及 CaMV-35S gene。
- 3、每一種 sample 皆進行三重覆實驗。
- 4、溶液之配製分為 1、primer & probe mixture；2、TaqMan Universal PCR Master Mix。primer & probe mixture：F 及 R-primer 各 1.25 umol/L；probe：0.5 umol/L (檢測 35S 時 probe：0.25 umol/L)。當 primer & probe mixture 配至完成後再將 TaqMan Universal PCR Master Mix：primer & probe mixture=1.25：1 之比例混合，完成 Q-PCR 反應溶液之配製。
- 5、取足夠三重覆的量，將 Q-PCR 反應溶液分裝至 32 tube 中，以 Q-PCR 反應溶液：templet DNA=22.5：2.55 之比例混合均勻。
- 6、將各個反應液小心分裝到 96 well 之 PCR plate，NTC 特別小心以避免 contamination。
- 8、專用之 96 well 之 PCR plate 離心機，使轉速達 1000 rpm 後立即 stop!
- 9、ABI 7700 上機，約需 2:08 分鐘！

10、分析數據，決定 threshold line，check 結果是否污染！

※ Determine the threshold line of SSIIb runs ※

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	ΔA  (%)	ΔA  condition	Remark	Adopted Th.Line
0	1	0.001	0.006	0.113	17.821	0.00	#####			
1	2	0.002	0.263	-1.635	26.811	4.09	##			
2	4	0.004	0.984	-3.608	37.260	1.89	53.70			
3	8	0.008	0.998	-3.579	38.385	1.90	0.52			
4	16	0.016	0.999	-3.491	39.090	1.93	1.63			
5	32	0.032	0.999	-3.442	39.880	1.95	0.94	1		
6	64	0.064	0.999	-3.433	40.835	1.96	0.18	1		
7	128	0.128	0.996	-3.538	42.316	1.92	1.97			
8	256	0.256				#DIV/0!	#DIV/0!			
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!			
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			

結果：

- 1、SS II b standard curve 非常好，最低濃度 20 copy 的點亦很好。高濃度之前四點，三重覆幾乎重疊，只有 20 copy 三重覆間相差為 1 cycle 內。
- 2、即使操作如此小心，亦有一個 well contamination。
- 3、CaMV-35S standard curve 也非常好，20 copy 的點亦很好，高濃度之前四點，三重覆幾乎重疊，只有 20 copy 三重覆間相差為 1 cycle 內，與 SS II b standard curve 極類似。
- 4、NTC 非常漂亮，完全無 signal。
- 5、non-GM 之結果與 NTC 之結果相同，完全無 signal，10 個 sample 幾乎可確認為純品 non-GM 玉米。

## 附件十四

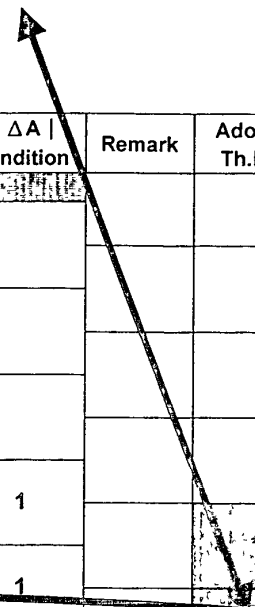
### ※ The rules of determination of threshold line position ※

- ① 先確定  $|\Delta A|$  condition 的值，必須最少有兩個連續  $|\Delta A|$  (%)在此值以下才可。(以下以 1 為例說明)。
- ② 如果只有兩個  $|\Delta A|$  (%)值小於 1，則取其中間之值  $2m=32$  之 Adopted Th.Line 為 threshold line。

m	$2^m$	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	$ \Delta A $ (%)	$ \Delta A $ condition	Remark	Adopted Th.Line
0	1	0.001	0.006	0.113	17.821	0.00	#####			
1	2	0.002	0.263	-1.635	26.811	4.09	##			
2	4	0.004	0.984	-3.608	37.260	1.89	53.70			
3	8	0.008	0.998	-3.579	38.385	1.90	1.12			
4	16	0.016	0.999	-3.491	39.090	1.93	1.63			
5	32	0.032	0.999	-3.442	39.880	1.95	0.94	1		
6	64	0.064	0.999	-3.433	40.835	1.96	0.48	1		
7	128	0.128	0.996	-3.538	42.316	1.92	1.97			
8	256	0.256				#DIV/0!	#DIV/0!			
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!			
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			

③ 如果有三個  $|\Delta A|$  (%) 值小於 1，則取 Adopted Th.Line 偏下方之值  $2m=32$  為 threshold line。

m	$2^m$	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	$ \Delta A $ (%)	$ \Delta A $ condition	Remark	Adopted Th.Line
0	1	0.001	0.006	0.113	17.821	0.00	#####			
1	2	0.002	0.263	-1.635	26.811	4.09	##			
2	4	0.004	0.984	-3.608	37.260	1.89	53.70			
3	8	0.008	0.998	-3.579	38.385	1.90	1.12			
4	16	0.016	0.999	-3.491	39.090	1.93	0.80	1		
5	32	0.032	0.999	-3.442	39.880	1.95	0.94	1		
6	64	0.064	0.999	-3.433	40.835	1.96	0.48	1		
7	128	0.128	0.996	-3.538	42.316	1.92	1.97			
8	256	0.256				#DIV/0!	#DIV/0!			
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!			
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			



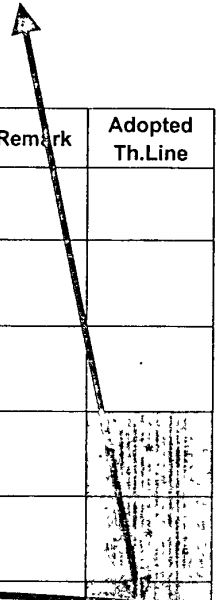


④ 如果有四個  $|\Delta A|$  (%) 值小於 1，則取 Adopted Th.Line 位於中央之值  $2m=32$  為 threshold line。

m	$2^m$	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	$ \Delta A $ (%)	$ \Delta A $ condition	Remark	Adopted Th.Line
0	1	0.001	0.006	0.113	17.821	0.00	#####			
1	2	0.002	0.263	-1.635	26.811	4.09	##			
2	4	0.004	0.984	-3.608	37.260	1.89	53.70			
3	8	0.008	0.998	-3.579	38.385	1.90	1.12			
4	16	0.016	0.999	-3.491	39.090	1.93	0.80	1		
5	32	0.032	0.999	-3.442	39.880	1.95	0.94	1		
6	64	0.064	0.999	-3.433	40.835	1.96	0.48	1		
7	128	0.128	0.996	-3.538	42.316	1.92	0.50	1		
8	256	0.256				#DIV/0!	#DIV/0!			
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!			
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			

⑤ 如果有五個  $|\Delta A|$  (%) 值小於 1，則取 Adopted Th.Line 位於中央偏下方之值  $2m=32$  為 threshold line。

m	$2^m$	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	$ \Delta A $ (%)	$ \Delta A $ condition	Remark	Adopted Th.Line
0	1	0.001	0.006	0.113	17.821	0.00	#####			
1	2	0.002	0.263	-1.635	26.811	4.09	##			
2	4	0.004	0.984	-3.608	37.260	1.89	53.70			
3	8	0.008	0.998	-3.579	38.385	1.90	0.52	1		
4	16	0.016	0.999	-3.491	39.090	1.93	0.80	1		
5	32	0.032	0.999	-3.442	39.880	1.95	0.94	1		
6	64	0.064	0.999	-3.433	40.835	1.96	0.48	1		
7	128	0.128	0.996	-3.538	42.316	1.92	0.50	1		
8	256	0.256				#DIV/0!	#DIV/0!			
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!			
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			



### ※ 註解：

- 1、 至於表格內每一條 standard curve 的參數值之求法為，ABI 7700 分析結束之後進行 standard curve 之 Analyze 一次，於 Amplification 之圖形視窗下方 cycle 的左半邊，先於 Mult.\*Stddev 空格處填入上表中 2m 中的值，按 Suggest 後，再按 Update Calculations，則圖形中之 threshold line 會跟著變，而相關參數亦同時改變了。
- 2、 接著叫出 Standard Curve，圖形視窗右半邊就有一些參數，如 Slope、Y-intercept、Correlation Coeff，將之記錄下來，輸入內建公式之 Excel 表格中，則其他參數如 Amp. Rate(A)、|  $\Delta A$  | condition 就會自動帶出來。
- 3、 依松岡猛博士之說法，threshold line 最常出現之值為 2m=32 及 64。
- 4、 表中之 |  $\Delta A$  | (%) 為方便解釋，我已稍做修改，並不一定正確，此值不用去深究，只要去觀察如何選擇 threshold line 的點即可。

附件十五

觀察市售產品標示情況（納豆）



本豆の原料大豆は  
遺伝子組み換え物  
ではありません。



観察市售産品標示情況（烹煮黃豆）



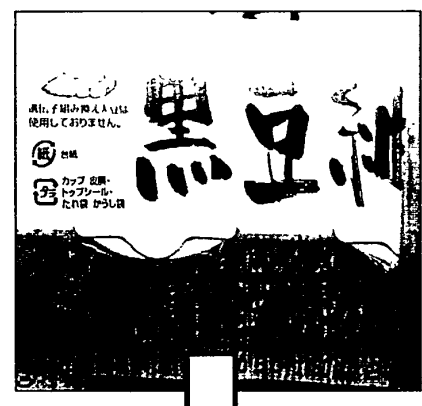
本品の大豆は遺伝子組換え  
大豆ではありません。



本品の大豆は  
遺伝子組換え大豆  
ではありません。



遺伝子組換え大豆は  
遺伝子組み換え大豆は  
使用しておりません。



遺伝子組み換え大豆は  
使用しておりません。

観察市售産品標示情況（玉米及黄豆）



玉米粒  
 遺伝子組み換え原料は  
 使用していません。



黄豆  
 yuba  
 遺伝子組換えでない  
 大豆を原料にしています。



黄豆芽  
 遺伝子組み換え大豆は  
 使用していません。



觀察市售產品標示情況  
 (黃豆及馬鈴薯之有機栽培標示)

## 附件十六

- 1、松岡猛博士提議本局需儘速決定執行 colaboratory study 的主要人選，必須選出一主要執行人，所有實驗須由此人獨立擔綱，以避免不同人員操作之人為誤差！
- 2、詢問有關 NK603、TC1507、MON863 之檢驗方法是否已經研發完成，松岡猛博士回答目前該實驗室正進行另一種 plasmid 之 construct，包括 NK603、TC1507、mon863 及 T25。由於現正忙於 colaboratory study 各種前置準備作業，沒空進行其他實驗，必須待完成 colaboratory study 後再繼續此部分之相關研究。而此新研發之 plasmid 最終目標仍是「商業化」。
- 3、關於 GM 小麥之檢驗方法開發問題，目前該實驗室幾乎已完成 GM 小麥 internal-control gene 之 primer 設計並已 clone 入 plasmid 中，同樣因為 colaboratory study 各種前置作業使得此部分研發工作停頓當中，必須等到 colaboratory study 結束後才有時間繼續進行相關實驗！而且目前該實驗室並未取得任何 GM 小麥之樣品！



## 附件十七

プレスリリース

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成14年7月31日

総合食料局

このことについて、独立行政法人農林水産消費技術センターが行った調査結果がまとまりましたので、別添のとおりお知らせします。

<問い合わせ先>

農林水産省総合食料局品質課

担当：金山、相原

TEL 03-3502-8111（内線 3399）

03-3502-2319（夜間直通）

（調査結果の詳細については・・・）

独立行政法人農林水産消費技術センター

本部技術指導部

担当：川村、大木

TEL 048-600-2370（直通）

(別添)

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成14年7月31日

(独)農林水産消費技術センター

平成13年度に、独立行政法人農林水産消費技術センター(以下「センター」という。)が遺伝子組換えの義務表示対象品目となっている305商品について買い上げ、調査を行った結果は次のとおりであった。

1. 調査方法

- (1) 遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの又は遺伝子組換えについての表示がないもの(注1)を合わせて305商品買い上げ、定性DNA分析(注2)を行った。
- (2) 組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出されたものについては、分別生産流通管理の実施確認(注3)を行うとともに、分析可能な商品については定量DNA分析を行った。

2. 調査結果の概要(別紙参照)

- (1) 305商品の定性DNA分析の結果は、以下のとおりであった。
  - ①組み換えられたDNAが検出されなかったもの 212商品(全商品の69%)
  - ②組み換えられたDNAが検出されたもの 80商品(全商品の26%)なお、残り13商品については、加工工程中の加熱等で遺伝子が分解しておりDNA分析ができなかった。
- (2) ①以外の商品について、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、1商品(コーングリッツ)(昨年8月に公表済み)以外は、適切に実施されており、表示が適正であることが確認された。

(別紙)

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果（平成13年度）

品目	調査商品数	組み換えられたDNAの検出の有無			最終結果		
		①不検出	②検出	③DNA分析不可能	適正な表示	不適正な表示	
					①+②及び③のうち、分別生産流通管理が適切に行われていたもの	②及び③のうち、分別生産流通管理が不適切であったもの	
生鮮							
大豆、枝豆、大豆もやし	11	9	2	0	11	0	
とうもろこし	3	3	0	0	3	0	
大豆加工品	豆腐	64	40	24	0	64	0
	油揚げ類	42	23	19	0	42	0
	凍豆腐	10	7	3	0	10	0
	おから	5	5	0	0	5	0
	ゆば	5	4	1	0	5	0
	納豆	19	15	0	4	19	0
	豆乳類	10	7	2	1	10	0
	みそ	20	15	3	2	20	0
	大豆煮豆	12	10	1	1	12	0
	大豆缶詰及び瓶詰	5	4	1	0	5	0
	きな粉	10	8	2	0	10	0
	大豆炒り豆	4	3	1	0	4	0
	大豆（調理用）を主な原材料とするもの	3	2	1	0	3	0
	大豆粉を主な原材料とするもの	4	2	2	0	4	0
	大豆たん白を主な原材料とするもの	7	2	5	0	7	0
	枝豆を主な原材料とするもの	4	4	0	0	4	0
	大豆もやしを主な原材料とするもの	5	5	0	0	5	0
その他	7	5	2	0	7	0	
とうもろこし加工品	コーンスナック菓子	23	16	4	3	23	0
	コーンスターチ	5	4	1	0	5	0
	ポップコーン	6	5	1	0	6	0
	冷凍とうもろこし	2	2	0	0	2	0
	とうもろこし缶詰及び瓶詰	3	3	0	0	3	0
	コーンフラワーを主な原材料とするもの	2	1	1	0	2	0
	コーングリッツを主な原材料とするもの	5	1	4	0	4	1 ※3)
	とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの	6	4	0	2	6	0
	その他	3	3	0	0	3	0
	合計	305	212	80	13	304	1
	※1		※2	※2			

※1) 昨年8月公表分（59商品）を含む。

※2) ②組み換えられたDNA（安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの）が検出された商品（80商品）及び③DNA分析ができなかったもの（13商品）については、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、※3に示した1商品以外の92商品については、分別生産流通管理が適切に実施されていたことから、表示が適正であることが確認された。

※3) コーングリッツを主な原材料とするとうもろこし加工品のうち1商品（コーングリッツ）については、定量分析の結果遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である5%を上回っていた（6%）ことから、センターから改善の指示を行った。（詳細については、13年8月10日に公表済み）

注1)「遺伝子組換えでない」との表示又は表示しないことができる場合

表示対象品目であって、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合は、表示不要又は「大豆（遺伝子組換えでない）」等の任意表示ができることとなっている。（遺伝子組換え食品に関する品質表示基準第3条第1項第3号）

また、分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性が避けられないことから、これらの管理が適切に行われている場合には、意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなすこととされている。（遺伝子組換えに関する品質表示基準第3条第3項）

ここでいう「一定の混入」とは、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が5%以下であること」と定められている。（遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について（平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知））

注2) DNA分析

DNA分析としては、PCR法を用いている。PCR法とは、農産物や食品中の特定の塩基配列のDNAのみを増幅し、検出する方法であり、農産物や食品中の微量のDNAであっても検出可能である。

なお、PCR法には遺伝子組換え農産物が含まれているかどうかを検出する定性PCR法と、遺伝子組換え農産物の混入率を算出する定量PCR法があるが、定量PCR法は農産物については適用可能であるが、加工食品の場合、加熱や発酵に伴うDNAの変性、分解等により精度の高い定量は不可能な場合があることに留意する必要がある。

（PCRとは、Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略。）

また、その分析方法については、平成13年4月にセンターが策定したJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」に基づき行った。

注3) 分別生産流通管理の実施確認

分別生産流通管理の実施確認は、「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について」（平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知）に示した「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トウモロコシの分別生産流通管理の指針（以下「指針」という。）」に基づき聞き取り又は書類による確認を行った。

(参考1)

### 遺伝子組換え食品の表示

遺伝子組換え農産物（大豆、とうもろこし等）及びその加工食品は、遺伝子組換え食品の品質表示基準に基づき、表示を行うこととされている。

(1) 従来のもとの組成、栄養価等が著しく異なるもの（高オレイン酸大豆）

→ 「大豆（高オレイン酸遺伝子組換え）」等の義務表示

(2) 従来のもとの組成、栄養価等が同等のもの

① 加工後に組み換えられたDNA又はこれによって生じたタンパク質が残存する加工食品（豆腐・油揚げ類、みそ、納豆、コーンスナック菓子等）

ア 分別生産流通管理が行われた遺伝子組換え農産物を原材料とする場合

→ 「大豆（遺伝子組換え）」等の義務表示

イ 遺伝子組換え農産物と非遺伝子組換え農産物が不分別の農産物を原材料とする場合

→ 「大豆（遺伝子組換え不分別）」等の義務表示

ウ 分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合

→ 表示不要又は「大豆（遺伝子組換えでない）」等の任意表示（注）

② 加工後に組み換えられたDNA及びこれによって生じたタンパク質が残存しない加工食品（醤油、コーンフレーク等）

→ 表示不要（任意表示）

(注) 分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性が避けられないことから、分別生産流通管理が適切に行われている場合には、5%以下の遺伝子組換え農産物の意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなすこととされている。(遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について(平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知食品流通局長通知))

## (参考2)

### プレスリリース

#### 遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成13年8月10日  
総合食料局

本年4月1日から、JAS法に基づき遺伝子組換え食品についての表示が義務付けられたことに伴い、本年4月中旬に約5,600商品について表示状況を調査した。(5月8日に調査結果を公表済み)

この調査の際、独立行政法人農林水産消費技術センター(以下「センター」という。)が、遺伝子組換えの義務表示対象品目である59商品を買上げ、DNA分析、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、その結果は次のとおりであった。

#### 1. 調査内容

##### (1) 調査期間

平成13年5～7月

##### (2) 調査方法

遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの(34商品)又は遺伝子組換えについての表示がないもの(25商品)を合わせて59商品を買上げ、定性DNA分析を行い、組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出されたものについては、分析可能な品目について定量DNA分析を行うとともに、分別生産流通管理の実施確認を行った。

#### 2. 調査結果

(1) 定性DNA分析の結果、11商品から組み換えられたDNAが検出された。

(2) このうち、精度の高い定量DNA分析技術が確立している5商品について、定量DNA分析を行った結果、1商品が遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である5%を上回っていた。

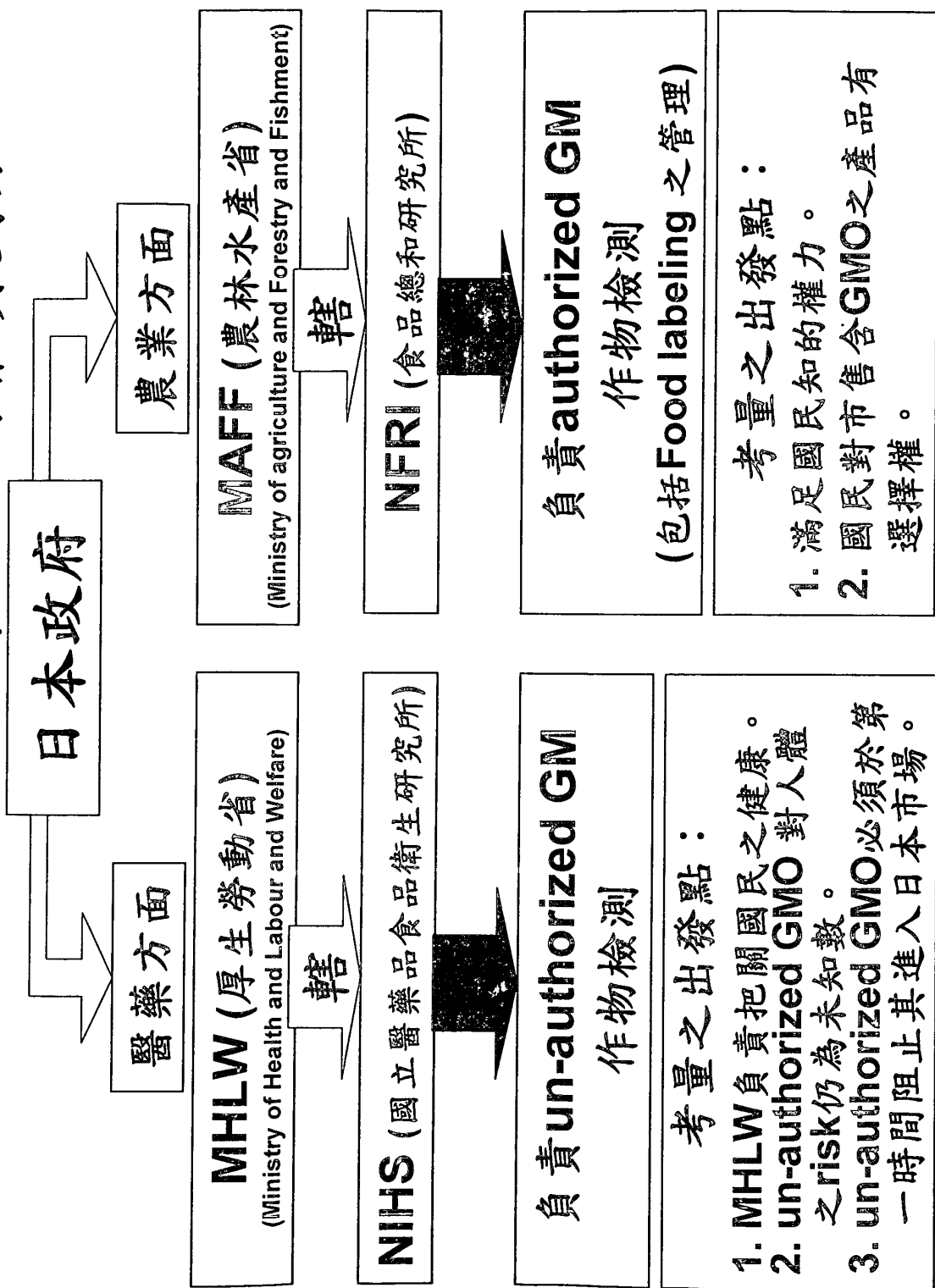
このため、この商品については、適切な分別生産流通管理が行われたとは認め

られず、表示が不適正であったので、センターから当該商品の表示の訂正を指導するとともに、製造業者等に対し、適切な分別生産流通管理の徹底を指導した。なお、製造業者等からは、当該商品と同じ製造年月日の商品を既に店頭から自主的に回収したとの報告を受けている。

- (3) 定量DNA分析を行った他の4商品については5%以下であり、また、残りの6商品については、精度の高い定量DNA分析技術が確立していないことから、これらの10商品について、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、指針に即して適切に実施されていたことから、表示内容又は表示されていないことが適正であることが確認された。

〔 なお、センターでは、平成13年度中に、これらを含め計約300商品を買上げ、その表示内容確認の調査を同様の方法で実施することとしている。 〕

# 日本政府基因改造食品政府權責劃分





## 附件十九

行政院衛生署藥物食品檢驗局 91 年 8 月第三次局務會議

【出國人員心得報告】

日期：8 月 19 日

報告人：林澤揚

服務單位：第五組

職稱：薦任技士

1. 出國主題：至日本食品總合研究所考察、研習基因改造食品之檢驗技術
2. 前往國家：日本
3. 出國期間：91 年 7 月 7 日至 91 年 8 月 3 日
4. 出國目的：了解日本基因改造食品檢驗研究之現況，學習相關檢驗方法，作為我國對基因改造食品檢驗研究之參考。
5. 活動內容：

研習期間共計四週，研習內容主要著重三部分（1）解決本實驗室開發 GMO 檢測方法時所遭遇之問題（2）觀摩如何避免定量分析時之人員及儀器之操作污染（3）參與日本舉辦之實驗室聯合評估(Collaboratory -study)。
6. 心得：
  - （1）本實驗室以 ABI 7700 進行 GMO 定量分析時，於低濃度時常遭遇重複性不佳之問題。經請教日方研究人員發現問題癥結在於模版 DNA 與反應試劑未能充分混合均勻，所有定量分析之溶液皆須進行兩次以上之混合，始可上機分析。
  - （2）為避免定量實驗操作時的污染問題，操作檯面需以 70%酒精仔細擦拭，覆蓋以保鮮膜使可進行實驗操作，不同品系間操作時操作檯必須重新擦拭並更換保鮮膜。抽取樣品 DNA、配製定量分析反應溶液及電泳分析之操作檯必須隔離使用。
  - （3）目前主管日本 GMO 檢測方法開發之單位分別為隸屬於「厚生勞動省」之「NIHS-國立醫藥品食品衛生研究所」及隸屬於「農林水產省」之「NRFI-食品總合研究所」。NIHS 主要負責未經核准 (un-authorized) GM 作物之檢驗方法開發，

而 NFRI 則負責已核准 (authorized) GM 作物之檢驗方法開發，此二單位所開發完成之方法則交由「農林水產消費技術中心」針對市售產品進行調查監控，三者間分工合作，各司其職。

- (4) 依據日本政府之規定，含 GMO 成分必須進行標示的加工產品種類共計 30 項，其中包括黃豆製品 15 類、玉米製品 9 類及馬鈴薯製品 6 類。實際至超級市場觀察後發現，標示產品之大宗為黃豆加工品，主要皆採負面標示法——『不含基因改造原料成分』之字樣。
- (5) 日方針對已開發之 plasmid 標準品修訂部分引子對種類，並舉辦此次「實驗室聯合評估」以確定修訂後引子對之偵測效果。本局亦參與此次之實驗室聯合評估，評估項目共區分為三大項：(1) 機器精度試驗—預估時間 1 週。(2) 內標比 (internal-standard ratio) 試驗—預估時間 2 週(3) 盲點(blind) 試驗—預估時間 2 週，目前正執行第一階段機器精度試驗。預估所有試驗完成時間為九月底。

#### 7. 建議：

- (1) 日本政府 GMO 檢驗方法之開發，是結合來自政府及民間企業兩者的力量合力進行，以 NFRI 為例，其中一半以上之研究人力為企業派駐之研究人員。由於 GMO 檢驗方法之開發需人力、資訊、經費等多方面之條件配合，唯有結合企業眾多之人才、財力支援政府有限之資源，則可提升檢驗方法開發之速度。
- (2) 日本政府對 GMO 的管理模式採負責政策研擬、技術研發與市場監測之政府單位各有區隔，權責區分，各司其職，相互支援。在分工的模式下，以各單位被賦予之權力在各自領域中發揮專才，結合成一完整之管理鎖鍊，始可有效達成全方位之管理。

## Part III

赴日本農林水產省獨立行政法人食品總合研究所  
(NFRI)考察研習基因改造食品之檢驗

服務機關：衛生署藥物食品檢驗局

姓名：林旭陽

職稱：薦任技士

出國地點：日本

出國期間：九十一年七月二十八日至八月二十四日

# 赴日本農林水產省獨立行政法人食品總合研究所 (NFRI)考察研習基因改造食品之檢驗

## 摘 要

研習期間共計四週，研習內容主為三部分（1）學習日本基因改造食品檢驗技術與方法（2）定量分析及儀器之操作與污染之防止（3）參與日本舉辦之實驗室聯合評估(Collaboratory study)。日本基因改造食品檢驗技術與方法之開發由農林水產省與厚生勞動省共同主導，參與單位包括獨立行政法人食品總合研究所（NFRI）、厚生勞動省國立醫葯品食品衛生研究所（NIHS）、獨立行政法人農林水產消費技術中心、27 個私立實驗室與公司，同時韓國衛生部（KFDA）、國立農業生技研究所（Korean National Institute of Agricultural Biotechnology）、國立農業產品品質管理服務所（Korean National Agricultural Products Quality Management Service）等三十多個單位參與共同研究開發基因改造食品檢驗方法。

目前日本已經開發完成的基因改造食品檢驗技術與方法針對一種大豆與五種玉米，其標準參考物質則分別將大豆與玉米之部分基因轉殖於二個不同質體上，所使用之同步定量 PCR 系統為 ABI PRISM 7700，食品總合研究所亦積極改良其檢測方法，以期能符合新機型之分析與應用；發色系統採用 Taqman 系統，使用不同之引子與探針，再針對不同目標基因之 PCR 反應結果個別計算標準曲線與基因數，再以插入基因數與參考基因數比和反應係數乘積計算其中之含量；而尚有三種玉米、二種馬鈴薯與一種大豆之檢驗方法正積極開發研究中。

參與實驗室共同試驗之材料與試劑試藥等之製備，進而瞭解此次實驗

室共同試驗之主要目的在於：1.定性檢測下限之驗證、2.評估以 ABI PRISM 7700 檢測 GMOs 定量分析之信賴性、3.定量分析法於不同儀器間差異之評估。參與單位共有 42 個單位參加，其中有韓國 7 個實驗室與本局等 8 個海外實驗室。根據目前時間表，七月二十九日資料寄送，七月底至八月中消耗品準備，八月中開始進行機器精度測試（一週），內標比測試（二週），盲樣測試（二週），試驗結果集計與解析（二週），預計於十月底可以完成實驗室共同試驗研究。日本政府大力推動基因改造食品管理機制，從法規至執行，行政區域、工作執掌與權責均已經建立合作無間之系統機制，分別從各方面著手於基因改造食品管理，筆者建議在明年基因改造食品標示制度即將上路之前，國內衛生、農政、學術與業界之力量，分工與合作亟有待整合。檢驗為最後之手段，亦為解決爭議根本之道，筆者認為本局應持續建立基因改造食品檢驗方法，進行實驗室間方法試驗與比對，實驗室間能力分析等。大眾教育與溝通亦是不可忽視之一環，目前台灣民眾對基因改造食品之接受程度尚不明確，因此對於大眾教育與溝通亦應及早著手。

目次：壹、目的.....	54
貳、過程.....	54
參、感想與建議.....	91
肆、附件.....	95

## 壹、目的

因應全球經濟之共通化，我國於明年（2003）即將實施之基因改造食品標示制度即將上路，歐洲與日本已經實施基因改造食品之標示制度，而日本已於去年（2001）實施基因改造食品標示制度，雖然國情與管理制度有所不同但與我國之制度較接近，但是科學的檢驗方法則無國界之分，此次赴日考察基因改造食品之檢驗研究，特別是著重於基因改造大豆與玉米之定量檢驗技術，與使用標準參考物質與分子參考物質之檢測方法，希能以作為國發展檢驗方法之重要參考並多所助益。

## 貳、過程

### 七月二十八日（日）：

今日晨間從台北出發，搭乘長榮航空九點班機，揮別亮麗的台北天空，飛向日本成田機場展開考察基因改造食品檢測方法研究的旅程，班機約於於十三時三十分降落，成田機場相當大設施相當新但是旅客很多，至出關時已經是下午二時，來自築波食品總和研究所的日野明寬博士已經於海關門口等待，是在對面棟之停車場，重新下樓穿過入境大樓至對面停車樓，上車坐定日野博士隨即設定其車上之衛星導航系統，縱然如此經過成田市區附近的高速公路仍然塞車，一旦遠離市區，所見路旁景物，沿途經過盡是稻田、鄉間景致與台灣相去不遠，有些路在導航器上未顯示呢，下午盡是陰天，日野博士說這是好幾個月來的涼快，先至築波農林園地中央之築波國際學舍(Tsukuba International House, TIH)，已經下午三時三十分了，放好行李後，先至日野博士實驗室參觀一下，他目前主持二項大計劃在執行中，Flavor sensor 和 GMO，所見假日尚有不少人仍然在進行實驗，大致參觀

他二個實驗室，根據計算，目前將近有三十個人在其實驗工作，實驗室儀器有 Roche LightCycler 2 部，ABI 7700 and 7000，BioRad icycler 1 部，目前工作量很大，因此又向 abi 借一部 7700，時已下午將近五時，雖然是週日日野博士也介紹仍在其實驗室工作的主任研究官大倉哲也博士、進藤洋一郎博士（Asahi 株式會社研究員）、來自韓國農部國立農產品質管理中心之鍾宋義(Soon-II, Jeong)博士與衛生部食品分析組李文揚博士等人與筆者認識，復返回築波國際學舍日野博士就找到先來三週亦同於藥檢局服務之林澤揚先生，一起至附近認識環境，約略知悉大致位置與市中心方向，晚餐後日野博士立即趕至最近之 ASSE 超市已經 7:55，衝入賣場門口，已經放晚安曲要打烊了，幸好林澤揚先生今日來過很快就找到了礦泉水麵包牛奶等日常品，日野博士送我們回築波國際學舍將行李稍做整理，並與林澤揚先生一談，大致瞭解此地之工作管理及生活作息情形。(農林園地中央、食品總合研究所等農林水產省研究單位如附件(一))

