

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)

赴日本農林水產省獨立行政法人食品總合研究所
(NFRI)及日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)考察
基因改造食品及食品中過敏原之管理與檢驗研究現況

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：林澤揚¹、吳宗熹²、謝佩君³

出國地點：日本

出國期間：1：九十二年七月二十一日至八月十七日

2：九十二年七月二十七日至八月二十四日

3：九十二年八月三日至八月三十一日

報告日期：九十二年十一月二十一日

I0/
109204392

系統識別號:C09204392

公務出國報告提要

頁數: 136 含附件: 否

報告名稱:

赴日考察[基因改造食品檢驗技術]

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:

謝佩君	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	薦任技士
吳宗熹	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	薦任技士
林澤揚	行政院衛生署藥物食品檢驗局	第五組	薦任技士

出國類別: 考察

出國地區: 日本

出國期間: 民國 92 年 07 月 21 日 - 民國 92 年 08 月 31 日

報告日期: 民國 92 年 11 月 25 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, 食品中過敏原

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、韓國國家已陸續制訂相關法規或準則，並開始實施控管與監測。我國衛生署食品衛生處亦於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，且於今年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，預計於兩年後對市售相關產品進行全面性強制性標示。為配合標示制度的推行，藥物食品檢驗局已積極投入各種基因改造作物檢驗方法之開發，卓然有成，為使未來工作更貼近世界趨勢，藥物食品檢驗局二度派員赴日本「厚生勞動省-國立醫藥品食品衛生研究所」及「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。研習重點包括基因改造食品之定性與定量檢測及食品中過敏原之檢測，並蒐集有此二領域相關資訊，持續維持藥檢局與日本政府實驗室之交流。此外，九十一年赴日考察亦初步接觸日本有關食品中過敏原標示政策實施與食品中過敏原之檢驗研究議題。過敏症為一普遍發生於人類之症狀，而食品中所含之過敏原則為引起過敏症原因之一。目前食品中過敏物質亦為歐、美、日等先進國家所關切之食品安全議題之一，故別將食品中過敏原標示列為今年考察目的之一。本次考察，成果豐碩，不但學習各種相關之實驗操作技術，亦獲得豐富之食品安全管理資訊，對我國日後執行基因改造食品標示制度及檢驗研究工作或欲開展新的食品安全管理議題（如食品中過敏原之標示）時，提供最佳的參考資料材。期望日後能繼續加強合作交流，使雙方在食品安全領域之各方面議題達到相互支援共同成長之目標，並使我國的衛生管理制度世界接軌。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

赴日本農林水產省獨立行政法人食品總合研究所(NFRI)及日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)考察基因改造食品及食品中過敏原之管理與檢驗研究現況

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、韓國國家已陸續制訂相關法規或準則，並開始實施控管與監測。我國衛生署食品衛生處亦於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，且於今年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，預計於兩年後對市售相關產品進行全面性強制性標示。為配合標示制度的推行，藥物食品檢驗局已積極投入各種基因改造作物檢驗方法之開發，卓然有成，為使未來工作更貼近世界趨勢，藥物食品檢驗局二度派員赴日本「厚生勞動省-國立醫藥品食品衛生研究所」及「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。研習重點包括基因改造食品之定性與定量檢測及食品中過敏原之檢測，並蒐集有此二領域相關資訊，持續維持藥檢局與日本政府實驗室之交流。此外，九十一年赴日考察亦初步接觸日本有關食品中過敏原標示政策實施與食品中過敏原之檢驗研究議題。過敏症為一普遍發生於人類之症狀，而食品中所含之過敏原則為引起過敏症原因之一。目前食品中過敏物質亦為歐、美、日等先進國家所關切之食品安全議題之一，故別將食品中過敏原標示列為今年考察目的之一。本次考察，成果豐碩，不但學習各種相關之實驗操作技術，亦獲得豐富之食品安全管理資訊，對我國日後執行基因改造食品標示制度及檢驗研究工作或欲開展新的食品安全管理議題（如食品中過敏原之標示）時，提供最佳的參考資料材。期望日後能繼續加強合作交流，使雙方在食品安全領域之各方面議題達到相互支援共同成長之目標，並使我國的衛生管理制度世界接軌。

Part I :	4
摘 要.....	6
壹、目的.....	7
貳、過程.....	8
參、心得與建議.....	46
肆、附件.....	52
Part II :	53
摘 要.....	55
壹、目的.....	57
貳、過程.....	58
參、心得與建議.....	82
肆、附件.....	88
Part III :	89
摘 要.....	91
壹、目的.....	92
貳、過程.....	93
參、心得與建議.....	133
肆、附件.....	136

Part I

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

出國人員 職 稱：薦任技士

姓 名：林 澤 揚

研習地點 國 家：日 本

機 關：農林水產省

獨立行政法人食品總和研究所

出國期間：九十二年七月二十一日至八月十七日

目 次

摘 要.....	6
壹、目的.....	7
貳、過程.....	8
參、心得及建議.....	46
肆、附件.....	52

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

摘 要

隨著越來越多的基因改造作物陸續問世，基因改造食品之檢驗與管理亦發被全球所關切。除歐洲、澳洲及亞洲國家陸續制訂相關法規或準則，我國主管基因改造食品之機構－衛生署，也在食品衛生處及藥物食品檢驗局等的齊力規劃之下訂定了相關管理規範。依據 90 年 2 月 22 日衛生署所公告之基因改造黃豆及玉米查驗登記與標示等相關規定，我國於今(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，正式展開食品標示制度的歷史新頁，並預計於兩年後全面實施市售加工食品中基因改造黃豆及玉米之強制標示。有鑑於此，為使我基因改造食品的管理制度更能貼近世界趨勢，符合世界潮流之脈動，藥物食品檢驗局二度派員赴「日本獨立行政法人食品總和研究所」日野名寬博士實驗室，考察現今 GMO 檢測技術及其管理制度的更迭，從中吸取經驗並掌握基因改造食品檢驗技術之最新發展趨勢，以作為未來本局規劃檢測方法研發的參考。此次考察重點為基因改造食品之定量檢測、請益本局檢驗方法開發所遭遇之問題、納豆發酵加工製品之定性檢測、蒐集檢驗相關資訊及促進實驗室之交流。藉由此次交流所獲得的經驗及資訊，提供給本局日後發展相關檢測技術之參考。

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，基因改造作物（genetically modified organism, GMO）高產量之特性便被視為二十一世紀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在食品衛生安全議題上成為各國聚焦所在，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，並於今(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。為落實實施標示制度，建立一套正確而有效率之檢測方法則是當務之急。有鑑於此，藥物食品檢驗局二度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，考察重點為日本基因改造食品定性與定量檢測技術之現況，發酵類加工製品之定性檢測，解決本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，並多方面蒐集有關 GMO 檢驗、政府管理及教育環保等各方面資訊，實際考察市售包裝食品廠商執行標示之概況，並維持藥物食品檢驗局與日本政府所轄之食品總和研究所實驗室間之良好互動，拓展我國國際資訊交流之管道。所謂「他山之石可以攻錯」，引日方之資訊與經驗為我所用，以利我國管理制度之持續推行。

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 21 日至 8 月 17 日，扣除往返及假日，實際研習時程為二十日。我國已於今（92）年一月一日開始實施第一階段加工食品原料中基因改造玉米及黃豆成分之標示制度，計畫於未來兩年分別推行輕度加工食品及全面加工食品中基因改造玉米及黃豆成分之標示制度。為配合政策面所推行之基改食品標示制度，近年來藥檢局積極發展相關檢驗技術，卓然有成，在定性及定量分析方面已初步建立檢驗方法。然日本政府早在 2001 年 4 月 1 日起便實施基改食品標示制度，無論是在政府管理及檢驗之執行方面皆執牛耳地位，其所累積的豐富經驗正是我們效法與學習的最好教材。此行之目的地—食品總和研究所日野明寬博士實驗室座落於東京都北方茨城縣，該實驗室主要負責日本基改食品檢驗技術開發，期望在這段考察期間，能更深入瞭解日方在各種 GMO 產品檢驗技術開發之現況、學習發酵類加工製品之定性檢測、瞭解並釐清日本政府對 GMO 之管理體制，並彙集各種相關資訊。將研習行程整理分述如下：

七月二十一日（一）：起程

由中正機場搭乘長榮航空 BR-2197 班機，於上午 9:00 出發，於當地時間下午 1:10 飛抵日本新成田機場。此行雖然是第二次造訪「食品總和研究所食品味覺機能實驗室」，但每每想到此行更為沈重的研習任務，心情怎麼樣也輕鬆不起來，只好自我安慰盡力而為了。「食品總和研究所」位於茨城縣築波市之「農林園地中央」，「農林園地中央」為日本政府致力於農業方面研究之重鎮。食品總和研究所內除日野明寬博士的實驗室外還包含數十個專精於各種食品相關領域研究的實驗室，是日本農林水產省所管轄下主

要的食品研究機構。此行為第二次拜訪該實驗室，交通運輸方面還記憶猶新，離開成田機場後便自行搭車前往築波市，省卻日野博士接機的舟車勞頓。抵達築波市後再由日野博士開車載我至該研究中心之交流學者宿舍 (TIH) 辦理住宿，途中他並簡單敘述實驗室這一年來人員及任務上的變動，得知不少去年造訪時所結識的同事因為公務及個人因素紛紛離職，成員上有蠻大的異動，加上近幾個月日本在食品安全方面出了頗多問題（例如大陸多種農產品檢出過量農藥殘留、大陸鰻魚檢出抗生素等等，因此日方幾乎禁止大陸相關產品輸日！），使得食品安全成為各界關注的重點，相形之下 GMO 的議題就較為降溫冷卻了。今天是日本的國定假日，為日本對外國開放海港之首日紀念日，所以 NFRI 萬籟俱寂，餐廳、商店等都停止營業，幸得日野博士協助解決飲食問題，才不至於在抵達日本的第一晚就挨餓受凍，用餐時並與日野博士交換有關 GMO 之相關資訊，整理如附件一。就寢前，將明天到實驗室報到的準備事項瀏覽一遍，並試著調整自己的心情準備迎接挑戰，在忐忑不安的思緒中結束抵達日本第一天的行程。

七月二十二日（二）：

考察首日，我於九點整至實驗室報到。日本氣溫出奇的冷，相較去年此時真是大相逕庭，日野博士說受到全球溫室效應之影響，今年之氣候異乎常理的低溫，為近二十年來首見。省卻拜會該中心之行政部門官員之禮俗，日野博士直接帶我認識實驗室的成員，除了幾位舊識之外其餘的對我而言都是新面孔。GMO 研究團隊共計九人，定量 PCR 的機型有 ABI7700、ABI7000 各一台、Roche light-cycler 兩台、Bio-red I-cycler 一台，但是目前定量分析仍以 ABI 之機種為主，尤其著重於 ABI 7700。關於 GMO 實驗之研習，由兒玉貴志負責安排與教導，研習之主題經過與日野博士一番討論之後定案如下：1. 參與實驗室目前正進行之新品系定量 plasmid (ssIIb、MON863、NK603、TC1507、T25) 之 PCR 抑制效應之研究。2. 觀摩利用

multi-plex PCR 定性技術檢測四種品系之 GM 玉米 (TC1507、MON863、T25、NK603) 並利用 HITACHI 公司所研發之毛細管電泳(I-chip)儀器系統分析 multi-plex PCR 之結果。

實驗室成員中除了三、四位為該中心正式公務員之外，其餘皆為約聘僱之研究人員及來自其他公務機關之研習人員，如兒玉貴志來自”農林水產消費技術中心(CFQLCS)”、奧田智勇來自”橫濱植物防疫所”、村上隆紀來自”種苗管理中心”。除了兒玉貴志外，都是來此研習 GMO 檢驗相關技術，與我此行任務類似。奧田智勇所屬之”橫濱植物防疫所”，將於明年成立新的實驗室，負責國外整船穀物運送進入橫濱港口時，進行抽樣檢驗是否含有 GMO 之作物。聽他解說該中心之任務：若外國船舶運送水果及穀物進入日本，在橫濱港口必須進行抽驗，檢測項目包括昆蟲，抗生素等，而 GMO 項目為新的檢驗業務。玉米需檢驗是否含有 CBH 351 品系，黃豆目前並無檢驗項目、GM 馬鈴薯及 GM-木瓜已禁止進口，故無須檢驗。我雖進一步請教關於檢驗樣品之採樣(sampling)事宜，但奧田智勇表示，一方面由於 GMO 很多議題事項都仍在研議中，下週會有相關會議舉行，加上他的位階太低，並不清楚也無法明確答覆很多法規上的詳細情形。村上隆紀所屬之“種苗管理中心”亦位於築波市，該中心為一新設立之中心，目的在監控市面販售之種苗的標示是否正確（例如外包裝上標示為 non GM seed 是否與內容物相符）。根據奧田智勇先生及村上隆紀的簡單說明，似乎意味日野博士實驗室主要致力於 GMO 方法與技術的建立，而後續相關檢驗執行則交由其他如上述”橫濱植物防疫所”或“種苗管理中心”等中心來執行。後續之討論，整理如附件二。

前述提到毛細管電泳(I-chip)儀器，乃是用於分析 multiplex PCR 之增幅產物，目前用於檢測四種品系玉米的 PCR 增幅片段，據說效果頗佳。該儀器為 HITACHI 公司所發明，原理採用毛細管電泳法，樣品用量少，耗時短

(只需 30 min)，頗適合快速篩選，亦可用於其他類的 DNA 或 RNA 之電泳分析！機器本身需配合的特殊 kit 進行電泳(稱為 I-chip)，有點類似本局用於菌株鑑定之 VITEK 卡夾形式，一片 I-chip 可在 30 min 內分析 12 個樣品，及四種品系 GM 玉米，可說相當迅速！

七月二十三日 (三)：

早上望月秀明與我配合進行 ”I-chip” 相關實驗，先從以 Qiagen maxi-kit 抽取 DNA 開始，我負責抽取的樣品為米及小麥，望月秀明則負責黃豆及玉米。至於為何進行五種玉米的 ”I-chip” multi-plex PCR 需要抽取米及小麥的 DNA 呢？其目的是為了確認 PCR 反應時 primer-sets 的專一性，本試驗一共要測五種作物之 DNA，分別為玉米、米、小麥、黃豆及大麥等。因昨天大西真理小姐以實驗室現有之玉米 primer-sets 進行 PCR 反應後發現米及小麥有微弱之 DNA-band，懷疑是抽取後之 DNA 品質不佳所引起，故今天重新抽取 DNA，以便進行重複確認。

兒玉貴志提供一份 2002 年 6 月 20 日發行之英文版 Instruction manual for testing and analyzing genetically modified foods –part2- basic precedures，由日本農林水產消費技術中心(The center for quality labeling and consumer services)發行，日後相關之實驗操作都將依循該方法，亦即實驗操作之 SOP，如附件三。他並解說目前實驗室所研發的 GMO 標準品 plasmid 種類共有三種：第一種 plasmid 包含的基因有 (LE1、RRS、ssIIb、CaMV、NOS、Bt11、GA21、M810、E176、T25，但 T25 已經不使用了)，第二種 plasmid 包含的基因有 (ssIIb、M863、NK603、TC1507、T25)、第三種 plasmid 包含的基因有 (SSIIb、CBH351)。製備以上 plasmid 標準品時皆溶於 colE1/TE buffer 進行後續測試。

下午則將早上抽取完成之樣品 DNA 溶解於 50 uL 的 TE buffer，該樣品需於 4°C 靜置至明日早上，再進行 DNA 濃度的測定並進行後續實驗！隨後

請教兒玉貴志關於不同方法抽取樣品 DNA 並進行定量測定時的差異性，整理如附件四。

七月二十四日（四）：

早上先將昨天抽取完成的米及小麥的 DNA 進行稀釋並測定 DNA 濃度，結果如下表所示。DNA 品質都很好(OD. 260 / OD. 280 皆為 1.7 之上)，但小麥 DNA 經稀釋 50 倍後的測定濃度超過 1000 ug/ul，懷疑其中含有過量的 RNA，這表示之前抽取時所加入的 RNase 未發生作用！若欲確認則可採用電泳方式，DNA-band 會出現於 gel 的上端，而底端的則為 RNA-band，當 gel 中清楚出現 RNA-band 就表示 DNA 溶液中確實含有過量的 RNA。但經過比對以前的 DNA 抽出紀錄，發現小麥的 DNA 濃度確實會比較高！所以 DNA 抽取操作過程並無問題！

Sample ID	OD 260/280	Dil. factor	Conc.
米 1	1.83516	50	360.3537
米 2	1.81861	50	264.3054
小麥 1	1.80175	50	1236.456
小麥 2	1.79290	50	1537.951

PS：抽取方法為 Qiagen MAXI kit，樣品量為 1g。

至於加工食品 DNA 抽取的方法，去年來此研習時曾獲得一份關於日本政府規定必須進行 GMO 成分標示的加工品表列，如附件五，其中包含玉米、黃豆、及馬鈴薯加工製品，經過一年該份表列加工品項目並未有所更動。至於抽取方法之研發，黃豆及玉米部分由 NFRI 負責，但馬鈴薯部分則由位於東京的國立醫藥品食品衛生研究所負責。研發之抽取方法仍著重於 Genomic-tip（較佳）與 Qiagen kit 兩種，但 WAKO 公司（與 NFRI 有密切之合作關係）也正積極測試自行研發 DNA 之抽取 kit。DNA 抽取之難易度方面，最難抽取的樣品為：納豆、爆米花、味噌及玉米澱粉，且至目前

為止，Canned or bottled corn 仍無法順利抽取 DNA，方法上仍有待突破！

至於”定量 PCR 抑制效應之研究”的實驗方面，下午在谷中有香的指導下操作 NK603 的定量分析以評估樣品中 inhibitor 的問題！兒玉貴志說明實驗的目的時指出，方法研發過程需依據 ISO 表列的事項，不同步驟需進行不同的 control 測試以確認方法的正確性，如附件六，當進行至 Nucleic acid amplification 階段時，一旦確認 Negative matrix control 皆為負反應時，就必須進行 PCR inhibition control 之 test，以便確認『負反應』是否真為 specific-negative，而不是因為樣品中 inhibition 之結果所造成。

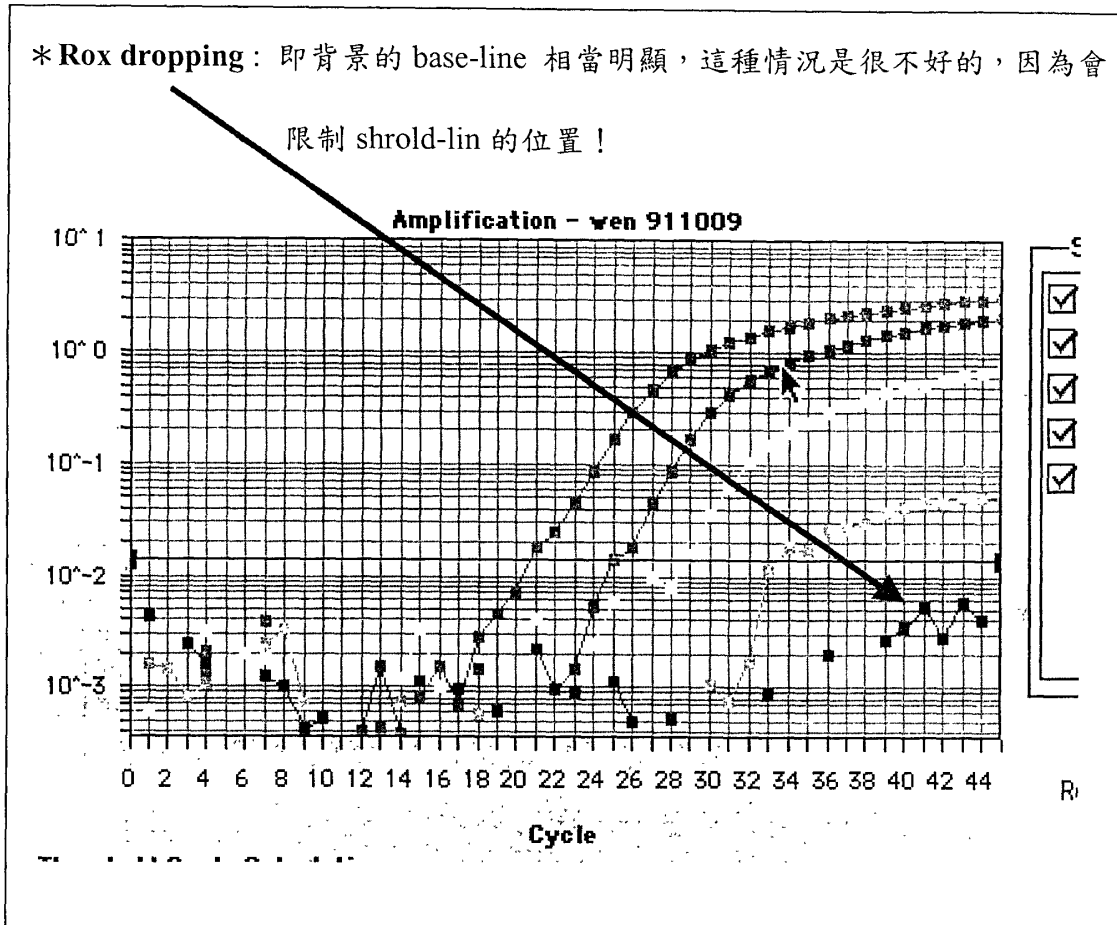
至於如何測試 inhibitor 的影響？其實就是把一般常用的樣品 DNA 濃度 (20 uM)再稀釋 5 倍成為 4 uM，然後把兩種濃度樣品分別進行定量實驗，分別測試 SSIb 及 GM(NK603)之濃度，評估是否真的相差 5 倍！若差異越大，表示 inhibitor 越嚴重！

谷中有香在進行 TC1507 之 CV 值評估實驗時發現，將 15 克的 TC1507 玉米粒磨粉後，進行三重複試驗，每重複各稱 1g 進行 DNA 抽取，於不同時間進行四次相同實驗，結果 CV 值竟然越來越低，問題出在哪裡目前仍不知道！關於 ABI7700 及 ABI7000 兩種定量分析機型的 performance，她表示 ABI7000 確實比 ABI7700 差！但當完成 ABI7700 部分的實驗後，將著手 ABI7000 的 CV test 部分試驗。至於 Roche lightcycler，現在實驗室中幾乎停擺，無人會用！重心大部分都轉移到 ABI 機器上了。

兒玉出示了一張他們研發 GMO 檢驗方法的流程圖，是由已離職的松岡猛所做，大致上跟本局之流程相符，就是多了比較多的 gene 資訊來源及自行配製各種百分比(W/W)的標準品，最後還需檢測該研發方法的檢測極限。至於如何確定所配製的各種百分比樣品之正確性，這又得追溯到原始的問題，目前為止的確無法”正確”確認配製品的準確性，但他翻出之前他們所發表聯合評估的結果表示，只需控制所配樣品與測定結果的 error-range 在 20

%即可。

研發流程中評估 probe 好壞時，會評估是否會有 **Rox dropping** 的問題，至於何謂 **Rox dropping**，參考下圖：



七月二十五日（五）：

早上進行昨日的 NK603 No. 1~4 sample（包含 20 uM 及 4 uM 兩種濃度）的定量 PCR 結果分析，計算後發現 CV 大約在 0.5 以上，唯獨 No.4 出現偏差，因此再將 No.4 重做，確定為操作誤差所致。重做後的 CV 就與 No. 1~3 之結果相近，如附件七所示！下午則再進行 NK603 No. 5-8 sample（包含 20uM 及 4uM 兩種濃度）樣品的定量分析，並趕在晚上離開實驗室前分

析完成，但結果的差異頗大，如附件八所示，由於不如預期的好，下週恐需進行重複確認。

關於不同方法抽取各種加工製品後進行定量分析的效果，依據實驗室所提供的資料整理如下表。整體而言 Qiagen genomic tip kit 仍較適用於加工製品之 DNA 製備。

加工品種類	Kit 種類	差異	Kit 種類	差異	Kit 種類
豆腐	Tip	相近	MAXI	相差 8 cycle	CTAB
魚肉香腸	Tip	1 cycle	CTAB	3 cycle	MAXI
水煮黃豆製品	MAX	相近	TIP	相近	CTAB
corn-starch	Tip	1 cycle	MAXI	2 cycle	CTAB

PS：Tip(Qiagen genomic tip kit)；MAX(Qiagen DNeasy Maxi kit)

實驗室成員中有位來自韓國「國立獸醫科學檢疫院微生物科」的訪問學者—鄭明恩女士，因她的所屬單位專注於「獸醫科學」方面之研究，所以對該國之食品 GM 管理及標示制度並不瞭解，而她所研習之項目也只著重於如何從禽畜類香腸製品中檢測 GM 成分。她說從韓國這些製品中已可測出確實含有大豆蛋白或玉米澱粉，因此如何判定這些添加品的原料是否為 GM 作物就顯得格外重要了！禽畜類香腸類製品中的大豆蛋白 DNA 較容易抽出及檢測，但玉米澱粉就很難抽取 DNA 進行檢測，截至目前她已試過六種 DNA 抽取方法，但效果都不佳，相較之下較好的是 Qiagen genomic Tip，而且以此 DNA 進行玉米 GM 基因檢測，效果尚可，但以之進行 Zein 基因 (internal control gene) 檢測時，靈敏度就下降很多，極不易測出 DNA 之 PCR 增幅產物，且她也認為 CTAB 方法確實不好，效率不佳，有機溶劑的使用也不符合環保的精神，唯一優點就是「節省經費」。

晚上時，問起兒玉先生農林水產食品消費技術中心是否還繼續針對「日

本市售鰻魚製品”進行來源及種類之檢測？他頗自豪的表示該計畫仍進行中，而且已經可以用 PCR 方法分辨來自日本、台灣、大陸及歐洲的鰻魚來源了！

七月二十六日～七月二十七日（六、日）：假日

假日的 NFRI 相當平靜，平時埋首研究的員工們經過一週的努力工作，假日正是好好養精蓄銳的時間。我則利用假日將一週來的學習心得與實驗報告整理完成，並利用空暇時至各大超級市場及賣場進行此行另一項考察任務—「市售加工食品包裝之 GM 標示情形」。相較於去年來訪時，今年具有標示之市售加工食品顯著增加，標示的項目種類也增加不少，其中包括馬鈴薯類製品、澱粉類製品、醬油類製品皆發現有相關之「NON-GM」標示產品，相關食品之照片，如附件九所示。由於澱粉類及醬油類等高度加工食品，依據日本現行法令是無須進行標示的，能發現標示有”non-GM”的這些製品，不禁令我相當好奇，或許我該請教實驗室的同仁到底廠商進行標示的原因何在。

七月二十八日（一）：

早上與谷中有香及兒玉貴志討論上週五所進行 NK603 No. 5~8 sample 的定量 PCR 分析結果，歸結 CV 值混亂之原因應該是進行實驗時，分析 ssIIb 及 NK603 所用的 master-mix 不同罐所致。他們說，一般在實驗開始前必須先估計 master-mix 之用量，當發現 master-mix 不夠時，必須先把兩瓶混勻後再進行後續 PCR 試劑之調配，以避免因 master-mix 不同批所引起之實驗誤差。確定問題原因後便開始今日所需進行兩盤實驗，分別為 T25 No. 1~4 sample 及重做 NK603 No. 5~8 sample。早上、下午各進行一盤之定量 PCR 實驗！

大西真理介紹實驗室現行電泳膠片之染色方法，仍使用膠片中添加

EtBr 的方式，她說採行此種方法較事後染色、脫色方式節省兩步驟，為了省時及增加敏感度起見，目前仍採用膠片中添加 EtBr 之方式！至於處理含 EtBr 溶液的方法，是使用一種類似過濾器的裝置，其中的濾心為關鍵所在，據說半年更換一次即可，當然仍需視處理量而定，如附件十所示。過濾後濾液即可直接排放，濾心亦可直接丟棄處理。更換濾心的判斷方法為檢查該濾心的濾液過濾速度，若滴漏的速度變得很慢，就表示該濾心需要更換了。濾心索價並不便宜，為日幣 1 萬元，但以環保觀點來看是蠻值得的！至於膠片部分，則是直接打包後焚化處理掉！

關於日本 GM 作物之安全評估，如附件十一之流程圖所示。整個流程與台灣現形制度頗為類似，由三個部會掌控負責，分別為「文部科學省」、「農林水產省」及「厚生勞動省」。「文部科學省」負責實驗室發展部分，隔離田間試驗及飼料部分由「農林水產省」負責，「厚生勞動省」則負責食品利用部分，三個單位合作，彼此環環相扣，形成一條由上游實驗室研發開始至下游產品商品化的管理鏈。

晚上巧遇任職於 ASAHI-beer 公司檢驗課的吉村倫彰先生，並邀請我參觀位於距 NFRI 不遠的 ASAHI-beer 研究中心。ASAHI 為日本第一大啤酒製造商，每年皆須進口大量穀物以供生產發酵類飲料，至於穀物進口所牽涉到之檢測 GM 作物一事，他說公司每批進口之黃豆必定會針對市場大宗之五種 GM 玉米進行檢測，以確認為 non-GM 玉米，也就是說該公司目前所用之原物料都是 non-GM，這些穀物皆進口自美國、加拿大及歐洲！至於小麥，他說目前並無 GM 小麥商業種植，所以不擔心！黃豆部分，因為 ASAHI 本身亦生產「乾燥豆腐」製品，因此原料黃豆需檢測是否含有 RRS-soybean。我提到為何市面上部分醬油仍需標示 non-GM？經他確認，醬油及酒類確實非強制性標示，但因為消費者擔心緣故，為取信消費者並藉以區別與競爭廠商之產品特性，進而刺激消費者之購買及選擇慾望，所以部分廠商會自

願性進行標示，由此不難發現日本消費大眾對於 GM 作物的看法已經呈現一面倒的”反對”。談起不久前國內新聞報導關於台灣檢測出部分大陸啤酒含甲醇一事，他除表示無法置信，並保證”青島啤酒”絕對沒問題，因為在日本青島啤酒是由 ASAHI 代工而後包裝販賣，在大陸，ASAHI beer 則是青島啤酒代工而後包裝販賣的，也就是兩家廠商技術合作及商標授權，這倒是令我頗感驚訝，原來這兩家啤酒廠有如此密切之合作關係。

七月二十九日（二）：

早上首先進行昨天兩盤 ABI-7700 實驗的數據分析，但因為 Apple 電腦作業系統版本上的差異，分析軟體頻頻出錯，只好求助望月秀明，經他幫助下載更新軟體後才恢復正常。谷中有香並交代我下午需進行兩盤 ABI-7700 實驗，第一盤為 Mon 863 No.2-5 sample、第二盤為 Mon 863 No.6-9 sample，這意味下午的工作將會相當忙碌！

今日，韓國鄭明恩女士將進行以 CTAB 法抽取肉製品之 DNA，她秀了一份截至目前的樣品成分資料，如附件十二所示。資料中共有 8 種肉製品，2 種火腿(ham)、2 種香腸(sausage)、另 4 種含 corn starch 的豬肉香腸試作品。據說此 4 種含 corn starch 的豬肉香腸試作是實驗室之博士後研究員柏葉晃一先生直接由廠商處要來的，並非市售產品。這些樣品中以澱粉含有率 10% 以上占最多！但鄭明恩女士表示，在韓國此種肉類加工製品之 corn starch 含量不會如此高，大多在 5% 以下，可能僅含 1~2% 左右，更增加檢測上的困難度。鄭女士將於下週一結束訪日行程，目前正緊鑼密鼓趕實驗，以便能趕在離開前完成「利用分生方法檢測肉製品中 GM 成分」之研究！我並將本局網頁上關於 GMO 之相關研究報告列印給她，藉機宣傳本局在 GM 領域之研究成果，達到國際資訊交流之目的。

關於谷中有香小姐目前已完成之各品系 GM 玉米 CV 測試之結果，部分數據確實令我感到相當困惑，比較”一粒玉米磨粉”及”12 克玉米磨粉”所

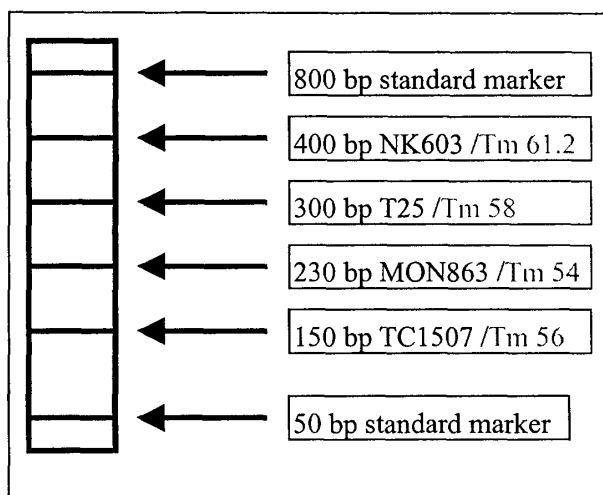
求得之 CV 值，幾乎都是”一粒玉米磨粉”之 CV 值高於”12 克玉米磨粉”，甚至 TC1507 的 CV 值，相同樣品分三天進行三次試驗，結果還會越來越低！這部分正是目前實驗室的成員最感苦惱的實驗瓶頸。

關於”橫濱檢疫所”之組織架構，因奧田智勇乃來自於”橫濱植物檢疫所”，遂向其請教兩單位之歸屬及執掌。”橫濱檢疫所”及”橫濱植物檢疫所”分屬”厚生勞動省”及”農林水產省”，皆位於橫濱地區並負責日本進出口農產品之相關檢疫工作，關於兩單位之歸屬及 GMO 權責差異，如附件十三所示。但當問及穀物船隻進入港口後，到底是由誰負責採樣檢驗呢！他顯得有些混淆，但他解釋”橫濱植物檢疫所”主要針對環境安全方面進行檢查，”橫濱防疫所”主要針對食品人體安全方面進行檢查，其實任務上是有部分重疊的，也許是需視該船穀物是作何用途來決定管理之負責單位。若為飼料用，則歸 MAFF 檢查；若為食品用，則歸 MHLW 檢查。

晚上，大西真理小姐示範如何利用 I-chip 毛細管電泳儀器檢測四種品系 GM 玉米之 multi-plex PCR 產物！這部分實驗是日野明寬博士與 WAKO 公司的古井聰先生共同合作之計畫，由大西真理小姐負責 multi-plex PCR 條件探討。此部分研究必須在月底前完成，並將成果回報 WAKO 公司的古井聰先生，以趕在九月份的 AOAC 會議時發表。一片 I-chip 可 loading 12 個 PCR 樣品，電泳所需時間為 6 分鐘，與傳統電泳相比的確節省許多時間。比較 I-chip 的電腦呈像及一般電泳片之照片，如附件十四所示，I-chip 之靈敏度相對好得多，一般膠體電泳上看不出來的 non-specific band 在 I-chip 之電腦上一清二楚，但本次結果並不理想，大西真理小姐看到結果後一直囔囔不知該如何向古井聰先生交代！

此次實驗，為檢測同時以 TC1507、MON863、T25、NK603 之 primer，分別與 TC1507、MON863、T25、NK603 四種 DNA templet 進行 PCR 反應及與 TC1507、MON863、T25、NK603、E176、GA21、Bt11、MON810 八

種 DNA template 進行 PCR 反應後，判斷 multi-plex PCR 是否出現 non-specific band，結果不盡理想，她說將先嘗試更換 TC1507 之 primer 看看，以解決 TC1507 沒有反應的問題！而 band 大小順序如下：



multi-plex PCR 之反應條件如下表：

95°C	10 cycles
63°C	
72°C	
↓	
95°C	30 cycles
60°C	
72°C	

七月三十日 (三)：

早上預定之實驗為進行 NK603 No.1-4 樣品之定量實驗，下午則需分析累積了兩天的數據。一早進入實驗大樓之大門就看到門口展示了各研究室的成果簡報，似乎預告將有重量級人物到訪，經詢問日野博士後才知道是 MAFF 的次長北村直人先生將來視察研究所內之成果。MAFF 每年都會不

會定期視察轄下各個研究單位，以督促研究工作之推行。只是官員們的視察多半屬於走馬看花性質，前後不過二十分鐘的視察卻已讓各個實驗室忙得不可開交了。

早上看到廠商送來 ABI master-mix，一時好奇問起同事送貨的先生是否為”ABJ”的 sales，經解說才知道日本跟台灣不同，”ABJ”為 product-producer，而銷售及分送則是交由其他行銷公司負責，也就是說 seller & distributor 可以有很多家公司，但 product-producer 就只有”ABJ”。這跟台灣 ABI 的角色又不一樣，台灣 ABI 反倒比較像日本 seller & distributor 角色了！

吳宗熹技士先前曾經介紹過日本政府的食品衛生管理組織，興起我瞭解日本食品管理體系的興趣。日本管理食品的相關律法及組織架構相當複雜，經過三個小時的討教後才稍微知道一點皮毛：日本政府之最高執政者為”總理大臣”，相當於總統，其下轄有管理如政治、經濟、教育、衛生、外交等等的部會，稱之為”省”。除此之外，尚有一較為特殊之組織—”內閣府 (Cabinet Office)”，內閣府的位階幾乎等同於上述的”省”，並不受任何”省”的管轄，而是直接對”總理大臣”負責。”內閣府”其下設立之「食品安全委員會」是新近的事，乃是為因應近年來狂牛症(BSE)所衍生出的龐大食品安全問題而設立的，其轄下雖不設立任何附屬的研究單位，卻可視情況需要要求其他”省”之研究單位為其工作，可見權力之大。本局王肇馨技士於今年五月份至 NFRI 考察所拜訪的一色賢司先生，目前已由 NFRI 轉調並任職「食品安全委員會」之事務局次長，升官的幅度頗大。

至於「食品安全委員會」所依據的食品相關法律，稱為『食品安全基本法』(平成 15 年 5 月 23 日法律第 48 號，最終改正---平成 15 年 6 月 11 日法律第 74 號)，如附件十五所示。內容共分為三章，為：總則、施政基本方針、食品安全基本法。至於該部會是否直接牽扯到 GMO 之管理，兒玉

先生是說無直接關連，但根據吳宗熹技士之介紹，「食品安全委員會」掌管食品風險性評估（risk assessment）以及風險性管理（risk management）事宜，這部分似乎又與 GMO 之管理息息相關，不知是不是因為不同人認知上的差異所致。至此為止，已知掌管日本食品安全方面之相關部會，就有『厚生勞動省 MHLW』、『農林水產省 MAFF』及『內閣府』了。『內閣府』的組織圖，如附件十六所示。其實，日本政府在制訂 GMO 的相關管理法律都是依循『聯合國 Catagena 生物安全議定書』。此部分，跟據奧田智勇先生手頭的公文資料可窺知一二，其中有一張圖表解說日本政府是如何依據『Catagena 生物安全議定書』規劃未來所要進行的工作及時程，可惜該文件屬機密文件無法取得。經他解說，在母法『Catagena 生物安全議定書』之下，各”省”也需制訂下一階的法律，甚至各”省”之下再制訂更下一階的法條，如同樹狀圖般的展開！但因為此部分是全新的業務，大家也都只知道個大原則，之後真正要如何推行各單位都仍在摸索階段！

鄭明恩女士則解說韓國政府關於 GMF 之管理組織。韓國政府對 GMF 之管理概分成三部會：

- 1、Crops 方面：由 NAQS (National Analysis Quarantee Services)負責，類似日本的 MAFF。
- 2、Foods 方面：由 KFDA 負責，類似日本的 MHLW。
- 3、Animal derived foods 方面：由鄭明恩女士單位『國立獸醫科學檢疫院』負責。

鄭明恩女士以不同方法抽取肉製品 DNA 進行 PCR 的後續電泳結果顯示，數種樣品確實測得 ssIIb 基因，表示這些肉製品中的確添加了部分玉米澱粉。而比較 35S promoter 之電泳結果，使用 Qiagen genomic tip kit 抽取之效果較 CTAB 法為佳，Qiagen genomic tip kit 所測得呈現正反應之樣品數比 CTAB 法多出 1-2 個樣品，可見針對肉類加工製品，Qiagen genomic tip kit

之 DNA 抽取效率確比 CTAB 法為佳。

七月三十一日（四）：

今日開始將有為期兩天的研討會，內容為 Gene-scan 美國區副總裁 Mr. Frank 介紹及示範該公司所研發之 GM-potato 及 GM 玉米 star-link 品系檢測套組。會議九點半在一樓底的會議室舉行，與會人員除實驗室同仁外，還有日本 FASMAC 公司的總裁 Mr. SATOSHI、來自”國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)”的渡邊先生及來自”農林水產消費技術中心(CFQLCS)”負責 GMO 業務的研究第二係長栗原秀夫及其部屬笠原正輝及白井裕一。栗原秀夫談起最近的工作項目，第一項為白井裕一所負責的洋蔥品種之 PCR 鑑別方法開發，第二項為笠原正輝所負責之比較以含有 0.5% 及 1% 之 GM 黃豆原料進行加工並製作成豆腐、YUBA 及黃豆渣粉（おから）製品後，原料所測得之 GM 黃豆濃度是否會與加工後之製品相符合，亦即確認加工過程對 GM 黃豆 DNA 之破壞影響。

FASMAC 公司的 Mr. SATOSHI 與 Mr. Frank 是舊識，Gene-scan 的日本代理權即為 FASMAC 公司所有，彼此在 GM 作物檢測方法之研究開發上亦有合作關係，雙方各自授權對方可在各自實驗室中測試並使用彼此的研發方法。此次 Mr. Frank 親自到日本進行 demo 示範，便是著眼於日本加工食品製造商皆須進行 GMO 相關標示時必須使用 GMO 檢測套組的龐大商機，Mr. SATOSHI 則負責 Mr. Frank 駐日期間的拜會及示範行程安排。

會議一開始免不了相互介紹及客套話，接著 Mr. Frank 開始解說套組操作方法及 potato 樣品 DNA 的稀釋及前處理，由於 GM potato 的檢測是由 NIHS 的渡邊先生負責，因此這些樣品都是渡邊先生所提供。樣品的種類及名稱，如附件十七所示。渡邊先生解釋第 11 號樣品雖標示為 non-GM，但之前在 NIHS 測試時發現有 New-Leaf 的 band，故懷疑已遭 New-Leaf 污染（約 0.1% 以下），因為污染量極低，大家都笑說該樣品正好可用來驗證

Gene-scan 測試套組的靈敏度！

該套組只針對 GM-potato 做定性分析，probe 乃針對 cryIIIa 設計，只要樣品中含有 GM-potato 便會呈現正螢光反應，套組操作很容易，只需先分裝 20 uL 之 master mix 到 96 孔盤的 well 中，接著加入 DNA solution，蓋上蓋子後上機就等著分析結果了。至於該套組的 low detection limit，Mr. Frank 解釋，因為目前為止 standard-material 的配製方法國際間並無共同認定的標準方法可依循，因此 low detection limit 就變得很難定義，譬如原料及加工過後的情形就不能相提並論。但該公司曾經用 potato 葉子進行試驗，當含量只有 0.1% 時套組仍然反應靈敏，而且該套組的目的是提供使用者進行快速篩選以分辨食品中是否為 GM 成分，因此操作越簡便、耗時越短越好，畢竟要一般使用者去取得標準品再進行比對分析是不太可能的，也不符合瞬時萬變的商業市場需求。至於該公司後續是否發展定量套組，他說未來也許會，但這部分比起定性檢測又複雜多了。該套組約為 2 年前所研發，1 年前便已上市，目前已可在市面上購買得到！

日野博士提供一份日本針對各國 GMO 管理標示制度的調查報告，此份報告為日文版，而且內文中並不包括台灣，為此日野博士還跟我鄭重致歉。該報告極為詳盡，將各國針對 GMO 所設定的容許限度，法規條文皆羅列其中，是我們行政部門參考比較各國管理制度的最好資料，如附件十八所示。另將今日研討會中所討論的部分內容，整理如附件十七所示。

八月一日（五）：

今天為 Gene-scan 檢測套組研討會的第二天會議，會議內容為示範 GM 玉米 star-link 品系的定量檢測套組。首先說明樣品種類、操作方法及樣品稀釋倍數等的準備事項，之後便分組下去進行樣品稀釋。其實今天有個重點的討論議題，就是實驗室同仁曾經以此套組分析 100% 的 star-link heterozygose 及 homozygose 之玉米顆粒後，發現後者濃度為前者之兩倍（這

是必然的)，但前者的濃度會飆到將近 200%，幾乎為日野博士實驗室自己的定量方法檢測值的 2 倍，希望透過與 Mr. Frank 的解釋及討論獲得解答。本試驗共需進行兩盤(96-well)ABI 7700，第一盤由望月秀明負責樣品配製，第二盤樣品則為 Mr. SATOSHI 自己準備的 GIPSA 的樣品。第一盤的樣品濃度及測試後結果如下：

樣品 編號	樣品配製濃度 【%】	分析結果 【%】	稀釋倍數	樣品 DNA 濃度	
1	0	0	1 : 3	pure	1 : 3
2	0.1	0.3	1 : 3	pure	1 : 3
3	0.5	0.99	1 : 3	pure	1 : 3
4	1	2.56	1 : 3	pure	1 : 3
5	3	7.5	1 : 3	pure	1 : 3
6	5	14.29	1 : 2 及 1 : 5	1 : 2	1 : 5
7	10	23.08	1 : 2 及 1 : 5	1 : 2	1 : 5
8	100 (hetero) 取自 FASMAC	172.54	1 : 5 及 1 : 25	1 : 5	1 : 25
9	100 (homo) 取自 GIPSA	296.3	1 : 5 及 1 : 25	1 : 5	1 : 25

部分實驗細節說明如下：

※ 96 well 的配置位置如下圖所示，『黑線粗匡』為 internal control gene (HMG) 檢測組，其他為檢測 Star-link 基因檢測組。

※ 『S』表 standard curve 之檢測組，1% 為本套組所附之標準品對照組。

※ PCR 條件如下：

Stage 1	95°C	10 min	1 cycle
Stage 2	95°C	15 sec	45 cycles
	60°C	1 min	

※ 樣品 DNA 之稀釋，使用 0.2 M 之 TE-buffer。

※ 反應溶液配方為：

Master-mix : 20 uL

樣品 DNA : 5 uL

※ PCR 反應結束並進行 data 分析時，Threshold-line 設為 0.1，Base-line 設為 5-18 cycles。

※ 日野博士請教此套組中所附的標準品內容物成分為何？Mr. Frank 解釋因為該套組為德國總部負責研發，因此他並不清楚。但由 Mr. Frank 說話時的神情我推測可能是因涉及公司內部商業研發機密，故不便在此公開。

②

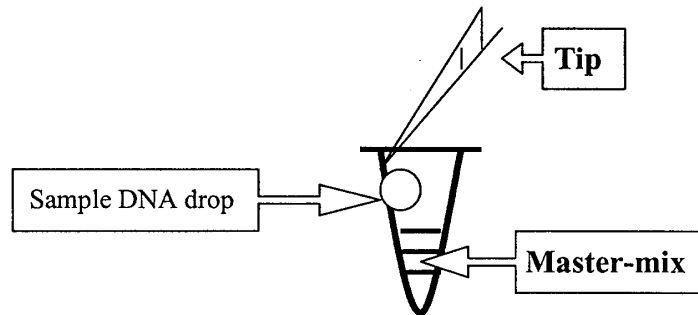
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	S4	NTC	NTC						
B	S1	S2	S3	S4	NTC	NTC						
C	0%	0%	1%	1%	0.1%	0.1%						
D	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%						
E	1%	1%	1%	1%	1%	1%						
F	3%	3%	5%	5%	5%	5%						
G	10%	10%	10%	10%	10%	10%						
H	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
I	1:45	1:25	1:5	1:5	1:5	1:5						

至於實驗室中是如何進行不同 GM 玉米濃度之樣品配製？目前並無書面方法可供參考，只能盡量問清楚了。他們是將磨粉後之玉米粉末採 weight by weight 方式進行配製，玉米粉碎後的粉末顆粒需經過粒徑大小確認，彼此間應盡量接近，以避免不同粒徑影響 DNA 抽取效果（今天實驗所用的玉米粉末是採用去年 collaborative-study 留下之玉米粉，而當時顆粒大小確實經由日本某單位技術支援而確認過）。再來以數個微量離心管進行配製，每管總重為 1g（若進行三重複，則秤三管），以 1% 為例，各秤入 0.99 g 之 non GM 加入 0.01 g GM。但是若樣品濃度低於 1%，由於微量時不易進行精確稱重，所以需把量放大，0.5% 則放大到 2 g；0.1% 則放大到 10 g。以 0.1% 濃度之樣品總重為 10 g 為例，以 Qiagen DNeasy Mini kit 抽取 DNA 時就需加入 10 倍量的 AP1 buffer，將之混合非常均勻後，再分裝到 10 個微量離心管中，續進行之後的抽取步驟。為控制微量稱重時因氣流所造成之誤差，因此必須於密閉空間中操作並關閉所有空調，同時盡量避免人員進出走動，實際操作時是相當累人的！

至於今天的第二盤實驗，則是由栗原秀夫負責，這一盤的樣品中亦有 100%(hetero) FASMAC star-link 及 100%(homo) GIPSA star-link 樣品，這兩個樣品的 HMG 測定用 DNA 濃度為稀釋 1：2 及 1：5，GM-specific 測定用 DNA 濃度為稀釋 1：20 及 1：50，至於其他測試樣品則是 FASMAC 總裁 Mr. SATOSHI 帶來的 GIPSA 樣品 DNA（我猜可能是 GIPSA 精度試驗之樣品 DNA）。

我是參與第一盤的樣品稀釋，操作順序為先分裝 20 uL 之 master mix 注入 96-well plate 中，再加入稀釋後的 DNA，這部分則由望月秀明自己操作。我觀察他在加入 DNA 後會用 pipetting 方式混勻 well 中之反應液，但 Mr. Frank 並不建議這樣做，因為 pipetting 時可能造成部分 DNA 及 master-mix 之殘留誤差，況且後續上機前的 spin down 及上機器後 PCR 反應

需升溫到 95°C，都具有混勻的效果。



第一盤的結果如上表中之『分析結果』欄位所示，至於第二盤的結果，GIPSA 的樣品濃度經分析後與實際含量頗為接近，但 100%(hetero)及 100%(homo)兩種 star-link 樣品之結果仍如同第一盤的結果，飆高進 2 倍。將一些後續針對今天實驗結果分析所討論的內容，整理如附件十九所示。

結束兩天的研討會，晚上繼續參與 I-chip 毛細管電泳的實驗討論。大西真理小姐更換了 TC1507 之 primer set，進行 multi-plex PCR 後再次以 I-chip 毛細管電泳分析 PCR 增幅片段，希望新的 primer set 組合能夠獲得較為專一性的電泳圖譜，結果顯示僅添加個別 GM 玉米品系之 primer set 進行 PCR 反應則可獲得專一性極佳的 PCR 產物，但當結合 4 種 GM 玉米品系之 primer set 後所獲得的 PCR 產物影像，比起前次（使用舊的 TC1507 之 primer set）結果的 non-specific PCR band 是少了些，但四種主要 GM 玉米品系的 PCR band 卻也減弱了，只好繼續思索問題所在並尋求其他的解決之道了。離開實驗室時約為 9 點，只剩大西真理小姐把 I-chip 結果 e-mail 給 WAKO 公司的古井聰先生。因為附近的飲食店家早已結束營業，我只好踏著單車獨自一人在漫漫黑夜尋找便利商店覓食。

下午曾與奧田智勇聊起他的工作經驗，他曾在日本新成田（NARITA）機場擔任檢疫官 3 年，之後才調到橫濱植物防疫所工作到現在約 1 年半。在成田機場時，他負責需檢驗一些旅客攜帶的物品是否含有病毒污染，例

如 CMV (cocomo mosaic virus)、ArMV (Arahis mosaic virus)，為求迅速起見檢測乃採用 RT-PCR 快速反應套組。韓國鄭明恩女士則說入境韓國機場時，肉製品是禁止攜入的物品，以隔絕任何可能的 BSE 媒介進入韓國！

八月二日～八月三日（六、日）：假日

兩天的假日除了好好休息，養精蓄銳之外，並持續在附近各大賣場超市進行「市售加工食品包裝之 GM 標示情形」之考察工作。星期日，本局同仁謝佩君技士亦抵達 NFRI 進行為期一個月的考察工作，身為前輩的我當然得到機場接機並為其介紹 NFRI 周邊環境及生活設施，使她能儘速適應異國的生活方式。我們將有兩個星期的重疊時間一起在日野博士實驗室中進行各種 GMO 實驗的研習及相關資料收集工作，辛苦的考察研習任務總算有同伴可以與我一起承擔。

八月四日（一）：

早上，日野博士將實驗室成員介紹給謝佩君技士認識！隨後，便與兒玉貴志討論謝佩君技士未來一個月的研習考察內容，最後決定兩個與本局 GMO 業務最為相關的實驗主題：

1.豆乾之 GM 成分定性定量檢測：

豆乾製品的含鹽量很高，日野博士說加工食品中若含鹽量越高則 DNA 越難抽取，相對的增加定性定量檢測的困難度，。

2.肉製品中 GM 成分之檢測：

韓國鄭女士明天即將返國，與日野博士討論過後，同意由謝佩君技士繼續鄭女士的研究主題，研習如何從肉製品中抽取玉米澱粉之 DNA 並進行 GM 成分定性檢測。但該部分難度很高，希望在有限的時間內盡力完成。

今日主要的工作是觀摩望月秀明示範 WAKO 公司最新研發之快速 DNA 抽取套組，因套組仍處於研發階段，操作手冊等資料屬於公司機密，幾經交涉仍無法取得，僅同意我們觀摩時自行紀錄步驟與重點，紀錄下來之步驟如附件二十所示。示範時該套組之特色為步驟簡便，耗時少(約 30min)，DNA 品質佳。示範時共抽取 2 件玉米粉末樣品，經測定抽取之 DNA 濃度及含量如下表所示：

sampleID	230 nm	260 nm	280 nm	260/230	260/280	稀釋倍數	Conc.
1	0.0443	0.1715	0.0967	3.87545	1.77287	5	42.8788
2	0.0508	0.1880	0.1055	3.70222	1.78147	5	46.9985

由 260/280 比值可瞭解，採用此套組所抽得之 DNA 品質頗佳，唯 260/230 比值太高，顯示抽出液中應有雜質存在（如糖類），該比值應維持在 2.5 以下，但望月秀明表示糖類對後續 PCR 反應進行的影響不大，無須太在意。其實該 DNA 抽取套組的重點據說是其所研發之 DNA 回收 membrane 較為特殊，但光從產品外表實在看不出所以然，而且上頭還標示「what-man」字樣，至於特殊之處為何，或許只能說是商業機密吧。下午則另外進行一盤 NK603 No. 5-8 的 ABI 7700 CV 值實驗，藉機請謝佩君技士觀摩如何進行 ABI 7700 定量實驗。四點時，鄭明恩女士與日野博士、兒玉貴志等實驗室同仁進行一場”結束研習之討論會”，討論鄭女士這一個月來的實習結果，類似研習成果報告，會後我並向她要了一份她所製作的書面報告供作日後參考，如附件二十一所示。報告提到關於肉類加工產品之 DNA 抽取，仍建議以 Qiagen genomic-tip 為第一選擇，由於研習時間太短，鄭女士的所有實驗都只進行一次，結果有待更進一步確認，或許謝佩君技士接下去的研習工作正可以彌補鄭女士數據上的不足之處。晚上，日野博士為歡送鄭明恩同時為謝佩君技士洗塵，宴請我們三人用餐，其間聊起一些有

意思的資訊，整理如附件二十二所示。

八月五日（二）：

早上我仍須例行的進行一回合之 GM 玉米之 CV 值實驗，樣品為 TC1507 No.9-11，這部分我已得心應手，但令一部份實驗則為謝佩君技士所負責之肉製品，香腸，豆乾之 DNA 抽取，為全新之挑戰。實驗樣品包括有雞塊、香腸、火腿（這些樣品是昨日聽聞同事討論如何處理韓國鄭女士所遺留的實驗樣品時，我趕緊請他們留下，供謝佩君技士學習用的）及我們帶來的豆乾。由於他們未曾見過豆乾製品，搞不清楚屬於何類產品，因此遲遲無法決定該用哪種方法進行 DNA 抽取，兒玉先生等人為此討論頗久，經我解說豆乾類似乾燥的豆腐，只是加入香料、鹽、醬油等調味料，且翻閱了 CFQLCS 的一本操作手冊，最後才決定抽取方法及所需秤取的樣品量。他們對此產品頗為好奇，部分同事亦想要吃吃看，但大家吃過之後的感覺卻是褒貶不一，大多數同事仍不太能接受。

豆乾的粉碎是採用一般市售之小型蔬菜調理機，剛開始先以 5 克豆乾加 5 克水進行打碎，但效果不佳，後來改成乾磨並將樣品量加大，研磨效果較佳，但方法仍需視樣品而定，部分樣品以添加少量水幫助研磨，則效果較好。但乾磨需注意研磨時溫度太高的問題，就謝佩君技士表示，有時磨完會有燒焦味。

谷中有香現正進行 ABI7000 定量分析之條件探討，她是目前實驗室中操作 ABI7000 經驗最豐富的人，遂向其請教關於 ABI7000 如何決定 shreold-line 位置之問題，ABI7000 之 shreold-line 位置仍然採用之前 ABI7700 的表格進行判定，只是 ABI7000 之分析軟體缺少部分如 ABI7700 之軟體可以更改參數之選項空格，因此需修正部分判定表格的輸入方式。ABI7000 之 shreold-line 位置決定法則，如附件二十三所示。然而就我之前請教大家時，對於 ABI7000 機型的效能都頗多負面意見，連 Gene-Scan 之 Mr. Frank

及日野博士亦不建議採用 ABI7000 進行正式之判定分析。隨後與兒玉貴志先生討論一些 GMO 相關資訊，整理如附件二十四所示。

上午，日野博士秀了一張他預備進行簡報的資料，內容為比較各國目前之 GM 管理制度，並詢問我簡報中關於台灣 GM 管理現況的資料是否正確，我一方面仔細檢視該部分資料，一方面也深深感激日野博士，畢竟日野博士經常出席國際會議，藉由他演說所傳達的資訊也傳達至世界各地，這對於國際地位極端嚴峻的台灣而言無疑是一種無形之宣傳。有機會真該好好答謝一下日野博士。

八月六日（三）：

八月六日為日本『廣島核爆紀念日』，負責帶我們實驗的兒玉貴志先生便是出生於廣島，而日本各大媒體也播放及討論廣島核爆的相關議題，藉以警惕世人和平的重要。下午的行程為參訪『Asahi 啤酒』研究中心，因此早上既有之工作便需盡快完成。我須進行一回合之 GM 玉米 CV 值實驗，而謝佩君技士則需進行 RRS 黃豆之粉碎工作，以便日後進行豆乾定性檢測時當作”positive-control”之用。

下午之參訪，除了我和謝佩君技士外，還包括 NFRI 食品機能部部長津志田藤二郎博士、日野博士、柏葉晃一博士、兒玉貴志及栗原秀夫。『Asahi 啤酒』為日本第一大啤酒公司，日本市場佔有率達到 45%，與麒麟啤酒在伯仲之間，排名第三、四則分別為 Sappollo 啤酒及山多利公司。Asahi 啤酒除了原本啤酒產業外，近年也著重於其他 soft-drink 飲料之開發，其中又致力於低麥芽原料比例之酒類產品研發，據日野博士表示，目前日本政府對於麥芽原料比例超過 25%之啤酒，會課徵較高之稅率，因此各大酒場無不爭相投入此種低麥芽原料比例之酒類研發。參觀行程共分為兩部分，其一為參觀『研究開發中心』、其二為參觀『啤酒生產線』，由於公司內部處處是商業機密故禁止拍照。『研究開發中心』成員共計 300 人，為 Asahi 啤酒

唯一一處之研究中心，本中心分三部門，為『R&D 本部』、『商品技術開發本部』及『生產事業本部』。去年考察時所結識之吉村倫彰先生便屬於『商品技術開發本部』，負責公司所用原料之 GM 檢測，該檢測部門為 P2 級實驗室，內部進行實驗之空間房間各自獨立，一間為磨粉專用、一間為抽 DNA 及進行 PCR 反應專用、另一間則為 PCR 反應後進行膠體分析專用，牆面及天花板都為硬式塑鋼，具備獨立空調，以杜絕任何可能發生之交叉污染，以確保分析數據之正確性。該研究中心大樓內亦配置一小型發酵槽生產線，體積為 200L，為實際發酵槽的 600 分之一，作為新產品研發初期時「試做」用。分析部門，儀器眾多，包括 NMR 1 台、GC-MS-MS 1 台、GC-MS 50 台、LC-MS-MS 3 台、電顯穿透及掃瞄式各 1 台、NMR 樣品濃縮儀 1 台、Micro-array 掃瞄儀 2 台及 I-Chip 管柱電泳儀 1 台等。接待人員亦自豪的帶我們至研究大樓地下室，展示最先進之避震結構，大樓整個架構於 96 個巨型圓桶狀避震盤上，當地震發生時，避震盤結構可將震波抵銷，避免震波對大樓結構造成損害，相當厲害。研究中心極為乾淨舒適，設備齊全，還包括一面積頗大之圖書館供員工查詢資料。我也特別攜帶了衛生署及本局之簡介，自我推銷一番。

隨後搭乘專用巴士至工廠參觀啤酒製造生產線，全自動化生產之啤酒工廠，諾大的廠房內工作人員少的可憐，為工廠自動化的標準示範，此處擁有大小為直徑 8 米、高 20 米之室外熟成發酵槽達 154 個之多，每分鐘可生產鋁罐啤酒 1700 罐、玻璃罐啤酒 1200 罐，高效能的生產速度才足以應付全球龐大的啤酒市場所需。在幾位部門負責人的帶領下，一行人詳盡的參觀生產線的各個製程，沿途亦設置有簡體中文之解說看板，顯示有不少中國人來此參觀。參觀行程的最後一站來到一瞭望台，此處是工廠全區之最高點，透過大片之透明窗四周景致盡收眼底，在登頂電梯入口處，牆壁上懸掛有幾幅各國政要來訪時所留下之紀念看板，看板上頭並標示該國國

旗，其中五星旗赫然在列，為中共外交部來訪時的說明看板。隨著電梯上升到瞭望台最高點，穿過透明觀景窗我的視線為之吸引，外頭大門之旗竿上除了日本國旗外，竟同時飄揚著『青天白日滿地紅的中華民國國旗』，我的思緒為之震撼，對於深處異邦的我們，能見到自己國家的國旗飄揚固然感動，但真正難得的是在無實際邦交的日本且需面臨台灣國際地位被矮化的現實情況下還能見到我們的國旗飄揚，那才是真正可貴之處。廠方隨後在此處的會客室中為大家舉辦一場簡單的歡送宴，隨著引導人員進入會場，映入眼簾的是桌上再次出現的鮮紅色『中華民國國旗』，兩次的感動，真是讓我一時間說不出話來。為時一小時的歡送宴，廠方請我們品嚐公司生產的各種飲料產品並徵詢對各種產品之看法意見，會場氣氛相當輕鬆和諧，我們於六點結束所有參訪，彼此留下深刻之印象，雖只是短短半天之參訪，但可以說是一次成功的國際外交參訪，當然，能有如此高層級之禮遇皆須感謝日野博士從中之協調幫忙，對此表示我的感激之意。

八月七日（四）：

早上甫接獲本局闕麗卿研究員之 E-mail 提及需收集”豆瓣醬”之相關檢測方法資料，立即向同事詢問相關資訊。在日本當地「豆瓣醬」並非主要之黃豆產品，因此並為列入官方檢驗方法的研發項目中，但考量「豆瓣醬」為黃豆原料經發酵後之高度加工食品，與日本主食之一的「納豆」產品頗為類似，遂與日野博士討論觀摩「納豆」之定性測試，並獲得日野博士的首肯，經其解說後才瞭解「納豆」又區分很多種類，大體上有整粒的及碎狀的兩種，由於整粒的納豆加工條件溫度為 131°C，而碎狀納豆加工條件溫度為 115°C，整粒的納豆加工條件較為嚴苛，因此目前為止，只有碎狀納豆抽得出 DNA 並可順利進行 PCR 反應，但整粒的納豆則否。中午時日野博士親自開車帶我到附近超市購買「納豆」檢體，由於實驗室的粉碎機不足，兒玉先生提議明天需帶我及謝佩君技士到位於埼玉縣的農林水產消費技術

中心進行樣品磨碎之前處理，看樣子又有得忙了。根據後續實驗之安排，我必須於本週完成樣品前處理，下週一、二、三各進行一種方法之樣品 DNA 抽取 (Q-MAXI、Q-Tip、CTAB)，最後兩天則進行 PCR 反應確認，當然還包括我目前所負責的 CV 值測試實驗，時間相當緊湊，幾乎已無任何喘息機會了，我必須在所剩不多的時間內做最有效率的利用，才不致辜負此次赴日考察之目的。

確認「納豆」部分之實驗後，下午繼續進行 GM 玉米之 CV 值測試，但不同以往的是今天測試之樣品為「12 克玉米磨粉」，之前所測試的則為「一粒玉米磨粉」之樣品，實驗目的在於確認樣品重量不同時是否影響所求得之 CV 值，如此仔細的實驗設計，不禁讓我對日方研究人員的仔細與耐心留下深刻的印象。至於 GMO 小組的其他人員，目前正積極測試實驗室所發展的另一標準質體(plasmid)之各種條件，為日後商業化做準備。兒玉先生說明質體標準品測試之流程，其間共分成三階段進行，第一階段為在日野博士實驗室內進行之內部條件測試，包含如 plasmid test、primer-probe test、contamination sample test、CV-test 等，第二階段測試範圍就擴大到三到四個實驗室，第三階段再擴大到 30 個實驗室的 collaborative-study 規模，循序漸進，由少到多的不斷進行測試確認，過程複雜而嚴謹。

之前曾在超市發現「油菜子沙拉油」產品標示『不排除混有 GM 成分』之字樣，如附件二十五所示。不禁讓我感到好奇，遂藉機請教日野博士為何法規明訂不需標示之沙拉油產品廠商仍進行標示呢？而且該產品還隱喻含有 GM 成分，難道不怕產品滯銷嗎？日野博士說這就得視廠商的想法而定了，由於日本國內並不種植油菜，油菜子原料 90% 以上都是進口自加拿大，因此其中含有 GM 成分是眾所周知的事，而廠商願意開誠布公，公開產品資訊，這是值得鼓勵的作法，有何不可呢！至於標示後是否影響銷售業績呢（廠商大可以不標示）？日野博士說或許廠商有自信不受影響吧，

但以政府立場倒是樂見製造商以開明的態度對其產品及消費大眾負責。

八月八日（五）：

早上預定隨兒玉貴志、奧田智勇至埼玉縣之「農林水產消費技術中心」進行『納豆』之前處理。因車程經耗時一個多小時，因此預先冷凍的樣品需以冰褸及保力龍進行保溫運送。「農林水產消費技術中心」大樓共計七層樓，二至四樓為農林水產消費技術中心，五至七樓為「肥飼料檢查所」，該所亦負責部分 GMO 之檢測工作，但著重於動物飼料方面，此外還包括狂牛症之相關檢測任務，「農林水產消費技術中心」及「肥飼料檢查所」皆隸屬於農林水產省管轄。去年來訪時結識一些「農林水產消費技術中心」之朋友，因此此次再次到訪受到和善之接待，大家一見如故。該大樓警戒森嚴，處處警衛，出入還需登記查詢，一派機密重鎮之氣派。「農林水產消費技術中心」之檢驗任務由兩個組負責，一組為負責市售食品之例行抽查檢測，另一組則負責技術研發，栗原秀夫與兒玉貴志皆屬於「技術研發課」。實驗室位於三樓，但為了就近照料我們，故借用位於他們辦公室同一層樓(2樓)屬於市售食品之抽查檢測課的實驗室，該實驗室內部另設置一獨立隔絕之房間，作為進行 PCR 反應與電泳分析之專屬空間，而我們納豆樣品處理，則必須於外部實驗室進行，如此分區使用始可避免污染。下午緊鑼密鼓的樣品處理工作，令人幾乎無法喘息，將納豆樣品處理流程及均質機清洗步驟，整理如附件二十六所示。試驗室亦設置有 ABI 7700 定量分析儀一部，但並無 ABI 7000 之機型，他們還告訴我 ABI 公司之所以停產 ABI 7700，是因為 ABI 7700 之冷卻系統使用氟氯碳化物，會破壞臭氧層，因而改推 ABI 7000 機型，此款之加熱及冷卻方式都使用如 ABI 9700 的加熱板形式，設計理念共為環保，但改型後卻使效能不彰，卻屬意料之外。一行五人分工合作處理五件樣品，待工作完成後已是夜幕低垂，我們稍事休息後，與辦公室內的朋友話別後即驅車返回 NFRI，黃昏時分正是交通尖峰期，每當

想到日本有名的高速公路大塞車景象，心中總會感到些許恐懼，幸好沿途車行順遂，倒是逆向車道往東京都方向大排長龍，我們由車陣旁呼嘯而過，情緒中泛起一種莫名的快意，一種屬於都市人特有的快意。八點多總算到達 NFRI 之實驗室，迅速將樣品置入冰庫中保存，忙碌的一天至此算是任務完成。

八月九日～八月十日（六、日）：假日

難得的星期假日竟遇上了大颱風，利用天氣還算穩定的星期六，趕緊帶謝佩君技士至市區張羅一些生活用品，並至頗負盛名的「築波大學」體驗不同國度的校園氣息，增廣見聞。傍晚時分，氣候驟變，瞬時間狂風驟雨烏雲蔽日，日本境內並無特別之高山地形障蔽，因此每逢颱風到來特別能感受得到大自然的威力，卻也常常造成極大的破壞，正巧我到訪的月份又是颱風發生頻率最高的季節，看著窗外飛沙走石，只能默默祝福身處颱風侵襲下的芸芸眾生都能平安度過。

八月十一日（一）：

未來的三天，我將分別採用三種方法抽取納豆製品中之 DNA，今天為 Qiagen G-Tip 方法。G-Tip 法所秤取之樣品量為 2 克，由於當初在制訂此套組之 SOP 時已對操作步驟進行部分修改，因此整個抽取步驟並非依據套組之操作手冊，而是依據農林水產消費技術中心所發行之實驗手冊專刊進行，其中部分抽取所需添加之溶液量亦有更動，與套組說明書所載不同，因此開始進行抽取之前，需先行額外配製套組中之 G2-buffer（即最初步驟之 extraction-buffer）。因實驗室目前所使用之 G2-buffer 為已離職之員工所配製，其他並無相關配製經驗，只好靠我、謝佩君技士及奧田智勇三人依據套組說明書中之配方慢慢摸索配製。配製需採濃度原液，待使用前再稀釋成為 1 倍原倍，配製完成之溶液需以過濾器進行雜質之過濾。整個早上

就耗在配製 G2-buffer 上，其間我們三人還為了配製後溶液是否會超過 1 升的定容體積而爭執不休，還好最後採用我所建議之 10N-NaOH 溶液來調整 pH 值，才使得最終體積得以控制在 1 升。由於配製 G2-buffer 耗時太久，為趕上既定之實驗進度，只好犧牲中午用餐時間，接著進行樣品 DNA 的抽取實驗了。

我所負責的樣品為五種納豆及一種肉製品(共六個)，謝佩君技士及奧田智勇則各自負責 12 個肉製品。G-Tip 法之原理為離子交換樹脂法，利用離子交換管柱以吸附 DNA 分子，效率雖好，卻常因樣品雜質太多，而使管柱阻塞，使液體無法濾過，兒玉貴志教我一個經驗法則就是利用 5 C.C.之 pipetman 進行加壓，藉以加速液體之通過，方法雖土但妙用無窮，這就得靠實驗者的巧思了！整個下午就在反覆的添加、沈澱、過濾、清洗的操作步驟中度過，當完成四種樣品之抽取已經是晚上 9 點了，原本答應谷中有香要再進行一回合的 CV 值實驗，只好跟她說聲抱歉取消了，整理完今天實驗的資料後，回到宿舍已是 11 點過後了！真是累人的一天！

下午還巧遇任職於 Nippon-Gene 公司的古井聰先生及去年到訪時負責帶我做實驗的松岡猛先生，但因為任務所需，松岡猛目前已調任至神戶地區之農林水產消費技術中心神戶支部了，能在實驗室再次相會誠屬不易啊！古井聰此行的目的是為了準備預計於九月份美國 AOAC 年會時所要發表之 multi-plex PCR 論文，而松岡猛則是為了解決大西真理小姐所遭遇的 multi-plex PCR 之 non-specific 反應的問題(因為之前的 multi-plex PCR primer set 是由松岡猛負責設計的)。

八月十二日 (二):

今天必須進行五種納豆樣品的 CTAB 法抽取，根據以往的經驗，每種 DNA 抽取方法幾乎都得花上整整一天的時間，昨天一直忙到 11:00 過後才回寢室，今天大概不會比較早吧，而且今天排定的實驗除了抽取納豆樣品

之 DNA 外，還得完成一回合的 ABI7700 之 CV 值實驗，我必須向自己的體能極限挑戰了。謝佩君技士則需負責肉製品的 CTAB 法抽取。兒玉先生認為我和謝佩君技士可以勝任依據 protocol 自行操作，所以今天的所有實驗都不安排其他同事指導，只囑咐我們在遇到疑問或是不知道藥品時再請教他。日本所採行之 CTAB 法已經過修飾，與本局所用之操作步驟出入頗大，如附件二十七所示。納豆樣品屬於高度加工產品，且蛋白質含量極高，因此抽取過程相當麻煩，步驟中還需添加 proteinase-K 分解蛋白質，以避免過多之干擾物質。因為整個流程步驟必須連貫無法停頓，因此只好犧牲中餐時間繼續工作了！我趕在五點前完成所有樣品萃取，以便晚上空出時間進行 ABI7700 之 CV 值實驗。此外，亦針對昨天 G-tip 所抽取之 DNA 及今天 CTAB 所抽取之 DNA 樣品進行 DNA 濃度測定，兒玉貴志建議 G-tip 採稀釋 20 倍，而 CTAB 則採稀釋 5 倍後進行濃度測定，但分析結果很奇怪，有些很高，有些很低，高低可以差到 700 倍以上，果真應驗高度發酵製品相當難搞的魔咒，心理不禁納悶以這樣的濃度進行 PCR 反應到底會不會成功？樣品 DNA 之濃度如下表所示：

	Sample name	Conc.(uM)
CTAB 法	納豆-1	4.79158
	納豆-2	8.67779
	納豆-3	9.27336
	納豆-4	2.05979
	納豆-5	31.55008
G-tip 法	納豆-1	1.00901
	納豆-2	190.12640
	納豆-3	3.06020
	納豆-4	8.78242
	納豆-5	733.46710

晚飯後又回到實驗室繼續完成我負責之 CV 值實驗，正巧古井聰博士買了一堆煙火回來，這個季節似乎是日本各地舉行煙火大會的時間，日本各地商店都可看到販賣煙火，實驗室同仁在忙碌之餘仍不忘自我娛樂一番，在停車場玩起煙火，自得其樂！完成所有工作離開實驗室已近 12:00 了，跟我早上預測的時間頗為吻合。

八月十三日（三）：

今天須進行最後一種方法—Qiagen-MAXI 法之抽取實驗。依據日方之操作手冊所載，黃豆及玉米的 Qiagen-MAXI 抽取步驟是不一樣的，黃豆之抽取步驟比玉米複雜多了，數目幾乎多出一倍！兒玉看我一臉訝異連忙安慰我說道，若能在晚上六點前完成工作就算順利！早上兒玉拿了一個玉米澎發食品（類似台灣的「乖乖」）得意的告訴我，他們測出該食品中含有 1 %之 GM 成分！

下午請教松岡猛及兒玉一些關於本局所遭遇的 ABI7000 96 well plate 的判讀值中間高兩邊低的問題！他們告訴我 ABI 7000 是使用 CCD 攝影機擷取反應液中之螢光，與 ABI 7700 所採用的每個 well 對應一組光纖接收螢光訊號的方式是不同的，對於此問題他們並不感到特別訝異，他們表示目前在消費水產技術中心的正式官方版報告是以 ABI 7700 為準，至於 ABI 7000 則只用於做 screening-test，而且 ABI 7000 的檢驗方法，目前也仍在實驗室評估及測試中，所以仍不清楚。但松岡猛認為，CV 值為統計上之值，假設進行 100 次之測試，最好是採用 100 次之平均值。但以此求得的 CV 值也僅止於適用進行 100 次測試的那部 ABI 7000 儀器，至於此 CV 值是否適用於每個實驗室的 ABI 7000，那就是 collaboratory study 層面的問題了！但他強調，一般需先瞭解各實驗室機器之情況，當機器明顯出現大幅度之誤差時，必須先請工程師調整，若調整過後仍不符合要求，他建議此機器則只用來做 screening-test，當真正進行樣品檢測時，仍必須以 ABI 7700 為

準。如此看來 ABI 7000 準確度不佳，確實是每個實驗室共同的想法。至於本局所遇到的另一問題，即當進行 ABI 7700 分析時 NTC 沒有任何螢光訊號，但有時相同 NTC 在 ABI 7000 卻會出現螢光訊號的問題，則可以確定日方的質體系統以 ABI 7000 進行反應時並無這個問題。

正如兒玉所預測，抽取 DNA 進行到將近六點才大功告成，而且中間出了些無法挽回的失誤，我把其中一件納豆樣品的 DNA 抽出液當成廢液丟棄，當我猛然發現時真的是捶胸頓足，奈何木已成舟只能空餘恨了，因為時間上的限制已經不允許我進行重複試驗了。明天開始必須進行三種抽取法所抽得的 DNA 之定性 PCR 確認工作，這又將會是極其繁重的工作了，而且我還得趕在結束考察前完成納豆實驗的成果書面報告，並將其交給日野博士審閱，行程滿滿！

晚飯後與兒玉貴志聊起日本「牛肉參偽檢測之問題」，此為農林水產消費技術中心目前的重點研究計畫之一，內容著重於以分子生物方法分辨公牛肉及母牛肉，他並提供給我一張現階段研發成果的壁報資料，如附件二十八所示。從中可知兩組 primer set，其一為公牛肉及母牛肉都有反應的 primer set，另一則為只針對公牛肉始可反應的 primer set，藉由此二組 primer set 之 PCR 反應結果既可判定牛肉的真偽亦可分辨公牛肉及母牛肉。至於發展公牛肉及母牛肉之檢測方法，是因為日本的極品牛肉「松板牛肉」市售價格昂貴，且「松板牛肉」必須取自母牛，由於一般消費者不易分辨，因此便有不肖商人以公牛之牛肉替代，從中牟取較大之利潤。他並解釋「松板牛肉」之所以好是因為它能比其他牛肉在 4°C 下保持更長時間的良好組織食感，而目前的計畫成果已經能從超市買來的生肉中測試得到 DNA 產物片段，但相關的 PCR 實驗並不容易進行，因為生肉在 4°C 保存下常因組織中的 DNase 作用而使 DNA 斷裂，造成測試失敗。他並提到日本「ITOHAM」這家公司生產一種套組，可由受精卵測試其為雄性或雌性，稱為「XY-select

kit」，而 Gene-scan 亦生產一些檢測套組，號稱可以測試人類、牛肉、羊肉等各種肉品之，但不一定在各國皆有販售。目前日方的牛肉參偽檢測結果仍屬於農林水產消費技術中心的內部機密文件，無法提供給我參考，但他提供一份參考資料為--「日本畜產學報 70(8): J111-J113 (1999)」，日方的方法亦是依此參考論文進行後續研發。

目前日野博士實驗室所採用之 non-GM 玉米，是直接向美國種子公司採購，包裝型式為方形桶裝形式，如附件二十九所示，該資訊可供本局取得 non-GM 玉米種子之參考。

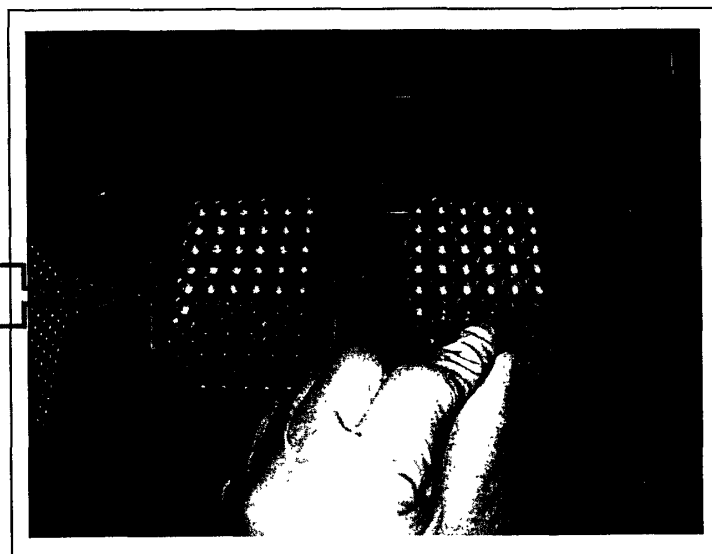
八月十四日（四）：

這一週以來一直是實驗繁重，有限的時間，加上天氣不好，陰雨不斷，無形中增加我精神及情緒上的壓力。剩下最後兩天的時間，必須完成納豆樣品的定性 PCR 分析並撰寫報告。納豆樣品的定性 PCR 分析需分別進行 LE1 及 RRS-gene 兩種基因的 PCR 反應，但在此之前，必須先行測定昨天以 Qiagen MAXI kit 所抽取之 DNA 溶液濃度，所測得的 DNA 濃度真的讓我傻眼了，因為五種樣品中的其中三種 DNA 濃度都在 0 以下，也就是說以分光光度儀測定不到抽出液中之 DNA，一想到自己超時工作的成果可能化為烏有，真的是說不出的落寞，但兒玉貴志表示可能是因為濃度太稀，未必是抽取失敗。接著需進行 DNA 溶液的稀釋，稀釋的原則為若抽出液原液濃度高於 10 uM 則稀釋至 10 uM，其他的就直接以原液進行 PCR 反應。由於下午兒玉貴志必須赴東京出差，因此指導我進行 PCR 實驗的工作就委託奧田志勇幫忙了。為求時效，這幾天中餐都是有一頓沒一頓的，今天也不例外，趕緊把 protocol 研究清楚以便進行 PCR 溶液配製工作。樣品數多達六、七十個，反應採用 0.2 mL 的 PCR 反應微量試管，所用的機型與本局舊式的 MJ-PCR machine 相同廠牌，唯機型較新，分為左右(A、B)兩個反應區塊，可以獨立運作。進行上機反應時，為求上蓋加熱及受力均勻，所

有空下來的 well 都必須補上空 micro-tube，如下圖所示。反應進行時還出現一個小插曲，不知從哪部機器傳出”嗶!嗶!”的警示聲，由於 ABI 7000、ABI 7700 及定性 PCR 反應器都放在一起，而且三種機器同時都在運作，警示聲一響起，三種儀器的實驗操作者同時精神緊繃，大家同時衝到各自的機器前，仔細檢查各自機器以確認是哪部機器出了問題，但因為警示聲是每隔一段時間才出現，一時間難以確認，結果三組實驗人員就像三隻鴛鴦，為各自的機器護航，都推說是對方儀器出問題，情形還有點搞笑！花了大半天的功夫終於確認問題是出在我的 PCR 機器散熱不良所致。既然責任歸屬已經確認，接下來大家就同心協力幫我的機器散熱，扇子、冰桶全都派上用場，只求加速散熱效果，但警示聲音還是持續不斷，無計可施之下也只好任由它去響，並默默祈求機器能順利完成使命。PCR 反應完成後即刻進行膠體電泳分析，使用 3 %之 agarose gel 並於膠體配製時預先加入 EtBr DNA 呈色劑，以節省染色及脫色時間。但為了避免接觸到致癌物質操作時必須特別注意防護工作，以保鮮膜鋪設桌面並確實配戴乳膠手套，一樣都不可疏忽。RRS-gene 膠片的結果先出來，都呈現 negative 反應，也就是樣品為「non GM 黃豆」或是「DNA 抽取失敗」，至於最終原因為何者就得依據 lectin gene 的 PCR 結果來做最後定奪了！但此時的我，臉部表情還是難掩失望之情，畢竟我已經花費相當多的心力在其中。幸好 lectin gene 的結果顯示大多數樣品皆呈現 positive 反應，這才讓我鬆了一口氣。根據兩種 gene PCR 的數據可知道納豆樣品之 DNA 抽取是成功的，即便無法以分光光度儀測得 DNA 濃度，但抽出液確實含有微量 DNA，而此五種納豆的原料皆為 non-GM 黃豆，因此 RRS-gene 的 PCR 結果才會呈現 negative 反應，至此實驗總算大功告成，心中的大石也才得以放下，不知不覺間竟已夜幕低垂。晚飯後，繼續回到實驗室工作，因谷中有香急著要 ABI 7700 的分析數據，因此我必須將剩下的兩回合數據分析完成。最後，還剩一份最重要的工作

來為我這一個月的研習考察劃下句點，那就是完成我的『納豆實驗研習報告』。時間已經很晚了，只好利用明天最後的時間來完成最後的任務。

空的 tube



八月十五日（五）：

今日是考察行程的最後一天了，雖然所有實驗工作都已結束，但仍有許多資料整理的工作有待完成，而其中最重要的就是『納豆實驗研習報告』。我仔細的分析電泳圖片、以電腦處理電泳膠片影像、將結果以表格方式清楚呈現，耗費心力所完成報告無非是希望讓實驗室同事及日野博士能清楚瞭解我的實驗結果。報告完成後列印三份，分別交給日野博士、兒玉貴志及柏葉晃一供他們參考，如附件三十所示。此外，我並分裝部分「納豆檢體」，準備攜回台灣，複印一些相關資料，作為日後參考。晚上，實驗室同事為我舉辦一小型歡送會，匆匆一個月的時間很快的過去了，大家從剛來時的生澀陌生到離開前依依不捨，我與大家已建立起不錯的友誼，希望這樣的友誼能持續不斷，為本局 GMO 檢驗工作維持一良好的國際資訊交流管道。最後，並感謝日野名寬博士提供本局此次研習的機會。

八月十六、十七日（六）：回程

考察任務總算順利結束，利用最後的假日時間好好調養生息，並將需攜回的資料分門別類小心打包，宿舍裡該歸還的物品亦一一歸還，以免有所遺漏，於十七日搭乘長榮班機返國。抵達成田機場出境前因所攜帶的資料太多使得行李超重不少，礙於航空公司的規定只得把部分資料往身上背，無論如何也得把自己辛苦取得的資料攜回才不妄此行。