### 七月二十九日(一):

第一天正式至實驗室，先至辦公室報到並且將手提電腦交給工作人員設定網路資訊、拍攝識別證用照片等，日野博士並請松剛猛博士為筆者說明與安排此段時間內之實驗工作，因為上午味覺感測 group 有一個工作報告，下午 GMO-group 要進行「GMO 共同試驗研究說明會議」所以全部的人都忙碌異常，部分準備會議工作人員，部分人員依然進行實驗，還好林澤揚先生帶我一位位找空檔介紹，實驗室成員大都見面，太多人了一時也記不起來，同時一一認識實驗室裡的儀器、操作，各種試藥試劑，材料置放處，實驗室基本規則等等，中午至農林園地中央之附屬餐廳，澤揚兄介紹一些該中心與餐廳之規矩與程序，使筆者能夠迅速瞭解該中心與實驗室之運作概況，實在感謝林澤揚先生之詳細介紹，中午返回實驗室，從東京國立醫藥品食品安全研究所之龜山浩博士與本局吳宗熹先生等人已趕來，吳宗熹



先生等九點出門碰上塞車至午後方行抵達，還有來自各地實驗室人員，會議於下午一時三十分舉行，由日野明寬博士主持，首先由栗原秀夫先生（獨立行政法人，農林水產消費技術中心本部，消費者情報部，技術研究課；研究第二係長），龜山浩博士（國立醫藥品食品安全研究所），松岡猛博士（食品總合研究所），重松万由小姐（日清製粉集團本社株式會社）分別就實驗室共同試驗研究專案之「定性」與「定量」時間表，應「預先準備事項與材料」，「內標比試驗之胚芽測定」逐一說明，因為以日語說明，筆者於此要感謝座位旁之重松万由小姐也逐一說明方得以明瞭，會議重要與本局有關者，1.根據目前時間表，七月二十九日計畫案資料送達給各參與單位，七月底至八月中消耗品準備，八月中機器精度測試（需時一週），內標比測試（需時二週），盲樣測試（需時二週），試驗結果集計與解析（需時二週）。2.筆者整理出所需試藥與耗材如下表，

<b>MicroAmp Optical 96-well Reaction plate</b>	<b>ABI #N801-0560</b>	<b>3 Box(1 Box=10 pcs)</b>
<b>ABI PRISM Optical Cap, 8 Caps/Strip (Flat)</b>	<b>ABI #4323032</b>	<b>2 Box(1 box= 12*25)</b>
<b>TaqMan Universal PCR Master Mix</b>	<b>ABI #4304437</b>	<b>10 box(1 box for about 3 plate)</b>

鑑於時間緊迫並且林澤揚先生、吳宗熹先生及筆者三人目前均滯留於日本，並且立即以電子郵件聯絡在台灣之闕麗卿博士，請其代為立即確認並聯繫台灣的試藥試劑供應商，事先備妥本實驗室要參與此次實驗室共同試驗所需之材料。

### **七月三十日 (二):**

今日主要是瞭解並學習與實際操作如何在 ABI 7700 同步定量儀器上，進行分析 threshold line decision calculation，筆者先以林澤揚先生上次實驗之數據進行分析之瞭解與實際分析，1.個別基因反應個別計算 (data not in use for

some selected), 2. 先進入“show data”的對話窗中, 先跑一下“analysis”的功能將數據做一個初步計算後, 再進行“analysis plot”工作, 接著一個一個鍵入“multi stddev”欄位中, 分別進入“suggest”功能並使用“use Threshold”之設定後, 接著進行“update calculation”功能分析, 然後打開“standard curve”功能檢視每一條標準曲線, 並且一一紀錄“Corr, Slope and y-intercept”之數值, 接著將這些數值轉移一一鍵入 excel 檔案中“threshold decision”的每一項空白欄位裡, 3. 將數據選定於 2 (一般以 2.1 至 1.9 之間的區域開始進行), 並且以系列的連續值找出所選定之數值, 將以標示清楚後, 在於  $| \cdot A | (%)$  和  $| \Delta A |$  condition, 找出低於 1 (%) 的一系列數據 (如 2、3、4、5 但是最好不要超過 5 否則有時會使結果數值變得很糟), 然後給予  $| \Delta A |$  之條件設定於 1, (根據  $| \cdot A | (%)$  的數值內容而決定), 如果是積數組的數值系列則選擇最中間的數值, 如果是偶數組的系列數值則必須選擇剛好大於中間值的上一個數值, 4. 然後便可以決定 insert gene 與 endogenous gene 個別之 threshold line 的數值, 5. 再回至進入 ABI 的操作軟體, 將之前計算決定所得之 threshold 數值重新設定於“analysis plot”位置中, 繼續跑一下“standard curve”以產生新的並且是正確所需之標準回歸曲線, 然後打開進入“report”功能位置, 便可以得到計算過之三重覆報告數值, 然後基因改造成分之數值 (GM value) 經除以内原生性 (Endogenous gene value) 再乘上相關係數 (coefficient value) 的乘積值即為答案。(如附件二)

附表為 threshold line 決定用之表格如下:

様式「Th. Line決定表」

センター名		備考								
実験者氏名										
定 量 日										
プレートNo.										
Target名										
m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	増幅率(A)	ΔA  (%)	ΔA 条件	備考	採用値
0	1									
1	2									
2	4									
3	8									
4	16									
5	32									
6	64									
7	128									
8	256									
9	512									
10	1024									
11	2048									
12	4096									

附表為混入率計算用表格如下：

様式「混入率計算表」

センター名		備考												
実験者氏名														
定 量 日														
プレートNo.														
Target名														
試料番号	試料名	Target	サイズ				トウモロコシ スターリング				トウモロコシ 稲穂比置			
			RLS Specific	CA1V1.55 processor (M7200)	GA21 Specific	B11 Specific	T25 Specific	F175 Specific	M810 Specific					
		コヒー散乱による混入率	内位相値	外位相値	内位相値	外位相値	内位相値	外位相値	内位相値	外位相値	内位相値	外位相値		
1		コヒー散												
		混入率												
2		コヒー散												
		混入率												
3		コヒー散												
		混入率												
4		コヒー散												
		混入率												
5		コヒー散												
		混入率												
6		コヒー散												
		混入率												
7		コヒー散												
		混入率												
8		コヒー散												
		混入率												
9		コヒー散												
		混入率												
10		コヒー散												
		混入率												
11		コヒー散												
		混入率												
12		コヒー散												
		混入率												
Target			RLS Specific	CA1V1.55 processor (M7200)	GA21 Specific	B11 Specific	T25 Specific	F175 Specific	M810 Specific					
内相値			0.04	0.30	1.40	0.50	0.34	2.05	0.38					

七月三十一日 (三):

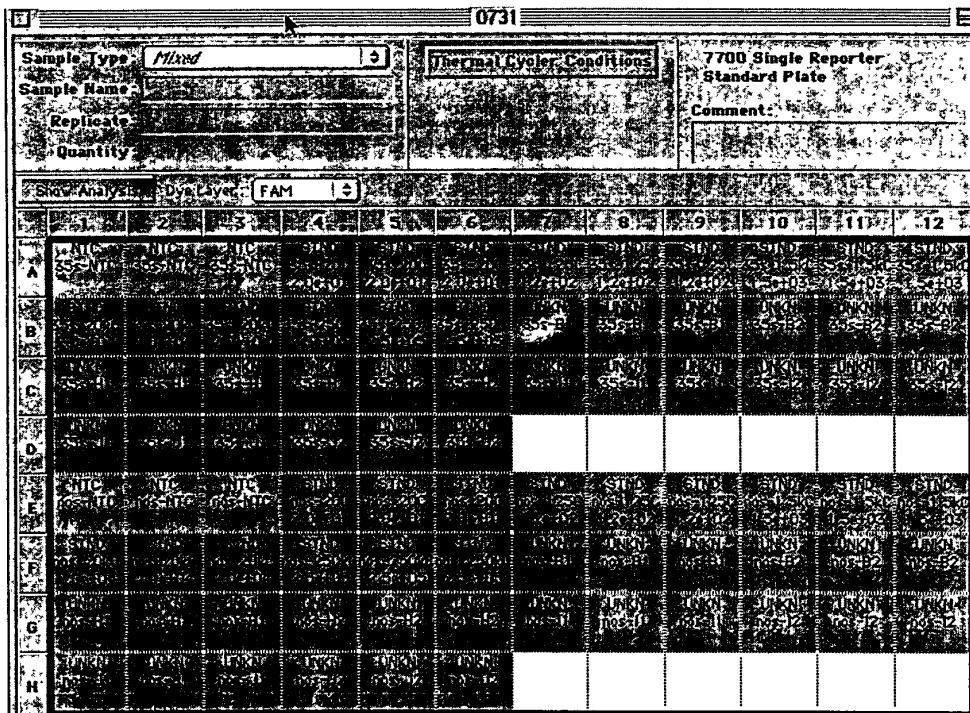
今天和松岡猛博士、林澤揚先生前往埼玉縣之(獨立行政法人, 農林水產消費技術中心本部), 因為準備進行實驗室共同研究試驗, 進行定量 PCR 的工作人員把主要的 2 部 7700, 1 部 7000, 2 部 lightcycler 都排滿了工作, 松岡猛博士在農林水產消費技術中心本部之實驗室還有一部 7700 經聯絡後可以借用, 今天主要是使用 CaMV-35S and NOS 不同之引子對, 進行同步定量 PCR 來確認所製備材料之純度與情況, 與松岡猛博士從築波約九時許出發, 松岡猛博士一路開車疾行, 可是還是碰上高速公路上幾處塞車, 趕到埼玉縣之獨立行政法人農林水產消費技術中心本部時, 已經接近中午, 三人直接至消費者情報部技術研究課將帶來之樣品先存放妥後, 首先拜訪該課課長條照雄先生, 並謝謝其同意我兩今日來借用他們的定量儀器與實驗室, 條照雄課長除表示歡迎外並介紹當時在其辦公室之兒玉貴志先生(研究第三係)、法邑雄司先生(研究第二係)等人, 條課長並關心我們台灣消費者對基因改造食品的關注與反應, 復引見我兩拜會理事長大西詳三先生, 大西理事長亦很關注台灣基因改造食品之管理情況, 對於此類食品上市之程序、管理法規與民意動向等諸多問題, 筆者等也一一將台灣的近況與工作進展詳細說明, 並感謝條課長與松岡猛博士為筆者等翻譯, 後並一一拜會消費者情報部長寒木邦彥先生, 消費者情報部技術研究課鈴木忠直先生, 企畫調整部部長湯川剛一郎先生, 技術指導部國際業務課國際業務第三係長藤田敏文先生等人後, 進行實驗用試藥試劑之配製, 今日主要利用另一組核酸引子來進行確認與比對, 原先在築波食品總合研究所時其他人員進行係使用 SSIIB 之核酸引子對, 我們改採用不同之策略, 主要針對基因啟動子區域與終止子區域分別來進行偵測與分析, 所以選用 CaMV 35S 啟動子核酸引子對與 NOS 終止子核酸引子對, 除了每一樣品與標準品都進行三重覆外並且同時跑控制對照組, 使用之檢測方法為日野博士實驗室所

研發，並已經由日本政府公布之檢驗方法（如附件三）。

#### 八月一日（四）：

將昨日農林水產消費技術中心進行定量實驗之 Data 進行分析計算，所使用方法如前所述，首先決定 threshold line 之後，分別計算出 GMO 殖入基因數與對照之原生基因數，相除後所得之比值，為基因改造物質在檢體中之含量百分比，演算過程與結果詳如附件四。

下圖為本次實驗之檢測樣品配製圖，淺紫色區為空白對照組，粉色區為標準參考物質，藍色區為樣品區。



今天大家除了繼續各自之實驗工作外，由於昨日筆者前往進行實驗之獨立行政法人農林水產消費技術中心執行之一項調查工作，經由農林水產省發佈結果（如附件五），筆者告訴實驗室其他伙伴後，也引起大家之注意與熱烈討論，另外筆者也找出為今年(2002,平成 14 年)六月份由厚生勞動省所發佈之基因改造食品大豆與玉米等及其加工食品檢測調查結果（如下文）與

去年(2001,平成 13 年)農林水産省所公布之基因改造食品調査結果(如下文),與農林水産省所發佈之資料相互呼應,此項資料應可作為日後我國衛生與農政執行基因改造食品之調查研究計畫擬定與執行之參考。

平成14年6月21日

大豆、とうもろこしを用いた加工食品中に含まれる遺伝子組換え食品の検出調査の結果について

平成13年4月より、遺伝子組換え食品の表示制度が開始されていますが、厚生労働省では、平成13年12月から平成14年3月にかけて、国立医薬品食品衛生研究所において、加工食品中に含まれる遺伝子組換え食品の検出調査を行い、その結果が報告されましたので、お知らせいたします。

遺伝子組換え食品の表示が義務づけられている大豆、とうもろこしを用いた加工食品73商品を無作為にサンプリングし、加工食品中に含まれる遺伝子組換え食品の検出調査を行った結果、大豆加工食品では47商品中13商品(27.7%)、とうもろこし加工食品では26商品中10商品(38.5%)から遺伝子組換え食品が検出されました。なお、遺伝子組換え食品が検出された23商品はいずれも遺伝子組換え食品の混入率は5%未満であり、表示違反はありませんでした。

注1) 現行の制度では、遺伝子組換え食品の混入率が5%未満のものについては、遺伝子組換え食品に係る表示の義務は課されていません。

<検査結果>

	商品数	0% (注1)	5%未満 (注2)	5%以上	測定不能 (注3)
大豆	47商品	31商品 66.0%	13商品 27.7%	0商品 0%	3商品 6.3%
とうもろこし とうとうもろこしもろし	26商品	10商品 38.5%	10商品 38.5%	0商品 0%	6商品 23.0%

注1)	「0%」とは、遺伝子組換え食品が混入していないものである。
注2)	「5%未満」は、遺伝子組換え食品が混入していたが、定量検査においては、5%を越えなかったものである。
注3)	「測定不能」は、遺伝子そのものが抽出されなかったために、測定出来なかったものである。

大豆、とうもろこしを用いた加工食品中に含まれる遺伝子組換え食品の検出調査の結果について

平成13年4月より、遺伝子組換え食品の表示制度が開始されている。

厚生労働省では、国民の遺伝子組換え食品の安全性に関する関心の高まりに対応して、加工食品中に含まれる遺伝子組換え農作物を確認する必要があることから、平成13年12月より厚生労働省の委託事業として国立医薬品食品衛生研究所において、加工食品中の安全性審査済みの遺伝子組換え農作物由来のDNAの有無、加工食品中の組換えDNAの定性的検知、遺伝子組換え農作物の混入率（参考値）及び製造・加工工程の違いによる農作物由来の内在性遺伝子（注1）の検知効率の差について調査を行ってきたが、今般、この結果がとりまとめられた。

（注1）内在性遺伝子とは、新たに組み込まれた遺伝子ではなく、個々の農作物に含まれる種特異的な遺伝子のことである。

#### 1・調査対象

食品衛生法及びJAS法において遺伝子組換えに関する表示が義務付けられている大豆及びとうもろこしを主な原材料とする加工食品24食品群から、無作為に商品を抽出し、調査対象とした。

内訳は、大豆加工食品15品目・47商品及びとうもろこし加工食品9品目・26商品の合計73商品である（表1）。

#### 2・調査結果

(1)加工食品中の組換えDNAの定性的検知と遺伝子組換え農作物の混入率（参考値）

遺伝子組換え農作物由来のDNAが定性的に検知された割合は、大豆加工食品では47商品中13商品（27.7%）、とうもろこし加工食品では26商品中10商品（38.5%）であった。

また、定量PCR法を用いた遺伝子組換え農作物の定量分析技術は、製品の原料としての穀物又はその粉碎物に対してのみ確立されていることから、本調査においては、

参考として、これら加工食品（73 商品）における組換え農作物混入率の算出を行った結果、それぞれに使用された遺伝子組換え大豆及び遺伝子組換えとうもろこしの混入率は、全て 5%未満と推定された。（表 1）

（注 2）現在の表示制度では、意図せざる混入による遺伝子組換え農作物の混入率が 5%未満のものについては、「遺伝子組換え」の表示は不要とされている。

### (2)製造・加工工程の違いによる農作物由来の内在性遺伝子（注 1）の検知の差

調査した全 73 商品のうち、DNA が抽出精製できなかった商品が大豆加工食品で 1 商品（茶碗蒸し）、とうもろこし加工食品で 4 商品（スナック菓子 1、コーンスターチ 2、シリアル 2、シリアル 4）見られ、同一品目を原材料に含む加工食品においても、商品ごとの DNA 抽出の効率に差が出ることを示された。また、DNA の抽出精製は可能でも、内在性遺伝子が定性的に検知されない商品が大豆加工食品 2 検体（大豆水煮 3、大豆炒り豆 2）、とうもろこし加工食品 2 検体（シリアル 1、菓子 5）の合計 4 検体あった。これらについて、DNA 抽出法等を改良し定量分析を行ったが、内在性遺伝子は検出できなかった。

また、DNA の抽出が不可能であったもの及び内在性遺伝子の定性的検知が不可能であったものは、共に組換えられた DNA の測定は不可能であった。

食品ごとに DNA 抽出や内在性遺伝子の検出に差が生じる要因の一つとして、加熱ならびに加圧といった製造・加工工程の違いが考えられた。

### (3)表示との関係

遺伝子組換え農作物由来の DNA が検知された製品（大豆 13 商品、とうもろこし 10 商品）の表示を確認したところ、遺伝子組換え大豆及びとうもろこし「不使用」とされていたものは、それぞれ 10 商品及び 8 商品であった。しかし、今回の定量分析の結果から推定された混入率は、2 . の製造・加工工程の違いによる農作物由来の内在性遺伝子の検知効率の差を考慮しても、遺伝子組換え農作物の意図せざる混入の目安である 5%を上回らないと考えられた。

なお、今後、定量分析による加工食品中の混入率測定をどの程度まで適用できるか明らかにするとともに、検知法の改良を加えていく予定としている。

（参考） 表 1 加工食品中の組換え DNA の定性分析と遺伝子組換え農作物の混入率（参考値）



商品分類	加工食品	対象農作物	製品	組換えられたDNA検出の有無	DNA定量分析 GMO含有率(%) (参考値)	表示内容
1	豆腐・油揚げ類	大豆	きぬごしとうふ	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			もめんとうふ	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			油揚げ1	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			油揚げ2	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
2	凍豆腐・おから及びゆば	大豆	おから	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			ゆば	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			凍り豆腐	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
3 4	納豆 豆乳類	大豆 大豆	納豆1	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			調整豆乳1	無	0	表示なし
			豆乳	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			調整豆乳2	無	0	表示なし
5	みそ	大豆	みそ1	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			みそ2	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り

			みそ3	無	0	表示なし
6	大豆水煮 (水煮大豆)	大豆	大豆水煮1	無	0	表示なし
			大豆水煮2	無	0	表示なし
			大豆水煮3	測定不能※	測定不能※	表示なし
	(味付け大豆)		味付け大豆1	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			味付け大豆2	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			味付け大豆3	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
7	大豆缶詰及び大豆瓶詰	大豆	大豆缶詰1	無	0	表示なし
			大豆缶詰2	無	0	表示なし
			大豆缶詰3	無	0	表示なし
8	きな粉	大豆	きな粉1	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			きな粉2	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			きな粉3	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
9	大豆いり豆	大豆	大豆炒り豆1	無	0	表示なし
			大豆炒り豆2	測定不能※	測定不能※	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
10	第1号から第9号までに掲げるものを主な原材料とするもの (魚肉ソーセージ)	大豆	即せきみそ汁	無	0	表示なし
			魚肉ソーセージ	有	5%未満	表示なし
			練り製品	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り

	(脂肪大豆)		茶わんむし	測定不能	測定不能	表示なし
11	大豆(調理用)を主な原材料とするもの	大豆	加工雑穀1	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			加工雑穀2	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			加工雑穀3	無	0	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
12	大豆粉を主な原材料とするもの	大豆	スプレット	有	5%未満	表示なし
			菓子1	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
			菓子2	有	5%未満	遺伝子組換え大豆不使用と表示有り
13	大豆たん白を主な原材料とするもの	大豆	冷凍ラーメン	無	0	表示なし
			菓子・栄養調整食品	有	5%未満	表示なし
			和生菓子	無	0	表示なし
14	枝豆を主な原材料とするもの	枝豆	乾燥スープ	無	0	表示なし
			きな粉4	無	0	表示なし
			冷凍枝豆	無	0	表示なし
15	大豆もやしを主な原材料とするもの	大豆もやし	大豆もやししょうゆ漬け1	無	0	表示なし
			大豆もやししょうゆ漬け2	無	0	表示なし
			大豆もやししょうゆ漬け3	無	0	表示なし
16	コーンスナック菓子	とうもろこし	スナック菓子1	測定不能	測定不能	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り

			スナック菓子2	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			スナック菓子3	無	0	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			スナック菓子4	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			スナック菓子5	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
17	コーンスターチ	とうもろこし	コーンスターチ1	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			コーンスターチ2	測定不能	測定不能	表示なし
			コーンスターチ3	無	0	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
18	ポップコーン	とうもろこし	ポップコーン	無	0	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
19	冷凍とうもろこし	とうもろこし	冷凍とうもろこし1	無	0	表示なし
			冷凍とうもろこし2	無	0	表示なし
			冷凍とうもろこし3	無	0	表示なし
20	とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰	とうもろこし	とうもろこし缶詰1	無	0	表示なし
			とうもろこし缶詰2	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			とうもろこし缶詰3	無	0	表示なし
21	コーンフラワーを主な原材料とするもの	とうもろこし	シリアル1	測定不能※	測定不能※	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り

			菓子3	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			菓子4	無	0	表示なし
22	コーングリッツを主な原材料とするもの	とうもろこし	シリアル2	測定不能	測定不能	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			シリアル3	無	0	表示なし
			シリアル4	測定不能	測定不能	表示なし
23	とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの	とうもろこし	タコス	有	5%未満	表示なし
			スナック菓子6	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
24	第16号から第20号までに掲げるものを主な原材料とするもの	とうもろこし	生ポタージュスープ	有	5%未満	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			菓子5	測定不能※	測定不能※	遺伝子組換えとうもろこし不使用と表示有り
			乾燥スープ(ポタージュ)	有	5%未満	表示なし

注1)	加工食品中の組換えられたDNAを定量する公定法は、確立されておらず、DNA定量分析結果の数値は参考値である。
注2)	DNA定量分析の結果、5%未満と分析されたものについては、「遺伝子組換え」の表示は不要とされている。
注3)	測定不能は、DNAの精製抽出及び内在性遺伝子の検出が不可能であったもの。
注4)	測定不能※は、DNAの精製抽出は可能であったが、内在性遺伝子の検出が不可能であったもの。

下文為農林水産省總合食料局於去年(2001)發佈之基因改造食品調查結

果，該項報告與此回報告均是由農林水產消費技術中心所負責執行抽購與檢測，由於日本於去年四月開始實施基因改造食品強制標示，所以官方會對市售食品之基因改造成分標示狀況進行調查，以落實基因改造食品標示法之實施。

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成13年8月10日

総合食料局

本年4月1日から、JAS法に基づき遺伝子組換え食品についての表示が義務付けられたことに伴い、本年4月中旬に約5,600商品について表示状況を調査した。(5月8日に調査結果を公表済み)

この調査の際、独立行政法人農林水産消費技術センター(以下「センター」という。)が、遺伝子組換えの義務表示対象品目である59商品を買上げ、DNA分析、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、その結果は次のとおりであった。(別紙1参照)

## 1. 調査内容

### (1) 調査期間

平成13年5～7月

### (2) 調査方法

遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの(34商品)又は遺伝子組換えについての表示がないもの(25商品)<sup>注1)</sup>を合わせて59商品を買上げ、定性DNA分析<sup>注2)</sup>を行い、組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出されたものについては、分析可能な品目について定量DNA分析を行うとともに、分別生産流通管理の実施確認<sup>注3)</sup>を行った。

## 2. 調査結果

- (1) 定性DNA分析の結果、11商品から組み換えられたDNAが検出された。
- (2) このうち、精度の高い定量DNA分析技術が確立している5商品について、定量DNA分析を行った結果、1商品が遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である5%を上回っていた。

このため、この商品については、適切な分別生産流通管理が行われたとは認められず、表示が不適正であったので、センターから当該商品の表示の訂正を指導するとともに、製造業者等に対し、適切な分別生産流通管理の徹底を指導した。なお、製造業者等からは、当該商品と同じ製造年月日の商品を既に店頭から自主的に回収したとの報告を受けている。

- (3) 定量DNA分析を行った他の4商品については5%以下であり、また、残りの6商品については、精度の高い定量DNA分析技術が確立していないことから、これらの10商品について、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、指針に即して適切に実施されていたことから、表示内容又は表示されていないことが適正であることが確認された。

(なお、センターでは、平成13年度中に、これらを含め計約300商品を買上げ、その表示内容確認の調査を同様の方法で実施することとしている。)

問い合わせ先

総合食料局品質課食品表示対策室 表示企画班 金山、財間 電話：3502-8111(内線3113,3114)

(参考)

注1)「遺伝子組換えでない」との表示又は表示しないことができる場合

表示対象品目であって、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合は、表示不要又は「大豆(遺伝子組換えでない)」等の任意表示ができることとなっている。(遺伝子組換え食品に関する品質表示基準第3条第1項第3号)

また、分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性が避けられないことから、これらの管理が適切に行われてい

る場合には、意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなすこととされている。(遺伝子組換えに関する品質表示基準第3条第3項)

ここでいう「一定の混入」とは、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が5%以下であること」と定められている。(遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について(平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知))

#### 注2) DNA分析

DNA分析としては、PCR法を用いている。PCR法とは、農産物や食品中の特定の塩基配列のDNAのみを増幅し、検出する方法であり、農産物や食品中の微量のDNAであっても検出可能である。

なお、PCR法には遺伝子組換え農産物が含まれているかどうかを検出する定性PCR法と、遺伝子組換え農産物の混入率を算出する定量PCR法があるが、定量PCR法は農産物については適用可能であるが、加工食品の場合、加熱や発酵に伴うDNAの変性、分解等により精度の高い定量は不可能な場合があることに留意する必要がある。

。(PCRとは、Polymerase Chain Reaction(ポリメラーゼ連鎖反応)の略。)

また、その分析方法については、平成13年4月にセンターが策定したJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」に基づき行った。

#### 注3) 分別生産流通管理の実施確認

分別生産流通管理の実施確認は、「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について」(平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知)に示した「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トウモロコシの分別生産流通管理の指針(以下「指針」という。)」に基づき聞き取り又は書類による確認を行った。



(別紙1) 調査結果一覧

品 目	調査 商品数	組み換えられた DNA の 検出の有無		組み換えら れた DNA が 検出された 商品の定量 DNA 分析結 果	
		不検出	検 出		
大豆	3	3	0		
大豆 加工品 (44)	豆腐	10	8	2	注) 定性D NA分析の 結果、組み 換えられた DNAが検 出された大 豆加工品6 商品につい ては、組み 換えられた DNAが検 出されたと うもろこし 加工品5商 品と異なり、加熱に よりDNA が一部分解 されている こと等から、現時点 では、精度 の高い定量 DNA分析 技術は開発 されていない。
	油揚げ類	10	8	2	
	凍豆腐	3	2	1	
	おから	5	5	0	
	ゆば	3	2	1	
	納豆	3	3	0	
	みそ	3	3	0	
	大豆煮豆	3	3	0	
きな粉	4	4	0		
とうもろ こし	コーンスナック菓子	7	7	0	うち1商品 が約6%

加工品 (12)	コーンケロッツ (コーンミール含む)	4	0	4	他の3商品 は5%以下
	コーンフラワーを主な 原材料とする食品	1	0	1	5%以下
	合計	59	48	11	

(別紙2)

### 遺伝子組換え食品の表示内容

遺伝子組換え食品の品質表示基準に基づき、遺伝子組換え農産物(大豆、とうもろこし等)及びその加工食品について、次のような表示を行うこととされている。

- ① 加工後も組み換えられたDNA又はこれによって生じたタンパク質が残存する加工食品(豆腐・油揚げ類、みそ、納豆、コーンスナック菓子等)
  - ア 分別生産流通管理が行われた遺伝子組換え農産物を原材料とする場合
    - 「大豆(遺伝子組換え)」等の義務表示
  - イ 遺伝子組換え農産物と非遺伝子組換え農産物が不分別の農産物を原材料とする場合
    - 「大豆(遺伝子組換え不分別)」等の義務表示
  - ウ 分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合
    - 表示不要又は「大豆(遺伝子組換えでない)」等の任意表示
- ② 加工後に組み換えられたDNA及びこれによって生じたタンパク質が残存しない加工食品(醤油、コーンフレーク等)
  - 表示不要(任意表示)

なお、①のウについて、分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入（5%以下）の可能性が避けられないことから、これらの管理が適切に行われている場合には、意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなす。

#### 八月二日（五）：

晨間繼續進行玉米胚芽與胚乳分離之工作，此項工作真是需要一些解剖用的工具，吉村先生、彥尾先生、重松小姐與筆者另於一個較小而獨立的實驗室進行此項分離之工作，主要原因在於避免污染，四人默默的各自進行切割分解等動作，今日是本局林澤揚先生於此之最後一日，也要攜帶一些從日野先生研究室作為實驗室共同研究用之材料回台，約於十時許筆者暫停分離玉米樣品之工作，先幫林澤揚先生配製與打包整理回台繼續實驗用之材料，之後整日持續進行玉米胚芽乳之分離，一行人除了刀具碰撞與切割聲、及偶而陸續傳來磨粉機之震盪聲音，均於無言寧靜而努力動作中進行著，因為要確保避免於此步驟中之再污染，工作台面、切割之墊襯、刀具等在處理完每一粒玉米後，均需重新清潔與更換，待今日將幾株玉米分離完畢及整理實驗室早已華燈高點了，因為是臨週末所以多數實驗室伙伴也都陸續離去，因此在另外日野博士向研究所借用之實驗室裡之儀器空出來，筆者與松岡博士討論後，先初步進行玉米抽出 DNA 之再確認實驗，以 CaMV35S 引子對、T25 引子對、SSIIB 引子對等來互相校對實驗之結果，實驗配方依循日野博士實驗室建立之檢驗方法程序調配各項試藥設定反應程式後進行反應檢測（如附件六）。

#### 八月五日（一）：

早晨先將在另外於 GMO 大實驗室之資料轉至實驗室裡，並對 P35S, T25, SSIIB 加以分別分析，將已經決定之 threshold line 分別重新記入各分析組

裡，然後重新計算在每一樣品之含量，結果如下表，

sample	P35S	T25	SSIb	P35S/SSIb	T25/SSIb
T5	11804.990	9931.570	33860.460	34.9%	29.3%
T6	8213.130	8013.270	29240.000	28.1%	27.4%
T9	11071.480	10797.980	26042.440	42.5%	41.5%
T10	9983.870	9879.860	26186.120	38.1%	37.7%

與松岡猛先生重新檢視並討論所得數據，發現以 P35S/SSIb 與 T25/SSIb 分別計算之結果數值並非完全相同，這是令人有興趣之處，因為使用不同之引子對進行定量檢測，依據理論推測應該得到相近之結果，可是實際上實驗數據之間的變異與差距，則是另一個研究之議題。今日下午共有六人進行抽取 DNA、純化的工作，分成二組人，重松万由小姐、吉村倫彰先生 (ASAHI 株式會社，商品技術開發本部，分析研究所，安全評價部) 與筆者三人一組，本組此次負責樣品是 Event BT176 胚乳 DNA 抽取製備，(目前共有五個品系玉米 DNA 樣品待製備，為了要避免污染或混入不必要之種子，所以全部的樣品都是需一顆一顆的分析確認，目前其中四個品系各有 40 顆玉米粒而 GA21 僅有 20 顆種子 (不足部分日本 Monsanto 公司會再提供)，因此 DNA 也必須一粒一粒分別抽取純化，然後再以 real time PCR 一一分析確認，經確認後無污染之種子原料，<sup>再</sup>在將其混合後，作為下一步驟製備標準參考物質與盲樣測試等之材料。

八月六日 (二):

繼續抽取 DNA，早上的樣品是 BT11 胚乳，一樣計有 40 個樣品由波田野修子小姐，尾野敏彥先生與筆者負責抽取純化，下午是另外一品系 T25 胚乳也是 40 個樣品則僅由尾野敏彥先生與筆者負責，依據日方的資料，使用之抽取純化方法，以 Dneasy Plant Mini Kit 為主，將 Qiagen 公司之標準方法 (如附件七) 加以修改更適合於玉米之 DNA 製備，取 0.2g sample, 再加入

10  $\mu$ l RNase (100mg/ml) 與 1.2ml AP1 buffer (65°C) 預熱。劇烈震盪，完全混合。65°C 15min (vortex each 5 min, total 3 times)。再加入 400 $\mu$ l AP2 緩衝液，vortex 10 sec 至少。靜置於冰浴 5 min。離心，3000rpm 15min at RT。取上清液 500 $\mu$ l 通過淺紫色 QIA shredder spin column，at RT 15000 rpm 2 min。收集流出液（並同時估算體積）於 15ml 尖底試管，加入 1.5 倍體積之 AP3/Et-OH buffer，vortex 10 sec。每次取 500 $\mu$ l 通過白色之 DNeasy Mini column, 15000rpm 1min at RT. 捨去流出液。將所有之檢液均通過。以 AW buffer 每次 500 $\mu$ l，wash 2 次，15000rpm 1min RT. 最後 dry the column 轉移至新 microfuge tube 1.5ml, add 50 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (65°C), 15000rpm 2min. 今天所製備之共計八十個 DNA 樣品，因為抽取完成時已經晚上八點多，幾部 real time PCR 也都操作分析中，因此栗原秀夫先生先開車帶筆者等前往晚餐後，返回實驗室大約說明因為明日我們定量 group 成員將進行非常重要之試藥配製工作，此部分確認工作將交由其他成員繼續完成。附圖為抽出之玉米 DNA 取 2 $\mu$ l 於 0.8% agarose gel 上電泳後染色之結果。



八月七日 (三):

今日進入配置 collaboratories study 試藥之工作，共有四人進行此項工作，栗原秀夫先生先做此項任務說明，並將工作計畫與配製方式逐項重複計算、說明和討論，並且一再確認四人瞭解，之後筆者與尾野敏彥先生一組，另外由琦玉縣來的兒玉先生與一組，共有十種 primer-probe mix 要製備，一組負責五種，筆者分配到的是 Le1 mix, GA21 mix, T25mix, Mon810 mix, RRS mix 而其他的 SSIb mix, CaMV mix, NOS mix, BT11 mix, Event 176 則由另一組負責。配製之用途有機器精度，內標比，盲樣測試，機種間差異等所要使用，其中配布本數為 916 管，分注本數為 1374 管，共計超過 2000 多支樣品，因為是 collaboratory study 要使用的，大家格外小心，在另外的大實驗室配製，整天靜悄悄的，除了日野先生進來，以及進餐外，幾乎無人打擾，同一組二人的原因除了互相搭配配製藥劑外，最特別的為互相確認，只要拿了任何一個藥品，轉動了微量吸管，只要有動作改變或任何試藥取用或離心管種類等等，都要二人互相確認可，才能動作，進行非常謹慎，不但是要求精準，而且事後筆者與日方工作人員估算，今天係大量製備，任何其中一種，最少也值日幣百萬元以上（約合台幣三四十萬），更何況十種配方，二三千支試管，一旦出錯不是後悔二字可以形容。根據事先討論計算之機器精度確認必要量概算，每一試驗為三重覆，因此所需之必要量為 25 $\mu$ M primer set 與 10 $\mu$ M 探針，必要量為 9072 $\mu$ l，並進一步算出探針與引子混合製備方法，所有引子之原濃度為 25 $\mu$ M，終濃度為 1.25 $\mu$ M，且算出初期配製試藥量與試藥殘量（如附件八），以求製備之精確與確認無誤。

八月八日 (四):

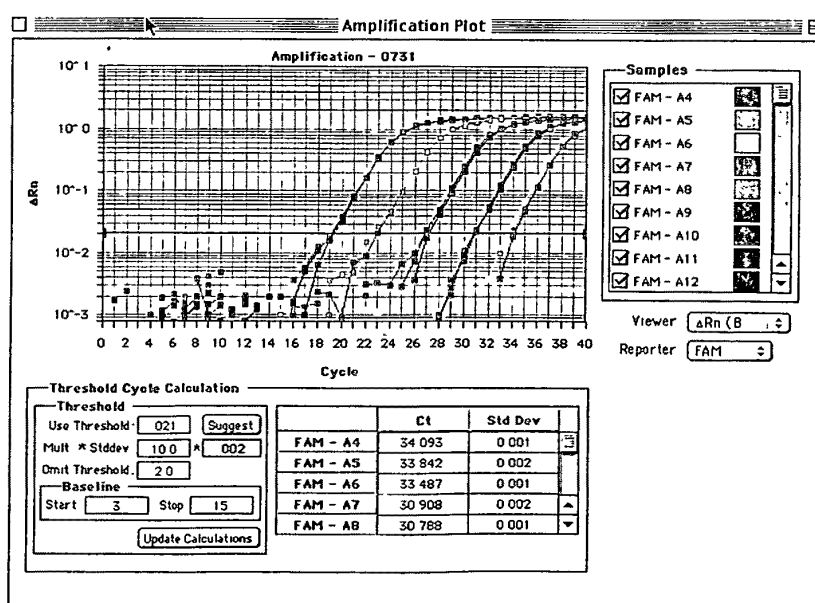
晨間進行 GA21 種子胚芽與胚乳分離，總計 40 顆種子，吉村先生，重松萬由小姐，尾野敏彥先生與筆者四人於另一小房間繼續進行此項分離工作，

而另外井上真以子小姐為避免污染，特別去另外一棟大樓的實驗室配製混合標準品，使用乾式混合法。下午栗原先生，築山佳苗小姐，法邑雄司先生(來自琦玉縣獨立行政法人農林水產消費技術中心本部)，岡野正代小姐與筆者開始分裝與包裝要寄出實驗室共同試驗研究用的機器精度試驗用所有試劑藥品，均分別以乾冰封裝，除一在反覆確認封裝之品目(因為參與之實驗室 real time pcr 機器機型品牌不同，參與項目也不同，故需一再確認內容物)，地址與收件人也反覆確認，最後並將保立容盒影印備存，最後筆者與岡野正代小姐將所準備完成物件送至其總務中心，請宅即便快遞寄出。之後繼續配製定性試驗用試劑，有玉米使用之 primer set 含 SSIIb, CaMV, NOS, Bt11, E176, GA21, Mon810, T25 和大豆使用之 Le1, CaMV, NOS, RRS 每一種四十管，每管之製備量除了 SSIIb 為 24ul 其他均為 12ul，法邑先生、尾野先生、重松小姐製備玉米部分，筆者則製備大豆用之試劑，根據事先計算完成必要量概算製備濃度為 25uM primer set (each primer) 逐一製備(如附件九)。附帶說明今日早上約十時許日野博士帶同筆者一同去拜訪食品總合研究所所長鈴木建夫博士、企畫調整部長春見隆文博士、企畫調整部食品衛生對策中心長一色賢司博士及橘田和美博士，筆者除了表示感謝該所接受我們之短期研究外，亦說明台灣基因改造食品之安全性審查制度與標示規定，食品總合研究所成立於 1934 年為稻米利用實驗室，1947 年改名為食品研究所，直至 1972 年負改名為國立食品總合研究所，1979 年從東京舊址搬遷至目前之新址，2001 年由政府機關改制為獨立行政法人，在農林水產省之督導下研究所的任務是要由於指領導研究為這個社會提供安全食品的供應以確保健康與豐富的生命，其食品研究項目含蓋各式各樣的科學和技術的領域和目的在於發展工藝系統，加強農業，處理工業的林業、漁業和食品，研究規劃包括健康功能評價關係的說明、規劃與分析技術的改進，發展技術以確保食品安全，食品運送和處理的方法的改進，和生活有機體

功能的探索及利用（詳如附件十）。

八月九日（五）：

筆者與重松小姐、吉春先生一起萃取昨日分離製備完成之 GA21 endosperm，抽取製備之方法同前所述，之後以同步定量 PCR 方法檢測是否有污染之情形，因為四十個樣品，需跑基因檢測篩選，每一樣品做二重複，加上 NTC 與一個標準品(20k copies)，在九十六孔之操作盤一次即可跑完，故即由重松小姐進行後續之實驗配製。在跑完定量 PCR 確認後，僅有一個樣品在 40cycle 以後出現，討論之後認為該樣品應該是因為些許微量的污染，或者是有背景值升高的緣故，為確保整個標準品之純度與品質，該樣品將捨去不用，其他的 39 個樣品，將作為實驗室共同試驗之材料。附圖為分子標準參考物質以定量 PCR 儀器（ABI7700 型）實驗之結果，顯示五個不同濃度之每一濃度之三重復之再現性相當好，反應曲線均能重複並重疊。



八月十二日（一）：

晨間九時是依舊是實驗室的清潔時間，日野先生之實驗室並無配有特定之



人員擔任清潔工作，每週一為清潔日，無論階級資歷年齡，大家分別拿著掃帚吸塵器拖把等一起動手，筆者在此研究期間之清潔時間，從沒有人發號施令或指揮，全員自行清理到垃圾，換塑膠袋容器等，全部自動進行也沒人偷懶，在平日，如有人把實驗室弄髒了當然會受到別人的指責，但是隨之手邊有空檔的人，亦會立即加入清理的工作，隨時共同維持清潔，目前我們政府正進行人事精簡之相關工作，也許，將來我們沒有特定人員擔任清潔工作，只有靠大家一樣的分工合作自行動手。隨之全部進行工作會議，因為目前實驗室共同試驗的各種準備工作進度落後，會中一一檢討提出並規劃本週應儘速趕辦工作，並對當前工作狀況調整人員，筆者因此也調動至定性 group，協助該組之工作，午後，因為大量製備的套組太貴了，而且也不能消耗太多樣品在確認的工作上，筆者與松岡博士重新討論修改抽取 DNA 的方法，逐步一一研究後修正新的流程方法，可以用於接續的 DNA 製備工作。我們討論研究後以取 0.1g 樣品（於 50ml 試管中）先加入 10 $\mu$ l RNase A (100mg/ml)及 5ml AP1 buffer(預熱於 65°C 水浴)，vortex 完全後。再置於 65°C 水浴(vortex each 5 min, total 3 times repeat)。Add 1.8ml AP2 緩衝液，vortex 10 sec。復靜置於冰浴 5 min。離心，3000rpm 15min at RT。取上清液 500ul 通過淺紫色 QIA shredder spin column (其餘保存於-80°C) at RT 10000 rpm 4 min。收集流出液（並同時估算體積）於 2ml 試管，加入 1.5 倍體積之 AP3/Et-OH buffer，vortex 10 sec。每次取 500ul 通過白色之 Dneasy Mini column, 10000rpm 1min at RT. 捨去流出液。將所有之檢液均通過。以 AW buffer 每次 500ul，wash 2 次，10000rpm 1min RT. 最後 dry the column. 轉移至新 microfuge tube 1.5ml, add 50ul dH<sub>2</sub>O (65°C)回收 DNA，10000rpm 1min。

八月十三日 (二):

因為持續要進行的實驗室共同試驗材料準備，栗原先生今日準備將寄至海

外實驗室進行第一部份儀器精度測試之 primer probe set 等，反覆仔細檢查，一一確認後方行寄送，砂川小姐、築山小姐與筆者則進行 non GM maize DNA 抽取製備，依照前日確認之程序抽取製備，並把完成之材料冷凍儲存於-80°C 冰箱備用，同時以分光光度儀(Beckman de1000)測定所抽取 DNA 濃度。本週是日本之烏盆節，日本的休假週，有些類似我們台灣之清明節，人們返鄉團聚祭祖，但是因為整個工作尚未完成，大部分的人都還在實驗室忙碌，實驗室已經公布休假表，人員分別只能短暫一二日輪休而已，今天還發生一件事，來自的日本食品分析中心多摩研究所青木信太郎先生，因為工作體力不支倒下，送至醫院，醫院要留他三四天治療與靜養，日野先生已經通知重要幹部與所有人員，晚上十點後一律回去休息，不要再留在實驗室工作，栗原先生也要大家注意個人健康狀況，因為筆者在實驗室人員中年紀算是”長者”，他還特別跑來關照我一番，他們做事糜遺的態度實值得學習。抽取 DNA 分別測定 230、260、280nm 等吸光值，並計算 OD260/OD230、OD260/OD280 測定結果如下：

sample ID	230nm net abs	260nm net abs	280nm net abs	260/230	260/280	dil Fact	Conc ng/ul
1	-0.0001	-0.0008	-0.0001	8.00000	8.00000	1	-0.0400
1125	0.0168	0.0961	0.0558	5.83929	1.75806	20	98.10
1358	-0.0033	0.0836	0.0481	-25.33333	1.73805	20	83.60
1388	0.0177	0.1306	0.0744	7.37853	1.75538	20	130.60
1296	0.0174	0.0962	0.0543	5.52874	1.77164	20	96.20
1229	0.0197	0.1268	0.0719	6.43655	1.76356	20	126.80
1510	0.0103	0.1129	0.0638	10.96117	1.76959	20	112.90
1538	0.0218	0.1127	0.0637	5.16972	1.76923	20	112.70
1369	0.0101	0.1141	0.0644	11.29703	1.77174	20	114.10
1359	0.0164	0.1189	0.0673	7.25000	1.76672	20	118.90
1042	0.0130	0.1139	0.0646	8.76154	1.76316	20	113.90
1959	0.0218	0.1330	0.0749	6.10092	1.77570	20	133.00
1385	0.0207	0.1426	0.0815	6.88889	1.74969	20	142.60
1323	0.0144	0.1239	0.0698	8.60417	1.77507	20	123.90
1442	0.0207	0.1214	0.0683	5.86473	1.77745	20	121.40
1378	0.0128	0.1019	0.0579	7.96094	1.75993	20	101.90
1029	0.0285	0.1293	0.0719	4.53684	1.79833	20	129.30

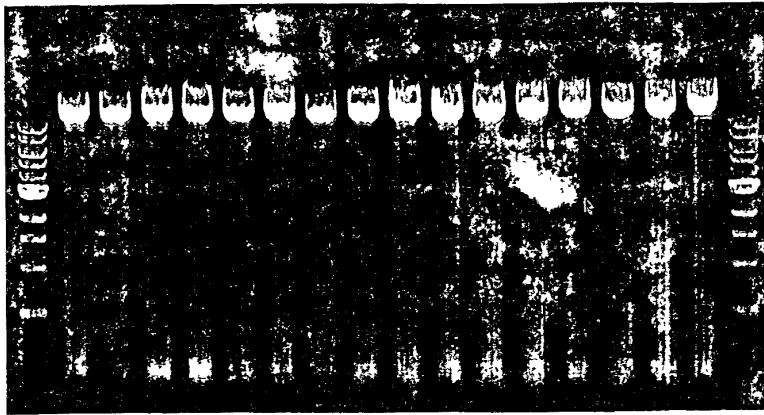
八月十四日 (三)：

將抽取之 maize DNA 以 0.8% agarose gel 含 EtBr 進行電泳分析，每一樣品

取 7.5 $\mu$ l 加上 1.5 $\mu$ l loading dye 混合均勻後，在 mupidII 電泳裝置以 25well comb maker 經 100V 約 25min 電泳後，在經 biorad 影像處理系統確認抽取之 DNA 無誤，在日野博士實驗室裡明確規定，有關 post PCR 的工作需於另外分離的空間進行，以避免這些 PCR 產物經由飛沫或空氣污染實驗室；此外則並繼續抽取 non GM soybeans DNA，大豆的前處理部分比較麻煩，因為蛋白質與脂質含量約為玉米之 4 倍左右，故於前處理手續更麻煩，今日由井上真以子小姐，築山小姐與筆者進行抽取工作，仍然於抽取後，取 DNA 抽出物 2.5 $\mu$ l 加入 47.5 $\mu$ l TE buffer 中做成二十倍之稀釋，然後於分光光度計分別測定 230、260、280nm 等吸光值，並計算 OD260/OD230、OD260/OD280，確定所抽取 DNA 之濃度與純度，測定與計算結果如下表，和井上真以子小姐，築山小姐討論，依照此方法一般狀況所抽取之 DNA 回收量可以在 100ng/ $\mu$ l 左右。

sample ID	230nm ne	260nm ne	280nm ne	260/230	260/280	dil Fact	Conc ng/ $\mu$ l
1	0.0003	-0.0005	-0.0001	-1.87008	5.00000	1	-0.0250
11	0.0011	0.0792	0.0441	72.00000	1.79592	20	79.20
203	0.0038	0.0765	0.0426	20.13158	1.79577	20	76.50
256	0.0134	0.1119	0.0617	8.35075	1.81361	20	111.90
531	0.0204	0.1239	0.0678	6.07353	1.82743	20	123.90
534	0.0238	0.1335	0.0732	5.60924	1.82377	20	133.50
600	0.0187	0.1178	0.0652	6.29947	1.80675	20	117.80
25	0.0055	0.0855	0.0475	15.54545	1.80000	20	85.50
70	-0.0052	0.0685	0.0376	-13.17308	1.82181	20	68.50
281	0.0050	0.0845	0.0475	16.90000	1.77895	20	84.50
305	-0.0015	0.0736	0.0411	-49.06667	1.79075	20	73.60
383	0.0020	0.0766	0.0428	38.30000	1.78972	20	76.60
532	0.0094	0.0848	0.0475	9.02128	1.78526	20	84.80

BECKMAN DU-7000



八月十五日（四）：

有三位來自台灣人員到訪日野先生，是農業試驗所的石信德博士、簡宣裕博士還有築波大學的鐘文鑫博士，此行目的主要是進行 GMOs 相關田間試驗等考察研究，日野先生將筆者引見幾位先進外，並詳細為其說明其 GMOs 相關工作與研究，筆者亦幫忙向三位同胞訪客說明日野博士研發檢驗方法之策略與架構（如附件十一），希望給予最詳盡之說明。GMO 各 group 負責人通知大家要開會討論，由日野先生主持，主要討論有關實驗室共同試驗進度落後之問題，主要問題點在因為所有樣品都必須完全確認，但是仍有部分樣品測試分析結果仍有疑慮，需再度確認或重新配製，同時由於標準參考物質的短缺與需再製備之需要也是矛盾令人頭痛，人手缺乏也是問題，因為幾位韓國朋友已於二週前返國，陸續又有幾位伙伴返回工作崗位，雖然有找到二位工讀生但是僅能賦予較為簡易工作亦屬為難之處，同時在加強工作效率、延長工作時間與顧及工作伙伴之健康等問題之衝突亦難取捨，經幾番討論，只見諸位日本伙伴面色凝重，筆者只能為他們打打氣，後經重新設定進度再出發，大伙兒又精神奕奕返回工作崗位。搞了半天他們告訴我依舊是定量 group 成員，前幾日是支援定性 group 而已。吉村先生，大島先生與筆者進行配製此次定量實驗室共同試驗要用的標準品，包括內標比測定，機種間差異和盲樣測試用的 GM 玉米部分，依然於工學實驗室

中靜靜的進行，依舊是密密麻麻如山的試管、成疊的標籤紙及保存盒，包括 PRISM7700、7900、7000 與 LightCycler 等機型。

八月十六日（五）：

NFRI marker 是本次實驗室共同試驗使用的核酸標記，築山小姐、波田野修子小姐與筆者進行製備分裝的工作，築山小姐先將該批核酸標記能與定量下限值同時在電泳膠片可以同時跑出來，能夠顯現應有的亮度，此次實驗室共同試驗研究定性部分，為了統一各研究室、所的結果與報告，所以購買乙批核酸標記，並且以連續測試不同濃度，以求實驗結果之準確與一致，目前是使用 TE 緩衝液加以稀釋，經一連串測試，目前所調配的濃度為 0.25ug/ul，當然和之前的情況並無二樣，依舊是仔細計算各種濃度，標記試管與配製數及剩餘量等等，反覆驗證確定則續之配製及裝管，之後並以 parafilm 仔細每一試管封閉，以免在冷凍或運送中蒸發或流失。在統一使用與由實驗室重行調配可行之濃度之前提下，同時僅使用於此次共同試驗，實在難以加以命名因此最後決定僅以 NFRI marker 標籤於各個試管上以求一致性。

八月十九日（一）：

晨間九時是依舊是實驗室的清潔時間，大夥兒井然有序的吸塵，掃地，拖地，處理垃圾等。今日要確認筆者與其他工作人員日來製備之 DNA 濃度與純度，以作為日後之標準物質使用。

目的：確認 DNA 濃度（以 isopropanol 沈澱之有無之影響）

方法：以三種不同方法，（1）spectrophotometer OD measurement，（2）pico green fluorescence microplate reader and （3）real-time pcr for SSIIB copy number decision，相互確認 DNA 含量，初步待測七個樣品皆為玉米樣品之使用 mini kit 抽取之 DNA，要做 spectrophotometer measurement 之樣品先以

TE buffer 稀釋 20 倍後，分別於 OD230、260、280nm 測定吸光值再予以計算 DNA 濃度如下：

sample ID	230nm ne	260nm ne	280nm ne	260/230	260/280	dil Fact	Conc ng/ul
1	0.0001	0.0000	0.0001	-1.87008	0.00000	1	0.0000
2	-0.3013	0.0930	0.0564	-0.30866	1.64894	20	93.00
3	-0.3037	0.1234	0.0729	-0.40632	1.69273	20	123.40
4	-0.2064	0.0946	0.0537	-0.45833	1.76164	20	94.60
5	-0.3021	0.0677	0.0442	-0.22410	1.53167	20	67.70
6	-0.3019	0.0849	0.0523	-0.28122	1.62333	20	84.90
7	-0.3042	0.3041	0.1746	-0.99967	1.74170	20	304.10
8	-0.3097	0.3102	0.1782	-1.00161	1.74074	20	310.20

BECKMAN DU-7000

Picogreen 方法為 Molecular probe 之產品，可以專一性測定 dsDNA 濃度，此次使用是 P-7589 picogreen daDNA quantitation kit，儀器為 millipore cytoflour 2350，(filter set: filter EX B(485nm/20)，fliter EM B(530nm/25)，sensitivity 4)，及 Flakon 96 well microtest™ flat bottom plate，最後存於.csv 檔，再轉至 excel 中加以計算，TE buffer:以所附 20X buffer 取 2ml 加上 38ml 滅菌水，pico reagent: pico reagent 30ul 加上 TE 6ml，DNA STD: Lambda DNA (100ug/ml) 30ul+TE 1.47ml (2000ng/ml), 2000ng/ml 100ul+ TE 900ul (200ng/ml), 200ng/ml 100ul+ TE 900ul(20ng/ml), 20ng/ml 100ul+ TE 900ul(2ng/ml), TE(0ng/ml)，樣品均以 TE 稀釋 200 倍，所有各試驗液體均為二重複，取檢液與 pico reagent 各 100ul 加入每一樣品孔洞中，五分鐘後上機測定。

pico green fluorescence microplate reader 測定 DNA 濃度結果如下：

	Dil. factor	螢光強度 Area	濃度 ng/ml	平均 ng/ml	實際濃度 ug/ml	OD260 ug/ml
4-1(300ul mini)	200	986, 989	463.1479, 464.7233	463.94	92.79	93.00
4-2(300ul mini)	200	1277, 1284	615.9666, 619.6426	617.80	123.56	123.40
2900ul maxi	200	871, 852	402.7556, 392.7777	397.77	79.55	94.60

1-1(1450ul Maxi)	200	706, 708	316.1058, 317.1561	316.33	63.33	67.70
1-2(1450ul Maxi)	200	937, 927	437.4155, 432.1640	434.79	86.96	84.90
2-1(1450ul Maxi)	200	2601, 2522	1311.2655, 1269.7787	1290.52	258.10	304.10
2-2(1200ul Maxi)	200	3063, 2985	1539.7059, 1512.9232	1526.31	305.26	310.20

如果樣品定量值超過標準品範圍，則需重新適當稀釋，進行第二次定量。

接續跑 real time PCR 去確認 SSIb copy number，先將各管檢液，依照 OD260 結果調製至 20ng/ul，依照配方分別加入 SSIb primer1-3 and probe mix、master mix 與 DNA，每樣品三重復，置入於 abi 7700 進行 PCR 檢測。

八月二十日 (二):

早上先至實驗室收集昨日同步定量 PCR 實驗之數據與結果，發現此批 DNA 樣品都沒有螢光上升反應，因此討論相關原因，因為今天要和日野先生去東京，所以暫把疑惑帶至車上思考，日野先生與筆者約於十時左右到達築波市中心巴士站，二人前往東京之東條 Imperial palace 參與由日本食品科學資訊中心所主辦之一項公眾「遺傳子組換食品研討」，東京塞車果然有名，原本車行一路順暢當抵達東京近郊便開始大塞車，但是駕駛人員似乎都很有耐心的有序排隊；抵達會場後先行拜會主持人日本食品科學公報中心代表正木英子小姐與瀨古博子小姐，此次公眾會議講題分別為「遺傳子組換食品現狀檢 查」由日野明寬博士主講(獨立行政法人食品總合研究所食品機能部味覺機能研究室長)，「安全性確認評估系統」笠井美惠 (特定非營利活動法人 日本國際生命科學協會 (ILSI Japan) 研究部會)，「遺傳子組換食品安全性確保」宮川昭二(厚生勞動省醫藥局食品保健部監視安全課課長補佐)，早先安排之講員為三木朗先生因事未能出席，原先計畫為二百人參與，但是報名參加之民眾非常踴躍，因此主辦單位在同一地點，租借更大的場地，超過四百人以上參加，其中亦不乏反對 GMO 團體或人士參與，

會程由正木英子小姐簡單致詞後，主持人瀨古博子小姐簡單引言開場後，三位來自不同單位的專家就其主題進行 50 分鐘之報告與說明，歷時約三小時，繼續則由專家答覆已經送至前方之發言單，並同時給與會民眾直接發問，日野先生深入淺出就生物技術以及基因轉殖技術原理加以介紹，從全球 GMO 栽培之狀況進入主題，談到基因改造食品引起之不安與疑慮，再談到消費者思考與關切的事項，並說明日本政府對基因改造食品安全性評價之情況，與當前研發之相關檢驗技術說明及介紹。笠井美惠 博士說明基因改造作物安全性審查之程序，安全性評價之共通概念與策略，使與會人員瞭解日本政府與研發者均於安全性的主題訴求前提下，所進行的方式與所盡的努力。接著由宮川昭二先生分別就安全性確保、安全性審查基準與概要、日本輸入食品安全性確保對策、基因改造食品之標示與調查研究之推進等詳細說明，深入淺出讓與會者深確瞭解其間作業之努力與投入。三位專家演講說明後十分鐘的休息，便由瀨古博子小姐主持，與會來賓大眾提問題，立即由三位專家當場回答，日本民眾對 GMO 的關心從其與會和發問之踴躍便可看出，有學生一般社會人士及中高齡民眾，大部分問題主要環繞安全性的疑慮及誤解，例如有人問到有基因的 GMO 食物與沒有基因的傳統食物差異性與毒性，GMO 產品的基因經由環境飲水或腸道跑入體內要如何處理等諸類問題，因此可見公眾溝通與教育之執行重要性，較奇怪的事本次仍然有 NGO 民眾參加，但是並未發言或反對，會議依照原訂時程結束後，還是很多民眾圍繞三位專家詢問各式問題，得到滿意答案後方形離去；因為聽眾太熱情也很熱烈發問，日野博士與筆者會後需趕車至名古屋，直至開車前十五分左右二人方告別不捨之聽眾趕之至東京車站搭乘火車前往名古屋，以便參加明天下一場公眾會議。

八月二十一日 (三):



今日主要是出席於名古屋愛鐵連厚生年金基金會館舉行的「遺傳子組換食品研討」公眾研討會，主辦單位仍然是日本食品科學公報中心，本日研討會主題內容與昨日相同，除了「遺傳子組換食品安全性確保」講者三木朗先生(厚生勞動省醫藥局食品保健部監視安全課生物食品專門官)今日依照原訂計畫出席事項會議，其他二項主題講者為日野先生與笠井小姐與昨日在東京會議相同，此場與昨日東京會場相較之下稍少，約有二百人參加，而且無反對 GMO 團體或人士參與，仍然由三位專家學者就「遺傳子組換食品現狀檢知技術」日野明寬博士(獨立行政法人食品總合研究所食品機能部味覺機能研究室長)、「安全性確認之系統」笠井美惠子博士(特定非營利活動法人日本國際生命科學協會研究部會)、「遺傳子組換食品之安全性確保」三木朗博士(厚生勞動省醫藥局食品保健部監視安全課，生技食品專門官)做專題演講，後經十分鐘短暫休息，即由現場之聽眾即席提問由專家作答，與會者有老有少，有銀髮族也有學生及青年族，可見日本民眾對於基因改造食品之相關議題都不分年齡具有高度關心，但由部分問題中可以發現，仍有部分民眾對基因改造食品之誤解與不明瞭，較特殊的問題是有一位退休教授問到，使用細胞株例如 hela cell 進行組織培養過程中，我們經常使用不同化學藥品，來控制或誘導研究一些基因的表現與調控，其結果總是因藥劑不同而得到不同的結果，為何在基因改造食品安全評估過程中，未見到使用類似的模式探討不同因素對 GMOs 的影響？當然還是由專家就其問題深入回答，日野博士就其所提之對照控住組與基因改造食品之異同與樣品取得之不易，分別深入淺出答覆，充分滿足發問者與其他聽眾之問題。另外笠井美惠 博士和日野明寬博士也對筆者表示與一二年前日本社會民情相較之下，已經改變很多，民眾的質疑與問題已經可以看出由「反對」轉變成「疑問與關心」，例如有人問到為何 GMO 產品都是一些抗蟲害耐除草劑之類的，目前環境污染這麼嚴重為何沒有可以利用分解這些毒素的轉

殖植物等，這樣的轉變使日野博士等人除了在實驗室工作之外的公眾溝通與教育以來，心中感到最大之成就。筆者亦帶回日本食品科學公報中心於本次研討會之會後問卷調查與宣導品如附件十二。

#### 八月二十二日（四）：

於名古屋 Morrit Hotel 舉行，主辦單位為日本生物技術情報普及會之「2002 Biotech Science Garden」，雖然報名人數高達 600 人，但礙於場地等因素僅能給予出席人數 200 人，雖然也是一場公眾會議，但又別於前二日的形式，首先由淑德大學北野大教授與名主持人雲野右子，開場將話題帶入生物技術及其應用產品，接著由二位 NHK 電視公司晨間節目非常受歡迎的外籍主持人穿插對話，以類似雙簧式的方式，道出新世代與一般民眾的疑惑，由日野明寬博士做深入淺出的回答與說明，北野大教授與雲野小姐則穿插說明與接續問題，相對應的進行頭腦體操，主辦單位發給的第一份問題解答用紙上，就將台上表演與敘述一一融入該文件裡，接著頭腦體操就是把主辦單位發給的問卷一一作答，並試問自己比較一下參加此生物技術園地後對生物技術及相關事物有進一步而清楚的瞭解，在休息時間中參與的民眾既然已知道生物技術的基本原理與目前應用概況，要請諸位與會人員，用自己的想像力創作出自己心中的生技產品，然後將自己的設計交給工作人員回收評比，休息之後接著為「遺傳組換作物安全性」為主題，依然由北野大教授與雲野小姐主持，並由日野明寬士、田部井豐博士（獨立行政法人農業生物資源研究所新生物資源創出研究中心植物細胞工學研究群）小崎丈太郎（日經生物技術經濟編集長）與聽眾來賓做即席之問與答，三位不同領域之專家都能面對問題深入淺出應答，民眾多能得到滿意之答覆；繼續則發表之前與會民眾之生技產品研發構想評比結果，第一名的設計為應用生物技術方法，做出一種可以探知地雷所在處之基因轉殖植物，然後該植物之根部可以迅速在地底下生長找到地雷，並將以推出地表，可以讓

專業人士有效處理該些潛伏在地底的炸彈，他是一位約四十歲的男性，此項靈感源自因應 911 效應；第二位是希望經由生物技術產生可以以非常低營養與水分供與就可以生長得很好的基因轉殖植物，這樣在地球廣被污染的環境之下，者些新的轉殖作物得以蓬勃成長，而且可以把環境污染再轉化為自然乾淨之環境。雖然會程中看起來似乎很大眾化，但是參與同台的有三位是來自大眾傳播事業工作者，一位新聞媒體工作者，三位學者專家，晨間確實花了不少時間進行預演實作的準備工作，會程結束一行人包括工作人員並進行簡單的檢討，日野博士與筆者便與眾人告別，至名古屋車站搭乘新幹線火車至東京，復轉搭巴士回築波抵達市區已是夜深，大約兩日半的行程非常緊湊，但是卻是一種全新之體驗，本來很難瞭解如同日野博士一般的一以實驗室工作為主的人員，在面對來自各行各業不同年齡階層，不同教育背景的民眾，要如何去面對與回應各式各樣的問題，有時甚或面對反對立場一味抗爭的同胞，真是必須身體力行以充實的智識方能充分應對。Biotech Science Garden 公眾會議之聽眾使用生技產品研發用紙與測試卷如附件十三。

八月二十三日（五）：

今日返回繼續實驗室的工作，這幾日工作伙伴們綜合討論檢視這些日子大家努力製備之 DNA 與各個測試確認試驗結果，原本預期可以順利完成所有 DNA 樣本與世試藥濃度調整等工作，但是此次之 DNA 抽取物可能有一些未知的問題，討論之後仍有可疑之處，因此解決之道則重新抽取 DNA，並且改良原來的製備流程，與重松小姐一起處理樣品，將適量石英砂(quartz sand)加入樣品中，加入液態氮並研磨成粉末，加入 Rnase 24ul and 12ml AP1(65°C)一小時，3000xg 離心 15min，上清液添加 AP2 4.32ml，震盪 10sec，置於冰上 15 分鐘，3000xg 離心 35min，上清液添加於 shredder column，3000xg 離心 5min，震盪 10sec，+1.5vol Ap3/EtOH，震盪 10sec，3000xg 離心 15min，