參、心得及建議

一、專才專用，促進研發工作順利推展

日野博士之實驗室主要著重於兩方面之研究，其一為基因改造食品之檢驗方法研發，其二為味覺機能之研究。依據領域的不同，研究室之成員亦大致區分為兩群，基因改造食品方面主要由來自農林水產消費技術中心(CFQLCS)的兒玉貴志負責領軍，而味覺機能方面之研究工作則主要由大倉哲也博士負責統整，日野博士負責最終研究工作之整合、研究目標之制訂、行政工作之推行及政策方針之研擬。整體而言，『文』的方面責任歸屬為日野博士，而『武』的方面則為各小組負責人，分工明確。由於味覺機能並非筆者此次考察之主題，因此瞭解不多，至於基因改造食品工作小組成員，具筆者所知幾乎沒有食品總和研究所編制內的正式職員，以主要負責人兒玉貴志來說，他是隸屬於農林水產消費技術中心的正式職員，目前奉派至日野博士實驗室技術支援兩年；柏葉晃一博士後研究員及望月秀明研究助理，專長為分生及統計數據分析，專職於 collaborative study 的數據處理及分析；大西真理研究助理，專職於 GMO 定性分析及 multiplex PCR 之研究，谷中有香研究助理，專職於 ABI 7000 及 7700 之 GMO 定量分析，此外尚有兩位約聘技術員，主要負責日常例行實驗如：試藥試劑配製、DNA 抽取製備、試藥耗材之管理及準備。雖然正式職員寥寥無幾，但整個 GMO 工作小組成員分工仔細而明確，不致有任務重疊，而且依據實驗室需求所招聘之研究人員，幾乎涵蓋實驗各個層面所需，如技術研發、數據統計分析、實驗方法之確認及偵錯、非技術導向的日常實驗執行及物料管理，如此正可截長補短發揮各自所長，加上日野博士的整合與監控進度，隨時評估任務性質需求更替所需之研究人員，得以使整個 GMO 檢驗之研發腳步迅速推展。筆者以為，以目前 GMO 研究之發展趨勢已非單純的只需進行實驗即

可，一套完整而能獲得世界認可的檢驗方法其背後所牽涉到的數據統計與分析才是最後決定的關鍵所在，本局目前在 GMO 檢測技術開發方面之人才已可說是人才濟濟，唯獨在統計與分析方面尚稱薄弱，未來如何加強此方面能力的精進，值得仔細思考與評估，任用具相關技能之人員，或者加強既有人員之訓練皆為務實而可行的方向。此外，專職人員負責實驗室試藥耗材之管理也是值得注意的重點，分生實驗所耗費的資源及經費相當龐大，落實試藥耗材之管理才能實際掌握各種藥品的需求，不致發生無藥品可用的窘境，對於研發工作的順利推行幫助頗大，亦可避免重複購買浪費經費的情形，使研究經費得以有效利用。相關的管理整合工作亦是未來努力改進的方向。

二、養成良好實驗習慣，確保實驗數據正確

進行 GMO 定性或定量之檢測，樣品的污染問題常困擾研究人員，由於樣品粉末及 DNA 易隨空氣四散，常會造成檢測上的誤差。為此筆者特別留意日方人員如何克服污染，以獲得正確之檢測數據。具他們表示，依照不同的操作步驟，區別獨立的實驗空間是最為理想的方式，例如樣品粉碎、DNA 抽取、PCR 進行、電泳分析各自於四個空間獨立，空調獨立的房間中進行，然而受限於經費、空間等限制，除了少數大企業願意砸下鉅資興建專用實驗室之外，能夠達到此種嚴苛標準的機構實在是少之又少。因此目前日野博士實驗室是採行折衷方案，樣品粉碎於獨立空間進行，至於 DNA 抽取、PCR 進行、電泳分析則區別各自的實驗操作台面進行，各種實驗器具如 pipetman、微量離心管架、鑷子等器材也需各自獨立一套專門使用，絕對不允許相互混用，人員進行實驗之前需做好各種準備工作，如仔細擦拭操作台面，鋪設防止污染之保鮮膜，配戴乳膠手套，並嚴禁實驗操作中之交談，實驗完成後，亦需完成台面及器具之酒精清理，恢復台面整潔，並確實歸回試藥試劑，如此縝密的防污步驟，只求確實隔絕交叉污染途徑，

獲取正確之結果。筆者除佩服日方人員操作過程的仔細，亦隨時要求自己改善實驗操作之弊習，並期望自己歸國後的經驗傳承能有助改善本局相關實驗污染困擾，進而提升本局 GMO 檢驗之水準及正確性。本局 GMO 實驗空間之規劃亦已積極朝向區別實驗台面的方向努力，目前已大至劃分出電泳專區、樣品粉碎專區、定量分析專區，但受限於既有空間不敷使用的關係，仍常因空間過於接近而產生交叉污染，未來需更小心進行各個操作空間之清理工作並確實要求個人之操作防污準備工作，以達成零污染的最終目標。

三、加強各政府單位間之人員交流

前述，日野博士實驗室中 GMO 小組成員多數並非內部正式職員，除了約聘僱研究人員外，依筆者所知尚有來自國內各個研究單位之中短期進修及支援人員，例如來自“種苗管理中心”的村上隆紀、來自“橫濱植物防疫所”的奧田智勇、來自“國立醫藥品食品衛生研究所”的渡邊敬浩、“農林水產消費技術中心”的松岡猛及兒玉貴志等。而筆者來訪前後，亦不斷有來自各政府檢驗相關部門之人員前來研習。這些來訪人員有些是與日野博士有長期研究合作關係，有些是來此學習相關技術，有些則來幫忙解決研發工作的疑難雜症。即便大家來訪的目的各不相同，但每個人都憑藉自身的實驗技能直接或間接貢獻於日野博士 GMO 檢驗研發工作之中，充分顯示出團隊合作的成果。筆者認為，固然每個政府所屬技術研究機構皆有其專精的研究領域，在各自的專門領域中都有極佳的成就，但反向思之，在各自領域之外，一旦有其他技術性的需求時就顯得力有未逮了，畢竟每個機構都不可能具備各方面完整的人才，也不可能因應任務需求隨時增減人員，因此整合人力資源或可提供解決之道。GMO 之檢驗技術開發是一項必須整合資訊、技術、統計、分析等等領域才能的工作，當本局既有人員負荷過大時，效法日本的方式加強相關部會技術人員的交流與合作，如農委會之農試

所、毒試所、農改場等，將會是一個值得參考的方式。融合大家的知識與技術共同開發制訂檢測技術，使其成為國內共通而一致的檢測技術，進而推展成為國際認可之檢測技術，如此不但有效利用政府各界的研究資源，亦可達到培育政府人才的多重目標。

四、統合民間企業資源

日野博士在推動 GMO 檢驗方法開發時，已結合來自政府及民間企業兩者的力量合力進行。舉例而言，日野博士實驗室目前致力研發的 multiplex PCR 技術，可用於同時定性檢測四種 GM 玉米的技術，便是日野博士實驗室、WAKO 公司及 HITACHI 公司共同合作的大型計畫。而先前研發完成的 GM 玉米及 GM 大豆 plasmid 標準物質定量檢測系統亦是與 WAKO 公司密切合作下的產物，且該 plasmid 標準物質最終還交由 WAKO 公司進行商業化生產並推廣行銷各國。筆著認為，與企業合作有幾項優點：

①、拓展 GMO 資訊獲得之管道：

企業與企業間資訊的流通常常比企業與政府的資訊流通來的迅速，這是因為企業與政府之間角色定位多處於對立狀態，因此即便企業有相關資訊也不便提供給政府單位使用，若能化解二者角色間的對立狀態，讓企業與政府間利用某種程度的資源分享來達到整合 GMO 相關資訊的目的，未嘗不是一種互惠的溝通方式。例如日野博士實驗室與 WAKO 公司或 FASMAC 公司間長期合作，部分玉米原料之取得亦是經由以上兩家生技公司，而生技公司亦獲得檢測技術支援，彼此互惠。

②、技術、人員、儀器的支援：

民間公司所擁有龐大的研究資源常不亞於政府單位，他們所網羅的各方面人才也較政府單位周全，統合各企業所擁有的眾多儀器設備與其投入之研發資本，對於推動 GMO 檢驗方法之研發及檢驗方法後續的精準度

評估工作都有正面的助益。

③、扶植相關生技產業發展：

推動生技產業發展是政府目前主要重點工作，但這不光只是一個口號或一個目標，它是必需靠政府相關單位實際有計畫的推行，若能藉由 GMO 計畫而促成政府及民間企業合作，對於政府扶植生技產業政策無疑將是一項實質的示範作用，宣示政府的決心，進而發揮推波助瀾之功效。

④、拓展所研發的檢驗方法為國際認可：

一種檢驗方法若能被越多人所採用就越具公信力並能得到國際認可。這方面筆者認為日方就做得相當成功，他們將官方技術委託民間生產檢測套組並行銷國際，一方面達到商業化扶植產業之目的，一方面也將其官方方法推展至國際之間，無形間也提升其官方方法之國際能見度進而增加各國對其方法的信賴，建立其在 GMO 檢測領域之專業地位。

當然，在促進政商合作方面必須審慎評估並規範為人所詬病的利益迴避問題，筆者並不清楚日方在授予民間企業生產其檢驗套組時是否簽訂任何權利及義務的限制條約，但筆者相信，若能妥善規劃彼此之合作關係，訂立適法的合作條約，此種合作模式必定利多於弊。

五、加強國際技術資訊之交流

以現今局勢來看，欲制訂為國際所認可的 GMO 檢驗技術，僅靠某個實驗室閉門造車單打獨鬥已非可行的方式。以日本為例，日本政府在發展檢驗技術之初便以察覺此趨勢，因此方法開發完成後便積極爭取亞洲國家的採用使其成為足以與歐美兩大體系相抗衡的檢驗技術。目前，採行日本檢驗技術的就有韓國、香港、泰國等，儼然已成為一種國際流通之檢測技術。而日野博士實驗室亦不斷接受來自各國之考察研習人員如韓國、台灣及大陸等，一方面可達到推廣日方技術之目的，另一方面也可形成效尤之

趨勢，將其方法原理推升成為國際間認可的主要檢驗技術。本局目前所發展之技術原理亦依循日野博士所研發之「DNA-質體」檢測系統，雖然「DNA-質體」組成之 DNA 序列不同但檢測原理相同。礙於我國國際地位曖昧不明，欲將研發之方法推行國際化困難重重，但若學習日本經驗加強與各國間的學術考察互動並參與各種國際學術研討會議，既可收集各國 GMO 相關資訊亦可增加我國自行研發方法的國際能見度，以另一種形式爭取國際間之認可。

六、規劃合乎國際公約之管理規範

依筆者所知，目前日方規劃其國內相關 GMO 之法規都是依循聯合國生物多樣性公約組織各會員國所簽訂之『卡塔基納生物安全議定書』。『卡塔基納生物安全議定書』已於 2003/6/13 於第 50 個締約國國會批准後 3 個月開始生效，因此它已成為國際間規範 GMO 越境轉移的無限上綱，日本政府刻正積極依循此議定書之內容進行法律、經濟、教育、科學、衛生、環保等各方面之管理法規制訂，以因應 2004/2/23 即將召開的『卡塔基納生物安全議定書第一回合締約國會議』，會中將討論各會員國執行 GMO 相關管理法規制訂之現況。我國目前並非聯合國之成員亦非『卡塔基納生物安全議定書』之締約國，但依據以往經驗，在面對各種國際性具爭議之議題時卻總被要求需依循聯合國所制訂之條約，有鑑於此，政府相關權責單位在思考規劃國內 GMO 管理時，無可後非的必須依循國際規範以思考未來政策制訂之走向。因此筆者認為，現今我們亦當仔細研究『卡塔基納生物安全議定書』的內容，就可行的部分開始召集相關部會討論或制訂國內 GMO 之相關規範，或者訂立明確之工作時間表按部就班推行符合國際趨勢之管理體制，以避免日後遭其他國家質疑，影響我國在國際上之形象及利益。

七、感謝支持公務同仁人員培訓計畫

此行為期一個月的赴日考察研習，筆者深切瞭解到日本政府在 GMO 管理及檢驗方法制訂所付出的努力，也清楚看見日方在 GMO 管理及檢驗的傑出成果。筆者及本局藉由跨國的經驗交流獲益匪淺，並深深感受到人員培訓的重要。感謝本局長官對 GMO 計畫之支持與重視，使筆者得此機會赴日吸取新知；感謝日本食品總合研究所日野名寬博士接受本局之考察申請；亦感謝本局施養志組長及闕麗卿博士辛勞撰寫並爭取研究計畫支持，最後亦感謝國科會提供經費支持。

國家科技競爭力的提升乃奠基於科技人才的永續培育，筆者除感謝國家經費支持外，仍建議政府未來能持續支持相關之國外考察研究計畫，儲備各界人才以為國家所用。

肆、附 件

附件一

1. ISO 明年將在韓國召開年會，日野博士建議我國應派員前往瞭解，但我提到由於台灣國際地位特殊之故，恐有困難。
2. GIPSA 有關 standard material preparation 之會議，其實並無任何書面結論，或者說連正式的結論也沒有，只是達成協議將由美國、日本、加拿大、及歐盟共同合作發展配製標準品(1、2、5%)之方法。日野博士說 GIPSA 會議之結論只以一封極簡單之 E-mail 通知與會各國代表，PCR 方法之 standard material 部分共 2 行，Protein 方法之 standard material 部分共 2 行，僅此而已，所以一切都還處在半空中，為此日野博士近期必須再度赴美討論此事。
3. 關於 standard material 的配製方法，日野博士實驗室目前所採行的方法是經過 validation 的，而 USA 所用配製方法是屬於其內部的方法，並未對外公開的，至於 USA 的方法是否經 validation？他也不清楚。
4. 下週 Gene-scan 公司將派員來此解說新的快速檢測套組，為測 potato 及 star-link 之 PCR 套組，日野博士邀請我與會參與見習。
5. 日野博士實驗室目前已近乎完成 TC1507 及 Mon863 之檢驗方法研發。而 T25 及 TC1507 之鑑別檢驗方法則完成開發，所採行的方法皆為 PCR event-specific，而所設計之 primer set 是介於 GM 與 vector 之間！
6. 韓國之交換學者正從事肉類加工製品中 GM 成分之檢驗，檢測因

其中所添加之黃豆或玉米成分添加物！

7. 不同抽取方法的確會影響 CV 值，他們曾經用 Qiagen mini 及 Qiagen maxi 抽取玉米 DNA 並分析 CV 值，發現以 Qiagen mini 抽的 DNA 所求之 CV 會比 Qiagen maxi 高。
8. 日野博士自豪的說他們幾乎研發成功一種特殊的 DNA 抽取用 buffer，可適用於 QIAGEN 抽取套組，時間更省(約 30 min)，且 DNA 得品質相當好，目前正在實驗室進行評估。
9. 他說他們也曾參加 GIPSA 之精度試驗，我提到我們用 WAKO kit 所做之結果不是很理想，想在他的實驗室中試試，以發現問題所在，他說要安排看看。但他說世界上有許多種定量檢測方法，但以 GIPSA 精度試驗之結果來比較，JAS 方法每每都落在可接受範圍，其他則不一定，顯示 JAS 方法相當好，可信度也很高。
10. 日野博士的上司，一色賢司博士日前升官，轉任位於東京的「食品安全委員會」事務局次長。

附件二

請教望月秀明關於 ABI 7700 數據分析軟體中 mult.x stddev 中後面那呈現灰色的值，其影響因子為何，他說一般而言 0.001~0.003 為可接受之範圍，若超過此值，即表示機器本身不太穩定，需要找 ABI 公司進行維修！

請教望月秀明及兒玉貴志，若 ABI 7700 機器所偵測之螢光值很低，有可能是因為 96 孔盤及光纖接收頭出現位移，使得螢光收不到！

目前日野博士實驗室沒有相關的標準品配製方法。他們說歐洲有 1% (gene-scan)的配製方法，但這種 1%是否真為 1%，目前也無從確認，追根究底，因為國際間沒有經過公認的 standard-material 配法！

不同批的 non-GM 玉米所進行的實驗結果也會不同！他們舉例，該實驗室所用的 non-GM 玉米是來自於 USA QTI 公司所生產，然而 2003 所生產的及 2001 年所生產的 non-GM 玉米，結果會不相同。所以他們說不同批(Lot No.)之 non-GM 玉米實際上是不一樣的。而 GIPSA 所配製的 sample 到底準不準，必須看 GIPSA 所用的 non-GM 玉米而定。既然如此，同樣問題亦會出現在 GM 玉米上，他們也不置可否。標準品的問題頗複雜，必須先確立標準品之配製方法，所以日野博士才急於去 GIPSA 開會討論標準品配製方法的統一。

望月秀明提到關於 Gene-scan 公司 CBH 351 檢測套組的問題，他曾測試用 Gene-scan 公司 kit 及日本方法同時分析 100% F1-line 及 homo-line 之玉米，正常結果以 JAS 測定後之結果 F1 為 100%而

homo-line 為 200%，但以 Gene-scan 公司的 kit 測定後卻出現 F1 為 200% 而 homo-line 為 400% 的結果！原因為何，目前未知，因此 7/31、8/1 兩天 Gene-scan 公司的美國地區副總裁才要來此討論此事！

日野博士並不負責 authorize laboratory 的事，一方面因為日野博士認為 institute 的角色不適合，再則他沒興趣！一個單位不可能同時負責方法研發、方法 validation、市場監控等多重角色，這方面的任務，該由位於埼玉縣之“農林水產消費技術中心”負責，至於如何負擔龐大之任務，目前“農林水產消費技術中心”仍在研商中。

關於 blind sample 之配製，日野博士表示並非此處負責，而是由“日本食品分析 center”及“日本冷凍食品檢查協會”負責，blind sample 配製完成後送來日野博士實驗室進行 in house test，待測試通過，此 blind sample 再用於相關之 collaboration study。

日野博士出示參加 GIPSA 會議討論 RSM(relative standard material)之 e-mail 結論，內容大至上只可說是共識吧！結論只有一句話，就是研訂統一的 RSM(matrix)配製方法是當務之急！如此而已，相當簡潔！

實驗室新構築完成的 plasmid 包含 ssIIb、M863C5'-1、M863C5'-2、NK603、TC1507、T25 共六種基因，其中 M863C5'-2 比 M863C5'-1 效果好！他們在構築質體時，前前後後構築相當多的 plasmid，在經過相關測試後，最後再確定出一種最好的 plasmid，很耗時間精神。T25 及 TC1507 已可以個別區分(舊版的 plasmid 不行)，T25 之 primer set 設計在 pUC 與 plant 之間，TC1507 設計在 cryIFa2 與 3' polyadenylation signal from ORF 25 (terminator)之間，不會相互干擾檢

測結果！至於他們如何獲得相關的基因序列或圖譜資訊，他們都笑笑不做正面答覆，只說日野博士與各公司間有相當多管道的聯繫。

目前確定日方新修正的方法中，NTC 是使用 TE-buffer，而 dilute plasmid 則用 col E1，如此 NTC 才不至於有 random signal，而 low copy plasmid solution 中加入 col E1 可避免 plasmid 吸附在 tube 管壁！該部分仍在實驗中，結果待確立。改變 NTC 的原因為：salmon sperm DNA 會因個別 salmon 造成品質差異，而 colE1 會有 crude（不純物）的問題，所以 NTC 結果常常不穩！

附件三

**Japan Agricultural Standards
Testing and Analysis Handbook Series**

**Instruction Manual for
Testing and Analyzing Genetically Modified Foods
— Part 2 —
Basic Procedures**

June 20, 2002

The Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services

I. Introduction

Based on Article 7, Section 1 of the Standards for the Labeling of Processed Foods Derived from Genetically Modified Crops promulgated under the Law for the Standardization and Labeling of Agricultural Products (1950 Law No. 175), so-called the “JAS Law,” and the Standards (MAFF Notice No. 517 of March 31, 2000) published by the Minister of Agriculture, Forestry and Fisheries under Article 7, Section 1 of the Standards for the Labeling of Fresh Food, food labeling for the contents of recombinant materials was mandated in Japan on April 1, 2001. Labeling food products as “non-GMO” is made possible through use of the identity preserved (IP) handling system, in which GM and non-GM crops are strictly segregated and documented throughout the life of the crops at issue from production through transportation, importation and processing to retail distribution. The Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services (hereinafter referred to as the “Center”) is responsible for, as part of the JAS regulations compliance monitoring program, the testing of food products for the contents of recombinant materials. The Instruction Manual for Testing and Analyzing Genetically Modified Foods (hereinafter referred to as the “Manual”) were developed to establish the standardized methods for this purpose.

This part of the Manual describes the basic procedures involved in the *qualitative* PCR screening to determine the presence or absence of recombinant materials in food crops and processed foods derived from such crops, according to the stages of the screening process.

1. Purchase and documentation of food samples
2. Sample preparation
3. DNA extraction
4. PCR amplification and gel electrophoresis
5. Determination as either GM or non-GM food.

II. General precautions

PCR is so powerful that even a trace amount of a template DNA can be amplified to a detectable level. It is thus critical to prevent the contamination of samples by undesired DNA, especially carryover PCR products, and by the DNases excreted from human skin that enzymatically degrade PCR samples. While *Part 5—Prevention of Contamination* of the Manual describes in detail the proper procedures to prevent contamination, the following general precautions may be useful:

- (1) Autoclave all solutions other than those that are sensitive to heat. For the purpose of this Manual, “pure water” means deionized water with a conductivity of 0.0056 mS/m or below at 25 °C, and “sterilized water” means the pure water autoclaved at 121 °C for no less than 15 minutes.
- (2) Use disposable micropipette tips and sample tubes to avoid cross-contamination.
- (3) Use micropipettes, tips and 1.5- and 0.2-ml sample tubes only after they have been autoclaved and completely dried in a dryer or, if possible, dry heat-sterilized.
- (4) Prior to handling DNA samples, disinfect the surface of the laboratory bench with ethanol. Always wear rubber gloves also disinfected with ethanol. Gloves should

be powder-free. If your gloves are powdered, wash your hands thoroughly after wearing the gloves. Gloves should be ethanol-disinfected frequently during the procedure. Use a laminar flow clean bench if necessary.

- (5) It is recommended that each analyst re-prepare his/her own sterilized water and TE buffer at least once every month. Note that the quality of sterilized water and TE buffer is critical to successful PCR. DNase contamination, among others, can have extensive and serious effects on PCR including failed reactions and false results.

III. Handling and management of reagents

Some of the chemicals and compounds used in laboratory activities involving genes are powerful mutagens. Proper management of reagents and effluents is thus imperative for laboratories engaged in GM food testing. Handle and manage them properly in accordance with the instructions of reagent suppliers' manuals and *Part 4—Preparation of Reagents* of the Manual.

IV. Basic procedures

1 Purchase and documentation of food samples

See *Part 1—Handling of Test Samples* of the Manual for the documentation of food samples. For a food product to be tested, purchase three packages each on the retail market.

2 Sample preparation

See *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual for the preparation of test samples.

3 DNA extraction

One DNA sample is extracted from each package of the food product to be tested. In other words, three DNA samples will normally be taken for a food product from three different packages.

DNA samples may be extracted from prepared food samples using spin columns with silica matrices, ion exchange columns or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Of these options, the spin and ion exchange column methods are recommended in view of obtained DNA sizes that fit for PCR as well as health and environmental considerations. Described below are the extraction procedures using Qiagen's DNeasy Plant Maxi kit as an example of the spin column method and those using Qiagen's Genomic tip 20/G as an example of the ion exchange column method. While these kits and procedures are given only as examples, any alternative method to be selected should be able to provide the same quality^(Note 1) of DNA extracts.

^(Note 1) For the purpose of Stage 3 "DNA extraction" of this part of the Manual, the "same quality" means that not only the obtained DNA solution has the same purity as determined by the $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ ratio, but also the selected method successfully extracts DNA samples suitable for PCR from each of the long array of food products listed in *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual. The Center verifies the suitability of a method by comparing the results from the quantification of the DNA sequence specific to an endogenous gene of a crop plant,

Precautions

- Use sterilized laboratory utensils and equipment.
- Take all necessary measures to prevent contamination, such as wearing disinfected gloves.

3.1 DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

3.1.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, digestion by RNase, and removal of proteins and other impurities, followed by adsorption of DNA to a silica-gel membrane in the presence of high concentrations of chaotropic salt, and finally elution of purified DNA in a low-salt buffer or sterilized water.

3.1.2 Authority

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).

3.1.3 Applicability of the procedure to different food products

See Part 3—Specific Procedures by Food Product of the Manual

3.1.4 Equipment

- Centrifuge with a swing-bucket rotor and capable of spinning 50 ml polypropylene tube at 3,000 x g;
- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 $\mu\text{l}^{(\text{Note } 2)}$;
- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.1.5 Reagents

Qiagen's DNeasy Plant Maxi kit.

using the method described in Part 6 - Quantitative PCR of the Manual, that are present in the DNA extracts from the quoted and alternative extraction methods.

^(Note 2) These volume ranges are only examples (??)

3.1.6 Extraction procedure

3.1.6.1 Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube and add 20 μ l RNase (supplied in the kit) using a 10-100 μ l micropipette and 10 ml Buffer AP1 preheated to 65°C using a 1,000-5,000 μ l micropipette. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Incubate the solution for one hour in a 65°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (3) Spin the solution at 3,000 x g for 10 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (4) Transfer 7 ml of the supernatant into a new 15 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface.
- (5) Add 2.5 ml AP2 buffer to the 15 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution at maximum speed on a vortex tube mixer for 10 seconds, and incubate in an ice-water bath for 15 minutes.
- (6) Spin the solution at 3,000 x g for 35 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (7) Aspirate 8 ml of the supernatant using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface, to load it onto the QIA shredder spin column (lilac).
- (8) Spin the solution at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (9) Transfer 7.5 ml of the supernatant into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the column.
- (10) After mixing on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, transfer 6.8 ml of the solution into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette.
- (11) Add 10.2 ml AP3/Et-OH buffer using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, and load the entire solution onto the DNeasy spin column (colorless) by decanting.
- (12) Spin the column at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor and discard the eluate.
- (13) Add 12 ml Buffer AW to the spin column using a 1,000-5,000 μ l micropipette and spin the column at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (14) Place the spin column in a new 50 ml tube and add 1 ml sterilized water preheated to 65°C in a separate spin column.

- (15) After leaving at room temperature for 5 minutes, spin at 3,000 x g for 10 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (16) Using a 100-1,000 µl micropipette, measure the volume of the eluate and transfer it to a 2 ml sample tube. Add an equal volume of isopropanol to the tube using a 100-1,000 µl micropipette.
- (17) After mixing by slowly turning the tube upside down 10 times, leave the solution at room temperature for five minutes.
- (18) After spinning the tube at 12,000 x g at 4°C for 15 minutes in a swing-out rotor, discard the supernatant using a 100-1,000 µl micropipette.
- (19) Add 500 µl 70% ethanol using a 100-1,000 µl micropipette and tap the end of the tube with a finger until the precipitate on the bottom of the tube is completely resuspended in the solution.
- (20) After spinning at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C in a swing-out rotor, discard the entire supernatant using a 10-100 µl micropipette and dry the precipitate.
- (21) Add 100 µl TE buffer, pH 8.0, using a 10-100 µl micropipette to dissolve the precipitate. See 3.1.10 *Additional notes* for further information.
- (22) Repeat tapping the tube with a finger and spinning it until the liquid drops on the tube wall completely disappear. Incubate the solution overnight (12-24 hours) in a refrigerator.
- (23) A DNA lysate is finally produced when the solution is free from any visible insoluble matter. If any visible insoluble matter is still present even after 24 hours of incubation, use the supernatant obtained by spinning the solution at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C and transferred to a new tube as a DNA lysate. Store the DNA lysate as well as the precipitate at -20°C or below.

3.1.6.2 Procedure B: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube and add 10 µl RNase (supplied in the kit) using a 0.5-10 µl micropipette and 5 ml Buffer AP1 preheated to 65°C using a 1,000-5,000 µl micropipette. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Incubate the solution for one hour in a 65°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (3) After adding 1.8 ml Buffer AP2 to the tube using a 1,000-5,000 µl micropipette and mixing the solution at maximum speed for 10 seconds on a vortex tube mixer, incubate the tube in an ice-water bath for 15 minutes.
- (4) Spin the solution at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (5) Aspire 4.2 ml of the supernatant using a 1,000-5,000 µl micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface, to

load it onto the QIA shredder spin column (lilac).

- (6) Spin the solution at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (7) Transfer 4 ml of the supernatant into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the column.
- (8) After mixing on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, transfer 3.4 ml of the solution into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette.
- (9) Add 5.1 ml AP3/Et-OH buffer using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, and load the entire solution onto the DNeasy spin column (colorless) by decanting.
- (10) Spin the column at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor and discard the eluate.

For the subsequent steps (11) through (21) under 3.1.6.2 *Procedure B: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*, refer steps (13) through (23), respectively, under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*.

3.1.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Aspirate 5 μ l of the DNA lysate solution using a 0.5-10 μ l micropipette and add TE buffer to give a total volume of 50 μ l. Scan the UV absorbance in the wavelength range from 200 to 300 nm to measure the absorbance at 230, 260 and 280 nm^(Note 3) ^(Note 4). Calculate the concentration of DNA by converting an absorbance (O.D.) of 1.0 at 260 nm to 50 ng of DNA per μ l^(Note 5). Prepare a PCR solution with a DNA concentration of 10ng/ μ l using sterilized water. If the concentration of the extracted DNA was too low for use as a PCR solution, perform the DNA extraction procedure again. If the concentration of the re-extracted DNA was still too low for use as a PCR solution, use the undiluted DNA solution as a PCR solution.

3.1.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by these procedures as determined by the OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratios will be approximately 1.7-2.0.

3.1.9 Record keeping

Record the dilution factor, absorbance readings, and OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratio. Also record in detail any deviation from the standard procedures you used to obtain the DNA solution for PCR.

3.1.10 Additional notes

In Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*,

^(Note 3) The absorbance spectrum for DNA has a dip at 230 nm and a peak at 260 nm whereas impurities such as proteins have highest absorbances at around 280 nm.

^(Note 4) Dilution should be adjusted depending on the DNA yield of an extraction procedure.

^(Note 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)).

adjust the dilution factor depending on the yield of extracted DNA. We recommend using 100 µl TE buffer for soybeans and 50 µl TE buffer for maize and maize products.

3.1.10 Additional notes

In Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*, adjust the dilution factor depending on the yield of extracted DNA. We recommend using 100 µl TE buffer for soybeans and 50 µl TE buffer for maize and maize products.

If the concentration of the DNA solution was too low for use in PCR, try the following operations:

1. Concentrate the DNA solution by ethanol precipitation.
2. Perform the DNA extraction procedure from the beginning in accordance with this protocol except that you add 20 µl TE buffer rather than 100 µl in Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*.

If the above operations still do not provide the concentration of DNA solution the PCR procedure normally requires, use the DNA solution finally obtained as a starting DNA solution for PCR. Record the volume of DNA in the solution used in PCR.

3.2 DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G

3.2.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, digestion by RNase, and removal of proteins and other impurities, followed by adsorption of DNA to an ion-exchange column in the presence of low concentrations of chaotropic salt, and finally elution of purified DNA in a high-salt buffer.

3.2.2 Authority

The QIAGEN Genomic-tip protocol for DNA isolation has been modified to meet the requirements of the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) guidelines, *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques* (MHLW Food Announcement No. 110 of 27 March 2001), and the amendment to the guidelines (MHLW Food Announcement No. 158 of 25 May 2001).

3.2.3 Applicability of the procedure to different food products

See *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual

3.2.4 Equipment

- Centrifuge with a swing-out rotor and capable of spinning 50 ml polypropylene tube at 3,000 x g;
- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000

$\mu\text{l}^{(\text{Note } 6)}$;

- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.2.5 Reagents

QIAGEN Genomic-tip 20/G (Cat. No. 10223) ion-exchange column;

QIAGEN RNase A (Cat. No. 19101);

QIAGEN Proteinase K (Cat. No. 19131 or 19133);

Buffers G2, QBT, QC and QF^(Note 7).

3.2.6 Extraction procedure: DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube, add 7.5 ml Buffer G2 using a 1,000-5,000 μl micropipette, and vigorously mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Add another 7.5 ml of Buffer G2 using a 1,000-5,000 μl micropipette, 200 μl QIAGEN Proteinase K using a 100-1,000 μl micropipette, and 20 μl RNase A using a 10-100 μl micropipette to the tube. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (3) Incubate the solution for one hour in a 50°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (4) Spin the solution at 3,000 x g for 15 minutes at 4°C in a swing-out rotor.
- (5) Transfer the entire supernatant into either a new 15 ml or 50 ml tube using a 1,000-5,000 μl micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface.
- (6) Flash centrifuge the tube.
- (7) Equilibrate QIAGEN Genomic-tip 20/G with 1 ml Buffer QBT.
- (8) Load the entire supernatant onto the QIAGEN Genomic-tip 20/G in 2 ml aliquots using either a 100-1,000 or 1,000-5,000 μl micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube. Allow the supernatant to move through the QIAGEN Genomic-tip 20/G by gravity flow.
- (9) Wash the column by loading 2 ml Buffer QC onto the tip using either a 100-1,000 or 1,000-5,000 μl micropipette and allowing the buffer to move through the QIAGEN Genomic-tip 20/G by gravity flow.

^(Note 6) These volume ranges are only examples. (??)

^(Note 7) Prepare these buffers according to the instructions of the supplier's protocol. You may also purchase either Qiagen's Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Cat. No. 13323) or Qiagen's Genomic DNA buffer set (Cat. No. 19060) in which these buffers are supplied.

- (10) Repeat Step (9) washing operation additional two times.
- (11) Place the tip over a 1.5 ml tube and add 750 μ l Buffer QF prewarmed to 50°C using a 100-1,000 μ l micropipette to elute DNA (Eluate 1).
- (12) Place the tip over a new 1.5 ml tube and add again 750 μ l Buffer QF prewarmed to 50°C using a 100-1,000 μ l micropipette to elute DNA (Eluate 2).
- (13) Measure the volumes of Eluates 1 and 2 and add to each eluate an equal volume of isopropanol using a 100-1,000 μ l micropipette. After mixing the eluates by gently inverting the tubes 10 times, leave them at room temperature for 5 minutes.
- (14) After spinning at 12,000 x g at 4°C for 15 minutes in a fixed angle rotor, discard the supernatant using a 200-1,000 μ l micropipette.
- (15) Add 1,000 μ l 70% ethanol using a 100-1,000 μ l micropipette and mix by slowly turning the tube upside down 10 times.
- (16) After spinning at 12,000 x g at 4°C for 3 minutes in a fixed angle rotor, discard the entire supernatant using either a 10-100 or 100-1,000 μ l micropipette and dry the precipitate.
- (17) Add 50 μ l TE buffer (pH 8.0) to the tube containing Eluate 2 using a 10-100 μ l micropipette and resuspend the precipitate by shaking at 65°C for 15 minutes on a shaker.
- (18) Transfer the entire contents of the tube containing Eluate 2 to the one containing Eluate 1 using a 10-100 μ l micropipette and resuspend the DNA by shaking at 65°C for 15 minutes on a shaker.
- (19) Tap the tube with a finger and place it in a refrigerator for incubation for 12-24 hours.
- (20) A DNA lysate is finally produced when the solution is free from any visible insoluble matter. If any visible insoluble matter is still present even after 24 hours of incubation, use the supernatant obtained by spinning the solution at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C and transferred to a new tube as a DNA lysate. Store the DNA lysate as well as the precipitate at -20°C or below.

3.2.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Same as 3.1.7.

3.2.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by this procedure as determined by the $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ratios will be approximately 1.7-2.0.

3.2.9 Record keeping

Same as 3.1.9.

3.2.10 Additional notes

Same as 3.1.10, except that Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit* should be read as Step 17 under 3.2.6 *Extraction procedure: DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G*.

3.3 DNA extraction using CTAB

3.2.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, removal of proteins and other impurities, and digestion by RNase to extract DNA. Use of CTAB as the eluent effectively prevents polysaccharides from being extracted.

3.3.2 Authority

Murray, M.G., Thompson, W., *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*, *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325(1980), with partial modification.

3.3.3 Applicability of the procedure to different food products

See Part 2—Basic Procedures, Chapter 1 of the Manual

3.3.4 Equipment

- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μl ^(Note 8);
- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.3.5 Reagents

See _____ of the Manual.

3.3.6 Extraction procedure: DNA extraction using CTAB

(1) Cell lysis of the sample

Weigh out an appropriate amount of the sample into a mortar^{(Note 9)(Note 10)}. Add a small amount of silica sand and 2 ml CTAB extraction buffer to the mortar and

^(Note 8) These volume ranges are only examples. (??)

^(Note 9) An excess amount of the sample will lead to an increased volume of the intermediate layer during phenol-mediated removal of proteins and make the subsequent operations more difficult.

^(Note 10) In weighing the sample, you can use the aluminum foil that has been used to wrap sterilized mortar as a replace for a glassine weighing paper. Do not pick up the samples directly with your fingers. Always use a sterilized spatula to scoop and transfer the sample.

grind them with a pestle. Transfer the ground mixture into 1.5 ml tubes^(Note 11).

After incubating at 60°C for 30 minutes, centrifuge at 14,000 rpm for three minutes^(Note 12). (离心 1~2 次)

Transfer 700 µl of the supernatant to a new tube.

(2) PCI-mediated removal of proteins

Add an equal volume of PCI to the tube containing the sample solution, vigorously shake the tube for two minutes, and then centrifuge at 14,000 rpm for 15 minutes at room temperature^(Note 13).

(3) Extraction with CIA

DNA 在上层, 小心取上层液 - new tube

To remove phenol from the aqueous layer, add an equal volume of CIA to the tube containing the sample solution, vigorously shake the tube for two minutes, and then centrifuge at 14,000 rpm for three minutes at room temperature.

Remove the upper layer into a new tube. Pipette carefully to avoid drawing the intermediate layer. 将上层吸出, 转入 / new tube. 避免中间层

(4) Alcohol precipitation

To precipitate DNA, add an equal volume of isopropanol to the tube containing the sample solution, invert the tube for 30 seconds, and then centrifuge for three minutes at 12,000 rpm or about 13,000 x g^(Note 14).

Discard the supernatant.

Wash the precipitate by adding 800 µl 70% ethanol, mix by inverting, incubate for three minutes, and centrifuge for three minutes at 12,000 rpm.

Discard the supernatant^(Note 15) and vacuum dry for five minutes using a centrifugal vacuum concentrator or a desktop desiccator. Visually confirm the dehydration of the sample.

(5) Dissolving DNA in TE buffer and removing RNA with CTAB eluent

Add 100 µl TE and 2 µl RNase A (10 mg/mL) to dissolve DNA.

After incubating the solution for 30 minutes at room temperature or 37°C, add 400 µl CTAB eluent. (CTAB extraction bu (f.c.e.))

^(Note 11) Proteinase digestion: If the sample is expected to have a high protein content and produce a thick intermediate layer during the PCI treatment, you can add 20 µl of a 20 mg/ml proteinase K solution to each tube to decrease the volume of the protein layer.

^(Note 12) Here, the centrifuge is assumed to be Eppendorf Centrifuge 5417R at 16,000 x g but use of the maximum speed with your centrifuge will generally produce satisfactory results.

^(Note 13) Record in detail the changes in the contents of the tube. If the solution does not successfully separate into layers, repeat either the spinning operation or the PCI-mediated removal of proteins. Perform all spinning operations at room temperature; lower temperatures will cause CTAB to precipitate and the solution does not separate properly.

^(Note 14) These conditions may need to be modified depending on salt concentrations and polysaccharide contents.

^(Note 15) After the supernatant is discarded, flash centrifuge the tube again at 5,000-12,000 rpm to thoroughly remove the supernatant. If the resulting precipitate is gel-like, wash the precipitate with alcohol several times to dehydrate it to some extent.

(6) Re-extraction with CIA

(用手指 搅拌)

Add 500 μ l CIA and mix briefly. Centrifuge for 15 minutes at 12,000 rpm and transfer the top layer to a new tube.

(7) Alcohol precipitation

取上层 (内含 DNA)

To remove phenol from the aqueous layer, add an equal volume of isopropanol to the tube containing the sample solution, invert the tube gently for 30 seconds, and then centrifuge for three minutes at 12,000 rpm or about 13,000 \times g^(Note 14).

Discard the supernatant^(Note 15) and vacuum dry for five minutes using a centrifugal vacuum concentrator or a desktop desiccator. Visually confirm the dehydration of the sample.

(8) Dissolving DNA in sterilized water

蒸馏水

Add 100 μ l sterilized water^(Note 16) to make a DNA solution. Divide the solution into several single-use aliquots for frozen storage at -20°C or below because repeated freezing and thawing is not advisable.

3.3.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Same as 3.1.7.

3.3.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by these procedures as determined by the OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratios will be approximately 1.8-2.0.

3.3.9 Record keeping

- (1) See 3.1.9. Also record the following:
- (2) The changes in the contents of the tube in Step (2) *PCI-mediated removal of proteins*; and
- (3) The manner in which precipitation proceeds in Step (4) *Alcohol precipitation* when an equal volume of isopropanol is added to the sample solution, the mixed solution is centrifuged and the supernatant is discarded.

3.3.10 Additional notes

Not applicable.

^(Note 16) In making the DNA solution, use of distilled water rather than TE buffer is recommended because EDTA in TE buffer can attract magnesium ion which can negatively affect PCR reactions.

4. PCR amplification and gel electrophoresis

4.1 Brief description of the procedure

PCR is performed using the extracted DNA as a template, a DNA polymerase and primers that specifically bind to the target sequences of genetically modified crops. The PCR products are then loaded on electrophoresis and visualized under UV light to determine whether the sample contains genetically modified crop varieties. At the same time, to determine that the target PCR products may be obtained, PCR amplification tests are performed using the primer pairs designed to amplify crop-specific endogenous genes.

Safety considerations for ethidium bromide

Personal protection:

The fluorescent dye ethidium bromide is a potent mutagen that can intercalate into a DNA strand. Always wear gloves when working with this dye and a mask when weighing the powder form.

Waste disposal:

For ethidium bromide solutions of lower concentrations, treat them using commercially available decontamination devices. For higher-concentration solutions, dispose of them through specialized hazardous waste treatment service providers.

4.2 Authority

- (1) For PCR, and the primers for soybean and maize samples, 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).
- (2) For the primers for potato samples, the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) guidelines, *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques* (MHLW Food Announcement No. 110 of 27 March 2001), and the amendment to the guidelines (MHLW Food Announcement No. 158 of 25 May 2001).
- (3) For the electrophoresis procedures, the QIAGEN Genomic-tip protocol for DNA isolation.

4.3 Applicability of the procedure to different food products

This procedure may be used to:

- (1) specifically detect the recombinant Roundup Ready soybean event 40-3-2;
- (2) specifically detect and screen for the five maize recombinants Bt11, Event 176, T25, MON810 and GA21; and
- (3) specifically detect the potato recombinants NewLeaf events Bt6 and SPBT02-05 and NewLeaf Plus events RBMT21-129, RBMT21-350 and RBMT22-82;

Note that this procedure screens maize samples for the 35S promoter from cauliflower mosaic virus and thus is not applicable to those processed food products that contain both maize and other plants that may be transformed using the promoter.

4.4 Equipment

4.4.1 PCR

- Thermal cycler:
Optional thermal cyclers include MJ Research's PTC-200 DNA Engine, Takara Bio's TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applied Biosystems's GeneAmp system 9700 with the MAX heating mode, and others that provide the same PCR results as the former three.
- Micropipettes in the volume ranges of, for example, 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μ ls.

4.4.2 Gel electrophoresis

- Gel electrophoresis apparatus:
Advance's Mupid[®]-2 gel electrophoretic system, or equivalent;
- Gel maker specified by your gel electrophoresis apparatus;
- Transilluminator;
- Photographic system;
- Micropipettes in the volume ranges of, for example, 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μ ls.

4.5 Reagents

4.5.1 PCR

- Applied Biosystems' AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, or equivalent;
- 2 mmol/l deoxynucleoside triphosphate (dNTP) solution
(The AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase kit includes the solution.);
- 25 mmol/L magnesium chloride (MgCl₂) solution
(The AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase kit includes the solution.);
- 10 X PCR Buffer II
- Primer pairs
According to the target sequences you are detecting (see Tables 4.1(1)-(3)), you can either purchase your primer pairs or prepare them yourself. The sizes of target sequences to be amplified are shown in Tables 4.1(1)-(3). Primer pairs are available from Nippon Gene Co., Ltd. and FASMAC Co., Ltd. and they will meet most of your amplification needs.

Primer pairs to detect GM soybeans:

- Endogenous *le1* gene (Nippon Gene Cat # 313-05501, FASMAC Cat # S1-1M, or their bulk products); and
- Roundup Resistant soybeans-specific sequence (Nippon Gene Cat # 310-05511, FASMAC Cat # S2-1M, or their bulk products).

Primer pairs to screen for GM maize:

- Endogenous *SSIb* gene (Nippon Gene Cat # 315-05441, FASMAC Cat # M1-1M, or their bulk products);
- CaMV 35S promoter (Nippon Gene Cat # 317-05521, FASMAC Cat # C1-1M, or their bulk products); and
- GA21-specific sequence (Nippon Gene Cat # 312-05451, FASMAC Cat # M2-1M, or their bulk products).

Primer pairs to detect specific GM maize lines:

- Endogenous *SSIb* gene (Nippon Gene Cat # 315-05441, FASMAC Cat # M1-1M, or their bulk products);
- GA21-specific sequence (Nippon Gene Cat # 312-05451, FASMAC Cat # M2-1M, or their bulk products);
- Bt11-specific sequence (Nippon Gene Cat # 319-05461, FASMAC Cat # M3-1M, or their bulk products);
- Event 176-specific sequence (Nippon Gene Cat # 316-05471, FASMAC Cat # M4-1M, or their bulk products); and
- MON810-specific sequence (Nippon Gene Cat # 310-05491, FASMAC Cat # M6-1M, or their bulk products).

Primer pairs to detect GM potatoes:

- Endogenous *Pss* gene (Nippon Gene Cat # 311-05501, FASMAC Cat # G5-1, their bulk products, or self-prepared);
- NewLeaf-specific sequence (Note that no commercial product of primer pairs seems to be available at present that can be used to detect this GM line. For the time being, the GM line may be detected by combination of the primer pairs for the CaMV 35S promoter and the positive control plasmid for either Roundup Resistant soybeans or maize. However, this method should be used with utmost care because the target sequence of PCR is also present in plants infected with cytomegalovirus (CMV) and many GM crops.);
- NewLeaf Plus-specific sequence (Nippon Gene Cat # 311-05511, FASMAC Cat # G1-1, their bulk products, or self-prepared);

Reference plasmid solution^(Note 17) is available from Nippon Gene and FASMAC.

Reference plasmid for soybeans:

^(Note 17) The reference plasmid solution is used as a positive control for both PCR reactions and GM crop varieties. You can also use the DNAs of recombinants if they are available.

- Positive control plasmid for the detection of Roundup-resistant GM soybeans (Nippon Gene Cat # 311-04941, FASMAC Cat # PS-1, or their bulk products)

Reference plasmid for maize:

- Positive control plasmid for the detection of GM maize (Nippon Gene Cat # 314-04811, FASMAC Cat # PM-1, or their bulk products)

Reference plasmid for potatoes (see the Note in the second item under “*Primer pairs to detect GM potatoes*”):

- Positive control plasmid for the detection of NewLeaf Plus GM potatoes (Nippon Gene Cat # 311-05301, FASMAC Cat # PP-1, or their bulk products)

4.5.2 Gel electrophoresis

- Agarose gel
- TBE or TAE buffer
- Ethidium bromide
- Gel loading buffer (blue juice)
- DNA molecular weight marker:
Choose a marker with good resolution for your PCR products. A 100-bp ladder marker should be the best choice.

4.6 Procedure

4.6.1 PCR procedure

Precautions

- Use sterilized laboratory utensils and equipment.
- Take all necessary measures to prevent contamination, such as wearing disinfected gloves.

(1) Number of tubes needed for PCR

Perform PCR for each solution obtained by DNA extraction of a sample. Include the primer pairs that can detect the endogenous gene specific to the crop to be tested to confirm that the PCR successfully yields the product of expected length. Use of such primer pairs should be accompanied by both negative and positive controls. A negative control detects contamination of reagents by sequences that can serve as PCR templates. A positive control with a reference plasmid for the crop, signals that the primer pairs are of good quality, that the PCR solution is thoroughly mixed, and that the PCR reaction proceeds successfully. Set up a “no template” negative control when the primer pairs for the detection of GM varieties are included. Also include in every PCR at least one negative control that has a reference plasmid template but does not have primer pairs that can bind to any GM variety. This control detects contamination of reagents by such primer pairs. If you have the non-GM variety of the crop at issue, you can set up a

negative control with a template prepared from the DNA extracted from the non-GM variety. This control detects contaminants such the primer pairs that bind to the endogenous gene present in those that are designed to bind to GM varieties.

(2) Preparation of master mix

The composition of the master mix is shown in Table 4.2 *Composition of PCR Solution*. Note that primer pairs are added after all other components have been mixed. The number of sterilized 0.2 ml tubes is determined by that of the samples for which PCR is performed. The total volume of PCR solution is then determined on the basis of the number of tubes. Add an extra volume to allow for losses due to, for example, droplets adhering to the inside wall of the tube. The volumes of individual components other than template DNA solution are calculated based on their relative volumes shown in Table 4.2. Mixed solution is then transferred in 22.5 µl aliquots to each reaction tube. Choose your micropipette considering its volume range, especially the minimum volume.

For the “no primer” negative control, prepare a separate master mix in which no primer pairs are added.

(3) Addition of samples

After 2.5 µl aliquots of template DNA solution have been added to the tubes containing the master mix, add the samples to the tube in the order of the extracted DNA, negative control and positive control solutions.

(4) PCR amplification

After all solutions are added, perform PCR on the thermal conditions specified in Table 4.3 *Thermal Cycles*.

(5) Post-PCR procedure

When PCR is complete, store the PCR product in a refrigerator or a freezer, or otherwise immediately run electrophoresis.

4.6.2 Gel electrophoresis

Run gel electrophoresis according to 4.6.2.1 *Pre-staining gel electrophoresis* or 4.6.2.2 *Post-staining gel electrophoresis*. These and other gel electrophoresis procedures described in this manual are based on the Mupid[®]-2 electrophoresis apparatus (Advance Co., Ltd., Japan).

Precautions

- There is no need at this stage for the use of sterilized laboratory utensils and equipment.
- Wear gloves to protect you from contact with hazardous materials.

4.6.2.1 Pre-staining gel electrophoresis

(1) Preparing the gel ready

Assemble the gel maker module and prepare a 2-3% agarose gel. First, weigh out

an appropriate amount of agarose and add it to the TBE buffer^{(Note 18)(Note 19)}. Heat the gel solution to melt agarose^(Note 20). When agarose is completely melted, add the ethidium bromide solution to the gel solution so that each 100 ml gel solution contains 50 µg ethidium bromide. Pour the thoroughly mixed solution into the gel maker module and place the comb carefully so that no air bubble is formed around it. Leave the gel to cool at ambient temperature for about 30 minutes. When the gel has cooled and set, remove the comb carefully from the gel so that you don't make a hole through the well from which the sample solution can leak.

(2) Preparing the gel tank ready

Place the gel in the gel tank. Check to ensure that the wells are on the side of the negative electrode. While it is advisable that you immediately run the gel, you can store it in the buffer for a few days.

Flood the gel with the TBE buffer^(Note 18) to barely cover the gel surface. Note that excess buffer results in longer migration time due to reduced current density.

(3) Running electrophoresis

Add 1 µl gel loading buffer to 5 µl of the post-PCR sample DNA solution^(Note 21) and gently pour the mixture into the wells. Also load the molecular weight marker in one or two lanes on the same gel. Remember that taking too much time in pouring a sample solution into wells can diffuse the DNAs into the gel and produce smeared bands.

When the sample solution has properly been poured into the wells, turn on the power and run the gel at 100 volts. Check if bubbles are generated at the electrodes by the electrolysis of water to ensure that electrophoresis is occurring. Stop running the gel when the BPB marker dye added to the gel loading buffer has migrated half of the way down the gel. Although "half of the way down the gel" is only an indication, it is not advisable to run the gel over a longer distance because the size of the PCR product is relatively small.

Photograph the gel immediately after electrophoresis to prevent diffusion of DNAs resulting in lower resolution of bands.

(4) Photographing the gel

Cover the surface of a UV transilluminator with plastic wrap^(Note 22). Place the gel

^(Note 18) You may use TAE for TBE if it works. In that case, also use TAE in the electrophoresis buffer.

^(Note 19) A 100 ml gel solution is sufficient for two large and one small gels.

^(Note 20) The gel solution can conveniently be melted in the microwave. Handle the flask(?) carefully to avoid burn by sudden boiling.

^(Note 21) You need not to strictly adhere to the 1:5 ratio of the gel loading buffer to the sample DNA solution. Thus, you can make the mixture simply by: (1) aspirating five volumes of the sample solution into the micropipette tip; (2) placing one volume of the buffer on a laboratory film; and (3) mixing the two solutions by drawing and expelling them several times with the micropipette. If you wish to increase the volume of the mixture because of, for example, the size of the wells, you can add one volume of the gel loading buffer per six volumes of the mixture.

^(Note 22) Some food wrap films absorb the UV light depending on the wavelength and the band image may not appear. In that case, use a polyvinylidene chloride film.

on the wrap and turn on the transilluminator^(Note 23). Photograph the gel with a CCD camera and examine the pattern of bands against that of the DNA molecular weight marker to determine if the bands of interest are present.

4.6.2.2 Post-staining gel electrophoresis

(1) Preparing the gel ready

Assemble the gel maker module and prepare a 2-3% agarose gel. First, weigh out an appropriate amount of agarose and add it to the TBE buffer^{(Note 18)(Note 19)}. Heat the gel solution to melt agarose^(Note 20). Pour the thoroughly mixed solution into the gel maker module and place the comb carefully so that no air bubble is formed around it. Leave the gel to cool at ambient temperature for about 30 minutes. When the gel has cooled and set, remove the comb carefully from the gel so that you don't make a hole through the well from which the sample solution can leak.

(2) Preparing the gel tank ready

Place the gel in the gel tank. Check to ensure that the wells are on the side of the negative electrode. While it is advisable that you immediately run the gel, you can store it in the buffer for a few days.

Flood the gel with the TBE buffer^(Note 18) to barely cover the gel surface. Note that excess buffer results in longer migration time due to reduced current density.

(3) Running electrophoresis

Add 1 µl gel loading buffer to 5 µl of the post-PCR sample DNA solution^(Note 21) and gently pour the mixture into the wells. Also load the molecular weight marker in one or two lanes on the same gel. Remember that taking too much time in pouring a sample solution into wells can diffuse the DNAs into the gel and produce smeared bands.

When the sample solution has properly been poured into the wells, turn on the power and run the gel at 100 volts. Check if bubbles are generated at the electrodes by the electrolysis of water to ensure that electrophoresis is occurring. Stop running the gel when the BPB marker dye added to the gel loading buffer has migrated half of the way down the gel. Although "half of the way down the gel" is only an indication, it is not advisable to run the gel over a longer distance because the size of the PCR product is relatively small.

^(Note 23) UV transilluminators are available in a variety of wavelengths. Considering health risk and sensitivity, a UV light of about 312 nm is best recommended.

^(Note 18) You may use TAE for TBE if it works. In that case, also use TAE in the electrophoresis buffer.

^(Note 19) A 100 ml gel solution is sufficient for two large and one small gels.

^(Note 20) The gel solution can conveniently be melted in the microwave. Handle the flask(?) carefully to avoid burn by sudden boiling.

^(Note 21) You need not to strictly adhere to the 1:5 ratio of the gel loading buffer to the sample DNA solution. Thus, you can make the mixture simply by: (1) aspirating five volumes of the sample solution into the micropipette tip; (2) placing one volume of the buffer on a laboratory film; and (3) mixing the two solutions by drawing and expelling them several times with the micropipette. If you wish to increase the volume of the mixture because of, for example, the size of the wells, you can add one volume of the gel loading buffer per six volumes of the mixture.

Stain the gel immediately after electrophoresis to prevent diffusion of DNAs resulting in lower resolution of bands.

(4) Staining the gel

Transfer the electrophoresed gel to a plastic container filled with an amount of new electrophoresis buffer sufficient to flood the gel. Add 50 µg of ethidium bromide per 100 ml of buffer. Place the container on a shaker and gently shake the solution for about 30 minutes to stain the gel.

(5) Photographing the gel

Cover the surface of a UV transilluminator with plastic wrap^(Note 22). Place the gel on the wrap and turn on the transilluminator^(Note 23). Photograph the gel with a CCD camera and examine the pattern of bands against that of the DNA molecular weight marker to determine if the bands of interest are present.

4.7 Verification of successful PCR

Successful PCR can be verified on the photograph of the electrophoresed gel by the absence of any band in the lane for the negative control and the presence of the bands of predicted lengths in the lane for the positive control. Once successful PCR is verified, the presence or absence of GMOs in the sample can be determined according to the procedures described in 5. *Determination of the presence or absence of GMOs*. If contamination is found, immediately take necessary actions specified in Part 5 *Prevention of Contamination* and perform PCR again using, if necessary, newly extracted DNA.

4.8 Specificity (and sensitivity) of the procedure

Combined with the DNA templates extracted from soybean and maize seeds and potatoes using the DNeasy Plant Maxi kit, the PCR procedure described in this manual produces the bands only when the test sample contains the target GMOs. This PCR procedure is also plant-specific in that it produces no band when other main crops including rice, wheat and barley are used as test samples.

4.9 Record keeping

Keep the photographs of electrophoresed gels in the image data file.

4.10 Additional notes

Not applicable.

^(Note 22) Some food wrap films absorb the UV light depending on the wavelength and the band image may not appear. In that case, use a polyvinylidene chloride film.

^(Note 23) UV transilluminators are available in a variety of wavelengths. Considering health risk and sensitivity, a UV light of about 312 nm is best recommended.

5. Determination of the presence or absence of GMOs

Presence or absence of GMOs in a test sample is determined by the presence or absence of the target PCR products through electrophoresis. Presence of a GMO is determined when the PCR products contained the lengths of both the plant's endogenous gene and the GMO-specific gene.

If the PCR products did not contain the ones corresponding to the endogenous gene, first perform PCR again using already extracted DNA. If the resulting PCR products did not show the presence of the endogenous gene, then extract DNA again from the sample crop and carry out PCR. If the PCR still did not amplify the sequence of the endogenous gene, identify the sample crop as "undetectable."

Table 4.1(1)
Primer pairs for soybeans*

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous <i>Le1</i> gene	<i>Le1-n02</i>	118 bp	<i>Le1</i>	
Introduced <i>P-35S</i> gene	<i>P35S-1</i>	101 bp	<i>P-35S</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also binds to the genes of non-GM plants infected with CMV.
Introduced <i>NOS-ter</i> gene	<i>NOS-ter-2</i>	151 bp	<i>NOS-ter</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also primes when the soil bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is present.
Introduced RRS-specific gene	<i>RRS-01</i>	121 bp	<i>cp4 epsps</i> from <i>P. hybrida</i>	

* The Japanese patents jointly applied for by the National Food Research Institute, Asahi Breweries, Ltd. and Nippon Flour Mills Co., Ltd. on these primer pairs are pending.

Table 4.1(2)
Primer pairs for maize**

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous <i>SSIIb</i> gene	SSIIb	151 bp	<i>zSSIIb</i>	
Introduced <i>P-35S</i> gene	P35S-1	101 bp	<i>P-35S</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also binds to the genes of non-GM plants infected with CMV.
Introduced <i>NOS-ter</i> gene	NOS-ter-2	151 bp	<i>NOS-ter</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also primes when the soil bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is present.
Introduced Event 176-specific gene	E176-2	100 bp	<i>cryIA(b)</i> - PEPC intron #9	
Introduced Bt11 gene	Bt11-3	127 bp	<i>adh1-1S</i> - <i>cryIA(b)</i>	
Introduced GA21 gene	GA21-3	133 bp	OTP - <i>m-epsps</i>	
Introduced T25 gene	T25-1	149 bp	<i>Pat</i> - 35S- <i>ter</i>	
Introduced MON810 gene	M810-2	113 bp	<i>hsp70</i> - <i>cryIA(b)</i>	

** The Japanese patents jointly applied for by the National Food Research Institute, Asahi Breweries, Ltd. and Nippon Flour Mills Co., Ltd. on these primer pairs are pending.

Table 4.1(3)
Primer pairs for maize

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous Pss gene	Pss 01n-5'	216 bp	TGACCT GGA CAC CAC AGT TAT	<i>S. tuberosum</i> sucrose synthase/ sense
	Pss 01n-3'		GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCGA	<i>S. tuberosum</i> sucrose synthase/ anti-sense
Introduced NewLeaf-specific gene				
Introduced NewLeaf Plus-specific gene	p-FMV02-5'	234 bp	AAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCTCTGA	p-FMV/ sense
	PLRV01-3'		AAAAGAGCGGCATATGCCGTTAAATCTG	PLRV/ anti-sense

Table 4.2
Composition of PCR solution.

Components	Volume (µl) / tube	Final concentration
Sterilized water	15.375	
AmpliTaq™ Gold	0.125	0.625 U
10x PCR buffer II	2.5	1 x
dNTP (2 mmol/l each)	2.5	200 µmol/l each
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1.5	1.5 mmol/l
Primer pair (25 µmol/l each)	0.5	0.5 µmol/l each
Template DNA (10 ng/µl)	2.5	25 ng
Total volume	25.0	

**Table 4.3
Thermal Cycles and Conditions**

Stage	Temperature (°C)	Duration	Number of cycle repetitions
Denaturation in the first cycle	95	10 min	1 cycle
Denaturation in the second cycle and after	95	30 sec	39 cycles (2nd-40th)
Annealing	60	30 sec	40 cycles
Extension in the first 39 cycles	72	30 sec	39 cycles (1st-39th)
Extension in the final cycle	72	7 min	1 cycle
Storage	4	NA*	NA*

NA*: Not applicable

附件四

筆者請問關於不同方法抽取同一種樣品 DNA 並進行定量測定後，結果是否會相符？兒玉貴志說是 case by case，無法一概而論。不同的樣品必須使用不一樣的抽取方法，否則差異極大。也就是說，有極大可能性當同一樣的樣品用 CTAB 及 Qiagen 抽取 DNA 並進行定量分析後會出現差異極大的結果！至於差異多大呢？他出示一份 powerpoint 結論，為之前吉村彰倫所做的，報告中共使用三種套組抽取 DNA（離子交換形式之 Q-genomic-tip、Q-Max、CTAB）。以豆腐而言 MAX 最好、Tip 次之、CTAB 最差，而 MAX 與 CTAB 間差了 8 個 cycles，魚類香腸製品則以 Tip 最好、CTAB 次之、MAX 最差，Tip 與 MAX 差異較小，大概 3-4cycles。加工前後也有差異，甚至 1% 及 5% 樣品加工前後差異情形也不同，若無看錯，5%加工後甚至標到 10%，夠詭異吧！但 corn-starch 樣品一定得用 genomic-tip，因為用 MAX 會抽不到 DNA。

所以哪種 DNA 抽取方法最好呢？目前並無定論，只能說 case by case 吧！但他說原則上仍建議以 MAX 為主，因為只有 MAX 經過 validation，其他兩種則無！

附件五

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

附件七

sample ID	SSIb	5分之1	NK603	5分之1	NK603/SSIb (CV)
1 (20uM)	22249.04	4449.81	11741.10	2348.22	0.53
2 (20uM)	20927.51	4185.50	11212.59	2242.52	0.54
3 (20uM)	25059.59	5011.92	13920.34	2784.07	0.56
4 (20uM)	21148.70	4229.74	11257.40	2251.48	0.53

sample ID	SSIb	5倍	NK603	5倍	NK603/SSIb (CV)
1 (4uM)	3848.63	19243.15	1908.74	9543.70	0.50
2 (4uM)	3606.57	18032.85	1830.42	9152.10	0.51
3 (4uM)	4824.21	24121.05	2388.30	11941.50	0.50
4 (4uM)	3230.48	16152.40	1805.98	9329.90	0.58

判斷是否抑制的方法：觀察(4uM)數據乘以5倍後，其值與(20uM)數據做比較，若(20uM)數據

大幅度低於(4uM)數據乘以5倍，表示有抑制現象。

以這四個檢體而言，應可說未出現抑制現象。

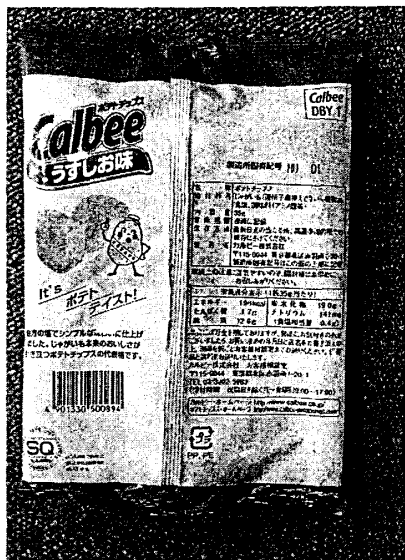
附件八

sample ID	SSIb	5分之1	NK603	5分之1	NK603/SSIb (CV)
5 (20uM)	23626.54	4725.31	11286.35	2257.27	0.48
6 (20uM)	21068.72	4213.74	12001.12	2400.22	0.57
7 (20uM)	17780.44	3556.09	10796.83	2159.37	0.61
8 (20uM)	21343.66	4268.73	11834.15	2366.83	0.55

sample ID	SSIb	5倍	NK603	5倍	NK603/SSIb (CV)
5 (4uM)	4023.97	20119.85	2677.70	13388.50	0.67
6 (4uM)	3731.07	18655.35	2412.89	12064.45	0.65
7 (4uM)	3033.73	15168.65	2136.98	10684.90	0.70
8 (4uM)	3931.91	19659.55	2524.20	12621.00	0.64

附件九

馬鈴薯



名称	ポテトチップス
原材料名	じゃがいも(遺伝子組換えでない)、植物油、食塩、調味料(アミノ酸等)
内容量	21g

澱粉

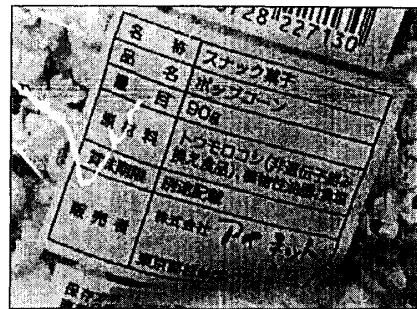
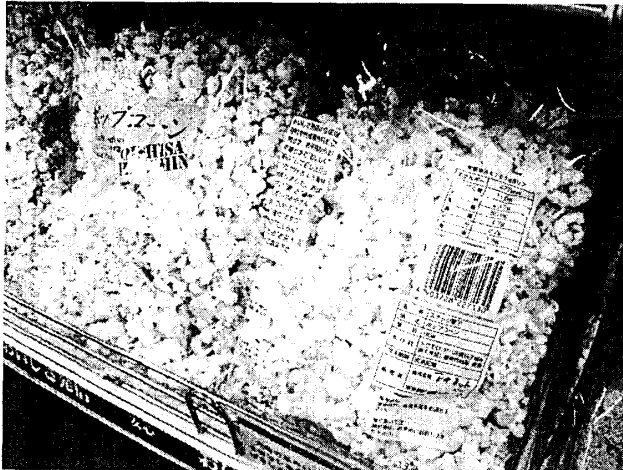


スナックあられ	
名称	菓子
原材料名	小麦粉、植物油、澱粉(遺伝子組み換え不使用)、食塩、プロセスチーズ、膨張剤、調味料(アミノ酸等)、着色料(アトール)、香料、香料、(原材料の一部に豚肉由来のものを含む)
内容量	105g + 21g
賞味期限	枠外上部に記載
保存方法	直射日光、高温・多湿を避けて保存してください。

玉米澱粉



爆米花



植物油脂



商品名 えびせんべい	
名称	米菓
原料名	うるち米、植物油類(コーン油(遺伝子組換え不分別)、パーム油)えび、食塩、たん白加水分解物、デキストリン、酵母エキス、調味料(アミノ酸等)、着色料(赤色102号、赤色106号)。(原材料の一部に大豆、乳を含む)

醤油



商品名 キコーマンしょうゆ	
名称	醸造醤油
原料名	大豆(遺伝子組換え不分別)、小麦(遺伝子組換え不分別)、水、食塩、アルコール
内容量	1L
賞味期限	開栓後記載
保存方法	直射日光を避け常温で保存してください。
製造者	キコーマン株式会社
〒	470-0250 愛知県野田町野田250

黄豆渣



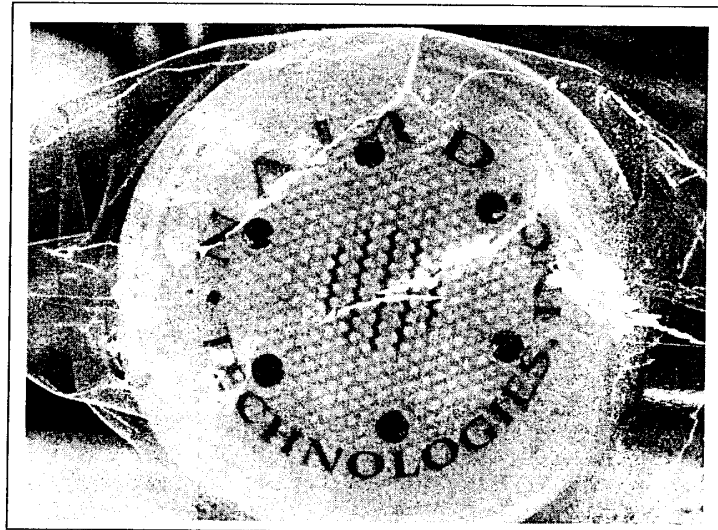
遺伝子組み換え大豆は使用しておりません

黄豆粉

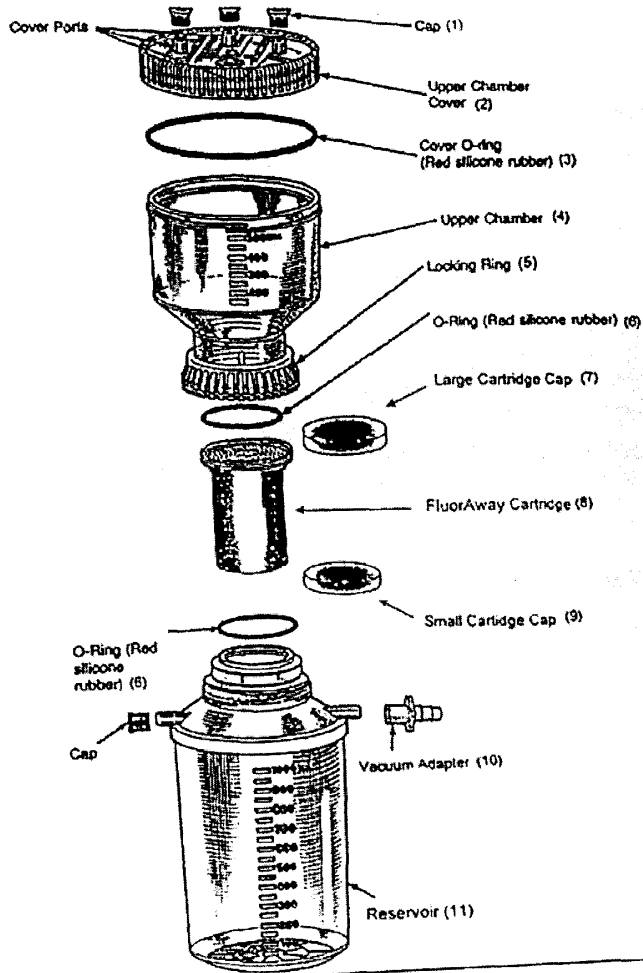


種子総合技術センターによる	
名称	きな粉
原材料名	大豆(北海道産100%・ 遺伝子組換えでない)
内容量	120g
賞味期限	枠外上部に記載
保存方法	直射日光をさけて、常温で 保存してください。

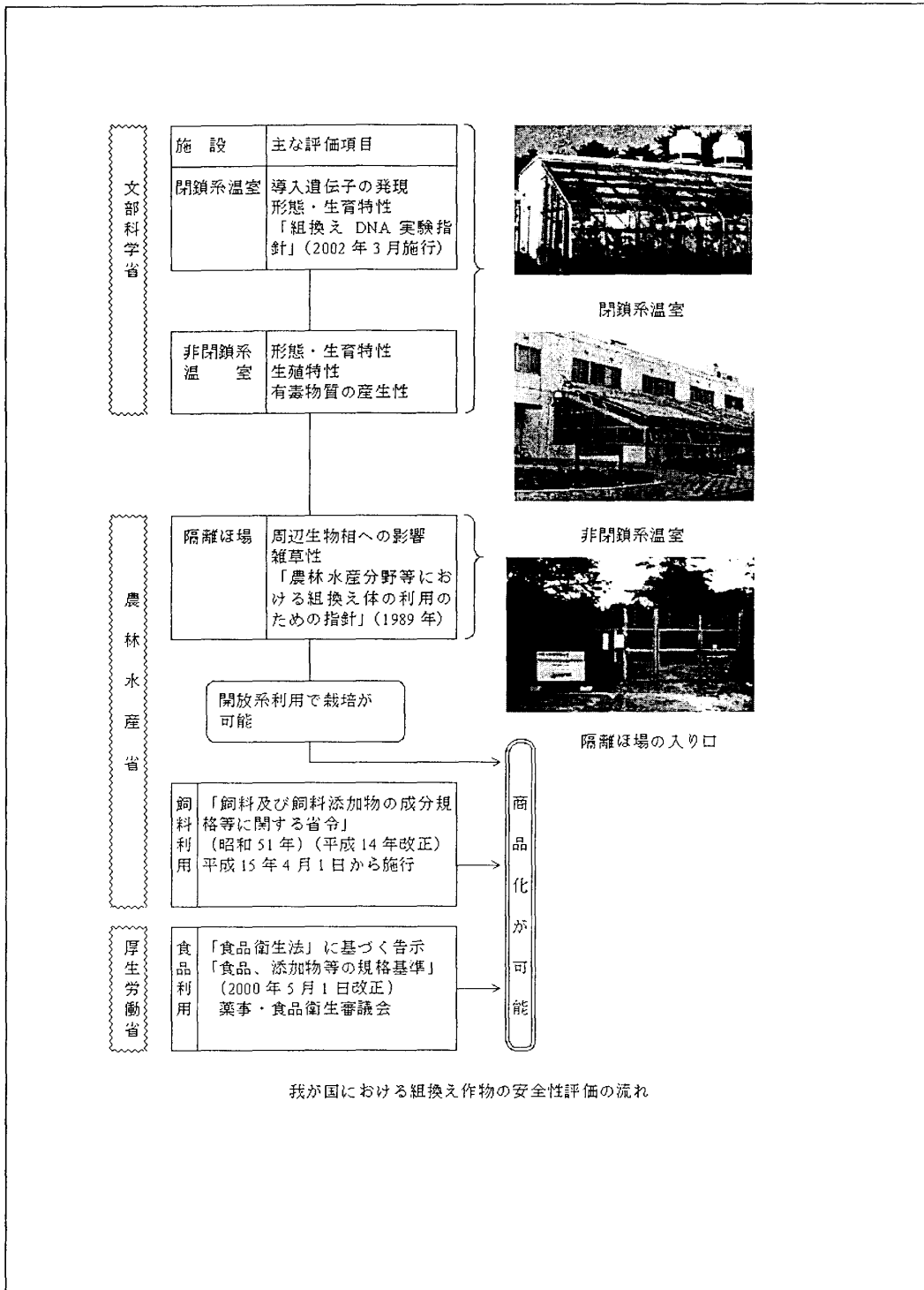
附件十



Product Diagram
Main Features of the FluorAway System



附件十一



附件十二

2003年7月17日

独立行政法人 食品総合研究所
食品機能部 味覚機能研究室
日野 室長 殿

プリマハム(株)
基礎研究所
丹治 宏之

ご依頼の件

拝啓

いつも大変お世話になっております。

早速ですが、先日所長宛ご依頼いただきましたサンプル、下記の通りですので、よろしくお願いたします。

— 記 —

1. 製品サンプル

商品名	CS推定値(%) ^a	澱粉含有率(%)
①アパレンジャーソーセージ	7.5	0
②まるかじりポークソーセージ	0.9	3.0
③さざみハム Sliced Ham	3.1	11.0
④チョップドハム(スライス)	6.7	13.0

注) 上記商品の品名は、「①加圧加熱ウインナーソーセージ、②ポークソーセージ(フランクフルト)、③食肉製品(チョップドハム・細切り)、④食肉製品(チョップドハム・スライス)」となっています。もし外部発表などされる場合は、品名での表記をお願いします。

^aCS: コーンスターチ

2. コーンスターチ(CS)試作品

項目	CT	①	②	③
豚肉 豚肉 (Pork meat)	60	60	60	60
水 Water	40	40	40	40
食塩 Salt	1.9	1.9	1.9	1.9
重合リン酸塩	0.2	0.2	0.2	0.2
亜硝酸ナトリウム	0.012	0.012	0.012	0.012
ビタミンC Vitamin C	0.03	0.03	0.03	0.03
CS (Corn Starch)	0	10	15	20
計	102.142	112.142	117.142	122.142
CS推定値	0.0	8.9	12.8	16.4

- 作成方法
- ① 豚肉をチョッパーにかけ、挽肉とする。
 - ② 豚肉、水、塩漬剤を加えてサイレントカッターでソーセージ生地とする。
 - ③ ケーシングに充填する。
 - ④ 80°Cで30分間、加熱処理を行う。
 - ⑤ 氷水中で冷却する。

以上

NIHS 及 NFRI 權責劃分表

日本政府

食品醫藥方面

MHLW (厚生勞動省)

(Ministry of Health and Labour and Welfare)

Food Risk

食品：un-authorized GM 檢測
食品：authorized GM 檢測
(包括 Food labeling 之管理)

轄

NIHS (國立醫藥品食品衛生研究所)

考量之出發點：

1. MHLW 負責把關國民之健康。
2. un-authorized GMO 對人體之危害仍為未知數。
3. un-authorized GMO 必須於第一時間阻止其進入日本市場。

農業方面

MAFF (農林水產省)

(Ministry of agriculture and Forestry and Fishment)

Food Quality Information

飼料：authorized 檢測
飼料：un-authorized 檢測

轄

NFRI (食品總和研究所)

考量之出發點：

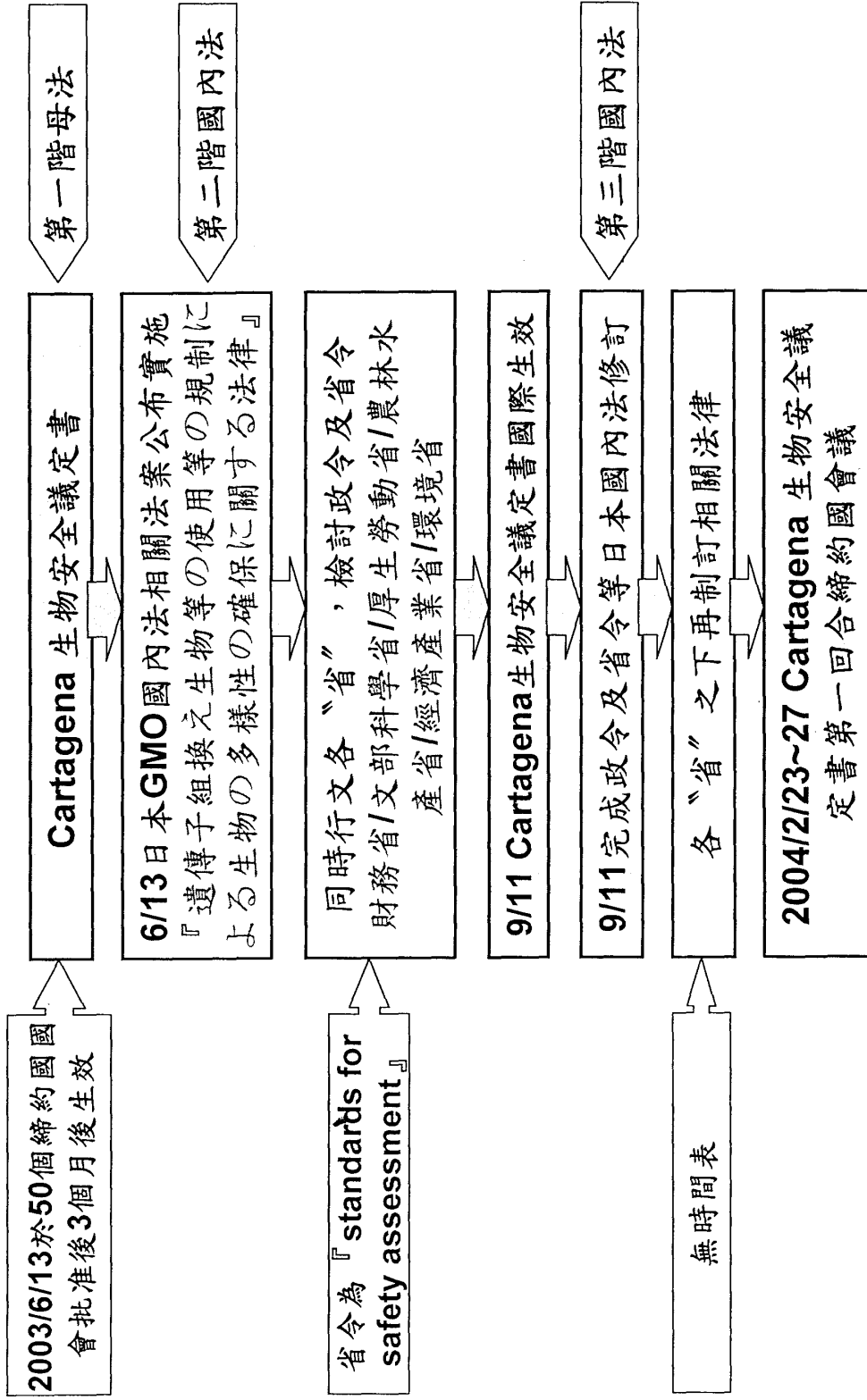
1. 滿足國民知的權力。
2. 國民對市售含GMO之產品有選擇權。

	依據律法	架構在Cartagina protocol 之下之管理單位	備註
厚生勞動省 (MHLW)	食品衛生 法律	1.橫濱檢疫所(人體, 食品安全)	食品
農林水產省 (MAFF)	日本農林 規格	1.橫濱植物防疫所(環境安全) (Plant Portection Station) 2.動物檢疫所 (The Animal Quarantine Service) 3.家畜改良中心 (National Livestock Breeding Center) 4.農林水產消費技術中心 (CFQLCS) 5.肥飼料檢查所 (Fertilizer and Feed Inspection Station) 6.種苗管理中心 (National Center for Seeds and Seedlings)	亦管理動物性食品 (如牛羊豬雞)

當船舶進口穀物作業時，檢疫之負責單位		
農林水產省之所屬單位	SEED	Commodity
橫濱植物防疫所	○	○
動物檢疫所	×	×
家畜改良中心	○	×
農林水產消費技術中心	×	○
肥飼料檢查所	×	○
種苗管理中心	○	×

MAFF之下各單位負責之範疇	
農林水產省之所屬單位	負責之範疇
橫濱植物防疫所	imported plants
動物檢疫所	imported animals
家畜改良中心	seeds of feed crops
農林水產消費技術中心	processed foods
肥飼料檢查所	feeds
種苗管理中心	seeds of crops