12ml AW, 3000xg 離心 15min, 0.5ml TE buffer 5min, 3000xg 離心 15min, 0.5ml TE buffer 5min, 3000xg 離心 15min 2<sup>nd</sup> elute. 共計約可得到 1ml DNA 抽出物, 隨之以異丙醇濃縮至 100ul, 這樣的流程可以把 DNA 的濃度再提升。因為樣品數頗多, 待抽取製備完成已是華燈高掛, 因為筆者明晨即將返國, 趁著明月初升先至日野博士辦公室向其道別與並致謝四週來在其實驗室之研修與學習, 並將抽取之 DNA 溶液交由重松小姐準備下週來進行定量分析確認實際之濃度, 筆者整理資料並將識別卡、安全出入卡、借用之資料物品等委由重松小姐下週上班繳回辦公室, 告別實驗室工作伙伴, 進藤洋一郎博士將筆者送回住處已經是時近午夜, 迅速整理行囊以備明晨出發返台。

八月二十四日 (六):

晨間整理行李, 至築波巴士中心搭乘九時往成田機場之巴士, 在巴士站向重松小姐致謝這些時日之關照並道珍重再見後, 經過一個多小時車程至成田機場搭機, 揮別日本帶著滿懷的友誼與行囊, 搭機飛返親切的鄉土。

### 參、感想與建議

此次前往日本考察基因改造食品之檢驗技術, 並學習日本之檢驗方法, 恰巧碰上食品總合研究所與國立醫藥品食品衛生研究所共同主導進行檢驗方法之新回合實驗室間共同研究試驗, 筆者在日野先生實驗室裡由加入工作團隊中, 實際的一點一滴的操作與學習, 在四週的時日裡獲益良多。

一、共同試驗計畫: 其主要目的在於 (1) 定性檢測下限之驗證、(2) 改良基因改造作物之定量分析法增進結果之可信度與 (3) 評估相同定量檢測方法在其他定量儀器之適應性。共同試驗包括二大部分為訂性分析法與

定量分析法，定性分析部分主要含括適卻濃度之選定，影像攝取裝置感度之確認，Co-lab 之實施方法（新純粹之 GM 與 nonGM 種子粉末之調製與確認各種濃度定性 PCR 之均一性，粉末樣品寄送至各參與機構與確認 DNA 抽出物之定性試驗，結果統計分析與評估各品種系統值之定性檢測下限），並且確認參加共同試驗機構數目與儀器，估算人員試藥試劑等所需預算及參加機構之結果電泳攝影寄送至食品總合研究所解析，而定量分析部分則包括 1.改進部分（7700 之測定條件與 7900 和 7000 之協同，DNA 溶劑之改變，為提高增幅之安定性日本方面檢討 NTC 物質改定為 ColE1，共有十種定量系統實驗之實施，減少使用 well 數之均一性確認其再現性 N=3 改變為 N=2），2.實施方法為寄送各共同試驗機構純粹種子 DNA 抽出物確認，內標比試驗之進行；測定結果之統計平均值計算以作為後續實驗之依據，進行盲樣試驗及其結果統計處理以評估各系統之精度與準確度；參加共同機構之數量與儀器之確認調查，3.寄送之樣品、參考物質、primer probe mix、酵素活性、控制對照組及盲樣測試樣品等之重複確認其安定性與均一性。並且計算所需各項材料、試劑藥品、包裝保存與郵寄等費用。我國將於明年（2003）起分三階段實施基因改造食品標示，對於檢測方法之建立過程亦需經歷實驗室共同試驗研究，不但可以驗證該方法之準確性、正確性與變異性，並借以增加該檢測方法之可信度，同時又可加強建立參與實驗室之檢測能力，因此筆者於此建議本局亦應進行實驗室間共同試驗研究，在此之時亦提供足夠之人力物力方能順利達成此項階段性目標，進而將本局之檢測方法推介至 AOAC 或 CODEX 等國際層面。

二、基因改造食品標示系統檢測需求與建設：日本係由農林水產技術服務中心與檢疫所分別就其轄管業務進行基因改造食品之檢測監視工作，而食品產業以 IP handled 程序與文件來確認食品加工之原物料，但是對

於市面未通過審查之基因改造食品監測工作則由厚生勞動省負責執行，例如日本監測發現未經過安全性審查之基因改造 potato (Newleaf Y)、papaya(Sunup)、maize (StarLink) 事件，而我國明年即將上路之基因改造食品標示工作在衛生、農政與各研究機構等應如何分工合作，亦是筆者認為應及早思考與規劃，方能真正落實基因改造食品標示之執行，筆者建議依據業務之特性，具有基因改造作物與食品檢測能力與管理部門之衛生與農政單位，合作並分工負責農產品之原物料檢測與監視（例如農糧處、食品衛生處、農業試驗所、農藥毒物試驗所、藥物食品檢驗局等），監視與檢測計畫亦應及早訂定與安排，對於所需之人員、經費等及早籌措，方能有效落實與執行基因改造食品之標示。

三、知識與經驗之交流，筆者在日本食品總合研究所期間，碰到來自日本各地各地從事基因改造食品檢測之專家，大家之專業背景迥異，但是在日野博士領導與安排下，來自不同領域之專業人才，互相激勵與合作，集合專家與菁英，促進效率與品質，使得實驗之進展迅速，各種問題在，討論合作與競爭之下均能迅速找出與解決，本局基於人力資源之限制，僅有少數人員投注此項工作，雖然工作伙伴們盡心盡力在做，終究在有限之人力物力下進展有限，因此廣羅人才與籌措經費不但是因應基因改造食品檢驗研究的要因外，本局其他檢驗業務之科學研究亦無例外。

四、昂貴之貴重儀器集中管理，以增加使用率與易於維護，在食品總合研究所日野先生實驗室裡多部之同步定量 PCR 儀器，在眾多的使用者之下，其調配調度、保管與維修均由松岡博士專責，特別是松岡博士對這些儀器之故障排除與基本維護頗多瞭解，筆者在此間曾二次夜半碰上儀器當機，松岡博士均能立即檢查，並與儀器公司維修人員聯繫與

對話，使維修人員能立即瞭解問題所在，攜帶最正確的工具與材料進行維修；因為工作伙伴們也都急於進行自己負責之實驗，不但儀器滿檔外，經常會有衝檔情形，也有賴松岡博士與各小集團負責人、操作人員協調安排，使各實驗之數據能在適當的時間內完成；因此筆者亦建議貴重儀器應集中管理，提高其使用率，日野博士與松岡博士與筆者討論貴重儀器集中管理，主要希望能最有效發揮儀器使用率之下，也能夠維持儀器最佳之運行狀況，以保實驗室中實驗之順利進展。

五、目前日本並無日產之基因改造食品上市，如果將來有日產之基因改造食品上市，其管理方式將如同日本政府公告方式管理，並不會有差別處理方法，本局也關注日本研發中之基因改造食品相關產品，當前日本研發中之基因改造食品，筆者根據農林水產省農林水產技術會議事務局技術安全課資料至七月八日止，加以初步分類統計有紅豆、甜瓜各 1 種，球花甘藍、馬鈴薯、花椰菜、草莓、萵苣等各 2 種，胡瓜 4 種，蕃茄 11 種，及水稻 27 種共約五十四種（詳如附件十四），筆者認為這是值得我們繼續觀察的資料，如果世界各國不斷開發研究新的基因改造食品，則基因改造食品檢驗與管理政策與方法，則必須因應趨勢加以修正與調整，以符合實務上之需求。

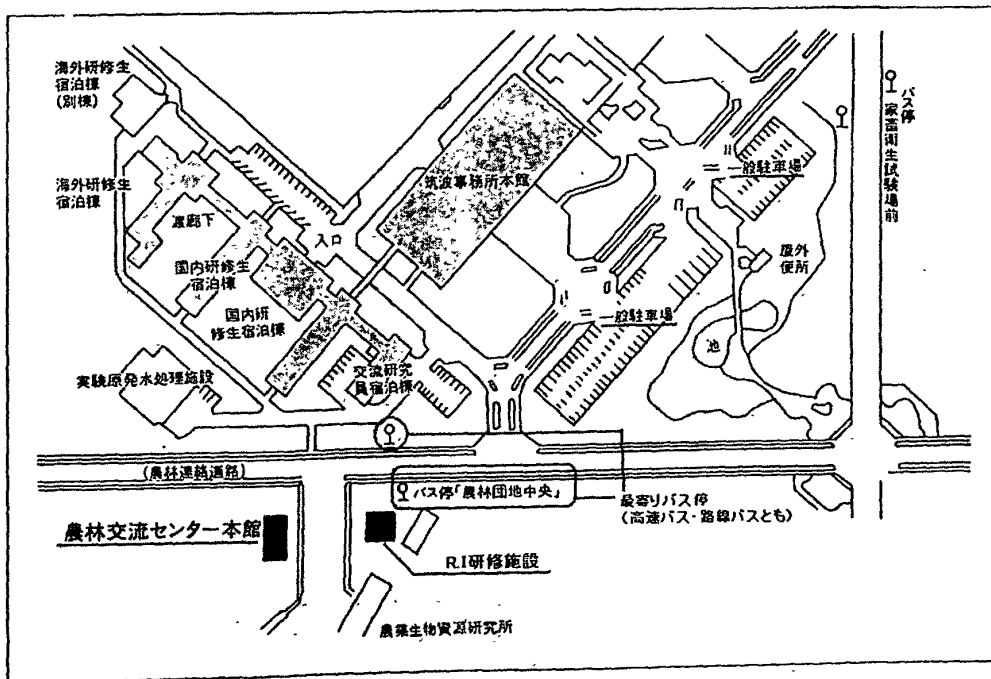
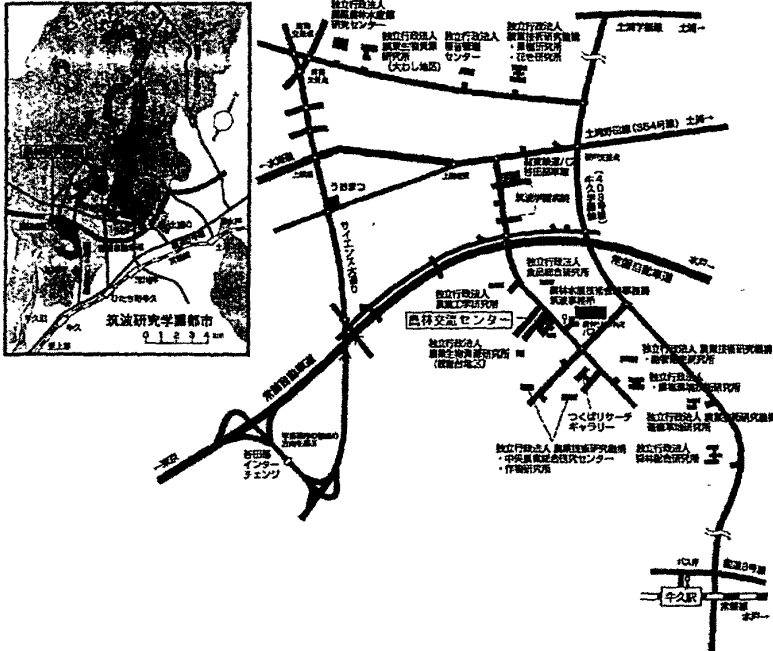
六、發展技術與科技之關鍵在於人員訓練與培育，筆者於此要感謝本局長官之愛護與重視，使筆者等有機會赴國外考察研習新的檢驗技術，此行亦感謝國科會之經會補助否則無法成行，也要感謝日本食品總合研究所與國立醫藥品食品衛生研究所之慨然接受本局之申請，也要謝謝日野明寬博士與龜山浩博士之安排與協調，筆者於日野博士之實驗室中與其他來自日本各地之研修員共事之間，深深感覺到日方對於人員之培訓非常重視，這些來自四面八方之菁英份子，有來自一般公司與私人企業，也有來自公務機構之研究人員，所至此地唯有共同之研習

方法與精進技術之目標，筆者於此建議本局與國科會能支持在人員訓練與培育之經費與數量，日後也為我國發展技術與科技奠定更深厚之基礎。筆者返國後於本局九十一年九月份第三次局務會議(九月十三日)進行此次赴日之「出國人員心得報告」，報告摘要如附件十五。

#### 肆、附 件



# 農林研究団地案内図

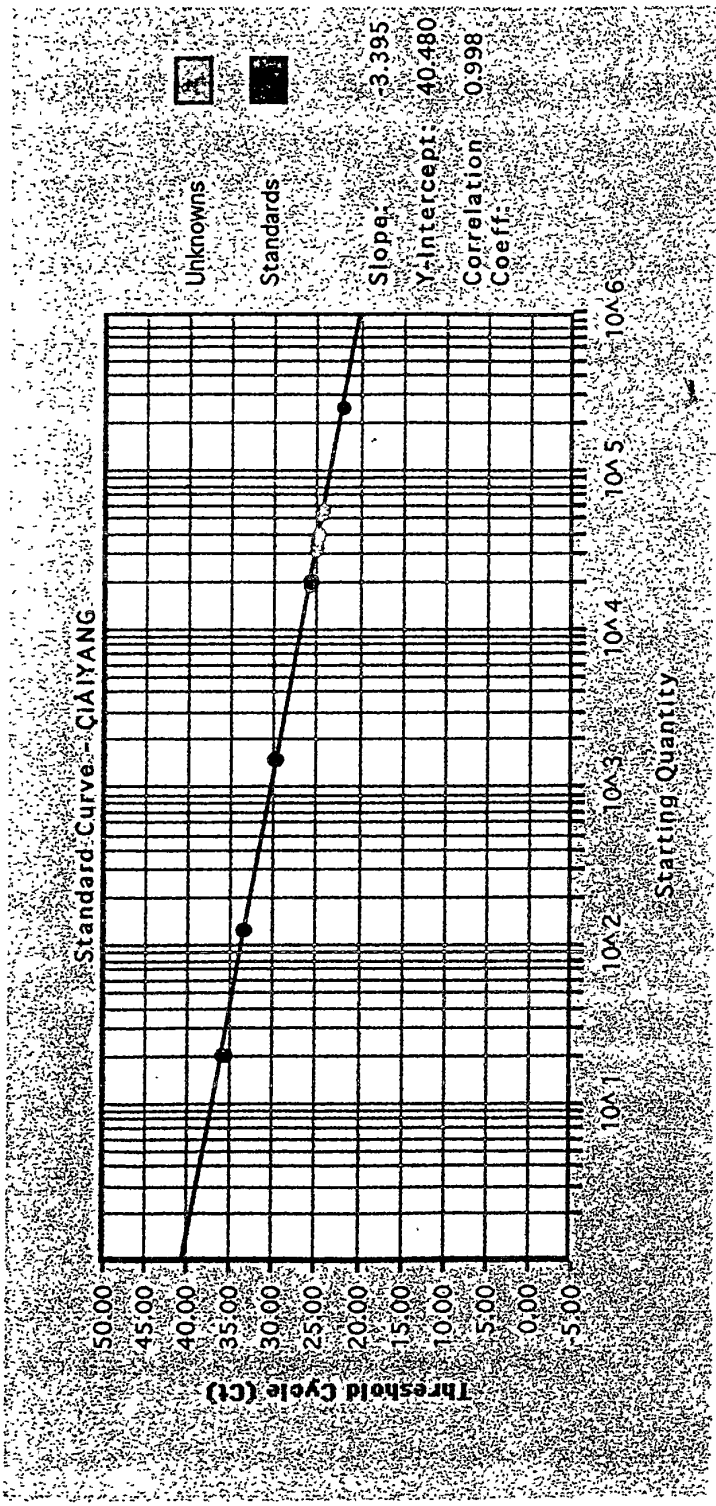


CV Report form B-1(th.line decision list)

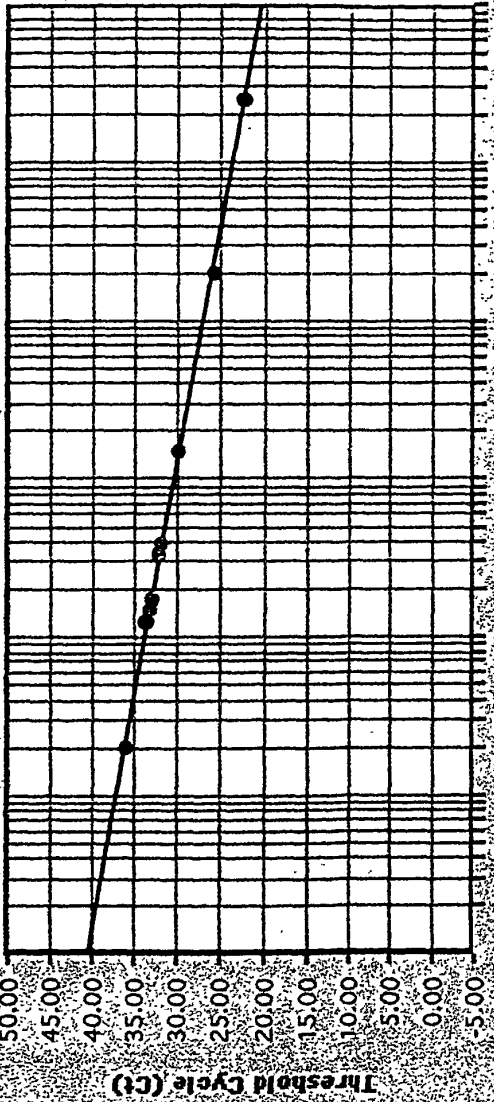
Company (Organization)		Remark									
Researcher											
Quantification date											
Plate-Run number											
Target		SSI/b									
m	2 <sup>m</sup>	Th. Linc	Corr	Slope	y-intercept	Amp Rate(Δ)	ΔΔ   (%)	ΔΔ   conditio	Remark	Adopted Th.Linc	
0	1	0.001	0.158	-1.300	22.900	5.88	58.54				
1	2	0.002	0.324	-2.585	31.189	2.44	5.63				
2	4	0.004	0.477	-2.765	34.188	2.30	18.08				
3	8	0.008	0.997	-3.636	38.825	1.88	2.05				
4	16	0.016	0.998	-3.523	39.198	1.92	1.73	2			
5	32	0.032	0.998	-3.433	39.735	1.96	0.75	2	*		
6	64	0.064	0.998	-3.395	40.480	1.97	1.64	2			
7	128	0.128	0.998	-3.480	41.788	1.94	1.88	2	*		
8	256	0.256	0.998	-3.583	43.269	1.90	#DIV/0!				
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!				
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!				
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!				
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!				

CV Report form B-1(th.line decision list)

Company (Organization)		Remark									
Researcher											
Quantification date											
Plate-Run number		1-1									
Target		CAMM M071 170									
m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	Amp. Rate(A)	ΔA  (%)	ΔA   condition	Remark	Adopted	
0	1	0.001	0.240	-1.598	24.022	4.22	35.69				
1	2	0.002	0.378	-2.304	28.592	2.72	32.61				
2	4	0.004	0.981	-3.808	36.387	1.83	4.49				
3	8	0.008	0.997	-3.550	36.533	1.91	1.24				
4	16	0.016	0.998	-3.484	37.135	1.94	1.05				
5	32	0.032	0.999	-3.430	37.895	1.96	0.69	1			
6	64	0.064	0.999	-3.395	38.718	1.97	0.46	1	*		
7	128	0.128	0.999	-3.372	39.620	1.98	0.20	1	*		
8	256	0.256	0.999	-3.362	40.642	1.98	0.10	1	*		
9	512	0.512	0.999	-3.357	41.902	1.99	0.18	1	*		
10	1024	1.024	0.999	-3.348	44.072	1.99	#DIV/0!				
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!				
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!				



Standard Curve: CIAIYANG



Unknowns

Standards

Slope: -3.362

Y-Intercept: 40.642

Correlation Coeff: 0.999

# PE Applied Biosystems

Sequence Detection Systems  
1.6.3

File Name: J - YANG

Plate Type: 7700 Single Reporter

User:

PCR Volume: 25

Date: 2002年7月30日(火)

Comments:

## Thermal Cycle Conditions

<u>Cycle</u>	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Repeat</u>	<u>Ramp Time</u>	<u>Auto Increment</u>
Hold	50.00	2:00		Auto	
Hold	95.00	10:00		Auto	
Cycle	95.00	0:30	40	Auto	
	59.00	1:00		Auto	

## Standard Curve

Slope: -3.39                      Threshold: 0.06  
 Intercept: 40.48                  Baseline Range: (3, 15)  
 Fit R: 1.00

## Sample Information

<u>Well</u>	<u>Type</u>	<u>Sample Name</u>	<u>Replicate</u>	<u>Ct</u>	<u>Quantity</u>	<u>Std. Dev.</u>	<u>Mean</u>
A1	NTC	ssl1b-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
A2	NTC	ssl1b-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
A3	NTC	ssl1b-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
A10	STND	ssl1b-1.5k	ssl1b-1.5k	30.03	1.5e+03	0.00	1500.00
A11	STND	ssl1b-1.5k	ssl1b-1.5k	29.79	1.5e+03	0.00	1500.00
A12	STND	ssl1b-1.5k	ssl1b-1.5k	30.03	1.5e+03	0.00	1500.00
A7	STND	ssl1b-125	ssl1b-125	33.33	1.2e+02	0.00	125.00
A8	STND	ssl1b-125	ssl1b-125	33.49	1.2e+02	0.00	125.00
A9	STND	ssl1b-125	ssl1b-125	33.52	1.2e+02	0.00	125.00
A4	STND	ssl1b-20	ssl1b-20	36.12	2.0e+01	0.00	20.00
A5	STND	ssl1b-20	ssl1b-20	35.55	2.0e+01	0.00	20.00
A6	STND	ssl1b-20	ssl1b-20	35.95	2.0e+01	0.00	20.00
B1	STND	ssl1b-20k	ssl1b-20k	25.73	2.0e+04	0.00	20000.00
B2	STND	ssl1b-20k	ssl1b-20k	25.75	2.0e+04	0.00	20000.00
B3	STND	ssl1b-20k	ssl1b-20k	25.95	2.0e+04	0.00	20000.00
B4	STND	ssl1b-250k	ssl1b-250k	22.09	2.5e+05	0.00	250000.0
B5	STND	ssl1b-250k	ssl1b-250k	22.08	2.5e+05	0.00	250000.0
B6	STND	ssl1b-250k	ssl1b-250k	22.04	2.5e+05	0.00	250000.0
C7	UNKN	ssl1b-b2	ssl1b-b2	25.12	3.3e+04	257.86	33113.75
C8	UNKN	ssl1b-b2	ssl1b-b2	25.14	3.3e+04	257.86	33113.75
C9	UNKN	ssl1b-b2	ssl1b-b2	25.14	3.3e+04	257.86	33113.75
C1	UNKN	ssl1b-Bt11-1	ssl1b-Bt11-1	25.04	3.5e+04	1688.36	33457.54
C2	UNKN	ssl1b-Bt11-1	ssl1b-Bt11-1	25.13	3.3e+04	1688.36	33457.54
C3	UNKN	ssl1b-Bt11-1	ssl1b-Bt11-1	25.19	3.2e+04	1688.36	33457.54
C4	UNKN	ssl1b-Bt11-2	ssl1b-Bt11-2	25.93	1.9e+04	547.50	19207.34

C5	UNKN	sslfb-Bt11-2	sslfb-Bt11-2	25.90	2.0e+04	547.50	19207.34
C6	UNKN	sslfb-Bt11-2	sslfb-Bt11-2	25.99	1.9e+04	547.50	19207.34
C10	UNKN	sslfb-d1	sslfb-d1	24.45	5.3e+04	1595.28	53766.29
C11	UNKN	sslfb-d1	sslfb-d1	24.44	5.3e+04	1595.28	53766.29
C12	UNKN	sslfb-d1	sslfb-d1	24.37	5.6e+04	1595.28	53766.29
B7	UNKN	sslfb-non-GM-a1	sslfb-non-GM-a1	25.24	3.1e+04	1169.46	32230.32
B8	UNKN	sslfb-non-GM-a1	sslfb-non-GM-a1	25.16	3.3e+04	1169.46	32230.32
B9	UNKN	sslfb-non-GM-a1	sslfb-non-GM-a1	25.13	3.3e+04	1169.46	32230.32
B10	UNKN	sslfb-non-GM-a2	sslfb-non-GM-a2	24.90	3.9e+04	472.85	38737.32
B11	UNKN	sslfb-non-GM-a2	sslfb-non-GM-a2	24.92	3.8e+04	472.85	38737.32
B12	UNKN	sslfb-non-GM-a2	sslfb-non-GM-a2	24.89	3.9e+04	472.85	38737.32

# PE Applied Biosystems

Sequence Detection Systems  
1.6.3

File Name: J - YANG

Plate Type: 7700 Single Reporter

User:

PCR Volume: 25

Date: 2002年7月30日 (火)

Comments:

---

## Thermal Cycle Conditions

<u>Cycle</u>	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Repeat</u>	<u>Ramp Time</u>	<u>Auto Increment</u>
Hold	50.00	2:00		Auto	
Hold	95.00	10:00		Auto	
Cycle	95.00	0:30	40	Auto	
	59.00	1:00		Auto	

---

## Standard Curve

Slope: -3.36                      Threshold: 0.26  
Intercept: 40.64                  Baseline Range: (3 , 15)  
Fit R: 1.00

---

## Sample Information

<u>Well</u>	<u>Type</u>	<u>Sample Name</u>	<u>Replicate</u>	<u>Ct</u>	<u>Quantity</u>	<u>Std. Dev.</u>	<u>Mean</u>
G10	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.17	1.5e+03	0.00	1500.00
G11	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.05	1.5e+03	0.00	1500.00
G12	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.09	1.5e+03	0.00	1500.00
G7	STND	mon-125	mon-125	33.87	1.2e+02	0.00	125.00
G8	STND	mon-125	mon-125	33.63	1.2e+02	0.00	125.00
G9	STND	mon-125	mon-125	33.73	1.2e+02	0.00	125.00
G4	STND	mon-20	mon-20	36.08	2.0e+01	0.00	20.00
G5	STND	mon-20	mon-20	36.22	2.0e+01	0.00	20.00
G6	STND	mon-20	mon-20	36.02	2.0e+01	0.00	20.00
H1	STND	mon-20k	mon-20k	26.04	2.0e+04	0.00	20000.00
H2	STND	mon-20k	mon-20k	26.06	2.0e+04	0.00	20000.00
H3	STND	mon-20k	mon-20k	26.06	2.0e+04	0.00	20000.00
H4	STND	mon-250k	mon-250k	22.42	2.5e+05	0.00	250000.0
H5	STND	mon-250k	mon-250k	22.50	2.5e+05	0.00	250000.0
H6	STND	mon-250k	mon-250k	22.56	2.5e+05	0.00	250000.0
H7	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	32.16	3.3e+02	32.16	344.27
H8	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	31.97	3.8e+02	32.16	344.27
H9	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	32.22	3.2e+02	32.16	344.27
H10	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.36	1.5e+02	15.27	163.65
H11	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.10	1.7e+02	15.27	163.65
H12	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.14	1.7e+02	15.27	163.65
G1	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
G2	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
G3	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00



C5	UNKN	ssl1b-Bt11-2	ssl1b-Bt11-2	25.90	2.0e+04	547.50	19207.34
C6	UNKN	ssl1b-Bt11-2	ssl1b-Bt11-2	25.99	1.9e+04	547.50	<b>19207.34</b>
C10	UNKN	ssl1b-d1	ssl1b-d1	24.45	5.3e+04	1595.28	53766.29
C11	UNKN	ssl1b-d1	ssl1b-d1	24.44	5.3e+04	1595.28	53766.29
C12	UNKN	ssl1b-d1	ssl1b-d1	24.37	5.6e+04	1595.28	53766.29
B7	UNKN	ssl1b-non-GM-a1	ssl1b-non-GM-a1	25.24	3.1e+04	1169.46	32230.32
B8	UNKN	ssl1b-non-GM-a1	ssl1b-non-GM-a1	25.16	3.3e+04	1169.46	32230.32
B9	UNKN	ssl1b-non-GM-a1	ssl1b-non-GM-a1	25.13	3.3e+04	1169.46	32230.32
B10	UNKN	ssl1b-non-GM-a2	ssl1b-non-GM-a2	24.90	3.9e+04	472.85	38737.32
B11	UNKN	ssl1b-non-GM-a2	ssl1b-non-GM-a2	24.92	3.8e+04	472.85	38737.32
B12	UNKN	ssl1b-non-GM-a2	ssl1b-non-GM-a2	24.89	3.9e+04	472.85	38737.32

# PE Applied Biosystems

Sequence Detection Systems  
1.6.3

File Name: J-YANG

Plate Type: 7700 Single Reporter

User:

PCR Volume: 25

Date: 2002年7月30日 (火)

Comments:

## Thermal Cycle Conditions

<u>Cycle</u>	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Repeat</u>	<u>Ramp Time</u>	<u>Auto Increment</u>
Hold	50.00	2:00		Auto	
Hold	95.00	10:00		Auto	
Cycle	95.00	0:30	40	Auto	
	59.00	1:00		Auto	

## Standard Curve

Slope: -3.36

Threshold: 0.26

Intercept: 40.64

Baseline Range: (3, 15)

Fit R: 1.00

## Sample Information

<u>Well</u>	<u>Type</u>	<u>Sample Name</u>	<u>Replicate</u>	<u>Ct</u>	<u>Quantity</u>	<u>Std. Dev.</u>	<u>Mean</u>
G10	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.17	1.5e+03	0.00	1500.00
G11	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.05	1.5e+03	0.00	1500.00
G12	STND	mon-1.5k	mon-1.5k	30.09	1.5e+03	0.00	1500.00
G7	STND	mon-125	mon-125	33.87	1.2e+02	0.00	125.00
G8	STND	mon-125	mon-125	33.63	1.2e+02	0.00	125.00
G9	STND	mon-125	mon-125	33.73	1.2e+02	0.00	125.00
G4	STND	mon-20	mon-20	36.08	2.0e+01	0.00	20.00
G5	STND	mon-20	mon-20	36.22	2.0e+01	0.00	20.00
G6	STND	mon-20	mon-20	36.02	2.0e+01	0.00	20.00
H1	STND	mon-20k	mon-20k	26.04	2.0e+04	0.00	20000.00
H2	STND	mon-20k	mon-20k	26.06	2.0e+04	0.00	20000.00
H3	STND	mon-20k	mon-20k	26.06	2.0e+04	0.00	20000.00
H4	STND	mon-250k	mon-250k	22.42	2.5e+05	0.00	250000.00
H5	STND	mon-250k	mon-250k	22.50	2.5e+05	0.00	250000.00
H6	STND	mon-250k	mon-250k	22.56	2.5e+05	0.00	250000.00
H7	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	32.16	3.3e+02	32.16	344.27
H8	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	31.97	3.8e+02	32.16	344.27
H9	UNKN	mon-Bt11-1	mon-Bt11-1	32.22	3.2e+02	32.16	344.27
H10	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.36	1.5e+02	15.27	163.65
H11	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.10	1.7e+02	15.27	163.65
H12	UNKN	mon-Bt11-2	mon-Bt11-2	33.14	1.7e+02	15.27	163.65
G1	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
G2	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
G3	NTC	mon-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00

附件三

JAS 分析試験ハンドブック

遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

改訂第2版

平成14年 6月20日



独立行政法人 農林水産消費技術センター

はじめに

遺伝子組換え農産物含有可能食品について、遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成12年3月31日農林水産省告示第517号）に基づき、表示の義務化が平成13年4月から行われることとなった。表示は分別生産流通管理（IPハンドリング）に基づいて行われるが、IPハンドリングが正しく行われているかどうかの目安として、独立行政法人 農林水産消費技術センターにおいて、遺伝子組換え食品の表示の遵守点検を行うこととなる。本マニュアルは、この検査分析方法の標準化のために作成したものである。

本マニュアルは、分析試料取り扱い編、基本操作編、個別品目編（定性試験用）、分析試薬調製編、コンタミネーション防止編、定量的PCR編の6編よりなる。遺伝子組換え食品の検査・分析に当たっては、マニュアルに記載された事項を遵守して行うこと。

遺伝子組換え食品の品質表示は、その適用範囲が非常に広い。また、品質表示基準は新たな組換え体等に対応するため、毎年見直しが行われる。

また、遺伝子関連技術は、日進月歩の状態であり、本マニュアルに記載してある遺伝子組換え食品の分析方法についても、分析技術の向上と品質表示基準の見直しに対応するため、常に見直しをしておく必要がある。このため、遺伝子組換え食品の検査・分析に当たっては、マニュアルの改訂履歴を参照し、最新版を用いて行う。

（平成14年4月1日作成、平成14年6月20日最終改訂）

遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂履歴

版	改訂年月日	改訂理由及び内容	承認	審査	作成
0	平成 13年 4月 1日	新規 <ul style="list-style-type: none"> <li>・分析試料取り扱い編</li> <li>・基本操作編</li> <li>・個別品目編</li> <li>・分析試薬調製編</li> <li>・コンタミネーション防止編</li> <li>・定量的 PCR 編</li> </ul>			
1	平成 13年 5月 25日	内標比（別表 1）の追加 <ul style="list-style-type: none"> <li>・定量的 PCR 編</li> </ul>			
2	平成 14年 6月 20日	全編改訂 文言の修正及び統一を行った。 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第 7 条第 1 項及び生鮮食品品質表示基準第 7 条第 1 項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 517 号）における義務表示対象品目に、ジャガイモ加工食品が追加されたことに伴う分析法の追加を行った。 各編における変更は以下のとおり。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・分析試料取り扱い編                              市販品検査時の買い上げ点数の追加した。                              抽出法追加に伴う野帳記入要領を変更した。</li> <li>・基本操作編                              章立ての変更を行った。（試験の概要、出典、適用の範囲、装置、試薬、操作、純度、記録、備考）                              抽出法にスピнкаラム及びイオン交換カラムを使用する方法を追加した。                              ジャガイモ加工食品からの組換え体検知法を記載した。                              PCR に、独立行政法人食品総合研究所を中心に開発された方法を採用し、記載した。                              ジャガイモ用のプライマーを記載した。</li> <li>・個別品目編                              前処理法が、定量試験と混同することのないように編題を「個別品目編（定性試験用）」とした。                              適用範囲、使用機器を記載した。                              ジャガイモ加工食品の前処理法を記載した。                              抽出法の追加に伴うサンプル採取量を記載した。</li> <li>・分析試薬調製編                              プライマーの使用方法を、詳しく記載した。</li> <li>・定量的 PCR 編                              章立ての変更を行った。（試験の概要、出典、適用の範囲、装置、試薬、操作、反応の解析、測定のやり直し、定量下限、記録、備考）                              定量的 PCR に適した DNA の抽出法について記載した。</li> </ul>			

JAS 分析試験ハンドブック

# 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

改訂第2版

基本操作編 Ⅰ

平成14年 6月20日



独立行政法人 農林水産消費技術センター

i) はじめに

遺伝子組換え農産物含有可能食品について、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）の遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成12年3月31日農林水産省告示第517号）に基づき、表示の義務化が平成13年4月から導入されることとなった。表示は分別生産流通管理（IP ハンドリング）に基づいて行われるが、IP ハンドリングが正しく行われているかどうかの目安として、農林水産消費技術センターにおいて、遺伝子組換え食品の表示の遵守点検を行うこととなる。本マニュアルは、この検査分析方法の標準化のために作成したものである。

試験は、PCR 法による組換え遺伝子の定性検出法による。本編では、遺伝子組換え食品分析のための試験法を示してある。

試験の流れを下に示し、これに沿って記述していく。

1. 試料の買い上げ、整理  
↓
2. 試料の前処理及びサンプリング  
↓
3. DNA 抽出  
↓
4. PCR 増幅及びゲル電気泳動  
↓
5. 結果の判定

ii) 試験における一般事項

PCR では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので目的外の DNA（特に PCR 産物）の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面等から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。そのため、本マニュアルのコンタミネーション防止編を参照し、適切な操作を行うが、特に次のような配慮も必要である。

（1）溶液類は、熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は、電気伝導率 0.0056 mS/m (25℃以下になるように脱イオン化されたものを用い、滅菌水は、純水を 121℃、15分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

（2）チップやチューブ類は必ず使い捨てとし、洗ったものを再使用しない。

（3）マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 mL と 0.2 mL 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌をし、その後、乾燥器に入れ完全に乾かしてから用いる。あるいは、可能なものについては乾熱滅菌を行う。

（4）DNA を操作するときは、必要に応じてクリーンベンチを使用するとともに、実験台上をエタノールで消毒し、必ずゴム手袋をはめ、作業中も頻繁にエタノールで消毒すること。ゴム手袋はパウダーなしのものを用いるか、パウダーを洗い落としてから使用する。

（5）滅菌水や TE 緩衝液に DNase が混入すると被害が広がるので、この2つの溶液は実験者ごとに別々に作製し、頻繁に（少なくとも月に一回程度）作り直す。

iii) 試薬の管理

遺伝子関連の実験では、強力な変異原性物質等を用いる場合もあるので、試薬や廃液の管理をしっかり行う必要がある。試薬管理マニュアル及び試薬調製編を参照し適切な管理を行うこと。

### 1 試料の買い上げ、整理

市販品は本マニュアル分析試料取り扱い編に従う。  
市販品は、通常、一商品につき3点の買い上げを行う。

### 2 試料の前処理及びサンプリング

本マニュアル個別品目編による。

### 3 DNA 抽出

抽出は、買い上げた1点の試料につき1点とする。すなわち買い上げ点数だけ抽出が行われる。  
シリカスピンカラムを使用した方法、イオン交換カラムを使用した方法又は、CTAB を使用した方法により DNA を抽出する。PCR に適した DNA の抽出ができ、また、環境保全や実験従事者の健康面を考慮し、シリカスピンカラム又はイオン交換樹脂カラムを使用する方法が望ましい。以下に、シリカスピンカラムを使用した方法として QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit、イオン交換樹脂カラムとして QIAGEN 社 Genomic tip 20/G を使用した方法を示す。DNeasy Plant Maxi kit 及び Genomic-tip 20/G に限定するものではなく、手順についても、これに限定するものではない。しかし、同程度の品質(注1)の DNA が抽出できることを確認した上で試験を行わなければならない。

#### 準備

使用器具は必ず滅菌して用いる。

操作にあたっては、ゴム手袋を使用する等コンタミネーションに注意すること。

### 3. 1 DNeasy Plant Maxikit による DNA の抽出

#### 3. 1. 1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を高塩濃度緩衝液によりシリカゲルに吸着させ、低濃度緩衝液又は滅菌水を用いて溶出する。

#### 3. 1. 2 出典

Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Quantification Methods using Novel Reference Molecules for Detection of Genetically Modified Maize and Soybean. *Journal of AOAC International* (in press) で用いられた DNA の抽出方法と同一である。

#### 3. 1. 3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

#### 3. 1. 4 装置

スイング式遠心機：50 mL のポリプロピレンチューブを 3,000xg で遠心可能なもの。

冷却遠心機：2 mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる。(注2)

恒温水槽

試験管ミキサー

#### 3. 1. 5 試薬

QIAGEN 社 DNeasy Plant Maxi kit



### 3. 1. 6 抽出操作

#### 3. 1. 6. 1 DNeasyPlant Maxi kit による DNA の抽出 A

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、10-100  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、20  $\mu\text{L}$  の RNase (kit 添付品及び、1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、10 mL の AP1 buffer (65  $^{\circ}\text{C}$ ) を直接添加し、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (2) 65  $^{\circ}\text{C}$  の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (3) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で、室温で 10 分間遠心分離する。
- (4) 1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 7 mL 採取し、新しい 15 mL 容チューブに移す。
- (5) チューブに、1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、2.5 mL の AP2 buffer を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で室温で 35 分間遠心分離する。
- (7) 1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 8 mL 採取し、QIAshredderspin column (lilac) に負荷する。
- (8) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で、室温で 5 分間遠心分離する。
- (9) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、上清を 7.5 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (10) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、6.8 mL を採取し新しい 50 mL チューブに移す。
- (11) 1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、10.2 mL の AP3/Et-OH buffer を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column (colorless) に負荷する。
- (12) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で室温で 15 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。
- (13) 1,000-5,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、カラムに 12 mL の AW buffer を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で室温で 15 分間遠心分離する。
- (14) カラムを新しい 50 mL チューブに移し、100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、カラムに温めておいた 1 mL 滅菌水 (65  $^{\circ}\text{C}$ ) を加える。
- (15) 5 分間室温で静置後、スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times\text{g}$  で室温で 10 分間遠心分離する。
- (16) 100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、溶出液の液量を測り、2 mL のサンプルチューブに移す。100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。
- (17) 上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (18) 遠心分離器を使用し、12,000 $\times\text{g}$  で、4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間遠心分離後、100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (19) 100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、500  $\mu\text{L}$  の 70%エタノールを添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。
- (20) 遠心分離器を使用し、12,000 $\times\text{g}$  で、4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 分間遠心分離後、100-1,000  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペット又は 10-100  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (21) 10-100  $\mu\text{L}$  容のマイクロピペットを用いて、100  $\mu\text{L}$  の TE (pH 8.0)緩衝液を加え沈殿物を溶解させる。(備考参照)
- (22) 指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し最後に一晩 (12-24 時間) 冷蔵庫に静置する。

- (23) 目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×g で、4 °C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20 °C 以下で保存すること。

### 3. 1. 6. 2 DNeasyPlant Maxi kit による DNA の抽出 B

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、0.5-10 µL 容のマイクロピペットを用いて、10 µL の RNase (kit 添付品及び、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、5 mL の AP1buffer (65 °C) を直接添加し、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (2) 65 °C の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (3) チューブに、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、1.8 mL の AP2 buffer を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 15 分間遠心分離する。
- (5) 1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 4.2 mL 採取し、QIAshredderspin column (ilac) に負荷する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で、室温で 5 分間遠心分離する。
- (7) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、上清を 4 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (8) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、3.4 mL を採取し新しい 50 mL チューブに移す。
- (9) 1,000-5,000 µL 容のマイクロピペットを用いて、5.1 mL の AP3/Et-OH buffer を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌する。デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column (colorless) に負荷する。
- (10) スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g で室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。  
以下の操作 (11) ~ (21) については、「3. 1. 6. 1 DNA の抽出 A」の(13)~(23)とそれぞれ読みかえ、操作する。

### 3. 1. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

抽出後の DNA 溶液は、0.5-10 µL 容のマイクロピペットを用いて、5 µL を採り、TE 緩衝液を加えて 50 µL にし 200 ~ 300 nm の範囲で紫外吸光スペクトルを測定し、230, 260 及び 280 nm の吸光度を測定する (注 3) (注 4)。1 O.D. 260nm を 50 ng/µL DNA 溶液 (注 5) として DNA 濃度を算出し、滅菌水により PCR 用の溶液 (10 ng/µL) を調製する。濃度が薄い場合は再度抽出を行う。再抽出した DNA も濃度が薄い場合には、そのまま用いる。

### 3. 1. 8 抽出される DNA の純度

本法により、ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、O.D.260 nm/ O.D.280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 程度になる。

### 3. 1. 9 記録

希釈倍率と吸光度値及び吸光度の比を記録する。また、PCR 用 DNA 溶液を得るために特別に行った操作があれば、詳細に記録すること。

### 3. 1. 10 備考

「3. 1. 6. 1 DNA の抽出A」の操作 (21) は、抽出される DNA 量によって、適宜、希釈量を変更する。ダイズ種子においては TE 100  $\mu$ L、トウモロコシ及びトウモロコシ加工食品においては、TE50 $\mu$ L で行うと良い。

PCRに必要な濃度の DNA 溶液が得られなかった場合は、以下の対策を行う。

- ① 得られた DNA 溶液を、エタノール沈殿等を行い濃縮する。
- ② 最初から DNA 抽出をやり直し、「3. 1. 6. 1 DNA の抽出A」の操作 (21) で、DNA の融解に用いる TE を 20  $\mu$ L にする。

それでも、PCR に必要な濃度の DNA 溶液が得られない場合は、最終的な DNA 溶液を PCR 用 DNA 溶液とする。その場合は、PCR 用 DNA 溶液の DNA 量を記録すること。

(注1) 同程度の品質とは、抽出した DNA 溶液の O.D.260 nm/O.D.230nm 比だけでなく、個別品目編に記載した多くの品目に対し、PCR に適した DNA の抽出ができることをいう。さらに、当センターでは、当該農産物から DNA を抽出し、定量 PCR 編に基づき内在性遺伝子の定量を行い、比較することにより確認している。

(注2) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注3) DNA は、230nm で吸収極小を示し、260nm で吸収極大を示す。また、タンパク質等不純物は、280nm 付近に吸収を示す。

(注4) 抽出される DNA 量によって、適宜、希釈量を変更する。

(注5) Sambrook, J., Russel, D. W. "Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd Ed. (volume 3)", Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, A8.20. (ISBN 0-87969-577-3(pbk), ISBN 0-87969-576-5 (cloth))

## 3. 2 QIAGENGenomic-tip20/G による DNA の抽出

### 3. 2. 1 試験の概要

抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を低塩濃度緩衝液によりイオン交換樹脂カラムに吸着させ、高濃度緩衝液を用いて溶出する。

### 3. 2. 2 出典

製品添付のプロトコールを「組換え DNA 技術応用食品の検査法について」(厚生労働省食発第 110 号平成 13 年 3 月 27 日及び厚生労働省食発第 158 号平成 13 年 5 月 25 日)を参考に、改変している。

### 3. 2. 3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

### 3. 2. 4 装置

スイング式冷却遠心機：50mL のポリプロピレンチューブを 3,000xg で遠心可能なもの。

冷却遠心機：2mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000 $\mu$ L 容等を用いる。(注1)

恒温水槽

試験管ミキサー

### 3. 2. 5 試薬

イオン交換樹脂カラム：QIAGEN 社 QIAGENGenomic-tip 20/G (Cat. No. 10223)

RNase A : QIAGEN 社 RNase A (Cat. No. 19101)

Proteinase K : QIAGEN 社 QIAGEN Proteinase K (Cat. No. 19131 又は 19133)

G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液 (注 2)

3. 2. 6 抽出操作 : QIAGEN Genomic-tip20/G による DNA の抽出

- (1) 試料適量を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、1,000-5,000 $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて 7.5 mL の G2 緩衝液、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、200  $\mu$ L の QIAGEN Proteinase K 及び、10-100  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、20  $\mu$ L の RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (3) 50  $^{\circ}$ C の恒温水槽中で 1 時間保温する。(15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 $\times$ g で 4  $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離する。
- (5) 15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。
- (6) チューブをフラッシュ遠心する。
- (7) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (8) 100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (9) tip に、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。
- (10) (9) のカラムの洗浄操作を、さらに 2 回行う。
- (11) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、750  $\mu$ L の QF 緩衝液(50  $^{\circ}$ C を加え、DNA を溶出する (溶出 1))。
- (12) tip を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、750  $\mu$ L の QF 緩衝液(50  $^{\circ}$ C)を加え、DNA を溶出する。(溶出 2)
- (13) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、等量のイソプロパノールをそれぞれ添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (14) 遠心分離器(アングルロータ)を使用し、12,000 $\times$ g で、4  $^{\circ}$ C、15 分間遠心分離後、200-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (15) 100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、1,000  $\mu$ L の 70%エタノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。
- (16) 遠心分離器 (アングルロータ) を使用し、12,000 $\times$ g で、4  $^{\circ}$ C、3 分間遠心分離し、100-1,000  $\mu$ L 容のマイクロピペット又は 10-100  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (17) 10-100  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブに 50  $\mu$ L の TE (pH 8.0)を加え、沈殿物を 65  $^{\circ}$ C で 15 分間振とう溶解させる。
- (18) 10-100  $\mu$ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブの液を全量、溶出 1 のチューブに入れ、DNA を 65  $^{\circ}$ C で 15 分間振とう溶解する。
- (19) 指先でチューブをばじき、(12-24 時間) 冷蔵庫に静置する。

(20) 目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×g で、4 °C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 抽出溶液とする。なお、沈殿も、-20 °C 以下で保存すること。

### 3. 2. 7 抽出 DNA の確認及び抽出 DNA 量の計算

3. 1. 7 に同じ。

### 3. 2. 8 抽出される DNA の純度

本法により、ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、O.D.260 nm/ O.D.280 nm 比が 1.7～2.0 程度になる。

### 3. 2. 9 記録

3. 1. 9 に同じ。

### 3. 2. 10 備考

3. 1. 10 に同じ。但し、「3. 1. 6. 1 DNA の抽出 A」の操作 (21) は、「操作(17)」に読みかえる。

(注 1) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。

(注 2) 製品添付のプロトコールに従い作製する。Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Cat. No. 13323)又は、Genomic DNA bufferset(Cat.No.19060)を購入しても良い。

## 3. 3 CTAB を用いた DNA の抽出

### 3. 3. 1 試験の概要

抽出緩衝液中に試料を溶解し、夾雑物及びタンパク質の除去、RNase 処理を行い、DNA を抽出する。CTAB を溶出液とすることで、多糖類等が抽出されるのを避けている。

### 3. 3. 2 出典

Murray, M.G., Thompson, W., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA., Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325(1980)を一部改変している。

### 3. 3. 3 適用範囲

個別品目編を参照のこと。

### 3. 3. 4 装置

冷却遠心機：2mL マイクロチューブが遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5-10 µL、10-100 µL、100-1,000 µL、1,000-5,000µL 容等を用いる（注 1）。

恒温水槽

試験管ミキサー

### 3. 3. 5 試薬

試薬調製編を参照のこと。

### 3. 3. 6 抽出操作

#### (1) 試料の溶解

試料適量を乳鉢に採取(注2)(注3)し、石英砂少々、CTAB抽出液2 mLを加え、磨砕して、1.5 mLチューブへ移す(注4:プロテイナーゼ処理)。

60℃、30分間インキュベートした後、14,000rpm、3分間遠心分離(注5)する。

上清約700 μLを採取して、新しいチューブへ移す。

#### (2) PCI除タンパク処理

試料溶液に等量のPCIを加え、2分間激しく振り、14,000rpm、15分間遠心分離(注6)する。

上層を新しいチューブに採取する。

#### (3) CIA処理

試料溶液に等量のCIAを加え、2分間激しく振り(注7)、14,000rpm、3分間遠心分離する。

上層を新しいチューブに採取する。

#### (4) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え(注8)、30秒間チューブを転倒混和した後、12,000rpm、3分間遠心分離(注9)する。

上清を捨てる。

アルコール洗浄:70%エタノール800 μLを加え、転倒混和し、3分間静置した後、12,000rpm、3分間遠心分離する。

上清を捨て(注10)、5分間真空乾燥(注11)する。

#### (5) DNAの溶解とRNAの除去

TE100 μL、RNase A(10mg/mL)2 μLを加え、DNAを溶解する。

室温又は37℃で30min静置し、400 μLのCTAB抽出液を加える。

#### (6) 再CIA処理

500 μLのCIAを加えて軽く混和する。12,000rpm、15分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

#### (7) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え(注7)、30秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、12,000rpm、3分間遠心分離(注8)する。

上清を捨て(注10)、5分間減圧乾燥(注11)する。

#### (8) DNAの溶解

滅菌水100 μLを加え、DNAを溶解する(DNA溶液)。溶液は小分けして-20℃以下で凍結保存する(注12)(注13)。

### 3. 3. 7 抽出DNAの確認及び抽出DNA量の計算

3. 1. 7に同じ。

### 3. 3. 8 抽出されるDNAの純度

ダイズ種子及びトウモロコシ種子においては、OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>比が1.8~2.0程度になる。

### 3. 3. 9 記録

3. 1. 9に同じ。また、「3. 3. 6 抽出操作」時の下記の点も記録する。

(2) PCI除タンパク処理のチューブの様子

(4) アルコール沈殿の試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、遠心分離し、上清を捨てたときの沈殿の様子

### 3. 3. 10 備考

なし。

- (注1) マイクロピペットは、一例を示している。抽出操作においても同様である。
- (注2) 試料は秤量採取するが、あまり多すぎるとフェノール除タンパク処理の時に中間層が多くなり、後の操作が困難になる。
- (注3) 薬包紙の代わりに滅菌した乳鉢を包んでいたアルミ箔を使うと良い。試料を採取するときは、滅菌した葉さじを使用する。素手で触らない。
- (注4) プロテイナーゼ処理：あらかじめタンパク質が多く PCI 処理で中間層が多くなることが予想される試料については、プロテイナーゼ K (20 mg/mL) 溶液を各チューブあたり 20  $\mu$ L 程度加えると中間層を減らすことができる。
- (注5) 遠心機は Centrifuge5417R(Eppendorf 社製) の場合を想定。約 16,000 $\times$ g。一般には、最大遠心でよい。
- (注6) このとき、チューブの様子をノートに記録すること。ピペット操作は、中間層を吸い込まないように気をつける。また、処理がうまくいかないときは遠心分離をやり直すか、もう一度 PCI 除タンパク処理をする。遠心分離はすべて室温で行う。低温で行うと、CTAB が沈殿して失敗する。
- (注7) 水層からフェノールを除くための操作。
- (注8) DNA を沈殿させるわけだが、試料溶液の塩濃度や糖類の量によって条件が変わることもある。
- (注9) 約 13,000 $\times$ g。
- (注10) 上清を採取してから、フラッシュ遠心 (5,000 ~ 12,000rpm、数秒) をかけて、再度上清を採取すると、きれいに液を除くことができる。このとき沈殿がゲル状の場合には、アルコール洗浄を繰り返すと、ある程度改善される。
- (注11) 遠心濃縮機又は小型のデシケーターを使う。乾燥の具合は目視で確認する。
- (注12) DNA の溶解には TE を用いてもよいが、TE に含まれる EDTA が PCR バッファー中のマグネシウムイオンを捕捉して PCR 反応に影響を与える可能性があるため、ここでは滅菌水を用いる。
- (注13) 凍結・融解を繰り返さないよう小分けして保存し、使い捨てとするのがよい。

## 4 PCR 増幅及びゲル電気泳動

### 4. 1 試験の概要

抽出 DNA を鋳型とし、DNA ポリメラーゼ、遺伝子組換え体に特異的なプライマー対を用い、PCR を行う。その後、電気泳動、紫外線照射下での可視化を行い、予想される長さの PCR 産物が得られるか否かにより、試料中に遺伝子組換え体が含まれていたかを判定する。同時に、抽出した DNA が PCR 増幅に適していることを確認するために、各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、目的の PCR 産物が得られることを確認する。

#### ※エチジウムブロミドについて

この試薬は、2本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な変異原性がある。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。廃液は、必ず処理した後に捨てること。

#### ※エチジウムブロミドの処理

エチジウムブロミド処理用の器具が市販されているので、それを利用する。高濃度の場合は、処理に出すこと。

#### 4. 2 出典

PCR、ダイズ及びトウモロコシのプライマーについては、Kurbara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A. Quantification Methods using Novel Reference Molecules for Detection of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International (in press)による。ジャガイモのプライマーについては、「組換え DNA 技術応用食品の検査法について」(厚生労働省食発第 110 号平成 13 年 3 月 27 日及び厚生労働省食発第 158 号平成 13 年 5 月 25 日)による。電気泳動操作については、製品添付のプロトコールによる。

#### 4. 3 適用範囲

ダイズについては、遺伝子組換えダイズ RoundupReady Soy (40-3-2 系統) の特異的検知

トウモロコシについては、遺伝子組換えトウモロコシ Bt11, Event176, T25, MON810 及び GA21 の 5 系統の特異的検知又は、スクリーニング

ジャガイモについては、遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf (Bt6 系統及び SPBT02-05 系統) 及び NewLeafPlus(RBMT21-129 系統, RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統) の特異的検知

なお、トウモロコシのスクリーニングについては、Cauliflower mosaic virus の 35S promoter を検知している。したがって、同記列を含む他の農産物とトウモロコシを混合して原材料とする加工食品には適用できない。

#### 4. 4 装置

##### 4. 4. 1 PCR

サーマルサイクラー: MJResearch 社 PTC-200 DNA Engine, 宝酒造(株)製 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applied Biosystems 社 GeneAmp system 9700 (昇温モード: MAX)、又はこれらの機器を用いて行った PCR の結果と同等であるもの。

マイクロピペット: 0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる(注 1)。

##### 4. 4. 2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動装置: ミューピッド II 電気泳動装置(株式会社アドバンス製)又は、同等品。

ゲルメーカー: 電気泳動装置指定品。

トランスイルミネータ

写真撮影装置

マイクロピペット: 0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L、1,000-5,000  $\mu$ L 容等を用いる(注 1)。

#### 4. 5 試薬

##### 4. 5. 1 PCR

DNA ポリメラーゼ: AmpliTaq<sup>TM</sup> Gold (Applied Biosystems 社)又は、同等品。

デオキシヌクレオシド三リン酸溶液: dNTP(2mmol/Each)AmpliTaq<sup>TM</sup> Gold 添付品。

塩化マグネシウム溶液: MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) AmpliTaq<sup>TM</sup> Gold 添付品。

PCR用緩衝液: 10 x PCR bufferII

プライマー対: 表 4-1 (1)-(3)に示した検知対象に応じて、既製のプライマーを購入するか、合成する。既製のプライマー又はプライマー対については、(株)ニッポンジーン又は(株)ファス



マックより購入する。増幅長については、表 4. 1 (1)-(3)に示す。通常は、以下に示すプライマー又はプライマー対を購入すればよい。

《ダイズ用プライマー対》

- ・ 内在性遺伝子(*LeI*)検知用：(株)ニッポンジーン(#313-05501)又は、(株)ファスマック(#S1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ RRSspecific 検知用：同(#310-05511)又は、同(#S2-1M)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシ(スクリーニング用)プライマー対》

- ・ 内在性遺伝子(*SSI/b*)検知用：同(#315-05441)又は、同(#M1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ CaMV 35S promoter 検知用：同(#317-05521)又は、同(#C1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ GA21 specific 検知用： 同(#312-05451)又は、同(#M2-1M)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシ(系統用)プライマー対》

- ・ 内在性(*SSI/b*)遺伝子検知用：同(#315-05441)又は、同(#M1-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ GA21 specific 検知用： 同(#312-05451)又は、同(#M2-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ Bt11 specific 検知用： 同(#319-05461)又は、同(#M3-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ Event176specific 検知用： 同(#316-05471)又は、同(#M4-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ T25specific 検知用： 同(#313-05481)又は、同(#M5-1M)、若しくは同バルク品。
- ・ MON810 specific 検知用： 同(#310-05491)又は、同(#M6-1M)、若しくは同バルク品。

《ジャガイモ用プライマー》(注2)

- ・ 内在性遺伝子検知用 (Pss 定性用)：(株)ニッポンジーン(#316-05231)又は、(株)ファスマック(#G5-1)、又は同バルク品、若しくは、合成品。
- ・ NewLeafspecific 検知用：
- ・ NewLeaf Plus specific 検知用：同(#312-05191)又は、同(#G1-1)、又は同バルク品、若しくは、合成品。

標準プラスミド溶液(注3)：(株)ニッポンジーン又は(株)ファスマックより購入する。

《ダイズ用標準プラスミド》

- ・ GM ダイズ (RRS)陽性コントロールプラスミド：(株)ニッポンジーン(#311-04941)又は、(株)ファスマック(#PS-1)、若しくは同バルク品。

《トウモロコシ用標準プラスミド》

- ・ GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド：同(#314-04811)又は、同(#PM-1)、若しくは同バルク品。

《ジャガイモ用標準プラスミド》(注2)

- ・ GM ジャガイモ (NewLeaf Plus)陽性コントロールプラスミド：同(#311-05301)又は、同(#PP-1)、若しくは同バルク品。

#### 4. 5. 2 ゲル電気泳動

アガロースゲル

TBE 又は、TAE 緩衝液

エチジウムブロミド

ゲルローディング緩衝液 (ブルージュース)

DNA 分子量マーカー：PCR 産物の増幅長に適したマーカーを使用する。100 bp ラダーマーカー等が適当である。

#### 4. 6 操作

##### 4. 6. 1 PCR 操作

###### 準備

使用するチューブ、チップは使い捨てとし、使用する間近に 121 °C、15 分以上オートクレーブ滅菌しておくこと。

操作に当たっては、専用のゴム手袋を着用すること。

操作は氷上で行う。

###### (1) 必要な PCR チューブの本数

PCR は、抽出後の DNA 溶液 1 点につき 1 本ずつ行う。抽出した DNA で PCR 増幅ができることを確認するために、必ず各農産物に対応する内在性遺伝子検知用プライマー対を用いた PCR を行い、予想される長さの PCR 産物が得られることを確認する。その他、内在性遺伝子検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注 4）と、各農産物に対応した標準プラスミドを使用したポジティブコントロールを用意する（注 5）。組換え体検知用プライマー対を使用するときは、DNA を含まないネガティブコントロール（注 4）を用意する。さらに、各 PCR 装置一回の反応につき、標準プラスミドを鋳型として、プライマー対を含まないネガティブコントロールを一本以上用意する（注 6）（注 7）。

###### (2) マスターミックスの調製

PCR 反応液の組成は「表 4.2 PCR 反応液の組成」に定める。プライマー対以外を先に混合した後、プライマー対を混合する。PCR を行う試料数にあわせて、滅菌した 0.2 mL チューブを用意する。この本数にあわせ、全体の使用液量を決め（注 8）、表の液量と比較して適当な倍率になるように、鋳型 DNA を除く各液を混合調製する。これを反応チューブに各 22.5  $\mu$ L 分取する。

プライマー対なしのネガティブコントロールについては、別にプライマー対を含まないマスターミックスを用意する。なお、マイクロピペットの最小容量に注意すること。

###### (3) 試料の添加

分取したマスターミックスに鋳型 DNA 溶液 2.5  $\mu$ L を加える。

試料の添加は、抽出 DNA、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの順に行う。

###### (4) PCR 増幅

すべての溶液を加えたら、PCR 増幅装置にかける。PCR の温度条件は表 4.3 温度サイクルに定める。

###### (5) 増幅後の処理

反応終了後は冷蔵あるいは冷凍保存するかあるいは直ちに電気泳動を行う。

##### 4. 6. 2 ゲル電気泳動

ゲル電気泳動は、「4. 6. 2. 1 前染色によるゲル電気泳動」又は、「4. 6. 2. 2 後染色によるゲル電気泳動」を行う。

本マニュアルではミューピッド II 電気泳動装置（株式会社アドバンス製）を用いることを想定して記述してある。

###### 準備

この段階では、特に滅菌した器具を用いる必要はない。

危険防止のためゴム手袋を使用すること。

#### 4. 6. 2. 1 前染色によるゲル電気泳動

##### (1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3%アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液(注9)(注10)を加え、加熱してアガロースを溶解する(注11)。ゲルが均一になった時点で、100 mLあたり 50 µg エチジウムブロミドを含むようにエチジウムブロミド溶液を加える。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける(注12)。30分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く(注13)。

##### (2) 泳動槽の準備

DNAの泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする(注14)。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液(TBE)を満たす(注9)(注15)。

##### (3) 電気泳動

PCR後の試料DNA溶液 5 µLに 1 µLのゲルローディング緩衝液を加え(注16)、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時にDNA分子量マーカースも泳動する(注17)。

試料を間違いなく注入できたら、100 Vの電圧で電気泳動を行う(注18)。ゲルローディング緩衝液に含まれるBPBがゲルの1/2に進んだところで電気泳動を止める(注19)。

速やかに、泳動写真の撮影を行う(注20)。

##### (4) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ(注21)をしき、その上にゲルを置き紫外線で照らす(注22)。CCDカメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA分子量マーカースと比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

#### 4. 6. 2. 2 後染色によるゲル電気泳動

##### (1) ゲルの作製

ゲルメーカーを組み立てる。2～3%アガロースゲルを作製する。必要量のアガロースを秤量し、TBE 緩衝液(注9)(注10)を加え、加熱してアガロースを溶解する(注11)。ゲルが均一になった状態でゲルメーカーに流し込み、コームを取り付ける(注12)。30分ほど静置し、十分にゲルが冷えて固まったら、コームを抜く(注13)。

##### (2) 泳動槽の準備

DNAの泳動方向に注意し、ゲルを電気泳動装置の泳動槽にセットする(注14)。

ゲル上面がかぶる程度に電気泳動緩衝液(TBE)を満たす(注9)(注15)。

##### (3) 電気泳動

PCR後の試料DNA溶液 5 µLに 1 µLのゲルローディング緩衝液を加え(注16)、ウェルに試料を静かに入れる。同じゲルで同時にDNA分子量マーカースも泳動する(注17)。

試料を間違いなく注入できたら、100 Vの電圧で電気泳動を行う(注18)。ゲルローディング緩衝液に含まれるBPBがゲルの1/2進んだところで電気泳動を止める(注19)。

速やかに、ゲルの染色に移る(注20)。

##### (4) ゲルの染色

ゲルが浸る量の新しい泳動緩衝液をプラスチック製容器に入れ、これに泳動後のゲルを移し入れる。ゲルを入れたら、緩衝液 100 mLあたり 50 µgの割合でエチジウムブロミド溶液を加える。容器をシェーカーに乗せて軽く振とうしながら30分ほど染色する。

##### (5) 泳動写真の撮影

トランスイルミネーターにラップ(注21)をしき、その上にゲルを置き紫外線を照射する(注

22)。CCD カメラによる撮影で泳動パターンを確認し、DNA 分子量マーカールと比較して目的のバンドが得られたかどうかを確認する。

#### 4. 7 PCR の成否

ネガティブコントロールからバンドがみられないことを確認し、ポジティブコントロールから予想される長さのバンドがみられることを確認する。確認後は、「5 結果の判定」から組換え体存在の有無を判定する。コンタミネーションがみられる場合は、コンタミネーション防止編を参照し速やかに適当な処置を行うこと。処置後、必要に応じて DNA の抽出をやり直し、PCR を行うこと。

#### 4. 8 特異性及び検知感度

ダイズ種子、トウモロコシ種子及びジャガイモから DNeasy Plant Maxi kit を用いて抽出した DNA 溶液を鋳型として、本編に記載された PCR を行った場合、目的とする遺伝子組換え体のみ増幅バンドがみられる。また、他の主要農作物(コメ、コムギ、オオムギ)において増幅バンドがみられない。

#### 4. 9 記録

泳動結果は画像データとして保存しておく。

#### 4. 10 備考

なし。

(注 1) マイクロピペットは、一例を示している。

(注 2) 遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf について、現在のところ系統検知用プライマー対は開発されていない。当面の間、遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf については、CaMV 35S promoter 検知用プライマー対を使用し、GM ダイズ (RRS)陽性コントロールプラスミド又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて、試験することとする。なお、CMV に感染した植物及び、多くの組換え体においても、PCR で増幅するので注意すること