日本政府GMO相關法律架構

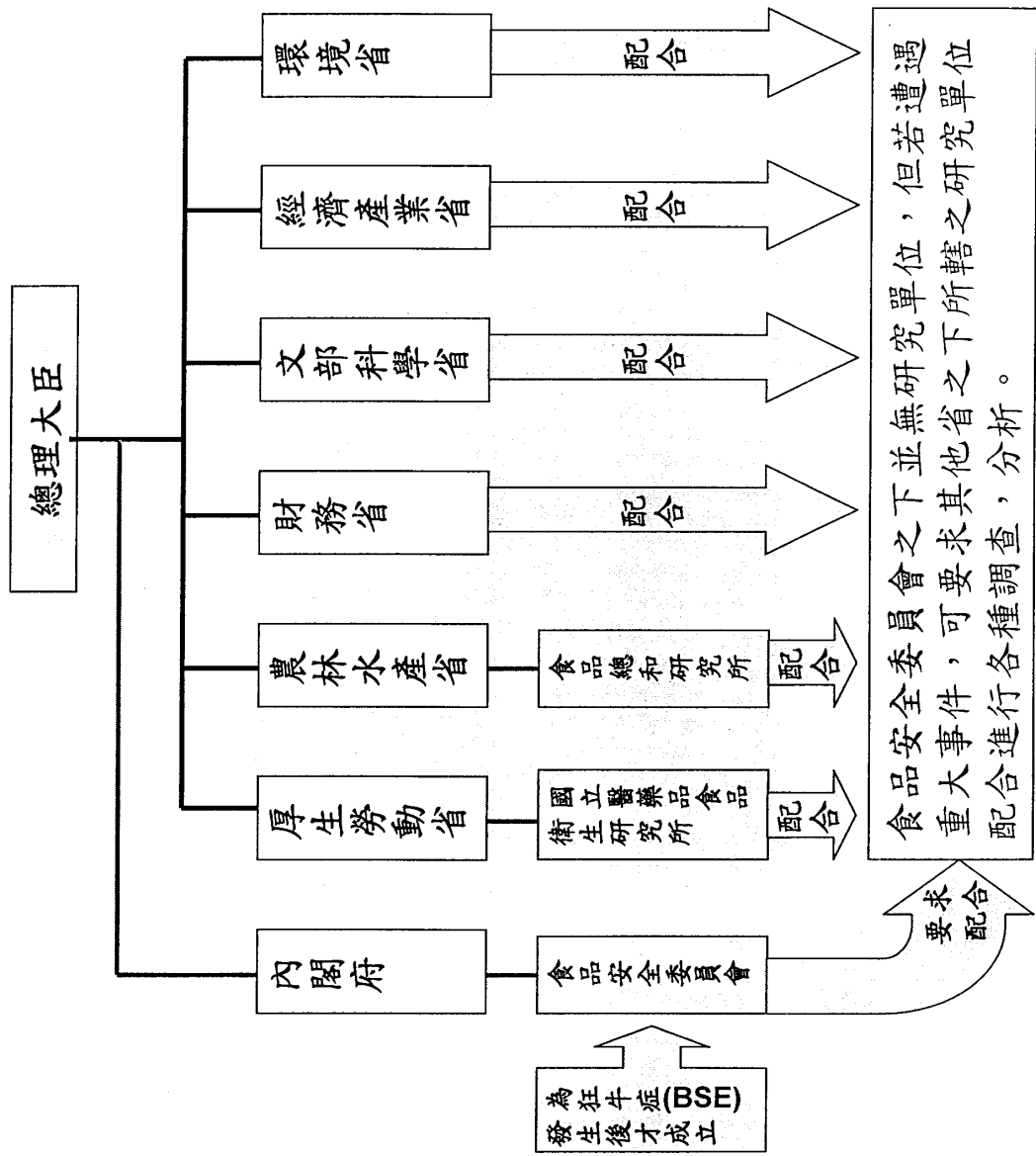


日本之法律種類

層級	法之種類	制訂者
legal	法律	國會議員
	政令(閣議)	總理大臣
	省令	大臣
	告示	省之職員
Guide-line	通達	局長 or 科長

日本之法律產生流程

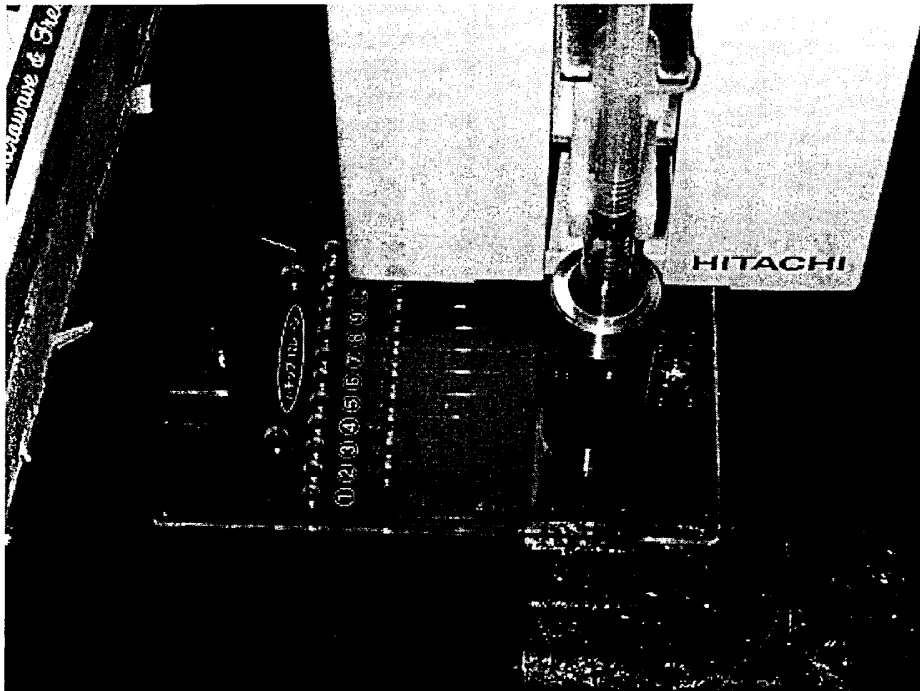
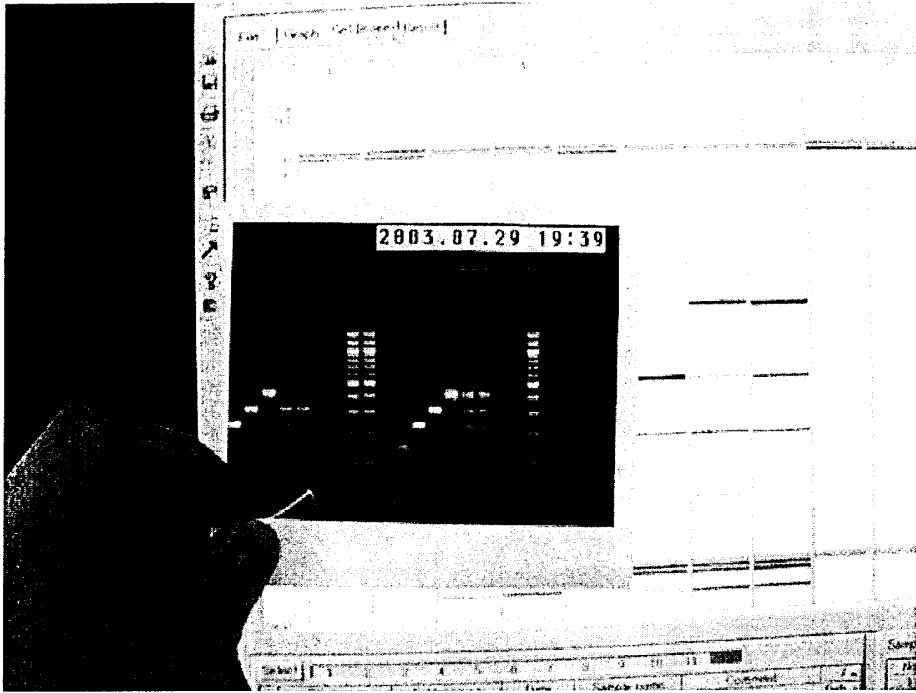
	法律	政令 (閣議)	省令	告示
制訂	省(役人) or 議員	省(役人)	省(役人)	省(役人)
同意	國會	大臣	大臣	↓
同意	天皇	總理大臣	↓	↓
行使	國民	國民	國民	國民



內閣府直接對「總理大臣」負責，但專注於科學發展之領域，「內閣府」與「省」之系統是獨立運作的。

附件十四





附件十五

食品安全基本法（平成十五年五月二十三日法律第四十八号）

最終改正 平成十五年六月十一日法律第七十四号

目次

- 第一章 総則（第一条—第十条）
- 第二章 施策の策定に係る基本的な方針（第十一条—第二十一条）
- 第三章 食品安全委員会（第二十二条—第三十八条）
- 附則

第一章 総則

（目的）

第一条 この法律は、科学技術の発展、国際化の進展その他の国民の食生活を取り巻く環境の変化に適確に対応することの緊要性にかんがみ、食品の安全性の確保に関し、基本理念を定め、並びに国、地方公共団体及び食品関連事業者の責務並びに消費者の役割を明らかにするとともに、施策の策定に係る基本的な方針を定めることにより、食品の安全性の確保に関する施策を総合的に推進することを目的とする。

（定義）

第二条 この法律において「食品」とは、すべての飲食物（薬事法（昭和三十五年法律第百四十五号）に規定する医薬品及び医薬部外品を除く。）をいう。

（食品の安全性の確保のための措置を講ずるに当たっての基本的認識）

第三条 食品の安全性の確保は、このために必要な措置が国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下に講じられることにより、行われなければならない。

（食品供給行程の各段階における適切な措置）

第四条 農林水産物の生産から食品の販売に至る一連の国の内外における食品供給の行程（以下「食品供給行程」という。）におけるあらゆる要素が食品の安全性に影響を及ぼすおそれがあることにかんがみ、食品の安全性の確保は、このために必要な措置が食品供給行程の各段階において適切に講じられることにより、行われなければならない。

（国民の健康への悪影響の未然防止）

第五条 食品の安全性の確保は、このために必要な措置が食品の安全性の確保に関する国際的動向及び国民の意見に十分配慮しつつ科学的知見に基づいて講じられることによって、食品を摂取することによる国民の健康への悪影響が未然に防止されるようにすることを旨として、行われなければならない。

（国の責務）

第六条 国は、前三条に定める食品の安全性の確保についての基本理念（以下「基本理念」という。）にのっとり、食品の安全性の確保に関する施策を総合的に策定し、及び実施する責務を有する。

（地方公共団体の責務）

第七条 地方公共団体は、基本理念にのっとり、食品の安全性の確保に関し、国との適切な役割分担を踏まえて、その地方公共団体の区域の自然的経済的社会的諸条件に応じた施策を策定し、及び実施する責務を有する。

（食品関連事業者の責務）

第八条 肥料、農薬、飼料、飼料添加物、動物用の医薬品その他食品の安全性に影響を及ぼすおそれがある農林漁業の生産資材、食品（その原料又は材料として使用される農林水産物を含む。）若しくは添加物（食品衛生法（昭和二十二年法律第二百三十三号）第二条第二項に規定する添加物をいう。）又は器具（同条第四項に規定する器具をいう。）若しくは容器包装（同条第五項に規定する容器包装をいう。）の生産、輸入又は販売その他の事業活動を行う事業者（以下「食品関連事業者」という。）は、基本理念にのっとり、その事業活動を行うに当たって、自らが食品の安全性の確保について第一義的責任を有していることを認識して

- 、食品の安全性を確保するために必要な措置を食品供給行程の各段階において適切に講ずる責務を有する。
- 2 前項に定めるもののほか、食品関連事業者は、基本理念にのっとり、その事業活動を行うに当たっては、その事業活動に係る食品その他の物に関する正確かつ適切な情報の提供に努めなければならない。
 - 3 前二項に定めるもののほか、食品関連事業者は、基本理念にのっとり、その事業活動に関し、国又は地方公共団体が実施する食品の安全性の確保に関する施策に協力する責務を有する。

(消費者の役割)

第九条 消費者は、食品の安全性の確保に関する知識と理解を深めるとともに、食品の安全性の確保に関する施策について意見を表明するように努めることによって、食品の安全性の確保に積極的な役割を果たすものとする。

(法制上の措置等)

第十条 政府は、食品の安全性の確保に関する施策を実施するため必要な法制上又は財政上の措置その他の措置を講じなければならない。

第二章 施策の策定に係る基本的な方針

(食品健康影響評価の実施)

第十一条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、人の健康に悪影響を及ぼすおそれがある生物学的、化学的若しくは物理的な要因又は状態であって、食品に含まれ、又は食品が置かれるおそれがあるものが当該食品が摂取されることにより人の健康に及ぼす影響についての評価（以下「食品健康影響評価」という。）が施策ごとに行われなければならない。ただし、次に掲げる場合は、この限りでない。

- 一 当該施策の内容からみて食品健康影響評価を行うことが明らかに必要でないとき。
 - 二 人の健康に及ぼす悪影響の内容及び程度が明らかであるとき。
 - 三 人の健康に悪影響が及ぶことを防止し、又は抑制するため緊急を要する場合で、あらかじめ食品健康影響評価を行ういとまがないとき。
- 2 前項第三号に掲げる場合においては、事後において、遅滞なく、食品健康影響評価が行われなければならない。
 - 3 前二項の食品健康影響評価は、その時点において到達されている水準の科学的知見に基づいて、客観的かつ中立公正に行われなければならない。

(国民の食生活の状況等を考慮し、食品健康影響評価の結果に基づいた施策の策定)

第十二条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、食品を摂取することにより人の健康に悪影響が及ぶことを防止し、及び抑制するため、国民の食生活の状況その他の事情を考慮するとともに、前条第一項又は第二項の規定により食品健康影響評価が行われたときは、その結果に基づいて、これが行われなければならない。

(情報及び意見の交換の促進)

第十三条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、当該施策の策定に国民の意見を反映し、並びにその過程の公正性及び透明性を確保するため、当該施策に関する情報の提供、当該施策について意見を述べる機会の付与その他の関係者相互間の情報及び意見の交換の促進を図るために必要な措置が講じられなければならない。

(緊急の事態への対処等に関する体制の整備等)

第十四条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、食品を摂取することにより人の健康に係る重大な被害が生ずることを防止するため、当該被害が生じ、又は生じるおそれがある緊急の事態への対処及び当該事態の発生を防止に関する体制の整備その他の必要な措置が講じられなければならない。

(関係行政機関の相互の密接な連携)

第十五条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、食品の安全性の確保のために必要な措置が食品供給行程の各段階において適切に講じられるようにするため、関係行政機関の相互の密接な連携の下に、これが行われなければならない。

(試験研究の体制の整備等)

第十六条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、科学的知見の充実に努めることが食品の安全性の確保上重要であることにかんがみ、試験研究の体制の整備、研究開発の推進及びその成果の普及、研究者の養成その他の必要な措置が講じられなければならない。

(国の内外の情報の収集、整理及び活用等)

第十七条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、国民の食生活を取り巻く環境の変化に即応して食品の安全性の確保のために必要な措置の適切かつ有効な実施を図るため、食品の安全性の確保に関する国の内外の情報の収集、整理及び活用その他の必要な措置が講じられなければならない。

(表示制度の適切な運用の確保等)

第十八条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、食品の表示が食品の安全性の確保に関し重要な役割を果たしていることにかんがみ、食品の表示の制度の適切な運用の確保その他食品に関する情報を正確に伝達するために必要な措置が講じられなければならない。

(食品の安全性の確保に関する教育、学習等)

第十九条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、食品の安全性の確保に関する教育及び学習の振興並びに食品の安全性の確保に関する広報活動の充実により国民が食品の安全性の確保に関する知識と理解を深めるために必要な措置が講じられなければならない。

(環境に及ぼす影響の配慮)

第二十条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、当該施策が環境に及ぼす影響について配慮して、これが行われなければならない。

(措置の実施に関する基本的事項の決定及び公表)

第二十一条 政府は、第十一条から前条までの規定により講じられる措置につき、それらの実施に関する基本的事項（以下「基本的事項」という。）を定めなければならない。

2 内閣総理大臣は、食品安全委員会の意見を聴いて、基本的事項の案を作成し、閣議の決定を求めなければならない。

3 内閣総理大臣は、前項の規定による閣議の決定があったときは、遅滞なく、基本的事項を公表しなければならない。

4 前二項の規定は、基本的事項の変更について準用する。

第三章 食品安全委員会

(設置)

第二十二条 内閣府に、食品安全委員会（以下「委員会」という。）を置く。

(所掌事務)

第二十三条 委員会は、次に掲げる事務をつかさどる。

一 第二十一条第二項の規定により、内閣総理大臣に意見を述べること。

二 次条の規定により、又は自ら食品健康影響評価を行うこと。

三 前号の規定により行った食品健康影響評価の結果に基づき、食品の安全性の確保のため講ずべき施策について内閣総理大臣を通じて関係各大臣に勧告すること。

四 第二号の規定により行った食品健康影響評価の結果に基づき講じられる施策の実施状況を監視し、必要があると認めるときは、内閣総理大臣を通じて関係各大臣に勧告すること。

五 食品の安全性の確保のため講ずべき施策に関する重要事項を調査審議し、必要があると認めるときは、関係行政機関の長に意見を述べること。

六 第二号から前号までに掲げる事務を行うために必要な科学的調査及び研究を行うこと。

七 第二号から前号までに掲げる事務に係る関係者相互間の情報及び意見の交換を企画し、及び実施すること。

八 関係行政機関が行う食品の安全性の確保に関する関係者相互間の情報及び意見の交換に関する事務の調整を行うこと。

2 委員会は、前項第二号の規定に基づき食品健康影響評価を行ったときは、遅滞なく、関係各大臣に対して

- 、その食品健康影響評価の結果を通知しなければならない。
- 3 委員会は、前項の規定による通知を行ったとき、又は第一項第三号若しくは第四号の規定による勧告をしたときは、遅滞なく、その通知に係る事項又はその勧告の内容を公表しなければならない。
 - 4 関係各大臣は、第一項第三号又は第四号の規定による勧告に基づき講じた施策について委員会に報告しなければならない。

(委員会の意見の聴取)

第二十四条 関係各大臣は、次に掲げる場合には、委員会の意見を聴かななければならない。ただし、委員会が第十一条第一項第一号に該当すると認める場合又は関係各大臣が同項第三号に該当すると認める場合は、この限りでない。

- 一 食品衛生法第四条第二号ただし書（同法第二十九条第二項において準用する場合を含む。）に規定する人の健康を害する虞がない場合を定めようとするとき、同法第四条の二の規定による販売の禁止をしようとするとき、同法第五条第一項の厚生労働省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき、同法第六条に規定する人の健康を損なうおそれのない場合を定めようとするとき、同法第七条第一項（同法第二十九条第二項において準用する場合を含む。）若しくは同法第十条第一項（同法第二十九条第三項において準用する場合を含む。）の規定により基準若しくは規格を定めようとするとき、又は同法第十九条の十八第一項の規定により基準を定めようとするとき。
- 二 農薬取締法（昭和二十三年法律第八十二号）第一条の三の規定により公定規格を設定し、変更し、若しくは廃止しようとするとき、同法第二条第一項の規定により特定農薬を指定し、若しくは変更しようとするとき、又は同法第三条第二項（同法第十五条の二第六項において準用する場合を含む。）の基準（同法第三条第一項第六号又は第七号に掲げる場合に該当するかどうかの基準を除く。）を定め、若しくは変更しようとするとき。
- 三 肥料取締法（昭和二十五年法律第二百二十七号）第三条の規定により公定規格を設定し、変更し、若しくは廃止しようとするとき、同法第四条第一項第四号の政令の制定若しくは改廃の立案をしようとするとき、同法第七条第一項若しくは第八条第三項（これらの規定を同法第三十三条の二第六項において準用する場合を含む。）の規定により特定普通肥料についての登録若しくは仮登録をしようとするとき、同法第十三条の二第二項（同法第三十三条の二第六項において準用する場合を含む。）の規定により特定普通肥料についての変更の登録若しくは仮登録をしようとするとき、又は同法第十三条の三第一項（同法第三十三条の二第六項において準用する場合を含む。）の規定により特定普通肥料についての変更の登録若しくは仮登録をし、若しくはその登録若しくは仮登録を取り消そうとするとき。
- 四 家畜伝染病予防法（昭和二十六年法律第六十六号）第二条第一項の政令の制定若しくは改廃の立案をしようとするとき、同法第四条第一項の届出伝染病を定める農林水産省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき、又は同法第六十二条第一項の政令の制定若しくは改廃の立案をしようとするとき。
- 五 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和二十八年法律第三十五号）第二条第三項の規定により飼料添加物を指定しようとするとき、同法第三条第一項の規定により基準若しくは規格を設定し、改正し、若しくは廃止しようとするとき、又は同法第二十三条の規定による製造、輸入、販売若しくは使用の禁止をしようとするとき。
- 六 と畜場法（昭和二十八年法律第一百四号）第九条第一項第三号の厚生労働省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき、又は同法第十条第五項の政令の制定若しくは改廃の立案をしようとするとき。
- 七 水道法（昭和三十三年法律第七十七号）第四条第二項（同条第一項第一号から第三号までの規定に係る部分に限る。）の厚生労働省令を制定し、又は改廃しようとするとき。
- 八 薬事法第十四条第一項（同法第二十三条において準用する場合を含む。以下同じ。）若しくは同法第八十三条の規定により読み替えて適用される同項の規定による動物のために使用されることが目的とされている医薬品、医薬部外品若しくは医療用具（以下「動物用医薬品等」という。）についての承認をしようとするとき、同法第十四条の四第一項（同法第十九条の四及び第二十三条において準用する場合を含む。以下同じ。）若しくは同法第八十三条の規定により読み替えて適用される同項の規定による動物用医薬品

等についての再審査を行おうとするとき、同法第十四条の五第一項（同法第十九条の四及び第二十三条において準用する場合を含む。以下同じ。）若しくは同法第八十三条の規定により読み替えて適用される同項の規定による動物用医薬品等についての再評価を行おうとするとき、同法第十九条の二第一項若しくは第八十三条の規定により読み替えて適用される同項の規定による動物用医薬品等についての承認をしようとするとき、又は同法第八十三条の二第一項の農林水産省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき。

九 農用地の土壌の汚染防止等に関する法律（昭和四十五年法律第百三十九号）第二条第三項の政令（農用地の土壌に含まれることに起因して人の健康を損なうおそれがある農畜産物が生産されるおそれがある物質を定めるものに限る。）又は同法第三条第一項の政令（農用地の利用に起因して人の健康を損なうおそれがある農畜産物が生産されると認められ、又はそのおそれが著しいと認められる地域の要件を定めるものに限る。）の制定又は改廃の立案をしようとするとき。

十 食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律（平成二年法律第七十号）第十一条、第十五条第五項又は第十九条の厚生労働省令を制定し、又は改廃しようとするとき。

十一 ダイオキシン類対策特別措置法（平成十一年法律第百五号）第六条第一項の政令の制定又は改廃の立案をしようとするとき。 *らさ*

十二 牛海綿状脳症対策特別措置法（平成十四年法律第七十号）第七条第一項又は第二項の厚生労働省令を制定し、又は改廃しようとするとき。

十三 前各号に掲げるもののほか、政令で定めるとき。

2 関係各大臣は、前項ただし書の場合（関係各大臣が第十一条第一項第三号に該当すると認めた場合に限る。）においては、当該食品の安全性の確保に関する施策の策定の後相当の期間内に、その旨を委員会に報告し、委員会の意見を聴かなければならない。

3 第一項に定めるもののほか、関係各大臣は、食品の安全性の確保に関する施策を策定するため必要があると認めるときは、委員会の意見を聴くことができる。

（資料の提出等の要求）

第二十五条 委員会は、その所掌事務を遂行するため必要があると認めるときは、関係行政機関の長に対し、資料の提出、意見の表明、説明その他必要な協力を求めることができる。

（調査の委託）

第二十六条 委員会は、その所掌事務を遂行するため必要があると認めるときは、独立行政法人、民法（明治二十九年法律第八十九号）第三十四条の規定により設立された法人、事業者その他の民間の団体、都道府県の試験研究機関又は学識経験を有する者に対し、必要な調査を委託することができる。

（緊急時の要請等）

第二十七条 委員会は、食品の安全性の確保に関し重大な被害が生じ、又は生じるおそれがある緊急の事態に対処するため必要があると認めるときは、国の関係行政機関の試験研究機関に対し、食品健康影響評価に必要な調査、分析又は検査を実施すべきことを要請することができる。 *health-risk assessment*

2 国の関係行政機関の試験研究機関は、前項の規定による委員会の要請があったときは、速やかにその要請された調査、分析又は検査を実施しなければならない。

3 委員会は、食品の安全性の確保に関し重大な被害が生じ、又は生じるおそれがある緊急の事態に対処するため必要があると認めるときは、関係各大臣に対し、独立行政法人国立健康・栄養研究所法（平成十一年法律第百八十号）第十二条第一項の規定による求め又は独立行政法人農林水産消費技術センター法（平成十一年法律第百八十三号）第十二条第一項、独立行政法人農業技術研究機構法（平成十一年法律第百九十二号）第十二条第一項、独立行政法人農業環境技術研究所法（平成十一年法律第百九十四号）第十二条第一項、独立行政法人食品総合研究所法（平成十一年法律第百九十六号）第十二条第一項若しくは独立行政法人水産総合研究センター法（平成十一年法律第百九十九号）第十二条第一項の規定による要請をしよう求めることができる。

（組織）

第二十八条 委員会は、委員七人をもって組織する。

CFDLCS

2 委員のうち三人は、非常勤とする。

(委員の任命)

第二十九条 委員は、食品の安全性の確保に関して優れた識見を有する者のうちから、両議院の同意を得て、内閣総理大臣が任命する。

2 委員の任期が満了し、又は欠員が生じた場合において、国会の閉会又は衆議院の解散のために両議院の同意を得ることができないときは、内閣総理大臣は、前項の規定にかかわらず、同項に定める資格を有する者のうちから、委員を任命することができる。

3 前項の場合においては、任命後最初の国会で両議院の事後の承認を得なければならない。この場合において、両議院の事後の承認を得られないときは、内閣総理大臣は、直ちにその委員を罷免しなければならない。

(委員の任期)

第三十条 委員の任期は、三年とする。ただし、補欠の委員の任期は、前任者の残任期間とする。

2 委員は、再任されることができる。

3 委員の任期が満了したときは、当該委員は、後任者が任命されるまで引き続きその職務を行うものとする。

(委員の罷免)

第三十一条 内閣総理大臣は、委員が心身の故障のため職務の執行ができないと認める場合又は委員に職務上の義務違反その他委員たるに適しない非行があると認める場合においては、両議院の同意を得て、これを罷免することができる。

(委員の服務)

第三十二条 委員は、職務上知ることのできた秘密を漏らしてはならない。その職を退いた後も同様とする。

2 委員は、在任中、政党その他の政治的団体の役員となり、又は積極的に政治運動をしてはならない。

3 常勤の委員は、在任中、内閣総理大臣の許可のある場合を除くほか、報酬を得て他の職務に従事し、又は営利事業を営み、その他金銭上の利益を目的とする業務を行ってはならない。

(委員の給与)

第三十三条 委員の給与は、別に法律で定める。

(委員長)

第三十四条 委員会に委員長を置き、委員の互選によって常勤の委員のうちからこれを定める。

2 委員長は、会務を総理し、委員会を代表する。

3 委員長に事故があるときは、あらかじめその指名する常勤の委員が、その職務を代理する。

(会議)

第三十五条 委員会は、委員長が招集する。

2 委員会は、委員長及び三人以上の委員の出席がなければ、会議を開き、議決をすることができない。

3 委員会の議事は、出席者の過半数でこれを決し、可否同数のときは、委員長の決するところによる。

4 委員長に事故がある場合の第二項の規定の適用については、前条第三項に規定する委員は、委員長とみなす。

(専門委員)

第三十六条 委員会に、専門の事項を調査審議させるため、専門委員を置くことができる。

2 専門委員は、学識経験のある者のうちから、内閣総理大臣が任命する。

3 専門委員は、当該専門の事項に関する調査審議が終了したときは、解任されるものとする。

4 専門委員は、非常勤とする。

(事務局)

第三十七条 委員会の事務を処理させるため、委員会に事務局を置く。

2 事務局に、事務局長のほか、所要の職員を置く。

3 事務局長は、委員長の命を受けて、局務を掌理する。

(政令への委任)

第三十八条 この章に規定するもののほか、委員会に関し必要な事項は、政令で定める。

附 則

(施行期日)

第一条 この法律は、公布の日から起算して三月を超えない範囲内において政令で定める日から施行する。ただし、第二十九条第一項中両議院の同意を得ることに関する部分は、公布の日から施行する。

(最初の委員の任命)

第二条 この法律の施行後最初に任命される委員会の委員の任命について、国会の閉会又は衆議院の解散のために両議院の同意を得ることができないときは、第二十九条第二項及び第三項の規定を準用する。

(特別職の職員の給与に関する法律の一部改正)

第三条 特別職の職員の給与に関する法律（昭和二十四年法律第二百五十二号）の一部を次のように改正する。

第一条中第十三号の二の二を第十三号の二の三とし、第十三号の二を第十三号の二の二とし、第十三号の次に次の一号を加える。

十三の二 食品安全委員会の常勤の委員

第一条中第十九号の二の二を第十九号の二の三とし、第十九号の二を第十九号の二の二とし、第十九号の次に次の一号を加える。

十九の二 食品安全委員会の非常勤の委員

別表第一官職名の欄中「地方財政審議会委員」を「地方財政審議会委員
食品安全委員会の常勤の委員」に改める。

(薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律の一部改正)

第四条 薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律（平成十四年法律第九十六号）の一部を次のように改正する。

附則第二十五条の次に次の一条を加える。

第二十五条の二 食品安全基本法（平成十五年法律第四十八号）の一部を次のように改正する。

第二十四条第一項第八号中「（同法第二十三条において準用する場合を含む。以下同じ。）」を削り、「医療用具」を「医療機器」に、「第十四条の四第一項」を「第十四条の三第一項（同法第二十条第一項において準用する場合を含む。以下同じ。）若しくは同法第八十三条の規定により読み替えて適用される同法第十四条の三第一項の規定による動物用医薬品等についての承認をしようとするとき、同法第十四条の四第一項」に改め、「及び第二十三条」を削り、「第十四条の五第一項」を「第十四条の六第一項」に改める。

(独立行政法人農業技術研究機構法の一部を改正する法律の一部改正)

第五条 独立行政法人農業技術研究機構法の一部を改正する法律（平成十四年法律第二百二十九号）の一部を次のように改正する。

附則第十六条の次に次の一条を加える。

(食品安全基本法の一部改正)

第十六条の二 食品安全基本法（平成十五年法律第四十八号）の一部を次のように改正する。

第二十七条第三項中「独立行政法人農業技術研究機構法（平成十一年法律第九十二号）第十二条第一項」を「独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構法（平成十一年法律第九十二号）第十九条第一項」に改める。

(独立行政法人水産総合研究センター法の一部を改正する法律の一部改正)

第六条 独立行政法人水産総合研究センター法の一部を改正する法律（平成十四年法律第三百十一号）の一部を次のように改正する。

附則に次の一条を加える。

(食品安全基本法の一部改正)

第十七条 食品安全基本法（平成十五年法律第四十八号）の一部を次のように改正する。

第二十七条第三項中「第十二条第一項の規定による要請」を「第十四条第一項の規定による要請」に改める。

(内閣府設置法の一部改正)

第七条 内閣府設置法（平成十一年法律第八十九号）の一部を次のように改正する。

第四条第一項に次の一号を加える。

十六 食品の安全性の確保を図るための環境の総合的な整備に関する事項

第四条第三項第二十七号の次に次の一号を加える。

二十七の二 食品安全基本法（平成十五年法律第四十八号）第二十一条第一項に規定する基本的事項の策定、同法第十一条第一項に規定する食品健康影響評価並びに食品の安全性の確保に関する関係者相互間の情報及び意見の交換に関する関係行政機関の事務の調整に関すること。

第三十七条第三項の表民間資金等活用事業推進委員会の項の次に次のように加える。

食品安全委員会	食品安全基本法
---------	---------

(検討)

第八条 政府は、食品の安全性の確保を図るための諸施策に関する国際的動向その他の社会経済情勢の変化を勘案しつつ、この法律の施行の状況について検討を加え、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする。

附件十七

產地	品系	Sample name	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA conc. (ng/uL)	DNA 抽取法	備考
			230 nm	260 nm	280 nm	320 nm					
GM (positive)	New leaf	1: SPBT0205 100%	0.099	0.212	0.116	0	1.828	2.141	106	JAS CTAB	
	New leaf	2: SPBT0205 5%	0.223	0.473	0.255	0.002	1.855	2.121	236.5	JAS CTAB	
	New leaf	3: RBBT0206 100%	0.109	0.193	0.106	0.001	1.821	1.771	96.5	JAS CTAB	
	New leaf	4: RBBT0206 5%	0.161	0.332	0.179	0.001	1.855	2.062	166	JAS CTAB	
	New leaf plus	5: RBMT21-350 100%	0.107	0.210	0.115	0.001	1.826	1.963	105	JAS CTAB	
	New leaf plus	6: RBMT21-350 5%	0.196	0.414	0.223	0.002	1.857	2.112	207	JAS CTAB	
	New leaf Y	7: SEMT15-15 100%	0.043	0.053	0.031	0.002	1.710	1.233	26.5	Dneasy mini	
	New leaf	8: SPBT0205 0.1%	0.05	0.100	0.056	0	1.786	2.000	50	JAS CTAB	
	New leaf	9: RBBT0206 0.1%	0.048	0.101	0.056	0	1.804	2.104	50.5	JAS CTAB	
	New leaf plus	10: RBMT21-350 0.1%	0.046	0.100	0.055	0	1.818	2.174	50	JAS CTAB	
	Non GM	11: SP control	0.055	0.144	0.075	-0.001	1.920	2.618	72	JAS CTAB	New leaf 污染
	Non GM	12: RB control	0.076	0.186	0.100	0	1.860	2.447	93	JAS CTAB	
	Non GM	13: Shepody	0.237	0.518	0.276	0.002	1.877	2.186	259	JAS CTAB	
	Non GM	14: 男爵	0.156	0.363	0.194	0	1.871	2.327	181.5	JAS CTAB	
	Non GM	15: フセシロ (日文)	0.121	0.260	0.141	0.001	1.844	2.149	130	JAS CTAB	
	Non GM	16: トヨシロ (日文)	0.085	0.147	0.081	0	1.815	1.729	73.5	JAS CTAB	
	Non GM	17: メーカーイン (日文)	0.074	0.161	0.088	0	1.830	2.176	80.5	JAS CTAB	

◎ 上表(positive)部分，稀釋倍數為 1:2、1:5、1:10、1:20、1:50、1:100、1:1000

◎ 上表(sample)部分，稀釋倍數為 1:2、1:5、1:10

◎ 結果顯示 kit 效果頗佳，所有 positive 都如期檢測出，但 11 號樣品因有污染 NL，預期應該出現反應，但並無出現反應。反倒是 12 號出現反應，這使得渡邊先生頗尷尬的，猜測可能是將 11 號與 12 號號弄顛倒了！

◎ 本套組需將 NAC 及 NAC 進行 6 重複，也就是 6 個 well，關於這點我一直很好奇，Mr. Frank 說這是一個重點，因為一般以三重複而言，統計上要達到 95% 可信賴之誤差區間是不太足夠的，而 6 重複的數據組數便可達到統計上極佳之信賴度，因此才必須且一定要 6 重複。

◎ 關於 BioRed 的 i-cycler，其 performance 連 Mr. Frank 都搖頭。

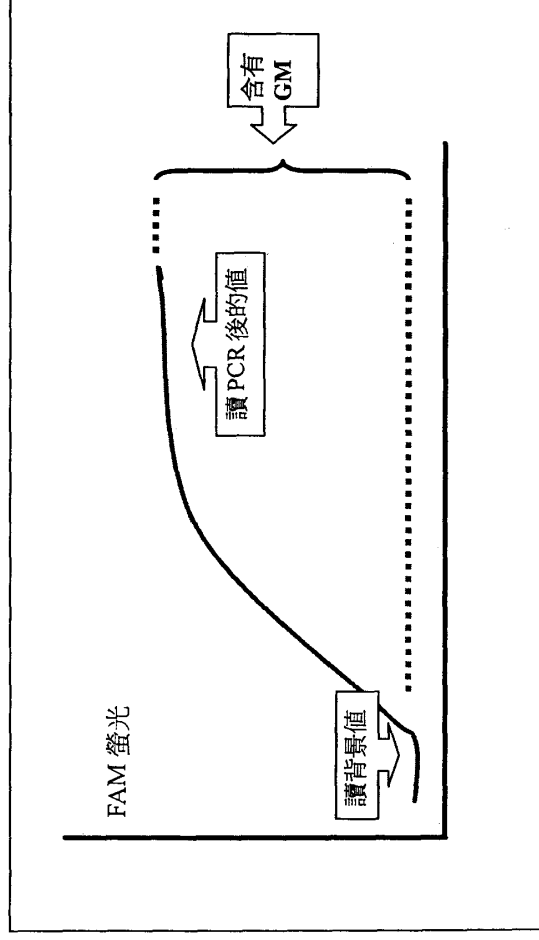
◎ Mr. Frank 說關於 GM 的這些套組只有在 Gene-scan 的德國柏林總公司工廠生產，連他都得跟德國總公司拿才有貨！

◎ Kit 包含 master-mix / positive-control / NAC，其中 NAC 含有一些 PCR 之 inhibitor，會抑制掉 PCR 反應，不會有任何螢光出現，Mr. Frank 不願透露 inhibitor 的成分為何，只開玩笑的說千萬別拿去喝。master-mix 很穩定，所以放在實驗室桌上常溫下 1 天都沒關係，倒是一定要遮光！而且他建議操作時實驗室燈源最好別過亮，以免破壞 probe（因為操作的實驗室燈很亮！），其中含有之成分如下：

成分
dNTP
MgCl2
10x buffer
Taq
Forward-primer
Reverse-primer
Probe-FAM
IPC（於後補述）

◎ Kit 可用兩種方式操作，其一為 96 well plate 直接上機到 ABI7700，其二為 96 well plate 先於一般如 ABI9700 上反應，之後再用 ABI7700 偵測螢光！

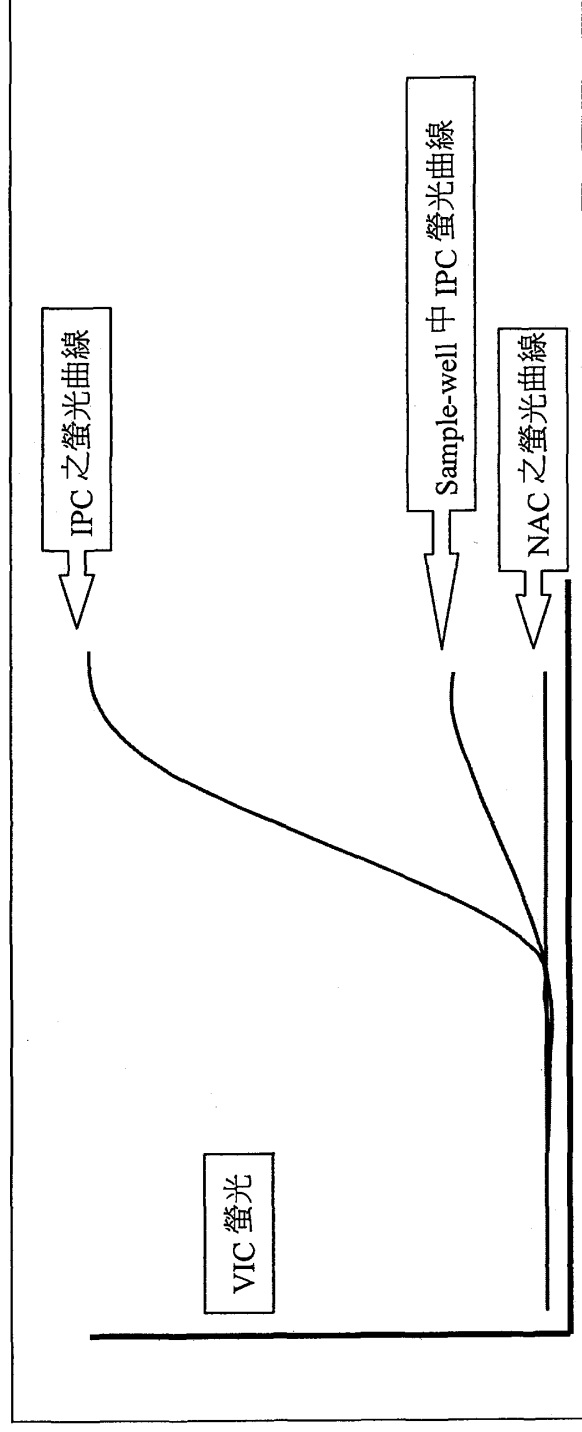
◎ 關於上述第二種方法，相信大家一定會問 Why，因為該 Kit 不需於反應全程收集螢光 DATA，他只需於一開始測定 PCR 反應前之螢光值，然後測定 PCR 後之螢光值，比較前後差異來決定是否有 GM 成分。這種方式，ABI7700 在開 new-plate 時，需設成「plate-read」。（請見下圖）



◎ IPC 的目的為 check DNA-sample 是否含有 inhibitor 用，成分為：

成分
Artificial-templet DNA
Forward-primer
Reverse-primer
Probe-VIC

◎ 至於如何可以判斷是否有 inhibitor 存在呢，見下圖：



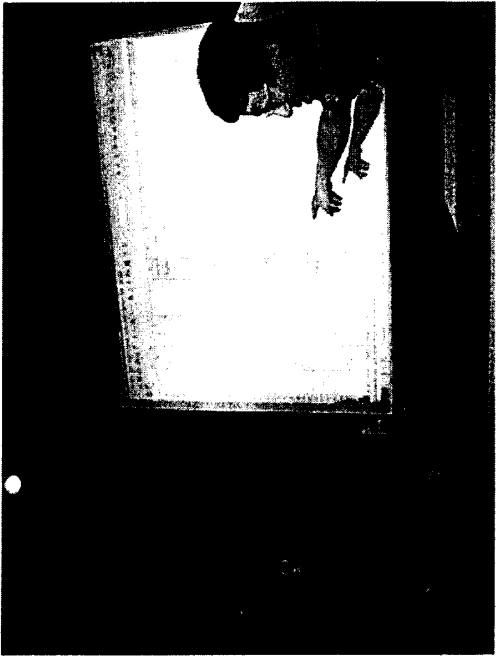
正常 IPC 的 VIC 螢光增幅曲線為紅色曲線，但因為 Artificial-templet DNA 濃度很低，所以 pick 會出現在蠻後面之 cycle 數，NAC-well 因含 inhibitor 所以幾乎不會有反應，因此若 DNA-sample well 中之 IPC 螢光曲線出現如藍色曲線的螢光增幅曲線，則可推測 DNA-sample 中含有 inhibitor。

◎ 望月秀明問，此為 2 對 primer set 之 PCR 系統，是否影響目標 primer set 之 PCR 反應，Mr. Frank 說因為 IPC 中 Artificial-templet DNA 的含量極微小，可能只有數個 copy 數，所以影響極微！

附件十九

- ◎ 該檢測 CBH 351 之 kit 在計算含量時並無需乘以 CV，這點 Mr. Frank 不願答覆，我想應該在密談時會談到，但之前日野博士就說他已經想出來了，我猜應已經乘到所設定的標準曲線之 copy number 中了。
 - ◎ SDI 有販賣部分標準品（這點我不確定是否聽錯！）
 - ◎ 精純的 sample 對於定量分析之準確度很重要，而 CTAB 法中之有機溶劑恐會造成誤差。
 - ◎ pharmaia「法碼西亞」公司之 micro-spin 之套組為 Mr. Frank 建議用來純化 DNA 抽出血之套組。
 - ◎ 日野博士說他們的問題不只是使用此 Gene-scan kit 測定之含量會頗高，還有 star-link 之 CV 值，前年、去年、今年以相同一批玉米分三年做，結果逐年下降，他懷疑 star-link 之 DNA 會 degrade，他稱之為 star-link ghost。該部分實驗是由栗原秀夫所做，我問栗原秀夫關於 CV 值會不穩定的，是否還有其他品系，他表示目前只發現 star-link 有此問題。這問題最終大家都無解答，Mr. Frank 只建議日野博士可再取其他來源之 star-link 來測試之。我看日野博士似乎很失望，表情顯得相當無奈。
 - ◎ 由於第二盤的 GIPSA sample 結果不錯，Mr. Frank 像是吃了定心丸，信心大增，說起話又中氣十足了。其實他一直鎖定幾個 key-point，到底所用的 reference material 是否大家都一樣（出發點一致否），reference material 配製方法是否與 GIPSA 一致。由於這兩個問題，國際間一直懸而未決，因此討論到最後就歸結到 reference material 不一致所導致，Mr. Frank 說他們的 kit 是 base 在 GIPSA 系統之下，且似乎也最信任 GIPSA，所以他認為第二盤 GIPSA 結果正確，可證明 kit 是正確的，至於為何日野博士配的 sample 會這樣，他只能說是 reference material 不一致所導致，至於有何進一步建議，Mr. Frank 也無其他好的可行的建議了。
- 其實，今天的 DEMO 有一陣子氣氛是頗為緊繃的，因為數據上不盡理想。為此，大家都群起攻之，Mr. Frank 有一陣子還阻止 FASMAC 老闆與日野博士以日文討論，而我和隔壁栗原秀夫先生幾乎同時發問，結果也惹得他不高興，要求一次一個問題！甚至望月秀明所問的一些問題，Mr. Frank 還回他 "I cannot get your question!"，這過程頗為戲劇化的。

今天，FASMAC 老闆也秀了他們參加 GIPSA 精度試驗之結果，他們所用之方法為 JAS，玉米的確有一兩種品系測出來偏低。但是，黃豆部分確實會偏高。而且他說，GIPSA 的資料顯示約 70% 參加者的檢測結果都偏高，他說會出現這樣的結果，GIPSA 也在研究原因，可能因為 GIPSA 所用之配製方法未經過 validation，所以第一次之結果，各實驗室之結果很混亂。GIPSA 後續也在分析調整，看看到底是他們的錯，還是真的是參加者的分析誤差！也因此，第二次的結果就比較趨於一致了！



附件二十

玉米的 sample 量為 100 mg，黃豆的 sample 量為 50 mg。

(因為黃豆的 protein 含量較多，不易處理)

步驟	內容
1	加入 Rnase 4uL 及 solution-1 800uL (含 SDS、NaOH、乙醇)
2	室溫靜置 5 min (pH 約 9~11)
3	加入 solution-2 100uL (含 sodium acetate, 平衡 pH 至 7)
4	混勻後冰浴 5 min
5	4°C、15000 rpm 離心 5~10 min
6	取 700uL 上清液，注入一新的 tube (勿吸到殘渣)
7	(重要步驟) 加入 solution-3 350uL，溫和混勻
8	加入 iso propanol 450uL，溫和混勻
9	把過濾頭裝於一較粗之注射桶，並將上述液體注入並押濾之。
10	分兩次注入 2.5 mL 之 washing-buffer-1，並押濾之。
11	再分兩次注入 2.5 mL 之 washing-buffer-2，並押濾之。
12	取下過濾頭，裝於一較細之注射桶，續將之裝於高壓空氣瓶前端，噴壓 10 sec。
13	取一 para-film，滴上 140 uL 之 TE buffer，並將 TE buffer 由過濾頭之前端吸上來，並使 membrane 保持在浸泡之濕潤狀態，靜置 3min 以上。
14	將此溶有 DNA 之溶液注入另一新的 tube。完成！

附件二十一

**Study on the Qualitative PCR
to detect the presence of GMO
in Animal-Derived Products**

2003. 8.

(2003. 7. 10 ~ 8. 4)

National Veterinary Research and Quarantine Service
Livestock Products Safety & Inspection Department
Livestock Products Standard Division
Chung, Myeong-Eun

I . Materials and Methods

1. Sample used in this study

No.	Name	Contents	Information
1	Chicken Nugget(C)	with Corn flour	Purchased from Market
2	Baby Ham(H)	with Soy protein	Purchased from Market
3	Sausage(S)	with Corn starch & soy protein	Purchased from Market
4	White Sausage(Fish Sausage W)	with Corn starch	Purchased from Market
5	Sausage(A)	Contents of Corn starch : 7.5%	Prima Ham Company
6	Sliced Ham(CuH)	Contents of Corn starch : 0.9%	Prima Ham Company
7	FrankFruite Sausage(P.S)	Contents of Corn starch : 3.1%	Prima Ham Company
8	Ham(R.H)	Contents of Corn starch : 6.7%	Prima Ham Company
9	Ham(CT)	Contents of Corn starch : 0%	Prima Ham Company (Heating treated at 80°C for 30min)
10	Ham(10%)	Contents of Corn starch : 8.9%	Prima Ham Company (Heating treated at 80°C for 30min)
11	Ham(15%)	Contents of Corn starch : 12.8%	Prima Ham Company (Heating treated at 80°C for 30min)
12	Ham(20%)	Contents of Corn starch : 16.4%	Prima Ham Company (Heating treated at 80°C for 30min)
13	Non-GM Corn Powder	100% Non-GM Corn Powder	(-) control
14	NK Powder	99.9% Non-GM Corn Powder + 0.1% NK powder	(+) control

2. DNA Preparation and Purification

2.1 Methods of DNA Extraction

2.1.1 DNA Extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G

2.1.2 DNA Extraction using QIAGEN DNeasy Maxi Kit plus CTAB (API-CTAB Buffer 0.2%)

2.1.3 DNA Extraction using QIAGEN DNeasy Maxi Kit

2.1.4 DNA Extraction using CTAB

3. Reaction of PCR

3.1 Initial denaturation : 95°C for 10min

3.2 40 cycles of Amplification

- 95°C for 30sec, 60°C for 30sec, 72°C for 30sec

3.3 Completed at 72°C for 7min

4. PCR Analysis

II. Results

1. Concentration and Purify of Extracted DNA

Name of Sample	QIAGEN DNeasy Mini Kit			API-CTAB Buffer 0.2%			QIAGEN Genomic-tip 20/G			CTAB		
	(DNA) ng/ul	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	(DNA) ng/ul	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	(DNA) ng/ul	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	(DNA) ng/ul	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Chicken Nugget(C)	135.49	1.71	0	833.74	1.75	0.96	1680.53	1.82	2.33	49.22	2.04	0.26
Baby Ham(H)	658.42	1.71	1.12	834.23	1.78	1.10	2521.15	1.83	2.39	56.64	2.12	0.28
Sausage(S)	394.60	1.74	1.78	1023.61	1.75	1.14	2856.03	1.82	2.39	53.67	2.13	0.27
White Sausage(W)	0	2.69	0.08	174.14	1.77	0.75	680.41	1.83	2.24	0	0.49	0
Sausage(A)	58.84	1.90	3.60	125.51	1.84	1.27	2538.94	1.84	2.34	59.83	2.36	0.34
Sliced Ham(CuH)	10.7.05	1.73	2.11	1014.07	1.79	1.10	1091.47	1.84	2.34	26.05	3.50	0.15
Frankfruite Sausage(PS)	384.65	1.81	2.23	988.10	1.82	1.53	1319.05	1.83	2.82	69.02	1.96	0.35
Ham(RH)	137.52	1.83	2.42	753.17	1.78	0.97	1257.08	1.82	2.23	22.36	2.21	0.12
Ham(CT)	292.92	1.81	2.49	36.49	1.88	0.45	1143.13	1.82	1.99	0	1.68	1.71
Ham(10%)	194.23	1.80	2.00	189.20	1.85	1.64	1275.29	1.82	2.57	0	1.89	0.38
Ham(15%)	104.03	1.81	2.70	98.60	1.93	1.32	1117.62	1.81	1.89	0	1.71	3.93
Ham(20%)	79.14	1.78	2.32	243.22	1.84	1.69	1122.72	1.82	2.38	0	1.80	1.14
Non-GM Corn	538.65	1.78	7.19	1201.39	1.78	1.87	1174.57	1.79	2.51	24	12.16	0
NK	579.42	1.78	4.95	1383.95	1.80	2.07	1367.44	1.80	2.59	35.76	2.16	1.41

2. Qualitative PCR

2.1 Results of Qualitative PCR with extracted DNA using QIAGEN Genomic-tip 20/G

2.1.1 PCR products with SSIIB primer

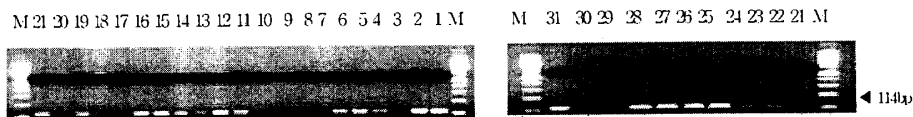


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using SSIIB primer
 Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (W), lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(CuH), lane 13 & 14:Frankfruite Sausage(PS), lane 15 & 16:Ham(RH), lane 17 & 18:Ham(CT), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.1.2 PCR products with P35S primer

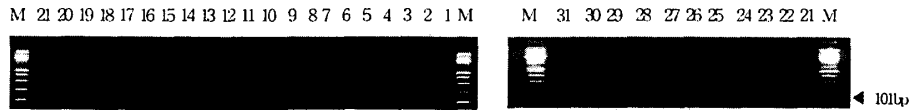


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using P35S primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (H) lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfruite Sausage(P,S), lane 15 & 16:Ham(R,I,D), lane 17 & 18:Ham(C,T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.1.3 PCR products with GA2I primer

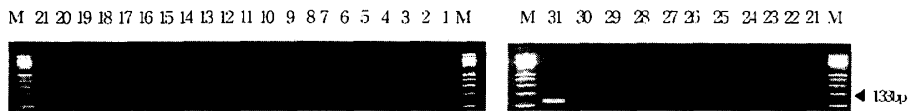


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using GA2I primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (H) lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfruite Sausage(P,S), lane 15 & 16:Ham(R,I,D), lane 17 & 18:Ham(C,T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.2 Results of Qualitative PCR with extracted DNA using QACENDNAasy Mini Kit plus CTAB (API+CTAB Buffer 0.2%)

2.2.1 PCR products with SSIIb primer

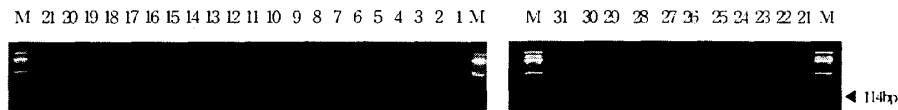


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using SSIIb primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (H) lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfruite Sausage(P,S), lane 15 & 16:Ham(R,I,D), lane 17 & 18:Ham(C,T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.2.2 PCR products with P35S-P primer



Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using P35S primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (H) lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfruite Sausage(P,S), lane 15 & 16:Ham(R,I,D), lane 17 & 18:Ham(C,T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.3.3 PCR products with GA21 primer

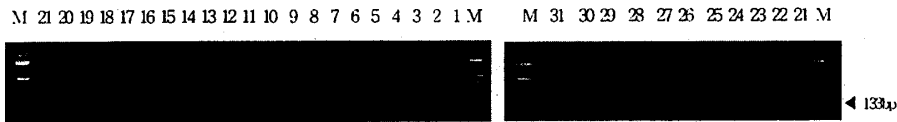


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using GA21 primer
 Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2Chicken Nugget(C), lane 3 & 4Baby Ham(H), lane 5 & 6Sausage(S), lane 7 & 8White Sausage (W), lane 9 & 10Sausage(A), lane 11 & 12Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14Frankfrite Sausage(PS), lane 15 & 16Ham(R.H), lane 17 & 18Ham(CT), lane 19 & 20Ham(10%), lane 21 & 22Ham(15%), lane 23 & 24Ham(20%), lane 25 & 26Non-GM Corn, lane 27 & 28NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.3 Results of Qualitative PCR with extracted DNA using QIAGEN DNeasy Maxi Kit

2.3.1 PCR products with SSIb primer

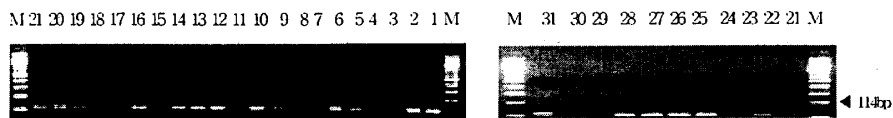


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using SSIb primer
 Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2Chicken Nugget(C), lane 3 & 4Baby Ham(H), lane 5 & 6Sausage(S), lane 7 & 8White Sausage (W), lane 9 & 10Sausage(A), lane 11 & 12Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14Frankfrite Sausage(PS), lane 15 & 16Ham(R.H), lane 17 & 18Ham(CT), lane 19 & 20Ham(10%), lane 21 & 22Ham(15%), lane 23 & 24Ham(20%), lane 25 & 26Non-GM Corn, lane 27 & 28NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.3.2 PCR products with P35S primer

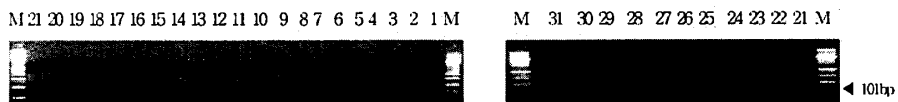


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using P35S primer
 Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2Chicken Nugget(C), lane 3 & 4Baby Ham(H), lane 5 & 6Sausage(S), lane 7 & 8White Sausage (W), lane 9 & 10Sausage(A), lane 11 & 12Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14Frankfrite Sausage(PS), lane 15 & 16Ham(R.H), lane 17 & 18Ham(CT), lane 19 & 20Ham(10%), lane 21 & 22Ham(15%), lane 23 & 24Ham(20%), lane 25 & 26Non-GM Corn, lane 27 & 28NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.3.3 PCR products with GA21 primer



Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using GA21 primer
 Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2Chicken Nugget(C), lane 3 & 4Baby Ham(H), lane 5 & 6Sausage(S), lane 7 & 8White Sausage (W), lane 9 & 10Sausage(A), lane 11 & 12Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14Frankfrite Sausage(PS), lane 15 & 16Ham(R.H), lane 17 & 18Ham(CT), lane 19 & 20Ham(10%), lane 21 & 22Ham(15%), lane 23 & 24Ham(20%), lane 25 & 26Non-GM Corn, lane 27 & 28NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.4 Results of Qualitative PCR with extracted DNA using CTAB

2.4.1 PCR products with SSIIb primer

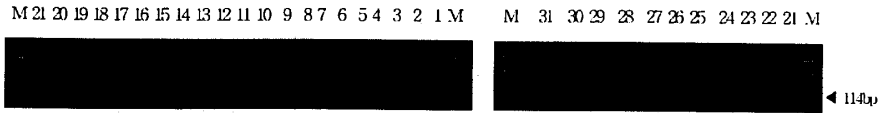


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using SSIIb primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (S), lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfurter Sausage(PS), lane 15 & 16:Ham(R.H), lane 17 & 18:Ham(C.T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.4.2 PCR products with P35S primer

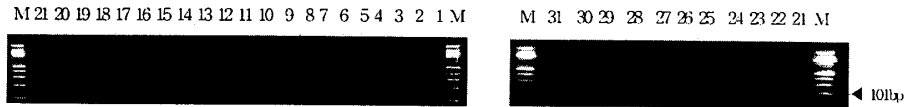


Fig. 11. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using P35S primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (S), lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfurter Sausage(PS), lane 15 & 16:Ham(R.H), lane 17 & 18:Ham(C.T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.4.3 PCR products with GA2I primer

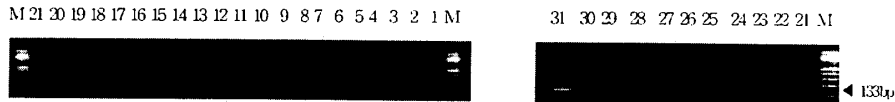


Fig. 12. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from animal-derived products using GA2I primer

Lane M : 100bp ladder, lane 1 & 2:Chicken Nugget(C), lane 3 & 4:Baby Ham(H), lane 5 & 6:Sausage(S), lane 7 & 8:White Sausage (S), lane 9 & 10:Sausage(A), lane 11 & 12:Sliced Ham(Cul D), lane 13 & 14:Frankfurter Sausage(PS), lane 15 & 16:Ham(R.H), lane 17 & 18:Ham(C.T), lane 19 & 20:Ham(10%), lane 21 & 22:Ham(15%), lane 23 & 24:Ham(20%), lane 25 & 26:Non-GM Corn, lane 27 & 28:NK, lane 29:No DNA, lane 30:No Primer, lane 31: positive Control

2.5 Comparisons for Results of Qualitative PCR with extracted DNA from different DNA extraction methods

Sample	QIAGEN Genomic-tip 20/G			Maxi Kit plus CTAB (AFI-CTAB Buffer 0.2%)			QIAGEN DNeasy Maxi Kit			CTAB		
	SSIIIb	P35S	GA21	SSIIIb	P35S	GA21	SSIIIb	P35S	GA21	SSIIIb	P35S	GA21
Chicken Nugget(C)-1	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Chicken Nugget(C)-2	+	+	-	+	Δ	-	+	+	-	+	+	-
Baby Ham(H)-1	-	-	-	Δ	Δ	-	-	-	-	-	+	-
Baby Ham(H)-2	+	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	-
Sausage(S)-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Sausage(S)-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
White Sausage (Fish Sausage(W)-1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
White Sausage (Fish Sausage(W)-2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sausage(A)-1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Δ	-	-
Sausage(A)-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Sliced Ham (CuH)-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Sliced Ham (CuH)-2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
FrankFruite Sausage(PS)-1	Δ	+	-	-	Δ	-	+	+	-	+	+	-
FrankFruite Sausage(PS)-2	Δ	+	-	-	Δ	-	+	+	-	+	+	-
Ham(R.H)-1	+	+	-	-	Δ	-	-	+	-	+	+	-
Ham(R.H)-2	+	+	-	-	Δ	-	+	+	-	+	+	-
Ham(CT)-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ham(CT)-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ham(10%)-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Ham(10%)-2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Ham(15%)-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ham(15%)-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Δ	Δ	-
Ham(20%)-1	Δ	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Ham(20%)-2	Δ	-	-	-	-	-	+	+	-	Δ	-	-
Non-GM Corn-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Δ	-	-
Non-GM Corn-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
NK-1	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
NK-2	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

附件二十二

- 1、Gene scan 公司之檢測套組應該是使用 plasmid 之系統，但標準曲線各點所輸入的值並非 plasmid 的 copy-number，而是 real-DNA，日野博士叫筆者仔細看說明書中所使用的字眼『relative amount corn-reference DNA』，用字上模糊不清，含意上暗示此值即為相對於真正的玉米 DNA 含量。至於為何不需乘以 CV 值，因屬商業機密，日野博士不便透露，但暗示 CV 值已經加到此『relative amount corn-reference DNA』中了。
- 2、關於進行 PCR 實驗時 DNA 污染問題其實是無所不在的，他們曾經發現 PCR 溶液中不加 DNA-templet 竟然測得到 kanamycine-gene，百思不解，結果確認為 Taq-polymerase 污染此種基因，至於此種基因的來源為廠商生產 Taq-polymerase 是藉由 E-coli 進行大量生產，造成產品中含有抗藥基因，但他們已經找到沒有抗藥基因污染的市售 Taq-polymerase 了。
- 3、實驗室中當 PCR 完成，打開 eppendorff 並用 pipit 方式吸取 DNA 反應液之同時，部分 DNA 便隨著揮發氣體而到處污染，也就是說 DNA 其實充滿整個實驗室。
- 4、一般，institute 級之實驗室及 testing 級之實驗室在避免污染上是不太一樣的，以日野博士實驗室而言，其為 institute 級之實驗室，負責方法研發，所以避免污染之方式除區隔操作檯面及區別使用器具外，並盡量把 PCR 後進行電泳之區域隔離，最好是在有抽風設備之抽氣風櫃中再打開 eppendorff 之蓋子，進行電泳。但是若為 testing 級之實驗室，因檢測正確與否將直接影響許多商機，錯誤不得，所以應更為嚴格，因此必須於獨立房間，獨立空調之個別實驗室中操作不同階段之實驗，已確定結果萬無一失。

- 5、以 E-coli 生產 standard material plasmid，當 E-coli 以高溫高壓滅菌後，E-coli 確實死亡，但將之進行 PCR 反應，仍然測得到一些微弱之 GM 基因，可見污染是相當難避免！
- 6、日本『內閣府』系統並非與現有各『省』系統相同。『內閣府』直接對總理大臣負責，擁有最高之諮詢建議權，所以看起來權力比各『省』大。『內閣府』是偏重於科學發展之管理方面，但因科學發展牽扯到各個領域如：科學、教育、經濟、法律等等各層面，所以其所轄之部門便關係到各『省』所管轄的範圍，當然包括『食品安全』之範疇。

附件二十三

①必要事項を記入。例は、内標比測定試験プレート1、Run1、Target(定量系)がBill Specificのときの報告様式3-1「Th. line決定表」のもの。機関名、機関名コード、氏名、機器名はSS1-1のシートのみ記入。他のシートは自動参照。

機 関 名	食総研	備 考	記入例							
機関名コード	NFR	5備考欄に気づいた点等を入力する。								
氏 名	松岡 猛									
試 験 名	内標比測定試験									
機 器 名	ABI PRISM 7700									
定 量 日	H14.8.9									
プレート - Run 番号	1-1									
Target名	Bill specific									
②最初のTh. Lineを入力する。m ≤ 10のTh. Lineは自動的に計算される。										
m	2 ⁿ	Th. Line	Corr.	Slope	y-intercept	増幅率(A)	Δ (%)	Δ 条件	備 考	採用欄
0	1	0.001	0.166	-1.355	23.613	5.47	64.02		NTC	
1	2	0.002	0.823	-3.400	33.330	1.97	2.68		NTC	
2	4	0.004	0.978	-3.542	34.826	1.92	0.75	1	NTC	
3	8	0.008	0.996	-3.502	35.663	1.93	0.04	1		
4	16	0.016	0.999	-3.504	36.636	1.93	0.24	1		
5	32	0.032	1.000	-3.517	37.623	1.92	0.21	1		
6	64	0.064	0.999	-3.506	38.587	1.93	0.26	1		
7	128	0.128	1.000	-3.492	39.622	1.93	0.75	1		
8	256	0.256	0.999	-3.454	40.733	1.95				
9	512	0.512				#DIV/0!	#DIV/0!		plot out	
10	1024	1.024				#DIV/0!	#DIV/0!			
11	2048	2.048				#DIV/0!	#DIV/0!			
12	4096	4.096				#DIV/0!	#DIV/0!			
13	8192	8.192				#DIV/0!	#DIV/0!			

①Corr., Slope, y-interceptを入力する。

plot outした際のCorr., Slopeおよび

y-interceptは入力しない。

③備考欄にNTC, plot outを入力する

⑤プロトコルに従い、Th. Lineを決定する。

|Δ| 条件を入力し、採用前に色を入力する。

採用したTh. Lineの列に色をつける

箭頭所示為原本 ABI7700 之軟體可以更改參數之空格，當 2ⁿ 為 1 時，Th line 之值會因為曲線好壞而出現如 0.001 / 0.002 / 0.003 不等之數值。但這部分在 ABI 7000 是無法更動的，所以使用此表格進行 Th line 決定時，固定使用如上表所示由 0.001 0.002 0.004 0.008 0.016 以此類推之數值進行輸入。

附件二十四

- ※ 兒玉貴志解釋，依循 ISO 規範進行方法研發，在評估 Nucleic acid amplification 階段時，當確認 Negative matrix control 皆為負反應，則必須進行 PCR inhibition control 之測試，以便確認『負反應』是否真為專一性之結果，而不是因為 PCR 反應混合液中之 inhibition 影響所造成。
- ※ 當發現出現抑制現象時，方法研發上該做如何調整？這部分並無獲得解答，因為這是他們第一次針對新品系之 plasmid 所進行之 inhibition control 之測試，從前舊的 plasmid 並未進行 inhibition control 測試，所以若遇到問題，仍需進行思考及檢討，目前他也不知道將如何修正。
- ※ 他們三年前所研發之 Bt11 primer，目前進行再確認時發現部分 primer 之序列與玉米本身之基因相似，所以以前以 Bt11 primer 檢測 non-GM 玉米時常出現一些 non-specific 之 band，原本以為是污染，之後確認為以上之原因，因此將定性 protocol 中 MgCl₂ 之濃度進行調整（原本添加量為 1.5uL，修正後為 1.2uL），但 primer 並未更換，如此即可克服問題。
- ※ Bt 11 定量反應，由於 probe 專一性很高，所以無上述問題。
- ※ 確認新的 plasmid 中之四種品系（NK603、TC1507、MON863、T25）之 primer 及 probe 皆為第四級，即為跨越植物及 insert gene。

附件二十五



●同じ生産工程で「大豆」を含んだ食品を扱っています。
 ●なたね油(なたね)遺伝子組換え不分別
 (遺伝子組換えなたねが含まれる可能性があります。)

附件二十六

步驟	內 容
1	將一整批之納豆倒入網袋中
2	於水龍頭下，以流水方式並持續清搓黃豆，直到將黃豆表皮黏液清洗乾淨，進行 15 min
3	將清洗完之納豆甩乾，並輕輕擠壓，排除水分。
4	納豆連同網袋至入一透明夾練袋中
5	注入無菌純水，使其淹過納豆
6	攪動，清洗納豆
7	取出納豆，並甩乾水分。
8	先以空袋進行天秤歸零，然後秤納豆總重量
9	將納豆移入均質機之鋼杯中，並以 1:1 之重量比例，加入無菌純水
10	均質至呈現黏稠液態（隨時檢查確認）
11	以 50 mL 離心管秤取樣品重，並以 parafilm 封口。 * CTAB：0.2 g * MAXI：1 g * Tip：2 g

均質機需至於無菌操作台內隔離，檯面鋪設保鮮膜，每更換一個樣品便需重新清理檯面，並更新保鮮膜。秤重用之操作台面亦需依照上述方式處理。

使用後之鋼杯及均質轉軸清洗步驟如下：

步驟	內 容
1	以水龍頭洗淨鋼杯上之殘餘物
2	以超音波震盪清洗 15 min
3	以清潔劑清洗鋼杯
4	以水龍頭洗淨殘餘之清潔劑
5	再以蒸餾水清洗鋼杯
6	使用前，以 160°C 乾熱滅菌 4-5 小時（使用乾熱滅菌的原因為均質機之鋼杯不可以高溫高壓濕熱滅菌）

附件二十七

DNA 抽出(1)

CTAB 法

乳鉢・適量試料

↓ +石英少々(試料の 1/5~1/4 ぐらい)

↓ +CTAB 抽出液 2ml

磨碎

↓ 1.5ml チューブ(必要ならばプロテアーゼ K 20 μ l(20mg/ml)を加える)

↓ インキュベート(2~3回転倒混和)60℃, 30分。その後、遠心分離 14,000rpm, 3分

↓ 上澄み(約 700 μ l)を新しいチューブに移す(ピペットで量を取る)

↓ +等量の PCI

2分間激しく振る。(チューブの様子を記録)その後、遠心分離 14,000rpm, 15分

↓ 上層(上と下のものが入らないように)ピペットで量を取る

↓ +等量の CIA

2分間激しく振る。その後、遠心分離 14,000rpm, 3分

↓ 上層(上層と下のものが入らないように)ピペットで量を取る

↓ +等量のイソプロピルアルコール

転倒混和 30秒。その後、遠心分離 12,000rpm, 3分

↓ 上澄みを捨てる

↓ +70%エタノール 800 μ l

やさしく転倒混和、3分間放置。その後、遠心分離 12,000rpm, 3分

↓ 上澄みを捨てる

遠心真空乾燥 5分

↓ +TE 100 μ l(10倍か1)

↓ +RNase(10mg/ml)2 μ l

指で弾いて混和、室温 or 37℃, 30分静置。

↓ +CTAB 400 μ l

↓ +CIA 500 μ l

軽く混和(指で弾く)。その後、遠心分離 12,000rpm, 15分

↓ 上層(上層と下のものが入らないように)ピペットで量を取る

↓ +等量のイソプロピルアルコール

緩やかに転倒混和。その後、遠心分離 12,000rpm, 3分

↓ 上澄みを捨てる

遠心真空乾燥 5分

↓ +滅菌水 100 μ l

DNA 溶液完成(保存は -20℃以下で冷凍保存)

牛肉の雌雄判別技術

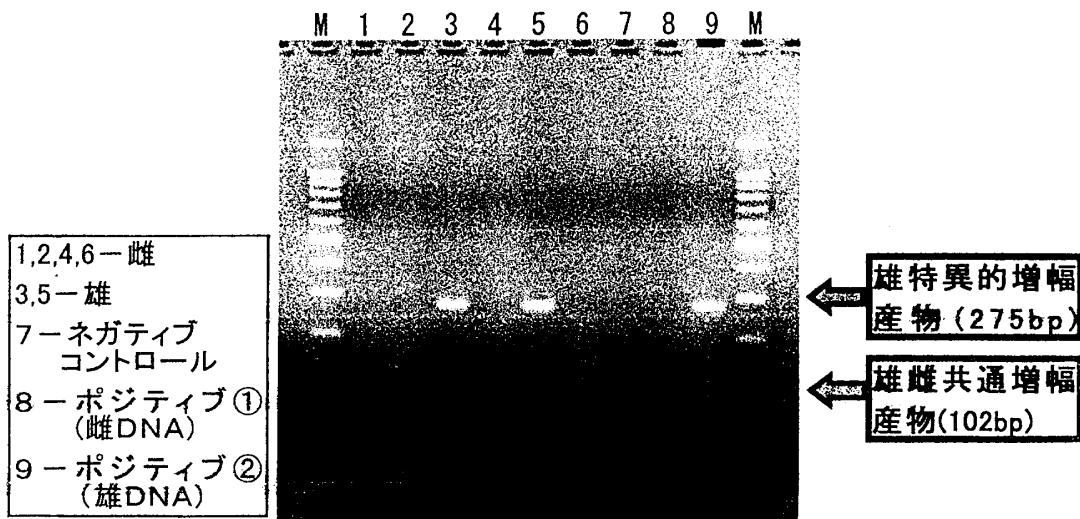
背景：生鮮食品品質表示基準に基づき、平成12年7月1日から生鮮食品の牛肉表示が義務化された。

目的：日本食肉消費総合センターにおいて、全国の各銘柄牛の品種・交配様式を調査したところ、下の銘柄牛について、雌雄牛のみの特徴がうたわれていた。これらの銘柄牛は、雌雄判別を行うことにより、表示が適切に行われているかを判断することができると思われる。

雌 牛	雄 牛
鶴居村アップルビーフ、いわて西和賀牛、いわて短角和牛マイルドビーフ、那須高原乙女牛、ぎゅうや、静岡そだち、松阪牛、伊賀牛、皇牛	しほろ牛、津軽愛情牛、開拓牛、熟成牛、大潟牛、白河牛、豊浦牛、宇都宮牛、那須高原牛、鈴鹿山麓和牛、北伊勢和牛、しまね牛

方法*：牛肉試料からDNAを抽出する。抽出したDNA溶液を鋳型として、伊藤ハム社製牛胚性別キットXYセレクターを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)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雌雄を判別する。

電 気 泳 動 図



山中昌哉、工藤季之、板垣佳明、佐藤静治、中村豊郎：「PC法による牛肉の性別判別」、日本畜産学会報、70(8):J111-J113(1999)

附件二十九



附件三十

獨立行政法人 食品總合研究所

研究報告

大豆加工製品—『納豆』

之 **GM** 定性計測

製作者：林澤揚 Lin J-Yang

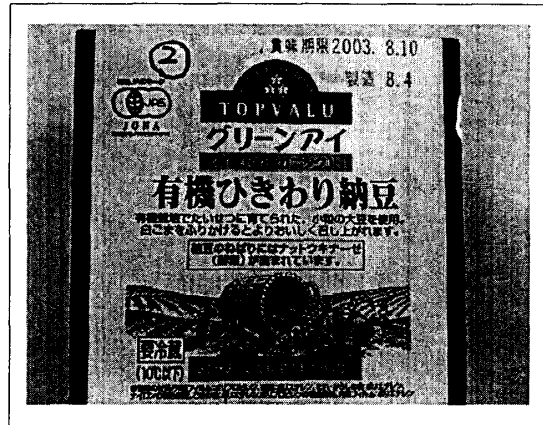
平成 15 年 8 月

Sample : 納豆

Sample number : 5



No. 1



No. 2



No. 3



No. 4



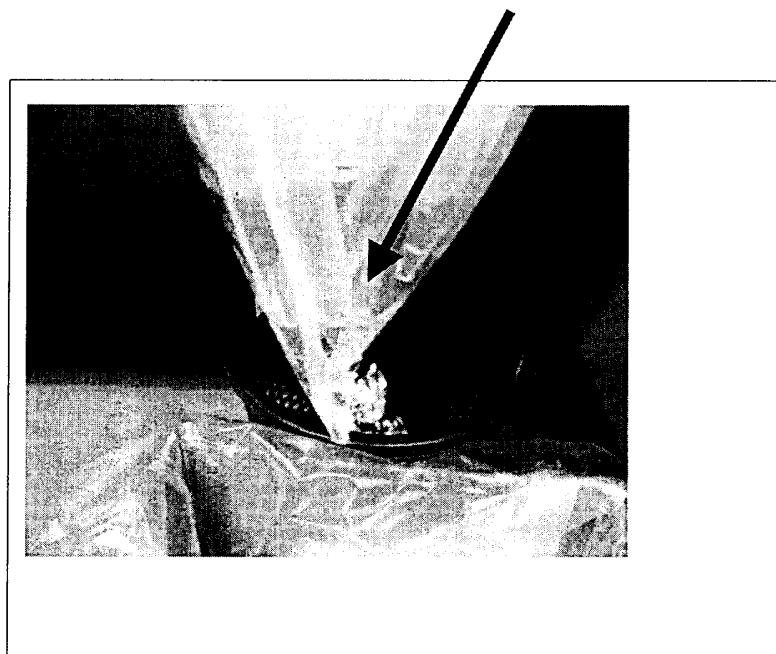
No. 5

Sample DNA extraction method :

	CTAB	MAXI	G-Tip
No. 1	OK	OK	OK
No. 2	OK	OK	OK
No. 3	OK	OK	OK
No. 4	OK	OK	OK
No. 5	OK	Loss (I am sorry!)	OK

Sample DNA solution conctratation :

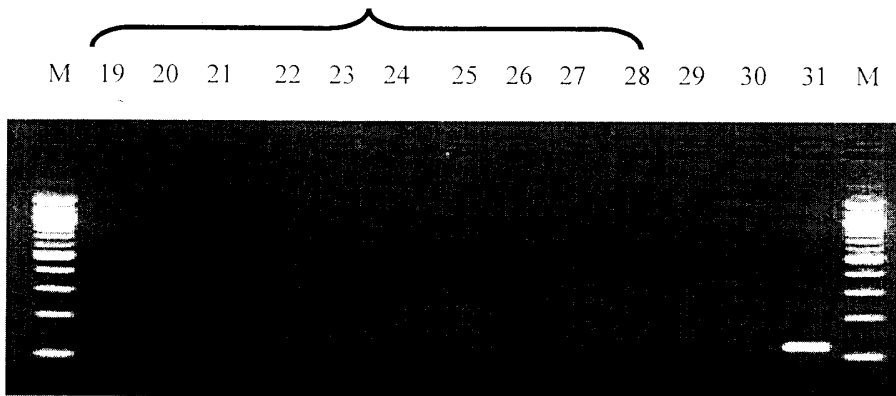
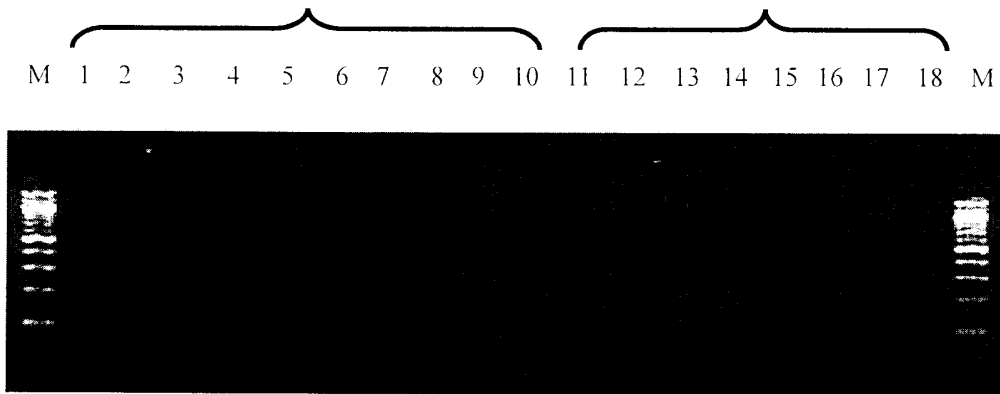
	CTAB	MAXI	G-Tip
No. 1	4.79158	-0.52152	1.00901
No. 2	8.67779	-0.20617	190.12640
No. 3	9.27336	0.38749	3.06020
No. 4	2.05979	0.59363	8.78242
No. 5	31.5500	Loss (I am sorry!)	733.46710



Result :

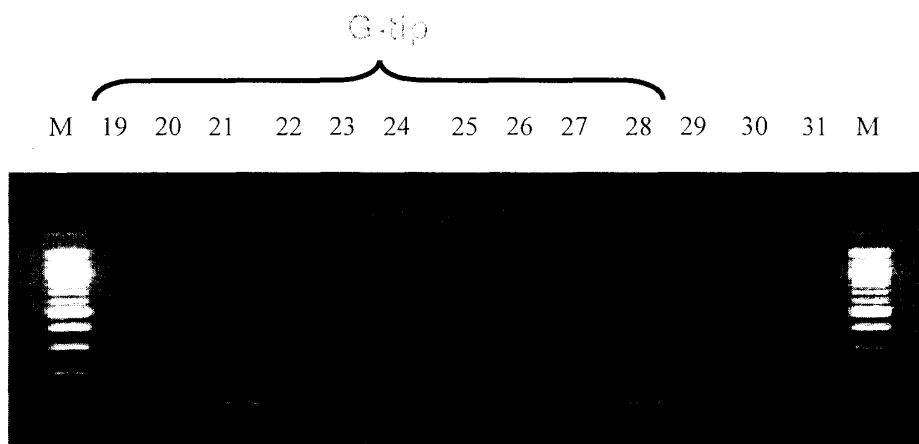
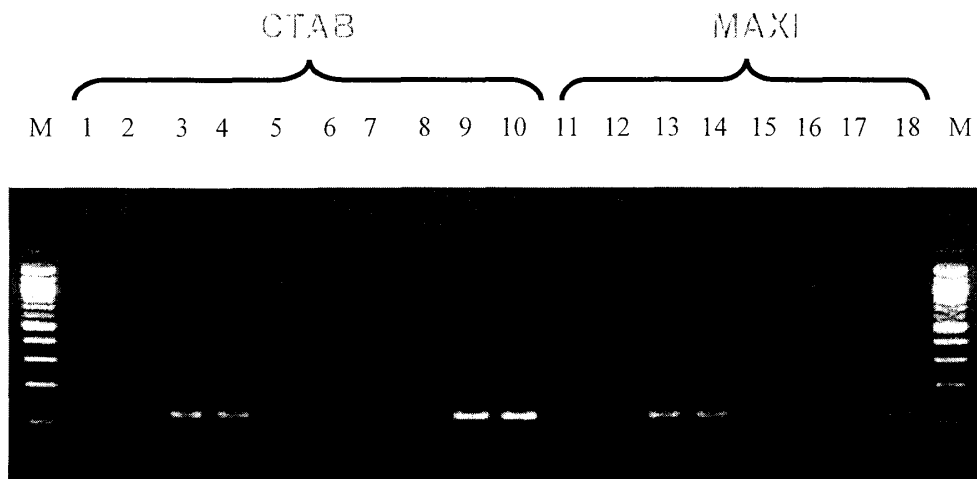
Extraction method	Sample No.	Sample name	LE 1	RRS
CTAB	1	Sample N0.1-1	—	—
CTAB	2	Sample N0.1-2	—	—
CTAB	3	Sample N0.2-1	—	—
CTAB	4	Sample N0.2-2	+	—
CTAB	5	Sample N0.3-1	—	—
CTAB	6	Sample N0.3-2	—	—
CTAB	7	Sample N0.4-1	+	—
CTAB	8	Sample N0.4-2	+	—
CTAB	9	Sample N0.5-1	+	—
CTAB	10	Sample N0.5-2	+	—
MAXI	11	Sample N0.1-1	—	—
MAXI	12	Sample N0.1-2	—	—
MAXI	13	Sample N0.2-1	—	—
MAXI	14	Sample N0.2-2	—	—
MAXI	15	Sample N0.3-1	—	—
MAXI	16	Sample N0.3-2	—	—
MAXI	17	Sample N0.4-1	—	—
MAXI	18	Sample N0.4-2	—	—
G-tip	19	Sample N0.1-1	+	—
G-tip	20	Sample N0.1-2	—	—
G-tip	21	Sample N0.2-1	++	—
G-tip	22	Sample N0.2-2	+	—
G-tip	23	Sample N0.3-1	+	—
G-tip	24	Sample N0.3-2	—	—
G-tip	25	Sample N0.4-1	++	—
G-tip	26	Sample N0.4-2	—	—
G-tip	27	Sample N0.5-1	+	—
G-tip	28	Sample N0.5-2	+	—
Negative (no-DNA)	29		—	—
Negative (no-primer)	30		—	—
Positive (plasmid)	31		++	+

RRS gel-electrophoresis



Lane 1、2、11、12、19、20 : Sample No.1
Lane 3、4、13、14、21、22 : Sample No.2
Lane 5、6、15、16、23、24 : Sample No.3
Lane 7、8、17、18、25、26 : Sample No.4
Lane 9、10、27、28 : Sample No.5
Lane 29 : negative control (no DNA)
Lane 30 : negative control (no primer)
Lane 31 : positive control (plasmid)

Le-1 gel-electrophoresis



Lane 1、2、11、12、19、20 : Sample No.1
 Lane 3、4、13、14、21、22 : Sample No.2
 Lane 5、6、15、16、23、24 : Sample No.3
 Lane 7、8、17、18、25、26 : Sample No.4
 Lane 9、10、27、28 : Sample No.5
 Lane 29 : negative control (no DNA)
 Lane 30 : negative control (no primer)
 Lane 31 : positive control (plasmid)

()

Part II

赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS)
考察日本基因改造食品與食品中過敏原之
管理與檢驗研究現況並研習檢驗技術

服務機關：衛生署藥物食品檢驗局

出國人員 職 稱：薦任技士

姓 名：吳 宗 熹

研習地點 國 家：日 本

機 關：厚生勞動省

國立醫藥品食品衛生研究所

食品部第三室

出國期間：九十二年七月二十七日至八月二十四日

目 次

摘 要.....	55
壹、目的.....	57
貳、過程.....	58
參、心得與建議.....	82
肆、附件.....	88

赴日本國立醫藥品食品衛生研究所(NIHS) 考察日本基因改造食品與食品中過敏原之 管理與檢驗研究現況並研習檢驗技術

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，世界各國陸續制訂與相關法規或準則，並對基因改造食品實施控管與檢測。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，確保國民飲食安全與健康，我國將陸續對特定基改食品實施查驗登記與標示政策。九十二年一月起，首先針對基因改造大豆與玉米實施標示，並預計於九十二年底將基因改造馬鈴薯、番茄與木瓜等列為需辦理查驗登記之食品。有鑑於基因改造食品種類及產量日益增加，為提增我國對基因改造食品管理與檢驗之知識與能力，藥物食品檢驗局繼九十一年派員赴日本國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science) 考察、研習基因改造食品之檢驗，於九十二年再度派員至國立醫藥品食品衛生研究所考察基因改造食品之管理與監測與研習檢驗技術。此外，日本於 2001 年起實施五種食品中過敏原強制標示之政策，為全球第一個也是迄今惟一一個實施食品中過敏原強制標示之國家。除了已建立五種食品中過敏原的檢驗方法外，並且也已經頒布市售食品中過敏原的檢查辦法，供做日本全國衛生檢查機關執行市售食品含過敏原檢測以及判定標示不符與處罰之依據。過敏症為一普遍發生於人類之症狀，症狀輕微者或僅引起身體不適，嚴重者可能導致死亡，而食品中所含之過敏原為引起過敏症原因之一，因

此食品中是否含有過敏物質，已成為過先進國家關切之食品安全議題。目前歐盟、英國、法國與美國皆已針對部分食品中過敏原實施建議標示制度，日本除已對食品中含雞蛋、牛奶、小麥、花生以及蕎麥五種成分實施強制標示，並研發建立檢驗方法外，另也依臨床統計報告，針對十九種常引起過敏症之食品實施建議標示制度。食品中過敏原的標示，可使對特定食品過敏之人，易於選購適合自己之食物，避免選購攝食含特定過敏原之食品而引發過敏症。因此，食品中過敏原標示制度有助於國人健康之維護，為飲食安全之新議題。鑒於此，今年特別將日本之食品中過敏原標示制度之實施與檢驗技術列為考察、研習之任務。經四星期之考察、研習歷程，順利習得日本基因改造食品之管理監測現況、基因改造食品定性與定量檢驗研究、食品中過敏原標示制度實施現況以及食品中過敏原之檢驗研究。同時蒐集有相關資訊，並攜回相關參考物質。藉由此次研習，亦為藥物食品檢驗局與國立醫藥品食品衛生研究所建立互信、交流及合作關係。

壹、目的

基因改造食品之管理與檢驗不僅為現今全球所關切之經貿與生技研發運用議題之一，更是環境生態保護與食品衛生安全議題之一。世界各國陸續制訂相關法規或準則，並對基因改造食品實施控管與檢測。為有效管理基因改造食品，確保國民飲食安全與健康，我國陸續對特定基改食品實施查驗登記與標示政策。有鑑於基因改造食品種類及產量日益增加，為提增我國對基因改造食品管理與檢驗之知識與能力，藥物食品檢驗局繼九十一年後，於九十二年再度派員赴日本國立醫藥品食品衛生研究所 (National Institute of Health Science 簡稱 NIHS) 考察與研習基因改造食品之管理與監測與研習檢驗技術。主要考察與研習重點為日本基因改造食品管理現況、基因改造馬鈴薯之定性與定量檢測以及基因改造玉米及大豆精準度試驗及樣品配製。此外，食品中所含之過敏原為引起過敏症原因之一，因此食品中是否含有過敏物質，已成為過先進國家關切之食品安全議題。目前歐盟、英國、法國與美國皆已針對部分食品中過敏原實施建議標示制度，日本除已對食品中含雞蛋、牛奶、小麥、花生以及蕎麥五種過敏原成分實施強制標示，並研發建立檢驗方法外，另也依臨床統計報告，針對十九種常引起過敏症之食品實施建議標示制度。食品中過敏原的標示，可使對特定食品過敏之人，易於選購適合自己之食物，避免選購攝食含特定過敏原之食品而引發過敏症。因此，食品中過敏原標示制度有助於國人健康之維護，為飲食安全之新議題。故日本之食品中過敏原標示制度之實施與檢驗技術亦為考察與研習之任務。主要的考察與研習重點包括日本食品中過敏標示與檢查制度及實施現況，以及五種主要食品中過敏原之檢驗方法。此外，亦藉為期四週之考察與研習時程，蒐集日方相關資訊，並攜回相關參考物質，並與國立醫藥品食品衛生研究所建立互信、密切交流及合作之關係。