(注 3) PCR 反応のポジティブコントロール及び、遺伝子組換え農産物検知の判定のためのポジティブコントロールとして使用している。組換え体が入手できればそれを抽出して使用しても良い。

(注 4) 使用している試薬に、PCR の鋳型となるようなコンタミネーションがないことを示す。

(注 5) プライマー対の品質、混合等に問題がなく、PCR 反応が問題なく進行していることを示す。

(注 6) 使用している試薬に、プライマー対のコンタミネーションがないことを示す。

(注 7) 対象農産物の非組換え体が入手可能であったら、非組換え体から抽出した DNA 溶液を鋳型としたネガティブコントロールを用意する。組換え体検知用プライマー対に、内在性遺伝子検知用プライマー対等のコンタミネーションがないことを示すことができる。

(注 8) チップの壁に反応液が付着するなどして損失する溶液量を考慮し、多めに作製する。

(注 9) 問題がなければ、TAE 緩衝液を使用しても良い。その場合は、電気泳動緩衝液も TAE 緩衝液を使用するのがよい。

(注 10) 100mL のゲル溶液で、大 2 枚、小 1 枚の作製が可能である。

(注 11) 電子レンジを用いて加熱すると簡単である。ただし、突沸の可能性もあるので、やけど等しないように取り扱いに注意すること。

(注 12) このときコームの周囲に気泡が入らないよう注意する。

(注 13) 注意してコームを抜き取らないと、コームを抜き取った後のウェル (ゲルの試料を入れる穴) の底に穴があきサンプルが漏れることがある。

- (注 14) ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。
- (注 15) 緩衝液は適量が良い、多すぎると電流密度が下がり泳動時間が長くなる。
- (注 16) 試料溶液 5  $\mu$ L に対しゲルローディング緩衝液 1  $\mu$ L の割合であるが、ゲルローディング緩衝液の量は、厳密である必要はない。ラボフィルム上にゲルローディング緩衝液をおき、試料溶液を採取したピペットで何回か溶液を出し入れして混合すればよい。また、試料溶液又は、ウェルの大きさ等により、泳動に供する試料溶液量を変更する場合は、試料溶液に対して 1/6 倍量のゲルローディング緩衝液を加える。この場合、泳動に供した試料溶液量を記録すること。
- (注 17) 試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。
- (注 18) 電極で、水の電気分解による気泡を確認する。
- (注 19) ゲルの 1/2 と、厳密に規定するものではないが、PCR の増幅長が短いため、長時間泳動するのは好ましくない。
- (注 20) 時間が経つと DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなる。
- (注 21) 食品包装用のラップ。紫外線の波長によっては、ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでない  
と紫外線が吸収されてしまい、像が得られない場合がある。
- (注 22) 紫外線照射装置には、波長に各種のものがある。人体への有害性や感度面からみて、312nm  
程度の波長を持つ照射装置を用いるのがよい。

## 5 結果の判定

結果の判定は目的の PCR 産物の有無を電気泳動結果から判定して行う。すなわち、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られ、かつ遺伝子組換え農産物に対応する長さの PCR 産物が得られた場合、遺伝子組換え農産物が検出されたとする。

内在性遺伝子に対応する PCR 産物が認められない試料については、既に抽出している DNA 溶液を用いて、再度 PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、再度 DNA の抽出を行い、PCR を行う。それでも、内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は、「検出不能」とする。

表4. 1 (1) プライマー対：ダイズ\*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>Lel</i> 用	Le1-n02	118 bp	<i>Lel</i>	
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え 農産物以外の CMV に感染した植 物等の混入によっても増幅を示す ので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOSter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え 農産物以外の土壌細菌等の混入に よっても増幅を示すので結果の判 定に注意すること
組換え遺伝子 RRS 用	RRS-01	121 bp	CTP4from <i>P. hybrida</i> － CP4EPSPS 間	

\* 独立行政法人 食品総合研究所、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社により、特許出願中である。

表4. 1 (2) プライマー対：トウモロコシ\*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>SSIIb</i> 用	SSIIb	151 bp	<i>zSSIIb</i>	
組換え遺伝子 P-35S 用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え 農産物以外の CMV に感染した植 物等の混入によっても増幅を示す ので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter 用	NOSter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え 農産物以外の土壌細菌等の混入に よっても増幅を示すので結果の判 定に注意すること
組換え遺伝子 Event176 用	E176-2	100 bp	<i>cryIA(b)</i> － PEPC#9 intron	
組換え遺伝子 Bt11 用	Bt11-3	127 bp	<i>adh1-1S</i> － <i>cryIA(b)</i>	
組換え遺伝子 GA21 用	GA21-3	133 bp	OTP － <i>m-epsps</i>	
組換え遺伝子 T25 用	T25-1	149 bp	<i>pat</i> － 35S-ter	
組換え遺伝子 MON810 用	M810-2	113 bp	<i>hsp70</i> － <i>cryIA(b)</i>	

\* 独立行政法人 食品総合研究所、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社により、特許出願中である。

表 4. 1 (3) プライマー対：ジャガイモ

対象遺伝子	記号	増幅長	配列 (5'→3')	増幅部分
内在性遺伝子 Pss 用	Pss 01n-5' Pss 01n-3'	216 bp	TGACCTGGACACCACAGTTAT GTGGATTTCAGGAGTTCTTCGA	<i>S tuberosum</i> sucrose synthase/sense 同 /anti-sense
組換え遺伝子 NewLeaf 用				
組換え遺伝子 NewLeaf Plus 用	p-FMV02-5' PLRV01-3'	234 bp	AAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGA AAAAGAGCGGCATATGCGGTAATCTG	p-FMV/sense PLRV/ anti-sense

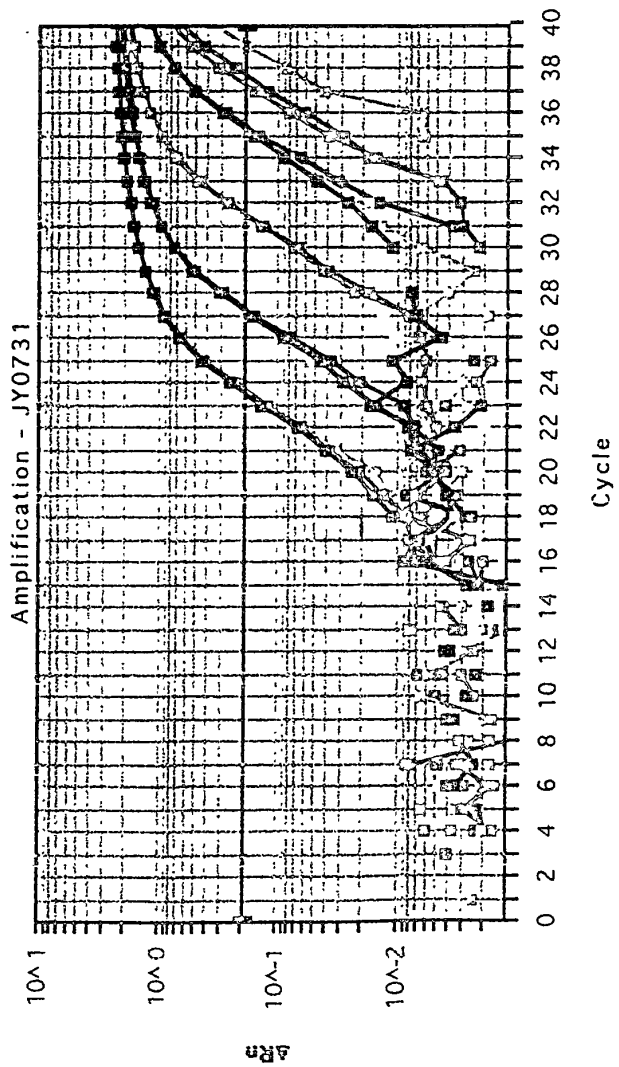
表 4. 2 PCR 溶液の組成

	液量/tube	終濃度
滅菌水	15.375μL	
AmpliTaq™ Gold	0.125μL	0.625 U
10x PCR bufferII	2.5 μL	1 x
dNTP (2mmol/Leach)	2.5 μL	200μmol/Leach
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1.5 μL	1.5 mmol/L
プライマー対 (25 μmol/Leach)	0.5 μL	0.5 μmol/Leach
鋳型 DNA(10ng/μL)	2.5 μL	25 ng
全量	25 μL	

表 4. 3 温度サイクル

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95 °C	10min	1 サイクル
変性	95 °C	30sec	40 サイクル
アニーリング	60 °C	30sec	
伸長反応	72 °C	30sec	
最後の伸長反応	72 °C	7min	1 サイクル
保存	4 °C	-	-

附件四



Samples

FAM - E1
FAM - E2
FAM - E3
FAM - E4
FAM - E5
FAM - E6
FAM - E7
FAM - E8
FAM - E9

Viewer:

Reporter:

Threshold Cycle Calculation

Threshold

Use Threshold:

Mult. \* Stddev:  \*

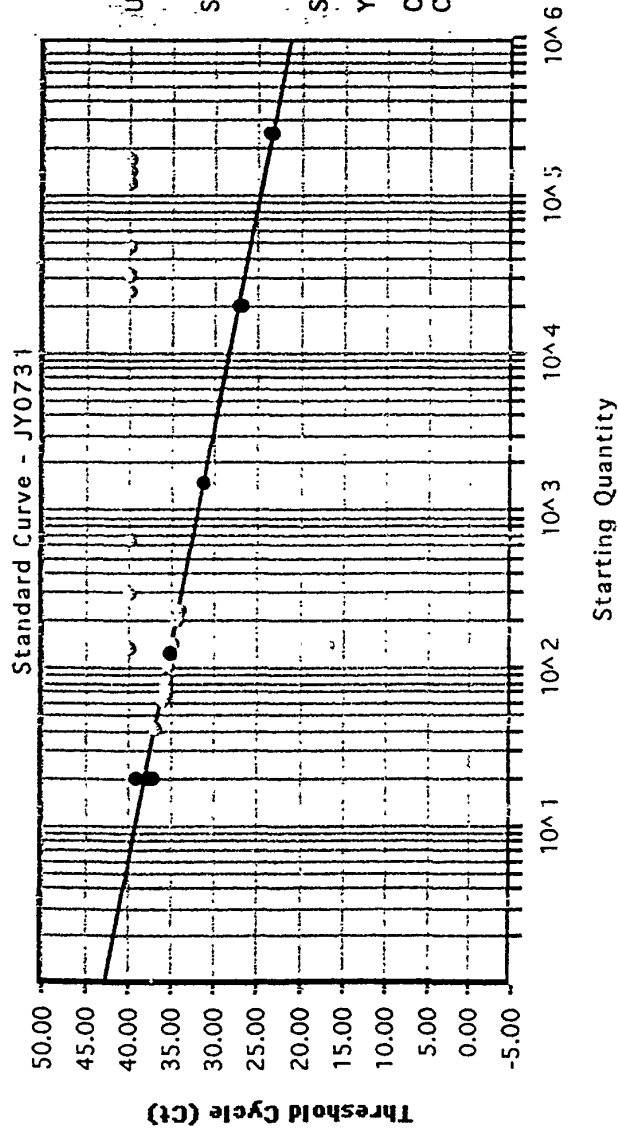
Omit Threshold:

Baseline

Start:  Stop:

	Ct	Std Dev
FAM - E1	40.000	0.003
FAM - E2	40.000	0.005
FAM - E3	40.000	0.003
FAM - E4	37.206	0.003
FAM - E5	39.012	0.002





# PE Applied Biosystems

Sequence Detection Systems  
1.6.3

File Name: JY0731

Plate Type: 7700 Single Reporter

User:

PCR Volume: 25

Date: 2002年8月1日(木)

Comments:

## Thermal Cycle Conditions

<u>Cycle</u>	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Repeat</u>	<u>Ramp Time</u>	<u>Auto Increment</u>
Hold	50.00	2:00		Auto	
Hold	95.00	10:00		Auto	
Cycle	95.00	0:30	40	Auto	
	59.00	1:00		Auto	

## Standard Curve

Slope: -3.54                      Threshold: 0.19  
Intercept: 42.61                  Baseline Range: (3, 15)  
Fit R: 1.00

## Sample Information

<u>Well</u>	<u>Type</u>	<u>Sample Name</u>	<u>Replicate</u>	<u>Ct</u>	<u>Quantity</u>	<u>Std. Dev.</u>	<u>Mean</u>
E10	STND	nos-1.5kC	nos-1.5kC	31.43	1.5e+03	0.00	1500.00
E11	STND	nos-1.5kC	nos-1.5kC	31.35	1.5e+03	0.00	1500.00
E12	STND	nos-1.5kC	nos-1.5kC	31.40	1.5e+03	0.00	1500.00
E7	STND	nos-125C	nos-125C	35.33	1.2e+02	0.00	125.00
E8	STND	nos-125C	nos-125C	35.28	1.2e+02	0.00	125.00
E9	STND	nos-125C	nos-125C	35.23	1.2e+02	0.00	125.00
E4	STND	nos-20C	nos-20C	37.21	2.0e+01	0.00	20.00
E5	STND	nos-20C	nos-20C	39.01	2.0e+01	0.00	20.00
E6	STND	nos-20C	nos-20C	37.63	2.0e+01	0.00	20.00
F1	STND	nos-20kC	nos-20kC	27.13	2.0e+04	0.00	20000.00
F2	STND	nos-20kC	nos-20kC	27.21	2.0e+04	0.00	20000.00
F3	STND	nos-20kC	nos-20kC	27.25	2.0e+04	0.00	20000.00
F4	STND	nos-250kC	nos-250kC	23.48	2.5e+05	0.00	250000.0
F5	STND	nos-250kC	nos-250kC	23.62	2.5e+05	0.00	250000.0
F6	STND	nos-250kC	nos-250kC	23.62	2.5e+05	0.00	250000.0
F7	UNKN	nos-B1	nos-B1	35.97	7.5e+01	16.23	86.95
F8	UNKN	nos-B1	nos-B1	35.44	1.1e+02	16.23	86.95
F9	UNKN	nos-B1	nos-B1	35.85	8.1e+01	16.23	86.95
F10	UNKN	nos-B2	nos-B2	36.24	6.3e+01	17.24	59.93
F11	UNKN	nos-B2	nos-B2	36.88	4.1e+01	17.24	59.93
F12	UNKN	nos-B2	nos-B2	35.96	7.5e+01	17.24	59.93
G1	UNKN	nos-H1	nos-H1	40.00	2.9e+02	37907.0	22656.91
G2	UNKN	nos-H1	nos-H1	40.00	2.4e+04	84290.5	83762.90
G3	UNKN	nos-H1	nos-H1	40.00	1.4e+05	84290.5	83762.90
G4	UNKN	nos-H2	nos-H2	40.00	6.5e+02	1235.50	1518.71

G5	UNKN	nos-H2	nos-H2	40.00	3.1e+04	96359.9	99446.02
G6	UNKN	nos-H2	nos-H2	40.00	1.7e+05	96359.9	99446.02
G7	UNKN	nos-I1	nos-I1	40.00	3.1e+04	63354.5	75775.90
G8	UNKN	nos-I1	nos-I1	40.00	1.2e+05	63354.5	75775.90
G9	UNKN	nos-I1	nos-I1	40.00		0.00	0.00
G10	UNKN	nos-I2	nos-I2	40.00	4.7e+04	0.00	47120.84
G11	UNKN	nos-I2	nos-I2	40.00		0.00	0.00
G12	UNKN	nos-I2	nos-I2	40.00	1.3e+02	12693.1	9109.33
H1	UNKN	nos-J1	nos-J1	34.26	2.3e+02	44.37	190.44
H2	UNKN	nos-J1	nos-J1	34.43	2.0e+02	44.37	190.44
H3	UNKN	nos-J1	nos-J1	35.00	1.4e+02	44.37	190.44
H4	UNKN	nos-J2	nos-J2	35.01	1.4e+02	17.13	121.85
H5	UNKN	nos-J2	nos-J2	35.24	1.2e+02	17.13	121.85
H6	UNKN	nos-J2	nos-J2	35.44	1.1e+02	17.13	121.85
E1	NTC	nos-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
E2	NTC	nos-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00
E3	NTC	nos-NTC	NTC	40.00		0.00	0.00

## 附件五

(別添)

### 遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成14年7月31日

(独)農林水産消費技術センター

平成13年度に、独立行政法人農林水産消費技術センター(以下「センター」という。)が遺伝子組換えの義務表示対象品目となっている305商品について買い上げ、調査を行った結果は次のとおりであった。

#### 1. 調査方法

- (1) 遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの又は遺伝子組換えについての表示がないもの(注1)を合わせて305商品買い上げ、定性DNA分析(注2)を行った。
- (2) 組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出されたものについては、分別生産流通管理の実施確認(注3)を行うとともに、分析可能な商品については定量DNA分析を行った。

#### 2. 調査結果の概要(別紙参照)

- (1) 305商品の定性DNA分析の結果は、以下のとおりであった。
  - ①組み換えられたDNAが検出されなかったもの 212商品(全商品の69%)
  - ②組み換えられたDNAが検出されたもの 80商品(全商品の26%)なお、残り13商品については、加工工程中の加熱等で遺伝子が分解しておりDNA分析ができなかった。
- (2) ①以外の商品について、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、1商品(コーングリッツ)(昨年8月に公表済み)以外は、適切に実施されており、表示が適正であることが確認された。

(別紙)

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果（平成13年度）

品目	調査商品数	組み換えられたDNAの検出の有無			最終結果		
		①不検出	②検出	③DNA分析不可能	適正な表示	不適正な表示	
					①+ ②及び③のうち、分別生産流通管理が適切に行われていたもの)	(②及び③のうち、分別生産流通管理が不適切であったもの)	
生鮮							
大豆、枝豆、大豆もやし	11	9	2	0	11	0	
とうもろこし	3	3	0	0	3	0	
大豆加工品	豆腐	64	40	24	0	64	0
	油揚げ類	42	23	19	0	42	0
	凍豆腐	10	7	3	0	10	0
	おから	5	5	0	0	5	0
	ゆば	5	4	1	0	5	0
	納豆	19	15	0	4	19	0
	豆乳類	10	7	2	1	10	0
	みそ	20	15	3	2	20	0
	大豆煮豆	12	10	1	1	12	0
	大豆缶詰及びびん詰	5	4	1	0	5	0
	きな粉	10	8	2	0	10	0
	大豆炒り豆	4	3	1	0	4	0
	大豆(調理用)を主な原材料とするもの	3	2	1	0	3	0
	大豆粉を主な原材料とするもの	4	2	2	0	4	0
	大豆たん白を主な原材料とするもの	7	2	5	0	7	0
	枝豆を主な原材料とするもの	4	4	0	0	4	0
大豆もやしを主な原材料とするもの	5	5	0	0	5	0	
その他	7	5	2	0	7	0	
とうもろこし加工品	コーンスナック菓子	23	16	4	3	23	0
	コーンスターチ	5	4	1	0	5	0
	ポップコーン	6	5	1	0	6	0
	冷凍とうもろこし	2	2	0	0	2	0
	とうもろこし缶詰及びびん詰	3	3	0	0	3	0
	コーンフラワーを主な原材料とするもの	2	1	1	0	2	0
	コーングリッツを主な原材料とするもの	5	1	4	0	4	1 ※3)
	とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの	6	4	0	2	6	0
	その他	3	3	0	0	3	0
合計	305	212	80	13	304	1	
	※1		※2	※2			

※1) 昨年8月公表分(59商品)を含む。

※2) ②組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出された商品(80商品)及び③DNA分析ができなかったもの(13商品)については、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、※3に示した1商品以外の92商品については、分別生産流通管理が適切に実施されていたことから、表示が適正であることが確認された。

※3) コーングリッツを主な原材料とするとうもろこし加工品のうち1商品(コーングリッツ)については、定量分析の結果遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である5%を上回っていた(6%)ことから、センターから改善の指示を行った。(詳細については、13年8月10日に公表済み)

注1) 「遺伝子組換えでない」との表示又は表示しないことができる場合

表示対象品目であって、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合は、表示不要又は「大豆（遺伝子組換えでない）」等の任意表示ができることとなっている。（遺伝子組換え食品に関する品質表示基準第3条第1項第3号）

また、分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性が避けられないことから、これらの管理が適切に行われている場合には、意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなすこととされている。（遺伝子組換えに関する品質表示基準第3条第3項）

ここでいう「一定の混入」とは、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が5%以下であること」と定められている。（遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について（平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知））

注2) DNA分析

DNA分析としては、PCR法を用いている。PCR法とは、農産物や食品中の特定の塩基配列のDNAのみを増幅し、検出する方法であり、農産物や食品中の微量のDNAであっても検出可能である。

なお、PCR法には遺伝子組換え農産物が含まれているかどうかを検出する定性PCR法と、遺伝子組換え農産物の混入率を算出する定量PCR法があるが、定量PCR法は農産物については適用可能であるが、加工食品の場合、加熱や発酵に伴うDNAの変性、分解等により精度の高い定量は不可能な場合があることに留意する必要がある。

（PCRとは、Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略。）

また、その分析方法については、平成13年4月にセンターが策定したJAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」に基づき行った。

注3) 分別生産流通管理の実施確認

分別生産流通管理の実施確認は、「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について」（平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知）に示した「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トウモロコシの分別生産流通管理の指針（以下「指針」という。）」に基づき聞き取り又は書類による確認を行った。

(参考2)

プレスリリース

遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について

平成13年8月10日  
総合食料局

本年4月1日から、JAS法に基づき遺伝子組換え食品についての表示が義務付けられたことに伴い、本年4月中旬に約5,600商品について表示状況を調査した。(5月8日に調査結果を公表済み)

この調査の際、独立行政法人農林水産消費技術センター(以下「センター」という。)が、遺伝子組換えの義務表示対象品目である59商品を買上げ、DNA分析、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、その結果は次のとおりであった。

## 1. 調査内容

### (1) 調査期間

平成13年5～7月

### (2) 調査方法

遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの(34商品)又は遺伝子組換えについての表示がないもの(25商品)を合わせて59商品を買上げ、定性DNA分析を行い、組み換えられたDNA(安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの)が検出されたものについては、分析可能な品目について定量DNA分析を行うとともに、分別生産流通管理の実施確認を行った。

## 2. 調査結果

(1) 定性DNA分析の結果、11商品から組み換えられたDNAが検出された。

(2) このうち、精度の高い定量DNA分析技術が確立している5商品について、定量DNA分析を行った結果、1商品が遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である5%を上回っていた。

このため、この商品については、適切な分別生産流通管理が行われたとは認め

(参考1)

### 遺伝子組換え食品の表示

遺伝子組換え農産物（大豆、とうもろこし等）及びその加工食品は、遺伝子組換え食品の品質表示基準に基づき、表示を行うこととされている。

- (1) 従来のもとの組成、栄養価等が著しく異なるもの（高オレイン酸大豆）  
→ 「大豆（高オレイン酸遺伝子組換え）」等の義務表示
- (2) 従来のもとの組成、栄養価等が同等のもの
  - ① 加工後に組み換えられたDNA又はこれによって生じたタンパク質が残存する加工食品（豆腐・油揚げ類、みそ、納豆、コーンスナック菓子等）
    - ア 分別生産流通管理が行われた遺伝子組換え農産物を原材料とする場合  
→ 「大豆（遺伝子組換え）」等の義務表示
    - イ 遺伝子組換え農産物と非遺伝子組換え農産物が不分別の農産物を原材料とする場合  
→ 「大豆（遺伝子組換え不分別）」等の義務表示
    - ウ 分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする場合  
→ 表示不要又は「大豆（遺伝子組換えでない）」等の任意表示（注）
  - ② 加工後に組み換えられたDNA及びこれによって生じたタンパク質が残存しない加工食品（醤油、コーンフレーク等）  
→ 表示不要（任意表示）

(注) 分別生産流通管理を行っても、意図せざる遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性が避けられないことから、分別生産流通管理が適切に行われている場合には、5%以下の遺伝子組換え農産物の意図せざる混入があっても分別生産流通管理が行われた農産物とみなすこととされている。（遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について（平成12年6月10日付け農林水産省食品流通局長通知食品流通局長通知））



られず、表示が不適正であったので、センターから当該商品の表示の訂正を指導するとともに、製造業者等に対し、適切な分別生産流通管理の徹底を指導した。なお、製造業者等からは、当該商品と同じ製造年月日の商品を既に店頭から自主的に回収したとの報告を受けている。

- (3) 定量DNA分析を行った他の4商品については5%以下であり、また、残りの6商品については、精度の高い定量DNA分析技術が確立していないことから、これらの10商品について、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、指針に即して適切に実施されていたことから、表示内容又は表示されていないことが適正であることが確認された。

〔 なお、センターでは、平成13年度中に、これらを含め計約300商品を買上げ、その表示内容確認の調査を同様の方法で実施することとしている。 〕

附件六

Sample Name GA21胚芽nonGM コンタミチェック

Name Kajino

Sample Volume 25  $\mu$ l

Primer/Probe(1) SSIIb03

Primer/Probe(3) None

10 Samples for each Pr, Pb

Primer/Probe(2) GA21 specific

Primer/Probe(4) None

Standard Molecule(1) pMul5 ColE1TE

Standard Molecule(2) None

Standard Molecule(3) None

=recipe=

Universal Buffer	450	$\mu$ l
Primers & Probe	360	$\mu$ l
Total	810	$\mu$ l
▼		
for 3well+ a	78.75	$\mu$ l
add Template	8.75	$\mu$ l
for 1well	25	$\mu$ l

NTC ColE1/TE (5ng/ml)

Comment

Standard Full Range

Unknown (1) 1

(2) 2

(3) 3

(4) 4

(5) 5

(6) 6

(7) 7

(8) 8

Probe 10 pmol/ $\mu$ L を 5  $\mu$ Mにする。

10 pmol/ $\mu$ L を 75  $\mu$ L採り、 150  $\mu$ L に調製する  
75 mLのDWを加える。

10 pmol/ $\mu$ L を 91  $\mu$ L採り、 182  $\mu$ L に調製する  
91 mLのDWを加える。

	Initial conc.	調製量	22.5	43.75	187.5
5'primer	50	90	4	175	750
3'primer	50	90	4	175	750
probe	10	180	8	350	1500
H2O		3240	144	6300	27000
Primer & Probe作成量		3600	160	7000	30000

	Initial conc.	調製量	22.5	3.6
5'primer	200	22.5	1	3.6
3'primer	200	22.5	1	3.6
probe	5	360.0	16	57.6
H2O		3195.0	142	511.2
Primer & Probe作成量		3600	160	576

Probe 10 pmol/ $\mu$ L を 5  $\mu$ Mにする。

10 pmol/ $\mu$ L を 75  $\mu$ L採り、 150  $\mu$ L に調製する  
75 mLのDWを加える。

10 pmol/ $\mu$ L を 91  $\mu$ L採り、 182  $\mu$ L に調製する  
91 mLのDWを加える。

	Initial conc.	調製量	22.5	2.5	5
5'primer	50	90	4	10	20
3'primer	50	90	4	10	20
probe	10	180	8	20	40
H2O		3240	144	360	720
Primer & Probe作成量		3600	160	400	800

	Initial conc.	調製量	22.5	3.6
5'primer	200	22.5	1	3.6
3'primer	200	22.5	1	3.6
probe	5	360.0	16	57.6
H2O		3195.0	142	511.2
Primer & Probe作成量		3600	160	576

## Protocol for Isolation of DNA from Plant Tissue with the DNeasy Plant Mini Kit

### Important notes before starting

- If using DNeasy Plant Mini Kits for the first time please read "Technical Information" (page 11).
- Buffers AP1 and AP3/E concentrate may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 65°C to redissolve (before adding ethanol to Buffer AP3/E) Do not heat Buffer AP3/E after ethanol has been added
- Buffer AP1 may develop a yellow color upon storage This does not affect the procedure
- Buffers AW and AP3/E are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C
- Preheat Buffer AE to 65°C
- All centrifugation steps are carried out at room temperature in a microcentrifuge

1. Grind plant or fungal tissue under liquid nitrogen to a fine powder using a mortar and pestle. Transfer the tissue powder and liquid nitrogen to an appropriately sized tube and allow the liquid nitrogen to evaporate. Do not allow the sample to thaw. Continue immediately with step 2.

Note: See "Disruption of plant material" (page 11)

2. Add 400 µl of Buffer AP1 and 4 µl of RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 100 mg of ground (wet weight) or 20 mg (dried) plant or fungal tissue and vortex vigorously.

No tissue clumps should be visible Vortex or pipet further to remove any clumps Clumped tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA In the rare case where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A prior to use

3. Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2–3 times during incubation by inverting tube.

This step lyses the cells



4. **Add 130  $\mu$ l of Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.**

This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides.

**(Optional) Centrifuge the lysate for 5 min at full speed.**

Some plant materials can generate very viscous lysates and large amounts of precipitates during this step resulting in shearing of the DNA in the next step (see "Lysate filtration with QIAshredder", page 12). In this case optimal results are obtained if the majority of these precipitates are removed by centrifugation for 5 min at maximum speed. After centrifugation, apply supernatant to QIAshredder spin column and continue with step 5.

5. **Apply the lysate to the QIAshredder spin column (lilac) sitting in a 2 ml collection tube and centrifuge for 2 min at maximum speed.**

It may be necessary to cut the end off the pipette tip to apply the lysate to the QIAshredder column. QIAshredder removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 6.

6. **Transfer flow-through fraction from step 5 to a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet.**

Typically 450  $\mu$ l of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case determine volume for the next step.

7. **Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate and mix by pipetting.**

Example: To 450  $\mu$ l lysate add 675  $\mu$ l Buffer AP3/E. Reduce the amount of Buffer AP3/E accordingly if less lysate is recovered. A precipitate may form after the addition of ethanol but this will not affect the DNeasy procedure.

**Note:** Ensure ethanol has been added to Buffer AP3/E (see "Important notes before starting").

**Note:** It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.

8. **Apply 650  $\mu$ l of the mixture from step 7, including any precipitate which may have formed, to the DNeasy mini spin column sitting in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (corresponds to  $\geq 8000$  rpm for most microcentrifuges) and discard flow-through.\***

Reuse the collection tube in step 9.

9. **Repeat step 8 with remaining sample. Discard flow-through\* and collection tube.**

10. **Place DNeasy column in a new 2 ml collection tube (supplied), add 500  $\mu$ l Buffer AW to the DNeasy column and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm). Discard flow-through and reuse the collection tube in step 11.**

**Note:** Ensure ethanol is added to Buffer AW (see page 15).

\* Flow-through fractions contain Buffer AP3/E, and are therefore not compatible with bleach

11. Add 500  $\mu$ l Buffer AW to the DNeasy column and centrifuge for 2 min at maximum speed to dry the membrane.

It is important to dry the membrane of the DNeasy column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This spin ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

After washing with Buffer AW, the DNeasy mini spin column membrane is usually only slightly colored. In the rare case that the membrane remains significantly colored after washing with Buffer AW, refer to "Darkly colored membrane" in the Troubleshooting Guide on page 21.

**Note:** Following the spin, remove the DNeasy column from the collection tube carefully so the column does not contact the flow-through as this will result in carryover of ethanol.

12. Transfer the DNeasy column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied) and pipet 100  $\mu$ l of preheated (65°C) Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature and then centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm) to elute.

Elution with 50  $\mu$ l (instead of 100  $\mu$ l) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA ( $>20$   $\mu$ g) are loaded, eluting with 200  $\mu$ l (instead of 100  $\mu$ l) increases yield. See "Elution" on page 12.

13. Repeat elution (step 12) once as described.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates.

**Note:** More than 200  $\mu$ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy column will contact the eluate.

3/11/18

機器精度確認必要量計算

Primer Probe Mix 必要量  
IIRun 測定

Mix	3well 当たり	サンプル数	RUN	1well 当たり	送付量 (単位: $\mu$ l)	サンプル数	必要量 (単位: $\mu$ l)	必要量 (25 $\mu$ M Primer set 及 110 $\mu$ M Probe)
SSIIb	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
CaMV	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
NOS	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
It11	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
E176	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
GA21	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
Men810	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
T25	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
Let	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6
RRS	36	6	1	259.2	35	9072	453.6	453.6

スタンダード必要量(1sample 当たりの template 量 8.75  $\mu$ l)

トウモロコシ

3well 当たり	サンプル数	RUN	1well 当たり	送付量	サンプル数	必要量 (単位: $\mu$ l)
20	8	1	84	35	35	2940
125	8	1	84	35	35	2940
1.5k	8	1	84	35	35	2940
20k	8	1	84	35	35	2940
250k	8	1	84	35	35	2940

大豆

3well 当たり	サンプル数	RUN	1well 当たり	送付量	サンプル数	必要量 (単位: $\mu$ l)
20	2	1	21	35	35	735
125	2	1	21	35	35	735
1.5k	2	1	21	35	35	735
20k	2	1	21	35	35	735
250k	2	1	21	35	35	735

内標比測定: 必要試料採取必要量概算

抽出DNA濃度 20ng/μl (抽出: 1μl/1試管) DNA濃度 20ng/μl (抽出: 1μl/1試管)

検体ID: 176, GA21, Mon810, L25, RRS

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	8.75	5	3	157.5	35	35/27.5	35	35	1110
L176	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
GA21	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
Mon810	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
L25	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
RRS	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110

Primer Probe Mix比変更

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	8.75	5	3	157.5	35	35/27.5	35	35	1110
L176	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
GA21	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
Mon810	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
L25	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110
RRS	8.75	4	3	126	35	1110	35	35	1110

上向き: CaMV 測定用

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	36	14	3	1814.4	45	6150.1	45	45	1110
GA21	36	14	3	1814.4	45	6150.1	45	45	1110

上向き: NOS, Specific 測定用

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	36	10	3	3888	45	13680.0	45	45	1110
GA21	36	10	3	3888	45	13680.0	45	45	1110
Mon810	36	8	3	3036.8	35	9628.8	35	35	1110
L25	36	8	3	3036.8	35	9628.8	35	35	1110
RRS	36	8	3	3036.8	35	9628.8	35	35	1110

大目: CaMV, NOS, Specific 測定用

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	36	7	3	907.2	35	3175.2	35	35	1110
GA21	36	7	3	907.2	35	3175.2	35	35	1110
Mon810	36	7	3	907.2	35	3175.2	35	35	1110
L25	36	7	3	907.2	35	3175.2	35	35	1110
RRS	36	7	3	907.2	35	3175.2	35	35	1110

合計比変更風

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	5702.4	35	10955.4	9970.2	35	12150.0	35	35	1110
L176	2721.6	35	9925.6	4762.8	35	13680.0	35	35	1110
GA21	2203.2	35	7711.2	3855.6	35	1110	35	35	1110
Mon810	1036.8	35	3628.8	1814.4	35	9628.8	35	35	1110
L25	1036.8	35	3628.8	1814.4	35	9628.8	35	35	1110
RRS	1036.8	35	3628.8	1814.4	35	9628.8	35	35	1110
L25	907.2	35	3175.2	1587.6	35	5175.2	35	35	1110
RRS	907.2	35	3175.2	1587.6	35	5175.2	35	35	1110

測定対象

Target	CaMV	NOS	Specific
Bt11	○	○	○
L176	○	○	○
GA21	○	○	○
Mon810	○	○	○
L25	○	○	○
RRS	○	○	○

スケッチ: 1.17 変更風 (Sample: 1.17 100xemptious: 風 8.75 μl)

スケッチ: 1.17

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	20	8.75	11	346.5	35	1212.5	35	35	1110
L176	12.5	8.75	11	346.5	35	1212.5	35	35	1110
GA21	15k	8.75	11	346.5	35	1212.5	35	35	1110
Mon810	20k	8.75	11	346.5	35	1212.5	35	35	1110
L25	250k	8.75	11	346.5	35	1212.5	35	35	1110

大目

Target	3well当たり	Primer	RUN	3	検数1.2	送付風量(単位: μl)	ラボ数	35	35/27.5
Bt11	20	8.75	4	126	35	1110	35	35	1110
L176	12.5	8.75	4	126	35	1110	35	35	1110
GA21	15k	8.75	4	126	35	1110	35	35	1110
Mon810	20k	8.75	4	126	35	1110	35	35	1110
L25	250k	8.75	4	126	35	1110	35	35	1110



ブラインドサンプル測定試薬必要量概算

測定対象	トウモロコシ:BU11, E176, GA21, Mon810, T25 大豆:RRS
------	--

Primer Probe Mix必要量

トウモロコシ		大豆					
Specific測定用		Specific測定用					
Mix	3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位:μl)	ラボ数	送付量(単位:μl)	必要量(25μM Primer set及10μM Probe)
SS1b	36	84	1	3628.8	12	43515.6	2177.3
BU11	36	30	1	1296	12	15552	777.6
E176	36	30	1	1296	12	15552	777.6
GA21	36	30	1	1296	12	15552	777.6
Mon810	36	24	1	1036.8	12	12441.6	622.1
T25	36	30	1	1296	12	15552	777.6

大豆						
Specific測定用						
Mix	3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位:μl)	必要量(25μM Primer set及10μM Probe)	
Lel	36	24	1	1036.8	12	12441.6
RRS	36	24	1	1036.8	12	12441.6

スタンダード必要量

1sample当たりのtemplate量: 8.75 μl

トウモロコシ		大豆				
Specific測定用		Specific測定用				
Mix	3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位:μl)	必要量(単位:μl)	
20	8.75	22	1	231	12	2772
125	8.75	22	1	231	12	2772
1.5k	8.75	22	1	231	12	2772
20k	8.75	22	1	231	12	2772
250k	8.75	22	1	231	12	2772

大豆						
Specific測定用						
Mix	3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位:μl)	必要量(単位:μl)	
20	8.75	4	1	42	12	504
125	8.75	4	1	42	12	504
1.5k	8.75	4	1	42	12	504
20k	8.75	4	1	42	12	504
250k	8.75	4	1	42	12	504

ゾラインドサンプル測定読込薬必要量見積書

測定対象	トウモロコシ, Bt11, Bt176, GA21, Mon810, T25 大豆, RRS
------	---

Primer Probe Mix必要量

トウモロコシ		大豆	
Specific測定用			
3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位: $\mu$ l)
Mix			係数: 1.2
SSIIb	36	78	3369.6
Bt11	36	28	1209.6
Bt176	36	28	1209.6
GA21	36	28	1209.6
Mon810	36	22	950.4
T25	36	28	1209.6

大豆	
Specific測定用	
3well当たり	送付量(単位: $\mu$ l)
Mix	係数: 1.2
l cel	950.4
RRS	950.4

スタンダード必要量

1 sample 当たりの template 量 8.75  $\mu$ l

トウモロコシ		大豆	
Specific測定用			
3well当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位: $\mu$ l)
20	22	1	231
125	22	1	231
1.5k	22	1	231
20k	22	1	231
250k	22	1	231

大豆	
Specific測定用	
3well当たり	送付量(単位: $\mu$ l)
20	42
125	42
1.5k	42
20k	42
250k	42

## 定性試験必要量概算

25  $\mu$  M Primer set, 10  $\mu$  M プローブ必要量  
トウモロコシ

Primer set 必要量	1Run 当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位 $\mu$ l)	ラボ数	必要量(25 $\mu$ M Primer set)
SSIIb	0.5	40	1	24	17	408
CaMV	0.5	20	1	12	17	204
NOS	0.5	20	1	12	17	204
Bt11	0.5	20	1	12	17	204
E176	0.5	20	1	12	17	204
GA21	0.5	20	1	12	17	204
Mon810	0.5	20	1	12	17	204
T25	0.5	20	1	12	17	204

係数:1.2

大豆

Primer set 必要量	1Run 当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位 $\mu$ l)	必要量(25 $\mu$ M Primer set)
Lel	0.5	20	1	12	17
CaMV	0.5	20	1	12	17
NOS	0.5	20	1	12	17
RRS	0.5	20	1	12	17

係数:1.2

陽性コントロールプラスミド必要量

1Run 当たり	サンプル数	RUN	送付量(単位 $\mu$ l)	必要量(単位 $\mu$ l)
トウモロコシ	2.5	18	50	17
ダイズ	2.5	8	50	17

試薬をそのまま

附件九

Primer Probe Mix作成法

SSIIb Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
SSIIb 3-5'&3'	25	1.25	28.00	30.8	2.8
SSIIb-Taq	35.0	0.5	8.00	8.54	0.5
DW			524.00		
Total					

LeI Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
LeI $\alpha$ 02-5'&3'	25	1.25	6.00	6.65	0.7
LeI-Taq	15.0	0.5	4.00	4.47	0.5
DW			110.00		
Total					

CaMV Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
P35S 1-5'&3'	25	1.25	10.00	11.6	1.6
P35S-Taq	14.6	0.25	3.42	3.59	0.2
DW			186.58		
Total					

NOS Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
NOS $\alpha$ 2-5'&3'	25	1.25	7.50	9.25	1.8
NOS-Taq	19.8	0.5	3.79	4.09	0.3
DW			138.71		
Total					

Bt11 Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
Bt11 3-5'&3'	25	1.25	6.50	8.3	1.8
Bt11-2-Taq	17.2	0.5	3.78	4.33	0.6
DW			119.72		
Total					

GA21 Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
GA21 3-5'&3'	25	1.25	6.50	8.25	1.8
GA21-2-Taq	17.2	0.5	3.78	4.61	0.8
DW			119.72		
Total					

T25 Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
T25 1-5'&3'	25	1.25	6.50	7.85	1.4
T25-2-Taq	17.2	0.5	3.78	3.98	0.2
DW			119.72		
Total					

E176 Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
E176 2-5'&3'	25	1.25	6.50	7.6	1.1
E176-Taq	17.2	0.5	3.78	4.22	0.4
DW			119.72		
Total					

M810 Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
M810 2-5'&3'	25	1.25	6.00	7.35	1.4
M810-Taq	16.0	0.5	3.75	4.2	0.5
DW			110.25		
Total					

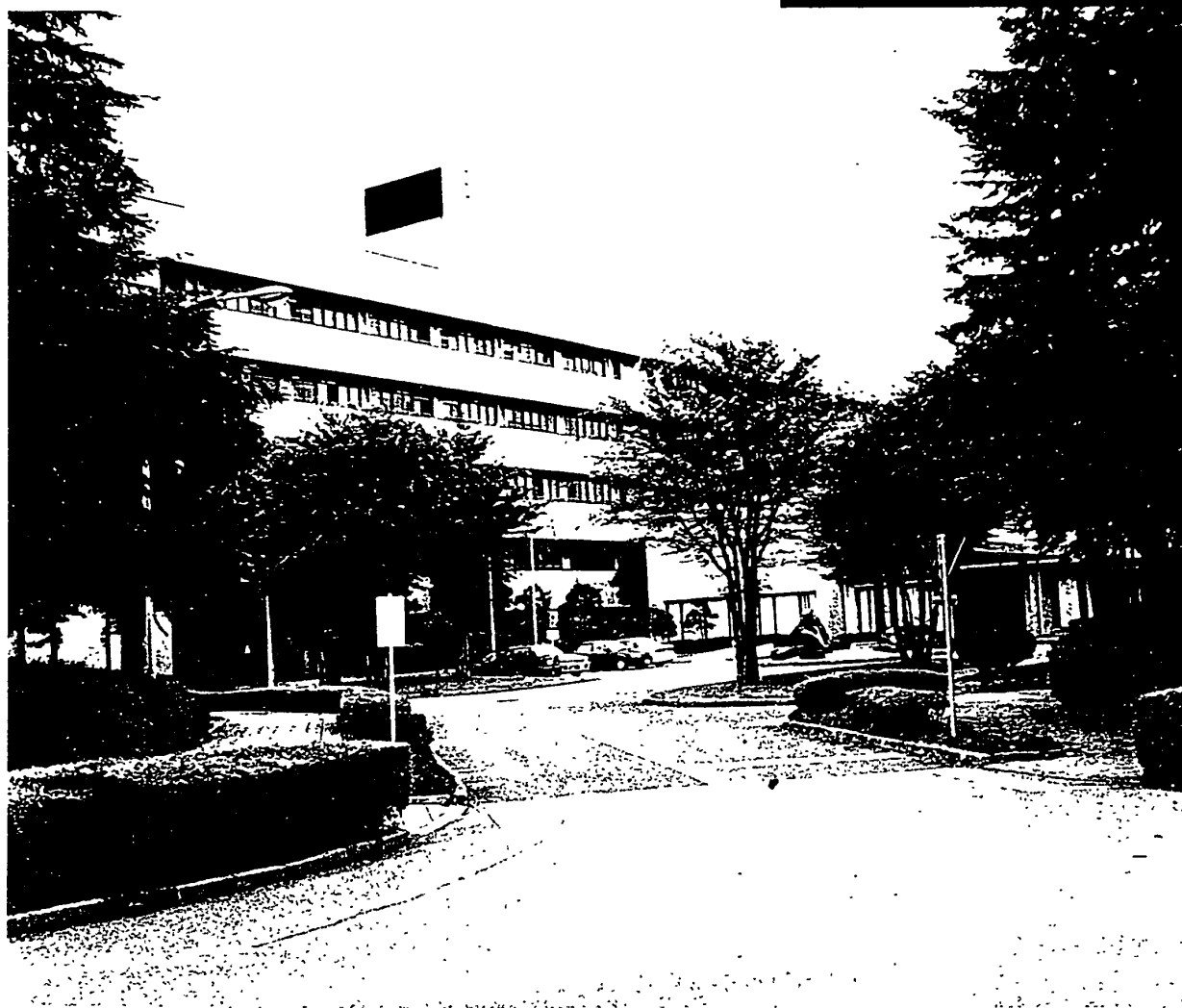
RRS Mix

	Initial ( $\mu$ M)	Final ( $\mu$ M)	Volume (mL)	初期試薬量 (nL)	試薬残量 (nL)
RRS 01-5'&3'	25	1.25	6.00	7.1	1.1
RRS-Taq	14.4	0.5	4.17	4.4	0.2
DW			109.83		
Total					



附件十

# National Food Research Institute



# MISSION

National Food Research Institute (NFRI) is one of independent administrative institutions (IAI) under the supervision of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF). The mission of NFRI is to provide the society with healthy and enriched life and secure supply of safe food through conducting research. Its food research projects cover a wide range of scientific and technical fields and are aimed at developing technological systems that strengthen the agriculture, forestry, fisheries, and food processing industries.

These research projects include: the elucidation of the relation of various foods to health, namely, functional evaluation of food components; improvement of technology for analysis; development of technology to ensure food safety; improvement of food distribution and processing methods; and exploration and utilization of functions of living organisms.

## Medium Term Plan for Research (2001-2005)

Elucidation of functional properties of food and development of technologies to utilize these properties

Development of methods of analysis in support of the food labeling

Development of technologies to ensure the safety and high quality of food

Development of technologies for utilizing various food materials, and advancement of food manufacturing techniques which meet the environmental needs of the society

Development of technologies for effectively using microorganisms and enzymes

Elucidation of biological functions of molecules through the latest biochemical methods and development of technologies for utilizing these molecules

## Cooperation, Research Planning and Organization Division for Collaboration with the Industry

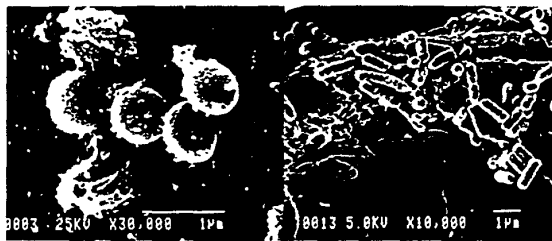
- ▷ Joint research with private enterprises, various public corporations, and local governmental agencies;
- ▷ Research entrusted to the Institute by private enterprises, various public corporations, and local governmental agencies, and research entrusted to other organizations or bodies by the Institute on specific topics of the Institute's projects;
- ▷ Acceptance of trainees from private enterprises, various public organizations, and local governmental agencies, and of researchers with special status and post-doctorate fellows;
- ▷ Cooperation with international organizations, such as the United Nations University, and exchange of researchers through fellowship programs and bilateral cooperation arrangements;
- ▷ International/national seminars, workshops and symposia on a variety of topics including food-related research; and
- ▷ Tour in the Institute and explanation of its research projects for visitors upon request

# Research Activities

## Research Teams

Five research teams in the division of planning and coordination for needed research relating to foods

- ➊ Development of measures for food protection
- ➋ Food function and quality
- ➌ Promotion of genome information analysis of useful microorganisms for fermentation industry
- ➍ Creation of functionally-strengthening macromolecules based upon protein engineering, 3D analyses and bioinformatics
- ➎ Development of micro-channel arrays and their applications including blood rheology measurement



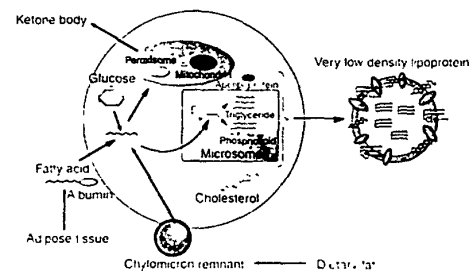
*Staphylococcus aureus*

*Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*

## Food Function Division

The nutritional, gustatory, physical and physiological functionalities of foods and food components

- ➊ The physiological activity of food components to reduce serum lipid and prevent obesity
- ➋ Mechanism of taste response and its physiological regulation
- ➌ Physicochemical properties of food and the physiological effects on humans
- ➍ Research into functional food factors in vegetables and fruits and their effects
- ➎ Mechanism of digestion and absorption, and improving effects on brain function

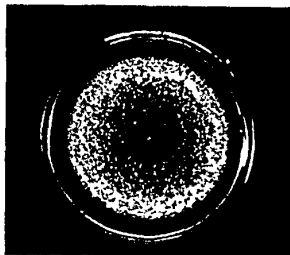


Lipoprotein production and hepatic fatty acid metabolism

## Food Safety and Quality Division

Food safety and preservation of quality during distribution of food resources and foods

- ➊ Evaluation and method development of safety of food resources and foods
- ➋ Control of microorganisms and microbial toxins contaminating food resources and foods
- ➌ Quality control of vegetables and fruits based on physiological properties
- ➍ Food packaging and quality maintenance of packaged foods
- ➎ Ecology, physiology and control of food insect pests



*Aspergillus flavus*: aflatoxin-producing fungus

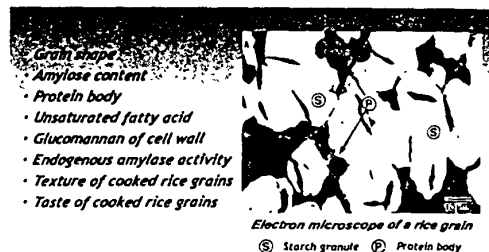


*Trichogramma chilonis* Ishii, the egg parasitoid of *Coreva cephalonica* Stanton

## Food Material Division

Biochemical and structural properties of food ingredients and development of new technologies for processing of agricultural products

- ➊ Development of new food carbohydrates and related enzymes
- ➋ Evaluation of quality and function of food proteins
- ➌ Elucidation of structure and function of hydrophilic macromolecules
- ➍ Clarification of factors affecting rice quality and development of technology for quality evaluation and utilization
- ➎ Development of new food manufacturing technology of cereals

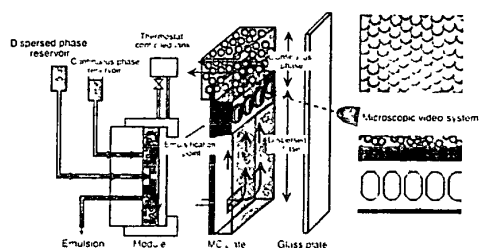


The differences between *Japonica* and *Indica* rice grains

## Food Engineering Division

Food processing, distribution, nano-measurement, information technology and other technologies

- Development of advanced food processing and waste treatment system
- Development of novel dispersion, separation and reactor system
- Development of novel analyzing methodology for nano-structure and function of foods and biomaterials
- Development of technology such as soft electron, quality measurement and network application system
- Development of environmentally-friendly system for high quality food distribution

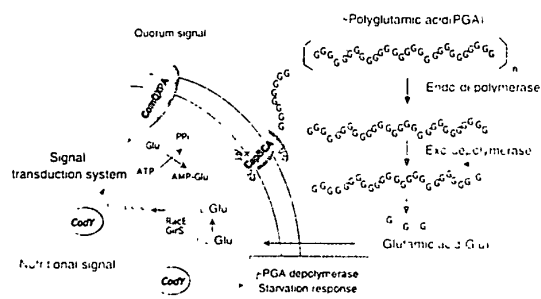


Microchannel(MC) Emulsification Mechanism

## Applied Microbiology Division

Molecular analysis of food microorganisms and application of microbial functions in food processing

- Molecular biological analysis of the genes expressed in Koji mold used in Miso, Soy sauce and Sake production
- Molecular and cellular biology of baker's yeast and lactic acid bacteria
- Molecular analysis of the bacterial  $\gamma$ -polyglutamic acid (the sticky polymer of Natto) production
- Development of enzymatic system for the production of useful amino-sugars

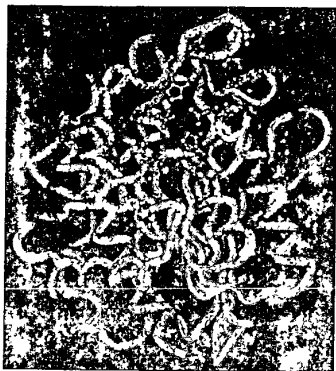


Metabolism of  $\gamma$ -polyglutamic acid, the sticky polymer of Natto

## Biological Function Division

Engineering and biotechnology of biomolecules and cells

- Macromolecular structure and catalytic mechanism
- Improvement of enzyme function by gene manipulation
- Secondary metabolism, and ribosome function of actinomycetes and *Bacillus subtilis*
- Cell metabolism and regulation

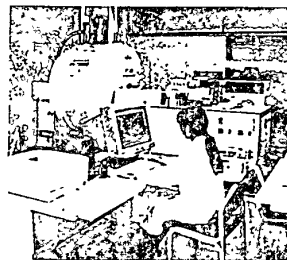


Tertiary structure of a protease exhibiting improved heat stability, constructed by gene replacement

## Analytical Science Division

Studies on food analysis and quality evaluation

- Development of sensitive and precise analytical methods and procedures to determine food components
- Analysis of structure and dynamics of food components at molecular level in relation to their function
- Development of nondestructive methods for bio-measurement and food analysis
- Development of spectral analysis and image analysis methods for quality evaluation of foods
- Collection and preparation of data for "New Standard Tables of Food Composition in Japan"



High performance instrument for the analysis of molecular structure and dynamics



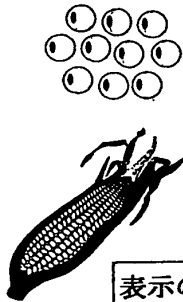
# 遺伝子組換え農産物の新しい定量分析法の開発

附件十一

食品総合研究所 食品衛生対策チーム

## 研究の要約

- ・ 安全性が承認されているが、消費者の不安感は払拭できていない
- ・ JAS法および食品衛生法により新しい表示制度が導入
- ・ 新しい分析用の標準物質を組換え技術を利用して開発し、組換え体の混入率を高い精度で測定する方法を確立



農林水産省、厚生労働省、韓国の標準的分析法として採用

表示の監視による消費者の信頼性確保

国際的標準化作業 (CODEX, ISO) が進む

この研究は食品総合研究所と国立医薬品食品衛生研究所、農林水産消費技術センター、韓国国立研究所、との共同研究の成果です。

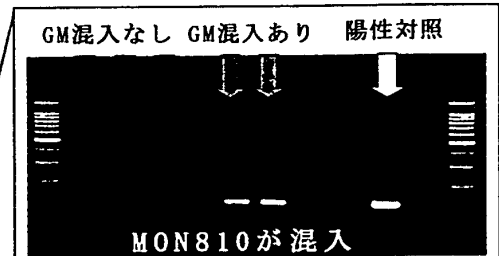
## 研究成果の内容

穀粒・粉碎試料

DNAの抽出

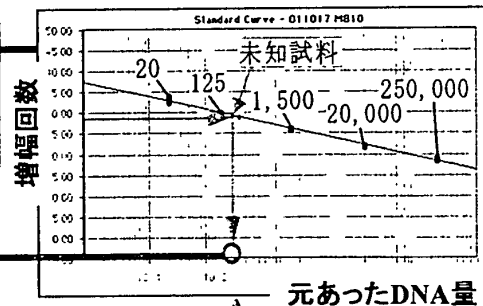
定性PCR法により混入GM系統の判定

定量PCR法により混入GM系統の混入率測定



分析には必ず標準物質が必要だが、GM種子が入手できない、精度が悪いなどの問題がある

増幅したDNA量が一定になった増幅回数から、元あったDNA量を測定し混入率を算出する



0.8%だった

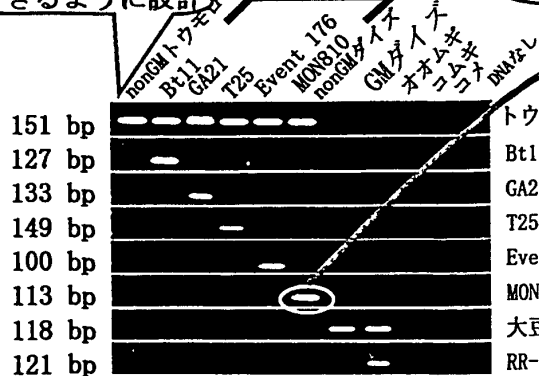
## 新しい標準物質の開発

特異的にGMを検知できるように設計

GMトウモロコシ

PCRで増幅したDNAをプラスミド上についで標準物質にする

プラスミドを用いて混入率を測定



トウモロコシ確認

Bt11  
GA21  
T25  
Event176  
MON810  
大豆確認  
RR-大豆

GMトウモロコシ検知用標準プラスミド

誰でも容易に入手可能

zSSI**I**b

(特許出願中)

\*PCR (Polymerase Chain Reaction) : 試料中の特定DNA配列を何百万倍にも増幅させ、試料中のDNAの種類を判定 (定性PCR) したり、その増幅速度から元のDNA量を測定する (定量PCR) 方法

あぐり博士の

# バイオ教室

なおちゃん



いくみくん



あぐり博士



食品科学広報センター

遺伝子組み換え食品

【くらし編】

# 私たちのくらしと 遺伝子組み換え食品

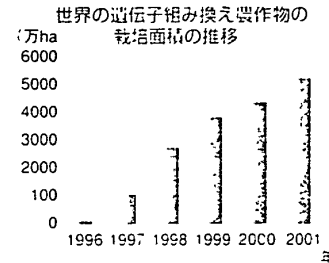


食品科学広報センター

## 遺伝子組み換え農作物は、 いろいろな国で栽培されて



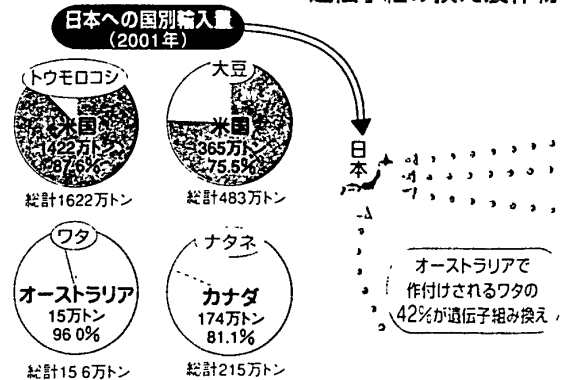
どれくらい栽培されているの？



どんなものがあるの？



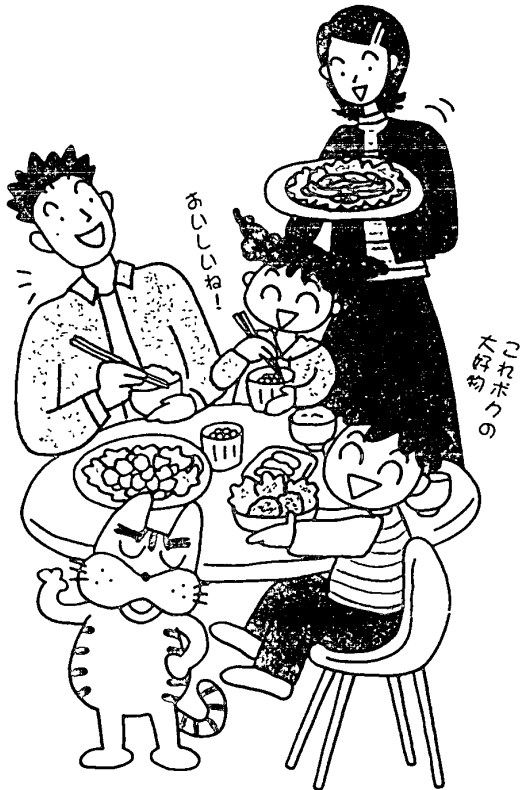
遺伝子組み換え農作物



遺伝子組み換え食品

【安全性編】

## 遺伝子組み換え食品を 食べても大丈夫ですか？



食品科学広報センター

## 安全性が確認されたうえで

遺伝子組み換え食品を食べてもよいかどうか、その安全性は厚生労働省によって審査されています。さまざまな評価が行われて、安全性が確認されたものが私たちの食卓に届きます。



もちろん牛になることはありません。遺伝子を食へたからといって、その遺伝子が人間の遺伝子に組み込まれることはありません。

# 遺伝子組み換えって どんな技術なの？



食品科学広報センター

## 遺伝子組み換えは21世紀の技術

遺伝子組み換え食品って21世紀の私たちの生活とどんな関係があるのかな？



# 遺伝子組み換えって わたしたちの環境と どんな関係があるの？



食品科学広報センター

## 遺伝子組み換え技術は環境との



害虫に強いBtトウモロコシを栽培しても  
チョウの生態に影響がないことが  
既に確認されています



気になること、

解らないこと、

知りたいたいこと。

解りたいたいし、知りたいたい。

そのままにしておけない。

## 北野大さんとおいしい午後バイテックゼミ『進行プログラム』

13:00 受付開始

13:30 開催ごあいさつ

13:40 第1部 頭の準備体操 ハイテックってなあに？

これはおいしいわかりやすい今までモヤモヤしていたバイテックの謎を一気に解いてしまいます

● 雲の道伝子組み換え卵 イサヘル＆ヘネ！が登場

● 卵様にバイテックに関する基礎知識を出題します

● クイズ解き用紙 に記入していただきます (正解の数だけケーキの数が増えるとか？)

14:35 頭の準備体操のまとめ

● ハイオテクノロジーとは？道伝子とは？道伝子組み換え作物とは？

● クイズ解き用紙 をご参加の方めいめいお持ち帰り

14:40 休憩

● ティー&ケーキタイム

おいしいケーキを食べながら、ハイテックでこんなことかてきたらいいな、という夢の

ハイテック アイデアを思い描いて下さい

面白いアイデアにはホテルからレストランまでのお食事券をさしあげます

15:10 第2部 道伝子組み換え作物の安全性

チエアマン・北野大氏 (きなのまさる) 工学博士

ハネリス ト 日野 明寛氏 (ひのあきひろ) 農学博士

ハネリス ト 田部 井 真氏 (たへいゆたか) 農学博士

ハネリス ト 小崎 丈太郎氏 (こさきじょうたろう) シヤーナリスト

● ハネリスからの道伝子組み換え作物の安全性についての疑問点、注意点のお話

● 道伝子組み換え作物のハノトニュースは本当なのか？」についての専攻解説

→ ● 日本人の食生活とハイテックの関係について

● 人口増加や温暖化や地球規模で起っているさまざまな問題とハイテックとの関係

● 参加者からの質問に対する解答

16:15 第3部 夢のハイテック トーク

各ハネリスが語るハイテックの夢

● すでに完成したり、完成間近なハイテック製品の情報

● 研究者が目標としているさまざまなハイテックの夢

● ハイテック夢物語

参加者から寄せられたハイテック アイデアの審査コーナー

優秀アイデアには ホテルお食事券プレゼント

16:25 北野チエアマンによるまとめとごあいさつ

16:30 閉会

ハネリス ト：日野 明寛氏 (ひのあきひろ)

独立行政法人食品総合研究所

食品機能部味覚研究室長

企画調整部食品衛生対策チーム

リーダー

ハネリス ト：田部 井 真氏 (たへいゆたか)

独立行政法人農業生物資源研究所

植物細胞工学研究グループ

植物細胞工学研究チーム

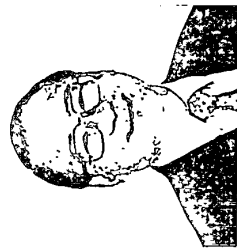
農学博士

ハネリス ト：小崎 丈太郎氏 (こさきじょうたろう)

日経ハイオビジネス 編集長

こあいさつ

この度は 北野人さんとおいしい午後のバイテクゼミへ  
ご参加いただきまして誠にありがとうございます。  
食糧、医療、環境など現代が抱えるさまざまな問題の解決に向けて、  
バイオテクノロジーへの期待が次第に高まりつつあります。  
これまで考えることのがなかつたバイオテクの今について、  
そして大きな可能性を秘めた未来にについて、  
この機会に、皆様にもぜひ一緒に考えていただきたく、  
当ゼミを開催いたします。



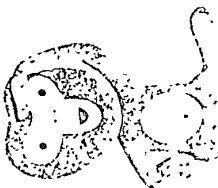
チエアマン：北野大氏 (科学者)

筑波大学 国際コミュニケーション学部教授 工学博士  
1972年、東京都立大学大学院 工学研究科 工業化学専攻博士課程修了  
大学で教える傍ら、発酵業、タレント業など幅広い分野で活躍中

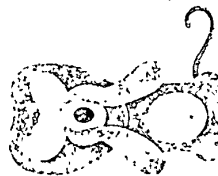
主な著書

- 僕が化学者になった理由
- なせか、たけしの兄です。
- 化学物質の安全管理
- いま飲み水が恐ろしい

見よう!



話そう!



聞こう!