貳、過程

此次赴日考察、研習行程共計 29 日，扣除去返日與假日，實際考察與研習天數為 20 天。主要考察與研習的機關為日本厚生勞動省國立醫藥品食品衛生研究所，其地點位於東京都世田谷區。考察與研習內容包括日本基因改造食品管理現況、基因改造馬鈴薯之定性與定量檢測以及基因改造玉米及大豆精準度試驗及樣品配製、馬鈴薯原料之改良 DNA 抽取方法、基因改造玉米、大豆、馬鈴薯檢驗研究遭遇之問題、進口基因改造玉米、大豆、木瓜及馬鈴薯之檢測、日本政府基因改造食品管理、檢驗之權責歸屬、日本政府食品安全權責機關新組織架構、基因改造食品檢驗研究團隊與研發成果之智慧財產權歸屬與運用、食品中過敏原標示制度現況、食品中過敏原檢驗方法及檢驗技術、食品中過敏原標示之市場調查，以及其他相關訊息等。考察與研習行程內容整理如下述：

七月二十七日（日）：啟程

上午九點搭乘長榮航空班機啟程赴日，中午一點半抵達日本成田機場。出關後，自行搭車前往東京，於下午五點抵達世田谷區用賀，下榻 TOKYU STAY YOGA 旅館。

七月二十八日（一）：

考察首日。上午九點自行前往 NIHS 食品部第三室報到。恰逢每週一早上為食品部例行部務會議，因此第三室之實驗室僅一位研究助理和久井千世子小姐和一位大學實習學生正進行以 CTAB 法抽取大豆之 DNA。和久井千世子小姐為去年至 NIHS 考察研習時之舊識，故我一邊觀摩和久井千世子

小姐進行實驗，一邊詢問一年來食品部第三室有關基因改造食品檢驗研究的發展以及食品部第三室人事上的變動。

中午十二點部務會議結束後，第三室室長穰山浩博士 (Dr. Akiyama) 帶我向食品部長米谷民雄博士報到，我向部長表達去年至 NIHS 考察研習對我國基因改造食品之檢驗研究之助益極大，並感謝他今年再度接受藥物食品檢驗局派員前往考察研習。隨後與穰山浩博士一起至餐廳用餐。用餐期間穰山浩博士向我說明第三室人員變動的情況，正式人員除了室長穰山浩博士(Akiyama Hirsohi)、主任研究官宮原誠博士(Miyahara Makoto)厚生勞動技官渡邊敬浩博士(Watanabe Takahiro)外，新添長岡惠博士一人（主要負責食品中天然毒素以及重金屬之殘留檢驗研究）。去年帶我作實驗的研究助理和久井千世子小姐雖然還在，但因故轉任兼職研究助理，每週只來工作二到三天，另外還有兩位研究助理（佐藤先生與坂田小姐）及學生二人。此外，食品部第三室預計新增業務項目，包括傳統發酵食品中致癌物之鑑別及定量檢驗研究方法，並由於日本最近發生之本土 BSE（狂牛症）事件，因此也可能增加食品中 BSE 殘留檢驗研究，所以第三室的正式人員預估將再增額。

午飯後，繼續拜會食品部主任研究官宮原博士、第一室室長佐佐木博士、第二室室長松田博士以及生藥部長合田博士。下午，和穰山浩博士討論我的考察研習項目和內容，我表示希望能了解並學習的項目有：GM potato 的 CTAB 抽取 DNA 方法、GM potato 的定量檢驗、定量之精準度試驗樣品之配製方法、其他新 GM strain 的檢驗研究，日本輸入基因改造食品之管理與監測、日本食品安全性評估之權責機關、組織架構與業務分配、食品中過敏源檢驗的 western blot 檢驗方法和 ELISA 檢驗方法、食品中過敏原標示之實施與管理現況，並且若有機會是否可安排拜會厚生省負責 GMO 管理和

標示的相關人士，以及至東京附近其他政府或民間的檢驗室或研究單位參訪。穗山浩博士表示厚生省業務繁忙，並且必須先申請，所以拜會厚生省較不可能，致於其他方面則他願意視情況及時間安排。

七月二十九日（二）：

利用 CTAB 方法來抽取馬鈴薯 DNA，由和久井千世子小姐指導。CTAB 方法抽取馬鈴薯 DNA 之日文實驗程序（protocol），利用實驗空檔翻譯為英文版，如附件一。抽取 DNA 之馬鈴薯樣品為 Shepody（三重覆）、Superior（三重覆）及 Russet Burbank（三重覆）三種，三種都是非基因改造之馬鈴薯。Shepody 為 Monsanto 公司研發之 New Leaf Y（簡稱 NLY）品系（line SEMT15-15）基因改造馬鈴薯之母株（mother strain），Superior 為 Monsanto 公司研發之 New Leaf Superior（簡稱 NL SP）品系（line SPBT02-5）基因改造馬鈴薯之母株，而 Russet Burbank 則為 Monsanto 公司研發之 New Leaf Russet Burbank（簡稱 NL RB）品系（line BT6）與 New Leaf Plus（簡稱 NLP）品系（line RBMT21-350）基因改造馬鈴薯之母株。這些馬鈴薯樣品是穗山浩博士與 Monsanto 公司簽定物質移轉協定（MTA）後，由 Monsanto 公司提供。DNA 抽取之結果如附件二。

在抽取 DNA 之空檔，我向渡邊敬浩博士請益關於馬鈴薯定量檢驗的研究策略與遭遇之問題，得知日本目前暫以 UDP-Glucose Pyrophosphorylase（在所有 potato 中都是 single copy）做為馬鈴薯定量的 endogenous gene。並且也獲知目前馬鈴薯的定量檢驗研究上遭遇一困難，即目前仍未能找到一個對於各品種馬鈴薯都有相似定量 PCR 增幅效率之馬鈴薯 endogenous gene（說明如附件三）。很幸運的，這個問題在玉米和大豆的定量上並沒有發生。

七月三十日 (三):

利用 ABI 7700 進行馬鈴薯之定量實驗，由渡邊敬浩博士指導。今天的馬鈴薯定量實驗其實非真正之定量檢驗，只是要確認昨日抽的馬鈴薯 DNA 之品質，並且確認 Shepody potato 有沒有問題，因為兩天前實驗數據顯示發現，原本抽好之 Shepody 的 DNA 可以檢出 Cry3A (抗蟲基因)，所以要確認是 DNA 污染？還是原來的 potato powder 標示錯誤？。由今天的結果證明，原來標示 Shepody 的 potato powder 是 NLY。關於馬鈴薯定性之 primers 與 probe 的序列，屬於機密，無法得知。而此套定量檢驗方法若經精準度試驗及其他試驗證明其正確性及可重複性無誤，將來會申請專利，並由 Nippon Gene 公司量產販售。定量 PCR 之配方與反應程式如下：

配方：

- 78.75 μ L pre mixture + 8.75 μ L DNA (20ng/ μ L)
- ↓
- divide mixture to 25 μ L to 3 well
 - pre mixture : 45 μ L Universal PCR mastermix + 36 μ L primers and probe mixture
 - primers and probe mixture : primers (1.25 μ M)、probe (0.5 μ M)
 - PCR program : 50°C 2min, 95°C 10 min, 95°C 30sec, 59°C 1min

┌──────────┐
── 40 cycles ──

於實驗操作中，並向渡邊敬浩博士請益馬鈴薯定量方法與定量 PCR 的研發。首先是 primer 與 probe 的設計，偵測 GM 的 primer 與 probe 是設計在偵測 Cry3A gene (NL SP、NL RB、NLY 及 NLP 四種基因改造馬鈴薯都含有轉殖之外來 Cry3A 基因，到目前為止，所有的基因改造作物中，只有基因改造馬鈴薯含有轉殖之外來 Cry3A 基因)，偵測 endogenous gene 則是

設計在 UDP-Glucose Pyrophosphorylase。所以馬鈴薯的定量是先以 Cry3A 專一性的 primer 與 probe 做篩選的定量，假如 GM 含量大於 4.5%，則再進行個別 GM strain (New Leaf, New Leaf Y, New leaf plus) 的定量。(New Leaf strain has 2 lines, BT-6 and SPBT02-05; New Leaf Y strain has 3 lines, RBMT15-101、SEMT15-15 and SEMT15-02*； New Leaf plus has 3 lines, RBMT21-129、 RBMT21-350 and RBMT22-82)。此外，我也順便問了日本政府現在怎麼執行玉米定量檢驗，如附件四。

關於玉米的定量，渡邊敬浩博士出示一份日本政府對於港口倉儲內之進口玉米 (Maize from silo) 進行基因改造玉米定量檢測的檢驗數據供我參考，我將數據抄下，如附件五。此一檢驗是今年二月先由神戶檢疫所對進口之 NON GM 玉米做抽測，共有九個檢測樣品。結果所有的樣品皆檢出含有 GM，於是日本政府要 NIHS 再測一次。渡邊敬浩博士出示之檢測結果即為 NIHS 之檢驗結果，穗山浩博士於七月中旬在菲律賓的一場 APEC 會議中發表這個結果。依據該檢驗數據，除了 Sample 1 GM 含量勉強低於 5% (4.88%)，其他都超過 5%。我問穗山浩博士日本政府怎麼處理這些驗出含有基因改造玉米的進口倉儲非基因改造玉米？穗山浩博士答覆日本政府不能接受這樣的進口非基因改造玉米，除非進口商將這些倉儲玉米改標示成基因改造玉米。但是進口商堅持輸入的都是非基因改造玉米而不願意改標示為基因改造玉米。這是一個非常大的問題，因為每一個 Silo 都有好幾千噸的玉米，若要求進口商將該些玉米運離日本恐怕引起鉅大的國際貿易糾紛和經濟衝擊。最後日本政府要求進口廠商自己再去做定量確認，如果進口商的檢驗結果小於 5%，那日本政府將可能同意該批玉米的輸入！！！！

關於馬鈴薯定性的檢驗，日本也新修正了檢驗方法。去年 NLY 還沒被核准，三個 NLY 的 lines 都不准進口，所以定性檢驗的方法設計的 detection

and confirmation primer 是針對 NLY strain。今年初日本以經核准 RBMT15-101、SEMT15-15 兩個 lines，所以定性檢驗只需要做 SEMT15-02（於考察結束前，SEMT15-02 也通過安全性評估）。因此修訂了新的方法如下：（網路上沒有）

* Endogenous gene is UDP-Glucose Pyrophosphorylase：

F-primer (UGPase01-5')：5'-CTC TCC ATA CTC TCT GCT CCT CG-3'

R-primer (UGPase01-3')：5'-CGG CAT CAG CAG GAG AAA G-3'

* Detection primer set (specific for NLY strain)：

F-primer (NLY01-5')：5'-CAA AAT CCC AGT ATC AAA ATT CTT-3'

R-primer (NLY01-3')：5'-TGG TTT TGT ATC TTT CTT GTT GCT TC-3'

* Confirmation primer set (specific only for NLY SEMT15-02 line)：

F-primer (NLY0201-5')：5'-TGA AAT TCG ACT AAT TAC AAG TTG
A-3'

R-primer (NLY0201-3')：5'-GCA TCG ATC GTG AAG TTT CTC AT-3'

* PCR program 則援用舊法

七月三十一日（四）：

利用 ELISA 方法進行大豆之定量檢驗，由穗山浩博士及板田小姐指導，實驗流程及結果如附件六。食品部第三室現正主辦以 SDI “GMO Soya Test Kit” 檢測 GM 大豆之精度試驗，共有 20 個實驗室參加。NIHS 配置了 0%、1% 及 5% 的 GM soybean sample powder。樣品的寄送是一個月前，今天剛好是第 30 天，所以今天做的實驗其實是 stability validation，是要看 sample powder 在 -20°C 保存 30 天後，GM 的含量是不是和剛配置好時一樣。他們稱為『精度管理』。這是因為，參加精度試驗的實驗室，可能在收到樣品後的一段時間才進行試驗。如果樣品的 GM 含量會因為樣品存放時間而減低（degrade），那精度試驗結果就不準確，所以要針對樣品的 stability 進行控

管和監測。今天的結果顯示，樣品在在-20°C保存30天後，GM含量和剛配置好時沒有差異。穉山浩博士說這是意料中事，事實上精度試驗的困難在於確實地並均勻地調配出各種含量(%)的GM sample powder。至於精度試驗的最終結果，各參加實驗室的檢驗數據目前尚在回收階段，故仍未進行統計分析。

八月一日(五):

在穉山浩博士安排並完成申請手續後，厚生勞動省橫濱檢疫所檢查中心(Examination Center of Yokohama Quarantine Station)接受我的參訪，同時穉山浩博士也商請和久井千世子小姐伴隨帶路。上午先至NIHS與和久井小姐會面後，至用賀站搭乘東急田原都市線轉大井町線、東橫線至橫濱站，再換乘京急本線至能見台站，最後搭乘計程車於下午兩點抵達橫濱檢疫所檢查中心。由統括檢查官大神田実先生接待，先拜會檢查中心主任中村先生，隨後由大神田実先生開始簡介並帶領參觀檢查中心。

厚生勞動省所轄之檢疫所分布於全日本之港口與國際機場所在城市，主要任務是依據檢疫法來執行輸入貨物及入境人員之檢疫、輸出貨物及出境人員之檢疫申請業務與港灣衛生檢查業務。另外，依據食品衛生法執行輸入食品監測業務。目前全日本共計有13個檢疫本所(Head Quarters Office)、19個檢疫分所(Branches Office)及81個出張所。其中僅有橫濱與神戶(Kobe)檢疫所設有檢查中心，針對各個檢疫所送來之申請輸入貨物或入境人員之檢體進行檢驗。橫濱檢疫所附設檢查中心負責本州島關東地區、北陸地區及北海道各檢疫所送驗檢體之檢驗工作，而神戶檢疫所附設檢查中心負責本州島關西地區、九州、四國及沖繩各檢疫所送驗檢體之檢驗工作(附件七)。橫濱檢疫所檢查中心成立於西元1991年，現在中心所在之檢驗大樓建於西元1995年，2001年3月起增設GMO檢驗室，2003

年3月新建之GMO實驗室落成於4月開始啟用。檢驗中心業務包含(1)輸入食品檢查、(2)入境旅客感染症病原體檢查、(3)食品中化學物質分析、(4)基因改造食品檢查及(5)信賴性確保業務等。目前人員共計37人(附件八)。橫濱檢疫所附設檢驗中心建築區分為教育訓練中心、辦公大樓、物理化學實驗室、微生物實驗室及GMO實驗室(附件九)。新落成啟用之GMO實驗室分為六個小實驗室,計有試料調製室、DNA及蛋白質萃取室、PCR反應準備室、定性、定量PCR反應室、電泳室以及驗餘檢體冷凍冷藏保存室(附件十)。

檢查中心負責進口食品GMO檢驗人員共計三人,負責人為統括檢查官大神田實先生。目前檢驗的項目有玉米定性一個品系(CBH 351)、玉米定量五個品系(MON 810、T25、Bt11、Event 176、GA21)、大豆定量一個品系(RRS)、木瓜定性一個品系(55-1),原本執行馬鈴薯三個品系的定性檢驗,因為三個品系都已通過安全性評估,所以馬鈴薯的定性檢驗工作已終止,待厚生勞動省公佈馬鈴薯定量檢驗方法後,將開始執行進口馬鈴薯食品的定量檢驗(附件十一)。

八月二日、八月三日(六、日): 假日

八月四日(一):

渡邊敬浩博士告知這禮拜他計畫進行兩項GMO檢驗的研究工作,他為我解說如下:

第一個是測試GM potato NLY和NL plus兩個品系之定量用primer set的efficiency實驗。目前NIHS研發的定量方法中,用於NLY和NL plus定量的5' primer是同一條(位置在5'FMV promoter),但3' primer不同(位置在個別的抗病毒基因)。兩組primer set對於各自的偵測標的,皆已經證實具有

專一性。然而試驗發現，NLY sample 可能會影響 NL plus primer set 的偵測效率，同樣 NL plus sample 也可能會影響 NLY primer set 的偵測效率。所以重新配置含有 5% 的 NLY 和 5% 的 NL plus 的檢體（混在一起），抽 DNA 後測試各組 primer set 在 NLY 和 NL plus 的混合檢體中的定量是試驗，看結果如何。如果證實另一品系存在會影響然定量，則必須改良另量的方法。

至於為何 NLY 及 NL plus 的 5' primer 要設計在同一個地方？渡邊敬浩博士解釋，因為兩種基因改造品系的構築方式，在 5' promoter、3' 的抗蟲基因 (CryIII A gene)、selected gene 及 terminator 的組成完全相同，只有中間抗病毒基因區間不同，原先設計了跨 5' promoter 和抗病毒基的 5' primer，但測試結果不好 (amplicon 太小了)，所以改採現在開發的 primer set。渡邊敬浩博士說明，他們也設計跨轉入基因和植物基因體間的 primer (event specific primer)，所以他們已經可以偵測每一品系的每一種 line，而日本政府對 GM 馬鈴薯的定性檢驗只需做到可以鑑別品系，定量檢驗亦為檢測某品系之含量，故那些 event specific 的 primer 暫時成了無用武之地的研發。

目前 NIHS 已經進行過玉米、大豆及馬鈴薯的定量精度試驗，PCR 方法和 ELISA 方法都有，PCR 方法定量共有 23 個實驗室參加。含有 5% 的 NLY 和 5% 的 NL plus 的檢體之 DNA 抽取使用三種方法，包括 CTAB 法、QIAGEN DNeasy plant MINI 法，以及 QIAGEN DNeasy plant MAXI 法（後者為 NIHS 公佈的方法），因為馬鈴薯的定量精度試驗並沒有限制參加的實驗室使用何種方法抽取 DNA，所以 NIHS 必須針對每一種方法抽取的 DNA 進行檢測，並評估不同方法抽取之 DNA 的定量結果。

另一項工作是新一回合的玉米定量精度試驗準備工作。今天開始 NON GM 玉米磨粉作業（GM 玉米檢體磨粉已完成），日後要配製各種 GM 比例

含量的檢體。配製各種比例含量 NON GM 的玉米是使用巴西進口的 NON GM 玉米，是純度 99% 以上的 NON GM。為何要用巴西進口 NON GM 玉米？，渡邊敬浩博士說這是日本政府決定的，他們向日本政府表示因玉米定量檢驗研究需要純度高之 NON GM 玉米，請求日本政府協助取得適當之檢體，於是日本政府即從進口之玉米中選擇，並要求進口商提供予 NIHS。於是 NIHS 最後就得到進口商提供之 99% 以上的巴西進口 NON GM 玉米。在磨粉前，必須要先以肉眼挑選。這一批玉米檢體很髒，除了沙粒外，竟含有少量黃豆！渡邊敬浩博士先把異物挑出，再挑選出完整的玉米粒約 500 公克，以 Retch MM100 磨粉機（德國）進行磨粉。

八月五日（二）：

以 CTAB 法抽取馬鈴薯之 DNA，並測量 DNA 濃度。以 CTAB 法抽取馬鈴薯之 DNA 濃度約在 200 ng/ul（附件十二）。去年考察所攜回的抽馬鈴薯 DNA 的 protocol（使用 QIAGEN DNeasy Mini kit）為基因改造馬鈴薯之定性檢驗用。根據 NIHS 的實驗結果顯示，以 Mini kit 抽馬鈴薯 DNA，可能因 DNA 品質上的差異，與 QIAGEN DNeasy Maxi kit 抽的 DNA，兩者定量結果不同，（Maxi kit 抽的 DNA 定量值較準確，Mini kit 抽的 DNA 定量測出的 GM 含量偏低）。此外以 CTAB 方法抽取之 DNA 定量檢驗也很準確，並且，CTAB 方法比 QIAGEN DNeasy Maxi kit 成本低很多。所以 NIHS 即以 CTAB 方法為馬鈴薯定量檢驗之 DNA 抽取方法。

目前厚生省公佈的 GM 定量檢驗方法中（目前只有玉米用定量 PCR 方法，大豆是用 ELISA 方法進行定量檢驗），抽取 DNA 的方法有 silica gel membrane（就是 QIAGEN Mini kit）、CTAB 法和 silica resin（是 Promega kit，此乃依照定性檢驗中抽取 DNA 之方法，但是 NIHS 從未探討各種方法抽出的 DNA 進行定量的差異性）。公佈的方法中並無 QIAGEN DNeasy Maxi kit

的方法，也沒有 Genomic tips（只用於抽加工食品的 DNA 的定性檢驗）。然而，農林水產省目前則是使用 QIAGEN DNeasy Maxi kit 抽取之 DNA 進行定量 PCR 檢驗。經向渡邊敬浩博士詢問抽取 DNA 方法不一致之原由，回答如下：「因為厚生省考量其轄下的檢疫所要進行大量的進口食品檢查，用 Maxi kit 抽取 DNA 成本太高，面對大量的進口檢驗案件，是龐大的費用負擔，故選擇使用成本較小的 Mini kit。」

現在 NIHS 也發現同一批 GM 大豆用 Mini kit 抽 DNA 做定量結果會比用 Maxi 抽的 DNA 測出的較低的 GM 含量（Maxi kit 的結果比較正確的）。這樣的結果並沒有立即促使厚生省把大豆定量檢驗的 DNA 抽取方法改成用 Maxi kit，但是正進行探討兩種大豆 DNA 抽取方法的量差異性。NIHS 已經進行將大豆的 DNA 用 Maxi kit 抽出，接著和 AP1 及 AP2 buffer（兩種 kit 皆使用相同之 buffer，但萃取管註不同）混合，然後用 Mini kit 的萃取管註（column）回收。近日將進行定量檢驗，比較 Mini kit 的萃取管註（column）回收的回收率是不是不佳。

八月六日（三）：

今天開始與穗山浩博士討論有關學習食品中過敏原之檢驗與了解日本有關食品中過敏原的檢驗政策及執行。穗山浩博士給我一份日本厚生勞動省醫藥局食品保健部長公告的「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（附件十三）參考。這是平成 14 年（2002 年）11 月 6 日由厚生勞動省醫藥局食品保健部長發函各地方行政首長及地方衛生檢驗單位的一份官方版食品中過品原檢查方法，除了日本政府研擬之五種食品中過敏原的檢驗方法外，並且包括檢驗結果評判方法及違規處置標準等，非單純的檢驗流程檢。我取得後即利用實驗及工作空檔閱讀翻譯，由於不諳日文，僅能就文中漢字並以外來語之平假名字母發音推測其原英文字方式慢慢解析

理解，遇有不明處再向日方人員詢問與討論。今日翻譯及整理如附件十四。

下午厚生勞動省有一位專門官中村泰久博士和一個過敏症治療醫師(不知名字)來穗山浩博士實驗室視察與學習食品過敏原 ELISA 檢驗之真實流程。中村泰久博士與我曾互相自我介紹並短暫對話。中村泰久博士原本於 WHO 任職，從事食品標示 (labeling) 方面的工作，今年七月才剛回到厚生勞動省醫藥食品局食品全部基準審查課任職。中村泰久博士目前在後生省亦負責包括 GM Labeling 及食品中過敏原 Labeling 的管理業務。中村泰久博士表示，目前日本政府公佈的五種主要過敏原檢驗方法，是先以 ELISA 去篩檢食品檢體是否含雞蛋或牛奶成分，目前的方法可使用兩種不同公司的 ELISA 套組。根據各地方衛生檢驗單位以該方法實際操作，回報指出，以兩種不同公司的 ELISA 套組檢驗同一個檢體，常常得到不一致的結果，造成各地方衛生檢驗單位判定檢驗結果上的困擾，所以厚生省必須檢討公佈的檢驗方法並重新修正。因此，他雖然是負責 Labeling 的行政業務，但仍有必要了解現在公佈的方法之檢驗流程以及實際操作上的問題，所以來穗山浩博士的實驗室觀看整個 ELISA 實驗之操作。我則向中村泰久博士表示，若有時間，希望能製厚生省拜訪並了解日本在食品過敏原及 GM 標示的執行現況。

八月七日 (四)：

觀摩和久井小姐與坂田小姐以 100%之 Non GM 玉米 (8/4 磨粉之巴西進口非基改玉米) 及 100%之 MON 810 玉米粉末樣品配製 5%之 MON 810 樣品。其依據之標準配製流程乃是 NFRI 開發，配製場所必須是在低污染可能性之場所 (最好是隔離、無空調之場所)，為求配製之樣品 GM 均勻分布，故配製過程繁瑣耗時。操作之步驟流程皆有攝影，另擇日整理。

於觀摩混合調配檢體過程空檔則翻譯穗山浩博士所著「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食品衛生學雜誌, 第 44 卷, 第二號, J-168~J-177) 部分內文(附件十五、十六)。

八月八日(五):

與渡邊敬浩博士一同進行利用馬鈴薯定量檢驗試驗。因為 NLY 與 NLP 的定量 PCR 檢驗使用同一條 5' primer, 故本試驗目的在測試 NLY 與 NLP 定量檢驗時, 各品系自己的 primer set 是否因另一個品系 DNA 存在而受影響。實驗結果顯示, NLY 與 NLP 的定量使用同一條 5' primer 進行定量 PCR, 另一個品系存在不會干擾定量結果。實驗方法及結果如附件十七。

實驗中與渡邊敬浩博士請教使用不同的 DNA 抽取方法所得之同一批玉米檢體之 DNA 進行定量檢驗, 定量結果是否有差異, 以及不同方法抽取之檢體 DNA, CV 值如何套用的問題。渡邊敬浩博士表示, 現在厚生省用的 CV 值是用 QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 方法抽的 DNA 決定的, Maxi Kit 抽 DNA 做定量檢驗也是目前惟一經過共同試驗驗證的(去年由食品總合研究所主辦, 結果並於 AOAC 發表論文兩篇)。然而, 厚生省公佈的方法卻不包含 QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 之方法, 且根據目前所得之實驗結果, 顯示使用 Mini kit 抽的 DNA, 然後套用以 Maxi Kit 方法抽的 DNA 定出的 CV 值, 會得到含量較低的 GM 含量檢測值。厚生省公佈的檢驗方法中不使用 Maxi Kit 抽取 DNA, 其原因是厚生省考量 Maxi Kit 的成本太高, 若將來案件量激增, 恐怕檢驗費用之財政負擔過鉅, 故屏除之。厚生省公佈的方法中亦含 CTAB 方法。根據實驗結果, CTAB 法抽的 DNA 品質與 Maxi Kit 抽的相似, 使用同一個 CV 值所得之定量檢驗結果亦相似。然而, 因為該法抽取過程複雜耗時, 且使用有毒之有機溶劑, 所以橫濱檢疫所檢查中心做 GMO 定量檢驗時, 並不使用 CTAB 法抽的 DNA, 而是使

用 Mini kit。這當然也意味該中心定量檢驗數值可能不正確！

八月九日、八月十日（六、日）： 假日

八月十一日（一）：

今天由坂田小姐帶領我操作食品中過敏原檢驗之 Western blot 實驗。首先，先由我至研究所附近超級市場選購成分中含有雞蛋及成分中含有牛奶的檢體各一種，攜回實驗室先登記商品名及產品標示等資料。然後取適量檢體粉碎磨粉，秤取兩克粉狀檢體進行均質化並調整均質液酸鹼度後，以濾紙過濾均質液。濾液與緩衝液（loading buffer）混合後於 100°C 水浴變性 5 分鐘，最後將變性處理之檢液冰存於 4°C，待隔日接續下步驟 SDS 電泳及轉漬（transfer）之操作。（附件十八）

實驗操作空則利用時間閱讀穗山浩博士提供之兩篇基因改造馬鈴薯定性檢驗之論文，該論文發表於日本食品衛生學雜誌（附件十九、附件二十）。我將論文中所載使用於基因改造馬鈴薯定性檢驗之偵測引子整理如附件二十一。

八月十二日（二）：

接續昨日 Western blot 實驗 SDS 電泳及轉漬（transfer/blotting）之操作（如附件二十二）。轉漬後即進行一次抗體雜交、二次抗體雜交以及呈色反應。當酵素受質加入後經十五分鐘避光反應，已經初步可以看到實驗結果，但真正確定之結果需待 blotting membrane 避光隔夜自然蔭乾。

實驗操作空檔則利用時間整理日前觀摩各含量 GM 樣品之配製混合方法（附件二十三），並翻譯日文標準流程（附件二十四、二十五）

八月十三日(三)：

觀察食品中過敏原檢驗之 Western blot 實驗之最後結果，Sample 1 驗出 Ovoalbumin 及 Casein，故成分中含雞蛋及牛奶。Sample 2 驗出 Ovoalbumin、Ovomucoid 及 Casein、 β -lactoglobulin，故成分中含雞蛋及牛奶（如附件二十二結果部分）。

日前將日本食品中過敏原檢驗方法翻譯以電子郵件回傳國內，其中雞蛋及牛乳（動物性食品）之檢驗方法皆為 Western Blotting(檢驗蛋白質)方法。關麗卿研究員來信詢問日方於動物性來源食品是否有開發 PCR 檢驗方法，關於此，因動物性食品需考慮基因的組織特譯性表現（tissue-specific expression）故檢驗 DNA 之方式本無利用可能。以下就動物性食品及植物性食品之過敏原檢驗分析如（附件二十六）。

八月十四日(四)：

有關精度試驗各百分比 GM 玉米及 GM 大豆樣品的配製，今天與渡邊敬浩博士初步請教日本所使用之 Non GM 之玉米及大豆。得到回覆為如下：

NIHS 目前經由兩個管道取得配製精度試驗樣品之 Non GM 玉米，一是 NIHS 向リョーコクツヨラツ公司（日本種子進口公司）購買，為美國進口之 Non GM 玉米。另一個是 NIHS 向日本政府要求協助取得，日本政府送來的巴西進口 99%Non GM 玉米（我之前也提到他們正從這批巴西玉米中，挑出雜質，其中還有黃豆）。

配精度試驗的樣品的 Non GM 材料選擇，首先以本土生產、其次以產量或輸入量最大的品種為優先考慮。這是因為日本沒有研發以本土品種為母系之基因改造作物（目前沒有，政策上以後也不會。然而，據了解目前

日本並不限制日本農民種植外國之基因改造作物)，所以必須嚴格監測日本本土種食品與 GM 食品混合。其次，以產量及輸入量作為考慮之原因則是，產量及輸入量大代表該品種日本民眾使用量大或使用率高，故應優先監測是否有 GM 的污染。接著則需針對這些 Non GM 材料進行「raw copy number」(endogenous gene copy number) 的測試，檢測其值是否與要調配的 GM strain 相似。

根據日方研究測試結果顯示，目前的 GM 玉米(GA21、MON 810、Bt11、Event 176、T25) raw copy number 都很接近，所以只要找一種 raw copy number 也接近的 Non GM 即可。因為日本沒有本土種玉米，所以 Non GM 玉米只能使用輸入的外國玉米。這方面 NFRI 測驗了多種不同的 Non GM 玉米，最後選擇了其中之一，並用這個品種的 Non GM 玉米配製樣品進行去年舉辦的 collaborative study，故 NFRI 對於各種玉米的 raw copy number 以及選擇哪一個 Non GM 玉米比較清楚。

至於大豆，雖然目前只有一種 GM 品系 (RRS)，但所有日本本土種大豆的 raw copy number 與 RRS 大豆差異很大，後來也是由 NFRI 測驗了幾個輸入品種後，選用美國進口的大豆當 Non GM。

關於 NIHS 目前所獲得的巴西進口 Non GM 玉米，將使用來調製精度試驗各品系各種百分比之玉米檢體，因此會先檢測其 raw copy number。

八月十五日(五)：

關於食品過敏原檢驗，向穗山浩博士詢問日本為何以及如何選擇五種過敏原做為法定強制標示之過敏原？穗山浩博士回答整理如下：

- (1) 由厚生省邀集過敏症醫師對日本國民過敏症做臨床調查統計，考量

盛行率、一般日本人飲食習慣及過敏症嚴重性來選擇。

- (2) 雞蛋、牛奶及小麥是造成過敏症的前三名（附件二十七）。
- (3) 花生和蕎麥雖然引起過敏症的盛行率不是太高（比蝦及水果類低，附件二十七），但是有些患者會有嚴重的過敏症狀，甚至死亡。因此選擇其為強制標示之過敏原。
- (4) 魚類是盛行率第四名（附件二十七），但是由於種類繁多，很難分辨是哪一種魚（對某一個人）造成過敏。事實上，魚類食品也區分部位食用，例如，到底是吃鮭魚肉會過敏、鮭魚卵、鮭魚生殖腺（日本食品）會過敏？還是根本是水產腐敗時產生的高量組織胺，或其他的胺類化合物造成過敏？這很難去定義出一個確定的過敏原來標示及做檢驗。所以只能把這些放在建議標示裡頭。
- (5) 十九個建議標示過敏原是：Abalone（鮑魚）、Squid（烏賊）、Salmon roe（鮭魚生殖腺）、Prawn（蝦類）、Orange、Crab、Kiwi fruit、beef、Walnut（胡桃）、鮭魚、Mackerel（鯖魚）、大豆、起司、雞肉、豬肉、Matsutake（茸類）、桃子、Yam（山芋）、蘋果及 Gelatin（明膠）。
- (6) 日本是全球第一個執行法定強制標示過敏原政策的國家，沒有其他可以參考的先例，在食品中過敏原檢驗方法開發現況上，目前全球亦沒有可供檢驗其他更多食品過敏原的檢驗方法和策略被提出，所以目前僅以五個食品過敏原作為強制標示標的，以後再視衛生保健需求及檢驗研究成果來增加應標示的食品過敏原。

八月十六~十七日(六~日)： 假日

八月十八日(一)：

繼續翻譯食品中過敏原檢查法（附件二十八）。五種主要過敏原強制標示是平成十三年(2001 年)開始實施的。去年十一月厚生省公佈過敏原檢查

法 所以地方衛生機關始有檢查法依據以及有過敏原的檢驗方法。但是厚生省並沒有規定商品要如何做標示 所以標示並無統一格式。

八月十九日(二)：

向穗山浩博士商請提供 New Leaf potato 樣品，穗山浩博士應允提供粉末樣品於我，由我自行在日本實驗室完成抽 DNA，抽出的 DNA 可攜回。New Leaf potato DNA 抽取如附件二十九。

抽取 DNA 空檔繼續向穗山浩博士請益有關食品中過敏原之檢驗。日本之過敏原檢驗方法中，植物性食品過敏原如小麥、蕎麥與花生，是以 PCR 方式為檢驗方法。小麥的偵測標地基因是 triticin precursor，蕎麥是 Specific allergen protein，而花生則是 Agglutinin。PCR 的 primer pairs 為目前日清製粉公司正在申請中之專利。這些 primers 的序列，原本日清製粉公司拒絕公開，但在厚生省發佈各地方檢驗單位的食品中過敏原檢查法中，primers 的序列是清楚列出的。穗山浩博士說這是他要求日清製粉公司必須讓這些序列公佈出來，而日清製粉公司則要求在該檢查法中必須註明 PCR 的 primer pairs 正在申請的專利，並且僅公家機構或受公家託付之機構，可以使用於食品中過敏原檢驗，如果是其他機構或其他目的之使用，必須先洽日清製粉。

另外，翻譯食品中過敏原檢查法之食品中過敏原檢查結果與處置判斷樹（附件三十）。

八月二十日(三)：

以定性 PCR 對昨日抽取之 New Leaf potato 之進行確認檢驗（附件三十一）。Primer pair 是日方未公開之 primers，無法知悉其序列。

與渡邊敬浩博士討論不同 DNA 抽取方法對定量檢驗的影響。有關日本對以不同 DNA 抽取方法進行定量檢驗所發現之問題，簡述如下。

在定性檢驗方面，不論是以 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit、QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 或 CTAB 法抽取 DNA，所得之 DNA 做定性檢驗都可以獲得正確檢驗結果。在定量檢驗方面，日方發現用 Mini kit 抽取之大豆 DNA 進行定量檢驗，獲得之檢測值比以 Maxi kit 抽取之大豆 DNA 之定量檢測值低。這個問題，NIHS 這邊已進行實驗，將 Maxi kit 抽的大豆 DNA（使用 Maxi column），與 AP1 及 AP2 buffer 混合，然後用 Mini Kit 的 column elute，測試 Mini Kit column 的 DNA 回收率。欲以此來驗證 Mini kit 抽 DNA 的 efficiency (8/5)。結果，其回收率相當低。所以也不用再繼續做定量，去測試原本有很好的訂量結果的 DNA，在通過 Mini column 後的定量效果。因此，可以肯定兩種 column 對 DNA 的抽取回收率不同（亦可能造成所得之 DNA 性質上有差異）。

這個結果表示，以 Mini Kit 抽取 DNA 做定量檢驗可能會發生檢驗值不正確的問題。在目前厚生省所公佈的方法裏，大豆、玉米之定量，其定量用 DNA 是以 Mini kit 或 CTAB 方法抽取。原擬的馬鈴薯定量也用 Mini kit 或 CTAB 抽取 DNA，同樣地，以 Mini kit 抽取之馬鈴薯 DNA，經實驗也發現定量上會低於以 Maxi kit 抽取的 DNA。（公佈檢驗方法中，以 Genomic tip 方法抽取 DNA 只用於加工食品之定性。目前厚生省不做加工食品的定量檢驗研究，檢疫所方面也不對進口加工食品，即非原料用途之加工食品做 GM 定性定量檢驗工作，只是書面審查）。

目前日本各檢疫所等檢驗單位實際上對進口大豆進行定量檢驗，是使用 SDI 公司的 ELISA kit，不需要抽 DNA。進口馬鈴薯則尚未開始做定量檢

測，所以無 Mini kit 抽取 DNA 影響定量檢測值致不正確檢驗結果的問題。但是，進口玉米的定量檢驗方面，除了 CBH 351 品系只需要做定性檢驗外（用 ELISA kit），其他品系之玉米，至今皆以 Mini kit 抽取之 DNA 做定量檢驗，於是 Mini kit 所抽取之玉米 DNA，在定量檢驗上是否如大豆及馬鈴薯有低估含量之影響，對於正確的檢驗結果就相當重要了。日方目前還沒這方面的報告，也還沒真正進行試驗比較驗證。渡邊敬浩博士表示這問題必須要釐清，比較試驗也計畫要執行。

在 7/30 的報告提到的厚生省今年初曾針對九個進口玉米倉儲做 GM 定量（先由厚生省神戶檢疫所的 Examination center 檢測，然後 NIHS 再做確認），定量結果幾乎全部超過 5%（4.88~6.51%）含量，那一次定量檢驗的 DNA 樣品即以 Mini kit 抽取。假如用 Mini kit 抽玉米 DNA 會造成低估 GM 含量的結果，那麼真正的 GM 含量一定更高！！！！

在大豆的結果出來後，加上之前馬鈴薯的實驗結果，渡邊敬浩博士準備向厚生省報告，建議在大豆定量方法上，刪除用 Mini Kit 抽 DNA，增列 Maxi Kit 抽 DNA 的方法。而在馬鈴薯的定量方面，也將改以 Maxi Kit 取代 Mini Kit。以如果證明 Mini kit 抽的玉米 DNA 也會造成定量值大幅下降，那玉米定量抽 DNA 的方法也會刪除用 Mini Kit 抽 DNA，增列 Maxi Kit 抽 DNA 的方法。

八月二十一日(四)：

與渡邊敬浩博士詢問日本 GM 馬鈴薯的定量研究。GM 馬鈴薯的定量用 primer and probe set 已經研發試驗完成，研發人即為渡邊敬浩博士，但研發資訊目前屬於『日本基因改造食品檢驗研究團隊』機密，並正由該團對準備申請專利事宜，故渡邊敬浩博士無法透漏 primes 及 probe 之序列。在

實驗方面，日方正準備進行 GM 馬鈴薯精度試驗。目前最大的障礙是 GM 馬鈴薯樣品調製。關於日本 GM 馬鈴薯之定量檢驗研究，整理如下附件三十二。

八月二十二日(五)：

今日是 NIHS 考察的最後一日，沒有安排實驗操作或觀摩，僅與日方人員就與考察相關議題討論詢問，並蒐集影印文件及資料。

一、關於日本之輸入食品的定量檢驗，考察期間與穉山浩博士及渡邊敬浩博士訪談後，整理如下：

目前厚生省不對加工食品進行定量檢驗，檢疫所也不對進口加工食品（非原料之加工食品，例如玉米片、洋芋片等進口零石）進行 GM 定性或定量檢驗工作，只是書面審查。原則上，檢疫所對於進口食品原料（諸如大豆豆粒、玉米穀粒、馬鈴薯切片、薯條等半成品）會進行未核准 GM 的定性檢測，而進行已核准 GM 的定量檢測。但是有例外，如木瓜。目前 55-1 木瓜尚未核准，所以所有進口木瓜要做定性。一旦 55-1 木瓜獲得核准後，進口木瓜就不做 55-1 的定性了，而且也不會進行定量檢測。因為木瓜是整顆進口的，沒有 GM 含量的問題（是 GM 木瓜則一定整顆木瓜都含 GM 成分，故做定性即可）。而其他進口木瓜產品只有木瓜乾和木瓜罐頭，但是因為是加工食品，不是原料食品，所以不用做輸入的定性或定量檢驗。

馬鈴薯則是另一個例外，日前日本已經核准最後一個 line 的 New Leaf Y 馬鈴薯，所以進口馬鈴薯原料也不用做定性檢驗了，但是因為目前厚生省還沒公佈馬鈴薯定量檢驗方法，所以檢疫所也還沒開始對進口馬鈴薯原料最定量檢驗。由於日本對於境外的病蟲病原進入日本之管制相當嚴厲，所有含土的農產品都必須加以處理才能進口。因此輸入日本的馬鈴薯原料，只能是去皮、切片或切丁而且無法再生長栽種，也就是說，完整的馬鈴薯

不能輸入日本。也因此在日本，馬鈴薯不像木瓜，因為是整顆完整的輸入而不必做定量，待厚生省完成馬鈴薯定量檢驗方法公佈後，檢疫所即會開始對進口馬鈴薯原料進行。

至於進口之加工食品，厚生省只是進行書面審查，進口商必須說明使用之原料，含有未核准的 GM 則不准進口。如果原料使用或含有已核准的 GM，且含量超 5%，進口商必須對該商品進行標示，但該食品標示與否並不影響輸入准駁，一樣可以進入日本市場，但是日本政府將依照 GM 標示法規（依據 Sanitation Law）對進口商施予懲罰。這是在進口商誠實說明使用 GM 原料以及其比例的情況，但通常進口商不會特別說明原料是否為 GM 或含 GM，且通常進口商根本不清楚原料是否為 GM 或含 GM。穗山浩博士說厚生省目前只進行輸入食品原料的 GM 檢驗，不包括加工食品。雖然厚生省有食品標示業務（依據 Sanitation Law），但農林水產省除了負責市場中食品的 GM 檢驗、監測外，也執行食品標示業務（依據 JAS Law）。目前農林水產需要做市場中加工食品的 GM 檢查，也因此 NFRI 才需要研發加工食品的定量檢驗方法，而目前厚生省不做加工食品定量，NIHS 也沒進行相關檢驗方法研發。

厚生省和農林水產省的 GM 標示，是使用同一個系統。至於，對於錯誤標示為不含 GM 之加工食品（實際上使用未核准的 GM，或是 GM 含量高於 5%），日本政府如何去檢查管理？因為 NIHS 非執行行政管理業務，故穗山浩博士不清楚。關於這方面，他表示現在日本應該主要由農林水產省處理。

關於厚生省不做加工食品定量的原因，穗山浩博士解釋有如下幾點：

1. 加工食品往往含高糖或高油脂，DNA 萃取困難度高，並且在高度加

工後 DNA 加工後，斷裂成小片段，影響 PCR 反應，定量困難。

2. 加工食品可能同時含有多種原料（如大豆、玉米、馬鈴薯），如何決定 GM 含量，也是一難題。
3. 研發或執行加工食品的定量檢驗，成本相當高。
4. 厚生省負責與人體健康有關的業務，並以與人體健康有關之食品安全問題為重心，未核准之 GM，不准進口與使用乃因為對其安全性方面恐有疑慮。已經核准的 GM，已無安全性方面的疑慮，因此對已經核准的 GM 的定量檢測，已非迫切必要的工作。

基於上述原因，目前厚生省不做加工食品定量檢驗，NIHS 也沒進行相關檢驗方法研發。

有關厚生省及農林水產省權責分配如附件三十三。有關日本 GM 食品之監測如附件三十四（渡邊敬浩博士授知）。

二、關於日本目前基因改食品安全評估之權責機關（附件三十五）簡述如下：

日本有關食品安全之業務歸屬在今年七月後有重大改變，食品安全性評估、食品安全政策及其管理業務由藥物管理及食品衛生會議移轉至內閣府七月一日新成立之食品安全委員會負責。有關基因改造食品之安全性評估業務亦移轉由內閣府食品安全委員會負責。

有關日本食品安全業務之主管機關的變動，乃是因為去年日本爆發本土牛隻感染狂牛症（BSE），對日本食品安全造成重大威脅，日本政府對此極為重視，故將食品安全性評估、食品安全政策制定及其管理業務調整，由專門負責日本緊急事件應辯遍及重大政策制定之內閣府成立食品安全委

會來負責食品安全工作。

新成立之食品安全委員會編製包含八位食品安全委員（其中，四位為常任委員，任期三年）、十三個專門調查會（各專門調查會由食品安全委員會於食品安全相關事件發生時召集並聘任數位專家、學者、民間人士組成），此外還有一個常設事務局（54 人）。食品安全委員會執行業務可以請求各省內閣協助並配合。

八月二十三日（六）：

利用最後停留日本最後一個假日，考察一般食品賣場之食品過敏原標示情形。考察結果發現超級市場販售之所有食品，包括各式零食冰品，包裝即食食品（便當、沙拉）、罐裝飲料、調味醬料等，皆清楚標示（附件三十六）。

整理其他考察研習中取得之資料，包括學術論文一篇（如附件三十七）與保健の科學雜誌第 45 卷（2003 年第 3 號）食品過敏原特輯（如附件三十八），及食品產業中心於 2003 年 3 月出版之各國基因改造食品標示制度調查（見本出國報告 part I 林澤揚報告附件十八）。

整理行李。

八月二十四日（日）： 歸國

於上午 10 點離開下榻旅館。自行搭車至成田機場，搭乘長榮班機歸國。

參、心得與建議

一、 檢驗研究所需標準品及相關資訊取得

去年至國立醫藥品食品衛生研究所考察時，已察知關於基因改造作物完整詳細之資料與標準品，國立醫藥品食品衛生研究所可經由日本政府，向進口商或生產商要求交送一定數量之標準品或必要資料。今年再度向穗山浩博士詢問更詳細之情形。穗山浩博士告知，國立醫藥品食品衛生研究所因業務上需要取得特定檢驗研究用之原料時，研究人員可以向日本政府請求協助。日本政府會尋找並聯繫適當之可提供者，並要求該可提供者與國立醫藥品食品衛生研究所聯繫接洽物質轉移事宜。過去在基因改造食品標準品取得上，曾有提供之廠商要求簽定物質轉移協定者，穗山浩博士確實也曾簽署物質轉移協定，並且於簽署後順利取得足量之標準品與詳細之資料。然而，依據該協定，若研究使用該移轉物質或資訊，穗山浩博士於發表研究論文前，需知會物質提供廠商。雖然至今未遇論文的發表或公開，在知會廠商後遭到不准於發表之主張或其他限制，亦未有廠商主張分享該研究成果歸屬之情事發生，但穗山浩博士與國立醫藥品食品衛生研究所方面，對物質移轉協定之拘束已感不妥與不便。因此，穗山浩博士表示，今後若無必要將不再簽署此類協定。標準品及資料之獲取，將盡量謀求以無須簽定任何協定方式取得，例如，穗山浩博士今年即購置 BECKMEN 之定序儀一部，準備自行訂序獲取基因改造食品之 DNA 資訊，如此一來，基因改造食品之檢驗研究只需取得標準品，再藉由資料庫即文獻查詢蒐集基礎資訊後，即可自行訂序來獲基因改造食品詳細之 DNA 資訊，無須請求廠商提供 DNA 資訊。此部定序儀正好於我考察期間裝設完畢。

二、檢驗研究工作與檢驗工作分屬不同業務單位

精確之檢驗方法建立，研究人員需投注相當精力。厚生勞動省轄下日本國立醫藥品食品衛生研究所專職研究工作，故其以國家衛生政策所規劃之檢驗研究與方法建立為首要任務，例如基因改造食品檢驗方法之建立、食品過敏原檢驗方法之建立等。而檢驗工作方面，如厚生勞動省轄下之各檢疫所，其工作為純粹之檢驗及檢疫工作。檢疫所乃依據依國立醫藥品食品衛生研究所擬定之檢驗方法進行檢驗工作。因此，檢驗研究工作與檢驗工作在日本是區分由不同業務單位執行。目前，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（據了解，日本這方面業務屬於農林水產省消費技術中心）、方法開發建立等工作。同時兼顧多項業務，工作效率與成果勢必低於專務一事。然而，此乃本局法定業務組織編制規定，惟若能於業務上做適當調配，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。故建議任務分配上，應可儘量做此分工之調整與安排。

三、實驗室儀器設置

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。本局基因改造食品檢驗研究所需之儀器，自九十年起陸續購置各型同步定量儀、DNA 定序儀、研磨機、冷凍乾燥機、各型離心機、PCR 儀器、冷凍冷藏設備、核酸濃縮機、溫控振盪器及其他各式實驗儀器器材，並且規劃分子生物實驗室、PCR 及電泳室、定量 PCR 配製室、冷凍冷藏設備室等專區，供基因改造食品之檢驗研究及其他分子生物實驗使用。目前在儀器及空間上等硬體環境上，已略優於國立醫藥品食品衛生研究所（因其建築老舊空間狹窄），並也相當齊全，但仍有缺乏。如缺少大型高速離心機（可離心 50 mL 或更大容積離心管、離心瓶）、操作簡便並精準之核酸濃度測定儀等實驗儀器，應再陸續添購以補實驗所需。

在新儀器的獲取與設置方面，此次至國立醫藥品食品衛生研究所考察發現，許多儀器是向廠商借用，或是以分期付款方式購買。穉山浩博士表示，由於預算上的限制，大多數高價機器無法以一次付清價款方式購置。而且如前所述，國立醫藥品食品衛生研究所主要任務是檢驗方法開發擬定，故某一檢驗項目的檢驗研究及方法開發，也許需要利用到某一種特殊儀器，當方法研發擬定完成，由厚生省公佈施用後，後續檢驗監測工作乃由檢疫所或各地方衛生檢驗機構實施，國立醫藥品食品衛生研究所並不從事檢驗工作，亦即檢驗方法開發完成後，適用於該檢驗項目之儀器或許將不再使用，或者暫時無應用之餘地。基於節省國家預算、考量儀器之有效利用及設置空間，國立醫藥品食品衛生研究所對於價格高昂且非一般實驗經常使用之儀器，往往考慮與廠商洽談借用或租用，待完成需要該儀器之工作後返還廠商。此一做法，頗值得借鏡，尤其在實驗室空間有限，且可以節約研究預算上，必有其益。

四、結合各研究機構、檢驗機構、生技廠商貫徹管理政策並發展產業

此次赴國立醫藥品食品衛生研究所考察，亦利用與穉山浩博士及渡邊敬浩博士討論時，了解日本基因改造食品檢驗研究模式。據了解，目前日本基因改造食品的檢驗有一個團隊（group）包括國立醫藥品食品衛生研究所（NIHS）、食品總合研究所（NFRI）、Nippon gene（生技廠商）、農林水產省消費技術中心、農林水產省種苗中心、FASMAC（生技廠商）、ASAHI（啤酒公司）、日清（食品公司）、CALBEE（食品公司）、House（食品公司）、ABI 日本分公司、冷凍食品檢查協會、食品環境檢查協會、日本食品分析中心等等政府、財團法人及民間公司，共同進行 GMO 檢驗方法的開發，其中以 NIHS、NFRI、農林水產省消費技術中心、Nippon gene、FASMAC 為核心團隊（core team）。

檢驗方法研發及擬定屬 NIHS（屬厚生勞動省，純粹公家機構）及 NFRI

(屬農林水產省，為具有半官方色彩之研究單位)的職責，亦即負責設計 Primers 及 probes、決定 PCR condition 以及進行 CV test、collaboratory study 和 performance test (含 ELISA 方法)等。Primers 及 probes 的設計與其序列等機密資訊皆交由 core team 管理。其製備則是由 core team 分別委託 FASMAC 及 ABI 製作 primer 與 probe。其他的單位則是提供技術及物質支援，如 Nippon gene 開發並提供 Standard material 及 NTC；FASMAC 提供 primers 合成等；ABI 提供 probes 合成、定量 PCR 操作技術、PCR 配方改良等。任何有幫助的機構或公司都可能被接納入檢驗研發個團隊，如今年六月在新橫濱剛蓋好並啟用新檢驗中心大樓的財團法人冷凍食品檢查協會，是去年剛加入的。最後，GMO 檢驗方法研發後則是交給 Nippon gene、FASMAC 等公司去商品化和行銷。

在智慧財產權歸屬與運用方面，現在日本 GMO 的研發成果申請專利後，專利擁有人 (patent holder) 是前述的 core team，亦即 NIHS、NFRI、Nippon gene、FASMAC 及農林水產省消費技術中心共同持有。原本 NIHS 也是專利共同擁有人之一，但是因 NIHS 屬於公家機關，在研發成果管理、運用及利益歸屬事項執行上，礙於繁瑣之法規與行政公文程序，常無法迅速配合其他專利共同擁有人。穗山浩博士表示為避免麻煩以及阻礙專利之運用，故 NIHS 決定放棄持有專利。所以現在 NIHS 不擁有那些研發專利，但專利發明人就是原研發人員，如度邊敬浩博士還是基因改造馬鈴薯檢驗方法專利的研發人員之一。

由上所述，日本在發展整個基因改造食品檢驗研究上，乃是結合諸各相關公私立研究及檢驗單位、生技公司、食品工廠之力，除了配合日本政府之基因改造食品管理政策外，將生技公司納入，可發展國內生技產業，並在基因改造食品之檢驗技術上，形成強有力的商業競爭力。而將眾多民

間檢驗機構納入，亦可讓這些檢驗機構提早具備執行檢驗能力，以勝任監測檢驗工作。將食品公司納入，則可以使基因改造食品管理政策（含量標示管理）自食品生產源頭加以控管，亦即食品廠商在生產前後，將具備能力選擇原料、檢測製成品，避免不實標示之產品流入市場，造成消費者恐慌並徒增國家管理及檢驗成本。

如日本此一貫徹管理政策以及發展科技產業、保護傳統食品產業之模式，值得吾人參考。

五、日本之食品中過敏原檢驗研究與標示現況

日本於 2001 年 4 月 1 日起實施食品與食品添加物中五種主要過敏原之強制標示制度。此外，十九種次要過敏源之標示則列為建議標示項目。為配合五種過敏原的強制標示政策，國立醫藥品食品衛生研究所即被賦與建立檢驗方法之職責，由食品部第三室負責食品過敏原之檢驗研究與方法研擬。2002 年 7 月第一次至國立醫藥品食品衛生研究所考察時，食品部第三室已完成五種主要過敏原之檢驗方法擬定，並且檢驗方法已在厚生勞動省最後之審議階段。2003 年 11 月 6 日由厚生勞動省醫藥局食品保健部長公告食品中過敏原檢查法「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（如附件十三），並函送各地方行政首長及地方衛生檢驗單位。此份官方版食品中過敏原檢查方法，即為各地方政府及衛生檢驗單位據以實施市場監測之過敏原檢驗、檢驗結果評判及違規處置之標準。今年再度赴日考察，食品中過敏原標示已正式實施兩年，而檢驗監測則實施逾半年，其執行之情形與成效亦為今年考察重點之一。在市場調查方面，發現包裝販售食品之過敏原標示已普遍化（如附件三十六），舉凡各式零食餅乾、冰品、包裝即食食品（便當、沙拉、油炸熟食）、罐裝飲料、調味醬料醬包等等在超市或賣場販售之食品，只要成分中含有或可能含有過敏原（包含五種強制標

示之主要過敏原與十九種建議標示之次要過敏原)，都能於包裝或外盒見到清楚之標示。惟日本政府現並無定訂標示之方式，故標示之方式或陳述不一，但已足使消費者清楚辨識。日本過敏原標示政策之執行由此觀之，應以落實於民眾消費生活之中。

關於市場檢驗監測方面，在與穉山浩博士交談中，得知日本政府並未對國內食品及外國輸入食品進行任何過敏原（五種主要過敏原）之檢驗工作，國內食品業者與外國食品輸入業者若未對其產品做正確之標示，其產品並不因此禁止於任本國內販售，但當消費者食用其產品而引發過敏症時，可以向地方衛生檢驗機關申訴，聲請調查及檢驗該可疑為不實標示之產品，地方衛生檢驗機關即依食品中過敏原檢查法進行調查及檢驗。若檢驗結果確定為標示不符或違反標示規定，則依法對業者處以罰款或要求改正。至於食品中過敏原檢查法公佈實施以來之消費者調查與市場檢驗狀況，因考察期恰遇厚生勞動省醫藥食品局食品全部基準審查課專門官中村泰久博士（其主管有關日本食品標示業務），根據中村泰久博士所研，原公告之食品中過敏原檢查法中，牛奶及雞蛋之檢驗方法為先以 ELISA 方法篩檢後再以 Western Blotting 方法確認。現行公告之方法可使用兩種不同公司的 ELISA 套組，然而根據各地方衛生檢驗單位以該方法實際操作，回報指出以兩種不同公司的 ELISA 套組檢驗同一個檢體，常常得到不一致的結果，造成結果判定上的困擾。因此，厚生勞動省必須檢討現行的檢驗方法並重新修正。中村泰久博士表示，雖然他是負責 Labeling 的行政管理業務，但既然在檢驗方法上出問題，他就必須了解現行檢驗方法實際操作的流程與可能的問題，所以來穉山浩博士的實驗室觀摩整個 ELISA 實驗之操作。關於兩種 ELISA 套組檢驗結果不同的問題，厚生省已初步決定修正公告檢驗方法，使篩檢之方法（套組）改為一種，避免不同方法（套組）之差異性。至於要選用哪一種方法（套組），則將進行評估後決定。

由此，可觀察知悉日本在食品過敏原檢驗方法於去年 11 月制定公佈後，各地方衛生機關或其他機構即應用於消費者調查與市場檢驗。各機構機關在實際檢驗工作實施時，遇有上述檢驗方法應用上的疑慮，即會向中央主管機關反應。目前厚生勞動省已察知該檢驗方法存有評斷檢驗結果之問題，故即著手補正之工作。此距食品過敏原檢查法之公佈實施未滿一年，雖原本之檢驗方法設計有瑕疵，可供吾人於訂定檢驗方法時引以為鑒，而重要的是，日方能在短時間發掘公告方法在實際運用上的不適宜，並即時反應，著手修正作業，一方面顯現日本政府行政之效率，另一方面亦顯現出日本政府對食品中過敏原標示制度之重視，亦即對於消費者健康保障之重視。於此，亦深值吾人借鏡與參考。

肆、附 件

附件一

CTAB method for extracting DNA from freeze-dried potato powder

Ground sample weight 200 mg sample to put in a 15 mL polypropylene centrifuge tube

- | ← add 5.0 mL CTAB extraction solution*¹ and 30 μ L Proteinase K
- | invert the tube several times to homogenize completely
- | incubate at room temp (RT, 25°C) for 60 min with shaking.
- | after 8,000g centrifugation at RT for 10 min, transfer 4 mL supernatant to a new 15 mL polypropylene centrifuge tube

Phenol and CIA treatment

- | ← add 2.0 mL TE saturated phenol*² into the new tube, shake vigorously for 2 min
- | ← add 2.0 mL CIA, shake vigorously for 2 min
- | after 8,000g centrifugation at RT for 10 min, transfer up-layer solution (~ 4 mL) to a new 15 mL polypropylene centrifuge tube

CIA treatment

- | ← add 4.0 mL CIA*³ into the new tube, shake vigorously for 2 min
- | after 8,000g centrifugation at RT for 10 min, transfer up-layer solution (~ 4 mL) to a new 15 mL polypropylene centrifuge tube

Isopropanol precipitation

- | ← add the same volume isopropanol (~ 4 mL) into the new tube, then invert this tube 10 times to mix well
- | after 8,000g centrifugation at 4°C for 10 min, discard supernatant
- | ← add 4.0 mL 70% alcohol, invert to mix
- | after 8,000g centrifugation at 4°C for 10 min, discard supernatant
- | vacuum dry for 5 min

dissolve DNA and remove RNA

- | add 200 μ L TE to dissolve DNA, then transfer DNA solution to a 2 mL tube
- | ← add 5 μ L RNase (10mg/mL), then incubate at 37°C for 1 hour
- | ← add 800 μ L CTAB extraction solution, mix well

CIA treatment

- | ← add 1 mL CIA, mix gently
- | after 12,000 rpm centrifugation at RT for 10 min, transfer up layer solution to a new tube

Isopropanol precipitation

- | ← add 1 mL isopropanol, invert 10 times to mix well
- | 15,000 rpm centrifugation at RT for 10 min, then discard the supernatant
- | ← add 800 μ L 70% alcohol, invert to mix
- | after 15,000 rpm centrifugation at 4°C for 5 min, discard supernatant

附件一

| vacuum dry for 5 min

Dissolve DNA

| ← add 100 μ L ddH₂O to dissolved DNA

DNA sample solution

*¹ CTAB extraction solution

0.1 mol/L Tris-HCl; 0.02 mol/L EDTA; 1.4 mol/L NaCl; 2% CTAB

*² TE Saturated phenol

ニッポンジーン社製

*³ CIA

Chloroform : Isoamyl Alcohol=24:1

附件一

CTAB を用いたジャガイモ凍結乾燥粉末からの DNA 抽出法

粉碎試料 200 mg ポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容)

- | ←CTAB 抽出液*¹ 5.0 mL、Protenaise K 30 μ L を加える
- | タッピングや転倒混和しながら、試料粉末の塊が見えなくなるまで均一化を行う
- | 室温で 60 分間インキュベートを行う (振とう)
- | 室温下 8,000g で、10 分間遠心後、上清 4 mL を別のマイクロ遠沈管(15 mL 容)
- | に分取する

フェノール及び CIA による除タンパク処理

- | ←分取した上清に TE 飽和フェノール*² 2.0 mL を加え、2 分間激しく振る
- | ←さらに CIA*³ を 2.0 mL を加え、2 分間激しく振り、
- | 室温下 8,000 g で、10 分間遠心後、上層 4 mL を別のマイクロ遠沈管(15 mL 容)
- | に分取する

CIA 処理

- | ←分取した上清に CIA 4.0 mL を加え、2 分間激しく振り、
- | 室温下 8,000 g で、10 分間遠心後、上層を別のマイクロ遠沈管(15 mL 容)に分取
- | する

アルコール沈殿

- | ←分取した上層に上層と等量のイソプロピルアルコールを加え、チューブを 10 回転倒
- | 混和する。4°C、8,000 g で 10 分間遠心後、上清を捨てる
- | ←70%エタノール 4.0 mL を加え転倒混和する。4°C、8,000 g で 5 分間遠心後、
- | 上清を捨てる。5 分間真空乾燥する

DNA の溶解と RNA の除去

- | TE 200 μ L を加え DNA を溶解し、溶解後の DNA 溶液を 2 mL チューブに移す
- | ←RNase (10mg/mL) を 5 μ L 加え、37°C で 1 時間加温する
- | ←CTAB 抽出液 800 μ L を加える

再 CIA 処理

- | ←CIA 1 mL を加えて軽く混和する
- | 室温下 12,000rpm、10 分遠心し、上層を新しいチューブに移す

アルコール沈殿

- | ←イソプロピルアルコール 1 mL を加え、チューブを 10 回転倒混和後、
- | 室温下 15,000rpm、10 分遠心する
- | ←70%エタノール 800 μ L を加え転倒混和する。4°C、15,000rpm で 5 分間遠心後、
- | 上清を捨て、5 分間真空乾燥する

DNA の溶解

- | ←滅菌水 100 μ L を加えて、DNA を溶解する

附件一

DNA 試料原液

*1 CTAB 抽出液

0.2 mol/L Tris·HCl; 0.02 mol/L EDTA; 1.4 mol/L NaCl; 2% CTAB

*2 TE 飽和フェノール

TE Saturated Phenol ニッポンジーン社製

*3 CIA

クロロホルム : イソアミルアルコール=24:1

附件二

利用 CTAB 法抽取馬鈴薯 DNA

新鮮馬鈴薯檢體經冷凍乾燥後，先以研磨機（Retch MM 100）磨粉成直徑小於 100 μM 之粉末。

秤取 200 mg 進行 DNA 抽取，方法如附件一。

注意：使用 TE saturated phenol、CIA（Chloroform：Isoamyl Alcohol=24：1）、開始萃取使用 15 mL tube、添加 proteinase K、可離心 15 mL tube 之離心機的離心力要達到 8,000 g。

結果：

		230 nm	260 nm	280nm	320 nm	260 nm / 280 nm	Conc. (ng/ μL)
Shepody ¹	1	0.129	0.276	0.153	0.001	1.78	139.86
	2	0.111	0.213	0.119	0.001	1.77	107.93
	3	0	0.002	0.002	0.001	1.01	1.17
Superior ²	1	0.188	0.435	0.239	0.002	1.79	220.09
	2	0.164	0.379	0.21	0.002	1.78	191.9
	3	0.179	0.415	0.229	0.003	1.78	209.59
Russet Burbank ³	1	0.124	0.286	0.156	-0.001	1.8	144.49
	2	0.119	0.28	0.154	-0.001	1.79	141.52
	3	0.106	0.246	0.135	-0.002	1.79	124.28

¹ Shepody is the parent strain of NLY potato (lime SEMT15-15) .

² Superior is the parent strain of NL SP (lime SPBT02-5) potato.

³ Russet Burbank are the parent strain of NL RB (line BT6) and NLPlus (line RBMT21-350) potato.

附件三

GM potato 定量檢驗之研究

首先，設計 primers and probe set (包含 endogenous gene and GM specific)

endogenous gene 必須選擇對不同 potato variety(種)進行定量時，raw copy number¹ 相近的 endogenous gene。

目前日本以確定用 UDP-Glucose Pyrophosphorylase (在所有 potato 中都是 single copy) 做為定量的 endogenous gene



檢測所有可得的植物，確認 primers and probe set 的專一性



研究 primers and probe set for endogenous gene 對不同 potato variety (種) 進行定量時，檢驗值的差異。



設定調整的 factor，以求定量的精準。

Dr. Watanabe 解釋，不同品種的 potato 對同一個 endogenous gene 以相同之 primers and probe set 進行定量時 (用 plasmid 當 reference)，實驗所呈現出來的 raw copy number 變異大。例如 100%A 品種 NON-GM potato 用 UDP-Glucose Pyrophosphorylase 當作 endogenous gene 去測量，假設得到的數值是 20,000 copy，然而 100%B 品種 NON-GM potato 用 UDP-Glucose Pyrophosphorylase 當作 endogenous gene 去測量，得到的數值可能是 40,000 copy。而不幸的是，在各 Potato 品種間確實存在這樣的變異。

因此會產生定量上的困難，例如：

- (1) 5g 100%的 C 品種 GM potato 與 95g 100%A 品種 NON-GM potato 混合，得到的應該是含量 5%GM 的 potato。
- (2) 5g 100%的 C 品種 GM potato 與 95g 100%B 品種 NON-GM potato 混合，

¹ Raw copy number 是指對同一種作物的不同的品系/種(100%純度)，選定一個 endogenous gene，以相同的 primer pair、probe 及反應條件進行同步定量檢驗，所得的檢驗數值 (copy number，即由增幅曲線之上升趨勢來判定，於反應同步偵測期間，越早達到 log phase 增幅者，表示其 raw copy number 越大)。對於同一種作物不同品系/種間，由於內在其差異，可能會造成 raw copy number 不同，甚至差距頗大。

附件三

得到的應該也是含量 5%GM 的 potato。

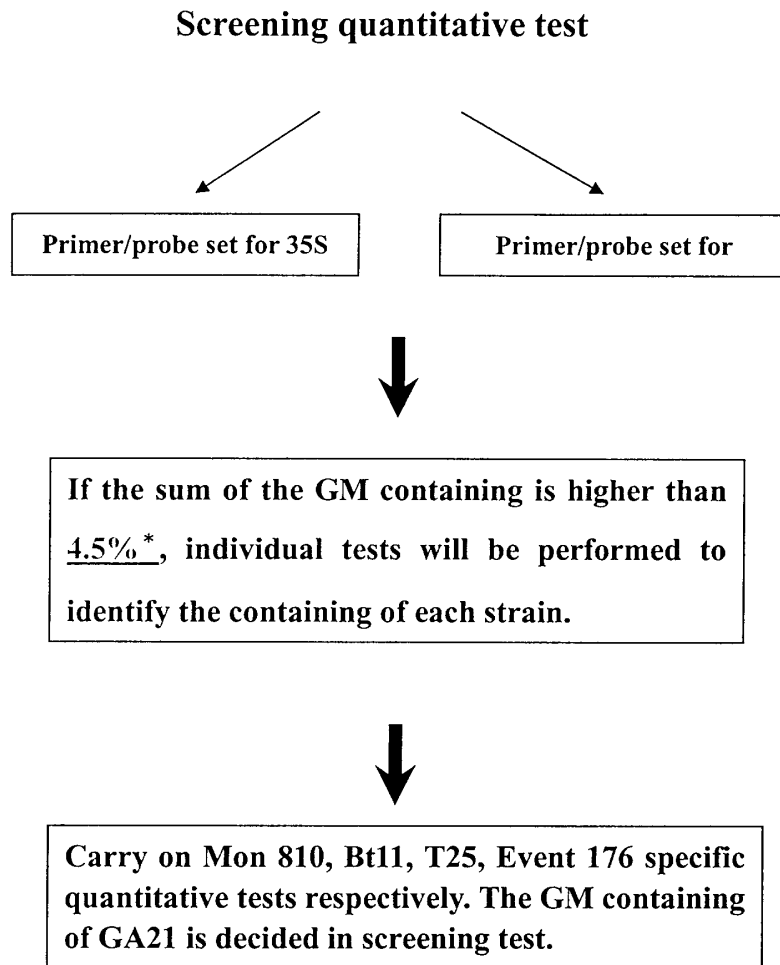
但是以 UDP-Glucose Pyrophosphorylase 當作 endogenous gene 去定量時，實驗數據會讓你把(2)的 GM 含量判讀成比(1)的含量低約兩倍。這樣定量就不準確了。

Dr. Watanabe 現在正進行研究各種品種 endogenous gene 檢測值的差異，他稱爲”Practical program”或”Actual program”。我想這大概是 Dr. Akiyama 會向孟山都要 GM potato 的 parent strain 的原因。Dr. Watanabe 說這個 Program 是怎麼來的，從哪裡來的他不能說。

我問怎麼玉米和大豆沒有這樣的問題？Dr. Watanabe 說他們做過實驗，老天幫忙，玉米和大豆沒有這樣的問題。

附件四

日本政府基因改造玉米定量檢驗流程圖：



*法定限量是 5%，但定量時以 4.5%為是否個別定量之界線

新的檢驗方法（只有日文版）裏已經將玉米、大豆的定量方法（包含 ABI 5700、7700、9700、7000 和 LightCycler）寫上去，但是目前網路上沒有放。Primer and probe 的資訊完全沒有（因為是 Nippon Gene 的機密），但是有各品系玉米的 CV 值。

附件五

進口之倉儲非基因改造玉米之定量抽測結果

Sample	MON810	GA21	Bt11	Event 176	T25	Total
Sample 1	2.41	1.03	1.12	0.21	0.11	4.88
Sample 2	2.98	1.01	0.87	0.19	0.13	<u>5.18</u>
Sample 3	3.57	1.26	1.12	0.22	0.09	<u>6.26</u>
Sample 4	3.12	1.25	0.90	0.19	0.12	<u>5.58</u>
Sample 5	3.50	1.13	1.04	0.20	0.12	<u>5.99</u>
Sample 6	2.87	1.24	0.92	0.16	0.10	<u>5.29</u>
Sample 7	3.10	1.13	0.95	0.17	0.10	<u>5.45</u>
Sample 8	3.66	1.28	1.25	0.20	0.12	<u>6.51</u>
Sample 9	2.40	1.20	1.06	0.19	0.20	<u>5.05</u>
Mean (%)	3.07	1.17	1.03	0.19	0.12	5.58
SD	0.64	0.10	0.13	0.02	0.03	0.56
RSD (%)	15.08	8.43	12.20	9.09	25.35	10.07

檢驗結果除了 Sample 1 GM 含量勉強低於 5%，其他都超過。

檢驗方法：厚生勞動省之公告方法，利用 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 抽取玉米 DNA，利用 Nippon Gene 之定量套組與 ABI 7700 進行定量 PCR。

附件六

SDI “GMO Soya Test Kit”進行 RRS 大豆定量試驗

Sample :

- (1) Blank ; (2) standard : 0% 、 0.3% 、 1.25% and 2.5% ground soybean ; (3) mixed sample : 0% sample × 4 、 1% sample × 4 、 5% sample × 4

All samples should be a particle size that passes through a 100 U.S. Mesh Screen

試驗 :

Extract protein

Weight out 0.5g ground sample to a 15 mL tube



Add 4.5 mL of Soya Extraction Buffer, then vortex 10 sec.



Centrifuge at 2,500 ×g for 15 min



Transfer supernatant to a new 15 mL tube

Dilute the protein extract

Take 20 μ L protein extract, add into 280 μ L Soya assay Buffer, vortex (15× Dilution)



Take 20 μ L protein extract, add into 380 μ L Soya assay Buffer, vortex (300× Dilution)



Take 20 μ L mixed sample 300× Diluent, add into 180 μ L Soya assay Buffer vortex, to get a final 3,000× Diluent

ELISA Test

Add 100 μ L diluted extract to Assay well plate, 2 repeat

Sample addition



Cover plate with Plastic wrap

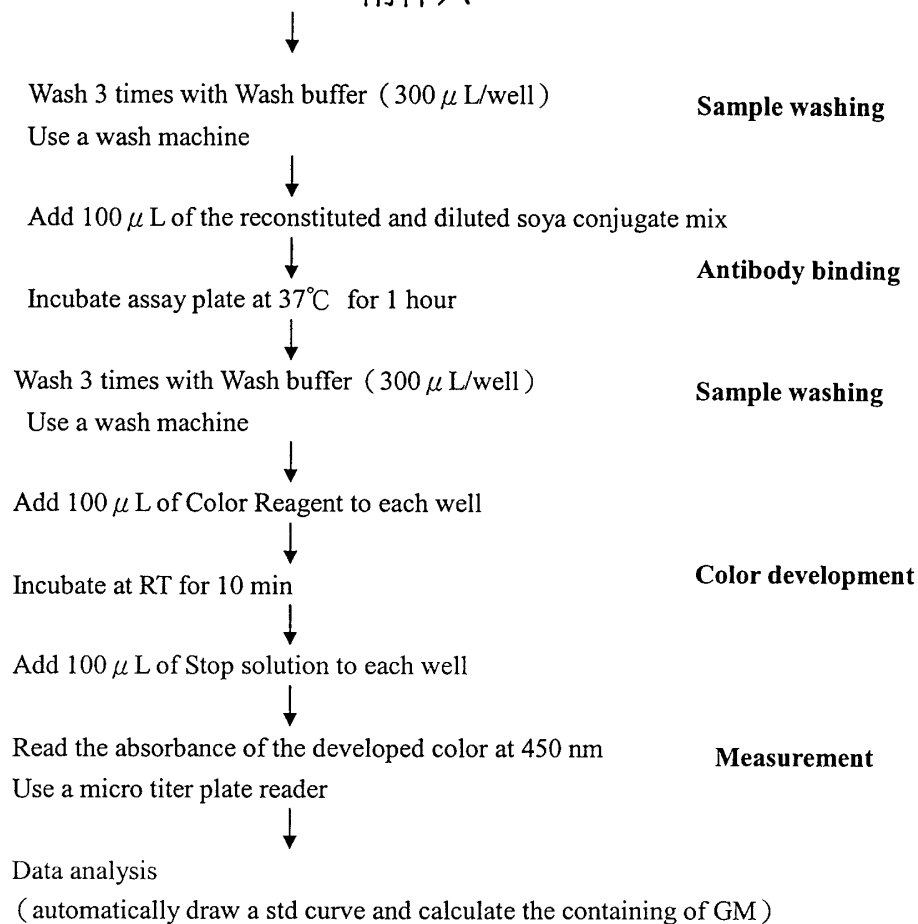


Incubate at 37°C for 1 hour

Sample incubation



附件六



Result :

Sample	Value	OD	Mean	SD	CV
STD1-1	0	-0.022	0.004	0.037	817.1
STD1-2	0	0.030			
STD2-1	0.3	0.200	0.235	0.050	21.36
STD2-2	0.3	0.270			
STD3-1	1.25	0.702	0.688	0.021	2.981
STD3-2	1.25	0.673			
STD4-1	2.5	1.367	1.360	0.011	0.832
STD4-2	2.5	1.352			

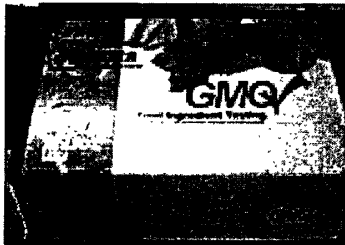
STD curve : $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

A = 0.0270 B = 1.04 C = 13.6 D = 8.97

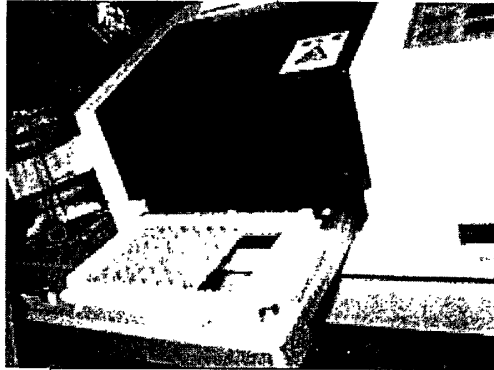
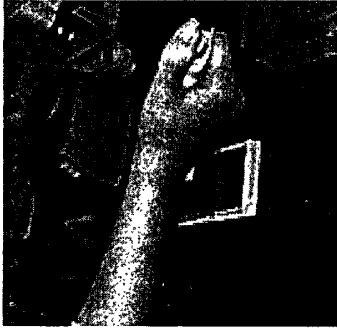
附件六

Sample	Mean Value (%)
Mix 0%-1	* * *
Mix 0%-1 10× dilution	* * *
Mix 0%-2	* * *
Mix 0%-2 10× dilution	* * *
Mix 0%-3	* * *
Mix 0%-3 10× dilution	* * *
Mix 0%-4	* * *
Mix 0%-4 10× dilution	* * *
Mix 1%-1	1.149
Mix 1%-1 10× dilution	0.244
Mix 1%-2	1.098
Mix 1%-2 10× dilution	0.144
Mix 1%-3	1.125
Mix 1%-3 10× dilution	0.130
Mix 1%-4	1.141
Mix 1%-4 10× dilution	0.283
Mix 5%-1	5.489
Mix 5%-1 10× dilution	0.643
Mix 5%-2	5.553
Mix 5%-2 10× dilution	0.557
Mix 5%-3	5.388
Mix 5%-3 10× dilution	0.621
Mix 5%-4	5.606
Mix 5%-4 10× dilution	0.664

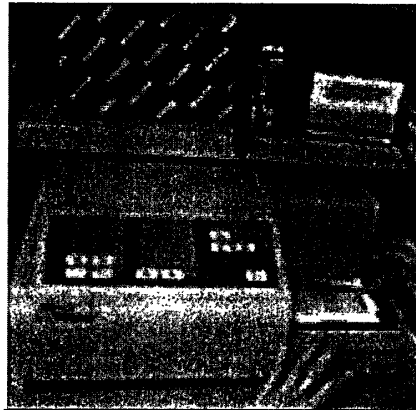
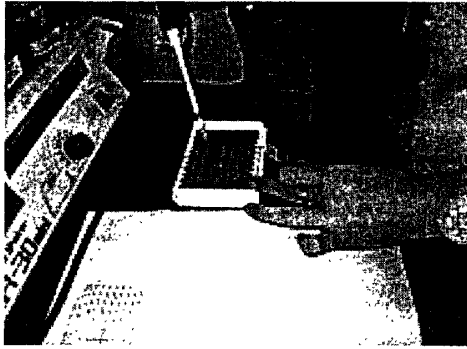
除了，Mix 1% 10× dilution 有兩個檢測值偏高超過兩倍外，其餘測量值得可以接受。偏高的測量值可能是因為 Antibody 沒洗乾淨造成背景值提升。



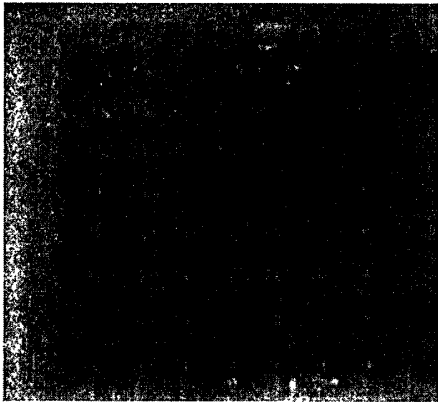
附件六



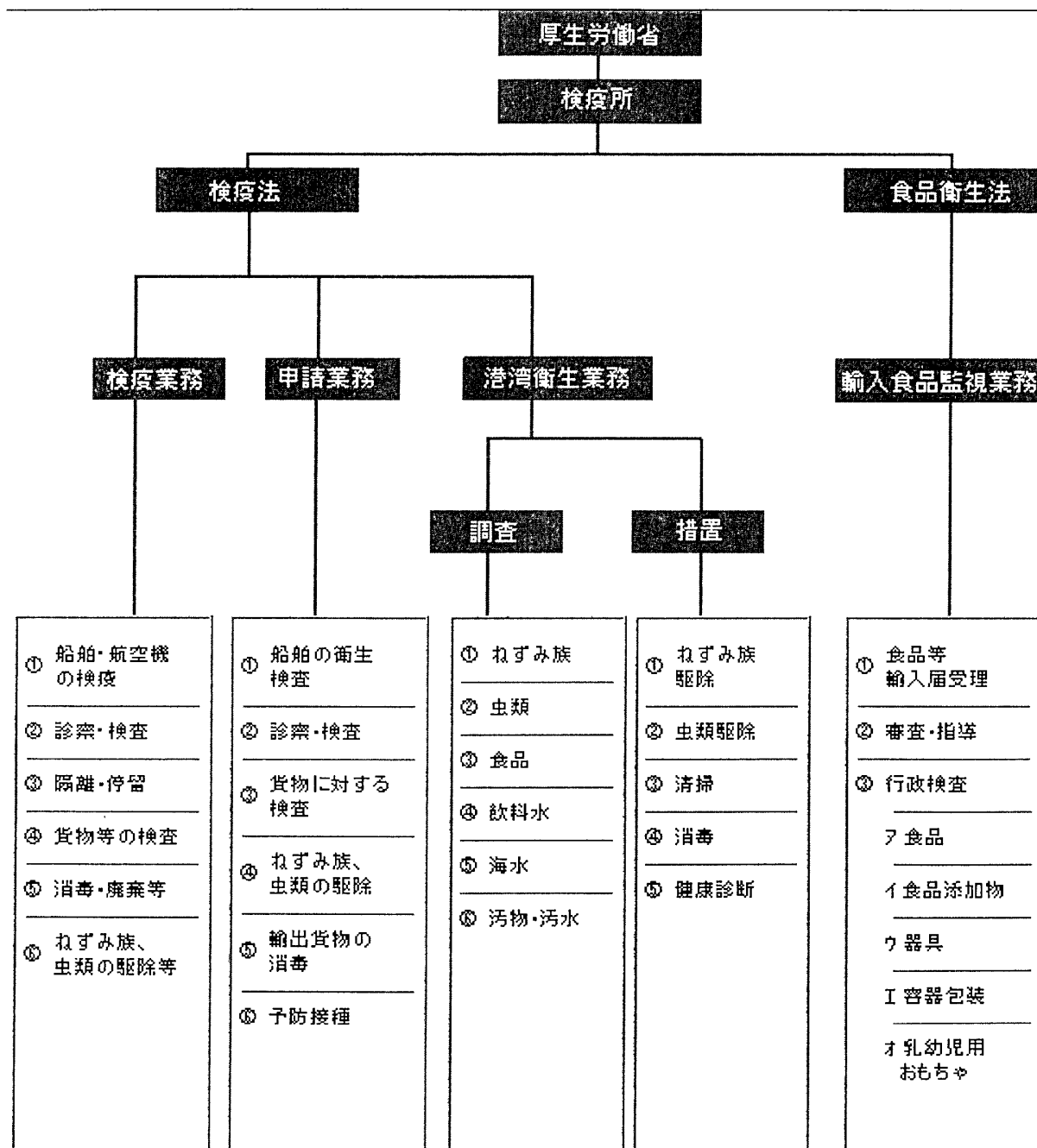
Wash Machine about 300,000 NTD



Reading Machine about 300,000 NTD



附件七
 檢疫所業務及分布



附件七

検疫所の配置

YOKOHAMA QUARANTINE STATION

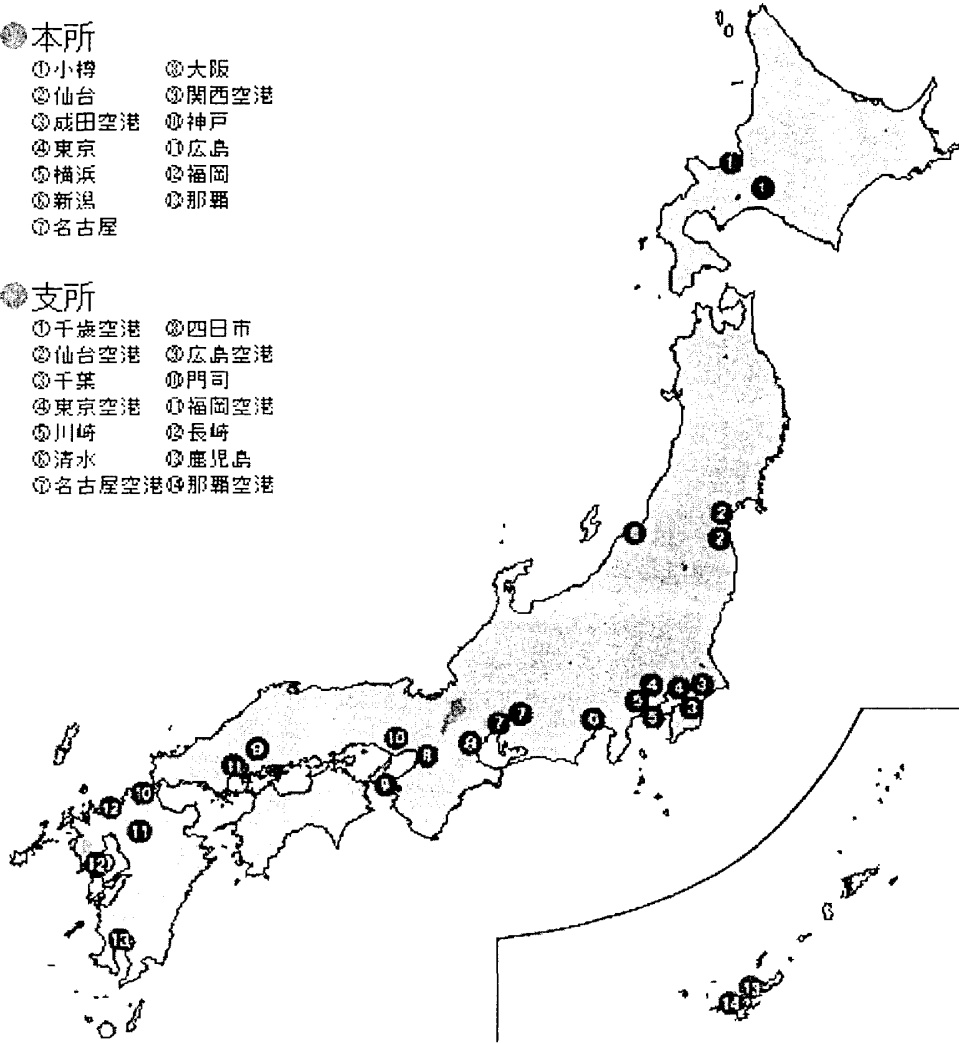
▶ 検疫所一覧へ

● 本所

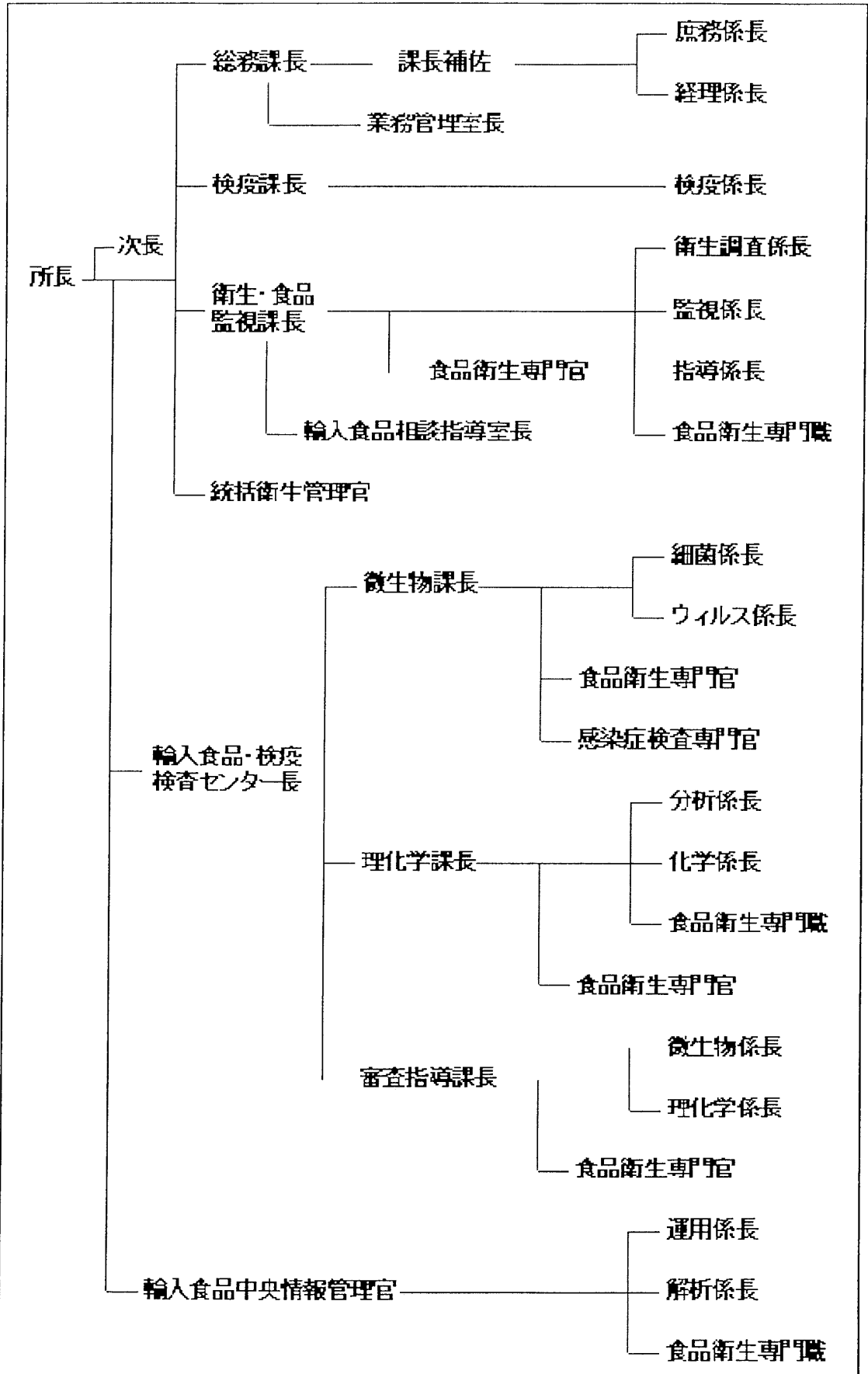
- ① 小樽
- ② 仙台
- ③ 成田空港
- ④ 東京
- ⑤ 横浜
- ⑥ 新潟
- ⑦ 名古屋
- ⑧ 大阪
- ⑨ 関西空港
- ⑩ 神戸
- ⑪ 広島
- ⑫ 福岡
- ⑬ 那覇

● 支所

- ⑭ 千歳空港
- ⑮ 仙台空港
- ⑯ 千葉
- ⑰ 東京空港
- ⑱ 川崎
- ⑲ 済水
- ⑳ 名古屋空港
- ㉑ 四日市
- ㉒ 広島空港
- ㉓ 門司
- ㉔ 福岡空港
- ㉕ 長崎
- ㉖ 鹿児島
- ㉗ 那覇空港



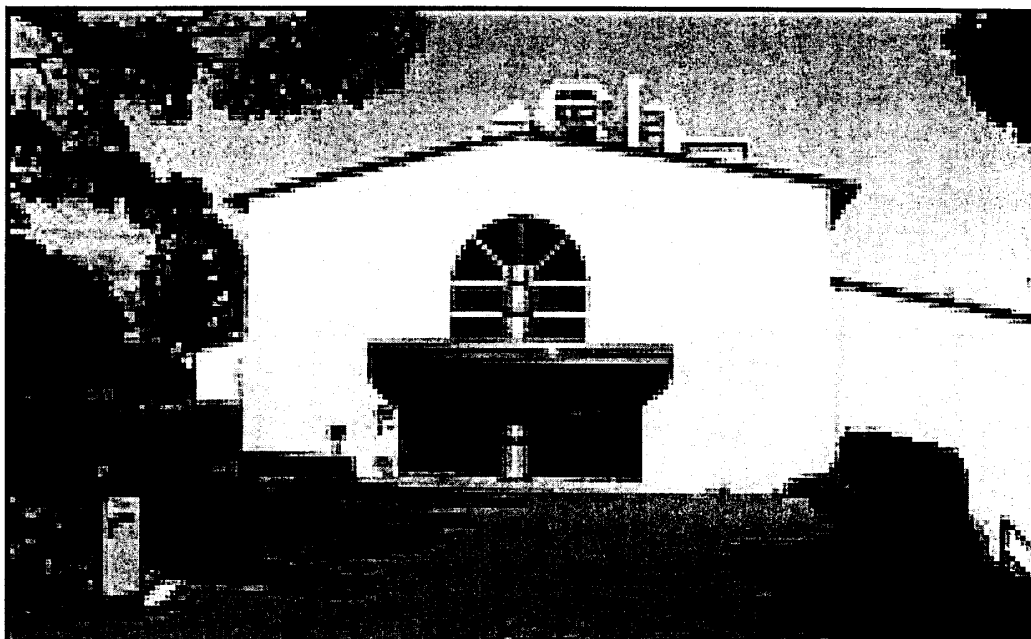
横濱検疫所人員配置



附件八

輸入食品・検疫検査センター

YOKOHAMA QUARANTINE STATION



History of Examination Center

1991--- Establishment of Examination center

1995--- Construction of Examination center

2001--- Increase of Genetic Modified Organism
Laboratory (March)

2003--- Construction of new Genetic Modified
Organism Laboratory (March)

附件八

輸入食品及檢疫檢查

日本各地檢疫所檢送之輸入食品樣本及發病旅行者檢體中有害化學物

微生物檢查

■輸入食品檢查

食中毒原因菌出血性大腸菌O157、沙門氏桿菌、霍亂弧菌等病原菌、牛海綿狀腦症病原體、食品中残留抗生物質。

■入境旅客感染症病原体檢查

發病旅行者糞便、血液檢查、港灣區域老鼠、蚊蟲等病媒病原体檢查。

理化學檢查

■食品中化學物質分析

食品添加物（加工食品）、残留農藥（蔬果）、残留動物用醫藥品（肉類、魚貝類）、真菌毒素（穀類、豆類）、放射性物質分析。

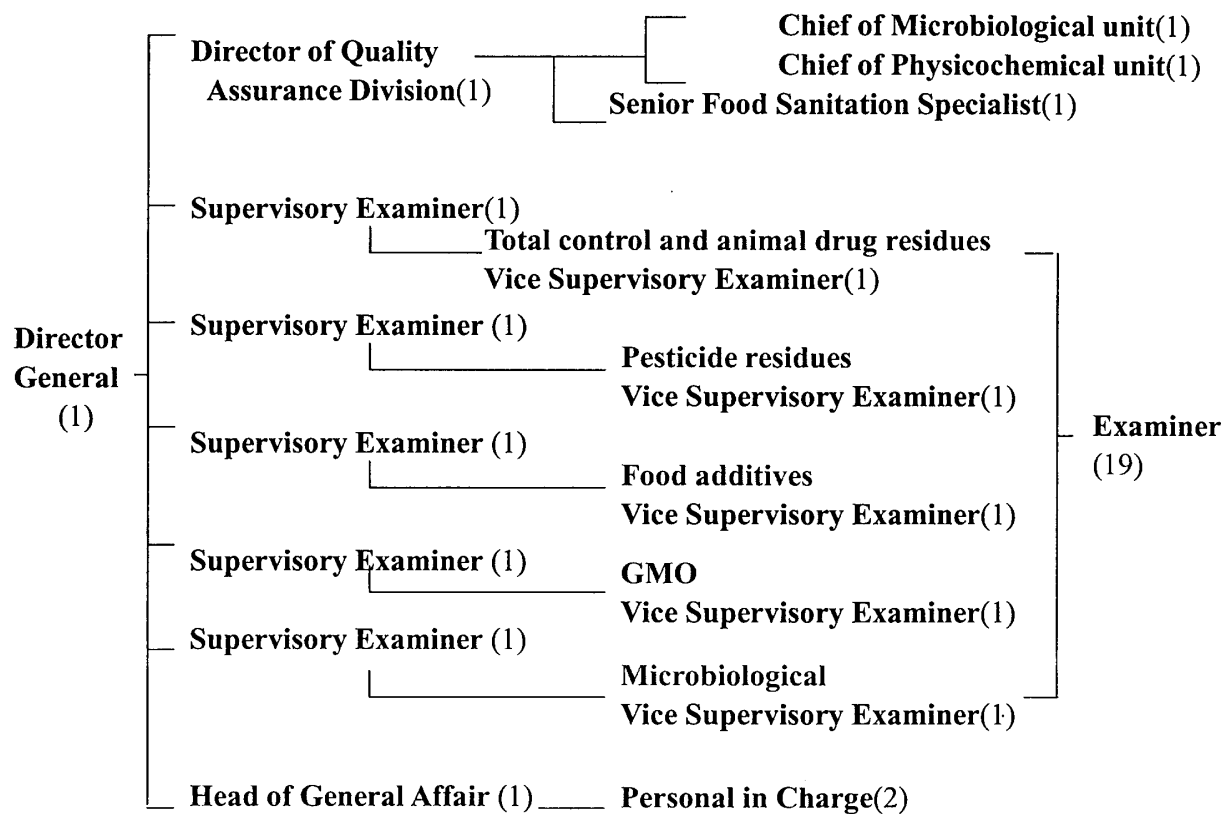
■基因改造食品檢查

信賴性確保業務

附件八

Organization of Yokohama Examination

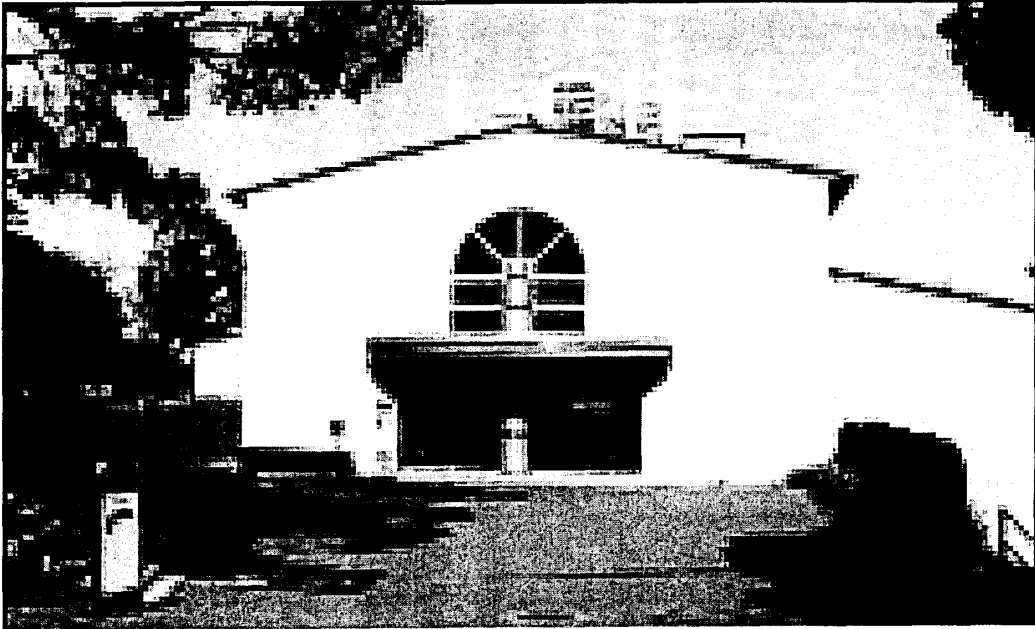
Center



成員37人

附件九

橫濱檢疫所檢查中心



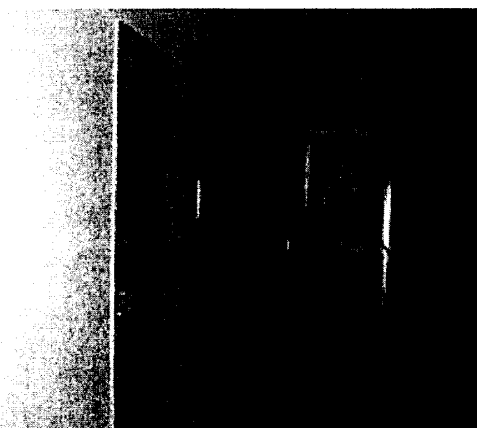
檢查中心正面——該中心共分為五棟相連之建築，進入必須換穿室內專用鞋。第一棟（正面第一棟，即左圖）一樓為總務及人事室，二樓為教育訓練中心，第二棟為新建之 GMO 實驗室，第三棟為檢驗員辦公室，第四棟為物理化學實驗室第五棟為微生物實驗室。

教育訓練中心



視聽教室

附件九



學員宿舍

橫濱檢疫所教育訓練中心為日本全國地方衛生檢驗機構及檢疫所之檢驗人員前往學習檢驗技術與方法之教學訓練場所。該中心設有視聽教室三間、大會議室一間以及學員宿舍。

檢驗員辦公室



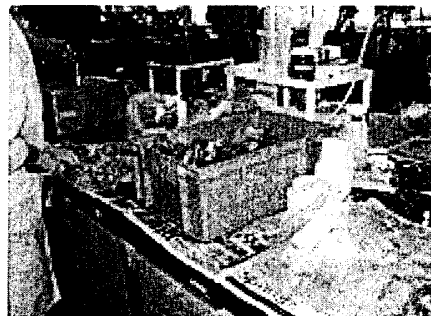
檢驗員辦公室與實驗室區隔，所有的檢驗人員集中於檢驗員辦公室辦理行政業務，於實驗室進行試驗工作。

附件九

物理化學實驗室



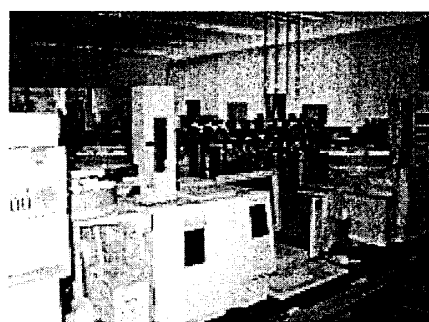
大實驗室



檢體前處理檯（動物用藥殘留）



濃縮萃取室



氣相層析儀室



質譜儀室



高壓液相層析儀室

理化實驗室區分為大實驗室級數個小實驗室。大實驗室裏設有數個實驗操作檯以及數個檢體前處理檯，不同檢測項目之檢體，各有不同之工作檯面。大實驗外圍有濃縮萃取室、氣相層析儀室、高壓液相層析儀室、質譜儀室等。

附件九

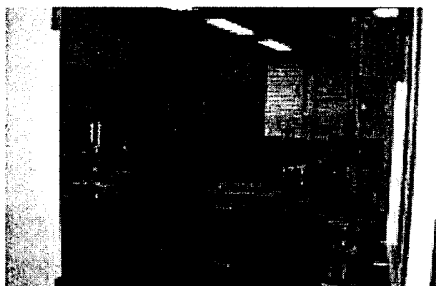
微生物實驗室



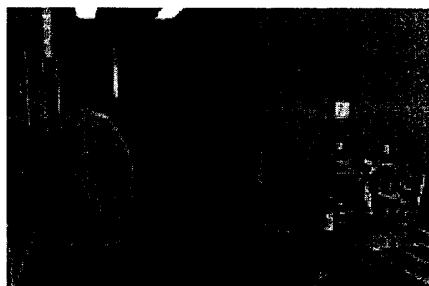
大實驗室



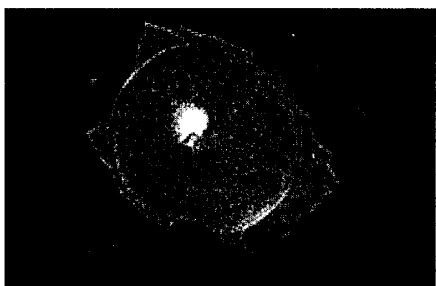
無菌操作檯



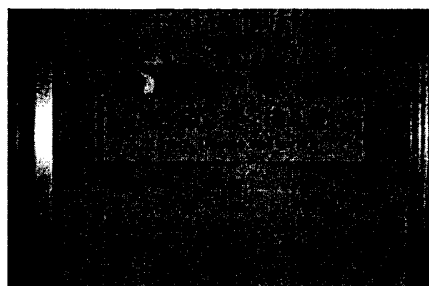
分子生物實驗室



顯微觀察室



病媒檢驗室



P3 實驗室

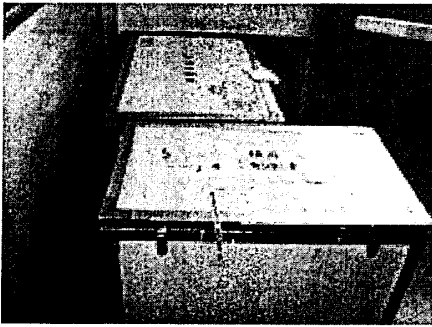
微生物實驗室亦區分為大實驗室及數個小實驗室。大實驗室裏設有數個實驗操作檯以及數個無菌操作檯。大實驗室外圍有分生實驗室、顯微觀察室、病媒檢驗室、P3 實驗室、滅菌洗滌室等。

附件九

檢體收受登記及分類庫存



各檢疫所送來之檢體由檢體收受專用門進入檢查中心



送驗之檢體必須依規定裝箱標示



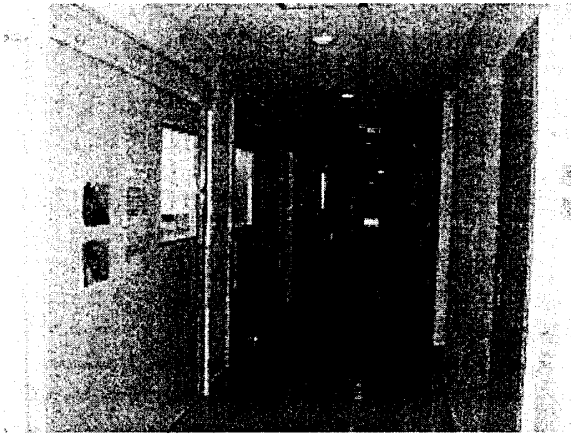
檢查、秤重、記錄



檢體由檢體專用電梯送至檢查中心
地下倉庫保存，待檢驗人員領取檢驗

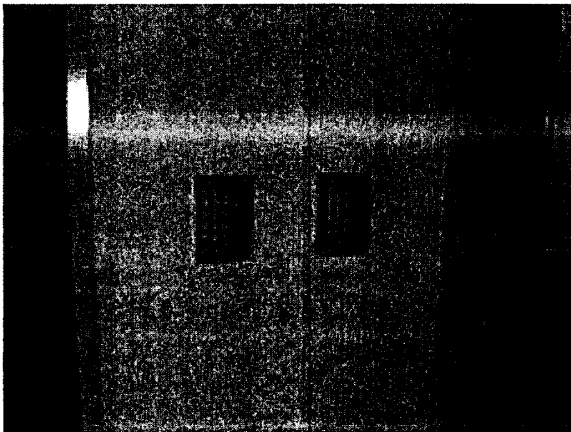
附件十

橫濱檢疫所檢查中心 GMO 實驗室



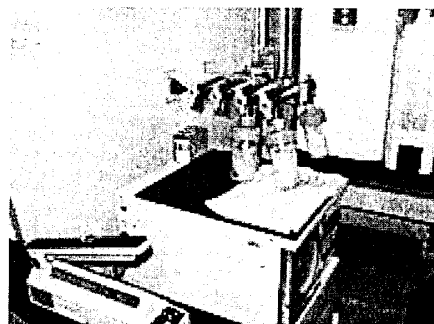
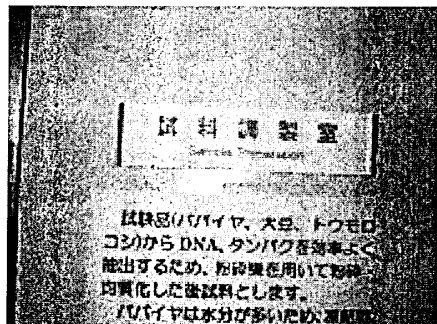
GMO 實驗室（走廊左側）

供區分為六間小實驗室。走廊右側之房間為 GMO 檢驗技術研習人員休息室。

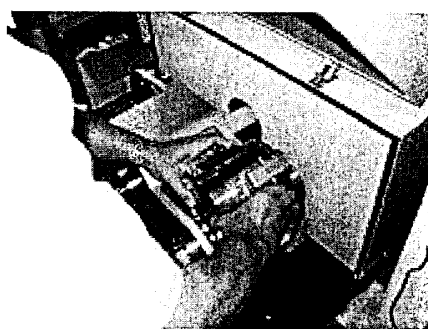


每個 GMO 實驗室之入口皆為號碼鎖門，必須輸入密碼方能進入。

附件十
試料調製室



検體先進行冷凍乾燥



於無菌台秤重分裝

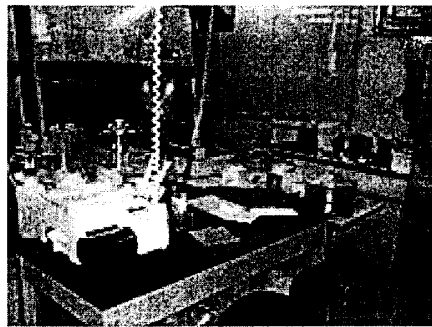
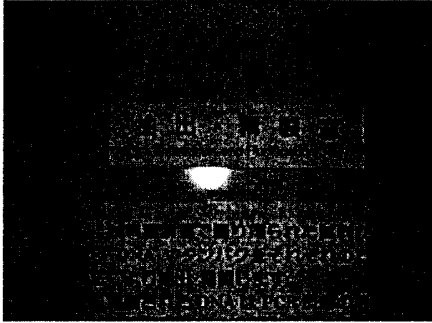
粉碎機磨粉



封裝標示

附件十

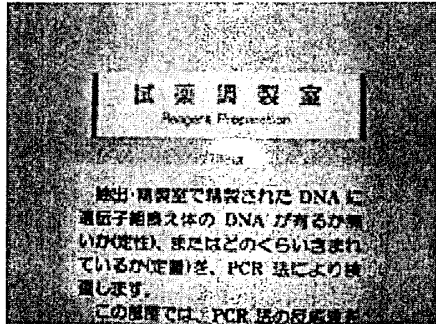
DNA 及蛋白質萃取室



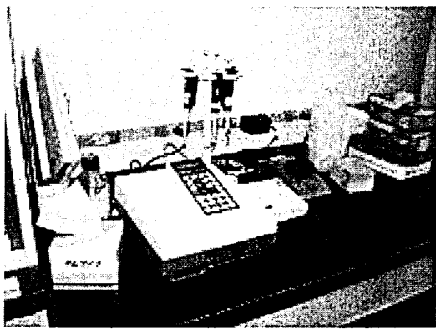
每一個無菌操作台以及工作台面皆配製一套完整之實驗設配，包括各規格之微量吸管、各規格之滅菌微量吸管尖、震盪混合器、桌上型微量離心機、酒精燈、70%酒精、滅菌之微量離心管、DNA 抽取套組等等。

附件十

PCR 反應準備室



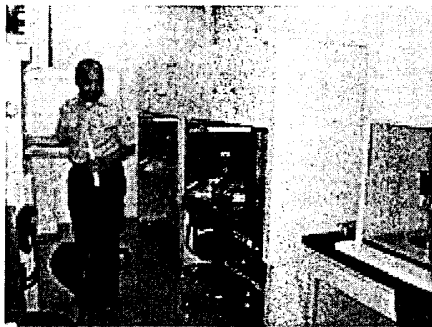
此實驗室為配製 PCR 反應配方與保存 PCR 反應試劑及酵素專用



檢體 DNA 濃度測量與稀釋——配製 PCR 反應配方前需先將檢體 DNA 調製成適合 PCR 反應之濃度



設有冷凍與冷藏櫃保存 PCR 反應試劑、酵素及暫時存放之 DNA 與 PCR 反應配方



配製 PCR 反應配方之作業，皆在無菌操作台內進行，每一無菌操作台階配有完整之實驗設備。無菌操作台不使用時，必須開啟紫外燈滅菌及破壞可能污染殘留之 DNA。

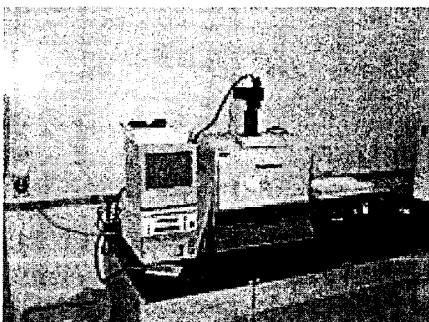
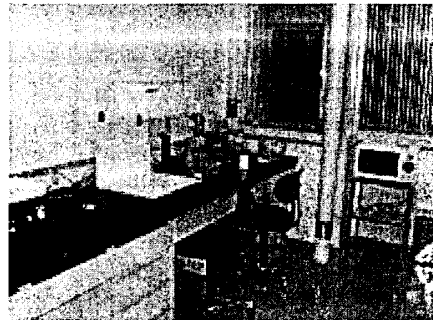
附件十

定性、定量 PCR 反應室



定性、定量 PCR 反應室內設有 ABI 7700 同步定量 PCR 儀器乙部以及 ABI 9700 PCR 儀器四部。定量 PCR 檢驗結果分析亦於此室進行。

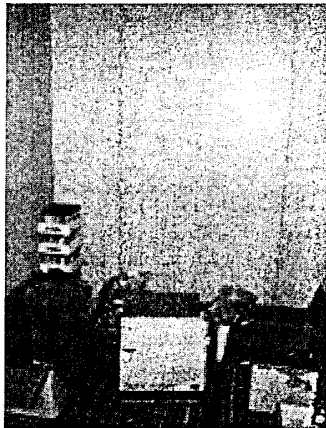
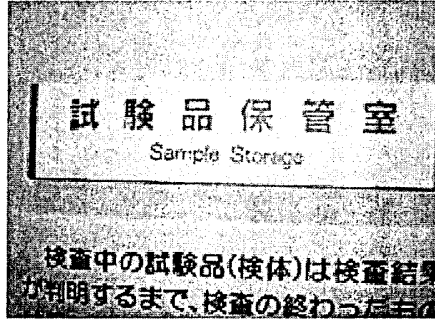
電泳室



定性 PCR 結果之電泳於此室進行。包含電泳配製設備、電泳設備以及照相設備。

附件十

驗餘檢體冷凍冷藏保存室



驗餘檢體冷凍冷藏保存室內設有一低溫冷凍室（-20℃）與一低溫冷藏室（4℃）。所有驗餘之檢體必須於此室保存三個月方能銷毀。

附件十一

進口食品GMO檢驗

人員：3人

負責人：統括檢查官 大神田実(Okanda Minoru)

目前之檢驗項目及方法：

1. 玉米
 - (1) CBH 351 定性 --- ELISA方法
 - (2) MON 810定量 --- PCR方法
 - (3) T25定量 --- PCR方法
 - (4) GA21定量 --- PCR方法
 - (5) Event 176定量 --- PCR方法
 - (6) Bt11定量 --- PCR方法
2. 大豆 RRS定量 --- ELISA方法
3. 木瓜 55-1定性 --- PCR方法
4. 馬鈴薯
 - (1) New Leaf 定性 --- PCR方法
 - (2) New Leaf Plus定性 --- PCR方法
 - (3) New Leaf Y定性 --- PCR方法

馬鈴薯定性檢驗現已停止（八月），將來會進行定量

附件十一

Total number of examination (2002, April ~ 2003, March) : 26,363

Microbiological Tests

SPC, Coliform group	606
Pathogenic microorganisms	365
Antibiotics	4,961

Chemical Tests

Food additives	2,465
Pesticide Residues	11,868
Veterinary drugs	4,344
Aflatoxin, Heavy Metals	877
GMO	1,077
<hr/>	
	26,363

附件十二

CTAB 抽馬鈴薯 (200 mg) DNA

2003/8/5	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA Conc. (ng/uL)
	230nm	260nm	280nm	320nm			
15-15 5%-1	0.176	0.348	0.191	0.001	1.822	1.977	174.0
15-15 5%-2	0.241	0.493	0.27	0.003	1.826	2.046	246.5
15-15 5%-3	0.296	0.664	0.361	-0.001	1.839	2.243	332.0
Y&P 5%-1	0.177	0.353	0.194	0.002	1.820	1.994	176.5
Y&P 5%-2	0.194	0.391	0.214	0.002	1.827	2.015	195.5
Y&P 5%-3	0.248	0.558	0.302	0.002	1.848	2.250	279.0
							average CV%
							24.38
							average CV%
							36.45

15-15 5% : 5% NLY SEMT15-15 line (是輸入日本主要的 NLY)

Y&P 5% : 5% NLY SEMT15-15 line + 5% NLPlus RBMT21-350 line (是輸入日本主要的 NLPlus)

用 CTAB 抽 200 mg 馬鈴薯 DNA，最後 DNA 濃度大都可達 200 ng/μL。需要時間約為六小時。
用這個方法，需要可以離心 15 mL 離心管的超高速離心機 (8,000xg 以上)

附 件 十 三

食発第1106001号
平成14年11月6日

各 { 都道府県知事
政令市市長
特別区区長 } 殿

厚生労働省医薬局食品保健部長

アレルギー物質を含む食品の検査方法について

アレルギー物質を含む食品については、特定のアレルギー体質を持つ方の健康危害の発生を防止する観点から、平成13年4月からその表示について法的に義務化しているところである。

これに関連して、今般、別添のとおりアレルギー物質を含む食品の検査方法を定めたので、検査を行う場合には、これらの方法により実施されたい。

なお、アレルギー物質を含む食品の検査方法については、その検査技術の進歩に対応し、順次見直しを行っていくこととしているので、ご留意願いたい。

(別添1)

特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）の検査方法

序文

本検査法は、特定原材料5品目の表示制度を科学的に検証する目的で、現時点で最も信頼性の高いと考えられる方法によって構成されたものである。該当する検査対象検体は流通する食品原料、添加物及び加工食品であるが、本検査法を全ての食品へ適用することは、実際上不可能である。さらに応用例を蓄積し、問題点を改訂していくこととしているので、ご留意願いたい。

なお加工による特定原材料成分の変化・分解や食品からの特定原材料成分の抽出効率の変動により、本検査法による特定原材料総タンパク質含有量の測定結果は実際の含有量と必ずしも正確に一致しない。

1. 検査原則及び試料調製法

1.1. 検査原則

当検査は、あらゆる加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・ 検査対象検体は、一包装を一単位とする。
- ・ 検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。
- ・ 試料中の特定原材料成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に均質化操作を行う。
- ・ 均質化した試料を調製試料とする。
- ・ 検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。
- ・ 試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない場所で実施する。
- ・ 微量測定のため、粉碎器、フードカッター、秤量用器具は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行う。
- ・ 試料の調製場所と検査場所は、区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐ。

1.2. 試料調製法

食品一包装単位に含まれる可食部全体を試料とする。その後、試料の全量を粉碎器あるいはフードカッター等*で十分に破碎し、均質混和して調製試料とする。

*エースホモジナイザーAM-11(日本精機製作所社製)、レッチェ GM200 (レッチェ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

注) 参考

①インスタント食品（カップ麺、カップスープ等）には、スープ、かやく及び麺などに小分けされ包装されているものが含まれる。そのような包装形態を持つインスタント食品については全体を一包装単位として考え、小分け包装されたもののすべてを混合し、次いで均質化操作を行った後に調製試料とする。

②幕の内弁当などの組み合わせ食品では弁当全体を一包装単位として考え、ご飯、おかず及び小分け包装された調味料等のすべてを混合し、次いで均質化操作を行った後に調製試料とする。

2. 特定原材料5品目の検査方法

卵、乳、小麦、そば、落花生の検査方法

2.1. ELISA 法

食品中の特定原材料由来のタンパク質を検出する手法である。調製試料に対して複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製 FASTKIT エライザシリーズ（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）と単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製特定原材料測定キット（卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生）の両キットを用い、測定検査を行う。

ELISA 法を用いた測定検査における注意事項

・（株）森永生科学研究所製 ELISA キットを用いた測定検査においては、卵を検知対象とする場合には卵白アルブミンキット、乳を検知対象とする場合にはカゼインキットを用いて測定を行う。上記両キットは加工食品への適用範囲が比較的広い。

・ELISA 法を用いて得られた測定結果において、3 ウェル間の CV 値が 20%以上を示した場合には、再度 ELISA 操作以降の操作を行う。

・1 度目の測定を行った結果、得られた数値が 8-12 $\mu\text{g/g}$ の範囲内にある場合には、再度、同じ調製試料から 2 g 採取し、抽出操作以降の操作をあらためて行い、2 度目の測定を行う。測定結果の判定は、1 度目に得られた値と 2 度目に得られた値とを平均した値で行う。調製試料から 2 度目の採取が不可能である場合には、別の同検査対象検体を入手し検査を行う。

2.1.1. 複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製 ELISA キット（FASTKIT エライザシリーズ）の実験操作

試薬、注意事項等を含め、複合抗原認識抗体を用いた ELISA キットの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

調製試料 2 g をホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、抽出用緩衝液^{*1} 38 mL を加え、ホモジナイザー^{*2} を用いて攪拌操作を行う^{*3}。攪拌した後、溶液の pH を確認し、必要であれば、中性付近 (pH 6.0-8.0) となるように調整^{*4} する。その後、同様の攪拌操作を 2 回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う^{*5}。抽出操作終了後、低温 (4 °C)、3,000 x g の条件で 20 分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し濾過する。次いで、得られた濾過液 100 μL に対して希釈用緩衝液 900 μL を加え、混合し、当混合溶液を測定溶液とする。抗体固相化プレート中、使用するウェルを 1 回あたり 250-300 μL の洗浄液^{*6} を用いて 5 回繰り返し洗浄した後に、測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液^{*7} の各々を 1 ウェルあたり 100 μL ずつ加える。モジュール用フタを取り付け各溶液がウェル様に広がるように軽く振とうした後に、室温^{*8} で 60 分間静置する。静置後、各溶液を捨て、洗浄液を用いて 5 回のウェル洗浄操作を行う。洗浄後、1 ウェルあたり 100 μL のビオチン結合抗体溶液を加え、フタをしてウェル様に広がるよう軽く振とうし

た後に、室温で60分間静置する。静置後、ビオチン結合抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて5回のウェル洗浄操作を行う。次いで、1 ウェルあたり100 μ Lの酵素-アビジン結合物溶液を加え、フタをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で30分間静置する。静置後、酵素-アビジン結合物溶液を捨て、洗浄液を用いて5回の洗浄操作を行う。洗浄後、1 ウェルあたり100 μ Lの発色溶液を加え、フタをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で20分間静置する。次いで、1 ウェルあたり100 μ Lの反応停止液を加え発色反応を停止させる。発色反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、主波長405又は450 nm⁹、副波長600-650 nmの条件で測定を行う。各濃度の標準溶液に対して得られる測定値より作成した検量線に基づき、測定溶液中に含まれる特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3 ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

*1 抽出用緩衝液

キット付属の濃縮抽出用緩衝液を、精製水を用いて10倍希釈したものとする。

*2 ホモジナイザー

ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製)、ラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製)、エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製) あるいはラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製)を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約20,000 rpmの条件で30秒間行う。エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約12,000 rpmの条件で1分間行う。

*4 pH調整

pHを測定し、調整が必要な場合には適宜、調整を行う。また、調整に要したアルカリ(あるいは酸)溶液の液量を2.1.3.の項にある希釈倍率を加味し、最終的な特定原材料由来のタンパク質含有量算出を行う。

*5 ホモジナイザー専用カップを用いた場合、3回目の攪拌操作終了後にカップ内容物の全量をポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に移し、遠心操作を行う。

*6 洗浄液

キット付属の濃縮洗浄液を、精製水を用いて10倍希釈したものとする。

*7 標準溶液

キット付属の説明書に従い、標準溶液を希釈用緩衝液を用いて順次希釈したものとする。

*8 室温

室温とは20-25°Cとする。

*9 測定波長

各ELISAキットで測定波長が異なるのでELISAキットの説明書に従う。

2.1.2. 単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製ELISAキットの実験操作

試薬、注意事項等を含め、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いたELISAキットの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

調製試料2 gをホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に量り採り、検体希釈液*1 38 mLを加え、ホモジナイザー*2を用いて攪拌操作を行う*3。攪拌した後、溶液のpHを確認し、必要であれば、中性付近(pH 6.0-8.0)となるように調整*4する。その後、同様の攪拌操作を2回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う*5。抽出操作終了後、低温(4℃)、3,000 x gの条件で20分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し濾過する。次いで、得られた濾過液 50 μLに対して検体希釈液950 μLを加え、混合し、当混合溶液を測定溶液とする。予め、必要量の抗体固相化モジュールをフレームにセットしておき、測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液*6の各々を1ウェルあたり100 μLずつ加える。各溶液がウェル様に広がるように軽く振とうし、モジュール用フタを取り付けた後、室温*7で60分間静置する。静置後、各溶液を捨て、1回あたり250-300 μLの洗浄液*8を用い、6回繰り返しの洗浄操作を行う。洗浄後、1ウェルあたり100 μLの酵素標識抗体溶液を加え、ウェル様に広がるよう軽く振とうし、フタをした後に、室温で30分間静置する。静置後、酵素標識抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて6回の洗浄操作を行う。洗浄後、1ウェルあたり100 μLの酵素基質溶液を加え、ウェル様に広がるよう軽く振とうした後に、室温、遮光条件下で10分間静置する。静置後、反応停止液100 μLを加え、発色反応を停止させる。発色反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、主波長450 nm、副波長600-650 nmの条件で測定を行う。各濃度の標準溶液に対して得られる測定値より作成した検量線に基づき、測定溶液中に含まれる特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

*1 検体希釈液

キット付属の20倍濃縮検体希釈液を、精製水を用いて20倍希釈したものとする。

*2 ホモジナイザー

ミルサーIFN-700G(岩谷産業社製)、ラボミルサーLM-2(大阪ケミカル社製)、エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 ミルサーIFN-700G(岩谷産業社製)あるいはラボミルサーLM-2(大阪ケミカル社製)を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約20,000 rpmの条件で30秒間行う。エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約12,000 rpmの条件で1分間行う。

*4 pH調整

pHを測定し、調整が必要な場合には適宜、調整を行う。また、調整に要したアルカリ(あるいは酸)溶液の液量を2.1.3.の項にある希釈倍率を加味し、最終的な特定原材料由来のタンパク質含有量算出を行う。

*5 ホモジナイザー専用カップを用いた場合、3回目の攪拌操作終了後にカップ内容物の全量をポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に移し、遠心操作を行う。

*6 標準溶液

凍結乾燥標準品を500 μ Lの精製水を用いて溶解したものを標準原液とし、当該標準原液を調製済み検体希釈液を用いて順次希釈し、調製する。

*7 室温

室温とは20-25 $^{\circ}$ Cとする。

*8 洗浄液

キット付属の20倍濃縮洗浄液を、精製水を用いて20倍希釈したものとする。

2.1.3. 結果の判定

4係数logistic解析より得られた検量線から各ウェルの特定原材料由来のタンパク質濃度を算出し、得られた値に希釈倍率*を乗じて食品採取重量あたりの特定原材料由来のタンパク質量を算出する。2.1.1.及び2.1.2.で得られた食品採取重量1gあたりの特定原材料由来のタンパク質含量が10 μ g以上の試料については、微量を超える特定原材料が混入している可能性があるものと判断する。

*希釈倍率

複合抗原認識抗体を用いたELISAキットにおける希釈倍率は200、また、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いたELISAキットにおける希釈倍率は400となる。

2.2. ウェスタンブロット法

試料中のタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、転写膜に転写後、特定原材料由来のタンパク質に対する特異的ポリクローナル抗体を用いて検出する定性試験法である。卵、乳についてのELISA法陽性判定の確認とする。卵タンパク質の検出の際は、(株)森永生科学研究所製モリナガ卵ウェスタンブロットキット(卵白アルブミン及びオボムコイド)、乳タンパク質の検出の際は同モリナガ牛乳キット(カゼイン及び β -ラクトグロブリン)を用いてそれぞれ行う。

ウェスタンブロット法を用いた検査における注意事項

2.2.1のポリアクリルアミドゲル電気泳動用混合溶液の調製において、2.1.2.の(株)森永生科学研究所製ELISAキットにおける測定の際に調製した濾過液を用いて、ローディング緩衝液と混和以降の操作から行うことが望ましい。濾過液は低温(4 $^{\circ}$ C)で3日間は保存可能である。ELISAキットにおける同一の濾過液からの測定が不可能である場合は、再度同じ調製試料から2g採取し、2.2.1に従って試料を調製する。2度目の採取が不可能である場合には、別の同検査対象検体を入手し検査を行う。

2.2.1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動用混合溶液の調製

調製試料2gをホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に量り採り、検体希釈液*138 mLを加え、ホモジナイザー*2を用いて攪拌操作を行う。攪拌した後、溶液のpHを確認し、必要であれば、中性付近(pH 6.0-8.0)となるように調整をする。その後、同様の攪拌操作を2回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う。抽出操作終了後、低温(4 $^{\circ}$ C)、3,000 x gの条件で20分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し

濾過する。次いで、得られた濾過液とローディング緩衝液^{*3}を1:2(V/V)の割合で混和後、沸騰水浴中で5分間加温^{*4}し、加温後の混合溶液を電気泳動に供する。また、陽性対照として検査対象の卵あるいは乳の標準液^{*5}をローディング緩衝液で希釈し、0.5 μg/mL、1 μg/mL 及び 10 μg/mL の3濃度の標準溶液を調製し、各々電気泳動に供する。

*1 検体希釈液

(株) 森永生科学研究所社製モリナガウエスタンブロットキットまたは(株) 森永生科学研究所社製 ELISA キットに付属の20倍濃縮検体希釈液を、精製水を用いて20倍希釈したものとする。

*2 ホモジナイザー

ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製)、ラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製)、エースホモジナイザーAM-3-50 (日本精機製作所社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 ローディング緩衝液

Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD 社製) と 2-mercaptoethanol を 19:1(V/V) の割合で混和したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4 加温

加温時に試料溶液の突沸により蓋が外れない容器を用いる。

*5 標準液

(株) 森永生科学研究所製モリナガウエスタンブロットキットに付属の標準液を用いる。

→ 生化学工業(株)

2.2.2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲルプレート^{*1}を電気泳動槽^{*2}にセットする。電気泳動槽に泳動用緩衝液^{*3}を注ぎ、ゲルのウェルを完全に満たす。液漏れのないことを確認し、2.2.1.において調製した混合溶液ならびに各標準溶液を各ウェルに20 μLずつ注入する。また、別のウェルにタンパク質分子量マーカー^{*4}を2 μL注入する。注入の際に混合溶液が隣のウェルに混入しないよう注意する。ゲルプレート1枚あたり30 mAの定電流で泳動する。ローディング緩衝液に含まれているBPB (Bromophenol Blue : BPB) がゲルの下端から1-1.5 cmのあたりまで進んだところで泳動を終了する。

*1 ポリアクリルアミドゲル

SDS-PAGE mini 15 % (1.0 mm x 12 well) (TEFCO 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*2 電気泳動槽

セイフティーセルミニ STC-808 (TEFCO 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 泳動用緩衝液

10 × Tris/glycine/SDS (BIO-RAD 社製) を蒸留水で10倍希釈したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4. タンパク質分子量マーカー

Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD 社製 161-0324) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.3. ブロットイング

ブロットイングに際しては予め、転写膜*1、濾紙*2 枚をブロットイングバッファー*3 に 30 分間浸しておく。ブロットイングバッファーを転写装置*4 の陽極面に展開し、濾紙、転写膜、ゲル、濾紙の順に重層する。重層する際、気泡が入らないように注意する。また、ゲルの乾燥を防ぐために速やかに作業する。重層後、ブロットイングバッファーを静かに少量滴下し、陰極のついた上部蓋を閉じる。転写装置を傾け余分なブロットイングバッファーを除く。転写膜の面積 1 平方センチあたり 2 mA の定電流で 60 分間転写する。

*1 転写膜

Hybond-P (アマシヤムバイオサイエンス社製) 及び同等の結果が得られる PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜を 100 %メタノールに 10~30 秒間浸してから使用する。

*2 濾紙

Extra Thick Filter Paper (BIO-RAD 社製) 及び同等の結果が得られる濾紙を使用する転写膜と同じ大きさにカットして用いる。

*3 ブロットイングバッファー

10 × Tris/glycine (BIO-RAD 社製) /メタノール/蒸留水を 1 : 2 : 7 (V/V/V) の割合で混合したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4 転写装置

トランスブロット SD セル (BIO-RAD 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.4. 免疫染色

転写後の膜を速やかにブロッキング溶液*1 に浸し、60 分間振とうする。振とう後、ブロッキング溶液を捨て、一次抗体溶液*2 に浸し、60 分間振とうする。振とう後、一次抗体溶液を捨てる。次いで、洗浄液*3 に浸し 5 分間振とう後、洗浄液を捨てる。この洗浄操作を更に 2 回行う。3 回目の洗浄終了後、二次抗体溶液*4 に浸し、30 分間振とうする。振とう後、二次抗体溶液を捨て、上記と同様に洗浄液で 3 回洗浄操作を行う。洗浄終了後、転写膜をアルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液*5 に浸し、20 分間振とうする。振とう後、アルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液を捨て、上記と同様に 3 回洗浄操作を行う。洗浄終了後、100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5) 溶液に浸し、15 分間振とう後、100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5) 溶液を捨て、転写膜を検出試薬*6 に 3-10 分間程度浸し、振とうする。この際、検査対象の卵あるいは乳の標準液 (1 µg/mL) のバンドが検出されていることを確認し、バックグラウンドが高くなるように注意する。次いで、検出試薬を除き、転写膜を蒸留水で軽くすすいだ後、蒸留水中で遮光下、15 分間振とうする。転写膜を遮光下で風乾して判定を行う。

*1 ブロッキング溶液

ウシ由来血清アルブミン (SIGMA社製A-7030) を最終濃度0.1 %及びTween-20を最終濃度

0.05%となるようにTris-Buffered Saline (TBS) (BIO-RAD社製の10 X TBSを蒸留水を用いて10倍希釈し、調製)を用いて調製した溶液を用いる。なおTBSは各最終濃度が20 mM Tris、500 mM 塩化ナトリウムとなるように溶解し、pH 7.5となるように調整したものをを用いてもよい。

*2 一次抗体溶液

特定原材料由来のタンパク質 (卵：卵白アルブミン及びオボムコイド、乳：カゼイン及びβ-ラクトグロブリン) に対するウエスタンブロットキットの各抗体をブロッキング溶液を用いて 0.5 μg/mL に調製した溶液を用いる。

*3 洗浄液

Tween-20 を最終濃度 0.05 % となるように TBS を用いて調製した溶液 (TBS-T) を用いる。

*4 二次抗体溶液

AL500/
VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製) に含まれるビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体をブロッキング溶液で 10000 倍に希釈したものをを用いる。

*5 アルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液

VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit 又は VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製) に含まれる A 液 1 滴と B 液 1 滴をブロッキング溶液 10 mL に加えたもの。当溶液は使用する 30 分前に調製する。

*6 検出試薬

Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV<BCIP/NBT> (VECTOR社製) に含まれる1液2滴を100 mM Tris/塩酸(pH 9.5)10 mLに加え混和後、2液と3液を順次各2滴加えたもの。用時調製する。

2.2.5. 結果の判定

各特定原材料由来のタンパク質の分子量 (SDS-PAGEにおける見かけ上の分子量：卵白アルブミン M.W. 50,000、オボムコイド M.W. 38,000、カゼイン M.W. 33,000-35,000、β-ラクトグロブリン M.W. 18,400) 付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性と判定する。適宜、標準液のバンド位置を参照して判定する。なお、陽性対照として検査対象の卵あるいは乳の標準液 (1 μg/mL) が検出されているかどうか確認する。標準液 (1 μg/mL) が検出されない場合は、検査が不適であると考え、再度ポリアクリルアミドゲル電気泳動混合溶液の調製から行う。卵タンパク質測定の際は、卵白アルブミンあるいはオボムコイド、乳タンパク質測定の際はカゼインあるいはβ-ラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いて陽性の場合、各特定原材料 (卵、乳) が微量を超える混入があると判断する。

2.3. PCR 法

小麦、そば、落花生についての ELISA 法陽性判定の確認とする。

食品からの DNA 抽出精製法 (2.3.2.) に従い DNA 抽出を行い、得られた DNA 試料液を用いて以下に示す定性 PCR を行う。なお、DNA 抽出は 1 調製試料につき 2 点並行で行い、それ以降、PCR 増幅産物の確認に至るまでの全操作は、この 2 点に対し独立並行で行う。

2.3.1. 試料調製法

1.1. 及び 1.2. に従って、試料を調製する。

ただし、試料中、ミキサーミル等を用いた単純な粉砕により均質化が困難なものについては、均質化処理過程において、試料と同重量の水を加え、十分に均質化操作を行う。その後、凍結乾燥処理を行い、再度粉砕操作を行ったものを調製試料とする。また、試料が液体の場合には、ミキサーミル等を用いた均質化を行った後、凍結乾燥処理に供し、処理後、再びミキサーミル等を用いた粉砕処理を経たものを調製試料とする。

2.3.2. DNA 抽出精製法

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) とフェノール/クロロホルム混合液を用いて DNA を抽出精製する CTAB 法は、応用範囲が広い上、PCR 阻害物質が残存しにくく、純度の高い DNA を得ることが出来る非常に優れた方法であるが、クロロホルム等の有害試薬、及び煩雑な精製操作が必要である。これに対し、市販の DNA 抽出キットを用いることで比較的簡易に DNA の抽出精製を行うことが可能である。市販の DNA 抽出キットには、シリカゲル膜タイプキット、イオン交換樹脂タイプキット等がある。これらのキットはそれぞれに特徴を有するため、各検査対象検体に適した方法にて DNA の抽出を行う。本項では、CTAB 法とシリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini)、イオン交換樹脂タイプのキット (QIAGEN Genomic-Tip 20/G) を用いた精製法を記す。

なお DNA の抽出精製の際に用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で $17\text{ M}\Omega/\text{cm}$ まで精製した超純水を 121°C 、20 分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとす。

2.3.2.1. シリカゲル膜タイプキット法¹⁾

調製試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り²⁾、同遠沈管に予め 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 10 mL と RNase A 10 μL を加える。その後、試料塊が残らないようボルテックスミキサーで激しく混合し、 65°C で 15 分間加温する。その間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、AP2 緩衝液 3,250 μL を加え室温で 5 分間静置し、その後、室温下、3,000 x g の条件で 5 分間遠心する。遠心終了後、速やかに上清を別の遠沈管に移す。次いで分取した上清を QIAshredder spin column に負荷し、室温下、10,000 x g、の条件で 2 分間遠心する。得られた溶出液は新しいポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に移しておく。この際、1 回あたりの負荷量は 500 μL とし、得られた上清のうち 3 mL を負荷し終えるまで数回繰り返す。最終的に得られた溶出液に、溶出液量の 1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液³⁾ を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち 500 μL を mini spin column に負荷し、室温下、10,000 x g の条件で 1 分間遠心し溶出液を捨てる。次いで残りの溶解液のうち、さらに 500 μL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで、column に AW 緩衝液 500 μL を負荷し、室温下、10,000 x g の条件で 1 分間遠心する。得られた溶出液を捨て、同じ操作をもう 1 度繰り返す。溶出液を捨てた後、mini spin column を乾燥させるため、室温下、10,000 x g 以上の条件で 15 分間遠心する。乾燥処理後、mini spin column をキット付属の遠沈管に移し、予め 65°C に温めておいた水 50 μL を加え、5 分間静置した後、室温下、10,000 x g の条件で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう 1 度同様の溶出操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液 (計 100 μL) とする。

*1 本法は主に加工程度の低い検査対象検体(小麦粉、そば粉、落花生粉砕物、並びにそれらに準ずる加工食品)に適用が可能である。加工程度が高く、糖、並びに油脂成分含量の高い検査対象検体では DNA の精製度が低く、DNA 量としても十分な量が抽出されないことがあるため留意する。また、本法により DNA が抽出されない調製試料については、2.3.2.2. に示すイオン交換樹脂タイプキット法を用いた DNA 抽出を試みる。

*2 試料の調製、採取は 2.3.1. に記載の方法に従う。

*3 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液とエタノール (96-100 %) を 1 : 2 (V/V) の割合で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

2.3.2.2. イオン交換樹脂タイプキット法*

調製試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採る*²。同遠沈管に G2 緩衝液*³ 7.5 mL を加えてボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらに G2 緩衝液 7.5 mL、並びに α -アミラーゼ*⁴ (1 mg/mL) 200 μ L を加え再びボルテックスミキサーで混合する。混合処理後、37°C で 1 時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、Proteinase K*⁵ 100 μ L ならびに RNase A 20 μ L を加えボルテックスミキサーで混合し、その後、50°C で 2 時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。次いで、低温下 (4°C)、3,000 x g 以上の条件で 15 分間遠心する。遠心終了後得られる上清をポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に移す。移し終えた後、溶液中に浮遊する残存物を除くためさらに軽く遠心する。この遠心操作の間に QIAGEN Genomic-Tip 20/G を QBT 緩衝液*³ 1 mL を用いて平衡化しておく。遠心操作終了後の上清を平衡化済み QIAGEN Genomic-Tip 20/G に 2 mL ずつ数回に分けて負荷する。上清全量の負荷操作を終了した後、tip に QC 緩衝液*² 2 mL を負荷し、洗浄する。同様の洗浄操作を合計 3 回繰り返した後、tip を新しいポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に移し変える。洗浄操作終了後の tip に予め 50°C に温めておいた QF 緩衝液*³ 1 mL を加え DNA を溶出する。同 tip に対し、もう 1 度同様の溶出操作を行う。得られた計 2 mL の溶出液に対し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、低温下 (4°C)、10,000 x g 以上の条件で 15 分間遠心し、沈殿*⁶ を除かないよう注意を払いつつ上清のみを除く。上清を除いた後の遠沈管に 70 % エタノール 1 mL を加え、低温下 (4°C)、10,000 x g 以上の条件で 5 分間遠心する。上清を捨て、残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて 5 分間程度の真空乾燥処理を行う。このとき完全に乾燥しないように注意する。沈殿が乾燥したことを確認した後、水 100 μ L を加え、65°C、5 分間の条件での加温処理、ならびにピペティングにより DNA を溶解させ、DNA 試料原液とする。

*1 本法は主に加糖、油脂処理、加熱混合、発酵などの処理が施された加工程度の高い検査対象検体に適用が可能である。また、本法により DNA が抽出されない調製試料については、2.3.2.1. に示したシリカゲル膜タイプキット法を用いた DNA 抽出を試みる。

*2 試料の調製、採取は 2.3.1. に記載の方法に従う。

*3 G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

*4 SIGMA 社製 (Cat. No. A-6380)、または、同等の効力を持つものを用いる。

*5 QIAGEN 社製 (Cat. No. 19133)、または、同等の効力を持つものを用いる。

*6 この沈殿が抽出された DNA である。検査対象検体によっては DNA が極微量しか抽出されないため、目視する事が不可能な場合もあるが、遠沈管の底には沈殿があるということに注意を払いながら操作を行う。

2.3.2.3. CTAB 法^{*1}

調製試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、同遠沈管に CTAB 緩衝液^{*2} 15 mL を加え、ホモジナイザーを用いて混合する。遠沈管の縁ならびにホモジナイザーの先端部を洗浄するように CTAB 緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間加温する。加温処理後、溶液を攪拌し、均質となった溶液 600 μ L をマイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) に量り採る。次いで量り採った溶液に対し 500 μ L のフェノール/クロロホルム混合液^{*3} を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 x g、室温条件下で 15 分間遠心し、分離した水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この際、中間層にさわらないように注意する。分取した水層に対し、再び 500 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液^{*4} を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 x g、室温条件下で 15 分間遠心し、分離した水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。分取した溶液に等容量のイソプロピルアルコール (室温) を加え、転倒混和後、7,500 x g、室温条件下で 15 分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、500 μ L の 70 % エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 x g、室温条件下で 1 分間遠心する。遠心後、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて 2~3 分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないように注意する。50 μ L の TE 緩衝液^{*5} を加えてよく混和し、その後、室温で 15 分間静置する。この間、数回転倒混和し、沈殿が完全に溶解する事を促す。得られた溶解液に RNase A 5 μ L を加え、37°C で 30 分間加温する。加温処理後の溶液に 200 μ L の CTAB 緩衝液、次いで 250 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁処理後、7,500 x g、室温条件下で 15 分間遠心し、分離した水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時、中間層にさわらないように分取する。分取した溶液に 200 μ L のイソプロピルアルコールを加え、転倒混和する。転倒混和後、7,500 x g、室温条件下で 10 分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 μ L の 70 % エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 x g、室温条件下で 1 分間遠心する。遠心後、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて 2~3 分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないよう注意する。50 μ L の水を加えて混合した後、室温下に 15 分間静置する。この間、数回転倒混和する事で沈殿が溶解することを促す。完全に溶解したものを DNA 試料原液とする。

*1 シリカゲル膜タイプキット法ならびにイオン交換樹脂タイプキット法を実施し、その結果、2.3.2.4. に記載の方法にて定量を行い、充分量の DNA が抽出できない場合に実施する。

*2 CTAB緩衝液

ビーカーに、8 mL の0.5 mM EDTA (pH 8.0)、20 mL の1 M Tris / 塩酸 (pH 8.0)、ならびに56 mL の5 M NaCl水溶液を量り採り、混合した後、約150 mLとなるように水を加える。この溶液に対してセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 4 gを攪拌しながら加え、完全に溶解する。さらに水を加え全量を200 mLとし、オートクレーブで滅菌したものをCTAB緩衝液とする。

*3 フェノール/クロロホルム混合液

1 M Tris/塩酸 (pH 8.0) 飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコールを1:1 (v/v) の割合で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1 (v/v) の割合で混合したものをクロロホルム/イソアミルアルコール混合液とする。

*5 TE 緩衝液

各最終濃度が10 mM Tris/塩酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0) となるように水を用いて調製したものをTE 緩衝液とする。

2.3.2.4. DNA の精製度の確認と定量

DNA 試料原液 5 μ L を取り、TE 緩衝液 45 μ L を加えて 50 μ L とし、200-320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定する。この際 230 nm、260 nm 及び 280 nm の吸光度 (O. D. 230、O. D. 260 及び O. D. 280*) を記録する。次いで O. D. 260 の値の 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また O. D. 260 / O. D. 280 を計算し、この比が 1.2-2.5 であることを確認する。吸光度比が 1.2 に達しない場合は抽出をやり直す。

2.3.2. に記載のある 3 種の DNA 抽出法のうち、いずれかの抽出法を用いて DNA 抽出を行い、吸光度測定を行った結果、O. D. 260 の値として相当量の DNA の抽出が確認されない場合、また、上記条件を満たす DNA 試料原液の品質が確認されない場合には、他の抽出法を用いて抽出操作を行う。

なお、2.3.3.2. 項に示すように、原則として DNA 試料液は 20 ng/ μ L の濃度で調製するが、検査対象検体によっては DNA の抽出効率が悪く、20 ng/ μ L の濃度で調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、最も 20 ng/ μ L に近い濃度で調製し、DNA 試料液とする。また、O. D. 260 / O. D. 280 の吸光度比に関しては、1.2-2.5 の範囲であることを原則とするが、3 種の抽出法を行っても、上記条件を満たした DNA が抽出されない場合には、原則の O. D. 260 / O. D. 280 の吸光度比の範囲である 1.2-2.5 に最も近い値を示した DNA 試料原液を用いて DNA 試料溶液を調製し、PCR 増幅を行う。

* O. D. 230 値は糖、フェノール等の低分子化合物由来の吸光度であり、O. D. 260 / O. D. 230 を計算する。この比が 2.0 を下回る場合には、上記夾雑物の影響により PCR 反応がうまく行われない場合がある。O. D. 260 が DNA 由来の吸光度、O. D. 280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2.3.3. 定性 PCR 法

定性 PCR 法においては、抽出された DNA に含まれる目的塩基配列領域を、プライマーと

呼ばれるオリゴヌクレオチドを用いて polymerase chain reaction (PCR) * を行うことにより増幅し、その増幅産物を電気泳動法により分離、染色することで検出する。本法により、対象とする特定原材料を特異的に検知する事が可能であり、増幅産物の有無によって、検査対象検体中における特定原材料の有無を判定する。

*PCR では、鋳型 DNA が極微量でも存在していれば目的塩基配列領域が増幅され得る。従って、実際の実験操作、ならびに日頃の実験環境の保全にあたり、DNA (特に PCR 増幅産物) の混入に充分注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるため、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使用するチューブ、チップは使用する直前に 121℃、20 分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものを用い、使い捨てとする。またチップに関しては、滅菌済みフィルター付きチップを使い捨てで使用することも意図せざる DNA の混入防止に有効である。さらに、定性 PCR 法において用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ/cm まで精製した超純水を 121℃、20 分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

2.3.3.1. PCR 増幅

定性 PCR 法により検知が可能な特定原材料は落花生、小麦、そばの 3 種である。その各につき PCR 増幅の条件が異なる。2.3.3.2. から 2.3.3.4. に記載する PCR 増幅条件のうち、検知対象とする特定原材料種に即した PCR 条件を用いて検査を行う。また、各検査とも、1 調製試料より 2 点並行で抽出された DNA の各を規定濃度に調製した後、PCR 法の鋳型 DNA として供する。PCR 増幅は、まず、植物 DNA 検出用プライマー対*を用いて行い、その結果を 2.3.5. 項に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じた 2 度目の PCR 増幅を各特定原材料検出用プライマー対を用いて行う。

* 植物 DNA 検出用のプライマー対および増幅バンド長*は以下の通りである。

植物 DNA 検出用プライマー対

F-primer (CP03-5') : 5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'

R-primer (CP03-3') : 5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'

増幅バンド長

124 bp

*植物 DNA 検出用プライマー対は、広く植物 DNA を検知することを目的として設計されている。そのため、標的遺伝子には植物界に広く分布し、高度に保存されている遺伝子を選定しているが、完全に保存されているものではなく、植物間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため、検査対象検体によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意する。

2.3.3.2. 落花生の検知を目的とした PCR 増幅

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR 緩衝液*¹、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 μM 5' 及び 3' プライマー*²、及び 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ*³を含む液に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*⁴ 2.5 μL (DNA として 50 ng) を加え、全量を 25 μL にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*⁵ にセットする。反応条件は次の通りである。95℃に 10 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5 分

間、60℃ 0.5 分間、72℃ 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72℃ で 7 分間保った後、4℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。PCR 反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの並びに DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。検査手順としては、まず、植物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅を行い、その結果から PCR 増幅に必要とされる品質を備えた DNA が抽出されていることの確認を行う。次いで、2.3.5. に記載のある判定例に従い、落花生検出用プライマー対を用いた PCR 増幅を行う。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II (アプライドバイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*2 落花生検出用プライマー対および増幅バンド長は以下の通りである。

検出用プライマー対

F-primer (agg04-5') : 5'-CGA AGG AAA CCC CGC AAT AAA T-3'

R-primer (agg05-3') : 5'-CGA CGC TAT TTA CCT TGT TGA G-3'

増幅バンド長

95 bp

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliAq Gold DNA ポリメラーゼ (アプライドバイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4 原則として DNA 試料液は 20 ng/μL の濃度で調製することとするが、検査対象検体によっては DNA の抽出効率が悪く、それ以下の濃度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA 試料液とする。

*5 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9600、9700 (アプライドバイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.3.3.3. そばの検知を目的とした PCR 増幅

使用機器、反応液の調製法、ならびに PCR 反応条件ともに 2.3.3.2. 記載の落花生の検知を目的とした PCR 増幅に同じ。また、5' 及び 3' プライマー*、をそば検出用プライマー対に変更する点を除いて、反応液組成も同一。

*そば検出用プライマー対および増幅バンド長は以下の通りである。

検出用プライマー対

F-primer (FAG19-5') : 5'-AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3'

R-primer (FAG22-3') : 5'-CCT CCT GCC TCC CAT TCT TC-3'

増幅バンド長

127 bp

本プライマーについては㈱日清製粉グループ本社が特許出願中である。保健所、衛生試験所など官公庁分析機関を除く分析機関において、本プライマーを使用した受託試験を業と

して実施する場合は、別途協議が必要であり、下記に連絡すること。但し、本プライマーを試験研究のために製造、使用することについては一切制限はない。

(連絡先：㈱日清製粉グループ本社 研究推進グループ、Tel.049-267-3916、Fax.049-266-5166)

2.3.3.4. 小麦の検知を目的とした PCR 増幅

使用機器、反応液の調製法、ならびに PCR 反応条件ともに 2.3.3.2. 記載の落花生の検知を目的とした PCR 増幅に同じ。また、5' 及び 3' プライマー*、を小麦検出用プライマー対に変更する点を除いて、反応液組成も同一。

*小麦検出用プライマー対および増幅バンド長は以下の通りである。

検出用プライマー対

F-primer (Wtr01-5') : 5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'

R-primer (Wtr10-3') : 5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'

増幅バンド長

141 bp

本プライマーについては㈱日清製粉グループ本社が特許出願中である。保健所、衛生試験所など官公庁分析機関を除く分析機関において、本プライマーを使用した受託試験を業として実施する場合は、別途協議が必要であり、下記に連絡すること。但し、本プライマーを試験研究のために製造、使用することについては一切制限はない。

(連絡先：㈱日清製粉グループ本社 研究推進グループ、Tel.049-267-3916、Fax.049-266-5166)

2.3.4. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、DNA 増幅バンドを確認する。

2.3.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液*¹を加え、加熱してアガースを溶解する。次に 100 mL 当たり 5 μ L のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) *²を加え、ゲルが 50°C 前後まで冷えたらゲルメーカーにゲルを流し込み、十分に室温で冷やし固めてゲルを作製する*³。ゲルはすぐに使用する事が望ましいが、緩衝液に浸して数日間は保存することが可能である。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要がある。泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (2.0-4.0 %) を決める。(特定原材料の検知においては 2.5-4.0%濃度のアガロースゲルを使用するのが適当である)

*1 TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA となるように蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

*2 エチジウムブロミド

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いの際には必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

*3 前染色

ここでは、前染色法について述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.3.4.3.に述べる後染色法に従って、染色を行っても良い。(予想増幅バンド長の短い場合には、可視化を容易にするためにも後染色をすることが望ましい)

2.3.4.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ウェルへの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。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 2/3 程度まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.3.4.3. ゲルの染色（後染色）

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが十分に浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 20 分程度染色する。その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、20 分程度軽く振とうしながら脱染色を行う。

2.3.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動ならびに染色操作を完了したゲルをのせて紫外線 (312 nm) を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準マーカーと比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検出された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

*食品包装用ラップ^{La. Pp}
ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

2.3.5. 結果の判定

2.3.5.1. 落花生を対象とした検査結果の判定

1 調製試料より 2 点並行で抽出した DNA を規定濃度に調製した後、鋳型 DNA として用い、PCR 法を実施する。まず 1 度目の PCR 増幅は植物 DNA 検出用プライマー対を用いて実施し、その結果、DNA 試料液 2 点のいずれを用いた場合も共に 124 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合には(下記植物 DNA 検出用プライマー対判定例試料番号 1)、両試料液において PCR 増幅に必要な品質を有する DNA が抽出されたと判断し、次いで、落花生検出用プライマー対を用いた PCR 増幅を各試料液に対し実施する。落花生検出用プライマー対を用いた 2 度目の PCR 増幅の結果、DNA 試料液 2 点の両方あるいは、そのいずれかにおいて 95 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する(下記検出用プライマー対判定例試料番号 1 ならびに 2)。また、1 度目の植物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅の結果、DNA 試料液 2 点のうちいずれかにおいて PCR 増幅バンドが検出されなかった場合(下記植物 DNA 検出用プライマー対判定例試料番号 2 ならびに 3)には、当該試料液を用いた検査を中止し、PCR 増幅バンドが得られた試料液のみを鋳型として、検出用

プライマー対を用いた2度目のPCR増幅を実施する。その結果、95 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する。なお、下記植物DNA検出用プライマー対判定例試料番号4にあるように、植物DNA検出用プライマー対を用いた1度目のPCR増幅の結果において、DNA試料液2点ともにPCR増幅バンドが得られなかった場合には、PCR増幅に必要な品質を有するDNAが抽出されていなかったと判断し、2.3.2.に示されている先に用いたDNA抽出法以外の抽出法を試みる。2.3.2.に示されている3種のDNA抽出法を用いても、同様の結果が得られる場合には、当該検査対象検体からのDNA抽出が不可能であり、PCR法による検知不能と判断する。以下に判定例を示す。

植物DNA検出用プライマー対判定例

	試料番号	1	2	3	4
抽出1		+	+	-	-
抽出2		+	-	+	-
		事例1	事例2	事例3	

+：増幅バンド検出、-：増幅バンド非検出

事例1：検出用プライマー対を用いたPCR増幅をDNA試料液2点に対し行う。

事例2：増幅バンドの得られたDNA試料液のみに対して、検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

事例3：本法によるDNA抽出は困難であると判断し、DNA抽出法の最適化を図る。3種のDNA抽出法を試みてなお、同じ結果のみ得られる場合には、当該検査対象検体からのDNA抽出は不可能であり、PCR法による検知不能と判断する。

検出用プライマー対判定例

	試料番号	1	2	3
抽出1		+	+	-
抽出2		+	-	-
判定		陽性	陽性	陰性

+：増幅バンド検出、-：増幅バンド非検出

2.3.2.に記したとおり、検査対象検体に最適な抽出法を選択しなかった場合、量、質ともにPCRの鋳型となりうるDNAを抽出することが難しい。PCR法に供するDNA試料液は最適な抽出法にて抽出、精製され、原則として2.3.2.4.に示す基準を満たしているものとする。

2.3.5.2. そばを対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、そば検出用プライマー対を用いたレーンで127 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.3.5.3. 小麦を対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124bpのPCR増幅バンドが検出され、小麦検出用プライマー対を用いたレーンで141bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は

2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

(参考)

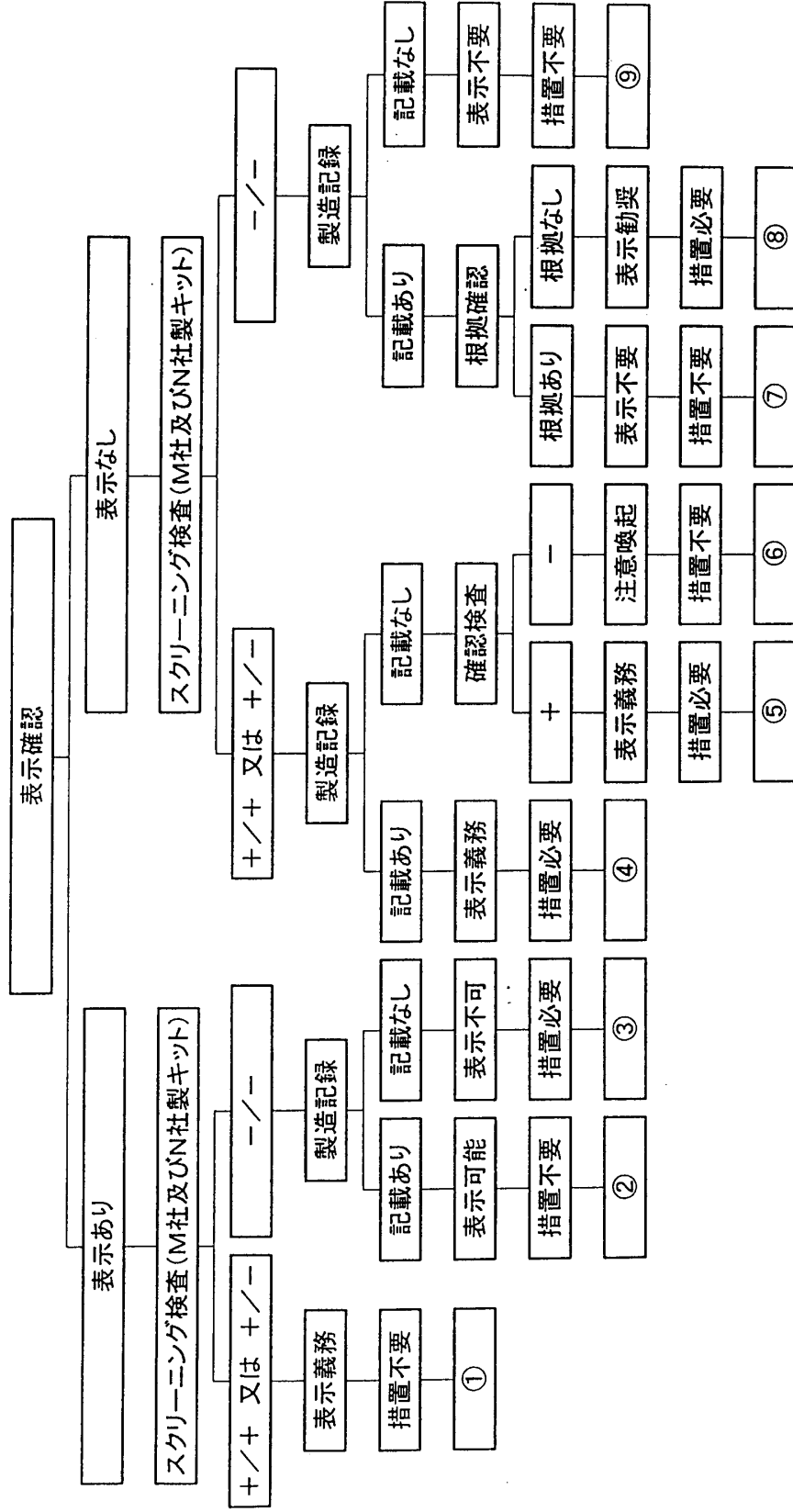
1. FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生)は、日本ハム株式会社中央研究所(〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3. Tel. 0298-47-7825 Fax. 0296-47-7824)から購入可能である。
2. モリナガ特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生) 及びモリナガウエスタンブロットキットは、株式会社森永生科学研究所(〒230-8504 横浜市鶴見区下末吉 2-1-1 Tel. 045-572-8247 Fax. 045-571-5042)から購入可能である。
3. そば及び小麦検出用プライマーはオリエンタル酵母工業㈱(〒526-0804 滋賀県長浜市加納町 50、オリエンタル酵母工業㈱ 長浜ライフサイエンスラボラトリー(長浜LSL) Tel.0749-64-2346、Fax.0749-63-7910)から購入可能である。

検査概要

同一調製試料を対象とし、複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生)、ならびに単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生)を用いて測定検査を実施する。それ以降の検査は、2種のELISA法を用いて実施された両結果に基づき、原則として別添2の「判断樹」に従って実施する。別添3の「判断樹について」も必ず参照すること。適宜、ウエスタンブロット法(卵、乳)、PCR法(小麦、そば、落花生)による確認検査を行う。

また現時点で判明している偽陽性及び偽陰性を示す可能性のある食品群を別添4の「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」に示す。全ての検査において、複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生)と単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生)の偽陽性、偽陰性の確認を別添4の「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」を参照して必ず行うこと。

(別添 2)



(別添3)

判断樹について

1 基本的注意事項

- (1) この判断樹は、健康被害防止の観点に立ち、現在の科学的知見に基づき、アレルギー症状を誘発する可能性のある食品の誤表示による危害をできる限り回避することを目的とし、構成されている。
- (2) 食品中の特定原材料の表示の監視は、原則としてこの判断樹に基づいて行う。
- (3) 本スクリーニング検査（M社及びN社のELISA法）には偽陽性又は偽陰性を示す食品が存在するので、その判断には十分注意する。すべての検査において、「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」を参照して偽陽性又は偽陰性の確認を必ず行う¹。
- (4) すべての検査において、製造記録の確認を必ず行う。（ただし、判断樹枝①の場合のみ省略可能。）

2 スクリーニング検査について

- (1) ELISAキットが2種類開発されている森永生科学製の卵キット（卵白アルブミン抗体及びオボムコイド抗体）、乳キット（カゼイン抗体及びβ-ラクトグロブリン抗体）では、それぞれオボアルブミン抗体、カゼイン抗体のキットを使用する²。
- (2) ELISA法で陽性とは、定量検査の結果、食品採取重量1gあたりの特定原材料由来のタンパク質含量が10μg以上のものをいう³。

3 製造記録の確認について

- (1) ここでいう「製造記録」とは、製造レシピ（配合表を含む。）、作業手順書、作業日報、検査成績書、ガントチャート（ライン毎の製造予定表）、品質（成分）保証書、商品カルテ（成分情報を含む。）、特定原材料を含まない旨の証明書等をいう。
- (2) 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示がないものについては、その根拠を必ず確認する。また、製造記録に記載がないにもかかわらず、表示があるものについては、その根拠を必ず確認する。
- (3) ここでいう「根拠」とは、実測値もしくは製造記録からの推計値をいう。
- (4) 製造記録が不明なものは、「記載なし」と同様に扱う。

4 確認検査について

- (1) 卵、乳の確認検査は、ウェスタンブロット法を使用する。ウェスタンブロット法で使用する抗体は、卵はオボアルブミン抗体及びオボムコイド抗体、乳はα-カゼイン抗体及びβ-ラクトグロブリン抗体を使用する。
- (2) 小麦、そば、落花生の確認検査は、PCR法を使用する。PCR法で特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。

5 違反発見時の措置

- (1) 特定原材料が含まれる食品に係る表示が訂正されるまでの間（判断樹枝⑧においては、製造記録に「表示なし」の根拠の記載がされるまでの間）は、当該食品等の販売を行わないよう指導する。
- (2) さらに、必要に応じて食品衛生法第22条若しくは第23条に基づく措置等を検討する。

6 枝①から⑨までの考え方

①	特定原材料の表示があり、2社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」の場合。
	<ul style="list-style-type: none">• この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではないが、省略は可能。• 確認検査は不要。• 適正表示と考えられ、行政措置は不要。
②	特定原材料の表示があり、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合。
	<ul style="list-style-type: none">• 製造記録の確認は必須。• 確認検査は不要。• 表示することは可能であり、行政措置は不要。• 食品中に含まれる特定原材料等の総タンパク量が、数$\mu\text{g/ml}$濃度レベル又は数$\mu\text{g/g}$含有レベルに満たない場合は、表示の必要性はないが、この場合に表示をするかしないかの判断は、製造者もしくは販売者によるものである。• スクリーニング検査結果の「-（マイナス）」が、特定原材料の総タンパク量が0（ゼロ）を意味しないことにご留意願いたい。
③	特定原材料の表示があり、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合。
	<ul style="list-style-type: none">• 製造記録の確認は必須。• 確認検査は不要。• 表示してはならず、表示を訂正させる。• 製造記録に記載がないにもかかわらず、表示した根拠があれば、今後、その根拠を製造記録に記載するように指導する。
④	特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合。

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示は必要であり、表示を訂正させる。

⑤	特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「+（プラス）」の場合。
---	---

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。
- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できており、表示が必要であり、表示を訂正させる。
- ただし、通常、原材料として扱われないものによるコンタミネーションが考えられる場合（例：「ソバをゆでた湯でうどんをゆでた場合のゆで湯」、「天ぷらやカツなどの揚げ油」等）は、欄外記載による注意喚起が望ましい。

⑥	特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「-（マイナス）」の場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。
- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できておらず、表示を訂正させることはしない。
- しかし、確認検査結果が「-（マイナス）」がスクリーニング検査結果の「+（プラス）」を完全に否定するものではないことに留意する必要がある。
- 原材料欄の外に注意喚起をすることは可能である。
- コンタミネーションの可能性が皆無の場合は、スクリーニング検査結果が偽陽性である可能性が高い。「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」に記載のない原材料を用いた食品について、このような結果が出た場合には、厚生労働省医薬局食品保健部企画課調査表示係までご報告願う。（様式自由）

⑦	特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がある場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示する義務はなく、適正表示である。

⑧	<p>特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がない場合。</p>
---	---

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示することが望ましい。スクリーニング検査結果でどちらも「－（マイナス）」であるため、表示を訂正させることはしないが、表示を勧奨する。
- しかし、製造記録に特定原材料の記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠については製造記録等へ必ず記載するように指導する。なお、スクリーニングキットの検査結果をもって表示しない根拠とする場合でも、自主的な検査結果は根拠として認めるが、行政検査における結果は表示をしない根拠として認めない。

⑨	<p>特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合。</p>
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考え、表示がなくても問題ない。

- ¹ 本リストについては、今後集積する知見に応じ、順次見直しを行う。
- ² オボムコイド抗体はわずかではあるが鶏肉に交差反応性が見られたこと、またカゼイン抗体はβ-ラクトグロブリン抗体に比べ熱に安定であること等による。
- ³ 平成13年10月29日に取りまとめられた厚生労働科学研究費補助金による食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班アレルギー表示検討会中間報告書において、「数μg/ml濃度レベル又は数μg/g含有レベル以上の特定原材料等の総タンパク質を含有する食品については表示が必要と考えられる。」とされたこと等による。

(別添4)

偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト

平成14年11月6日版

卵

	日本ハム製キット	森永生科学研究所製キット
偽陽性	鶏肉	鶏肉(オボムコイキットのみ、オボアルブミンキットは交差反応性なし)、いくら、すじこ
偽陰性	焼成卵殻カルシウム、卵殻膜タンパク質(未確認)、卵加水分解物、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品 焼き菓子(未確認)	卵黄のみ、もしくは卵黄のみで作られた加工食品(少なくとも一部は反応)、卵白加水分解物、卵殻膜蛋白、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品、焼き菓子(未確認)

乳

	日本ハム製キット	森永生科学研究所製キット
偽陽性	山羊乳、羊乳、牛肉	山羊乳、羊乳、いくら、すじこ
偽陰性	乳カルシウム、乳糖、乳加水分解物、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品 焼き菓子(未確認)	乳糖、乳カルシウム、カゼイン加水分解物、乳清、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品、焼き菓子(未確認)

小麦

	日本ハム製キット	森永生科学研究所製キット
偽陽性	ライ麦	ライ麦、いくら、すじこ
偽陰性	しょうゆ、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品 焼き菓子(未確認)	しょうゆ、容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食品製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品、小麦タンパク加水分解物、焼き菓子(未確認)

そば

	日本ハム製キット	森永生科学研究所製キット
偽陽性	蓼科植物	蓼科植物、いくら、すじこ、カカオ
偽陰性	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食品製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品

落花生

	日本ハム製キット	森永生科学研究所製キット
偽陽性	特になし	いくら、すじこ、カカオ
偽陰性	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品 焼き菓子(未確認)	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食品製品、鯨肉製品の缶詰及びレトルトパウチ製品 焼き菓子(未確認)

注1) 偽陽性を起こしやすい事例として、交差反応率が0.01%以上を示した食品を記載した。

注2) 偽陰性を起こしやすい事例として、回収率5%未満を示した食品を記載した。

注3) データの裏づけはないが、偽陰性を起こす可能性があるものを(未確認)と記載した。

附件十四

食品中過品原檢查方法

厚生勞動省醫藥局食品保健部長發函各地方行政首長之食品中過品原檢查方法
食發第 1106001 號 平成 14 年 11 月 6 日 (2002 年)

五項食品中特定原料的檢驗方法—雞蛋、牛奶、小麥、蕎麥及花生的檢驗方法

檢驗原則及檢體調製：

- 以一包裝食品為一單位。
- 取可食部份，棄不可食部份。
- 速食類食品（如泡麵），調味包內容物必須混入為檢體之一部分。
- 便當類，白飯（或麵條等）、所有配菜及調味包內容物，需先混合做為試驗檢體。
- 所有檢體需徹底均質化後，始進行檢驗。
- 使用 blender 進行均質化。
- 無論檢體是固態或液態，進行同一種過敏原的試驗時，使用等量（重量）的檢體。

五項食品中特定原料的檢驗方法—雞蛋、牛奶、小麥、蕎麥及花生的檢驗方法

ELISA 方法：利用檢測特定原料之蛋白質（screen 方法）

1. 日本ハム（株）製 ELISA KIT，「FASTKIT エライザシリーズ」---為複合抗體（以原料全體蛋白質製造抗體），分別針對雞蛋、牛奶、小麥、蕎麥及花生。
2. （株）森永生科學研究所製 ELISA KIT，「特定原材料測定キット」---為單一抗體（以原料中特定或單一蛋白質製造抗體），分別針對雞蛋 albumin、牛奶 casein、小麥 gliadin、蕎麥純化蛋白質及花生蛋白。

ELISA 三重複之結果 CV 值高於 20%須重新做 ELISA 試驗。

Western Blot 方法：萃取檢體中蛋白質，進行 polyacrylamide gel 電泳（SDS-PAGE）、轉印（PVDF membrane）及使用 polyclonal Ab 雜交偵測。

Western Blot 方法為對雞蛋或牛奶的 ELISA 結果為陽性的檢體進行確認檢驗之方法

1. （株）森永生科學研究所製，「モリナガ卵ウエスタンズロットキット」（針對雞蛋蛋白之 albumin 及 ovomucoid 兩種蛋白質）。
2. （株）森永生科學研究所製，「モリナガ牛乳トキット」（針對牛奶之 casein 及 β -lactoglobulin 兩種蛋白質）。

PCR 方法：對小麥、蕎麥或花生之 ELISA 結果為陽性的檢體進行確認檢驗之方法。

DNA 抽取前檢體前處理：以 blender 粉碎、均質化。粉碎、均質化困難者，先加等量（重量）水與檢體一起粉碎並均質化後，進行冷凍乾燥 24 小時，

附件十四

再將去水之檢體粉碎、均質化。

DNA 之抽取：

1. CTAB 法
2. QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (適用於加工程度低之檢體)
3. QIAGEN Genomic-Tip 20/G (適用於含糖量高、油脂處理、加熱混合及發酵等加工程度高之檢體)

Primer sets：

1. Plant specific primer set amplicon：124 bp
F-primer(CP03-5')：5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'
R-primer(CP03-3')：5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTC A-3'
2. Peanut specific primer set amplicon：96 bp
3. Soba specific primer set amplicon：127 bp
4. Wheat specific primer set amplicon：141 bp

除了 Plant specific primer set 其餘 primer sets 由 (株) 日清製粉グループ本社申請專利中，小麥和蕎麥的檢測 KIT 由オリエンタル酵母工業 (株) 販售。

PCR reaction：

1. Formula：

PCR Buffer ⁽¹⁾	1x PCR Buffer
dNTP	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
5' primer	0.2 μM
3' primer	0.2 μM
Taq DNA polymerase ⁽²⁾	0.625 units
DNA template	2.5 μL (20 ng/μL)
Total	25 μL

(1) 10x Buffer II (ABI)、(2) AmpliTaq Gold (ABI)

2. Program：95°C for 10 min,

95°C for 30 sec

60°C for 30 sec.