2002

Biotech Science Garden

「北野大さんと

# おいしい午後のバイテクゼミ」

いま話題の「遺伝子組み換え食品」を含むバイオテクノロジーについて、  
皆様からのさまざまな質問と疑問にお答えしながら、楽しくすすめるゼミナールです。  
バイオテクに関するアレコレについて、わかりやすく愉快なトークショーとクイズ、  
リクワクするような専門家による解説も登場します。ゲストは科学者の北野大氏。  
ホテル自慢のケーキとティーもご用意。バイオテクについて、見よう！聞こう！聞こう！  
午後のひとときを楽しく有意義にお過ごし下さい。



## 本日のシンポジウムについてアンケートにご協力下さい

### 1. シンポジウムの内容はいかがでしたか？

- 講演  わかりやすかった  全体  有意義であった  
 わかりにくかった  有意義でなかった  
 どちらともいえない  どちらともいえない  
 その他 ( )  その他 ( )

### 2. 本日のシンポジウムに出席した感想で、あてはまるものすべてにチェックして下さい。(複数回答可)

- 以前より、遺伝子組み換え食品の安全性がどのように審査されているかについて理解が深まった  
 以前より、アレルギー誘発性の評価方法について理解が深まった  
 以前より、遺伝子組み換え食品の安全性について不安感が少なくなった  
 以前より、遺伝子組み換え技術の必要性や有用性を感じるようになった  
 以前より、不信感が強くなった(どういう点ですか?)  
 その他 ( )

### 3. 遺伝子組み換え技術は今後どのようなことに役立つと思いますか？(複数回答可)

- 食糧増産に役立つ開発  栄養価の高い食品の開発  
 人の健康を増進する食品の開発  非アレルギー誘発性食品の開発  
 医薬品として利用できる食品の開発  価格低減につながる開発  
 環境問題に貢献する開発  エネルギー問題に寄与する開発  
 その他 ( )

### 4. 食品を購入する際に、遺伝子組み換え食品について気にしていますか？

- 特に気にしていない  
 多少値段が高くても「遺伝子組み換えでない」と表示されているものを買う  
 値段が同じなら「遺伝子組み換えでない」と表示されているものを買う  
 その他 ( )

### 5. 遺伝子組み換え食品についての情報は、主にどのような方法で得ていますか？(複数回答可)

- 新聞  書籍  雑誌  テレビ、ラジオ  インターネット  
 チラシ  パンフレット、広報誌  シンポジウム、セミナー、勉強会など  
 その他 ( )

### 6. 遺伝子組み換え食品について、どのような情報源に信頼をおいていますか？(複数回答可)

- 行政機関  食品業界団体  消費者団体などの団体  生協などの団体  
 学者・研究者  開発企業  新聞・テレビなどメディア  
 その他 ( )

### 7. ご意見、ご感想、今後希望される情報などございましたらお聞かせ下さい。

{

●さしつかえなければ、あてはまるものにチェックして下さい。

- 性別  男性  女性  
年代  20代  30代  40代  50代  60代  70歳以上  
所属  保健所  栄養士  教育関係  消費者団体  行政・団体  企業  
 消費生活相談員・アドバイザー・コンサルタント  メディア  
 その他 ( )

ご協力ありがとうございました。



## クイズ解答用紙

Q1

1. 古代    2. 平安時代    3. 明治時代    4. 昭和になってから

Q2

Q3

1. ジャガイモ    2. 大豆    3. パイナップル  
4. パパイア    5. スイカ    6. トウモロコシ



## 「バイテクの夢」記入用紙

### 記入事例

科学的根拠や裏づけのない、奇想天外のもので構いません。  
例えば、

- 海水で育ち、美味しく食べられるイネ
- 人を癒してくれ、挨拶をしてくれる室内鑑賞生花

### 記入欄

(お名前 : )



# アンケート用紙

(性別) 男 ・ 女 (年齢) 才

まず皆様の「遺伝子組み換え食品」に関する、このバイテクゼミに参加する以前の認識や印象についてお伺いします。

注：お答えいただいた内容は、今後の活動の参考の為に、「〇〇という人が何%」という統計的な処理を致しますので、個々の回答内容によってご迷惑をおかけするようなことは一切ございません。ぜひ、率直なご意見・ご感想をお聞かせ下さいませようお願いします。

## Q1. 遺伝子組み換え食品についてどの程度ご存知でしたか？

1. 言葉は知っているが、内容はあまり知らなかった
2. 言葉も知っているし、どのような食品なのか内容についても知っていた
3. 全く知らなかった

## Q2. 日本で現在承認され、輸入販売されている遺伝子組み換え作物を、どの程度ご存知でしたか？

1. 全部知っていた
2. いくつかは知っていた
3. ほとんど知らなかった

### SQ2-1. 【「知っていた」とお答えの方へ】具体的にはどのような作物をご存知でしたか？

## Q3. 遺伝子組み換え食品についてどのようなイメージをお持ちでしたか？

1. 良いイメージを持っていた
2. どちらかといえば良いイメージを持っていた
3. 特に何のイメージも持っていなかった
4. どちらかといえば怖い・悪いイメージを持っていた
5. 怖い・悪いイメージを持っていた

## Q4. これまでの、遺伝子組み換え食品の利用に対するお気持ちは、どのようなものですか？

1. 非常に抵抗がある
2. やや抵抗がある
3. どちらともいえない
4. あまり抵抗はない
5. 全く抵抗はない

## Q5. 「抵抗感がある」とお答えいただいた方へ。それは何故ですか？ (1つだけお選びください)

1. 自然に作られたものが良いから
2. 何となく感覚的に嫌だから
3. よくわからないから
4. 安全性に不安があるから
5. 反対者が多いから
6. その他 (

## Q6. 「抵抗感がある」とお答えいただいた方へ。あなたが一番大きな影響を受けたと思われる情報経路は次のどれですか？ (1つだけお選びください)

1. テレビ番組
2. 新聞記事
3. 雑誌
4. 友人・知人
5. インターネット
6. 店頭情報や商品表示
7. セミナー

次に皆様の本バイテクゼミ終了後における、印象やご感想をお聞かせください。

**Q7. このバイテクゼミに参加して、遺伝子組み換え食品の必要性についてどのように感じましたか？**

- 1. とても必要なものだと思う
- 2. やや必要なものだと思う
- 3. どちらともいえない
- 4. あまり必要なものとは思わない
- 5. 全く必要なものとは思わない

**Q8. このバイテクゼミに参加して、遺伝子組み換え食品に対するイメージやお考えは変化しましたか？**

- 1. 以前に比べ良くなった
- 2. 以前に比べ少し良くなった
- 3. どちらともいえない
- 4. 以前より少し悪くなった
- 5. 以前より悪くなった

**SQ8-1. [「良くなった」という方へ] その理由を簡単にご記入ください。**

--

**Q9. このバイテクゼミに参加して、遺伝子組み換え食品の利用に対する、今のお気持ちはどのようなものですか？**

- 1. 非常に抵抗がある
- 2. やや抵抗がある
- 3. どちらともいえない
- 4. あまり抵抗はない
- 5. 全く抵抗はない

**Q10. このようなトークショースタイルのPR活動は有意義だと思えますか？**

- 1. そう思う
- 2. そう思わない
- 3. わからない

**Q11. 遺伝子組換え食品について、情報は今後も必要ですか？**

- 1. はい
- 2. いいえ

**Q12. 「はい」とお答えいただいた方へ。具体的にどんな情報活動が望ましいか、以下の中からお選びください。(いくつでもお選びください)**

- 1. より専門的なシンポジウムや勉強会
- 2. テレビ・ラジオのPR
- 3. 新聞・雑誌によるPR
- 4. 書籍出版
- 5. インターネット
- 6. スーパーなど店頭ツール
- 7. このようなトークショースタイルのPR
- 8. パンフレットなどによるPR
- 9. 政府広報
- 10. その他 ( )

**Q13. その他に、本日のバイテクゼミに対するご感想がございましたら、ご記入ください。**

--

ご協力ありがとうございました。今後もイベントの案内や資料をお送りいたします。  
ご希望の方はお名前、ご住所、電話番号をご記入ください。

お名前		TEL	
ご住所			

遺伝子組換え植物（GMO）の栽培試験状況

注1) 「開発者」と「隔離ほ場申請者」が同一の場合は、隔離ほ場申請者の項は「-」と示す。

注2) 安全性確認状況の項について、

- a. 「閉鎖系」は、文部科学省の指針に基づく閉鎖系温室実験の安全性に関する確認がなされた年を示す。
- b. 「非閉鎖系」は、文部科学省の指針に基づく非閉鎖系温室実験の安全性に関する確認がなされた年を示す。
- c. 「隔離ほ場」は、農林水産省の指針に基づく隔離ほ場試験の安全性に関する確認がなされた年を示す。  
\*は輸入目的のための安全性確認に加え、新たに栽培を目的とする安全性確認のための、隔離ほ場試験の安全性確認がなされた年を示す。
- d. 「栽培目的」は、国内の一般ほ場での栽培の安全性に関する確認がなされた年を示す。
- e. 「輸入目的」は、加工を目的とする輸入の安全性に関する確認がなされた年を示す。
- f. 「食品」は、食品衛生法（厚生労働省）に基づく食品としての安全性に関する審査が終了した年を示す。
- g. 「飼料」は、農林水産省の指針に基づく家畜飼料としての安全性に関する確認がなされた年を示す。
- h. 「系統」の数値は、系統（又は品種）の延べ数。
- i. 「-」は未確認を、「不要」は対象外を意味する。

作物	品種/系統	開発者	隔離ほ場申請者	特性	導入遺伝子	安全性確認状況						
						閉鎖系	非閉鎖系	隔離ほ場	栽培目的	輸入目的	食品	飼料
						-	-	184系統	66系統	98系統	42系統	36系統
アズキ	AR-9	農業研究センター	農業環境技術研究所	害虫抵抗性	アルファ-アミラーゼ・インヒビター遺伝子	1996	1997	1998	1999	1999	-	-
アルファルファ	J-101	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-
	J-119	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-
	J-163	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-
	J-286	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-
	J-101×J-286	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-
	J-119×J-163	日本モンサント	北海道農業研究センター 農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	2002	2002	2002	-	-	-	-

イチゴ	C-5	奈良県農業試験場	-	うどん粉病抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1992	1994	1998	-	-	-	-
	C系統	福岡県農業総合試験場	-	うどん粉病抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1998	1999	2000	-	-	-	-
イネ	日本晴:16-2	農業研究センター、農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	ウイルス抵抗性	イネ縞葉枯ウイルス外被タンパク質遺伝子	1990	1992	1993	1994	1994	-	-
	キヌヒカリ	農業環境技術研究所、(株)植物工学研究所	-	ウイルス抵抗性	イネ縞葉枯ウイルス外被タンパク質遺伝子	1990	1992	1993	1994	1994	-	-
	キヌヒカリ	三井東圧化学	農業環境技術研究所	低アレルゲン	イネアレルゲン遺伝子アンチセンス	1992	1993	1994	1995	1995	-	-
	アキヒカリ	加工米育種研究所	日本たばこ産業	造酒用低タンパク質	イネグルテリン遺伝子アンチセンス	1991	1993	1994	-	-	-	-
	日本晴:20-2	農業研究センター、農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	ウイルス抵抗性	イネ縞葉枯ウイルス外被タンパク質遺伝子	1990	1992	1996	1997	1997	-	-
	日本晴:21-3	農業研究センター、農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	ウイルス抵抗性	イネ縞葉枯ウイルス外被タンパク質遺伝子	1990	1992	1996	1997	1997	-	-
	月の光:H39	日本たばこ産業	-	造酒用低タンパク質	イネグルテリン遺伝子アンチセンス	1994	1995	1997	1998	1998	-	-
	月の光:H75	日本たばこ産業	-	造酒用低タンパク質	イネグルテリン遺伝子アンチセンス	1994	1995	1995	1998	1998	-	-
	系統4	(財)岩手生物工学研究センター	-	除草剤耐性	ピアラフオス抵抗性遺伝子	1997	1997	1998	-	-	-	-
	KA45	オリノバ	-	低グルテリン	アンチセンスグルテリン遺伝子	1997	1998	1999	-	-	-	-
	KA48	オリノバ	-	低グルテリン	アンチセンスグルテリン遺伝子	1997	1998	1999	-	-	-	-
	KA119	オリノバ	-	低グルテリン	アンチセンスグルテリン遺伝子	1997	1998	1999	-	-	-	-
	KA130	オリノバ	-	低グルテリン	アンチセンスグルテリン遺伝子	1997	1998	1999	2000	2000	-	-
	LLRICE06	アグレボ・ジャパン	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1999	-	-	-	-
	LLRICE62	アグレボ・ジャパン	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1999	-	2000	-	-
	730	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-
1107	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-	

1316	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-
1702	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-
1708	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-
1763	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1999	2000	2000	-	-
AFT105-15	全国農業協同組合連合会	-	ラクトフェリン産生	ラクトフェリン産生遺伝子	1996	1998	2000	-	-	-	-
G2-59	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	2001	2001	-	-
G2-60	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	-	-	-	-
G2-69	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	-	-	-	-
G2-70	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	2001	2001	-	-
G2-138	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	2001	2001	-	-
G2-143	モンサント、愛知県農業総合試験場	モンサント、愛知県農業総合試験場	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	1998	1999	2000	-	-	-	-
CT2	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	細菌病抵抗性	エンバク・チオニン遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER2-1	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER2-2	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER2-3	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性注	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER2-4	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER3-1	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
N-ER3-2	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
K-ER2-1	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
K-ER2-2	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-



	K-ER3-1	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
	K-ER3-2	中央農業研究センター北陸研究センター	中央農業研究センター北陸研究センター	いもち病抵抗性	イネ・キチナーゼ遺伝子	1999	2000	2001	-	-	-	-
	PE2	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	高光合成	トウモロコシ・C4型PEPC遺伝子	1999	2000	2002	-	-	-	-
	PE84	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	高光合成	トウモロコシ・C4型PEPC遺伝子	1999	2000	2002	-	-	-	-
カーネーション	A-127	DNAP、サントリー	野菜・茶業試験場	日持ち延長	エチレン合成酵素遺伝子(コサブレーション)	AUS	1994	1995	1996	1996	不要	不要
	系統 2	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1996	1997	1997	不要	不要
	系統 11	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1996	1997	1997	不要	不要
	959	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	-	-	不要	不要
	988	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	-	-	不要	不要
	1226	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	-	-	不要	不要
	1351	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	1998	1998	不要	不要
	1363	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	1998	1998	不要	不要
	1400	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	アントシアニン合成遺伝子	AUS	AUS	1997	-	-	不要	不要
	121. 2. 7	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
	121. 2. 29	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	-	-	不要	不要
	121. 3. 12	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
123. 1. 36	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要	

123. 1. 40	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	-	-	不要	不要
123. 2. 12	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	-	-	不要	不要
123. 2. 38	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
1. 8. 124	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	2000	2000	不要	不要
8. 6. 25	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
12 1. 8	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
16. 0 66	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	2000	2000	不要	不要
17. 3. 67	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
18. 3. 33	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
20. 9. 53	フロリジーン、サントリー	-	日持ち延長	1-アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素遺伝子	AUS	AUS	1998	1999	1999	不要	不要
123. 1. 14	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1999	-	-	不要	不要

	123. 2. 57	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1999	-	-	不要	不要
	123. 8. 8	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1999	2000	2000	不要	不要
	123. 8. 14	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	1999	-	-	不要	不要
	123. 2. 2	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子	AUS	AUS	2002	-	-	不要	不要
カリ フラ ワー	TSB201	タキイ種苗	-	雄性不稔、除草剤耐性	雄性不稔遺伝子、グルホシネート耐性遺伝子	1994	1995	1997	-	-	-	-
	CF156	タキイ種苗	-	除草剤耐性、雄性不稔	グルホシネート耐性遺伝子、雄性不稔遺伝子	1996	1997	1999	2001	2001	-	-
キ ク	pacl, 2	麒麟麦酒	-	RNA 病原体抵抗性	二重鎖特異的 RNA 分解酵素遺伝子	1997	1997	1998	2002	-	不要	不要
	pacl, 14-2	麒麟麦酒	-	RNA 病原体抵抗性	二重鎖特異的 RNA 分解酵素遺伝子	1997	1997	1998	2002	-	不要	不要
	pacl, 29	麒麟麦酒	-	RNA 病原体抵抗性	二重鎖特異的 RNA 分解酵素遺伝子	1997	1997	1998	2002	-	不要	不要
キ ュ ウ リ	CR-29	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	灰色カビ病抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1996	1997	1998	1999	1999	-	-
	CR32	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	灰色カビ病抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1996	1997	1998	1999	1999	-	-
	CR33	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	灰色カビ病抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1996	1997	1998	1999	1999	-	-
	TI-7	青森県グリーンバイオセンター	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1995	1998	1999	-	-	-	-
コ	MON71800	モンサント	北海道農業研究セ	除草剤	グリホサート耐	USA	USA	2001	-	-	-	-

ムギ			ンター	耐性	性遺伝子									
ジャガイモ	メイクイン	北海道グリーンバイオ研究所	北海道農業試験場	ウイルス抵抗性	ジャガイモ葉巻ウイルス外液タンパク質遺伝子	1992	1993	1994	-	-	-	-		
	BT6	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	-		
	BT10	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	BT12	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	BT16	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	BT17	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	BT18	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	BT23	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	SPBT02-05	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	-		
	SPBT02-07	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	SPBT04-06	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	SPBT04-30	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	SPBT04-31	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
	SPBT04-36	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	/	/	/	-	-		
RBMT21-129	モンサント	-	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子 ジャガイモ葉巻ウイルス アプリケーション 遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	-			
RBMT21-350	モンサント	-	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子 ジャガイモ葉巻ウイルス アプリケーション 遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	-			
RBMT22-82	モンサント	-	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子 ジャガイモ葉巻ウイルス アプリケーション 遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	-			

	メイクイン	農業生物資源研究所	農業環境技術研究所	スクロースリン酸合成	トウモロコシ由来スクロースリン酸合成酵素遺伝子	1999	2001	2002	-	-	-	-
ダイズ	40-3-2	モンサント	農業環境技術研究所	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	1994	1995	1996	1996	2001	1996
	260-05	デュポン	北海道農業試験場	高オレイン酸含有	高オレイン酸遺伝子	USA	USA	1998	-	1999	2001	2000
	A2704-12	ヘキスト・シェーリング・アグレボ	北海道農業試験場	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1998	-	1999	2002	-
	A5547-127	アグレボ・ジャパン	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1999	-	2001	2002	-
	GU262	アグレボ・ジャパン	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1999	-	-	-	-
タバコ		日本たばこ産業	-	ウイルス抵抗性	CMV サテライト RNA の cDNA	1988	1992	1994	-	-	不要	不要
	35S-3	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
	GY1-2	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
	35S1-3	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
	G6i-3	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
	CR16.1-2	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
	CR16.2-2	住友化学工業	野菜・茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	GUS 酵素産生	GUS 産生遺伝子	1995	1999	2000	-	-	不要	不要
テンサイ	T120-7	アグレボ・ジャパン	-	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	/	/	/	2001	1999
トウ	T-14	ヘキスト・シェーリング・アグレボ	北海道農業試験場	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1995	-	1997	2001	1997

モ ロ コ シ	T-25	アベンティスクロップサイエンス オノギ(ヘキスト・シェーリング・アグレボ)	北海道農業試験場、農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1995 2002*	-	1997	2001	1997
	MON810	モンサント	農業環境技術研究所	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	1996 2001*	-	1996	2001	1997
	MON802	モンサント	農業環境技術研究所	害虫抵抗性、除草剤耐性	Btタンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1996	-	1997	-	-
	Bt11	ノースラップキング	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	1996 2001*	2002	1996 2002*	2001	1996
	Bt11 スイートコーン	ノバルティスシード	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	害虫抵抗性 除草剤抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	2001	2002	2002	2001	-
	Event176	シンジェンタシード(チバシード)	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	害虫抵抗性、除草剤耐性	Btタンパク質産生遺伝子、グルホシネート耐性	USA	USA	1996 2002*	-	1996	2001	1996
	DLL25- DK566	デカルブ	東食、農業環境技術研究所	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1996	1997	1997	不要	不要
	DBT418- DK566	デカルブ	東食、農業環境技術研究所	害虫抵抗性、除草剤耐性	Btタンパク質産生遺伝子、グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1997	1997	1997	不要	不要
	MON832	モンサント	農業環境技術研究所	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	-	-	-
	MON809	バイオニア・ハイブレード・ジャパン	農業環境技術研究所	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	-	1998
	CBH351	プラント・ジェネティック・システムズ	北海道農業試験場	害虫抵抗性、除草剤耐性	Btタンパク質産生遺伝子、グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	1999	-	-
	GA21	モンサント	農業環境技術研究所	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	1998	1998	1998	2001	1999
	DLL25	デカルブ	農業環境技術研究所	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1998	-	1999	2001	2000
	DBT418	デカルブ	農業環境技術研究所	害虫抵抗性、除草剤耐性	Btタンパク質産生遺伝子、グルホシネート耐性遺伝子	USA	USA	1998	-	1999	2001	2000
	MS6	アグレボ・ジャパン	草地試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	除草剤耐性、雄性不稔	グルホシネート耐性遺伝子、雄性不稔遺伝子	USA	USA	1999	-	-	-	-
	MON853	モンサント	-	害虫抵抗性	Btタンパク質産生遺伝子	USA	USA	2000	-	-	-	-

MON863	モンサント	-	害虫抵抗性	Bt タンパク質産生遺伝子	USA	USA	2000 2002*	-	2001	2002	-
NK603	モンサント	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	2000	2001	2001	2001	2001
1507 系統	ダウ・ケミカル	農業環境技術研究所、(社)農林水産先端技術産業振興センター	害虫抵抗性、除草剤耐性	Bt タンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性遺伝子	USA	USA	2001	-	-	2002	2002
MON840-06	モンサント	-	害虫抵抗性	Bt タンパク質産生遺伝子	USA	USA	2001	-	-	-	-
MON88001	モンサント	-	害虫抵抗性、除草剤耐性	Bt タンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性	USA	USA	2002	-	-	-	-
MON88012	モンサント	-	害虫抵抗性、除草剤耐性	Bt タンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性	USA	USA	2002	-	-	-	-
MON88017	モンサント	-	害虫抵抗性、除草剤耐性	Bt タンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性	USA	USA	2002	-	-	-	-
MON88041	モンサント	-	害虫抵抗性、除草剤耐性	Bt タンパク質産生遺伝子、グリホサート耐性	USA	USA	2002	-	-	-	-
トマト	農業環境技術研究所、農業生物資源研究所、農業研究センター	-	ウイルス抵抗性	TMV 外被タンパク質遺伝子	1988	1989	1991	1992	1992	-	-
405	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1994	1995	1996	1996	-	-
707	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1994	1995	1996	1996	-	-
ICI9	ゼネカ、カゴメ	-	高ベクチン含有	ポリガラクトソナーゼ遺伝子アンチセンス	1991	1994	1995	1996	1996	-	-
ICI13	ゼネカ、カゴメ	-	高ベクチン含有	ポリガラクトソナーゼ遺伝子アンチセンス	1991	1994	1995	1996	1996	-	-
	カルジーン、麒麟麦酒	-	日持ち延長	ポリガラクトソナーゼ遺伝子アンチセンス	USA	USA	1994	1996	1996	-	-
117	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1996	1996	1997	1997	-	-
1046	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1996	1996	1997	1997	-	-

	1204	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1996	1996	1997	1997	-	-
	1208	野菜・茶業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 外被タンパク質遺伝子	1992	1996	1996	1997	1997	-	-
	No. 4-7	北海道農業試験場	-	ウイルス抵抗性	CMV 抵抗性サテライト RNA 遺伝子	1993	1994	1998	2000	2000	-	-
ト レ ニ ア	1165	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	ジヒドロフラボノール-4-リダクターゼ耐性遺伝子、カルコン合成酵素遺伝子	1996	1997	1998	1998	1998	不要	不要
	1382	フロリジーン、サントリー	-	色変わり	ジヒドロフラボノール-4-リダクターゼ耐性遺伝子、カルコン合成酵素遺伝子	1996	1997	1998	1998	1998	不要	不要
ナ タ ネ	GT73	モンサント	農業環境技術研究所	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子、グリホサート分解酵素遺伝子	USA	1994	1995	1996	1996	2001	1996
	HCN92	ヘキスト・シェーリング・アグレボ	北海道農業試験場	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	CAN	CAN	1995	-	1996	2001	1996
	HCN10	ヘキスト・シェーリング・アグレボ	北海道農業試験場	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1997	2001	1998
	PGS1	プラント・ジェネティック・システムズ	北海道農業試験場	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1995	-	1996	2001	1996
	PHY14	プラント・ジェネティック・システムズ	-	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1997	2001	1998
	PHY35	プラント・ジェネティック・システムズ	-	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1997	2001	1997
	T45	ヘキスト・シェーリング・アグレボ	北海道農業試験場	除草剤耐性	グルホシネート耐性遺伝子	CAN	CAN	1995	-	1997	2001	1997
	PGS2	プラント・ジェネティック・システムズ	北海道農業試験場	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1996	-	1997	2001	1997
	PHY36	プラント・ジェネティック・システムズ	-	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1997	2001	1997



	PHY23	プラント・ジェネティック・システムズ	-	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1997	2001	1999
	Westar-Oxy-235	ローズ・プーラン油化アグロ	北海道農業試験場	除草剤耐性	プロモキシニル耐性遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1998	2001	1999
	MS8RF3	プラント・ジェネティック・システムズ	北海道農業試験場	除草剤耐性、雄性不稔、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、花粉生産阻害遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1997	-	1998	2001	1998
	MS8	プラント・ジェネティック・システムズ	野菜・茶業試験場	除草剤耐性、雄性不稔	グルホシネート耐性遺伝子、雄性不稔遺伝子	CAN	CAN	1998	-	-	2001	1999
	RF3	プラント・ジェネティック・システムズ	野菜・茶業試験場	除草剤耐性、稔性回復	グルホシネート耐性遺伝子、稔性回復遺伝子	CAN	CAN	1998	-	-	2001	1999
	RT200	モンサント、野菜茶業試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター	-	除草剤耐性	グリホサート耐性遺伝子、グリホサート分解酵素遺伝子	CAN	CAN	2001 2002*	-	-	2001	2001
ノシバ	EG6	ジャパン・ターフグラス	-	糸状菌抵抗性	$\beta$ -1, 3エンドグルカナーゼ遺伝子	1993	1995	1998	-	-	不要	不要
	EG38	ジャパン・ターフグラス	-	糸状菌抵抗性	$\beta$ -1, 3エンドグルカナーゼ遺伝子	1993	1995	1998	-	-	不要	不要
パパイア	55-1	コーネル大学、ハワイ大学、アップジョン	マック、国際農林水産業研究センター、(社)農林水産先端技術産業振興センター	ウイルス抵抗性	パパイア・リングスポット・ウイルス外被タンパク質遺伝子	USA	USA	1999	-	2000	-	-
ブロンコリー	TBR101	タキイ種苗	-	雄性不稔、除草剤耐性	雄性不稔遺伝子、グルホシネート耐性遺伝子	1994	1995	1997	-	-	-	-
	BR891	タキイ種苗	-	除草剤耐性、雄性不稔	グルホシネート耐性遺伝子、雄性不稔遺伝子	1996	1997	1999	2001	2001	-	-
ベチュニア		サントリー	農業環境技術研究所	ウイルス抵抗性	TMV 外被タンパク質遺伝子	1990	1991	1993	1994	1994	不要	不要
ベン	T9	ジャパン・ターフグラス	-	糸状菌抵抗性	キチナーゼ遺伝子	1993	1995	1998	-	-	不要	不要

ト グ ラ ス	T31	シャパン・ターフ グラス	-	糸状菌 抵抗性	キチナーゼ遺伝 子	1993	1995	1998	-	-	不要	不要
メ ロ ン	プリンス メロン	農業研究センタ ー、農業生物資源 研究所	農業環境技術研究 所	ウイルス抵抗 性	CMV 外被タンパク 質遺伝子	1990	1992	1993	1996	1996	-	-
レ タ ス	G17-1-1	(財)電力中央研究 所、農業環境技術 研究所、(社)農林 水産先端技術産業 振興センター		高鉄含 有レタ ス	フェリチン遺伝 子	1999	2000	2000	-	-	-	-
	G31-2-1	(財)電力中央研究 所、農業環境技術 研究所、(社)農林 水産先端技術産業 振興センター		高鉄含 有レタ ス	フェリチン遺伝 子	1999	2000	2000	-	-	-	-
フ タ	531	モンサント	九州農業試験場	害虫抵 抗性	Bt タンパク質産 生遺伝子	USA	USA	1996	-	1997	2001	1997
	757	モンサント	九州農業試験場	害虫抵 抗性	Bt タンパク質産 生遺伝子	USA	USA	1998	-	1999	2001	1997
	1445	モンサント	九州農業試験場	除草剤 耐性	グリホサート耐 性遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	2001	1998
	10109	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	除草剤 耐性	プロモキシニル 耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	-	-	-
	10211	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	除草剤 耐性	プロモキシニル 耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	2001	-
	10215	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	除草剤 耐性	プロモキシニル 耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	2001	1998
	10222	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	除草剤 耐性	プロモキシニル 耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	2001	1998
	10224	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	除草剤 耐性	プロモキシニル 耐性遺伝子	USA	USA	1997	-	1997	-	1998
	31807	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	害虫抵 抗性、 除草剤 耐性	Bt タンパク質産 生遺伝子、プロ モキシニル耐性 遺伝子	USA	USA	1998	-	1998	-	1999
	BG4740	モンサント、カル ジーン	九州農業試験場	害虫抵 抗性、 除草剤 耐性	Bt タンパク質産 生遺伝子、プロ モキシニル耐性 遺伝子	USA	USA	1998	-	1998	-	-
	1849 系 統	モンサント	九州農業試験場、 (社)農林水産先 端技術産業振興セ ンター	害虫抵 抗性	Bt タンパク質産 生遺伝子	USA	USA	1999	-	-	-	-
	15985 系 統	モンサント	九州農業試験場、 (社)農林水産先 端技術産業振興セ ンター	害虫抵 抗性	Bt タンパク質産 生遺伝子	USA	USA	2000	-	2001	-	-

(注) 生のパレイショ及びテンサイの輸入は植物防疫法により禁止されており、加工食品としての輸入のみであり国内における増殖の可能性がないため、「ジャガイモ」の品

種/系統「BT6」から「SPBT04-36」及び「テンサイ」における「隔離ほ場」「栽培目的」「輸入目的」の安全性確認は不要であることから、それぞれの欄は／としている。  
またキクの利用については品種育成のための限定的利用である。  
資料：農林水産省農林水産技術会議事務局技術安全課

附件十五

行政院衛生署藥物食品檢驗局九十一年九月份第三次局務會議

「出國人員心得報告」

9月13日

報告人：第五組 荐任技士 林旭陽

1.出國主題：至日本食品總合研究所考察、研習基因改造食品之檢驗技術

2.前往國家：日本

3.出國期間：91年7月28日至91年8月24日

4.出國目的：瞭解與學習日本基因改造食品檢驗技術現況與方法，作為對基因改造食品檢驗技術研究與發展之參考。

5.活動內容：

研習期間共計四週，研習內容主為三部分（1）學習日本基因改造食品檢驗技術與方法（2）定量分析及儀器之操作與污染之防止（3）參與日本舉辦之實驗室聯合評估(Collaboratory-study)。

6.心得：

(1) 日本基因改造食品檢驗技術與方法之開發由農林水產省與厚生勞動省共同主導，參與單位包括獨立行政法人食品總合研究所(NFRI)、厚生勞動省國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)、獨立行政法人農林水產消費技術中心、27個私立實驗室與公司，同時韓國衛生部(KFDA)、國立農業生技研究所(Korean National Institute of Agricultural Biotechnology)國立農業產品品質管理服務所(Korean National Agricultural Products Quality Management Service)等三十多個單位參與共同研究開發基因改造食品檢驗方法。

(2) 目前已經開發完成的基因改造食品檢驗技術與方法針對一種大豆與五種玉米，其標準參考物質則分別將大豆與玉米之部分基因轉殖於二個不同質體上，所使用之同步定量PCR系統為ABI PRISM 7700，食品總合研究所亦積極改良其檢測方法，以期能符合新機型之分析與應用；發色系統採用Taqman系統，使用不同之引子與探針，再針對不同目標基因之PCR反應結果個別

計算標準曲線與基因數，再以插入基因數與參考基因數比和反應係數乘積計算其中之含量；而尚有三種玉米、二種馬鈴薯與一種大豆之檢驗方法正積極開發研究中。

- (3) 參與實驗室共同試驗之材料與試劑試藥等之製備，進而瞭解此次實驗室共同試驗之主要目的在於 1.定性檢測下限之驗證、2.評估以 ABI PRISM 7700 檢測 GMOs 定量分析之信賴性、3.定量分析法於不同儀器間差異之評估。參與單位共有 42 個單位參加，其中韓國 7 個實驗室與本局等 8 個海外實驗室。根據目前時間表，七月二十九日資料寄送，七月底至八月中消耗品準備，八月中開始進行機器精度測試(一週)，內標比測試(二週)，盲樣測試(二週)，試驗結果集計與解析(二週)，預計於十月底可以完成實驗室共同試驗研究。

建議：

- (1) 日本政府大力推動基因改造食品管理機制，從法規至執行，行政區域、工作執掌與權責均已經建立合作無間之系統機制，分別從各方面著手於基因改造食品管理，在明年基因改造食品標示制度即將上路之前，國內衛生、農政、學術與業界之力量，分工與合作亟有待整合。
- (2) 檢驗為最後之手段，亦為解決爭議根本之道，本局應持續建立基因改造食品檢驗方法，進行實驗室間方法試驗與比對，實驗室間能力分析等。
- (3) 大眾教育與溝通亦是不可忽視之一環，目前台灣民眾對基因改造食品之接受程度尚不明確，因此對於大眾教育與溝通亦應及早著手。