72°C for 30 sec

72°C for 7 min



40 cycles

附 件 十 五

アレルギー物質を含む食品の検査方法について

種 山 浩

Notified Detection Method for Allergic Substances

Hiroshi AKIYAMA

(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

食品衛生学雑誌 第44巻 第2号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 44, No. 2, April 2003

J. Food Hyg. Soc. Japan
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

アレルギー物質を含む食品の検査方法について

種 山 浩*

Notified Detection Method for Allergic Substances

Hiroschi AKIYAMA

(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

はじめに

近年、アレルギーを誘発する物質を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになり、表示による情報提供の必要性が高まった。しかし、これまでの表示方法では、消費者が食品中のアレルギー物質の有無を知るには不十分と考えられていた。平成12年7月に食品調査会表示特別部会が厚生省（現厚生労働省）に対してアレルギー物質を含む旨の表示を義務づけることが必要とする報告を行った。その後、平成13年3月の食品衛生法（施行規則および乳糖省令）の改定に至り、平成13年4月よりアレルギーを含む食品の表示が義務づけられた（平成14年4月より全面施行）^{1),2)}。厚生労働省では、発症数・重篤度から判断して、省令で定める特定原材料の5品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）については、すべての流通段階での表示を義務づけ、通知で定める特定原材料に準ずる19品目（あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン）については表示を推奨することとした。

これに伴い、平成13年度より厚生労働科学研究費補助金による「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班（略称：食品表示研究班）（主任研究者：丸井英二）」では「アレルギー表示検討会」と「特定原材料検出法検討会」を発足し研究を開始した。前者では、医療従事者、製造業者、販売業者、患者団体の代表者により、アレルギー表示の方法および問題点の抽出、分析に関して検討され^{3)~5)}、後者では、国立医薬品食品衛生研究所を中心に、大学、企業、検査機関および試験研究機関が協力して、省令で定めた特定原材料5品目の表示を監視する目的で、科学的検証としての検出法に関して検討された⁶⁾。平成14年11月6日には、特定原材料検出法検討会で開発・評価された検出法をもとに、都道府県知事、政令市市長、特別区区长に宛てて厚生労働省医薬局食品保健部長通知として「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（食発第1106001号）（以下通知検査法）が公表された*1。本通知検査法は、アレルギー表示における世界で初めて国が定めた標準法であり、この検査法によりア

ルギー表示制度が有効に機能すれば、世界的にも雛形として活用されることが期待されている。本講座では、この通知検査法に内容について解説する。

1. 通知検査法の確立の経緯

特定原材料の表示義務が決まった際に、アレルギー表示検討会では、表示を必要とする特定原材料の混入レベルをどうするかが重要な問題であった。特定原材料表示の“ゼロ”規制は、食品の製造工場内で設備を共有しているのが一般的であることや、製造ラインを洗浄したとしても、この程度まで洗浄すればよいかという問題点が発生し、事実上不可能であると考えられた⁷⁾。そのため、アレルギー表示検討会の医療従事者により、アレルギー発症のリスクの見地から考えて、表示を必要とする“閾値”が検討された。その後、アレルギー表示検討会の中間および最終報告⁸⁾において、アレルギー症状を誘発する抗原量に関して、総タンパク量として一般的にはmg/mL濃度レベルでは確実に誘発しうるといえるが、 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベルではアレルギーの誘発には個人差があり、 ng/mL 濃度レベルではほぼ誘発しないであろうと判断された。これらのことから、特定原材料などの総タンパク質量として数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベルまたは数 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベル以上含有する食品には表示が必要であり、同様に数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベルまたは数 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベルに満たない場合は、必ずしも表示は必要としないとされた。以上の結果より、表示の必要性を判断する上で、数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベルまたは数 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベル以下まで検出可能な検出法が不可欠とされた。これがいわゆる“微量の定義”である。

この報告を受け、特定原材料検出法検討会では、表示を

*1 「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」食発第1106001号

通知の表書 (<http://www.whoarei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/141121-a.pdf>)

別添1 (<http://www.whoarei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/141121-b.pdf>)

別添2 (<http://www.whoarei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/141121-c.pdf>)

別添3 (<http://www.whoarei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/141121-d.pdf>)

別添4 (<http://www.whoarei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/141121-e.pdf>)

* 国立医薬品食品衛生研究所：〒158-8501 東京都世田谷区上野沢1-18-1

する必要があるかを判断するためには、上記のレベルまで特定原材料タンパク質を十分に“定量”できる検出法を確立することが必要であると考えられた。

特定原材料タンパク質を簡易で迅速に測定する手法としては、酵素免疫測定法（ELISA法）が一般的に有効である。しかし、このアレルギー表示制度は、市場に流通しているあらゆる食品に適用されるため、すべての食品の特定原材料タンパク質を正確に測定しようとする際には、様々な問題点を解決する必要があった。第一に、様々な加工条件により食品中に含有するタンパク質は変性し、3次構造が変化することは当然のことであり、ELISA法で用いる抗体と測定対象である食品中タンパク質との反応性が加工条件によって違う。第二に標準物質を一定にしないと、常に統一した結果が得られず、同一食品の特定原材料タンパク質を測定しても、検査ごとに違った測定値を示してしまう可能性がある。第三に抗体の種類をポリクロナール抗体か、モノクロナール抗体のどちらが有効であるか、また特定原材料タンパク質を全体として認識した方が良いか、単一あるいは精製したものを認識した方が良いかといった選択をする必要が生じた。特定原材料検出法検討会では、これら問題を迅速に効率よく解決するために、検出法開発ワーキンググループと評価ワーキンググループに分け、検討することにした。

検出法開発ワーキンググループでは、さらにELISA法グループ、ウエスタンブロット法グループ、PCR法グループ、イムノクロマト法グループに分かれ開発し、そこで開発された方法を評価グループで評価し、問題点を抽出し、解決することを検討してきた。同時に加工により変性された特定原材料タンパク質に対する動物抗体の応答性とヒト血清IgE抗体との相関性の研究や、実際に特定原材料タンパク質を添加した原材料からモデル的に加工食品を

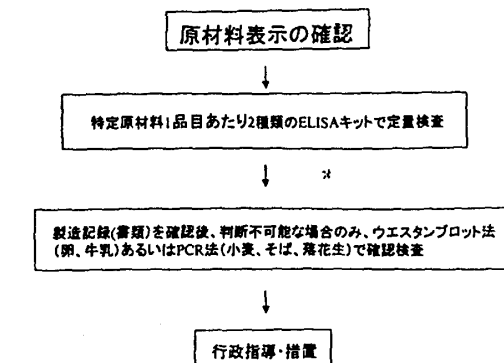


図1. 通知検査法の概要

作製し、開発された方法により、どの程度回収されるかといった大規模な研究も行った。

このような検出法の開発の検討に加え、その検出法を用いてどのように表示を指導するかといった行政サイドの監視方法も検討され、下記に示す通知検査法が確立されたのである。

しかし、通知検査法に示された検出法を用いても、特定原材料の総タンパク質含量の真の値を測定することや、あらゆる食品に適用することは不可能であるが、アレルギー発症の最小閾値である“微量の定義”とかけ離れた値を示さないレベルの検出は可能であると判断し、表示をできるだけ適正にするための検査法として通知されたと考えられる。

II. 通知検査法の概要

通知検査法の概要を図1に示す。まず、別添1として特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）の検査方法が

表1. 各ELISA法の特徴

ELISA法	特定原材料の複数タンパク質を検出する系	特定原材料の特異的な単一あるいは精製タンパク質を検出する系
キットの種類	日本ハム(株)製FASTKIT エライザシリーズ	(株)森永生科学研究所製特定原材料測定キット
測定対象タンパク質		
卵	卵タンパク質	オボアルブミン、オボムコイド
牛乳	牛乳タンパク質	α カゼイン、 β -ラクトグロブリン
小麦	小麦タンパク質	グリアジン
そば	そばタンパク質	主要タンパク質複合体
落花生	落花生タンパク質	Ara h2を含むタンパク質複合体
各ELISA法の特徴		
長所	卵白や卵黄を分離して使用しているような加工食品にも可能なため適用食品が広い	特異的なタンパク質を検出するため特異性に優れている
短所	非特異的検出が起こる可能性がある(偽陽性の可能性)	高変性タンパク質含有加工食品に検出しにくい可能性がある(偽陰性の可能性)

示されている。同一調製試料を対象として、特定原材料中の複数のタンパク質を検出する複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 ELISA キット (商品名; FASTKIT™ エライザシリーズ*2) (卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生)^{8), 9)}と、特定のタンパク質を検出する単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製 ELISA キット (商品名; モリナガ特定原材料測定キット*3) (卵白アルブミン, カゼイン, 小麦グリアジン, そば, 落花生)^{10), 11)}を用いて検査を実施し、定量スクリーニングを行うこととしている。両社 ELISA 法とも特定原材料検出法検討会で開発協力および評価を行った。両社 ELISA 法の特徴を表1に示す。両法とも、優れた長所を持っており、お互いの欠点を相補う関係にある。したがって、特定原材料検出法検討会では、両法とも重要であると考え、アレルギー発症のリスクを回避するためには、両法により二重チェックを行うことが最善であると判断した。

その後、両法で得られた結果と製造記録の確認に基づいて、表示が適正か判断される (別添2および別添3)。別添2の判断樹を図2に示す。しかし、ELISA 法は交差反応性がある場合、偽陽性が生じる可能性がある。そのため両法の結果と製造記録からでは判断が不可能な場合は、ELISA 法よりも特異性の高い方法として、同じく特定原材料検出法検討会で開発および評価されたウエスタンブロット法 (卵, 乳)*4、または PCR 法 (小麦, そば, 落花生)*5、*6による確認検査を行うことになっている (別添1)。

しかし、ある食品においては、抗体の交差反応性や抗体のタンパク質との反応性の変化のため、本来の測定値より、

高く測定されたり (偽陽性)、低く測定されたりすること (偽陰性) が明らかとなっている。そこで別添4として、現時点で判明している偽陽性および偽陰性を示す可能性のある食品群が「偽陽性または偽陰性を示す食品リスト」として示されている。すべての検査において、両 ELISA キットによる結果が偽陽性や偽陰性でないかを、そのリストを参照にして確認することにしてある。別添4を表2に示す。

III. 特定原材料 (卵, 乳, 小麦, そば, 落花生) の検査方法 (別添1)

別添1として示された検査方法では、第1項として検査全体における検査原則および試料調製法が示されており、第2項では、2.1にELISA法による検査方法、2.2にウエスタンブロット法による検査方法、2.3にPCR法による検査方法が示されている。以下順に解説する。

1. 検査原則および試料調製法

第1項では、検査方法の精度を維持するための原則と; 検査に供する前に均質化するための試料調製法が示されている。検査原則は、①検査対象体は、一包装を一単位とすること、②可食部を試料とすること、③検査前に均質化操作を行うこと、④試料は固体や液体の性状にかかわらず、重量測定にて一定量を採取すること、などの検査全般の統一した決定事項や、精度管理をするための注意事項について記載されている。試料調製法は、試料の全量を粉砕器あるいはフードカッターなどで十分に破砕し、均質混和して調製試料とするとされている。

ただし、注としてインスタント食品 (カップ麺, カップ

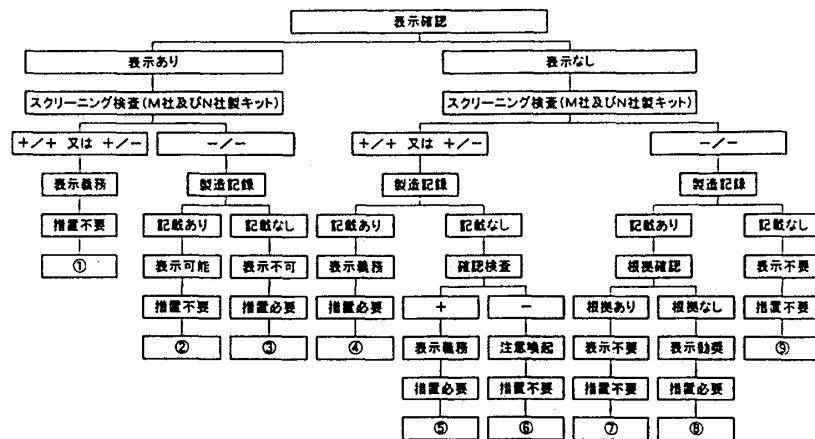


図2. 判断樹 (別添2)

*2 FASTKIT™ エライザシリーズ (卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生) は、日本ハム(株)中央研究所 (Tel. 0298-47-7825, Fax. 0296-47-7824) から購入可能である。

*3 モリナガ特定原材料測定キット (卵白アルブミン, カゼイン, 小麦グリアジン, そば, 落花生) は、(株)森永生科学研究所 (Tel. 045-572-8247, Fax. 045-571-5042) から購入可能である。

*4 和山 浩, 他: 日本食品衛生学会第 84 回学術講演会要旨集, p. 107 (2002).

*5 山川宏人, 他: 日本食品衛生学会第 84 回学術講演会講演要旨集, p. 104 (2002).

*6 渡邊敬浩, 他: 日本食品衛生学会第 83 回学術講演会講演要旨集, p. 38 (2002).

表 2. 偽陽性または偽陰性を示す食品リスト (別添 4)

卵		日本ハム(株)製キット	(株)森永生科学研究所製キット
偽陽性	鶏肉		鶏肉 (ナボムコイキットのみ, オボアルブミンキットは交差反応性なし), いくら, すじこ
偽陰性	卵殻膜タンパク質 (未確認), 卵加水分解物, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)		卵黄のみ, もしくは卵黄のみで作られた加工食品 (少なくとも一部は反応), 卵白加水分解物, 卵殻膜タンパク質, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)
乳		日本ハム(株)製キット	(株)森永生科学研究所製キット
偽陽性	山羊乳, 羊乳, 牛肉		山羊乳, 羊乳, いくら, すじこ
偽陰性	乳カルシウム, 乳糖, 乳加水分解物, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)		乳糖, 乳カルシウム, カゼイン加水分解物, 乳清, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)
小麦		日本ハム(株)製キット	(株)森永生科学研究所製キット
偽陽性	ライ麦		ライ麦, いくら, すじこ
偽陰性	しょうゆ, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)		しょうゆ, 容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 小麦タンパク加水分解物, 焼き菓子 (未確認)
そば		日本ハム(株)製キット	(株)森永生科学研究所製キット
偽陽性	蓼科植物		蓼科植物, いくら, すじこ, カカオ
偽陰性	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品		容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品
落花生		日本ハム(株)製キット	(株)森永生科学研究所製キット
偽陽性	特になし		いくら, すじこ, カカオ
偽陰性	容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)		容器包装詰加圧加熱殺菌食品あるいは食肉製品, 鯨肉製品の缶詰およびレトルトパウチ製品, 焼き菓子 (未確認)

注 1) 偽陽性を起こしやすい事例として, 交差反応率が 0.01% 以上を示した食品を記載した。

注 2) 偽陰性を起こしやすい事例として, 回収率 5% 未満を示した食品を記載した。

注 3) データの裏づけはないが, 偽陰性を起こす可能性があるものを (未確認) と記載した。

スープなど) のスープ, かやくおよび麺などに小分けされ包装されているものが含まれているものや, 幕の内弁当などの組み合わせ食品では, 全体を一包装単位として考え, すべてを混合し, 次いで均質化操作を行った後に調製試料とするとされている。

2. ELISA 法による検査方法

ELISA 法を開発する上で, 抗体をポリクロナール抗体にするかモノクロナール抗体にするかを選択する必要があった。抗体は同一タンパクの認識部位が異なる抗体の集団であるポリクロナール抗体か, 同一タンパクの同一部位を認識する抗体の集団であるモノクロナール抗体に分類されるが, 特定原材料検出法検討会では, 加工によるタンパク質の変性に対する適応性を考慮し, ポリクロナール抗体

の方が有効であると判断された。

次に特定原材料の複数タンパク質を検出するか, 特異的な特定のタンパク質を検出するかが議論になった。この議論に関しては, 実際に評価しないと判断できないと結論になり, 特定原材料検出法検討会では, 複合抗原を認識する抗体を利用した ELISA 法 (日本ハム(株)製 ELISA キット) と単一あるいは精製抗原を認識する抗体を利用した ELISA 法 ((株)森永生科学研究所製 ELISA キット) の 2 種類の方法が開発および評価された。しかし, 両検出法とも優れた長所を有しており, またお互いの検出系の欠点を相補う関係にあるために, どちらかの方法に絞ることに決着がつかず, 両検出系により一次スクリーニングをすることとなった。

通知検査法の ELISA 法による検査方法では、複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 ELISA キットを用いた実験操作と、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製 ELISA キットを用いた実験操作が示されている。なお、後者のキットを用いた検査においては、卵を検知対象とする場合には卵白アルブミンキット、乳を検知対象とする場合にはカゼインキットを用いて測定を行うことになっている。これは両キットが、同社で同様に市販されている卵のオボムコイドキットや、乳の β -ラクトグロブリンキットに比べ、加工食品への適用範囲が比較的広いためである。ただし卵の場合、卵白アルブミンおよびオボムコイドは、両方とも卵白の特異的タンパク質であり、卵黄の検出には適応できない。そのため卵白と卵黄を完全に分離されて食品に使用されている場合、卵黄が含まれている食品では、偽陰性となるので注意する必要がある。両社 ELISA キットとも原理はサンドイッチ ELISA 法に基づいている。日本ハム(株)製 ELISA キットの操作フローチャートを図 3 に、(株)森永生科学研究所製 ELISA キットの操作フローチャートを図 4 に示す。

抽出操作は、両 ELISA キットともに試料を 2 g 採取し、38 mL の抽出緩衝液あるいは検体希釈液を加え、ホモジナイザーなどによりかくはんすることになっている。この際のホモジナイザーとしては、ミルサー IFN-700G (岩谷産業(株)製)あるいはラボミルサー LM-2 (大阪ケミカル(株)製)が、刃とカップが洗浄できるため、便利である。また、エースホモジナイザー AM-3-50 ((株)日本精機製作所製)では、ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) で使用できるため、遠心操作をする際に容器内容物を移し替える必要がなく、かくはん後、そのまま遠心操作が可能である。

また両 ELISA キットとも、ホモジナイザーを用いてかくはん操作を行う際に、かくはんした後、溶液の pH を確認し、必要であれば中性付近 (pH 6.0~8.0) となるように調整することになっている。その後、同様のかくはん操作を 2 回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う。

両 ELISA キットとも、4 係数ロジスティック解析より得られた検量線から各測定溶液の特定原材料由来のタンバ

ク質濃度を算出し、得られた値に希釈倍率を乗じて食品採取重量当たりの特定原材料由来のタンパク質量を算出する。食品採取重量 1 g 当たりの特定原材料由来のタンパク質含量が 10 μ g 以上の試料については、微量を超える特定原材料が混入している可能性があるものと判断することとなっている。

3. ウェスタンブロット法による検査方法

ウェスタンブロット法は、試料中のタンパク質を電気泳動し、転写膜に転写後、特定原材料由来のタンパク質に対する特異的な抗体を用いて検出する定性試験法である。通知検査法では、卵、乳についての ELISA 法陽性判定の確認試験法となっている。

上記 ELISA 法に関しては、定量試験法であり測定結果が数値として算出されるが、交差反応性がある場合、数値からは特異的な反応により算出したものであるかを確認することができない。また卵および乳に関しては、鶏卵と鶏肉の遺伝子および牛乳と牛肉の遺伝子は同一であり、それらが混在している加工食品には下記に示す特異的 DNA を検出する方法 (PCR 法) は確認方法とはなりえない。そのため、特定原材料検出法検討会では、ELISA 法と同じく抗原抗体反応によりタンパク質を検出する方法であるが、分子量的な情報が得られるウェスタンブロット法が確認試験法として有効であると判断された。

通知検査法のウェスタンブロット法による検査方法は、電気泳動後の転写膜への転写方法としては、検査を迅速に

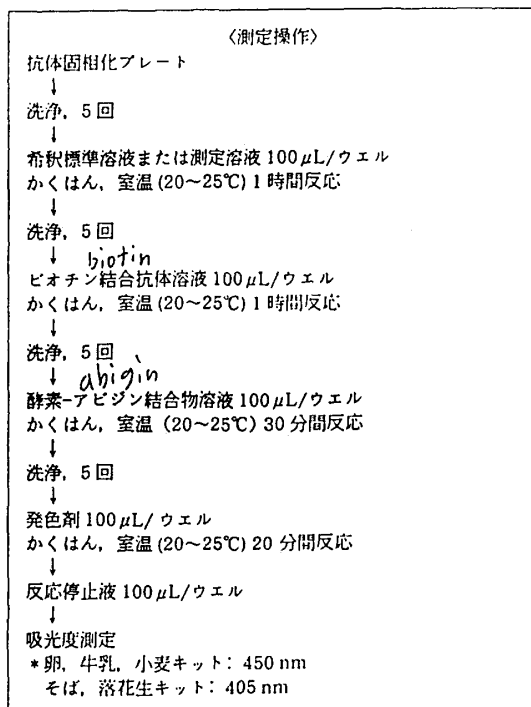
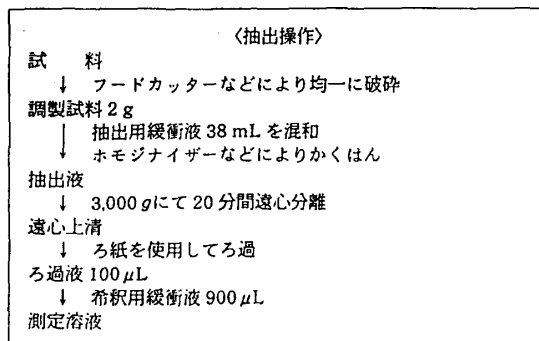


図 3. 日本ハム(株)製 ELISA キットの操作フローチャート

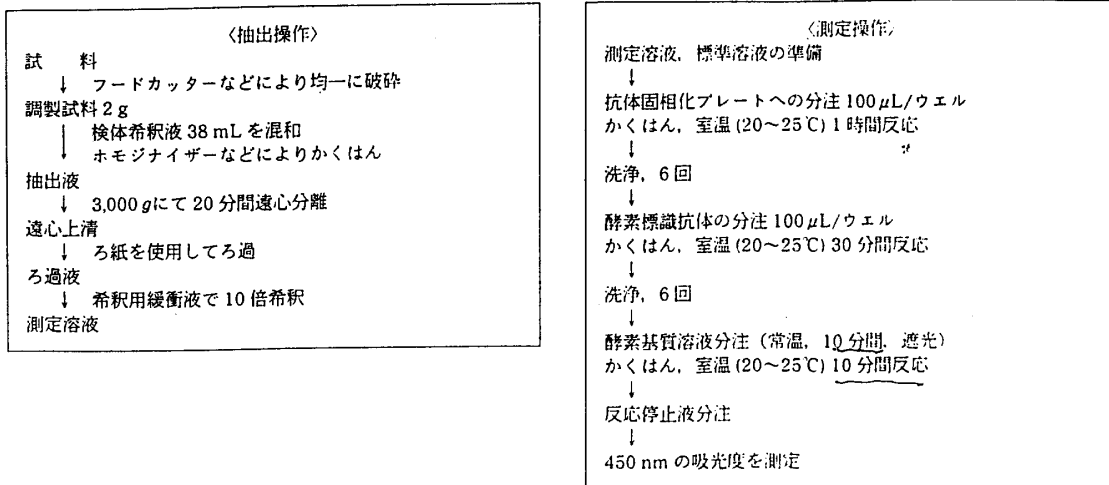


図4. (株)森永生科学研究所製 ELISA キットの操作フローチャート

するためにセミドライ方式を採用している。抗体としては、上記 ELISA 法の結果を確認するために、ELISA と同じポリクロナール抗体を採用した。検出法としては化学発光法か染色法の両法を検討した結果、再現性・頑健性を考慮して、染色法を採用した。

抗体および標準溶液は、卵タンパク質の検出の際は、(株)森永生科学研究所製卵ウエスタンブロットキット(商品名: モリナガ卵ウエスタンブロットキット*) (卵白アルブミンおよびオボムコイド)、乳タンパク質の検出の際は(株)森永生科学研究所製牛乳ウエスタンブロットキット(商品名: モリナガ牛乳ウエスタンブロットキット*) (カゼインおよびβ-ラクトグロブリン)を用いることとされている。ウエスタンブロット法の操作フローチャートを図5に示す。

結果の判定は、各特定原材料由来のタンパク質の分子量(SDS-PAGEにおける見かけ上の分子量: 卵白アルブミン 50,000 Da, オボムコイド 38,000 Da, カゼイン 33,000~35,000 Da, β-ラクトグロブリン 18,400 Da)付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性と判定する。卵タンパク質測定の際は、卵白アルブミンあるいはオボムコイド、乳タンパク質測定の際はカゼインあるいはβ-ラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いて陽性の場合、各特定原材料(卵、乳)が“微量”を超えて含有されると判断することとしている。ただし、卵の場合、卵白アルブミンおよびオボムコイドは、卵白の特異的タンパク質であり、卵黄の検出には適応できないので注意する必要がある。

4. PCR 法による検査方法

PCR 法は、試料中の DNA を精製し、特異的 DNA 領

*1 モリナガ卵ウエスタンブロットキットおよびモリナガ牛乳ウエスタンブロットキットは、(株)森永生科学研究所から購入可能である。

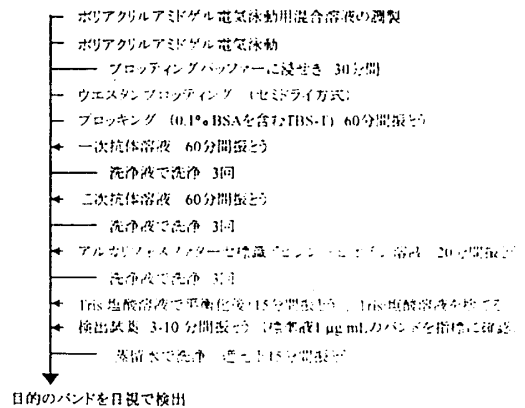


図5. ウエスタンブロット法の操作フローチャート

域を Polymer Chain Reaction (PCR) 反応により増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離し、DNA 増幅バンドを検出する定性試験法である^{14,15)}。通知検査法では、小麦、そば、落花生についての ELISA 法陽性判定の確認試験法となっている。

動物ポリクロナール抗体を用いてタンパク質を測定する方法は、どんなに特異性を高めたとしても、植物性食品では近縁種原材料との交差反応性は免れない。とりわけ、植物である小麦、そば、落花生に関しては交差反応性を示す近縁植物が多い。しかし、これら植物食品は各特異的な遺伝子情報を探し、その特異的遺伝子領域を PCR 反応により短時間に増殖して検出することが可能である。また PCR 法は加工品への適用が、ある程度可能であることから最終製品の検査には有効な手段と考えられる。その一方、操作が煩雑で特殊な機器を必要とするなどの欠点がある。

DNA の抽出には、「組換え DNA 技術応用食品の検査法」の厚生労働省通知法¹⁴⁾の経験に基づいて、シリカ膜

カラムキット, イオン交換カラムキットの改良法, CTAB法のいずれかの方法を用いて行うことになっている。原材料や加工程度の低い検査対象検体では, シリカ膜カラムキットを用いて十分にDNAが抽出可能であると考えられる。しかし, 加工程度の高い検査対象検体では, イオン交換カラムキットの改良法あるいはCTAB法により, DNAを抽出することが有効である。この場合, 第一の抽出法としては, イオン交換カラムキットの改良法を使用し, もしDNA抽出が困難な場合は, CTAB法を検討することを推奨する。

PCR法を開発する上で, 重要な点はプライマーの設計であった。各特定原材料のみに存在する特異的な遺伝子をターゲットとし, 加工食品にも応用可能であるように, できるだけ増幅断片長が短くなるようにプライマーを設計することが必要である。PCRのターゲット遺伝子としては, そばは特異アレルゲンタンパク質遺伝子, 小麦はtriticin precursor 遺伝子, 落花生はアグルチニン前駆体遺伝子を選択した。加工食品においては150 bp以下のDNAサイズが残存していることが多いため, PCR産物の長さが100 bp程度になるように各プライマーセットを設計した。

そばおよび小麦の検出プライマーについては, 小麦, デュラム小麦, ライ麦, 大麦, オオツ麦, そば, 米, トウモロコシ, 大豆, 粟, 菜種などを用いて特異性を確認した。落花生検出プライマーの特異性の確認は, 小麦, 落花生, アーモンド, ピスタチオ, ヘーゼルナッツ, 大豆などを用いて行った。その結果, 各プライマーセットは, 非常に高い特異性を有していることが確認された。

また, PCR増幅が問題なく反応しているかを確認する

ために, 植物に広く保存されている葉緑体DNA領域を増幅する植物DNA検出用プライマー対も設計した。この植物DNA検出用プライマー対を用いて, 試料から抽出したDNAがPCR増幅が可能なレベルまで精製されていることを確認した後に, 各特定原材料検出用プライマー対**を用いて試験することになっている。なお, 葉緑体DNA領域は植物界に広く分布し, 高度に保存されていると考えられるが, 完全に保存されているものではなく, 植物間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため, 検体によっては, 得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意する必要がある。

PCR法のDNA抽出のフローチャートを図6に, PCR反応液組成を表3に示す。PCR反応条件は, 95°Cに10分間保ち反応を開始させた後, 95°C 0.5分間, 60°C 0.5分間, 72°C 0.5分間を1サイクルとして, 40サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72°Cで7分間保った後, 4°Cで保存し, 得られた反応液をPCR増幅反応液とする。

結果の判定について, 落花生を対象とした場合の例を示す。1調製試料より2点並行で抽出したDNA溶液を規定濃度に調製した後, 鋳型DNAとして用い, PCRを実施する。2点並行のDNAに対し抽出液植物DNA検出用プライマー対を用いたPCR後の増幅バンドの検出結果により, 3つの事例が考えられる。

事例1: 検出用プライマー対を用いたPCRをDNA試料液2点に対し行う。

1度目の増幅は植物DNA検出用プライマー対を用いて実施し, その結果, DNA試料液2点のいずれを用いた場合も共に124 bpの増幅バンドが検出された場合(表4植物DNA検出用プライマー対判定例の試料番号1)には, 次いで, 落花生検出用プライマー対を用いた増幅を各試料

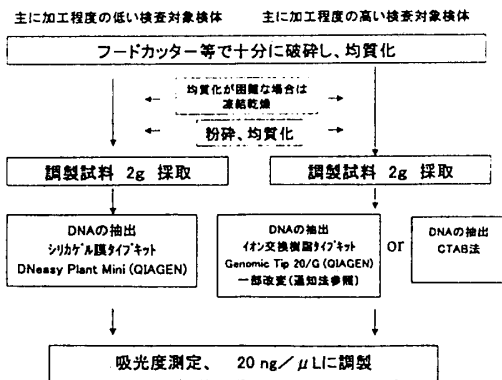


図6. DNA抽出のフローチャート

表3. PCR反応液組成

10×PCR Buffer II	×1
dNTPs	0.2 mM each
MgCl ₂	1.5 mM
Primer	0.2 μM each
AmpliTaq Gold	0.625 unit/reaction
DNA template (20 ng/μL)	2.5 μL/reaction
Total	25 μL

表4. 植物DNA検出用プライマー対判定例

試料番号	1	2	3	4
抽出1	+	-	-	-
抽出2	-	-	-	-
	事例1	事例2	事例3	

+: 増幅バンド検出; -: 増幅バンド非検出

表5. 検出用プライマー対判定例

試料番号	1	2	3
抽出1	-	+	-
抽出2	+	-	-
判定	陽性	陽性	陰性

+: 増幅バンド検出; -: 増幅バンド非検出

** そばおよび小麦検出用プライマー対 (商品名: アレルゲンチェッカー「小麦」および「そば」) はオリエンタル酵母工業(株) 長浜ライフサイエンスラボラトリー (長浜LSL) (Tel. 07-49-64-2346, Fax. 07-49-63-7910) から購入可能である。

液に対し実施する。2度目の増幅の結果、DNA 試料液 2 点の両方またはいずれかにおいて 95 bp の増幅バンドが検出された場合に、本検体は落花生陽性と判定する（表 5 検出用プライマー対判定例の試料番号 1 ならびに 2）。

事例 2: 増幅バンドの得られた DNA 試料液のみに対して、検出用プライマー対を用いた PCR を行う。

1 度目の植物 DNA 検出用プライマー対を用いた増幅の結果、DNA 試料液 2 点のうちいずれかにおいて増幅バンドが検出されなかった場合（表 4 の試料番号 2 と 3）には、増幅バンドが得られた試料液のみを鋳型として、落花生検出用プライマー対を用いた 2 度目の増幅を実施する。その結果、95 bp の増幅バンドが検出された場合、本検体は落花生陽性と判定することにしている。

事例 3: 本法による DNA 抽出は困難であると判断し、DNA 抽出法の最適化を図る。

植物 DNA 検出用プライマー対を用いた 1 度目の増幅の結果において、DNA 試料液 2 点ともに増幅バンドが得られなかった場合（表 4 の試料番号 4）には、用いた DNA 抽出法以外の抽出法を試みる。3 種の DNA 抽出法（CTAB 法、シリカ膜タイプキットおよびイオン交換樹脂タイプキット）を用いても、同様の結果が得られる場合には、当検体からの DNA 抽出が不可能であり、PCR 法による検知不能と判断することになっている。

そばおよび小麦の場合の判定の手順、判定例、ならびに注意事項は、上記の落花生の場合と同様である。

IV. 判断樹の解説（別添 2 および別添 3）

通知検査法では、上記概要に従って検査を行い、その検査結果による判断は、同時に添付された判断樹によって行うこととなっている（図 2; 別添 2）。この判断樹は、健康被害防止の観点に立ち、現在の科学的知見に基づき、食品の誤表示によるアレルギー症状の危害をできる限り回避することを目的とし、構成されている。（別添 2）「判断樹」にはその解説が記載されているが、両者が添付された理由の 1 つとして、検査の効率性および経済性が挙げられる。限られた人員、時間そして予算を用い、いかに効率的かつ経済的に表示の監視を行うかの 1 つの方法を示したものであると思われる。ただし、通知の表書きに「なお、アレルギー物質を含む食品の検査方法については、その検査技術の進歩に対応し、順次見直しを行っていくこととしているので、ご留意願いたい。」との記載があることから想像できるように、今回の通知に指定された検査方法は完全なものではなく、これら検査方法には検出能の限界が存在するために、（別添 2）「判断樹」および（別添 3）「判断樹について」に沿って監視を行うことができない食品が存在するのも事実であり、その場合は適宜判断することが望まれる。なお、「製造記録」とは、製造レシピ（配合表を含む）、作業手順書、作業日報、検査成績書、ガ

ントチャート（ラインごとの製造予定表）、品質（成分）保証書、商品カルテ（成分情報を含む）、特定原材料を含まない旨の証明書などをいう。

（別添 3）「判断樹について」および（別添 4）「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」において、「偽陽性」と「偽陰性」という言葉が示されている。「偽陽性」とは、食品採取材料 1 g 当たりの特定原材料由来のタンパク質含有量が 10 μ g 未満であるにもかかわらず、ELISA 法で陽性の結果「+（プラス）」が出る場合をいう。また、「偽陰性」とは、食品採取材料 1 g 当たりの特定原材料由来のタンパク質含有量が 10 μ g 以上含まれているにもかかわらず、ELISA 法で陰性の結果「-（マイナス）」が出る場合をいう。例を示すと、別添 4（表 2）の小麦の偽陽性欄に両社キットにおいて「ライ麦」と書かれている。これは両社キットを用いてライ麦あるいはライ麦を含むような食品を測定した場合、その食品の小麦の総タンパク含量が 10 μ g/g 未満であっても、キットの小麦に対する抗体は、ライ麦と交差反応性を示すことから、その測定値は 10 μ g/g 以上を示す可能性があることを示している。逆に乳の偽陰性欄に両社キットにおいて「焼き菓子」と書かれている。これは両社キットを用いて焼き菓子を測定した場合、その食品の牛乳の総タンパク含量が 10 μ g/g 以上であっても、焼き菓子は強い条件で加工が施されているため、牛乳タンパク質が断片的に分解しているか、キットの牛乳タンパク質に対する抗体が、変性されたタンパク質と反応しないため、その測定値は 10 μ g/g 未満を示す可能性があることを示している。

（別添 3）の「判断樹について」に記載されている「偽陽性又は偽陰性の確認」とは「確認検査を行う」の意味ではなく、「このリストに掲載されている食品を原材料とした食品については、ELISA 法の検査結果を誤認する可能性があるため、特に製造記録などと照合すべき」との意味である。なお、「偽陽性」または「偽陰性」が既に確認済みの食品については、ELISA 法によるスクリーニング検査は無意味となるので、（別添 2）「判断樹」によらず、適宜個別に判断すべきである。以下（別添 3）「判断樹について」の記載に沿って校訂から校訂までを解説する。

① 特定原材料の表示があり、2 社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか 1 つが「+（プラス）」の場合

このケースに関しては、どちらか一方の ELISA キットにより 10 μ g/g 以上検出されていることから、表示が必要とされるレベル以上含有している可能性が高く、問題なく表示がある場合、適正な表示がされていると判断され、製造記録の確認は省略できる。しかし、この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではない。

② 特定原材料の表示があり、2 社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合

このケースの場合、強い加工が施されている食品に対しては、ELISA 法でも測定が困難であり、実際の測定値より極めて低く検出され、偽陰性の可能性がある。一般にタンパク質は加熱により変性し、アレルギー誘発性が減少する傾向があるため^{14), 15)}、ELISA 法の測定値が実際量より低い場合は、アレルギー誘発性も低くなると考えられるが、アレルギーのリスクを考えた場合、製造記録に記載があり、数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度レベルまたは数 $\mu\text{g}/\text{g}$ 含有レベル残存していると考えられる場合は、表示をすることが必要であると判断する。

③特定原材料の表示があり、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合

このケースは、単に適正な表示を間違えたか、あるいは同じ製造工場内で特定原材料を使用した食品を製造しており、そのコンタミネーションを考慮して、表示をしたことが考えられる。“微量”以上のコンタミネーションが常に生じるようであれば、そのコンタミネーションは、原材料の一部として考え、表示が必要であると考えられるが、コンタミネーションが起らない状況であれば、表示を示すことによりむしろ消費者の選択の幅を狭めることになるので表示をしないよう訂正させる。

④特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合

このケースは、アレルギー症状を持つ消費者にとって、極めて高いリスクが考えられるので、表示を早急に訂正させる必要がある。

⑤特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「+（プラス）」の場合

このケースは、上記④のケースと同様で、アレルギー症状を持つ消費者にとって、アレルギー誘発性のリスクが考えられるため、表示を訂正させる必要がある。ただし輸入食品や輸入原材料の中には、表示が正確でないものがあるので注意が必要である。またコンタミネーションによる特定原材料の混入の可能性が考えられる。現行の通知では、コンタミネーションは、原材料として認識されていないので、欄外に注意喚起ということになっているが、特定原材料のタンパク質量を多量に含有しているとアレルギー発症のリスクが考えられるため、アレルギー表示検討会でコンタミネーションの表示については討議中である。早急の改定が望まれる。

⑥特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「-（マイナス）」の場合

このケースは、どちらか一方の ELISA キットで陽性と判定されたが、確認試験では陰性となる場合である。この

原因として、ELISA 法で交差反応性などにより偽陽性の判定がされたか、ELISA 法では検出可能であったが、確認試験法では検出限界以下のため陰性と判定されたなどが考えられる。どちらにしても、交差反応性を示すような食品原材料でも、アレルギー発症のリスクは高いので、原因を追及し、適正な表示を訂正することが推奨される。

⑦特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がある場合

このケースは、製造記録に特定原材料の記載があるが、特定原材料の重量換算からの推定値算出や、通知検査法に従い2社の ELISA キットによるスクリーニング検査を用いて自主管理をしている場合は根拠がありとされ、適正表示と判断される。その際には、推定値の算出方法やスクリーニングキット検査結果は製造記録などへ必ず記載するように指導する。しかし食品の種類は非常に多く、そのすべてについて ELISA 法を試みているものではないので、表2（別添4）のリストに掲載されている食品以外にも偽陽性または偽陰性を示す食品が存在する可能性があることに留意する必要がある。

⑧特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がない場合

このケースは、製造記録に記載があるにもかかわらず、根拠なしに表示をしなかったのは、単に表示を忘れたためであると考えられる。スクリーニング検査結果が陰性であるため、表示を訂正させることはしないが、製造記録に記載があるが特に表示をしない根拠がないため、特定原材料が食品中に局在していると、再度同様の食品をスクリーニング検査する際には、陽性となる可能性もあるので、表示をすることが望ましい。

⑨特定原材料の表示がなく、2社のキットによるスクリーニング検査結果のどちらも「-（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合

このケースは、表示もなくスクリーニング検査の結果も陰性で、しかも製造記録の記載がないため、適正表示であると判断される。ただし輸入食品や輸入原材料の中には、表示が正確なものではないものがあるので注意が必要である。

V. 今後の課題

紹介した通知検査法は、アレルギー表示を監視するために、現時点で最も信頼性の高いと考えられる方法によって作成されたものであるが、該当する検査対象検体は、流通している食品原料、添加物および加工食品の多岐にわたるため、本検査法をすべての食品に適用することは実際上不可能であり、測定不可能な食品も存在する。しかし、食物アレルギー患者は増加する一途をたどっており、患者側の

アレルギー表示と検査法に対する期待は大きい。そのため、今後さらに応用例を蓄積し、また問題点を解決し、完成度の高い検査法に改良していくことが望まれている。

付 記

厚生労働研究特定原材料検出法検討会班員および検査通知法に携わった諸氏（敬称略）を以下に示す。穂山 浩，米谷民雄，豊田正武，桑島昭文，一瀬 篤，神奈川芳行，小川 正，田辺創一，松田 幹，宇理須厚雄，赤澤 晃，田中和子，丸井英二，堀口逸子，今村知明，萩原清和，山内 淳，渡邊裕子，森松文毅，高畑能久，渡井正俊，佐藤秀隆，山本美保，三嶋 隆，吉田篤史，尾畑嘉英，山崎文典，本庄 勉，豆越慎一，村岡嗣朗，境 雅寿，布藤聡，小川真智子，中村健人，吉川礼次，飯塚太由，水口岳人，山川宏人，飯島 賢，小笠原 健，荒川史博，金山晋治，古井 聡，亀高 茂，赤木第子，大橋秀夫，加藤久，西原理久香，渡邊敬浩，張替直輝，五十鈴川和人，和久井知世子，佐藤雄嗣，坂田こずえ

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：アレルギー物質を含む食品に関する表示について (<http://www.mhlw.go.jp/topics/0103/tp0329-2b.html#b2>)
- 2) 神奈川芳行，今村知明：食衛誌. 43, J-269~J-271 (2002).
- 3) 丸井英二：食品衛生研究. 52(5), 7~13 (2002).
- 4) 堀口逸子：食品衛生研究. 52(5), 15~24 (2002).

- 5) 食品表示研究班アレルギー表示検討会最終報告書（平成14年3月31日）(http://www.nih.go.jp/eiken/chosa/chosa_shokuhin.html)
- 6) 穂山 浩，豊田正武：食品衛生研究 52(6), 65~73 (2002).
- 7) Taylor, S. L., *et al.*: J. Allergy Clin. Immunol. 109, 24~30 (2002).
- 8) 高畑能久：食衛誌. 43, J-275~J-277 (2002).
- 9) 高畑能久，森松文毅：FFIジャーナル 206, 23~32 (2002).
- 10) 本庄 勉，他：FFIジャーナル 206, 13~22 (2002).
- 11) 豆越慎一：食衛誌. 43, J-277~J-279 (2002).
- 12) 厚生労働省食品保健部長通知食発第 0430001 号「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」平成 14 年 4 月 30 日. (<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/kensa/tuuchi.html>)
- 13) 布藤 聡：食衛誌. 43, J-280~J-282 (2002).
- 14) Lee, Y.-H.: J. Pediatr. 121, S47~S50 (1992).
- 15) Honma, K. *et al.*: Int. Arch. Allergy Immunol. 103, 25~35 (1994).

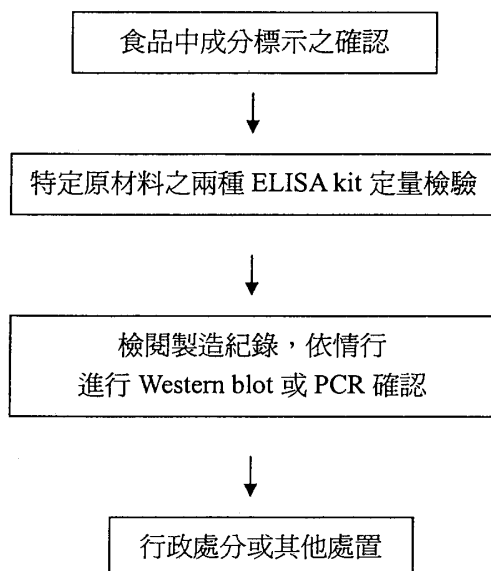
執筆者の PROFILE

穂山 浩 (Hiroshi ARIYAMA)

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 室長
千葉大学大学院薬学研究所博士課程修了 薬学博士
(専門分野) 食品衛生学, 分析化学, 免疫学
(主な著書) 「食品安全性辞典」(共著) 共立出版
「食品総合辞典」(共著) 丸善

附件十六

食品中過敏原檢查法概要



本概要為厚生勞動省函示各地方官方保健所及衛生試驗所，於辦理食品過敏原標示知市場監測及受理民眾申訴過敏原標示不實之食品檢驗的檢查處置標準。

首先，確認食品的標示。先檢視食品包裝上的成分標示，標示文字中該食品成分含哪些過敏原（五種主要過敏原），以及不含哪些過敏原（亦即沒有標示者）。

進行日本ハム（株）製 ELISA KIT，「FASTKIT エライザシリーズ」以及（株）森永生科學研究所製 ELISA KIT，「特定原材料測定キット」兩種 ELISA 定量檢驗。得到該食品成分中含有及不含哪些過敏原的檢驗結果（因為使用兩種檢驗套組，故可能有兩種結果）

調閱食品製造商之製造記錄，檢查原材料是否含有五種過敏原。若原材料使用記載與標示不符，依不同情形，決定不處分或施與行政處分。在 ELISA 結果為陽性的個案，標示成分不含過敏原且製造記錄亦顯示無過敏性原材料使用時，必須進行 Western blot 及 PCR 確認試驗。

最後，依據檢查的結果，對標示不實的食品製造廠商施予適當之行政處分或其他處置。

附件十六

日本ハム（株）製「FASTKIT エライザシリーズ」

ELISA 試驗流程圖

<蛋白質萃取>

檢體
↓ 以研磨機粉碎均質化
秤取 2g 樣品
↓ 以 38 mL 萃取緩衝溶液混合
萃取液
↓ 以 3000x g 離心 20 分鐘
上清液
↓ 以濾紙過濾
100 μ L 濾液
↓ 加入稀釋用緩衝液
試驗檢液

<ELISA 試驗>

沖洗抗體固相化 plate 五次
↓ 加入檢液及系列稀釋標準溶液 (100 μ L/well)，室溫下反應 1 小時
沖洗五次
↓ 加入結合抗體溶液 (100 μ L/well)，室溫下反應 1 小時
沖洗五次
↓ 加入 Biotin 結合抗體溶液 (100 μ L/well)，室溫下反應 1 小時
沖洗五次
↓ 加入酵素-Avidin 結合物溶液 (100 μ L/well)，室溫下反應 30 分鐘
沖洗五次
↓ 加入呈色劑溶液 (100 μ L/well)，室溫下反應 20 分鐘
↓ 加入反應停止溶液 (100 μ L/well)
吸光度測定

雞蛋、牛奶、小麥 Kit : 450 nm

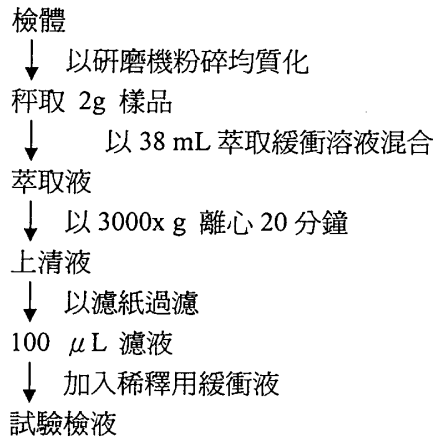
蕎麥、花生 Kit : 405 nm

附件十六

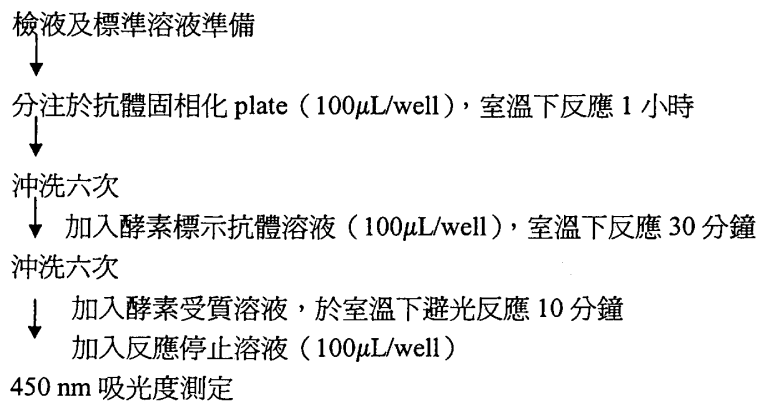
(株) 森永生科學研究所製 ELISA KIT, 「特定原材料測定キット」

ELISA 試驗流程圖

<蛋白質萃取>



<ELISA 試驗>

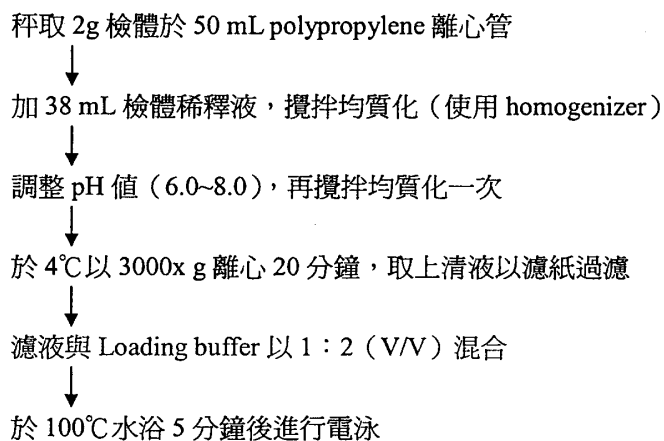


附件十六

Western blot 試驗流程

(株) 森永生科學研究所製「ウエスタンブロットキット」)

檢液配製 (for SDS-PAGE)

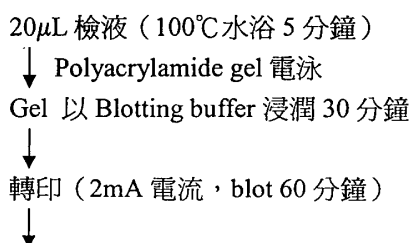


標準溶夜：(株) 森永生科學研究所モリナガウエスタンブロットキット内標準液，以 Loading buffer 稀釋調製 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL 及 10 μ g/mL 之雞蛋及牛奶標準溶夜。

檢體稀釋液：(株) 森永生科學研究所モリナガウエスタンブロットキット或(株) 森永生科學研究所 ELISA キット，以蒸餾水稀釋 20 倍。

Loading buffer：Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) 加 2-mercaptoethanol (19 : 1, V/V)。

Western blot



附件十六

以 Blocking buffer 浸潤 60 分鐘
↓
加入一次抗體，擺盪浸潤 60 分鐘
↓
以清洗液清洗三次
↓
加入二次抗體，擺盪浸潤 60 分鐘
↓
以清洗液清洗三次
↓
加入 Alkali phosphatase conjugated Avidin-Biotin 溶液，擺盪浸潤 20 分鐘
↓
以清洗液清洗三次
↓
以 Tris/鹽酸溶液平衡，擺盪浸潤 15 分鐘後，倒棄 Tris/鹽酸溶液
↓
加入檢出試劑，擺盪浸潤 3~5 分鐘
↓
以蒸餾水避光擺盪浸潤洗靜
↓
目視檢驗結果，判定結果。
雞蛋 albumin : 50K Da , ovomucoid : 38K Da
牛奶 casien : 33~35K Da , β -lactogloblin : 18.4K Da

Polyacrylamide gel : SDS-PAGE mini 15% 1.0 mm × 12 well (TEFCO 製)

電泳槽 : STC-808 (TEFCO 製)

電泳緩衝液 : 10x Tris/Glicine/SDS (BIO-RAD) 稀釋 10 倍後使用

Blotting buffer : 10x Tris/glicine (BIO-RAD) / Methanol/ ddH₂O (1:2:7,V/V/V)

轉印膜 : Hybond-P 或 PVDF 材質，使用前須先以 100% Methanol 浸潤 10~30 秒

濾紙 : Extra Think Filter Paper (BIO-RAD)

轉印裝置 : BIO-RAD 製

Blocking buffer : TBS (含 0.1% serum albumin 及 0.05% Tween-20)

一次抗體 : 「ウエスタンブロットキット」((株) 森永生科學研究所製)

二次抗體 : VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製)，稀釋 10000 倍後使用

清洗液 : TBS (含 0.05% Tween-20)

Alkali phosphatase conjugated Avidin-Biotin 溶液 : VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit 或 VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製)

附件十六

檢出試劑：Alkali phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT> (VECTOR 社製)

附件十七

馬鈴薯定量檢驗

目的：因為 NLY 與 NLP 的定量使用同一條 5' primer，故本試驗在測試 NLY 與 NLP 定量時，各品系自己的 primer set 是否因另一個品系 DNA 存在而受影響。

方法：配製含 5%NLY、含 5%NLP 及含 5%NLP+5%NLY 之馬鈴薯檢體。
以 NLY 定量 primers/probe set 對含 5 %NLY 及含 5%NLP+5%NLY 之馬鈴薯檢體進行 real time PCR 定量，確認 NLY 定量 primers/probe set 對兩個檢體的定量結果，判斷 NLY 定量 primers/probe set 是否受 NLP DNA 存在影響其定量。
NLP 定量 primers/probe set 對含 5 %NLP 及含 5%NLP+5%NLY 之馬鈴薯檢體進行 real time PCR 定量，確認 NLP 定量 primers/probe set 對兩個檢體的定量結果，判斷 NLP 定量 primers/probe set 是否受 NLP DNA 存在影響其定量。

DNA 抽：CTAB 法

定量儀器：ABI 7700

Primers/probe set：Unknown (保密資料)，primers from FASMAC, probes from ABI

Reaction formula：Unknown

實驗操作：

- (1) For Endogenous gene detection (UPG gene)
 - NTC × 3 well
 - Standard material：20、125、1.5K、20K 及 500K copy (from Nippon Gene 為含 UPG、New Leaf、NLY 及 NLP 之 plasmid)。每種 copy number × 3 well，共 15 wells
 - Samples：3 100% NLP samples、3 5%NLP samples 及 3 samples 5%NLP+5%NLY，每個三重複共 27 wells

- (2) For target gene detection (UPG gene)
 - NTC × 3 well
 - Standard material：20、125、1.5K、20K 及 500K copy (from Nippon Gene 為含 UPG、New Leaf、NLY 及 NLP 之 plasmid)。每種 copy number × 3 well，共 15 wells
 - Samples：3 100% NLP samples、3 5%NLP samples 及 3 samples 5%NLP+5%NLY，每個三重複共 27 wells

附件十七

PCR program :
 50°C 2 min
 95°C 10 min
 95°C 30 sec
 59°C 30 sec
 72°C 30 sec

結果：
100% NLP

UGP	NLP019	0.52	Cv
1 36337.57	1 14870.58	1 78.6989	1 0.409234
2 31397.39	2 17402.74	2 106.5911	2 0.554273
3 36269.7	3 21550.87	3 114.2661	3 0.594184
Mean (%) 34668	Mean (%) 17941	Mean (%) 99.85203	Mean (%) 0.51923
SD 2833	SD 3373	SD 18.71677	0
RSD (%) 8	RSD (%) 19	RSD (%) 18.74451	NLP 定量的 CV 值已 確定為 0.52。本次 100%NLP 所得平均 CV 為 0.51923。表示 本次定量實驗成功。
		Bias 1897.041	

5%NLP

UGP	NLP019	Cv=0.52	
1 13034.23	1 322.14	1 4.75287	5% NLP 定量所得值 接近 5%，除了第二個 sample。
2 19030.33	2 291.75	2 2.948229	
3 14708.47	3 451.41	3 5.902015	
Mean (%) 15591	Mean (%) 355	Mean (%) 4.534371	
SD 3094	SD 85	SD 1.488966	
RSD (%) 20	RSD (%) 24	RSD (%) 32.83732	
		Bias 1897.041	

附件十七

5%NLP+5%NLY

UGP	NLP019	Cv=0.52																																													
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 10%;"></td><td style="width: 10%; text-align: right;">2</td><td style="width: 80%;">21108.16</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: right;">3</td><td>14793.89</td></tr> <tr style="border-top: 1px solid black;"><td>Mean (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">17951</td></tr> <tr><td>SD</td><td></td><td style="text-align: right;">4465</td></tr> <tr><td>RSD (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">25</td></tr> </table>		2	21108.16		3	14793.89	Mean (%)		17951	SD		4465	RSD (%)		25	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 10%;"></td><td style="width: 10%; text-align: right;">2</td><td style="width: 80%;">452.88</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: right;">3</td><td>494.65</td></tr> <tr style="border-top: 1px solid black;"><td>Mean (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">474</td></tr> <tr><td>SD</td><td></td><td style="text-align: right;">30</td></tr> <tr><td>RSD (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">6</td></tr> </table>		2	452.88		3	494.65	Mean (%)		474	SD		30	RSD (%)		6	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 10%;"></td><td style="width: 10%; text-align: right;">2</td><td style="width: 80%;">4.126002</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: right;">3</td><td>6.430019</td></tr> <tr style="border-top: 1px solid black;"><td>Mean (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">5.278011</td></tr> <tr><td>SD</td><td></td><td style="text-align: right;">1.629186</td></tr> <tr><td>RSD (%)</td><td></td><td style="text-align: right;">30.86743</td></tr> </table>		2	4.126002		3	6.430019	Mean (%)		5.278011	SD		1.629186	RSD (%)		30.86743
	2	21108.16																																													
	3	14793.89																																													
Mean (%)		17951																																													
SD		4465																																													
RSD (%)		25																																													
	2	452.88																																													
	3	494.65																																													
Mean (%)		474																																													
SD		30																																													
RSD (%)		6																																													
	2	4.126002																																													
	3	6.430019																																													
Mean (%)		5.278011																																													
SD		1.629186																																													
RSD (%)		30.86743																																													
	Bias	5.560213																																													

5% NLP+5% NLY 定量所得值接近 5%，除了第一個 sample PCR 反應沒有進行。

結論：NLY DNA 存在並不會影響 NLP 定量 primers/probe set 之定量效能。

此外，實驗數據亦顯示 NLP DNA 存在並不會影響 NLY 定量 primers/probe set 之定量效能（由於實驗不是我做的，所以沒能記下實驗數據）。

附件十八

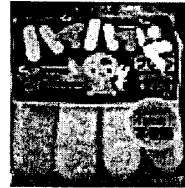
食品中過敏原（雞蛋、牛奶）之 Western blot 檢驗

超市購買檢體

Sample 1

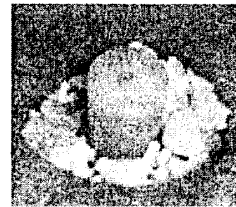


Sample 2

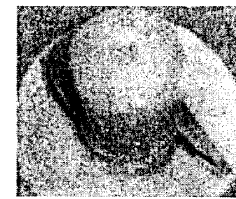
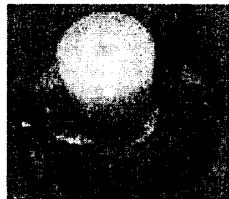


↓
粉碎

前



後



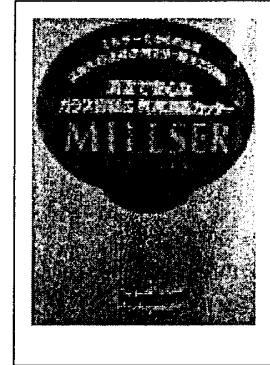
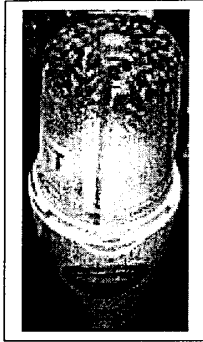
↓
秤重 秤取 2g sample

↓

附件十八



加 38 mL 萃取 buffer，以均質機均質化並調整 pH 值 (pH=6.0~8.0)



均質機 IFM-700G



4°C 以 3000x g 離心 20 分鐘，取上清液以濾紙過濾



濾液與 Loading buffer 以 1 : 2 (V/V) 混合後，於 100°C 水浴 5 分鐘



於 4°C 冷藏，隔日進行 SDS-PAGE 電泳及 transfer to membrane

附 件 十 九

遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus® Potato) からの 組換え遺伝子検知法の確立及びスナック菓子からの検知

穂山 浩 杉本和恵 松本美佐緒 五十鈴川和人
 渋谷雅明 合田幸広 豊田正武

A Detection Method of Recombinant DNA from Genetically Modified Potato
(NewLeaf Plus® Potato) and Detection of NewLeaf Plus® Potato in Snack

Hiroshi AKIYAMA*^{1,†}, Kazue SUGIMOTO*¹, Misao MATSUMOTO*¹, Kazuto ISUZUGAWA*¹,
Masaaki SHIBUYA*², Yukihiro GODA*¹ and Masatake TOYODA*¹

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo: 7-3-1,
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; [†] Corresponding author)

(報 文)

食品衛生学雑誌 第43巻 第1号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 43, No. 1, February 2002

J. Food Hyg. Soc. Japan
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

液 2.5 μ L を水中に加え、全量を 25 μ L にした。反応条件は以下のとおりである。95°C で 10 分間反応後、95°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR 増幅を行う。次いで 72°C で 7 分間保った後、4°C で保存した。

7. 検知方法

既報と同様に行った^{8), 9)}。泳動には、100 mL 当たり 10 μ g のエチジウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルを用いた。PCR 反応液の 7.5 μ L を TAE (tris-acetate EDTA) 緩衝液中で 100 V 定電圧で電気泳動を行った。次いで、ゲルイメージ解析装置を使用し、UV (312 nm) 照射下で画像を取り込み、増幅される DNA の検知を行った。また、予想される長さの DNA が増幅された場合は、該当する PCR 産物のダイレクトシーケンスを(株)グライナージャパンに依頼し行った。

結果及び考察

1. プライマーの設計

ジャガイモに普遍的な遺伝子として、ジャガイモゲノムに内在する Potato sucrose synthase (PSS) 遺伝子を選択し、PCR の陽性対照プライマー対として同遺伝子 (GenbankTM Accession No. U21129) の塩基配列情報をもとに、216 bp の増幅バンド長が得られるプライマー対 No. 1 (PSS01n-5' 及び PSS 01n-3') を設計した。次に NL-P を特異的に検知する目的でプライマーを設計した。NL-P に導入されており、NL 及び NL-Y には導入されていないジャガイモ葉巻ウイルスの replicase (PLRV-*rep*) 遺伝子情報 (GenbankTM Accession No. AF220151) を基に PLRV-*rep* 遺伝子領域を認識するプライマー対の設計を行った。NL-P に導入された DNA 構造^{*3} と本研究で報告するプライマー導入 DNA 上の位置を Fig. 1、プライ

マー配列と増幅バンド長を Table 1 に示す。

2. 陽性対照プライマーのジャガイモ特異性の確認

陽性対照として設計したプライマー対 No. 1 のジャガイモ特異性を調べるため、Non-GM ジャガイモ、小麦、大麦、コメ、ダイズ、トウモロコシから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、ジャガイモから抽出した試料のみ予想される長さの増幅産物が得られた。結果を Fig. 2 に示す。次に得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、遺伝子情報のデータと一致した。なお、それ以外の Table 1 に示されたプライマー対についても同様に実験を行い、すべての試料で PCR の増幅バンドが検出されないことを確認した。

3. PLRV-*rep* 遺伝子検知用プライマーの特異性の確認

Non-GM, GM ジャガイモから抽出した DNA を鋳型とし、プライマー対 No. 1, 2 を用いて PCR を行った。その結果、プライマー対 No. 1 を用いて PCR を行った際、すべてのジャガイモから抽出した DNA で、それぞれ予想される増幅バンド長 (216 bp) の増幅産物が得られた (Fig. 3)。それに対し、PLRV-*rep* 遺伝子領域を認識するプライマー対 No. 2 は、NL-P から抽出した DNA により予想される増幅バンド長の増幅産物が得られた (Fig. 4)。更に得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、Genbank の遺伝子情報と一致した。著者らが用いたジャガイモはウイルス感染のない健全なジャガイモである。したがって、No. 2 のプライマー対は健全なジャガイモ材料にする限り NL-P に特異性のあるプライマー対であることが示された。他方、PLRV はジャガイモに感染するウイルスである。したがって、ジャガイモウイルスに感染したジャガイモが混入した場合、プライマー対 No. 2 を用いて PCR を行うと増幅バンドが生じ誤った結果が得られる可能性が考えられる。事実、著者らは既にトウモロコシのス

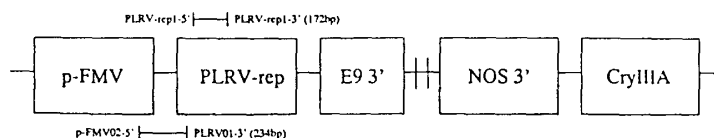


Fig. 1. Schematic diagram of PCR primers designed for detection of NewLeaf Plus[®] potato (NL-P). The two pairs of PCR primers were designed for detection of NewLeaf Plus[®] potato (NL-P). The expected lengths of PCR products are indicated in parentheses.

Table 1. List of PCR Primers

No.	Name	Sequence (5'-3')	Specificity	Amplicon
1	Pss 01n-5' Pss 01n-3'	TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCG A	potato sucrose synthetase/sense potato sucrose synthetase/anti-sense	216 bp
2	PLRV-rep1-5' PLRV-rep1-3'	CTT CTT TCA CGG AGT TCC AG TCG TCA TTA AAC TTG ACG AC	PVY/sense PVY/anti-sense	172 bp
3	p-FMV02-5' PLRV01-3'	AAA TAA CGT GGA AAA GAG CTG TCC TGA AAA AGA GCG GCA TAT GCG GTA AAT CTG	p-FMV/sense PVY/anti-sense	234 bp

*3 JRL/ILSI Joint Workshop on Method Development in Relation to Regulatory Requirements for the Detection of GMOs in the Food Chain, Book of Abstracts, p. 49 (11, December, 2000).

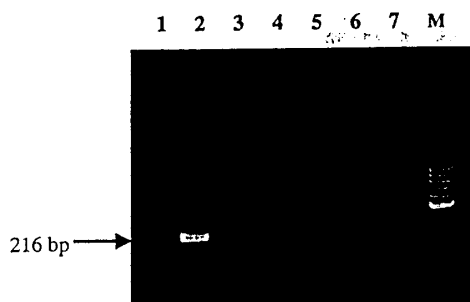


Fig. 2. Specificity of potato specific primer (primer pair No. 1)

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.

Lane 1: negative control (no DNA); lane 2: potato DNA; lane 3: wheat DNA; lane 4: barley DNA; lane 5: rice DNA; lane 6: soy DNA; lane 7: maize DNA; M: 100 bp ladder size standard

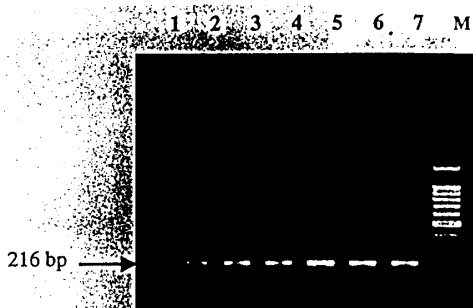


Fig. 3. PCR products amplified from non-GM and GM potato DNA with positive control primers (primer pair No. 1)

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.

Lane 1: negative control (no DNA); lane 2: NewLeaf[®] potato SPBT02-05 DNA; lane 3: NL-P DNA; lane 4: NewLeaf[®] potato RBBT-06 DNA; lane 5: NewLeaf Y[®] potato DNA; lane 6: non-GM potato (Russet Burbank) DNA; lane 7: non-GM potato (Superior) DNA; M: 100 bp ladder size standard

ナック菓子より、組換え植物由来ではなく、微生物由来の可能性の非常に高い barnase 遺伝子を検知し^{*1}、また缶詰パパイアからも微生物由来と考えられる GUS、及び NPTII の遺伝子を検知している⁹⁾。このような擬陽性の可能性をなくすため、更に 2 生物に由来する連続した遺伝子領域を認識するプライマー対についても設計を行うことにした。

4. NL-P 特異的プライマー対の設計と特異性の確認

NL-P 特異的なプライマー対として、ゴマノハグサモザイクウイルスの 35S プロモーター (*p-FMV*) 領域の塩基配列情報 (Genbank[™] Accession No. AR 091795) 及び *PLRV-rep* 遺伝子情報を基に、*p-FMV* 遺伝子から *PLRV-*

rep 遺伝子の 2 生物間をまたぐ領域を増幅するプライマー対の設計を行った。5 組のプライマー対を設計し、上述の 3 で用いた DNA を鋳型として PCR を行った結果、プライマー対 No. 3 が不得意なバンドが見られないプライマー対の中で最も増幅断片長が短いプライマー対であることが明らかとなった。加工食品から得られる DNA は断片化していることが知られている。したがって、本プライマー対が特異性が高く応用範囲の広い最も良好なプライマー対であるものと考えられた。プライマー対 No. 3 の結果を Fig. 5 に示す。

得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、安全性審査のために提出された資料 (未公開データ) と一致した。

なお、以上の実験で DNA が存在しない陰性対照レーン

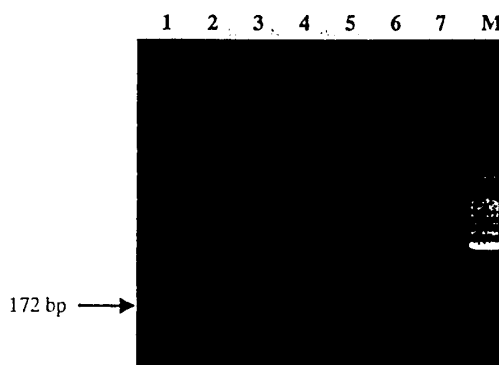


Fig. 4. Specificity of potato-specific primers (primer pair No. 2)

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.

Lane 1: negative control (no DNA); lane 2: NewLeaf[®] potato SPBT02-05 DNA; lane 3: NL-P DNA; lane 4: NewLeaf[®] potato RBBT-06 DNA; lane 5: NewLeaf Y[®] potato DNA; lane 6: non-GM potato (Russet Burbank) DNA; lane 7: non-GM potato (Superior) DNA; M: 100 bp ladder size standard.

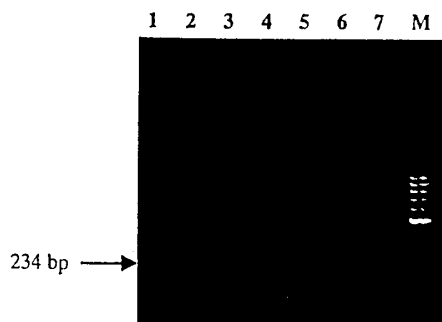


Fig. 5. Specificity of potato-specific primers (primer pair No. 3)

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.

See footnotes for Fig. 4.

*1 日本食品衛生学会第 79 回学術講演会講演要旨集, p. 37 (平成 12 年 5 月), 東京.

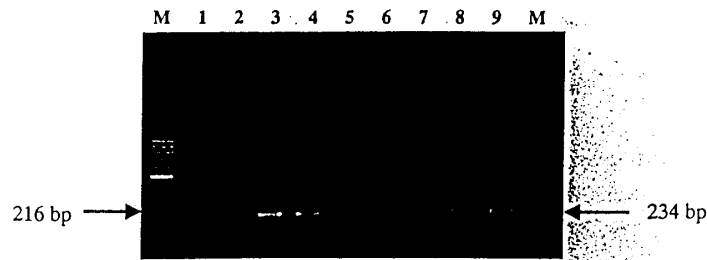


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNA containing various amounts of NL-P
 Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.
 Primer-pair No. 1 (lanes 3, 4), No. 3 (lanes 1, 2, 5~9)
 Lane 1: no potato DNA; lane 2, 3: non-GM DNA; lane 4: NewLeaf YTM potato DNA; lane 5: potato DNA containing 0.01% NL-P; lane 6: potato DNA containing 0.05% NL-P; lane 7: potato DNA containing 0.1% NL-P; lane 8: potato DNA containing 0.5% NL-P; lane 9: potato DNA containing 1.0% NL-P; M: 100 bp ladder size standard

Table 2. Results of NL-P in Processed Foods

Food item	Producing company	Pss 01n-5' p-FMV03-5'	
		Pss 01n-3' PLRV02-3' No. 1	No.
Snack	A	+	-
Snack	B	+	-
Snack	C	+	-
Snack	D	+	+
Snack	D	+	+
Snack	D	+	+
Snack	E	+	-
Snack	F	+	-
Snack	G	+	-
Mashed potato	H	+	-
Mashed potato	I	+	-
Stew or soup	J	-	-
Stew or soup	K	+	-
Stew or soup	D	+	-
Side dish	L	+	-
Frozen food	M	+	-
Crouquette	N	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-
Frozen fried potato	Imported food	+	-

+ : positive, - : negative

では、すべてのプライマー対で全く増幅バンドは検知されなかった。

5. ジャガイモ粉における組換え遺伝子検知感度の検討
 Non-GM ジャガイモに NL-P を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 5% となるように混合した試料から DNA を抽出し、PCR に供することにより、組換え遺伝子の検知感度を検討した。その結果、プライマー No. 2 と No. 3 のどちらを用いた場合も 0.05% まで検知可能であった。またすべての試料から内在的に含まれる Pss 遺伝子がプライマー対 No. 1 を用いて検知された。プライマー対 No. 3 を用いたときの

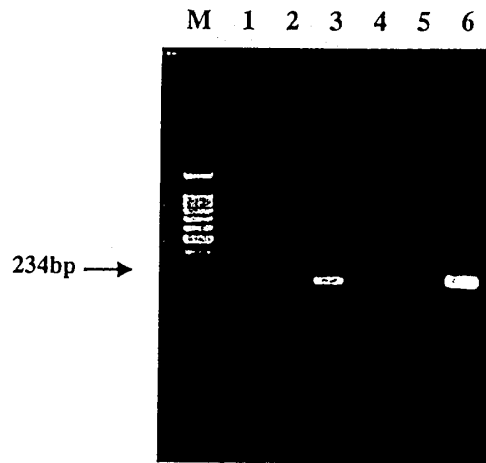


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of potato PCR products amplified from potatoes and snack with NL-P specific primer pair No. 3 for detection
 Lane 1: negative control (no primer); lane 2: negative control (no DNA); lane 3: positive control (NL-P); lane 4: snack D1; lane 5: snack D2; lane 6: snack D3.

電気泳動写真を Fig. 6 に示す。

6. 検査対象品目である市販冷凍ジャガイモ加工品の実態調査

プライマー対 No. 3 を用いて、ジャガイモを原料とした市販加工食品の冷凍フライドポテト 8 検体、マッシュポテト 2 検体、市販スナック菓子 7 検体、レトルトスープ・シチュー類 3 検体、クロック・惣菜類 3 検体に NL-P が含まれているか検知を行った。その結果、スナック菓子 1 検体からプライマー対 No. 3 を用いた際に増幅バンドが検知された。他の検体からは GM 特異的なプライマー対を用いたレーンで増幅バンドが検知されず、陽性対照プライマー対を用いたレーンでのみバンドが検知された。

更に確認の目的で、プライマー対 No. 3 で増幅バンドが検出されたスナック菓子由来の DNA について、プライ

マー対 No. 2 を用いて PCR を行った結果、対応する長さの増幅バンドが検出されることが明らかとなった。

更に、増幅バンドが検出されたスナック菓子と異なるロット番号の 2 検体を購入し、プライマー No. 2 及び No. 3 を用いて同様の実験を行った。その結果、この 2 検体からも予想される長さの PCR 増幅産物が得られた。更に得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、予想されるシーケンス結果と一致した。Fig. 7 にプライマー No. 3 を用いて PCR を行った結果を示す。以上の結果より、このスナック菓子 3 検体には NL-P が混入されたジャガイモ原料が使用されたことが明らかとなった。すべての検査結果を Table 2 に示す。

ま と め

日本で安全性審査未終了の NL-P について、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた検知法を検討し、検査対象品目である冷凍ジャガイモ加工品などを対象として、特異性の高い組換え遺伝子の検知法を確立した。本法を市販ジャガイモ加工品 25 検体に応用したところ、スナック菓子 3 検体から NL-P が検出された。

謝 辞

本研究の一部は、平成 13 年度厚生科学研究費補助金「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」による。

文 献

- 1) 厚生省告示第 232 号 “食品、添加物などの規格基準の一部改正” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 2) 厚生省告示第 233 号 “組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 3) 厚生労働省食品保健部長通知食発第 110 号 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について” 平成 13 年 3 月 27 日。

- 4) 厚生労働省食品保健部長通知食発第 158 号 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成 13 年 5 月 25 日。
- 5) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 40, 149-157 (1999).
- 6) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A method of detecting recombinant DNA from genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 41, 137-143 (2000).
- 7) Matsuoka, T., Kuribara, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 24-32 (2001).
- 8) Matsuoka, T., Kuribara, H., Suefuji, Y., Miura, H., Akiyama, H., Kusakabe, Y., Goda, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 197-201 (2001).
- 9) Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M., Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 231-236 (2001).
- 10) Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., Tumer, N. E., Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology (NY)*, 8, 127-134 (1990).

附 件 二 十

遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Y[®] Potato) からの 組換え遺伝子の検知法

穂山 浩 渡邊敬浩 和久井千世子 千葉良子
渋谷雅明 合田幸広 豊田正武

A Detection Method for Recombinant DNA from Genetically
Modified Potato (NewLeaf Y[®] Potato)

Hiroshi AKIYAMA^{*1,†}, Takahiro WATANABE^{*1}, Chiseko WAKUI^{*1}, Yoshiko CHIBA^{*2},
Masaaki SHIBUYA^{*3}, Yukihiro GODA^{*1} and Masatake TOYODA^{*1}

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*²Showa Pharmaceutical University: 3-3165, Higashitamagawagakuen, Machida-shi, Tokyo

194-8543, Japan; *³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo:

7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; †Corresponding author)

(ノ ー ト)

食品衛生学雑誌 第43巻 第5号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 43, No. 5, October 2002

J. Food Hyg. Soc. Japan
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

ノート

遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Y[®] Potato) からの 組換え遺伝子の検知法

(平成 14 年 4 月 8 日受理)

穂山 浩^{*1} 渡邊敬浩^{*1} 和久井千世子^{*1} 千葉良子^{*2}
 渋谷雅明^{*3} 合田幸広^{*1} 豊田正武^{*1}

A Detection Method for Recombinant DNA from Genetically Modified Potato (NewLeaf Y[®] Potato)

Hiroshi AKIYAMA^{*1,†}, Takahiro WATANABE^{*1}, Chiseko WAKUI^{*1}, Yoshiko CHIBA^{*2},
 Masaaki SHIBUYA^{*3}, Yukihiro GODA^{*1} and Masatake TOYODA^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;
^{*2}Showa Pharmaceutical University: 3-3165, Higashitamagawagakuen, Machida-shi, Tokyo
 194-8543, Japan; ^{*3}Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo:
 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; [†]Corresponding author)

A detection method using the polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect genetically modified (GM) potato (NewLeaf Y[®] potato; NL-Y), of which the mandatory assessment has not yet been completed in Japan. The potato sucrose synthase gene was used as an internal control. We designed a primer pair to specifically detect NL-Y without false-positive results in processed potato foods infected with the potato virus Y (PVY). The DNA introduced into NL-Y using the primer pair could be detected from potato powder samples containing 0.05% NL-Y. In addition, we designed primer pairs for recognizing the *CryIIIa* gene to detect the NewLeaf potato (NL), NewLeaf Plus potato (NL-P) and NL-Y and for recognizing *p-FMV* in order to detect NL-P and NL-Y. The proposed method was applied to the detection of NL-Y in 26 processed potato foods and NL-Y was not detected in any samples.

(Received April 8, 2002)

Key words: 遺伝子組換えジャガイモ genetically modified potato; 組換え遺伝子 recombinant DNA; ポリメラーゼ連鎖反応 PCR; 検知法 detection method; ニューリーフ Y ジャガイモ NewLeaf Y[®] potato

緒 言

遺伝子組換え (GM) 食品並びにそれらを原料とする加工食品が、我が国でも流通するようになってきた。平成 12 年の厚生省告示 232 号、233 号により、厚生省 (現厚生労働省) では安全性審査がされていないものが国内で流通しないよう、食品衛生法の規格基準を改正して、安全性審査を法的に義務化することとした^{1,2)}。これにより、平成 13 年 4 月から、安全性審査を受けていない GM 食品又はこれを原材料に用いた食品は、輸入、販売などが法的に禁止されることになった。また、農水省は、JAS 法の定め

る品質表示制度のもとで、安全性が確認された GM 農作物とその加工食品に対する表示を行うことを決定し、平成 13 年 4 月より実施している。これに伴い、厚生労働省では「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」を医薬局食品保健部長通知し、安全性未審査の GM 食品の検知法を示した^{3,4)}。著者らは、これまでに、安全性が確認された GM ダイズ⁵⁾と、トウモロコシ^{6) 7)}並びに、安全性未審査のトウモロコシ⁸⁾、パパイヤ⁹⁾及びジャガイモ (NewLeaf Plus[®] potato; NL-P)¹⁰⁾の検知法について報告してきた。本研究では、既に米国・カナダで市販されているが、日本では平成 14 年 6 月段階で安全性審査が終了していない遺伝子組換えジャガイモ系統 (NewLeaf Y[®] potato; NL-Y) の、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた検知法^{3,4)}について報告する。

† 連絡先

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1

^{*2} 昭和薬科大学: 〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3-3165

^{*3} 東京大学大学院薬学系研究科: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

^{*1} <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnsh/kensa/tuuch.html>

実験方法

1. 試料

遺伝子非組換え (non-GM) ジャガイモ 2 系統 (Russet Burbank 種及び Superior 種), 安全性審査終了 GM ジャガイモ 3 系統 (NewLeaf[®] potato SPBT02-05, NewLeaf[®] potato RBBT-06 NL; NL 及び NewLeaf Plus[®] potato, Russet Burbank 種) 及び安全性審査未終了 GM ジャガイモ 系統 (NewLeaf Y[®] potato, Shapody 種) は, 厚生労働省医薬局食品保健部を通じ, モンサント社から入手した。輸入時に検疫検査センターで検査対象品目である冷凍ジャガイモ加工品 (フライドポテト, マッシュポテト) 及びその他のジャガイモ加工品 (スナック菓子, レトルトスープ, コロッケなど) は, 世田谷区内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。北海道産ジャガイモ男爵は世田谷区内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

2. 試薬

既報と同様の試薬を用いた¹¹⁾。

3. 機器

既報と同様の機器を用いた¹¹⁾。

4. DNA 溶液の調製

既報と同様の調製法を用いた¹¹⁾。

5. プライマー

プライマーの合成は, Amersham Pharmacia Biotech 社に委託し, すべて脱塩精製品を用いた。

6. PCR 条件

既報と同様の条件を用いた¹¹⁾。

7. 検知方法

既報と同様に行った¹¹⁾。予想される長さの DNA が増幅された場合は, 該当する PCR 産物のダイレクトシーケンスを(株)グライナージャパンに依頼し行った。

結果及び考察

1. プライマーの設計

既報¹¹⁾と同様に, PCR の陽性対照プライマー対としてジャガイモゲノムに内在する potato sucrose synthase 遺伝子を標的とし, 216 bp の増幅バンド長が得られるプ

ライマー対, PSS 01n-5'及び PSS 01n-3'を用いた。

NL, NL-P 及び NL-Y には, *Bacillus thuringiensis* (Bt) 由来の害虫抵抗性タンパク質遺伝子 (*CryIIIa*: EMBL/GenBank/DDBJ Accession No. X70979) が目的遺伝子として導入されている。*CryIIIa* 検出用としては上記塩基配列情報を基にプライマー対を設計した。プロモーターとして導入されているゴマノハグサモザイクウイルスの 35 S プロモーター (*p-FMV*) 領域 (EMBL/GenBank/DDBJ Accession No. AR091795) 及び Lawson らの報告¹⁰⁾にあるウイルス抵抗性として導入されているジャガイモウイルス Y 外皮タンパク質遺伝子 (*PVY-cp*) の塩基配列情報を基に, 以下の検知用プライマー対を用意した。

NL, NL-P 及び NL-Y を検知する *CryIIIa* 領域を増幅するプライマー対, NL-P 及び NL-Y を検知する *p-FMV* 領域を増幅するプライマー対, NL-Y を検知する *PVY-cp* 領域を増幅するプライマー対, 更に NL-Y 検知の特異性を高めるため, *p-FMV* 領域から *PVY-cp* 領域にかけての異種生物由来の塩基配列をまたぐ領域を増幅するプライマー対の設計を行った。NL-Y に導入された DNA 構造^{*5}と組換え体検知のために設計したプライマーの位置を Fig. 1 に, プライマー配列と増幅バンド長を Table 1 に示す。

2. 遺伝子組換えジャガイモ検知用のプライマーの特異性の確認

NL, NL-P 及び NL-Y を検知する *CryIIIa* 領域を増幅するプライマー対 No. 2 の特異性を調べるため, 検討したすべてのジャガイモから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。その結果, GM ジャガイモ^{*5}から抽出した試料のみに予想される長さの増幅産物が得られた。結果を Fig. 2 に示す。次に得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ, データベース上の塩基配列情報に一致した。また, NL-P 及び NL-Y のみを検知する *p-FMV* 領域を増幅するプライマー対 No. 3 の特異性を調べるため, 検討したすべてのジャガイモから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。その結果, NL-P 及び NL-Y^{*6}から抽出した試料のみ予想される長さの増幅産物が得られた。結果を Fig. 3 に示す。しかし著者が用いたジャガイモはウイルス感染のない健全なジャガイモである。したがっ

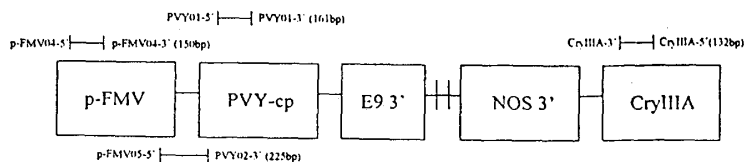


Fig. 1. Schematic diagram of PCR primers designed for detection of NewLeaf Y[®] potato (NL-Y). The expected lengths of PCR products are indicated in parentheses.

*5 JRL/ILSI Joint Workshop on Method Development in Relation to Regulatory Requirements for the Detection of GMOs in the Food Chain, Book of Abstracts, p. 49 (11, December, 2000)

*6 日本食品衛生学会第79回学術講演会講演要行集, p. 37 (平成12年5月, 東京).

Table 1. List of PCR Primers

No.	Name	Sequence (5'-3')							Specificity	Amplicon
1	Pss 01n-5'	TGA	CCT	GGA	CAC	CAC	AGT	TAT	Potato sucrose synthetase/sense	216 bp
	Pss 01n-3'	GTG	GAT	TTC	AGG	AGT	TCT	TCG A	Potato sucrose synthetase/anti-sense	
2	CryIIIA-5'	TGG	GAA	AGC	ATT	CAT	GGA	GC	<i>CryIIIA</i> /sense	132 bp
	CryIIIA-3'	TGG	ACA	ATG	CAC	TCA	CGT	AG	<i>CryIIIA</i> /anti-sense	
3	p-FMV04-5'	GTC	AGG	GTA	CAG	AGT	CTC	CA	<i>p-FMV</i> /sense	150 bp
	p-FMV04-3'	TGC	CCA	CTA	ACT	TTA	AGT	CT	<i>p-FMV</i> /anti-sense	
4	PVY01-05'	GAA	TCA	AGG	CTA	TCA	CGT	CC	<i>PVY-cp</i> /sense	161 bp
	PVY01-3'	CAT	CCG	CAC	TGC	CTC	ATA	CC	<i>PVY-cp</i> /anti-sense	
5	p-FMV05-5'	AAA	AGA	GCT	GTC	CTG	ACA	GC	<i>p-FMV</i> /sense	225 bp
	PVY02-03'	TCC	TCC	TGC	ATC	AAT	TGT	GT	<i>PVY-cp</i> /anti-sense	

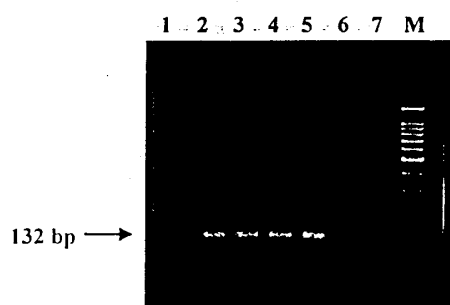


Fig. 2. Specificity of GM potato-specific (primer pair No. 2)

Arrow indicates the expected PCR amplification products.

Lane 1: negative control (no DNA); Lane 2: NL SPBT02-05 DNA; Lane 3: NL-P DNA; Lane 4: NL RBBT06 DNA; Lane 5: NL-Y DNA; Lane 6: non-GM potato (Russet Burbank) DNA; Lane 7: non-GM potato (Superior) DNA; M: 100 bp ladder size standard

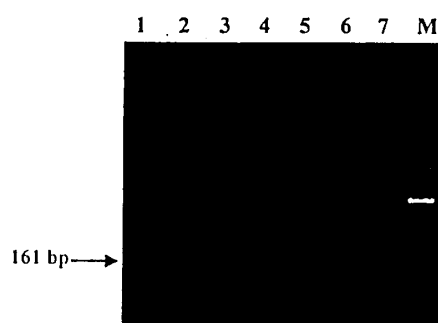


Fig. 4. Specificity of NL-Y-specific primers (primer pair No. 4)

Arrow indicates the expected PCR amplification products. See footnote for Fig. 2.

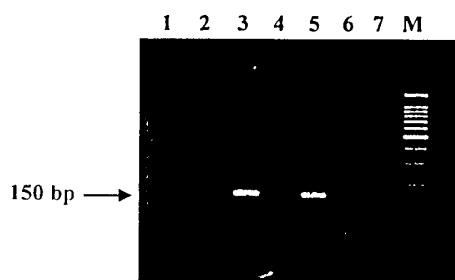


Fig. 3. Specificity of NL-P and NL-Y-specific primers (primer pair No. 3)

Arrow indicates the expected PCR amplification products. See footnote for Fig. 2.

て、No. 2 及び No. 3 のプライマー対は、Bt 菌やゴマノハグサモザイクウイルスが存在すると擬陽性の可能性が考えられる。そのため、No. 2 及び No. 3 を用いてバンドが検出された場合、NL^{*7} 及び NL-P¹¹⁾ を特異的に検出する

*7 日本農芸化学会 2002 年大会, p. 239 (平成 14 年 3 月)

プライマー対を用いて確認することが必要である。

3. NewLeaf Y 検知用プライマーの特異性の確認

次に、NewLeaf Y から抽出した DNA を鋳型とし、プライマー対 No. 4, 5 を用いて PCR を行った。その結果、どちらのプライマー対を用いたレーンでも、それぞれ予想される増幅バンド長の増幅産物が得られ、これらのプライマー対が NL-Y 検知に有効であることが明らかとなった。更に、得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、プライマー設計の際、NL-Y 標準品からの DNA の PCR 増幅産物をダイレクトシーケンスして得られた結果と一致した。

これらのプライマー対を実際の冷凍ジャガイモ加工品に応用したところ、プライマー対 No. 4 と No. 5 では検出できなかった。しかしプライマー対 No. 4 に関しては、*PVY-cp* 遺伝子内の領域を増幅するものであり、potato virus Y に感染していた場合にもバンドが増幅される可能性がある。著者らは、既にトウモロコシのスナック菓子^{*8} 及び缶詰パイナップル^{*9} より、組換え植物由来ではなく、微生物由来の可能性の非常に高い増幅産物を検知している。このため、既報の NL-P の検知法と同様に、2 生物に由来する連続した遺伝子領域を増幅するプライマー対 (No. 5) を用いることにより特異性の高い検知ができると考えた。プライマー対 No. 5 を用いて non-GM の 2 品種、GM でも

る NL, NL-P 及び NL-Y から抽出した DNA を鋳型とし、PCR を行った結果、NL-Y のみで特異的な増幅産物が検出され、特異性の高い検知が可能であることが明らかとなった。

なお、ジャガイモの DNA が存在しない陰性対照レーンでは、すべてのプライマー対で全く増幅バンドは検出されなかった。

4. ジャガイモ粉における組換え遺伝子検知感度の検討

Non-GM ジャガイモ粉に NL-Y を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5% となるように混合した GM ジャガイモ疑似混入試料から DNA を抽出し、PCR に供することにより、本検知法の検知感度を検討した。その結果、プライマー対 No. 5 を用いて検討したところ、予想されたバンドのみが特異的に増幅され、その検知下限は 0.05% であった (Fig. 6 lane 5~9)。なお内在性に含まれる PSS 遺伝子を標的としたプライマー対 No. 1 を用いた場合には、non-GM ジャガイモ及び NL-Y から目的とした増幅産物が検出された (Fig. 6 lane 3, 4)。プライマー対 No. 5 を用いたときの電気泳動写真を Fig. 6 に示す。

5. 検査対象品目である市販冷凍ジャガイモ加工品の実態調査

次に、プライマー対 No. 5 を用いて、東京都内で購入した冷凍フライドポテト 8 検体、マッシュポテト 2 検体、市販スナック菓子 9 検体、レトルトスープ・シチュー類 3

検体、コロッケ・惣菜類 3 検体 ジャガイモでんぶん 1 検体のジャガイモを原料として用いた加工品について NL-Y が含まれているか検知を行った (Table 2)。その結果、レトルトスープ・シチュー類 1 検体で陽性対照プライマー対でバンドが検出されず、検出不能であった。その他の検体は、陽性対照プライマー対を用いたレーンで増幅バンドが検知された。また測定不能であったレトルトスープ・シチュー類 1 検体を除くすべての検体から GM 特異的なプライマー対 No. 5 を用いたレーンで増幅バンドが検知されなかった。これらの結果より、今回使用したジャガイモを

Table 2. Results of NewLeaf Y Monitoring in Processed Foods

Food item	Producing company	PSS 01n-5' p-FMV05-5'	
		PSS 01n-3' No. 1	PVY02-3' No. 5
Snack	A	+	-
Snack	B	+	-
Snack	C	+	-
Snack	D	+	-
Snack	D	-	-
Snack	D	+	-
Snack	E	+	-
Snack	F	+	-
Snack	G	-	-
Mashed potato	H	-	-
Mashed potato	I	+	-
Stew or soup	J	-	-
Stew or soup	K	-	-
Stew or soup	L	-	-
Side dish	M	-	-
Frozen food	N	-	-
Croquette	O	-	-
Starch	P	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	-	-
Frozen fried potato	Imported	+	-
Frozen fried potato	Imported	+	-
Frozen fried potato	Imported	+	-

+: positive, -: negative

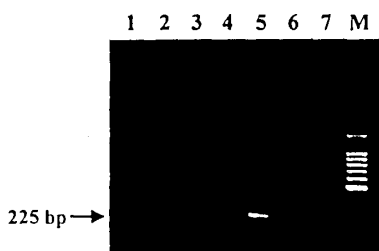


Fig. 5. Specificity of NL-Y-specific primers (primer pair No. 5)
Arrow indicates the expected PCR amplification products. See footnote for Fig. 2.

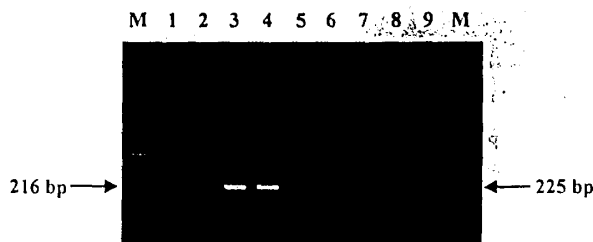


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from potato DNA containing various amounts of NL-Y
Arrowheads indicated the expected PCR amplification products for PSS (216 bp) and NL-Y (225 bp). Primer pair No. 1 (Lanes 3 and 4). Primer pair No. 5 (Lanes 1, 2 and 5~9).
Lane 1: no potato DNA; Lanes 2 and 3: non-GM DNA; Lane 4: NL-Y DNA; Lane 5: potato DNA containing 0.01% NL-Y; Lane 6: potato DNA containing 0.05% NL-Y; Lane 7: potato DNA containing 0.1% NL-Y; Lane 8: potato DNA containing 0.5% NL-Y; Lane 9: potato DNA containing 1.0% NL-Y; M: 100 bp ladder size standard

原料とした加工品にはNL-Yが混入していないことが明らかとなった。

以上、日本で安全性審査未終了(平成14年6月現在)のNL-Yについて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いた検知法を検討し、検査対象品目である冷凍ジャガイモ加工品及びその他のジャガイモ加工品を対象として、特異性の高い組換え遺伝子の検知法を確立した。

謝 辞

本研究の一部は、厚生科学研究費補助金「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」による。

文 献

- 1) 厚生省告示第232号“食品、添加物等の規格基準の一部改正”平成12年5月1日。
- 2) 厚生省告示第233号“組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き”平成12年5月1日。
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第110号“組換えDNA技術応用食品の検査方法について”平成13年3月27日。
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第158号“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成13年5月25日。
- 5) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 40, 149-157 (1999).
- 6) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A method of detecting recombinant DNA from genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 41, 137-143 (2000).
- 7) Matsuoka, T., Kuribara, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 24-32 (2001).
- 8) Matsuoka, T., Kuribara, H., Suefuji, Y., Miura, H., Akiyama, H., Kusakabe, Y., Goda, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 197-201 (2001).
- 9) Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M., Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 42, 231-236 (2001).
- 10) Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., Tumer, N. E., Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology (NY)*, 8, 127-134 (1990).
- 11) Akiyama, H., Sugimoto, K., Matsumoto, M., Isuzugawa, K., Shibuya, M., Goda, Y., Toyoda, M., A detection method of recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Plus[®] Potato) and detection of NewLeaf Plus[®] Potato in snack. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 43, 24-29 (2002).

附件二十一

Primers for Potato Qualitative PCR

Pss primer pair (for detection of the potato endogenous gene) 216-bp

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

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

New Leaf Y detection primer pair (cross over FMV and PVC-cp gene) 225-bp

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

R-primer : NLYd3' (PVY02-3'): 5'-TCC TCC TGC ATC AAT TGT GT-3'

PVY-cp gene detection primer pair (for NLY confirmation) 161-bp

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

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

New Leaf plus detection primer pair (cross over FMV and PLRV-rep gene) 234-bp

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

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

PLRV-rep gene detection primer pair (for NLP confirmation) 172-bp

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

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

FMV promoter detection primer pair 150-bp

F-primer : p-FMV04--5' : 5'- GTC AGG GTA CAG AGT CTC CA-3'

R-primer : p-FMV-3' : 3'- TGC CCA CTA ACT TTA AGT CT-3'

CryIIIA gene detection primer pair 132-bp

F-primer : p-CryIIIA-5' : 5'- TGG GAA AGC ATT CAT GGA GC-3'

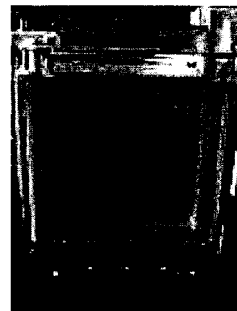
R-primer : p-CryIIIA-3' : 3'- TGG ACA ATG CAC TCA CGT AG-3'

附件二十二

食品中過敏原（雞蛋、牛奶）之 Western blot 檢驗 part 2

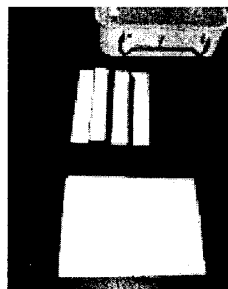
Electrophoresis (90 min)

	SDS Gel 1 (detect egg)	SDS Gel 2 (detect milk)
Lane 1	Marker	Marker
Lane 2	10% albumin standard	10% casein standard
Lane 3	5% albumin standard	5% casein standard
Lane 4	1% albumin standard	1% casien standard
Lane 5	Sample 1	Sample 1
Lane 6	Sample 2	Sample 2
Lane 7	Marker	Marker
Lane 8	10% ovomucoid standard	10% β -lactogloblin standard
Lane 9	5% ovomucoid standard	5% β -lactogloblin standard
Lane 10	1% ovomucoid standard	1% β -lactogloblin standard
Lane 11	Sample 1	Sample 1
Lane 12	Sample 2	Sample 2

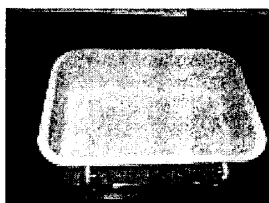


於電泳期間準備 blotting 所需之濾紙及 Hybond-P 轉印膜

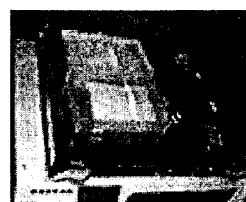
剪裁濾紙及 Hybond-P



Hybond-P 以甲醇活化



濾紙及 Hybond-P 浸泡於 Blotting buffer 30 min



附件二十二

Blotting (60 min)

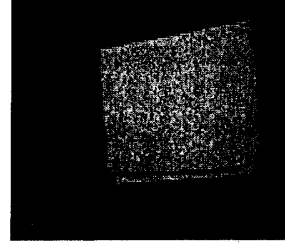
拆下 SDS Gel



設置 Hybond-P



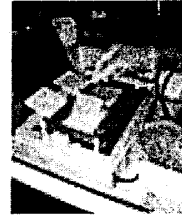
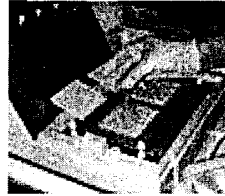
設置 SDS gel



開始 transfer



結束 transfer



Blocking (60 min)

Blocking and stain gel



Developing

1st antibody binding (60 min)

↓ wash 3 time (15 min)

2nd antibody binding (60 min)

↓ wash 3 time (15 min)

Alkali phosphatase conjugated Avidin-Biotin incubation(20 min)

↓ wash 3 time (15 min)

Tris/HCl equilibrium (15 min)

↓

Substrate adding, ddH₂O washing and incubate at dark (15 min)

↓

附件二十二

Air dry at dark

Result :

	Egg		Milk	
	Ovalbumin 50K Da	Ovomucoid 38K Da	Casein 33~35K Da	β -lactoglobulin 18.4K Da
Sample 1	+	-	+	-
Sample 2	+	+	+	+

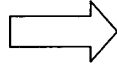
Sample 1 驗出 **Ovalbumin** 及 **Casein**，故成分中含雞蛋及牛奶。

Sample 2 驗出 **Ovalbumin**、**Ovomucoid** 及 **Casein**、 **β -lactoglobulin**，故成分中含雞蛋及牛奶。

Protocol for Mixing GM Sample Powder

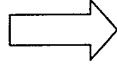
檢查確認檢體

(文件審閱、定性確認、目視挑選)



磨粉

(直徑 $500\ \mu\text{m}$ 以下粉末)



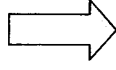
冷凍乾燥

(冷凍乾燥24小時)

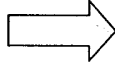




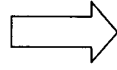
混合non GM及GM粉末
(混合、再混合標準程序)



再磨粉



再混合粉末





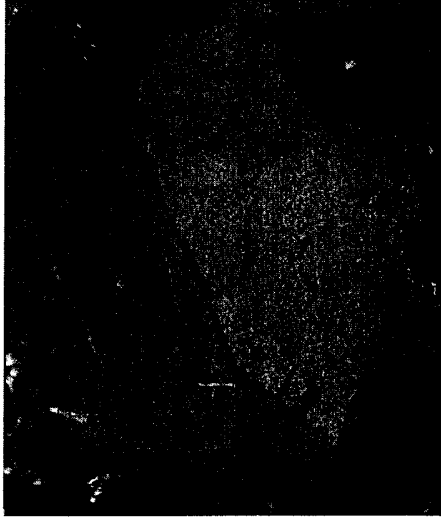
獨立隔離無空調配室



添加 GM
sample到
NON GM
Sample

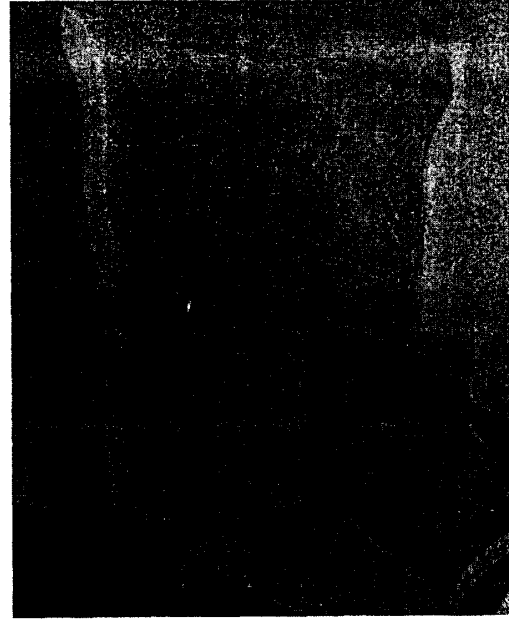
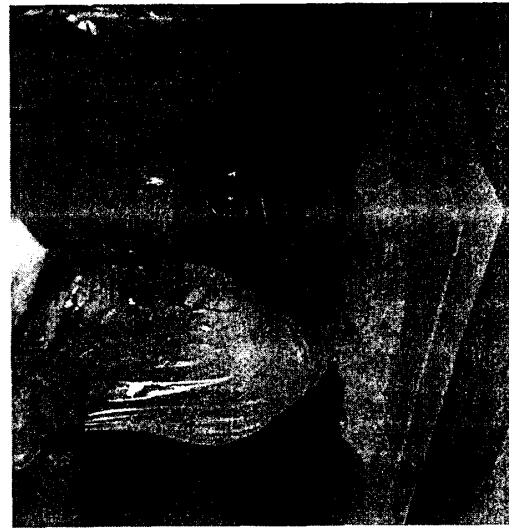


精確稱取

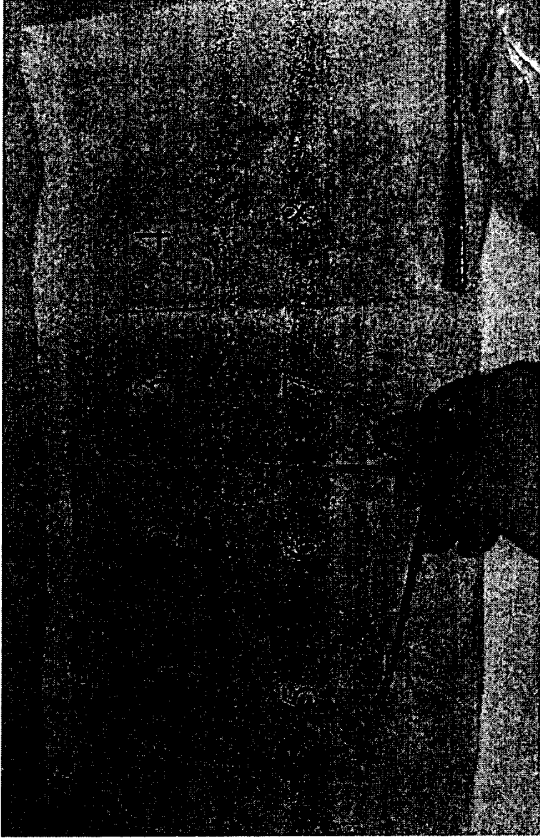




混合檢體,以一
長方形的六
面爲面向,依序
一面向輪轉混
合,每混完一次
六面向.爲一回
合.共需20回合

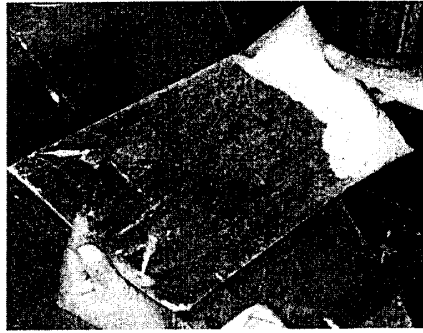
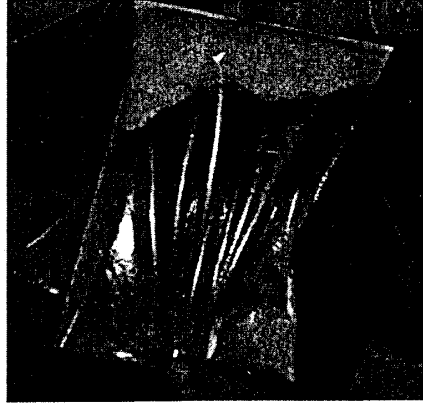


混合後,將
混粉末平舖
於白紙上成
衣長方形



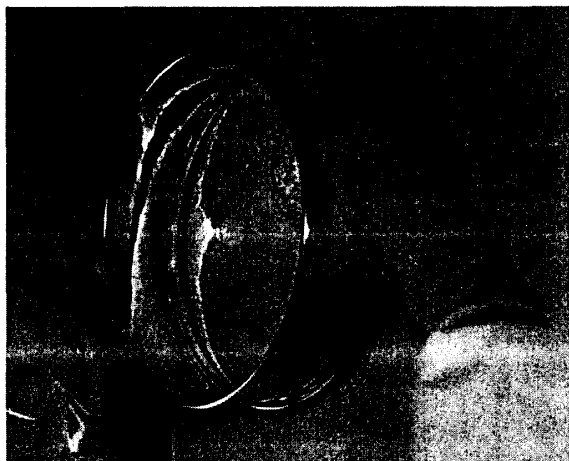
第一與第八塊混合為A袋
第二與第七塊混合為B袋
第三與第六塊混合為C袋
第四與第五塊混合為D袋

附件二十三

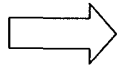


每一袋再進行六面向旋轉混合二十次

過篩



再以研磨機磨粉



確認

取10個混合後檢體樣品（每個含1g檢體粉末）進行均勻度確認



徹底清洗

附件二十四

Protocol for Mixing GM Containing Sample Powder

檢查確認檢體

non-GM 種子必須事先卻認為 non-GM，GM 種子必須事先卻認沒有其他 GM 污染。目視挑選出破碎、不完整之穀粒及雜物後凍存於 -80°C ，隔日使用。



磨粉

以磨粉機粉碎檢體為 $500\mu\text{m}$ 以下之粉末後，將檢體粉末凍存於 -80°C ，隔日使用。



冷凍乾燥

凍存之粉末檢體進行冷凍乾燥 24 小時



混合粉末

non GM 和 GM 粉末混合，混合方法見「混合、再混合標準程序」



再磨粉

以磨粉機粉碎檢體為 $500\mu\text{m}$ 以下之粉末



再混合粉末

再混合方法見「混合、再混合標準程序」



確認

取 10 個混合後檢體樣品（每個含 1g 檢體粉末）進行均勻度定量確認

附件二十五

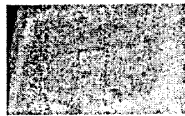
混合、再混合標準程序

步驟一 使用乾淨之塑膠袋裝盛預備混合之檢體將塑膠袋口綁緊並使其中充滿空氣

步驟二 假想該混合用塑膠袋為一正六面體，依序翻動使每一面都向上為一次混合，共需進行二十次混合



步驟三 將混合後之檢體粉末倒於一乾淨之 A3 白紙，小心舖平成衣長方形，並將長方形分割成均等之八個小長方形，並編上 1 至 8 號。



1	2	3	4
5	6	7	8

步驟四 取 1 號與 8 號小長方塊內之粉末於編號 A 之乾淨塑膠袋；取 2 號與 5 號小長方塊內之粉末於編號 B 之乾淨塑膠袋；取 3 號與 7 號小長方塊內之粉末於編號 C 之乾淨塑膠袋；取 4 號與 6 號小長方塊內之粉末於編號 A 之乾淨塑膠袋。

步驟五 A、B、C 及 D 袋分別以步驟一及步驟二進行混合

步驟六 將 A 及 C 袋粉末混合後，以步驟一及步驟二進行混合；將 B 及 D 袋粉末混合後，以步驟一及步驟二進行混合。

步驟七 將 A+C 袋與 B+D 袋混合檢體過篩後收集



附件二十六

動物性食品(尤其是禽畜類)的過敏原不能用偵測DNA的方式(如PCR)檢驗。因為大部分的動物性食品可以區分為不同的動物組織或器官來選擇食用，而又因為基因的組織特異性表現(tissue-specific expression)，在不同的動物組織器官，蛋白質成分組成含量各異，然而不同的組織器官的DNA都是一樣的。例如吃雞蛋會過敏的人，可能是因為雞蛋裏高量的ovoalbumin所致，而雞肉裏根本沒有ovoalbumin表現，如果用PCR方法檢驗，在雞蛋和雞肉都可以偵測到ovoalbumin基因。牛肉跟牛奶也一樣，牛奶有大量casein而牛肉裏幾乎沒有該蛋白質，然而兩者都含一樣的DNA。所以動物性食品僅能用偵測蛋白質的方式(如Western Blotting)檢驗。也許不區分組織部位來選擇實用的動物性食品可以用偵測DNA的方式(如PCR)檢驗過敏原，如蝦、蟹、貝之類，人吃這些食品不會分吃卵還是肉。

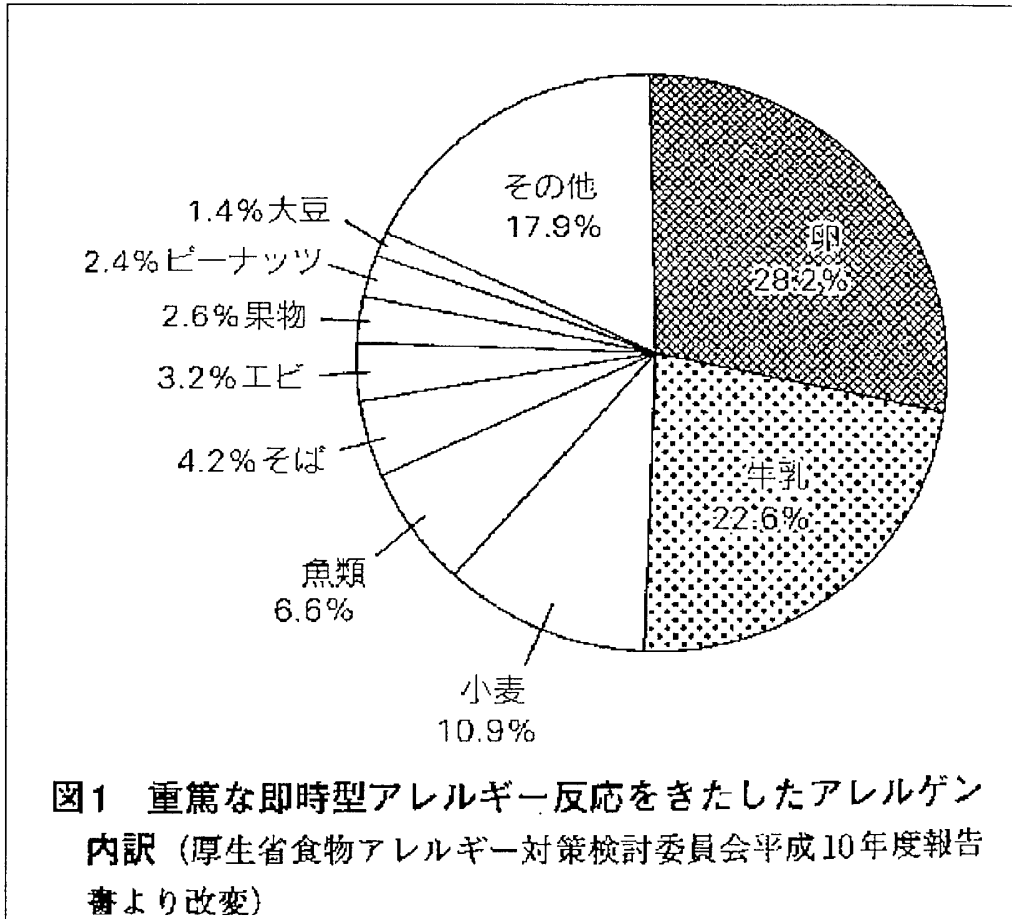
植物性食品(尤其是穀類豆類)的過敏原可以用偵測DNA的方式檢驗。這是因為很少有區分組織部位食用的植物性食品。例如吃花生不分吃胚芽還是吃胚乳，所以植物性食品(穀類豆類等)，沒有gene的基因的組織特異性表現的問題。但是像地瓜之類也許就不行，假如有人吃地瓜肉會過敏而吃地瓜葉不會。

反過來，植物性食品之過敏原卻不太能用Western Blotting做檢驗。因為很多植物(尤其是穀類和豆類)食品，其種源(variety)太相近，蛋白質的胺基酸序列(amino acid sequence)變異性低，例如小麥主要過敏原是gliadin 但是大麥、蕎麥甚至小米都有高度保留的同原蛋白質(highly reserved homolog protein)，但是吃小麥會過敏的人 不一定會對其他穀類過敏。雖然差一兩個胺基酸就可能是或不是

附件二十六

致一個過敏物質，然而很難開發可以專一性區別一兩個胺基酸的抗體。現在也沒有這種抗體的商業販售，若要開發，可能需要花很多時間和金錢，而且不一定成功。

1998年厚生省食品過敏原対策検討委員会調査報告

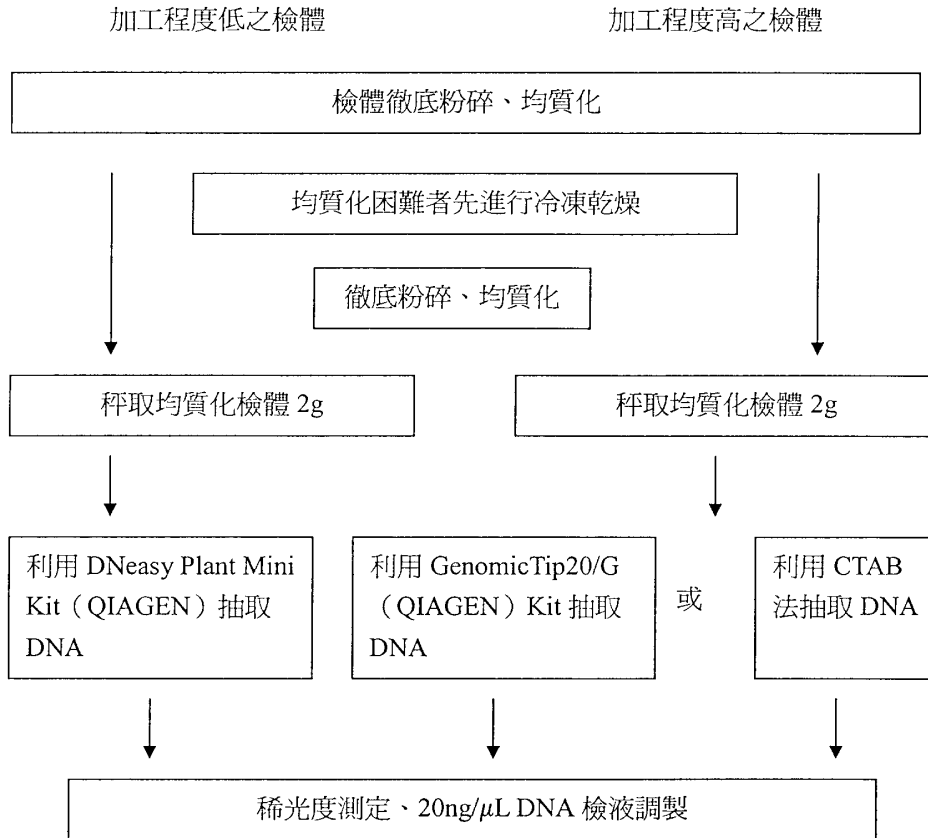


ピーナッツ---花生
エビ-----蝦子
そば-----蕎麥(麵)

附件二十八

食品中過敏原檢查法初譯之三

食品中過敏原 PCR 檢測檢體 DNA 抽取方法選擇



附件二十八

食品中過敏原檢查法 DNA 抽取法

<一> DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 法

Weight 2 g of ground sample, put into a 50 mL tube (polypropylene centrifuge tube)

↓
Add 10 mL of AP1 buffer (pre-warmed at 65°C)
Add 10 μ L of RNase A

↓
Vortex to mix very well, then incubate at 65°C for 15 min

↓
Invert the tube several times to mix

↓
Add 3.25 mL of AP2 buffer, then incubate at room temperature (RT) for 5 min

↓
3,000 \times g centrifugation at RT for 5 minutes

↓
Transfer supernatant to a new tube quickly (avoid to transfer pellet and upper-layer lipids)

↓
Load 3 mL supernatant (500 μ L per time) to a QIAshredder spin column

↓
10,000 \times g centrifugation at RT for 2 minutes

↓
Transfer flow-through to a new 15 mL tube (finally ~3 mL flow-through is obtained)

↓
Add 1.5 \times volume of AP3/Ethanol solution
AP3 : Ethanol (96~100%) = 1 : 2 (V/V)

↓
Vortex for about 10 seconds with maximum

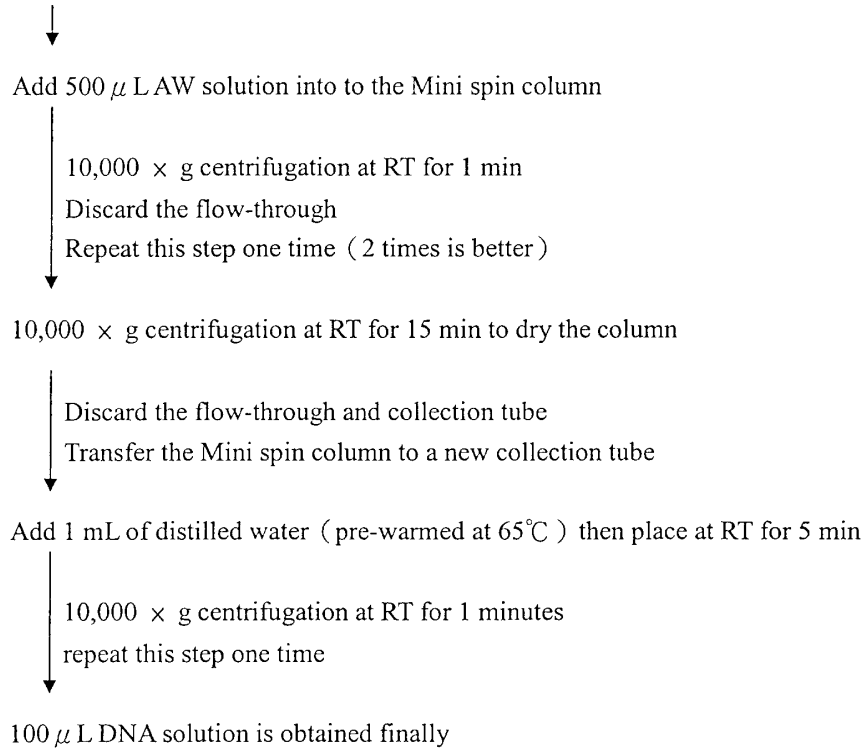
↓
Apply 500 μ L per time to the Mini spin column

↓
10,000 \times g centrifugation at RT for 1 min

↓
Discard the flow-through

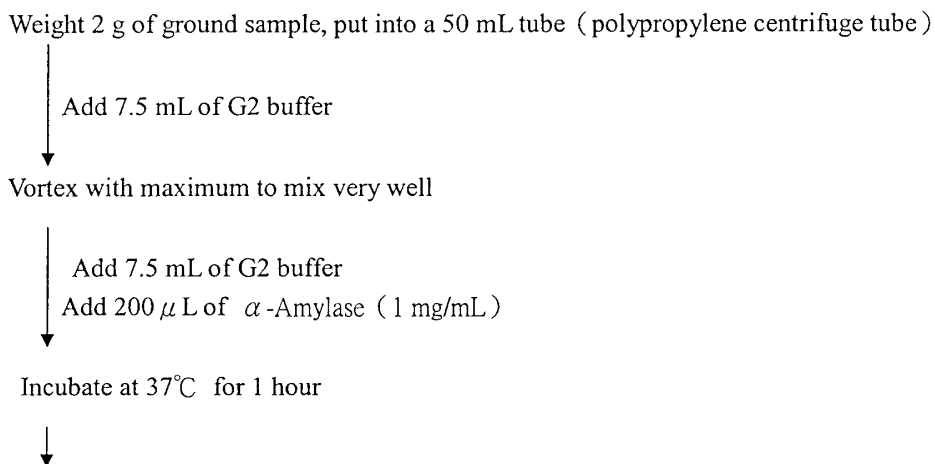
↓
Repeat this step until all the sample solution pass through Mini spin column

附件二十八

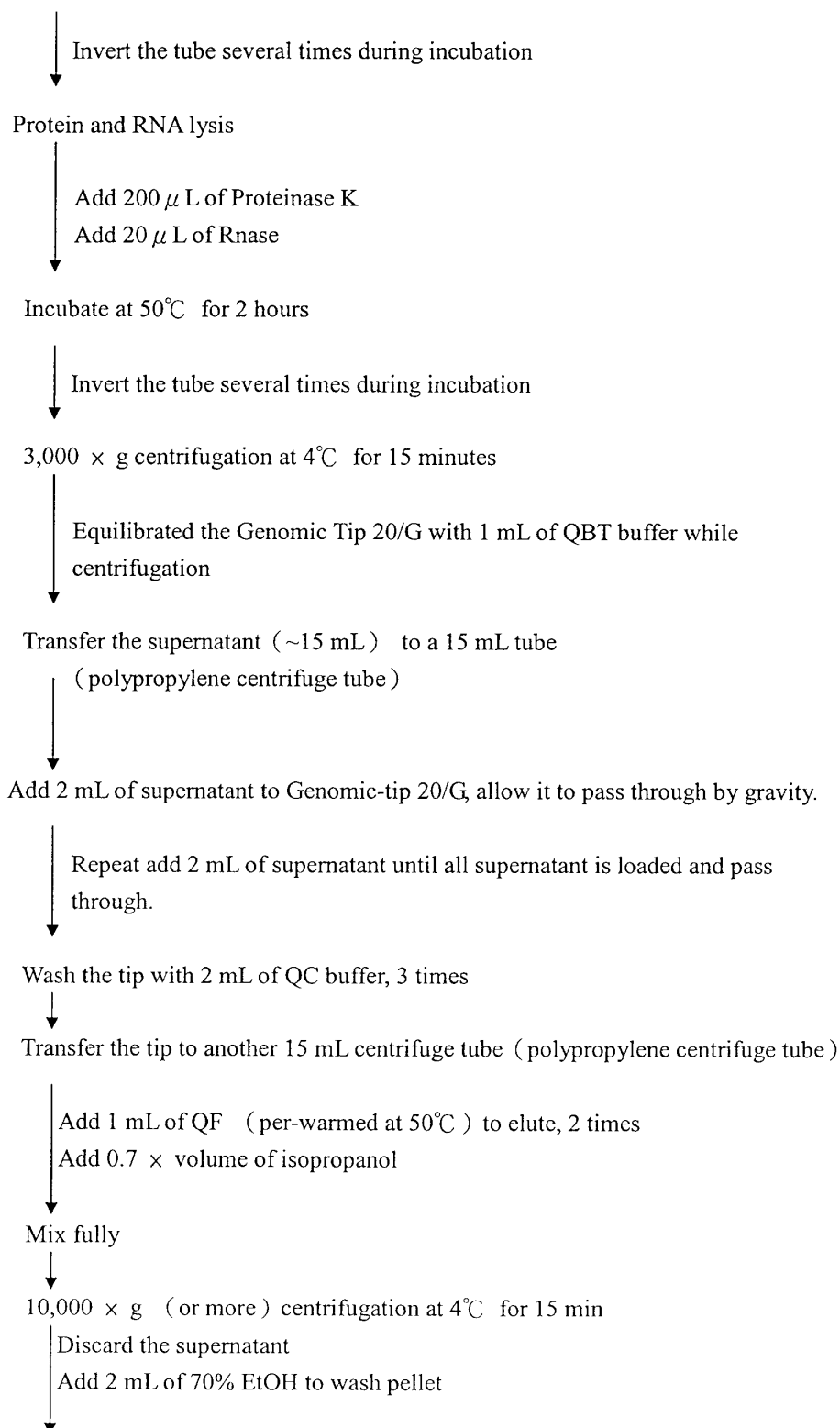


This method is used to extract DNA from lowly processed 、 low sugar containing and low fat containing food samples mainly.

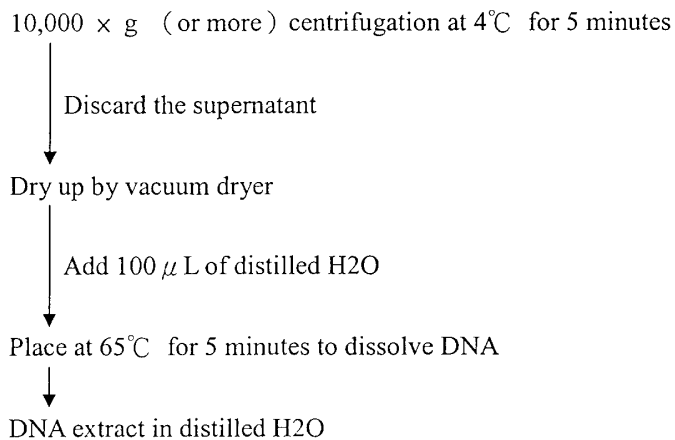
<二> DNeasy Genomic Tip 20/G Kit (QIAGEN) 法



附件二十八



附件二十八



This method is mainly used to extract DNA from highly processed including high sugar containing、high fat containing、heat treatment and fermentation food samples.

<三> CTAB 法

Weight 2g of sample, put in a 50 mL polypropylene centrifuge tube

- | ← Add 15 mL CTAB extraction solution *¹
- | To homogenize completely (using a homogenizer is recommend)
- | Incubate at 55°C for 30 min (with shaking)
- | Transfer 600 μL to a new 1.5 mL eppendorf tube

Phenol and Chloroform treatment

- | ← add 500 μL phenol/chloroform *², vortex vigorously to mix well
- | 7,500× g centrifugation at RT for 15 min, transfer up-layer solution (~ 600 μL) to a new 1.5 μL eppendorf tube

Chloroform treatment

- | ← add 500 μL chloroform/Isoamyl alcohol *³, vortex vigorously to mix well
- | 7,500× g centrifugation at RT for 15 min, transfer up-layer solution (~ 600 μL) to a new 1.5 μL eppendorf tube

Isopropanol precipitation

- | ← add the same volume isopropanol (~ 600 μL) into the new tube, then invert this tube several times to mix well
- | 7,500× g centrifugation at RT for 15 min, discard supernatant
- | ← add 500 μL 70% alcohol, wash carefully

附件二十八

- | 7,500× g centrifugation at RT for 1 min, discard supernatant
- | vacuum dry for 2~3 min

dissolve DNA and remove RNA

- | add 50 μ L TE to dissolve DNA well (place at RT for 15 min and mix several times)
- | ← add 5 μ L RNase (10mg/mL), then incubate at 37°C for 30 min
- | ← add 200 μ L CTAB extraction solution, mix well

Chloroform treatment

- | ← add 250 μ L chloroform/Isoamyl alcohol, mix gently
- | 7,500× g centrifugation at RT for 15 min, transfer up layer solution to a new eppendorf tube

Isopropanol precipitation

- | ← add 200 μ L isopropanol, invert several times to mix well
- | 75,00× g centrifugation at RT for 10 min, then discard the supernatant
- | ← add 200 μ L 70% alcohol , invert to mix
- | after 75,00× g centrifugation at RT for 1 min, discard supernatant
- | vacuum dry for 2~3 min

Dissolve DNA

- | ← add 50 μ L ddH₂O to dissolved DNA

DNA sample solution

*1 CTAB extraction solution

8 mL 0.5mM EDTA (pH 8.0) + 20 mL 1M Tris/HCl (pH 8.0) + 56 mL 5M NaCl + H₂O 150 mL + 4g CTAB stir to dissolve. After dissolve well, add H₂O to a final 200 mL volumn. Autoclave.

*2 Phenol / Chloroform

1M Tris/HCl (pH 8.0) saturated phenol: Chloroform/ Isoamyl alcohol =1:1 (v/v)

*3 Chloroform : Isoamyl Alcohol (CIA)

Chloroform : Isoamyl Alcohol=24:1

This method can be used to extract DNA from both lowly processed and highly processed food samples. However, Genomic Tip 20/G method is recommend when extract DNA from highly processed food samples.

附件二十九

抽取 New Leaf potato DNA

Sample : SPB T0205 及 RBB T0206

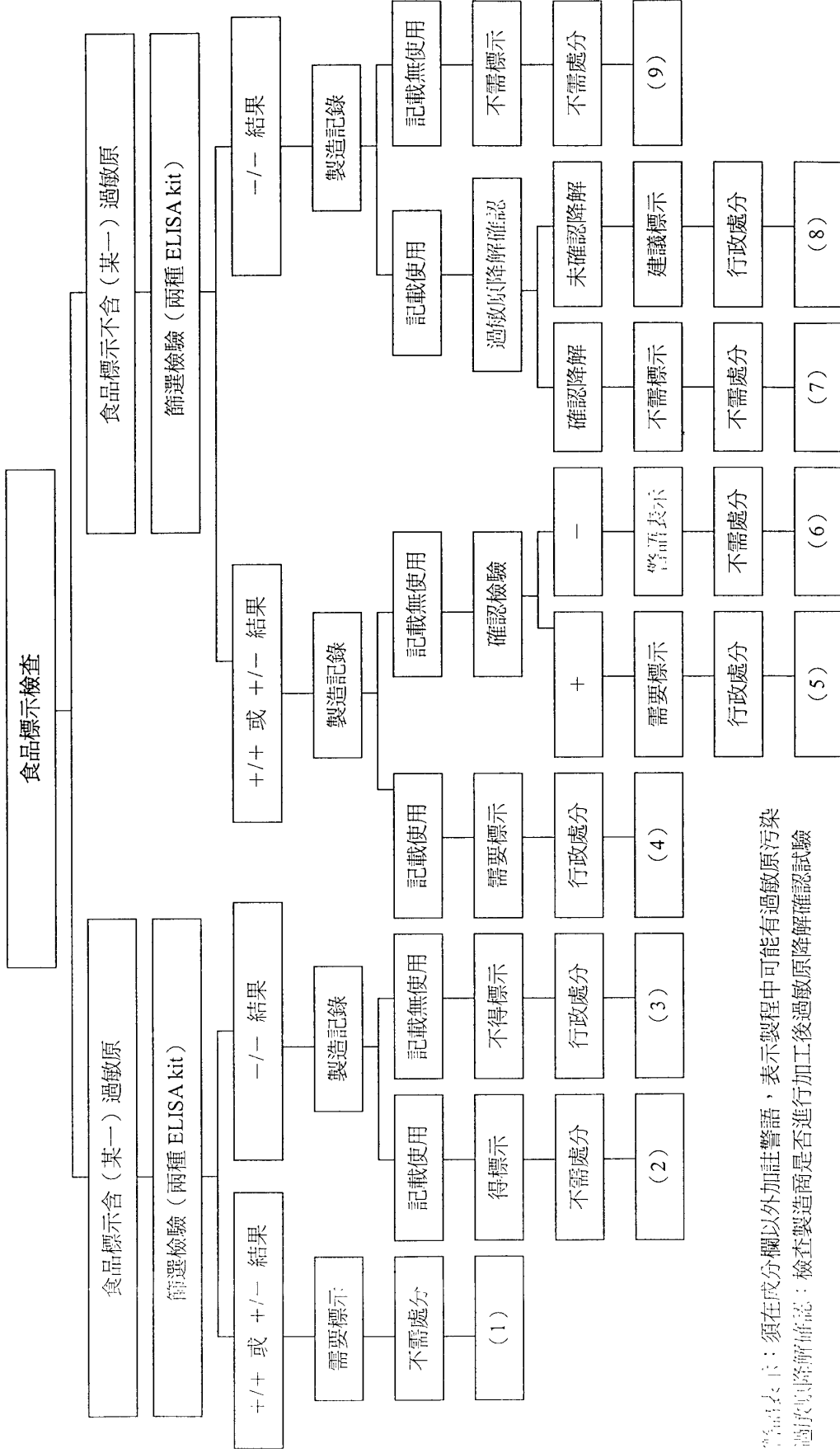
Method : CTAB method

DNA conc. :

New leaf	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA Conc. (ng/uL)
	230nm	260nm	280nm	320nm			
SPB T0205	0.112	0.225	0.123	0.001	1.829	2.009	112.5
RBB T0206	0.068	0.152	0.083	-0.001	1.831	2.235	76.0

附件三十

食品中過敏原檢查結果與處置判斷樹



警告表示：須在成分欄以外加註警語，表示製程中可能有過敏原污染
 過敏原降解確認：檢查製造商是否進行加工後過敏原降解確認試驗

附件三十一

New Leaf potato DNA 確認

Qualitative PCR : Primer UGPase011-5 and primer UGPase011-5 for endogenous gene, amplicon : 111 bp

Primer set NL012 (25 μ M mixed) specific for NL detection, amplicon : 113 bp

Both of the primer set are closed.

10 \times PCR buffer	2.5 μ L
25 mM MgCl ₂	1.5 μ L
2 mM dNTP	2.5 μ L
5 μ M F-primer	2.5 μ L
5 μ M R-primer	2.5 μ L
5U/ μ L AmpliTaq Gold	0.125 μ L
DW	10.875 μ L
DNA	2.5 μ L
Total	25 μ L

95°C 10 min

95°C 30 sec

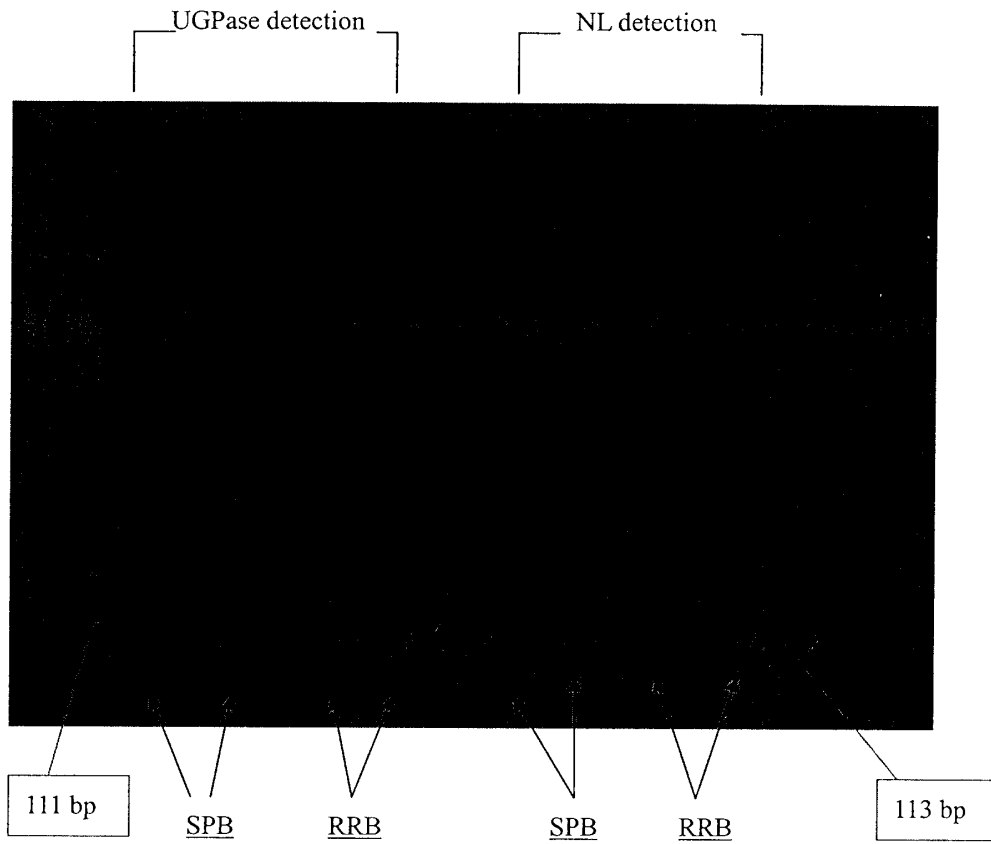
60°C 30 sec

72°C 30 sec

72°C 7 min

4°C

附件三十一



lane2,3,6,7 是同一個 SPB DNA, lane4,5,8,9 是同一個 RRB DNA. 不知為何,有幾個 PCR 反應沒有出來。但 DNA 應該是 NL 沒錯。

附件三十二

馬鈴薯定量精度試驗

各種含量 GM 樣品調製—Non GM 樣品選擇與取得

一、Non GM 的選擇

目前三種品系的 GM 馬鈴薯，New Leaf、New Leaf plus 及 New Leaf Y 的 raw copy number (用 UDP-GP gene 當 endogenous gene 時) 都不同，且不同時間(次) 抽的 DNA，檢測值都不一樣，根據我看到的 Data，New Leaf (Superior) raw copy number 約 17,000，和 New Leaf plus (Russet Burbank) 的 raw copy number 約 34000，平均約差兩倍，New Leaf Y (Shepody) 的值，則還在檢測中。因此在目前，馬鈴薯定量比大豆玉米都要複雜。

NIHS 測試了八種日本本土馬鈴薯，不幸的是，沒有一個本土種馬鈴薯的 raw copy number (用 UDP-GP gene 當 endogenous gene 時) 和任何一種 GM 馬鈴薯接近。本土種馬鈴薯大致上分成兩組，一組的 raw copy number 約為 40000，另一組的 raw copy number 則約為 60000。

因此 NIHS 決定選擇用 GM 馬鈴薯的母系 (parents strain) 當做定量檢驗之 Non GM。最後是選用 Russet Burbank，因為 Russet Burbank 同時是 New Leaf RB (RBBT0206/BT6) 和 NLPlus (RBMT21-350) 的 parents strain，而且其 raw copy number 比 Superior 高 (用 UDP-GP gene 當 endogenous gene 時)，可以避免將以 raw copy number 較低之 Non GM 馬鈴薯 (如 Superior) 為摻混母體時，定量檢驗之判定皆成高估之結果。此外，根據實驗結果，Shepody 之 DNA 抽取效率比其他兩品種高兩倍，也就是說 Russet Burbank 和 Superior 抽取 DNA，最後可得 100~150 ng/ μ L 的 DNA (100 μ L)，但是 Shepody 卻可以得到 200~300 ng/ μ L 的 DNA (100 μ L)。這也許會影響定量結果。綜合上述事實，日方先選 Russet Burbank 為 Non GM 馬鈴薯。

二、Non GM 的取得

NIHS 目前有一些 Shepody、Russet Burbank 和 Superior 的馬鈴薯檢體，但是

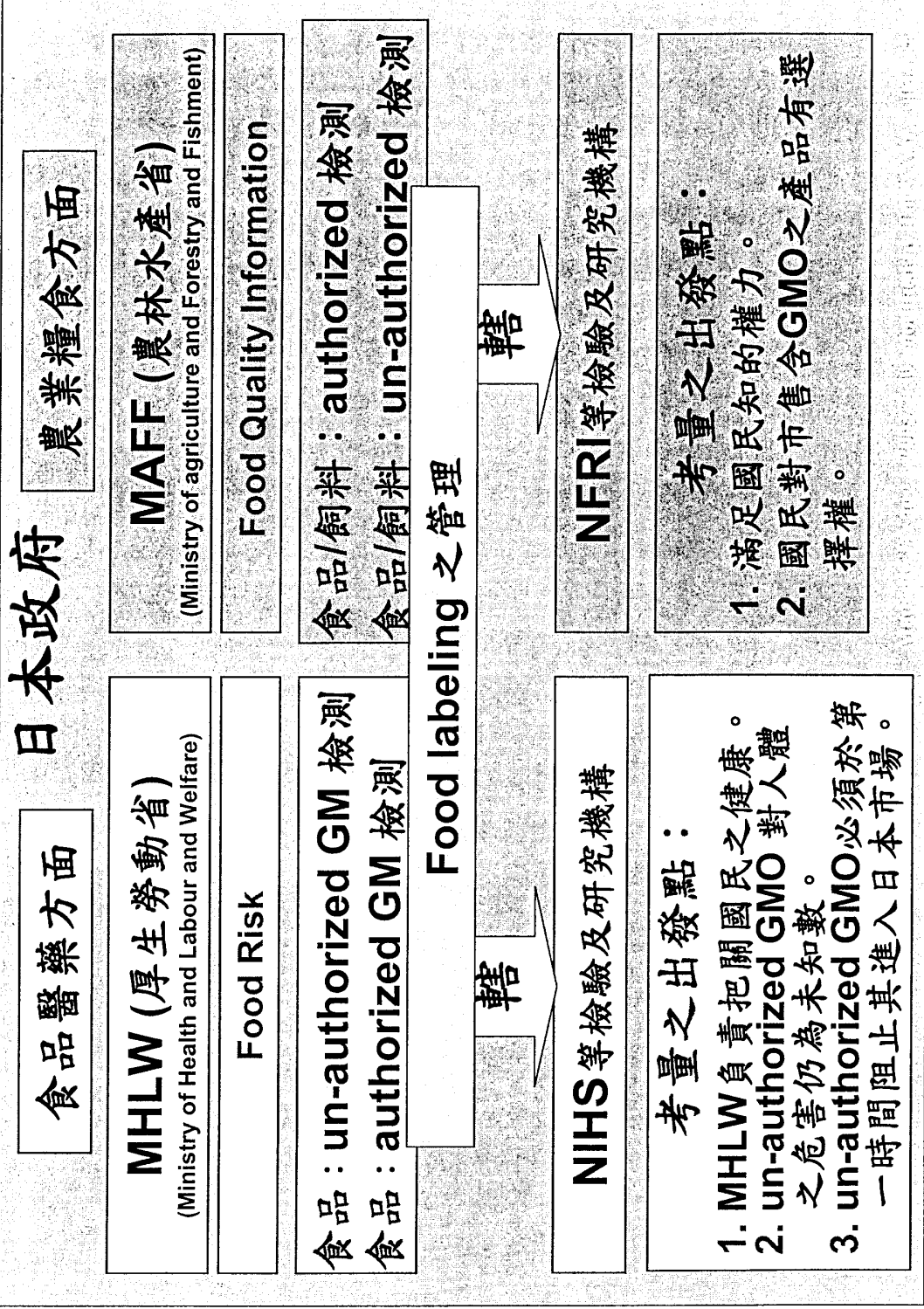
附件三十二

量很少，完全不敷調配各種含量之檢體供精度試驗使用。NIHS 曾嘗試向美加地區的種苗公司購買，但是礙於日本防疫法律規定，生鮮的外國馬鈴薯禁止進口，包括切片、切丁、磨粉的，只要是熟的都不得進口(為防堵境外病蟲害進入日本)。雖然可以買到冷凍乾燥的粉末檢體，但是因為精度試驗的 Non GM 需要量頗大，而且最好可以使用確定 100% Non GM 的檢體(亦即需要完整的馬鈴薯，以便一顆顆確認其為 100%Non GM)。所以，NIHS 想要取得完整的 Non GM Russet Burbank。最後，NIHS 和農林水產省的種苗管理中心合作，取得(以秘密方法) 5 顆生鮮 Russet Burbank 馬鈴薯，把每一顆切成數小塊後，種植於種苗管理中心的北海道分所，今年秋天第一批日本本土生產 Russet Burbank 即將要收成，目前產量預計只有 1 公斤，還是不夠調配精度試驗樣品之需要量。

三、改善 raw copy number 不同

現在擬定的馬鈴薯定量方法是以 UDP-GP gene 當 endogenous gene，但是存在各品種馬鈴薯間 raw copy number 相異的問題，確實會影響到定量的準確性。因此 NIHS 亦正準備改善這個問題。策略是改變 endogenous gene，亦即要找一個更佳的 endogenous gene，這個 endogenous gene 在各品種馬鈴薯中必須有相似的 raw copy number，或者是在大多數品種馬鈴薯中要相似。這也就是說，全部的實驗要重做，包括 primer 及 probe 設計，求 CV 值、精度試驗等。Dr. Watanabe 透漏下一個選定的 endogenous gene 是 TATA box binding protein gene，並將開始執行這個實驗 program。

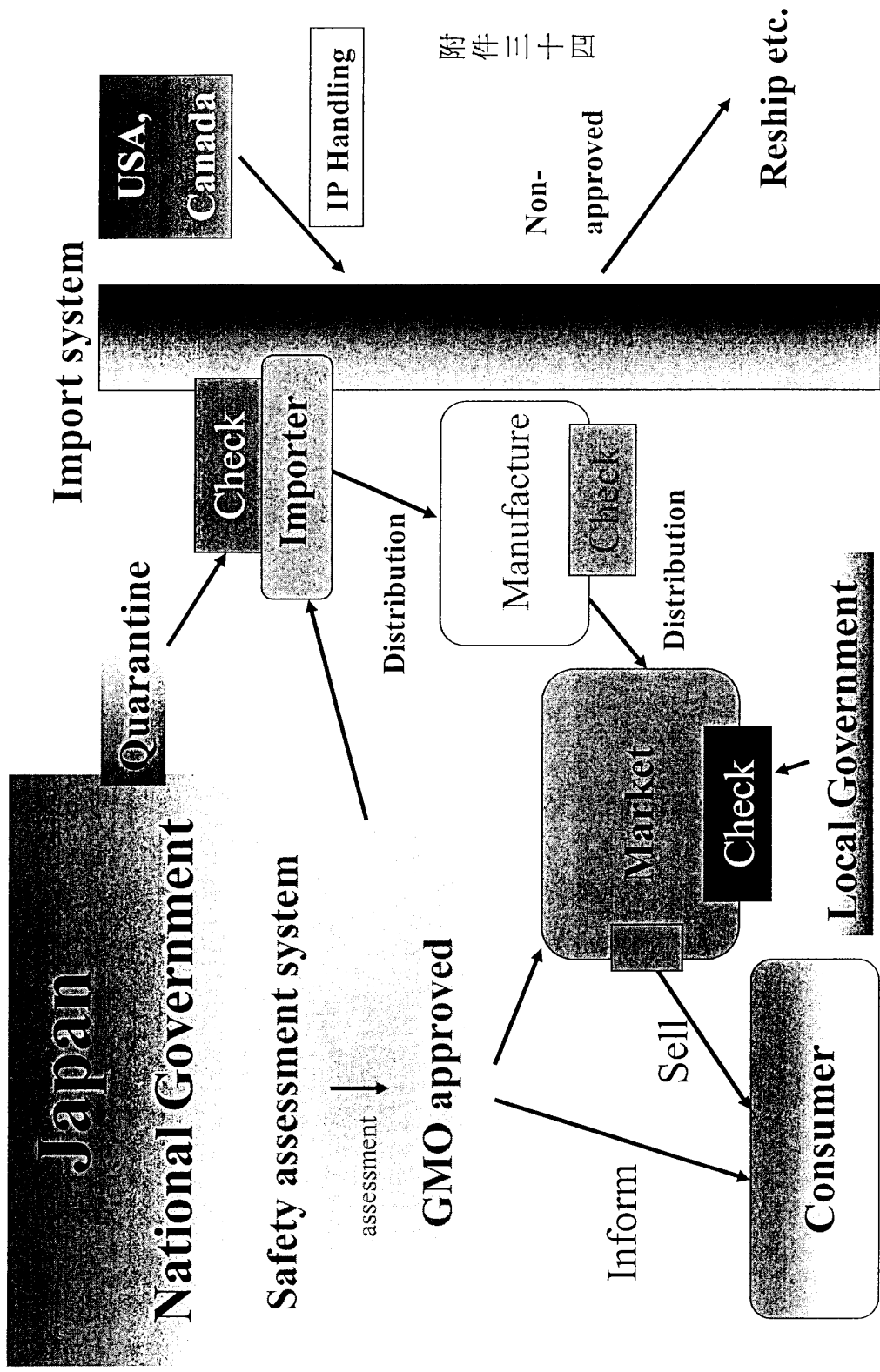
NIHS 及 NFRI 權責劃分表



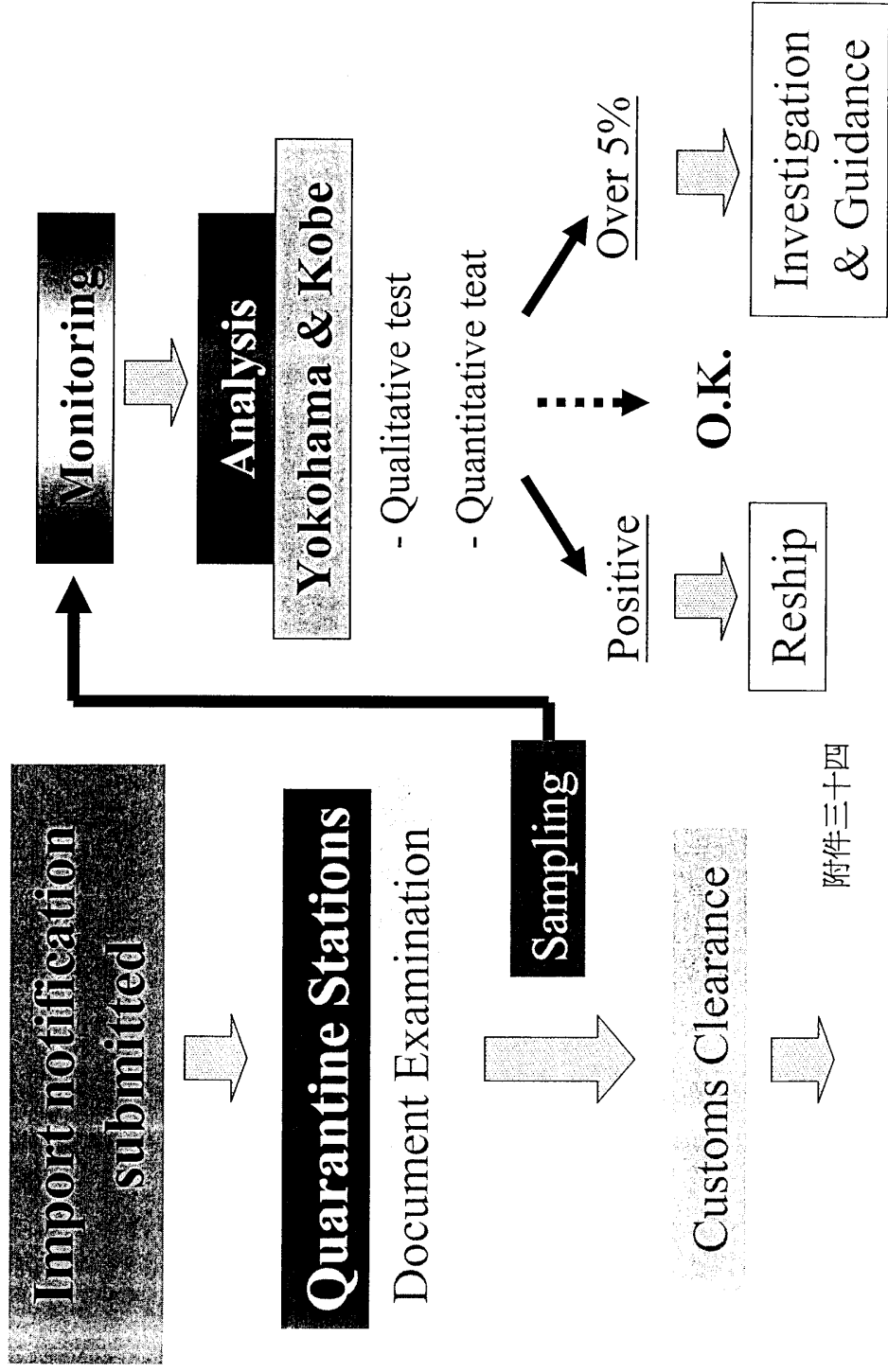
Monitoring of GM Foods in Japan



Flow of GM foods in Japan



Ordinary monitoring procedure



Monitoring

National quarantine offices

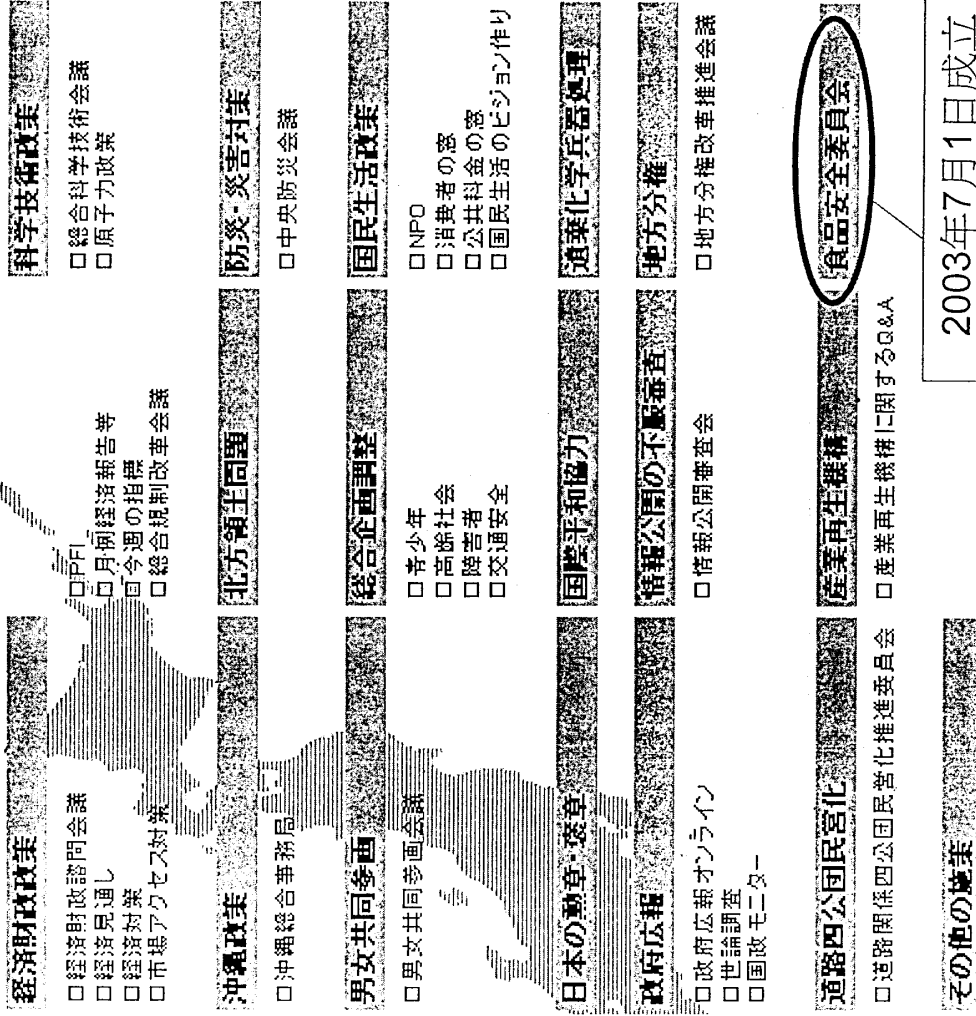
- 264 Food Sanitation Inspectors
 - To check whether non-approved GM is contained
 - To check whether import notification form is appropriate

Local governments, Health centers

- 7436 Food Sanitation Inspectors
 - To check whether non-approved GM is contained
 - To check whether the labeling is appropriate

内閣府負責業務

<http://www.cao.go.jp/>



2003年7月1日成立

<http://www8.cao.go.jp/shokuhin/>

Food Safety Commission

食品安全委員会

>> HOME > 事務局のご案内 > 食品安全委員会の構成

HOME

- ① 重要なお知らせ
- ② 新着情報
- ③ 委員会からのお知らせ
- ④ 食品健康影響評価について
- ⑤ 皆様との情報・意見の交換
- ⑥ 事務局のご案内
- ⑦ 法令について
- ⑧ 食の安全ダイヤルについて

食品安全委員会の構成

委員の構成

4員常設任期三年

委員長	寺田 雅昭	(てらだ まさあき)
委員長代理	寺尾 允男	(てらお ただお)
	小泉 直子	(こいずみ なおこ)
	見上 彪	(みかみ たけし)
	坂本 元子	(さかもと もとこ)
	中村 靖彦	(なかむら やすひこ)
	本間 清一	(ほんま せいいち)

専門調査会の構成

13 専門調査会

事務局の構成

54 officers

常設



食品安全委員会委員

小泉直子（元兵庫医科大学教授）

こいずみなおこ

寺尾允男（元財団法人日本公定書協会会長）

てらおただお

寺田雅昭（元財団法人先端医療振興財団副理事長）

てらだまさあき

見上彪（元日本大学教授）

みかみたけし

坂本元子（和洋女子大学教授）

さかもともとこ

中村靖彦（明治大学客員教授）

なかむらやすひこ

本間清一（お茶の水女子大学教授）

ほんませいいち

食品安全委員会

企画
リスクコミュニケーション
緊急時対応

(評価チーム)

化学物質系評価グループ

【添加物
動物用医薬品
化学物質】

【農薬
器具・容器包装
汚染物質】

生物系評価グループ

【微生物
プリオン
(prion)】

【ウイルス
かび毒・自然毒等
(virus)
(fungus)】

新食品等評価グループ

【遺伝子組換え食品等
肥料・飼料等】

【新開発食品
(包括GMO)】

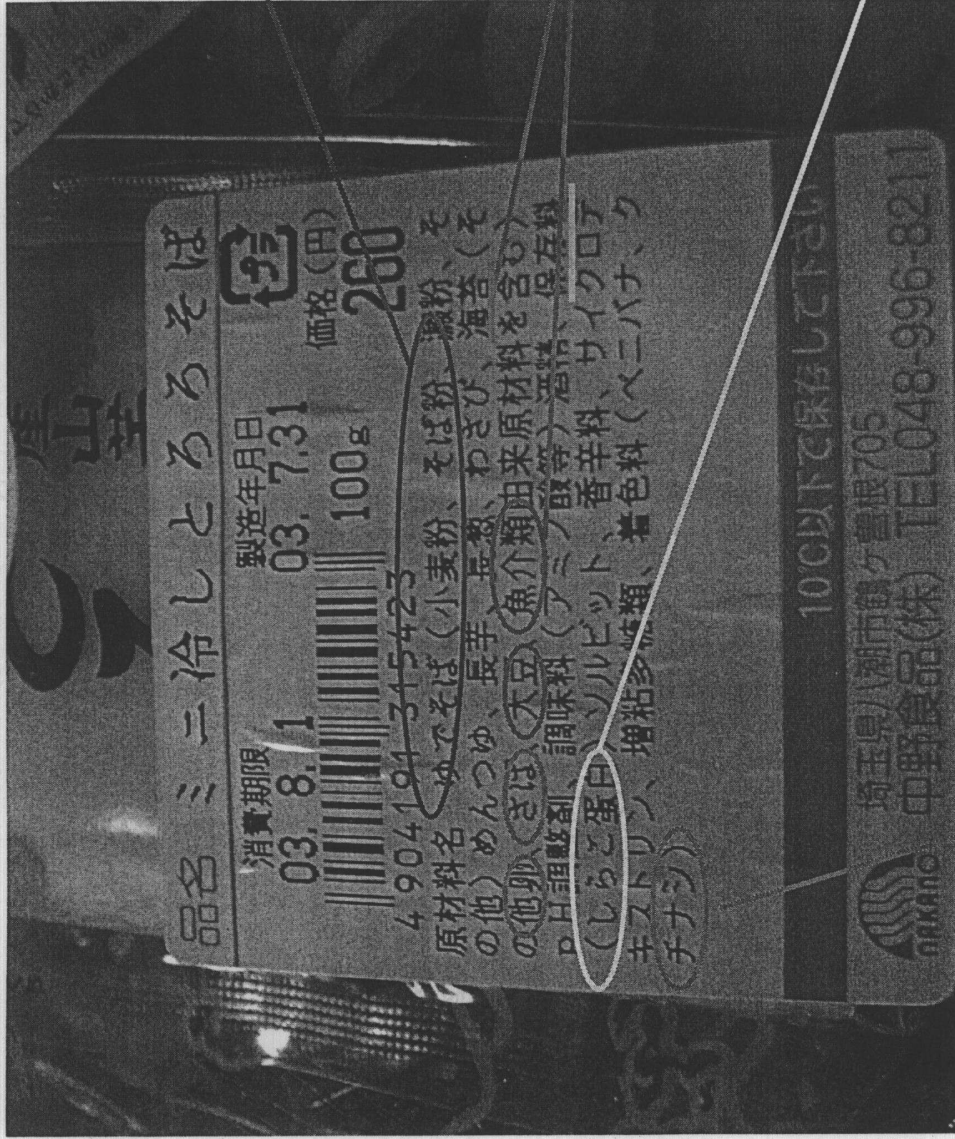
13 個 専 門 調 査 會

蕎麥涼麵

ゆでそば及蕎麥粉

海苔、鯖魚、海鮮蛋、大豆、海類及

保存料含雄魚生殖腺蛋白



中野食品

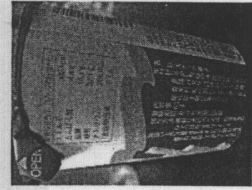
gardenia

馬鈴薯條零食



2003年

2002年

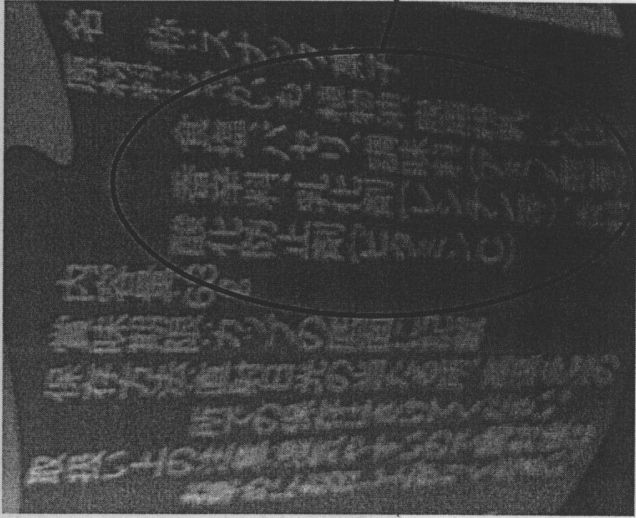


名称	スナック菓子
原材料名	じゃがいも(遺伝子組換えでない)、植物油、脱脂粉乳、食塩、香料、酸化防止剤(ビタミンE)、香料
内容量	63g
保存方法	直射日光の当たるところ、高温多湿の所での保存は避けてください。
販売者	カルビー株式会社 〒115-0044 東京都北区赤羽南1-20-1
	製造所固有記号はカッパ底面の下段左側に記載。

含大豆

非基因改造

無非基因改造及過敏源標示



麵包

附件三十六

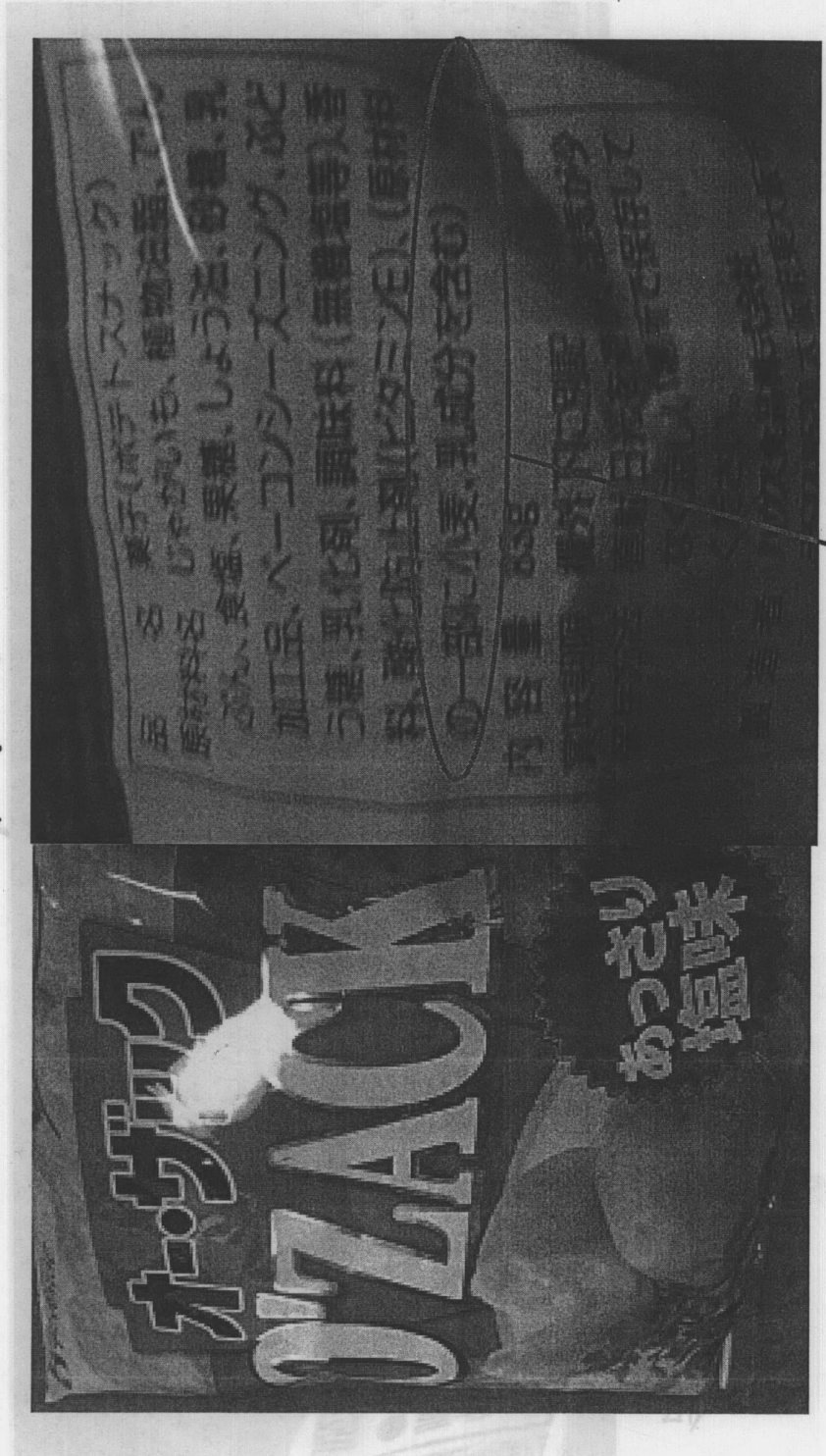
品名	菓子パン
原材 料 名	小麦粉、コーヒー味フライリング、ミルクペースト(れん乳)、植物油、卵、砂糖、動物油脂、パン酵母、脱脂粉乳、食塩、ソルビトール、乳化剤、イーストフード、ビタミンC、香料、着色料(カロチン・カラメル)、調味料(アミノ酸等)、糊料、増粘多糖類)、酸味料、リン酸塩(Na)、甘味料(スクラール)、防止剤(ビタミンE) (原材料の一部に大豆 豚脂を含む)
内 容 量	1個
消 費 期 限	欄外に記載
保 存 方 法	直射日光及び高温多湿を避けて保存して下さい。

含大豆及猪油

沒有標示非基因改造

洋芋片

附件三十六



含小麦及牛奶

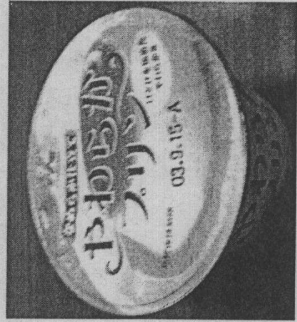
含小麥、雞蛋及大豆

名称 クッキー ●原材料名 小麦粉、砂糖、シヨートニング、カカオマス、糖
 ●油脂 卵、鶏卵、還元水飴、乳糖、全粉乳、食塩、香料
 ●乳化剤(大豆由来) 香料 ●内容量: 60g ●賞味期限: 左下部に表示
 ●保存方法: 直射日光、高温多湿をさげ、28°C以下で保存してください。
 販売者 株式会社 **ブルボン** 〒945-8611 新潟県柏崎市松波4丁目2番14
 製造所 新潟県有記町は賞味期限の下に表示

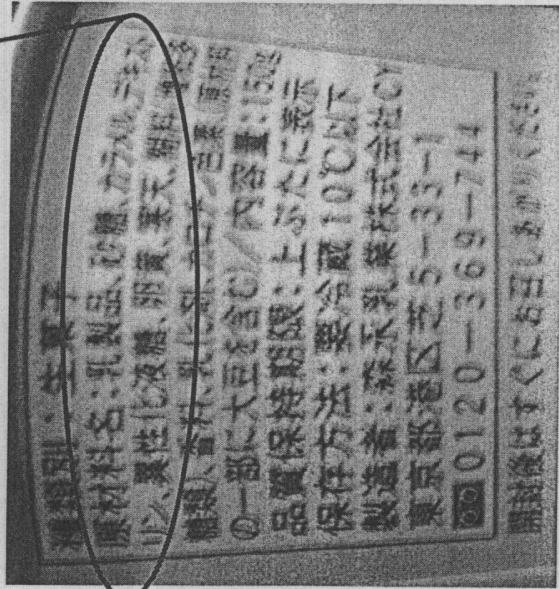
本品製造工場では、落花生を含む製品を生産していません。
 本製品の生産一時的にはお見直しをお願いします。
 ●アレルギーは高温になると、その油脂分が溶けだしてアレルギー成分が
 含まれます。風味は劣りますが、召しあがっても身体に害が
 ありません。アレルギーをお持ちの方は、お手取りでお買い上げ
 ください。アレルギーをお持ちの方は、お買い上げの際は、必ず
 本品の成分表示をお読みください。

原料成分雖不含花生，但與含花生之產品使用同一製造場所

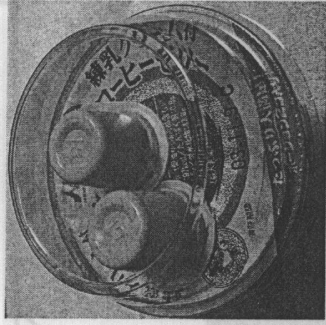
布丁



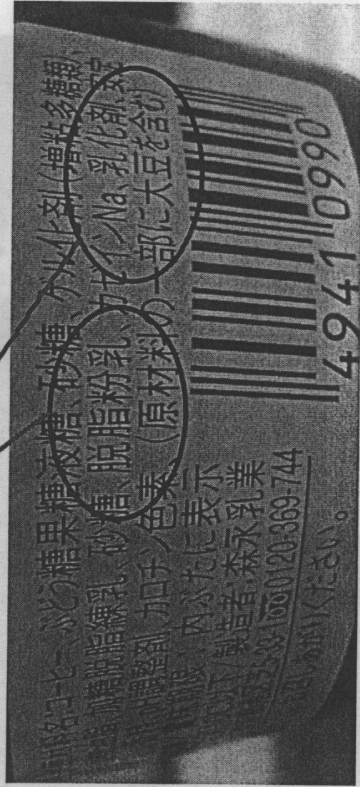
含牛奶、蛋黄



含牛奶、大豆



咖啡凍



便當



含雞肉、豬肉、
小麥、大豆、牛
肉、蘋果、牛奶
及雞蛋成分

調味料 (アミノ酸等) カラメル色素
の一部に鶏肉、豚肉、乳、卵を含む
、牛肉、リンゴ、小麦、大豆

DPT 品番

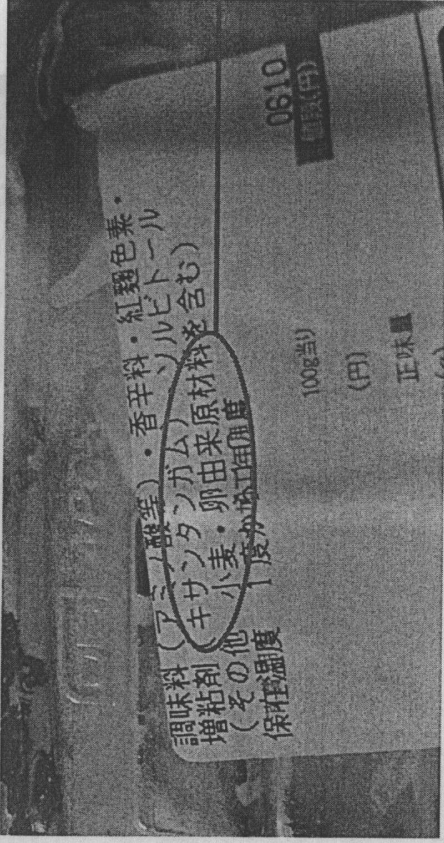
100g当り(円) 内容量(g)

お買上げ価格(円)

マツモト 食品店
東京都中央区新富2-31-5

蔬菜沙拉

附件三十六



含小麦及雞蛋

花生醬

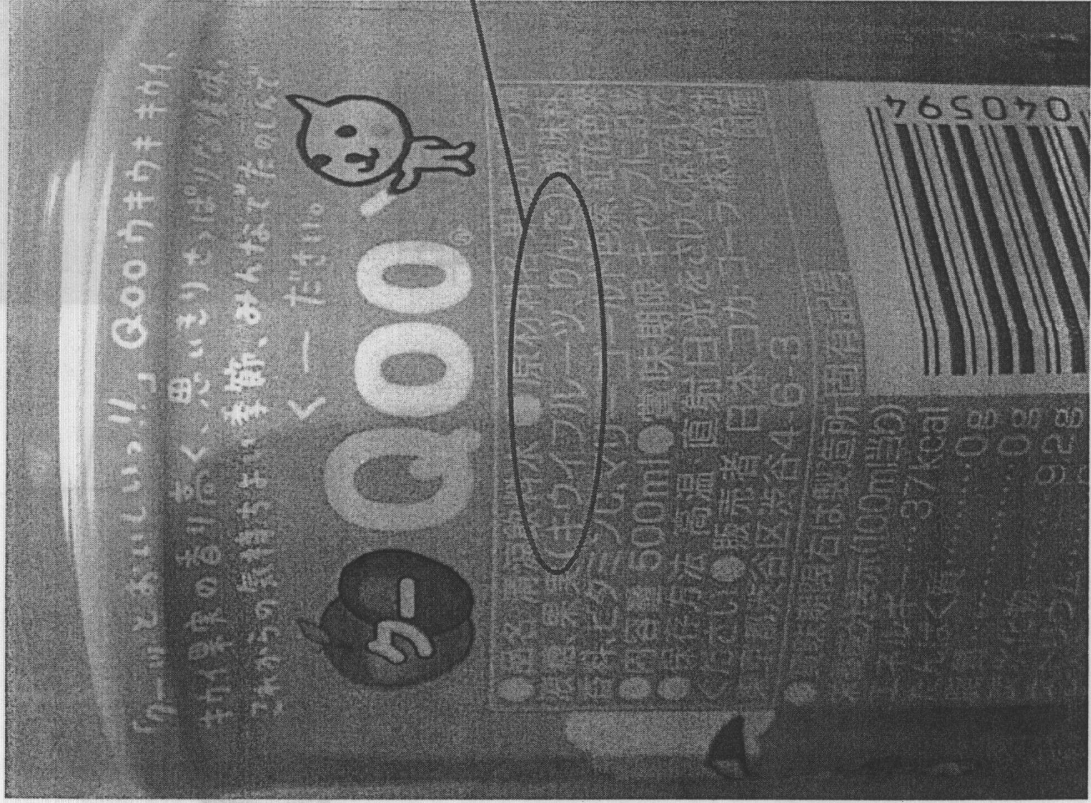
含
異
果
菓



及
花生
大豆



飲料

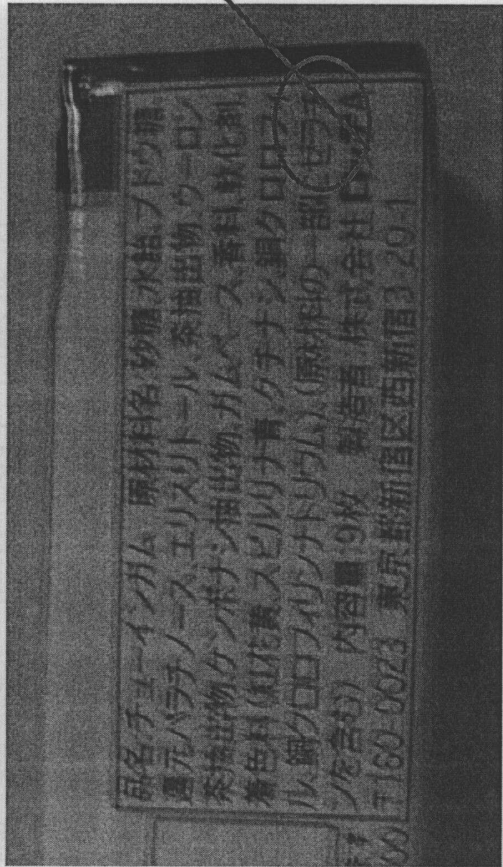
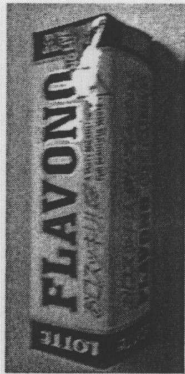


含奇異果
及蘋果

含小麦及雞蛋

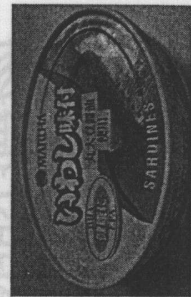
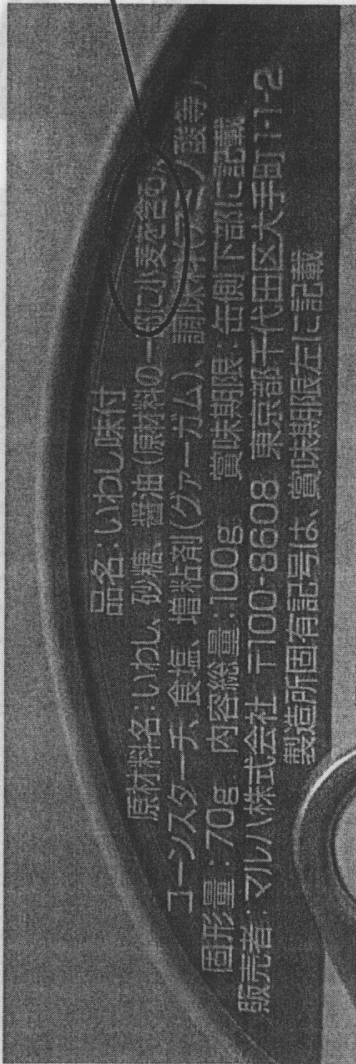
口香糖 附件三十六

Gelatin

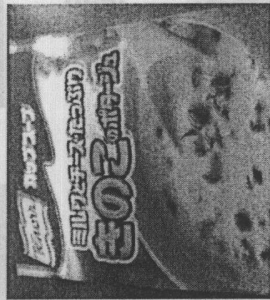


罐頭

含小麦



冲泡即時濃湯



品名 乾燥スープ(ポタージュ)

原材料名 でん粉、食用植物油、デキストリン、全粉乳、乳糖、チーズ、食塩、砂糖、じゃがいも、調味料(アミノ酸等)、ホルチーニ、加糖脱脂れん乳、たまねぎエキス、たまねぎ、乳たん白、酵母エキス、濃縮ホエイ、香辛料、うきみ(しめじ、まいたけ、ソルビトール、パセリ、酸化防止剤(ビタミンE))、
 (大豆、鶏肉、豚肉を原材料の一部に含む)

内容量 51.3g(1人150mlで3人分)

賞味期限 底面に表示

保存方法 常温にて保存

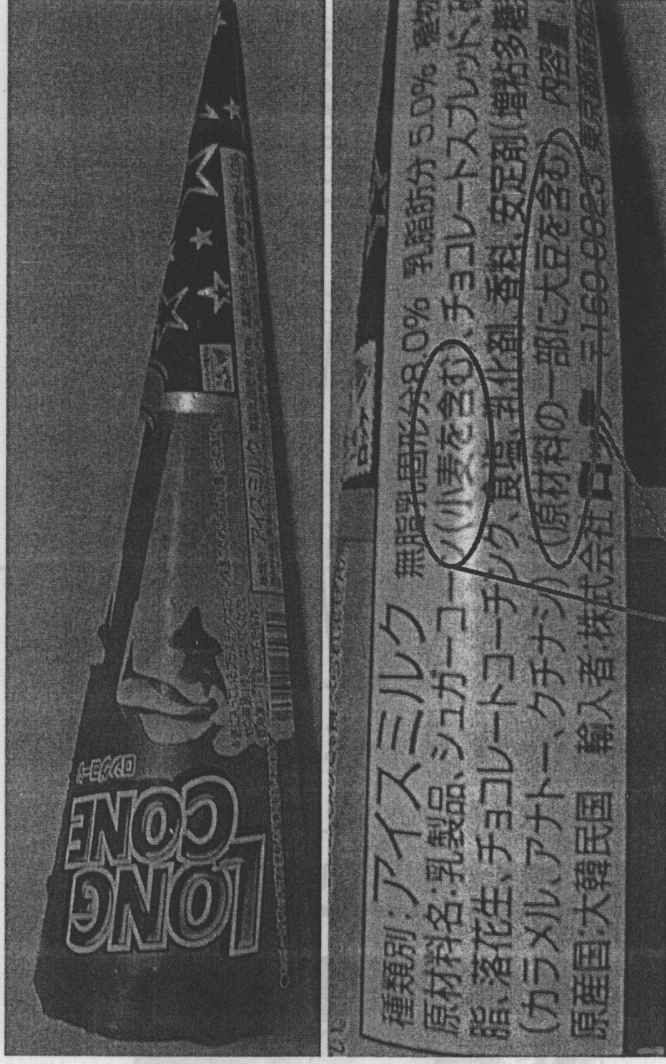
調理方法 直上に表示(熱湯を加える)

販売者 味の素株式会社N
 東京都中央区京橋1の15の1

含大豆、鶏肉、猪肉

冰淇淋甜筒

附件三十六



含小麦及大豆

附件三十六

調味醬包

附件三十六



(便當内調味醬)

原料: マスタード、
糖、醸造酢、植
脂、乳糖、食塩、増
粘剤、ウコン色素、増
粘剤、糖類、酸味料、
乳化剤、
(原材料の一部に
りんごを含む)

(麥當勞番茄醬)



品名: ケチャップ
原材料名: トマト、果糖ぶどう糖液糖、醸造酢、
食塩、香料、酸化防止剤(C)、
C)、(原材料の一部に大豆油を含む)

内容量: 20g
賞味期限: カップ裏面に記載
販売者: 日本マクドナルド株式会社 NIKB
東京都新宿区西新宿6-5-1
御時時、中身が飛び散る事が有りますのでご注意ください。

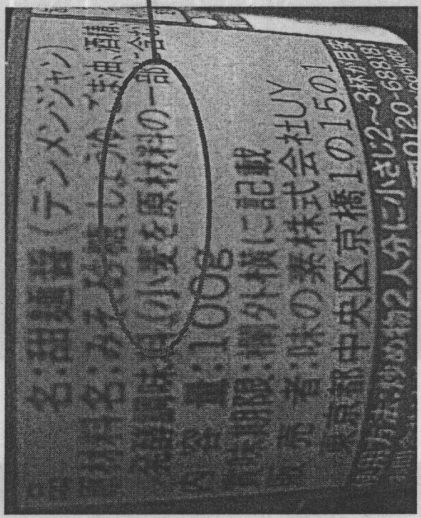
含大豆油

含蘋果

果糖合

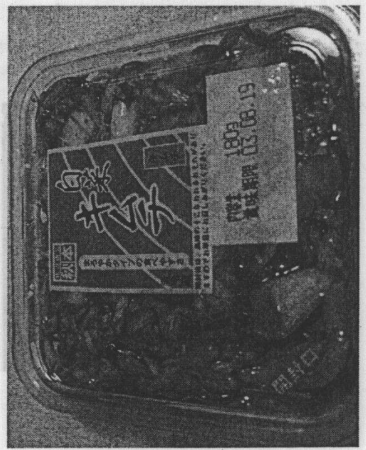


甜麵醬

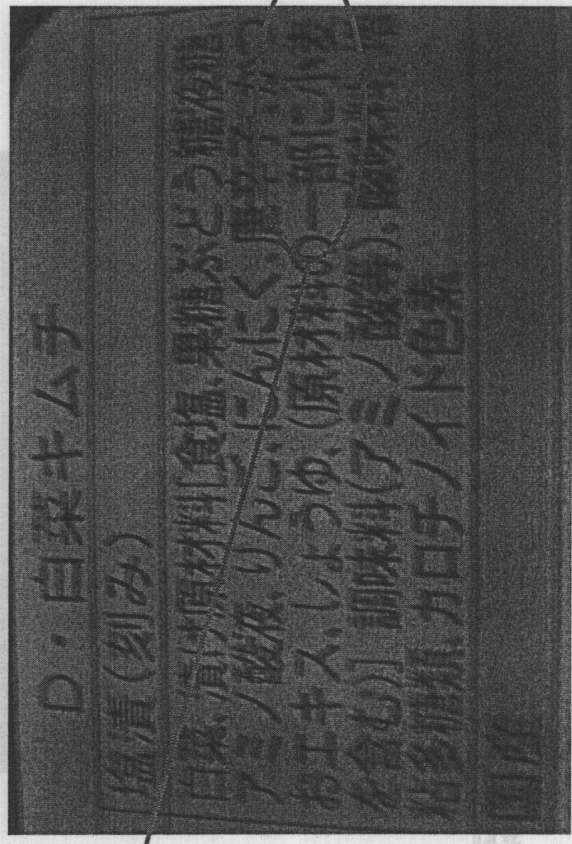


含小麥

泡菜



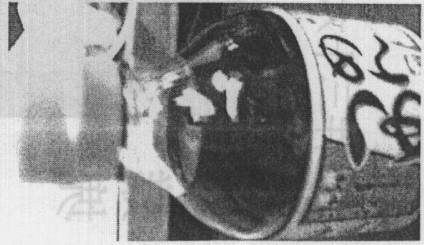
含小麥



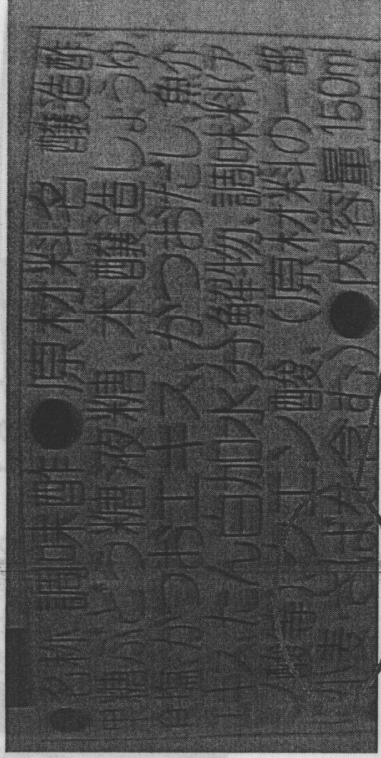
D・白菜キムチ
[漬漬(刻み)]



醋



醬油



含小麥及
鯖魚



含小麥

附件三十六



炸雞塊

調味料(アミノ酸等)、増粘多糖類
色素、香料、小麦、卵、乳由来原材料を含む
本品は、小麦、卵、乳由来原材料を含む
本品は、小麦、卵、乳由来原材料を含む

含小麦,雞蛋及牛奶

壽司拼盤



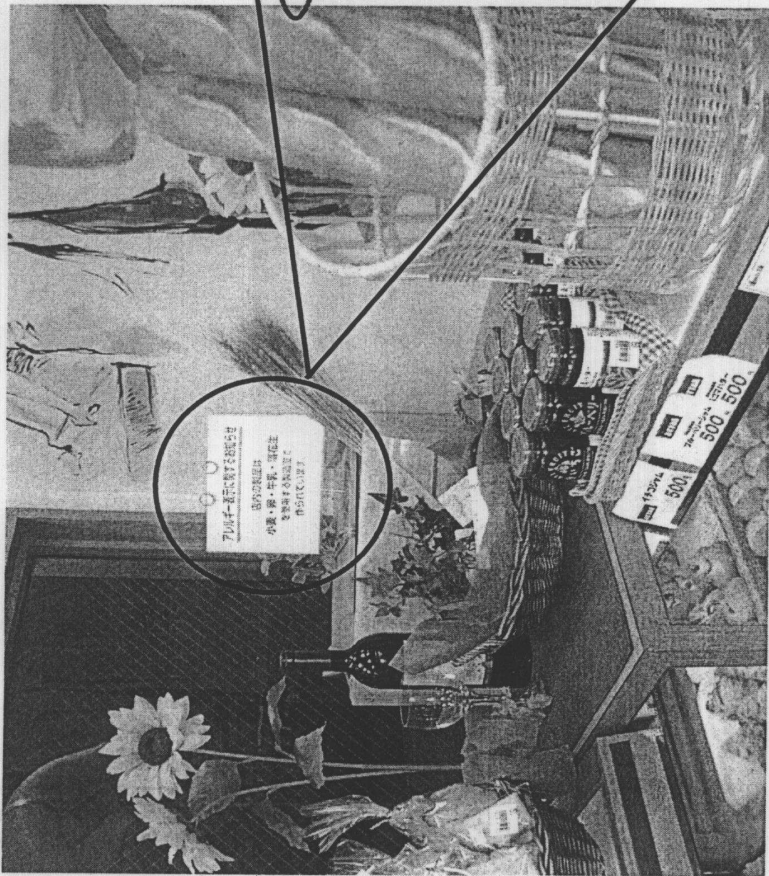
含小麦,雞蛋

ソルビトール・醗酵調味料・調味料(アミノ酸等)・保存料(シラコ)・ソルビン酸K・酸味料・甘味料(ソルビット・ステビア)・小麦・卵由来原材料を含む
保存温度 10℃~15℃

西點麵包店

附件三十六

含過敏原告示牌



アレルギー表示に関するお知らせ

店内の製品は
小麦・卵・牛乳・落花生
を使用する製造室
作られています

店内產品使用小
麥、雞蛋、牛奶
及花生製作

*食品販售店對其產品標示含過敏原

非強制性，僅為獎勵建議性

附件 三十七

Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS

Haruyo OKUNUKI*¹, Hiroshi AKIYAMA*^{1,†}, Reiko TESHIMA*¹,
Akihiro HINO*², Yukihiro GODA*¹, Jun-ichi SAWADA*¹,
Masatake TOYODA*^{1,*3} and Tamio MAITANI*¹

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*²National Food Research Institute: 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan;

*³Present Address, Jissen Woman's University: 4-1-1, Osakae, Hino 191-8510, Japan;

† Corresponding author)

(Original)

食品衛生学雑誌 第44巻 第2号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 44, No. 2, February 2003

J. Food Hyg. Soc. Japan
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

Original

Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS

(Received July 31, 2002)

Haruyo OKUNUKI*¹, Hiroshi AKIYAMA*^{1,†}, Reiko TESHIMA*¹,
Akihiro HINO*², Yukihiko GODA*¹, Jun-ichi SAWADA*¹,
Masatake TOYODA*^{1,*3} and Tamio MAITANI*¹

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*²National Food Research Institute: 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan;

*³Present Address, Jissen Woman's University: 4-1-1, Osakae, Hino 191-8510, Japan;

[†]Corresponding author)

A liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method for determining the enzymatic activity of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), an enzyme of the shikimate pathway, was developed. EPSP synthase catalyzes the formation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) from shikimate-3-phosphate (S-3-P) and phosphoenolpyruvate (PEP) in microorganisms and plants. The enzymatic activity of EPSP synthase was assessed by the determination of EPSP after a 30-min incubation with S-3-P and PEP using the LC/MS system. EPSP synthase activity is given in terms of the produced EPSP (pmol/min/mg protein). Glyphosate (*N*-phosphonomethyl glycine)-tolerant EPSP synthase from the *Agrobacterium* sp. strain CP4 (CP4-EPSP synthase) in genetically modified soybeans (GM-soybeans) was found to have an enzymatic activity of 736 EPSP pmol/min/mg protein in the presence of 3 nmol of S-3-P. In contrast, the enzyme activity of non-GM-soybeans was 21 EPSP pmol/min/mg protein. The EPSP synthase activity was markedly decreased in the non-GM-soybeans by the addition of glyphosate, but the enzyme activity of the GM-soybeans was only slightly decreased with this treatment. This LC/MS system could also be applicable to the measurement of EPSP synthase activity in different plant species and the detection of herbicide-tolerant EPSP synthase in GM foods.

Key words: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; LC/MS, genetically modified soybeans; shikimate-3-phosphate; glyphosate

Introduction

5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase, EC 2.5.1.19), an enzyme of the shikimate pathway, catalyzes the formation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) from shikimate-3-phosphate (S-3-P) and phosphoenolpyruvate (PEP)¹⁻³. The shikimate pathway of aromatic amino acid biosynthesis is present in plants and microorganisms, but not in mammals, making it a good target for herbicidal attack⁴. The herbicide glyphosate (*N*-phosphonomethyl glycine) is a specific inhibitor of EPSP synthase and does not affect other PEP-related enzymatic reactions^{5, 6}.

Recently, a number of genetically modified (GM) crops have been introduced into the mainstream cultivation worldwide. Some genetically modified soybeans (GM-soybeans) contain bacterial genes such as epsps from the *Agrobacterium* sp. strain CP4 (CP4-epsps) that have been introduced to confer tolerance to glyphosate¹.

We have already reported a detection method for the recombinant CP4-EPSP synthase DNA in GM-soybeans using a PCR technique⁷. Recently, a variety of geneti-

cally modified soybeans which does not express CP4-EPSP synthase has been found, even though the CP4-EPSP synthase DNA was detected in the variety using the PCR method. Therefore, it is also important to investigate the activity of CP4-EPSP synthase. A radioactive labeling method and an HPLC method with UV detection have been reported for the measurement of EPSP synthase activity^{1, 8}. However, the methods involve time-consuming steps because of many interfering peaks on the HPLC chromatogram or the potential hazard of radioactivity.

In the present report, we describe a novel and simple method based on LC/MS for the determination of the enzymatic activity of EPSP synthase without using complicated extraction steps or radioactive labeling. This LC/MS method was applied to measure the enzymatic activities of CP4-EPSP synthase expressed in the *E. coli* strain BL21 and GM-soybeans, and of EPSP synthase in non-GM-soybeans. This method allows the sensitive measurement of EPSP synthase activity in soybean crude extract, and should be applicable to the determination of EPSP synthase in different species of plants⁹. We also compared the EPSP synthase ac-

tivities in the crude extracts of GM and non-GM soybeans in the presence of glyphosate and confirmed the presence of herbicide-tolerant CP4-EPSP synthase.

Materials and Methods

Preparation of S-3-P and [³²P] S-3-P

S-3-P was prepared the following method of Akiyama *et al.*¹⁰⁾ The reaction buffer contained 10 μ L (protein content 260 μ g) of shikimate kinase II (in destruction buffer of *E. coli* including the *aroL* expression vector), 10 mmol/L shikimic acid (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan), 16 mmol/L ATP (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.), 16 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10 mmol/L benzamidine HCl, 50 mmol/L KF and 50 mmol/L HEPES buffer (pH 7.0) in a 100 μ L total volume. The mixture was incubated at 37°C overnight. After deproteinization using a Tosoh Air Press-30 (Tosoh Co., Tokyo, Japan), the reaction mixture was subjected to the HPLC method described below. The S-3-P peak fraction was collected repeatedly and evaporated to dryness at 40°C. The residue was weighed to determine the amount of purified S-3-P.

When [³²P] ATP (2.0 \times 10⁸ dpm/64 nmol) was used for preparing [³²P] S-3-P, the hot reaction mixture was assayed under the radio-HPLC in the conditions described below. For the control experiments, reactions without shikimate kinase II were run in parallel.

HPLC conditions for preparing S-3-P

A Shimadzu LC-10AD pump and an SPD-10AV UV detector (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) were used as the HPLC system. The column was a TSK gel CARBON-500 (Tosoh Co.). The column was maintained at 40°C with a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and S-3-P was monitored at 215 nm. The injection volume was 100 μ L. The determination of S-3-P obtained by enzyme reaction (shikimate kinase II) was performed by LC/MS¹⁰⁾.

HPLC conditions for analyzing EPSP

EPSP was analyzed according to the method reported by Washizu with some modifications⁹⁾. A Shimadzu LC-10AD pump and an SPD-10AV UV detector (Shimadzu Co.) were used as the HPLC system. The column was a Senshu Pak NH₂-1251 (4.6 \times 250 mm i.d.; Senshu Scientific Co., Tokyo, Japan). The operating conditions were: column temperature, 40°C; flow rate, 1 mL/min; injection volume, 20 μ L; detector wavelength, 215 nm. The mobile phase was 200 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 7.0).

Radio-HPLC conditions for preparing [³²P] S-3-P and analyzing [³²P] EPSP

[³²P] S-3-P were prepared according to the method reported by Washizu with some modifications⁹⁾. A Hitachi L-7100 pump, an L-7400 UV detector and L-7300 column oven (Hitachi Co., Tokyo, Japan) were used as the HPLC system. The column was a Senshu Pak NH₂-1251 (4.6 \times 250 mm i.d.; Senshu Scientific Co., Tokyo,

Japan). The operating conditions were: column temperature, 40°C; flow rate, 1 mL/min; injection volume, 20 μ L; detector wavelength, 215 nm. The mobile phase was 200 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 7.0). The eluted fractions (each 1 mL) were collected every minute. A 50 μ L volume of each fraction was added to 9 mL of liquid scintillation fluid (Perkin-Elmer, Inc., Wellesley, Massachusetts, USA) and the [³²P] radioactivity was detected using a liquid scintillation counter, SC-5100 (Aloka Co., Tokyo, Japan).

Preparation of CP4-EPSP synthase in *E. coli*

The entire coding sequence of CP4-EPSP synthase was PCR-amplified using a set of overlapping oligonucleotide primers, PR01-5' (5'-TCCTTCGCAAGACCCTT-CCTCTAT-3') and R1-EPSP synthase primer including *EcoRI* and *SacI* sites (5'-GCTGCCTGATGAGCTCGAA-TTCGA-3'), based on the reported GM-soybean genomic DNA sequence¹¹⁾, using the GeneAmp PCR system 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction mixture (25 μ L) contained 0.625 U Taq polymerase, 0.3 μ g GM-soybean DNA, 3.5 μ L of PCR premix (Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan), and 500 nmol/L primers. The PCR reactions were carried out for 40 cycles (94°C: 30 sec, 62°C: 1 min, 74°C: 2.5 min for each cycle) after incubation at 94°C for 4 min, and final extension was done at 74°C for 10 min. The amplified fragment was purified by gel electrophoresis in 1.5% agarose (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Co., Tokyo, Japan) and used as a template for the 2nd PCR using the F1-EPSP synthase primer with an *NdeI* site (5'-TTTCATCATGCTTCAC-GGTGCAAGCAGCCGG-3') and the R1-EPSP synthase primer. The PCR product was extracted with phenol, chloroform, precipitated with ethanol, and digested with restriction enzymes *NdeI* and *SacI* (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan). The digested fragments were inserted between the *NdeI* and *SacI* sites of the pET23b(+) expression vector (Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA) and cloned. Briefly, 55.5 ng of the insert DNA and 51 ng of pET23b(+) were ligated at 16°C for 24 hours with 7.5 μ L of Takara Ligation Kit Ver. 2 solution 1 (Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan). After subcloning of the inserted DNA (1,388 bp), the nucleotide sequence was determined by the dideoxynucleotide chain termination method¹²⁾. *E. coli* strain BL21 was transformed with the CP4-EPSP synthase cDNA expression vector pET23b(+) by the heat shock method. The cloned BL21 cells including CP4-EPSP synthase cDNA-pET23b(+) in 200 mL of NZCYM culture medium (NZ amine 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 5 g, casamino acids 1 g, MgCl₂·7H₂O 2 g/L) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were stimulated with 0.5 mmol/L isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to induce the CP4-EPSP synthase protein expression and then suspended in disruption buffer for BL21 (5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 0.37% KCl), and sonicated. The supernatant was collected and used as the CP4-

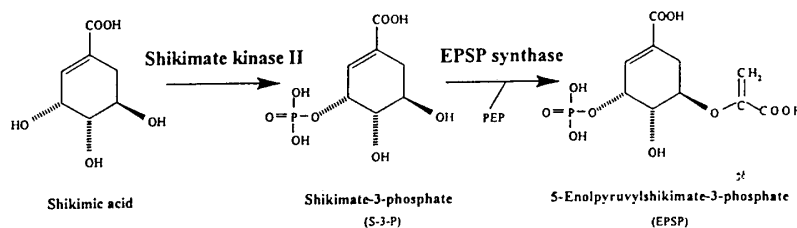


Fig. 1. Shikimic acid pathway and related enzymes

Shikimate kinase II catalyzes the phosphorylation of shikimic acid to shikimate-3-phosphate (S-3-P). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase catalyzes the reaction of S-3-P and phosphoenolpyruvate (PEP) to form EPSP and phosphate.

EPSP synthase from *E. coli*.

Extraction of EPSP synthase from GM- and non-GM-soybeans

Powders of 50 g of GM- and non-GM-soybeans, which were products from the state of Ohio, USA, and purchased from a Japanese trading company, respectively, were used. The soybean powder was prepared by the method of Teshima *et al.*¹³ A 200-mL volume of acetone was added to the soybean powder and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. The acetone solution was removed by filtration, and 100 mL of acetone was added to the precipitate again. The suspension was stirred for 20 min, then filtered and the precipitates were dried. Next, 250 mL of 50 mmol/L PBS (pH 7.4) with 0.05% sodium azide was added to the dried powder and the mixture was stirred overnight at 4°C. On the next day, it was centrifuged at 40,000 rpm for 1 hour at 4°C, and the supernatant was dialyzed against PBS for 2 days. The dialyzed supernatant was used as the extract for determining the EPSP synthase activity. The protein concentration of the extract was determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) based on the method of Bradford¹⁴.

Production and determination of EPSP

According to the reports of Padgett *et al.*^{9, 11}, we examined the conditions for the determination of EPSP synthase activity. Among various conditions examined, the following conditions were concluded to be optimal for the determination of EPSP synthase activity using LC/MS. The reaction mixture (100 μ L) containing 500 μ M PEP, 3.2 mmol/L MgCl₂, 10 μ L of 3 nmol S-3-P, 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L KF, 5 mmol/L HEPES buffer (pH 7.0) and 1 μ L of crude extract of the *E. coli* expressing CP4-EPSP synthase (protein content 1.5 μ g) or soybeans was incubated at 30°C for 30 min. The reaction tube was put on ice to stop the reaction after incubation since EPSP synthase activity is sensitive to temperature. The reaction mixture was applied to the LC/MS system. In advance, we had prepared an EPSP standard solution (10 ng/mL) to determine the extent of conversion of PEP to EPSP during the CP4-EPSP synthase reaction using the HPLC method for analyzing EPSP. The relationship between PEP reduc-

tion and EPSP production was linear up to about 25% conversion using the HPLC method with UV detection. EPSP was determined with the LC/MS system described below using the standard solution. Control reactions lacking CP4-EPSP synthase were also run in parallel. EPSP synthase activity is given in terms of produced EPSP (pmol/min/mg protein) at 30°C.

LC/MS conditions

The LC/MS system consisted of an Alliance 2790 HPLC system, 996 PDA detector and ZQ MS detector (Waters Co., MA, USA). A Develosil C30 column (4.6 mm i.d. \times 250 mm, Nomura Chemical, Tokyo, Japan) was used as the separation column and was maintained at 50°C. The mobile phase was 3% methanol solution containing 0.1% TFA at the flow rate of 0.7 mL/min. The cone voltage was 30 V. The ionization mode was negative ion mode of electrospray ionization (ESI) was used. The injection volume was 5 μ L.

Results and Discussion

Assay for enzymatic activity of CP4-EPSP synthase expressed in *E. coli*

To develop an assay method for the enzymatic activity of EPSP synthase by LC/MS analysis, CP4-EPSP synthase was over-expressed in *E. coli* for use as the positive control^{11, 15}. Since S-3-P, which is a substrate for measuring the enzymatic activity of EPSP synthase, was not commercially available, shikimate kinase II (S-3-P synthase), which biosynthetically produces S-3-P (Fig. 1), was expressed in *E. coli* as previously described¹⁰. The molecular weights of the expressed shikimate kinase II and expressed CP4-EPSP synthase were determined by SDS-PAGE to be 19 kDa and 44 kDa, respectively (data not shown), similar to the molecular mass of the enzyme predicted from the DNA sequence¹⁶⁻¹⁸. The complete reaction mixture containing CP4-EPSP synthase (protein content 1.5 μ g) and S-3-P (3 nmol) was subjected to HPLC method reported by Washizu with some modifications; an amino-silica column (Senshu Pak NH₂-1251) was eluted with 200 mmol/L KH₂PO₄ (pH 7.0) as shown in Fig. 2⁸. The chromatogram showed an additional peak indicated by the arrow at 13 min (Fig. 2A), which was not obtained from the sample solution without CP4-EPSP synthase (Fig. 2B). Thus, the 13-min peak appears to correspond to EPSP.

Detection of [32 P] S-3-P and [32 P] EPSP on radio-HPLC

To further confirm that the peak detected on HPLC described above was EPSP, we used a radio-HPLC procedure as described in Materials and Methods section⁹⁾. We added [γ - 32 P] ATP (2.0×10^8 dpm/64 nmol) to an enzyme reaction mixture for synthesis of [32 P] S-3-P. A single radioactive peak appeared at the retention time of 6 min (Fig. 3a), whereas the control solution reacted without shikimate kinase II showed no radioactive peak at this position (Fig. 3b). Typically, a 95% conversion

of [32 P] ATP to [32 P] S-3-P was achieved after 24 hours of incubation at 37°C. The peak fraction of [32 P] S-3-P was collected, added to a reaction mixture containing CP4-EPSP synthase from *E. coli* and incubated at 30°C for 30 min. The radio-chromatogram of the incubation mixture is shown in Fig. 3c. After the peak of [32 P] S-3-P was eluted, a new radioactive peak corresponding to [32 P] EPSP appeared at 10 min (Fig. 3c), which was not found in the reaction mixture without CP4-EPSP synthase (Fig. 3d). Though the retention time (10 min) of [32 P] EPSP was different from that (13 min) of EPSP detected above (Fig. 2a), the difference of the retention time was thought to be due to the difference of HPLC systems used.

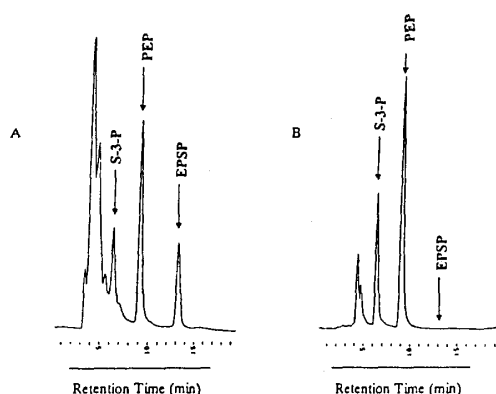


Fig. 2. Detection of EPSP using the HPLC method. HPLC chromatograms of the reaction mixtures with CP4-EPSP synthase from *E. coli* (A) and without CP4-EPSP synthase (B). The column was a Senshu Pak NH₂-1251 (4.6 × 250 mm i.d.). The operating conditions were as follows: column temperature, 40°C; flow rate, 1 mL/min; injection volume, 20 μ L; detector wavelength, 215 nm. The mobile phase was 200 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 7.0).

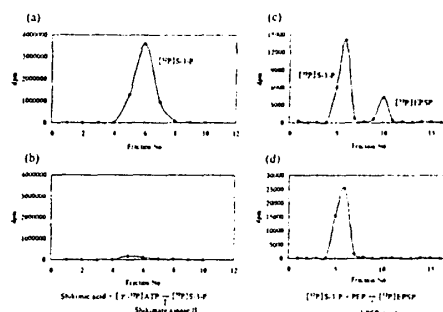


Fig. 3. Detection of [32 P] S-3-P and [32 P] EPSP using the radio-HPLC method.

HPLC chromatograms of the reaction mixtures with shikimate kinase II (a) and without shikimate kinase II (b). Chromatograms of the reaction mixtures containing [32 P] S-3-P obtained (a) with CP4-EPSP synthase from *E. coli* (c) and without CP4-EPSP synthase (d).

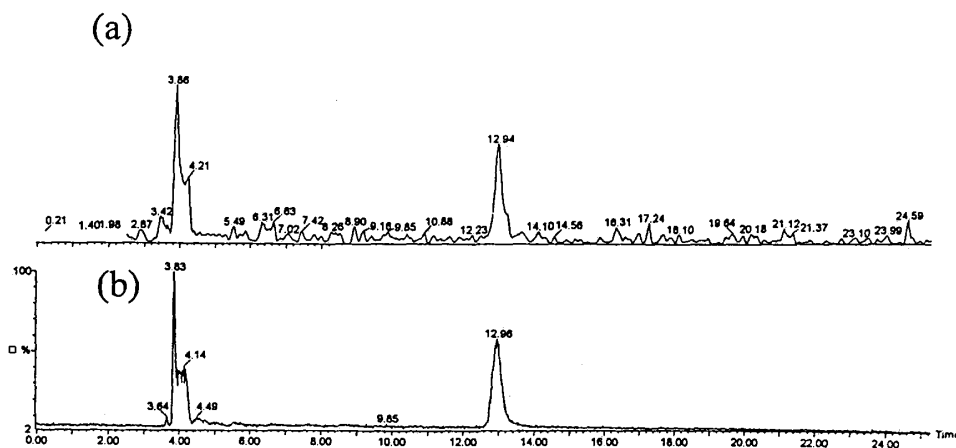


Fig. 4. Total ion chromatogram (a) and selected ion (m/z 323) chromatogram (b) for the LC/MS analysis of EPSP produced by the reaction mixture including GM-soybean crude extract.

The LC/MS conditions were as follows. A devesil C30 column was used as the separation column and was maintained at 50°C. The mobile phase was 3% methanol solution containing 0.1% TFA at the flow rate of 0.7 mL/min. The cone voltage was 30 V. The ionization mode was negative ion electrospray ionization (ESI). The injection volume was 5 μ L.

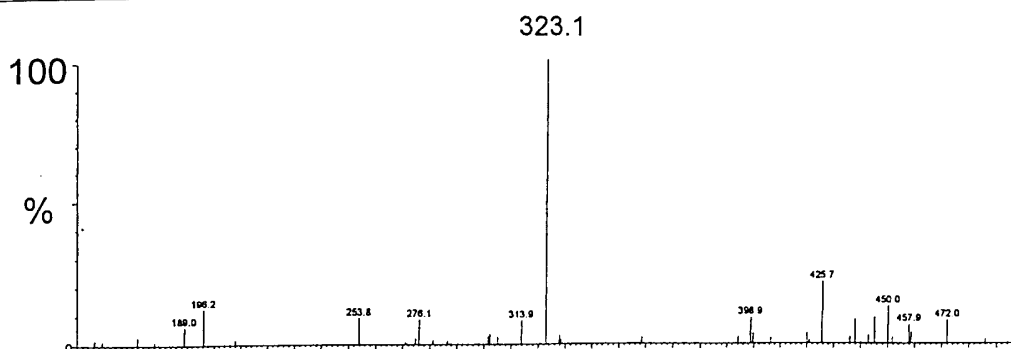


Fig. 5. ESI mass spectrum for the EPSP peak detected by the LC/MS analysis of EPSP produced by the reaction mixture including GM-soybean crude extract

Determination of EPSP using LC/MS system

To easily determine EPSP without using radio-HPLC, we developed an LC/MS method. Among the several reverse-phase columns examined, Develosil C30 showed the best retention of EPSP in combination with the volatile mobile phase described in the Materials and Methods section. The established HPLC separation system was adapted to the LC/MS system. Negative ion ESI produced deprotonated molecules $[M-H]^-$ (m/z 323) of EPSP without any fragmentation. Furthermore, the selected ion monitoring (SIM) mode unambiguously identified EPSP. Figures 4 and 5 show representative MS chromatograms and an ESI mass spectrum of EPSP, respectively. The relative standard deviation was less than 5% (3 ng/mL of EPSP) after six repeated injections. EPSP could be determined quantitatively in the range of 0.3–5 ng/mL. The detection limit was 0.1 ng/mL. This LC/MS method was used to analyze the EPSP synthase activity.

Determination of EPSP synthase activity in GM-soybean and non-GM-soybean crude extracts by LC/MS

We extracted proteins from GM-soybeans and attempted to detect the EPSP synthase enzymatic activity using the LC/MS method as described above. The enzymatic activity was calculated from the EPSP determination. The crude extract of the GM-soybeans (diluted 10, 50, 100, 500 and 1,000 times) was incubated with reaction mixture containing S-3-P at 30°C for 30 min. We confirmed the correlation between the dilution of the soybean crude extract and the production of EPSP.

Next, we compared the enzyme activity of CP4-EPSP synthase produced by *E. coli* and the soybean crude extracts. The enzymatic activity of EPSP synthase in the *E. coli* and GM- and non-GM-soybean crude extracts was $63,267.7 \pm 4,933.3$ EPSP pmol/min/mg protein, 735.6 ± 67.8 EPSP pmol/min/mg protein and 21.1 ± 10.3 EPSP pmol/min/mg protein, respectively. Each value represents the mean \pm SD from triplicate analyses.

CP4-EPSP synthase in the GM-soybeans is glyphosate-resistant. To measure only the glyphosate-resistant EPSP synthase in the GM-soybeans, we incubated S-3-P,

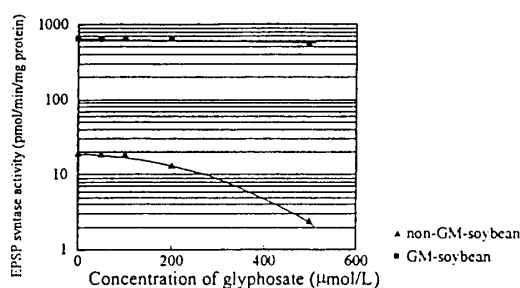


Fig. 6. EPSP synthase activity of GM- and non-GM-soybean extracts in the presence of glyphosate. EPSP synthase activity of GM- or non-GM-soybean crude extracts was assayed in the presence of 0–500 μ mol/L of glyphosate. EPSP produced by the reaction was measured by LC/MS analysis. The protein concentration of GM- and non-GM-soybean extract was 19 mg/mL. Each value represents the mean \pm SD from triplicate analyses.

PEP and the crude extracts of the GM-soybeans in the presence of glyphosate (0–500 μ mol/L) and analyzed these using the LC/MS method as described above. The crude extract from non-GM-soybeans was examined in parallel. Figure 6 represents the EPSP synthase activity in the GM- and non-GM-soybean crude extracts for several concentrations of glyphosate. The EPSP synthase activity of the GM-soybeans was unchanged or only slightly reduced in the presence of 50–500 μ mol/L of glyphosate, whereas the EPSP synthase activity in the non-GM-soybeans was dose-dependently inhibited by the glyphosate. The concentration of glyphosate which caused 50% inhibition of the EPSP synthase activity of the non-GM-soybeans (IC_{50}) was 258 μ mol/L, and 90% of the EPSP synthase activity was inhibited at 500 μ mol/L of glyphosate. The IC_{50} value obtained with our system was similar to that reported previously^{6, 8, 19}. Therefore, the GM-soybeans show herbicide-resistant EPSP synthase activity.

Padgett *et al.*¹¹ reported a radio-HPLC assay for the determination of EPSP synthase activity using ¹⁴C label. However, this poses a potential hazard. Moreover, Washizu also reported an HPLC method using an

amino-silica column for the determination of EPSP synthase⁹⁾. The method involved time-consuming steps because of many interfering peaks on the HPLC chromatogram. It also seems to be difficult to identify the EPSP peak reliably because of the rapid decline in the quality of the amino-silica column. Therefore, we used a reverse-phase C30 column to retain EPSP, because this should be more durable than the amino-silica column. The separation system of the HPLC was adapted to the LC/MS system for the qualitative and quantitative analysis of EPSP. The established LC/MS method for EPSP analysis proved to be more sensitive and precise than the HPLC method with UV detection. It provides a simple procedure for the determination of CP4-EPSP synthase activity or EPSP synthase activity by LC/MS without using any radioactive label.

Furthermore, we confirmed that the glyphosate-resistant enzymatic activity of CP4-EPSP synthase from enzyme reaction mixtures containing \dot{S} -3-P and PEP could be detected using the LC/MS method in the presence of 500 μ mol/L glyphosate. This method should be applicable to the detection of other glyphosate-resistant EPSP synthase species, which have been introduced into various grains or rapeseeds.

Acknowledgments

We express our thanks to Dr. S. Arami and Dr. H. Miura of the National Food Research Institute, and Ms. S. Tsuzuki of NIHS for their technical assistance and Dr. H. Sasaki of Nihon Waters Co. for advice on LC/MS technique. A part of this study was supported by a grant for Scientific Research Expense for Health and Welfare Programs from the Japanese Government.

References

- 1) Padgette, S. R., Huynh, Q. K., Aykent, S., Sammons, R. D., Sikorski, J. A., Kishore, G. M., Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1,798-1,802 (1988).
- 2) Steinrucken, H. C., Amrhein, N., 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. I. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, **143**, 351-357 (1984).
- 3) Boocock, M. R., Coggins, J. R., Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.*, **154**, 127-133 (1983).
- 4) Haslam, E. ed., "The Shikimate Pathway", New York, John Wiley & Sons, 1974, p. 17-19.
- 5) Smart, C. C., Johanning, D., Muller, G., Steinrucken, H. C., Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.*, **260**, 16,338-16,346 (1985).
- 6) Steinrucken, H. C., Amrhein, N., The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1,207-1,212 (1980).
- 7) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **40**, 149-157 (1998).
- 8) Washizu, M., An inhibition assay for EPSP synthase by HPLC. *Mitsubishi Kasei R & D Review*, **5**, 70-75 (1991).
- 9) Padgette, S. R., Huynh, Q. K., Borgmeyer, J., Shah, D. M., Brand, L. A., Re, D. B., Bishop, B. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Kishore, G. M., Bacterial expression and isolation of *Petunia hybrida* 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 564-573 (1987).
- 10) Akiyama, H., Okunuki, H., Tsuzuki, S., Arami, S., Miura, H., Sakushima, J., Teshima, R., Goda, Y., Hino, A., Sawada, J., Toyoda, M., Construction of the expression system of shikimate kinase II and the preparation of shikimic acid 3-phosphate. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **40**, 438-443 (1999).
- 11) Padgette, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., La-Vallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B., Kishore, G. M., Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.*, **35**, 1,451-1,461 (1995).
- 12) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5,463-5,467 (1977).
- 13) Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima, J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J., Toyoda, M., Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BX rats and B10A mice. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **41**, 188-193 (2000).
- 14) Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 15) Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., Hironaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, C. S., Aykent, S., Siegel, N. R., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, **233**, 478-481 (1986).
- 16) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 17) Millar, G., Lewendon, A., Hunter, M. G., Coggins, J. R., The cloning and expression of the *aroL* gene from *Escherichia coli* K12. Purification and complete amino acid sequence of shikimate kinase II, the *aroL*-gene product. *Biochem. J.*, **237**, 427-437 (1986).
- 18) Kishore, G. M., Brundage, L., Kolk, K., Padgette, S. R., Rochester, D., Huynh, Q. K., Della-Cioppa, G., Isolation, purification and characterization of a glyphosate tolerant mutant *E. coli* EPSP synthase. *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **45**, 1,506 (1986).
- 19) Steinrucken, H. C., Schulz, A., Amrhein, N., Porter, C. A., Fraley, R. T., Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 169-178 (1986).

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

出國人員 職 稱：薦任技士

姓 名：謝 佩 君

研習地點 國 家：日 本

機 關：農林水產省

獨立行政法人食品總和研究所

出國期間：九十二年八月三日至八月三十一日

目 次

摘 要.....	91
壹、目的.....	92
貳、過程.....	93
參、心得與建議.....	133
肆、附件.....	136

赴日本農林水產省獨立行政法人食品綜合研究所

考察研習基因改造食品之檢驗

摘要

隨著基因改造食品的日益增加，我國主管基因改造食品的單位：衛生署食品衛生處及藥物食品檢驗局，目前正積極投入基因改造食品標示及檢驗的工作。食品衛生處已於民國九十年二月二十二日公告以基因改造黃豆及基因改造玉米為原料之食品標示事宜，並於今年（九十二年）一月一日開始實施第一階段強制標示農產品型態之黃豆及玉米。從明年（九十三年）一月一日開始，以黃豆、玉米為主原料之初級加工食品，也需強制標示「基因改造」或「含基因改造」字樣。而民國九十四年一月一日起，其他較高層次含黃豆、玉米之加工食品，除了醬油、黃豆油（沙拉油）、玉米油、玉米糖漿、玉米澱粉等加工層次高且最終產品中不含轉殖基因片段或蛋白質之黃豆、玉米加工食品之外，皆需強制標示。有鑑於此，此次赴「日本農林水產省獨立行政法人食品綜合研究所」日野明寬博士實驗室，研習初級及其他較高層次之加工食品的檢驗技術及方法，以利國內日後執行與推動基因改造食品之相關政策。為期四週的研習活動中，前兩週除了學習如何處理各種不同型態之加工食品外，同時參訪朝日啤酒廠及獨立行政法人農林水產消費技術センター，深刻體認日本政府與民間企業合作交流關係之密切。後兩週則進行加工食品之基因改造成分分析，藉由實際操作所遭遇到的困難，提出問題與日方人員討論，經由相互討論學習相關的經驗，期望對國內日後執行基因改造食品相關政策有所助益。

壹、目的

隨著基因改造食品的日益增加，我國主管基因改造食品的單位：衛生署食品衛生處及藥物食品檢驗局，目前正積極投入基因改造食品標示及檢驗的工作。食品衛生處已於民國九十年二月二十二日公告以基因改造黃豆及基因改造玉米為原料之食品標示事宜，並於今年（九十二年）一月一日開始實施第一階段強制標示農產品型態之黃豆及玉米，包括黃豆、黃豆粉、玉米、碎（粉）狀玉米。從明年（九十三年）一月一日開始，以黃豆、玉米為主原料之初級加工食品，包括豆腐、豆乾、豆漿、豆花、冷凍玉米、罐頭玉米、黃豆蛋白製品，也需強制標示基因改造」或「含基因改造」字樣。而民國九十四年一月一日起，其他較高層次含黃豆、玉米之加工食品，除了醬油、黃豆油（沙拉油）、玉米油、玉米糖漿、玉米澱粉等加工層次高且最終產品中不含轉殖基因片段或蛋白質之黃豆、玉米加工食品之外，皆需強制標示。有鑑於此，此次赴「日本農林水產省獨立行政法人食品綜合研究所」日野明寬博士實驗室，研習初級及其他較高層次之加工食品的檢驗技術及方法，期望對國內日後執行基因改造食品相關政策有所助益。

貳、過 程

考察研習時間為八月三日至八月三十一日，研習行程如下：

八月三日（日）

自桃園中正機場搭乘長榮航空 BR2198 上午九點的班機，但是飛機延誤，直到九點半才起飛，抵達日本成田機場已是下午一點半。林澤揚技士來機場接機，教我如何搭巴士到筑波市中心。日野明寬博士實驗室（食品機能部味覺機能研究室）的研究助理望月秀明先生及農林水產省横浜植物防疫所植物防疫官奧田智勇先生則到筑波市中心接我們前往位於茨城県つくば市觀音台 2-1-12 的獨立行政法人食品綜合研究所（附件一）。用過晚餐之後，林澤揚技士帶我認識地理位置，幫助我在短時間之內適應新環境。

八月四日（一）

第一天正式到日野明寬博士實驗室報到，時間是上午九點整。首先拜見日野明寬博士，並介紹實驗室成員給我認識，之後大家便開始打掃（星期一清潔日）。實驗室之研究主要分為兩個方向，一是「味覺機能」，一是「GMO」。由於此行的目的為研習基因改造食品的檢驗技術及方法，與林澤揚技士討論之後，我們向日野明寬博士表明想學習加工肉製品（添加植物性蛋白）及加工大豆製品的檢驗，由柏葉晃一博士後研究及獨立行政法人農林水產消費技術センター的兒玉貴志先生負責指導我。加工肉製品樣本為市場購買或直接由廠商取得，來此研習之韓國鄭明恩女士已完成這些樣品的玉米 DNA 定性分析。加工大豆製品樣本為台灣購買的豆乾。

柏葉晃一博士及兒玉貴志先生先去安排我接下來一個月的實驗，上午剩餘的時間由望月秀明先生示範用 Wako 公司的「高速穀物 DNA 抽出 kit」抽取星連玉米粉的 DNA，這套試劑的操作只需花短短半小時，但是目前這套試劑尚未商品化。詳細的操作步驟整理於附件二。

下午測早上抽的 DNA 濃度和品質，結果如下：

編號	A260/230	A260/280	Dil.Fact.	conc. (ng/μL)
1	3.73439	1.77729	5	42.67516
2	3.70222	1.78147	5	46.99857

A260/280 在 1.77 和 1.79 之間，但是 A260/230 在 3.7 左右（應該在 2 左右，2.5 以上不佳），顯示可能抽到的糖類太多，但望月秀明先生說並不影響後續的實驗。

之後林澤揚技士做定量實驗。比較使用 DNA 濃度 20 μM 和稀釋五倍後 4 μM，定量結果的差別，以判定是否有抑制物。

明天鄭明恩女士就要回韓國了，晚上日野明寬博士請鄭明恩女士、林澤揚技士和我用餐。其間聊到污染的問題，日野明寬博士表示，他們曾經發現 PCR 時即使不加入 DNA，結果竟然可測出 kanamycin gene。經過確認之後，原因為 Taq polymerase 是使用抗 kanamycin 的 *E. coli* 大量生產的，而造成生產的 Taq polymerase 被污染。另外實驗室的空間管理也很重要，因為當盛裝 DNA 或進行 PCR 之後的管子打開時，DNA 便會飄散到空中而造成污染。

八月五日（二）

今日依照柏葉晃一博士及兪玉貴志先生排定的進度開始進行實驗，首先將要處理的樣本拍照（樣本一到十七，見附件三），並將樣本一到十五磨碎，以便後續抽取 DNA。預計要用四種方法抽取 DNA：

抽取 DNA 方法	縮寫	所需檢體重量
QIAGEN Genomic-tip 20/G	G	2 g
QIAGEN DNeasy Maxi Kit	M	1 g
CTAB	CT	加工肉製品 250 mg

		豆乾 100 mg
QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB	M+C	1 g

四種方法共需檢體大約 5 g，故取 5 g 樣本加水 5 mL 磨碎後，移至 50 mL 離心管。詳細操作方法見附件四。花一整天三個人力才將十五個樣本處理完畢，非常感謝獨立行政法人種苗管理センター種苗管理課遺伝子組換検査係長村上隆紀先生及飯倉惠子女士的協助。

晚上林澤揚技士將昨天的 data 分析好了，結果沒有抑制現象。請教兒玉貴志先生為何要檢定有無抑制，兒玉貴志先生解釋，是為了確定檢驗出來的陰性結果 (GM negative) 是真的，而非抑制現象的結果。

八月六日 (三)

上午進行 GM 黃豆 (RRS) 之粉碎工作。由波田野修子小姐示範如何操作磨碎機 (FRITSCH miller, 舊型)。由於此為 GM 樣本，故每個步驟都必須特別小心翼翼處理，千萬不可污染，以免往後操作的樣本皆受到污染。詳細步驟見附件五。

下午行程為參觀朝日啤酒廠。下午一點整，獨立行政法人食品総合研究所食品機能部部長津志田藤二郎博士、柏葉晃一博士、兒玉貴志先生，日野明寛博士、林澤揚技士和我，分乘兩部計程車前往位於茨城県守谷市緑1丁目1番地21的朝日啤酒廠茨城工場。朝日啤酒為日本第一大啤酒公司，日本市場佔有率於2002年時已達到47.4%。

首先參觀「研究開発センター」，由商品技術開発本部分析研究所長山下博博士、商品技術開発本部分析研究所安全評価部長望月直樹博士、商品技術開発本部分析研究所安全評価部主任研究員吉村倫彰先生帶領我們，並介紹其組織概況。「研究開発センター」由七個研究所（包括「未來技術研究所」、「事業開発研究所」、「技術開発研究所」、「酒類研究所」、「分析

研究所」、「容器包裝研究所」及「飲料開發研究所」)、一個中心(「品質保証センター」)、一部(「總務部」)、一室(技術情報室)構成,工作人員逐一介紹並帶領我們參觀。實驗室中有一小型發酵槽,僅 200 L,為實際發酵槽的 1/600,其功能為測試用,成功後方可至大型發酵槽生產。在「研究開發センター」的「研究棟」地下室,有著先進之避震結構,當地震發生時,可將大樓之晃動抵銷。

朝日啤酒廠茨城工場佔地 118,000 坪,非常寬廣,故搭乘場內遊覽車前往參觀生產線。首先觀看簡單的短片,介紹啤酒之製造過程,再實際參觀大型發酵槽,全自動化的生產線,每分鐘可生產鋁罐啤酒 1700 罐、玻璃罐啤酒 1200 罐,非常迅速。

參觀結束後工作人員帶領我們前往「展望接待館」進行小小的餐會,途中經過「スカイロード」,可眺望整個茨城工場場內景緻,此時,林澤揚技士和我的眼神同時為窗外飄揚的青天白日滿地紅國旗所吸引,真是太感動了。隨後進入「展望接待館」,桌上又再次出現『中華民國國旗』,讓我不得不佩服日本人做人做事的細心。

八月七日(四)

日前已準備好的樣品,今日以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 進行抽取 DNA 的工作。此方法已經過日本自行修改(附件六為兎玉貴志先生交予我的英文版實驗手冊),由飯倉惠子女士指導我今日的實驗。

編號	樣品名	檢體重量
1	Chicken nugget	1 g
2	Chibini ham	1 g
3	Sausage (H)	1 g
4	White sausage	1 g
5	Sausage (A)	1 g

6	Sliced ham	1 g
7	FrankFruite sausage	1 g
8	Ham (RH)	1 g
9	Ham (CT)	1 g
10	Ham (10%)	1 g
11	Ham (15%)	1 g
12	Ham (20%)	1 g
13	德昌炭燒角豆乾	1 g
14	德昌五香豆乾	1 g
15	德昌大溪五香豆乾	1 g
16	RRS powder	1 g
17	Non-GM soybean powder	1 g

詳細操作方法整理於附件七。

八月八日（五）

上午驅車前往位於埼玉縣さいたま市中央区新都心 2-1 的獨立行政法人農林水產消費技術センター，有點塞車，到達時已中午時分。和技術調查部部長武內良雄先生交換名片後，與技術研究課研究第二係長栗原秀夫先生、兒玉貴志先生、奧田智勇先生、林澤揚技士、以及其他工作人員共十人一同去用餐。餐後，簡單參觀一下實驗室，便立刻依照栗原秀夫先生交予我們的實驗手冊（附件八）開始進行納豆樣本（編號 1-5）的均質工作。

首先將要處理的樣本拍照（見附件九）。之後用三種方法抽 DNA：

抽取 DNA 方法	縮寫	所需檢體重量
QIAGEN Genomic-tip 20/G	G	2 g
QIAGEN DNeasy Maxi Kit	M	1 g
CTAB	CT	200 mg

詳細的處理過程見附件十。

八月十一日 (一)

今天以 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit 法抽檢體 DNA，所需藥品 G2 buffer 不足，故上午先配製二倍濃度的 G2 buffer。而配製 G2 buffer 之前，要先配製 20% Tween-20 與 10% Triton X-100。

20% Tween-20 的配製		
藥品	使用量	方法
滅菌水	480 mL	
Tween-20	120 mL	攪拌混合均勻
10% Triton X-100 的配製		
藥品	使用量	方法
滅菌水	135 mL	
Triton X-100	15 mL	攪拌混合均勻
2 倍濃度 G2 buffer 的配製		
藥品	使用量	方法
滅菌水	250 mL	
guanidine HCl	152.84 g	攪拌溶解混合
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	11.17 g	攪拌溶解混合
Tris base	3.63 g	攪拌溶解混合
20% Tween-20	500 mL	攪拌混合均勻
10% Triton X-100	100 mL	攪拌混合均勻
10 N NaOH	數滴	校正至 pH8.0
滅菌水		定量體積至 1 L

二倍濃度的 G2 buffer 配製完成後，依據需要量將 G2 buffer 稀釋成一倍的濃度，進行抽取 DNA 的動作。

編號	樣品名	檢體重量
1	Chicken nugget	2 g
2	Chibini ham	2 g
3	Sausage (H)	2 g
4	White sausage	2 g
5	Sausage (A)	2 g
6	Sliced ham	2 g
7	FrankFruite sausage	2 g
8	Ham (RH)	2 g
9	Ham (CT)	2 g
10	Ham (10%)	2 g
11	Ham (15%)	2 g
12	Ham (20%)	2 g
13	德昌炭燒角豆乾	2 g
14	德昌五香豆乾	2 g
15	德昌大溪五香豆乾	2 g
16	RRS powder	2 g
17	Non-GM soybean powder	2 g

詳細操作方法整理於附件十一。非常感謝奧田智勇先生鼎力相助，才能在一天之內順利將十七個 DNA 檢體抽取完畢。

八月十二日（二）

今日實驗進度是以 CTAB 法抽檢體 DNA，由於只有我自己獨立進行實驗，時間上只能先做 1 至 8 號檢體。

編號	樣品名	檢體重量
1	Chicken nugget	250 mg
2	Chibini ham	250 mg

3	Sausage (H)	250 mg
4	White sausage	250 mg
5	Sausage (A)	250 mg
6	Sliced ham	250 mg
7	FrankFruite sausage	250 mg
8	Ham (RH)	250 mg

詳細操作方法整理於附件十二。

八月十三日 (三)

今天繼續用 CTAB 法抽取剩餘檢體的 DNA。

編號	樣品名	檢體重量
9	Ham (CT)	250 mg
10	Ham (10%)	250 mg
11	Ham (15%)	250 mg
12	Ham (20%)	250 mg
13	德昌炭燒角豆乾	100 mg
14	德昌五香豆乾	100 mg
15	德昌大溪五香豆乾	100 mg
16	RRS powder	500 mg
17	Non-GM soybean powder	250 mg

詳細操作方法整理於附件十二。

前天以 QIAGEN Genomic-tip 20/G 抽的 DNA 檢體，稀釋 50 倍，測量濃度 (使用機型為 BECKMAN DU-7000)，結果見附件十三。完成今日的 DNA 抽取工作後，連同昨日抽取的 DNA，稀釋 10 倍，去測量濃度，結果見附件十四。

八月十四日 (四)

今日實驗進度是以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽檢體 DNA，仍然只有我自己獨立進行實驗，時間因素只能先做 1 至 9 及 16 號檢體。

編號	樣品名	檢體重量
1	Chicken nugget	1 g
2	Chibini ham	1 g
3	Sausage (H)	1 g
4	White sausage	1 g
5	Sausage (A)	1 g
6	Sliced ham	1 g
7	FrankFruite sausage	1 g
8	Ham (RH)	1 g
9	Ham (CT)	1 g
16	RRS powder	1 g

詳細操作方法整理於附件十五。

QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法與 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法不同的地方，在於 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法以 AP1/CTAB (1%) buffer (AP1+CTAB extraction buffer) 取代 AP1 buffer。

AP1/CTAB (1%) buffer 的配製		
藥品	使用量	方法
AP1 buffer	90 mL	
CTAB extraction buffer (10%)	10 mL	攪拌混合均勻

八月十五日 (五)

接著昨天的進度，今天繼續用 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽取剩餘檢體的 DNA。

編號	樣品名	檢體重量
10	Ham (10%)	1 g
11	Ham (15%)	1 g
12	Ham (20%)	1 g
13	德昌炭燒角豆乾	1 g
14	德昌五香豆乾	1 g
15	德昌大溪五香豆乾	1 g
17	Non-GM soybean powder	1 g

詳細操作方法整理於附件十五。

八月十八日 (一)

終於在上星期結束了抽取 DNA 的工作。早上測定以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽取的 DNA 濃度 (附件十六)，有大約一半的樣品 DNA 抽取失敗，濃度極低，甚至為負值。將於本週四再度進行 DNA 抽取工作。

編號	樣品名	A260/230	A260/280	Dil.Fact.	conc. (ng/ μ L)
1	Chicken nugget	1.21376	1.78237	10	323.98
2	Chibini ham	0.87369	1.74597	10	276.236
3	Sausage (H)	1.05206	1.77213	10	198.55
4	White sausage	0.5952	1.75904	10	19.6951
5	Sausage (A)	-3.1341	2.15575	10	-3.9395
6	Sliced ham	2.07574	1.81657	10	123.602
7	FrankFruite sausage	1.6433	1.81268	10	162.439
8	Ham (RH)	1.52489	1.83869	10	62.4636
9	Ham (CT)	-0.5048	1.25639	10	-0.7145

10	Ham (10%)	0.07169	1.79246	10	-0.5473
11	Ham (15%)	-8.5479	1.79844	10	8.51935
12	Ham (20%)	0.937	1.70242	10	3.05885
13	德昌炭燒角豆乾	2.24526	1.8368	10	30.5776
14	德昌五香豆乾	-1.2265	1.81336	10	15.1507
15	德昌大溪五香豆乾	-3.8145	1.78129	10	38.8845
16	RRS powder	0.08531	1.88863	10	3.62421
17	Non-GM soybean powder	1.75029	1.81421	10	116.288

至於以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽取的 DNA，飯倉惠子女士已經幫我測好濃度（附件十七，稀釋 50 倍測量），濃度太低的檢體也已重新萃取 DNA（附件十八）。

下午開始定性 PCR（LE1 及 RRS 基因）的檢測，先測定 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽出的 DNA。進行 PCR 前，需先將樣本稀釋至濃度 10 ng/μL，方法詳見附件。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [17（樣本數）×2（重覆數）+negative control（無 DNA）+negative control（無 primer）+positive control（使用 plasmid DNA）] ×2（兩種基因）= 74 管。詳細藥品配置與操作方法見附件十九及二十。

八月十九日（二）

上午繼續進行定性 PCR（LE1 及 RRS 基因）的檢測，測定 QIAGEN Genomic-tip 20/G 法抽出的 DNA。進行 PCR 前，同樣需先將樣本稀釋至濃度 10 ng/μL，方法詳見附件二十一。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [17（樣本數）×2（重覆數）+negative control（無 DNA）+negative control（無 primer）+positive control（使用 plasmid DNA）] ×2（兩種基因）=74 管。詳細藥品配置與操作方法見附件二十二。

下午將昨日 (QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽出之 DNA) 之 PCR 產物進行電泳分析，方法見附件二十三。電泳圖見附件二十四。結果整理如下表：

Well 編號	檢體編號	樣品名	LE1	RRS
1	1	Chicken nugget	+	+
2		Chicken nugget	+	+
3	2	Chibini ham	+	-
4		Chibini ham	+	-
5	3	Sausage (H)	+	+
6		Sausage (H)	+	-
7	4	White sausage	-	-
8		White sausage	-	-
9	5	Sausage (A)	+	-
10		Sausage (A)	+	-
11	6	Sliced ham	+	-
12		Sliced ham	+	-
13	7	FrankFruite sausage	+	-
14		FrankFruite sausage	+	-
15	8	Ham (RH)	+	-
16		Ham (RH)	+	-
17	9	Ham (CT)	N	-
18		Ham (CT)	N	-
19	10	Ham (10%)	N	-

20		Ham (10%)	N	—
21	11	Ham (15%)	—	—
22		Ham (15%)	—	—
23	12	Ham (20%)	—	+
24		Ham (20%)	—	—
25	13	德昌炭燒角豆乾	+	+
26		德昌炭燒角豆乾	+	+
27	14	德昌五香豆乾	+	+
28		德昌五香豆乾	+	+
29	15	德昌大溪五香豆乾	+	+
30		德昌大溪五香豆乾	+	+
31	16	RRS powder	+	+
32		RRS powder	+	+
33	17	Non-GM soybean powder	+	—
34		Non-GM soybean powder	+	—
35		negtive control (無 DNA)	—	—
36		negtive control (無 primer)	—	—
37		positive control (plasmid DNA)	+	+
<p>+: 檢定結果陽性。</p> <p>—: 檢定結果陰性。</p> <p>N: 出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。</p>				

LE1 基因分析 (118 bp) 結果, 4 號、11 號及 12 號檢體為陰性, 表示不含大豆 DNA。4 號檢體之檢驗結果符合其商品成分標示 (並無標示含大豆蛋白)。請教柏葉晃一博士 9 到 12 號檢體的來源, 他表示是先前其他實

驗需要，委託 Prima Ham Company 為研究目的而特別製造的，市面上並無銷售，他還特地打電話確認，其成分並不含有大豆蛋白。因此理論上 9 到 12 號檢體的檢驗結果均應呈陰性，然而 9 號及 10 號檢體的檢驗結果卻出現了非預期大小的增幅片段，請教兒玉貴志先生可能的原因。兒玉貴志先生表示當初在設計 primer 的特異性時，只考慮到大麥、小麥及米不會被檢出，但是 9 號及 10 號檢體為加工肉製品，其成份複雜，可能含有相似的序列而導致非特異性增幅片段的出現。

RRS 基因分析 (121 bp) 結果，在加工肉製品的部分，1 號檢體 (雞塊的麵粉皮) 為陽性，表示含基因改造大豆。3 號及 12 號檢體的二重覆中，只有其中之一為陽性，可能是污染，也可能是濃度太低所造成，由於是市場來源的樣本，所以除了廠商之外，我們也無法很肯定到底是否含基因改造大豆。兒玉貴志先生提到他們過去舉辦的實驗室共同試驗 (定性 PCR)，所有實驗室皆可檢出 0.1% 的 GM，但是大約只有 60-70% 的實驗室可檢出 0.05% 的 GM。由於目前實驗室大多數的成員對於統計分析並不十分熟悉，所以他們也無法確切說出定性 PCR 的檢出下限濃度為多少，只能推測是在 0.05-0.1% 之間。至於加工豆製品 (豆乾) 的部分，結果均呈陽性，與其商品之標示 (黃豆「基因改造」) 相符。

八月二十日 (三)

上午仍舊進行定性 PCR (LE1 及 RRS 基因) 的檢測，測定 CTAB 法抽出的 DNA。進行 PCR 前，同樣需先將樣本稀釋至濃度 10 ng/μL，方法詳見附件二十五。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [17 (樣本數) × 2 (重覆數) + negative control (無 DNA) + negative control (無 primer) + positive control (使用 plasmid DNA)] × 2 (兩種基因) = 74 管。詳細藥品配置與操作方法見附件二十六。

下午將昨日 (QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit 法抽出之 DNA) 之 PCR 產物進行電泳分析。電泳圖見附件二十七。結果整理如下表：

QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳結果				
Well 編號	檢體編號	樣品名	LE1	RRS
1	1	Chicken nugget	+	+
2		Chicken nugget	+	+
3	2	Chibini ham	+	+
4		Chibini ham	+	-
5	3	Sausage (H)	+	+
6		Sausage (H)	+	+
7	4	White sausage	-	-
8		White sausage	-	-
9	5	Sausage (A)	+	+
10		Sausage (A)	+	-
11	6	Sliced ham	+	+
12		Sliced ham	+	+
13	7	FrankFruite sausage	+	+
14		FrankFruite sausage	+	-
15	8	Ham (RH)	+	-
16		Ham (RH)	+	+
17	9	Ham (CT)	N	-
18		Ham (CT)	N	-
19	10	Ham (10%)	+N	-
20		Ham (10%)	-	-

21	11	Ham (15%)	N	+
22		Ham (15%)	N	-
23	12	Ham (20%)	N	-
24		Ham (20%)	N	-
25	13	德昌炭燒角豆乾	+	+
26		德昌炭燒角豆乾	+	+
27	14	德昌五香豆乾	+	+
28		德昌五香豆乾	+	+
29	15	德昌大溪五香豆乾	+	+
30		德昌大溪五香豆乾	+	+
31	16	RRS powder	+	+
32		RRS powder	+	+
33	17	Non-GM soybean powder	+	-
34		Non-GM soybean powder	+	-
35		negative control (無 DNA)	-	-
36		negative control (無 primer)	-	-
37		positive control (plasmid DNA)	+	+

+：檢定結果陽性。
 -：檢定結果陰性。
 N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。

LE1 基因分析 (118 bp) 結果，4 號檢體為陰性，檢驗結果符合其商品成分標示 (並無標示含大豆蛋白)。9 到 12 號檢體的檢驗結果出現了非預期大小的增幅片段，且 10 號檢體的二重覆中，其中之一為陽性，檢驗結果與 Prima Ham Company 宣稱其成分不含大豆蛋白不一致。

RRS 基因分析 (121 bp) 結果，和昨日差異較大。在加工肉製品的部分，昨日呈陰性的 2 號、5-8 號、11 號檢體，今天檢驗結果為陽性。請教兒玉貴志先生是否 QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit 法敏感度較 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法高？兒玉貴志先生表示 QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit 使用開放式管柱流洗，不像 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 的管柱有蓋子，因此很容易污染。原則上他們監測市售商品使用的是 QIAGEN DNeasy Maxi Kit，檢驗結果不符之後才會考慮使用 QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit。

至於加工豆製品（豆乾）的部分，結果均呈陽性，與其商品之標示（黃豆「基因改造」）相符。

八月二十一日（四）

由於一部分以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽取的 DNA 檢體不佳，今天重新進行 DNA 抽取的工作。

編號	樣品名	檢體重量
4	White sausage	1 g
5	Sausage (A)	1 g
9	Ham (CT)	1 g
10	Ham (10%)	1 g
11	Ham (15%)	1 g
12	Ham (20%)	1 g
14	德昌五香豆乾	1 g
16	RRS powder	1 g

請教兒玉貴志先生 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法的由來。兒

玉貴志先生表示其為 GeneScan 公司發明的。GeneScan 公司總裁幾個星期前曾經到此，表示以 AP1/CTAB buffer 取代 AP1 buffer 可以抽到較多 DNA，但是卻沒透露 CTAB 的最適濃度是多少。因此，他們也只能試不同濃度的 CTAB 看看結果如何。我是實驗室中第二個使用 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽取 DNA 的人，第一個為先前離開的韓國鄭明恩女士，她使用的 CTAB 濃度為 0.2%，但是實驗結果並不理想，亦即抽取的 DNA 濃度並不如使用 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽取來的高。我使用的 CTAB 濃度較高，為 1%，但是似乎也不理想，今天再重試一次。

我想知道 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法的設計原理，因此詢問兒玉貴志先生 AP1 buffer 和 CTAB buffer 的組成。兒玉貴志先生立刻翻閱操作手冊，很可惜 QIAGEN 公司並沒有公開 AP1 buffer 的成分。

不過這裡使用的 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法並不完全依照操作手冊上的步驟，原因是 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 原先的設計是用來抽取植物本體的 DNA，然而種子的油脂及蛋白質含量皆高，DNA 抽取較不易。因此他們改良了方法，將 AP1 buffer 及 AP2 buffer 的用量提高，並增加 isopropanol 和酒精的步驟來純化 DNA。

晚上將昨日 (CTAB 法) 之 PCR 產物進行電泳分析。電泳圖見附件二十八。結果整理如下表：

CTAB 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳結果				
Well 編號	檢體編號	樣品名	LE1	RRS
1	1	Chicken nugget	-	+
2		Chicken nugget	+	-
3	2	Chibini ham	+	-
4		Chibini ham	+	-

5	3	Sausage (H)	+	-
6		Sausage (H)	+	+
7	4	White sausage	-	-
8		White sausage	-	-
9	5	Sausage (A)	+	-
10		Sausage (A)	+	-
11	6	Sliced ham	+	-
12		Sliced ham	+	-
13	7	FrankFruite sausage	+	+
14		FrankFruite sausage	+	-
15	8	Ham (RH)	+	+
16		Ham (RH)	+	+
17	9	Ham (CT)	N	-
18		Ham (CT)	N	-
19	10	Ham (10%)	-	-
20		Ham (10%)	-	-
21	11	Ham (15%)	-	-
22		Ham (15%)	-	-
23	12	Ham (20%)	-	-
24		Ham (20%)	-	-
25	13	德昌炭燒角豆乾	+	+
26		德昌炭燒角豆乾	+	+
27	14	德昌五香豆乾	+	+
28		德昌五香豆乾	+	+

29	15	德昌大溪五香豆乾	+	+
30		德昌大溪五香豆乾	+	+
31	16	RRS powder	+	+
32		RRS powder	+	+
33	17	Non-GM soybean powder	+	-
34		Non-GM soybean powder	+	-
35		negative control (無 DNA)	-	-
36		negative control (無 primer)	-	-
37		positive control (plasmid DNA)	+	+
+：檢定結果陽性。 -：檢定結果陰性。 N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。				

LE1 基因分析 (118 bp) 結果，4 號、11 號及 12 號檢體為陰性，表示不含大豆 DNA。4 號檢體之檢驗結果符合其商品成分標示 (並無標示含大豆蛋白)。9 號檢體檢驗結果出現了非預期大小的增幅片段。

RRS 基因分析 (121 bp) 結果，在加工肉製品的部分，1 號、3 號及 7 號檢體的二重覆中，只有其中之一為陽性。8 號檢體檢驗結果為陽性，可能含基因改造大豆。至於加工豆製品 (豆乾) 的部分，結果均呈陽性，與其商品之標示 (黃豆「基因改造」) 相符。

八月二十二日 (五)

上午先測定昨日以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit + CTAB 法抽出的 DNA 濃度，結果 DNA 濃度仍低然非常低，9 號檢體的濃度低於第一次的濃度 (附件二十九)，所以 9 號檢體仍使用第一抽進行定性 PCR。

編號	樣品名	A260/230	A260/280	Dil.Fact.	conc. (ng/ μ L)
4	White sausage	0.35379	1.90216	10	10.34779
5	Sausage (A)	0.11434	5.74129	10	2.15637
9	Ham (CT)	0.23218	2.47724	10	3.08109
10	Ham (10%)	1.41919	1.85518	10	66.19716
11	Ham (15%)	0.61760	1.93802	10	13.69360
12	Ham (20%)	1.14402	1.83961	10	45.44184
14	德昌五香豆乾	0.84610	1.95454	10	26.49112
16	RRS powder	1.01841	1.81211	10	80.15472

接著進行定性 PCR (LE1 及 RRS 基因) 的檢測。進行 PCR 前，同樣需先將樣本稀釋至濃度 10 ng/ μ L，濃度低於 10 ng/ μ L 則直接使用原液，方法詳見附件三十。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [17 (樣本數) \times 2 (重覆數) + negative control (無 DNA) + negative control (無 primer) + positive control (使用 plasmid DNA)] \times 2 (兩種基因) = 74 管。詳細藥品配置與操作方法見附件三十一。

奧田智勇先生告知下午一點在セミナー室有討論，所以必須在中午前把實驗趕完。下午整個討論過程都用日文，還好有些有書面資料。首先是朝日啤酒的吉村倫彰先生，他們要張貼 "Quantitative Analysis of Genetically Modified Organisms in Processed Foods from Soy and Maize by Using Japanese Standard Method" 的論文海報，因此在討論一些版面配置問題。這篇論文內容在探討加熱加工處理 (heat-treated processing model, HTPM) 對 GM ratio (%) 的影響，發現隨著熱處理 (110 $^{\circ}$ C autoclave) 的時間增長，GM ratio 會逐漸增加。並且比較大豆在製成豆腐、豆漿、boiled beans 前後，以及玉米在製成 corn starch、corn puff、

corn chip 前後，GM ratio 的改變。其主要的結論有四點：一、許多原料在加工前後，GM ratio 有統計上顯著差異。二、玉米點心的 DNA 抽取方法仍須改進。三、豆腐、豆漿和 corn starch 與其原料比較，GM ratio 的變化量在 20% 以內。四、從豆腐、豆漿和 corn starch 的 DNA 定量來估計其原始 GM ratio 可能可行（附件三十二）。

接下來是 NIPPON GENE 株式会社ニッポンジーン研究試薬部製品開發第二課係長古井聡博士，由於沒有書面資料，所以不知論文正確名稱。感謝坐在身邊的奧田智勇先生翻譯，以及柏葉晃一博士的解釋，原來古井聡博士的實驗使用 multiplex PCR 方法，一次只需使用二管（一管含 TC1507、Mon863、NK603、T25，另一管含 Mon810、Event176、GA21、Bt11）進行 PCR 之後，混合，電泳分析可清楚見到 8 條 band，即可鑑別八種 GM 品系。

之後吉村倫彰先生又有另一日文補充資料「DNeasy 抽出イソプロパノール沉殿時の塩（酢酸ナトリウム）添加の影響について」，即使用 QIAGEN DNeasy Kit 法抽取 DNA 時，在 isopropanol 步驟（參考附件三十三）添加醋酸鈉與否，對於抽出 DNA 之 GM ratio 的影響。在大豆方面，有無添加醋酸鈉，其 GM ratio 有統計上的顯著差異，添加醋酸鈉的 GM ratio 明顯較低。玉米則無差異。

討論結束後，見到兒玉貴志先生拿了一份資料，是關於定量的實驗，雖然目前為止我還沒接觸到定量的部分，我仍向兒玉貴志先生表示希望可以得到此份資料，見附件三十四。

八月二十五日（一）

上午將上星期五（QIAGEN DNeasy Maxi Kit + CTAB 法）之 PCR 產物進行電泳分析。電泳圖見附件三十五。結果整理如下表：

QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳結果

Well 編號	檢體編號	樣品名	LE1	RRS
1	M+C1	Chicken nugget	+	+
2		Chicken nugget	+	+N
3	M+C2	Chibini ham	+	-
4		Chibini ham	+	-
5	M+C3	Sausage (H)	+	-
6		Sausage (H)	+	-
7	M+C4	White sausage	-	N
8		White sausage	-	-
9	M+C5	Sausage (A)	+	-
10		Sausage (A)	+	-
11	M+C6	Sliced ham	+	-
12		Sliced ham	+	-
13	M+C7	FrankFruite sausage	+	+
14		FrankFruite sausage	+	+
15	M+C8	Ham (RH)	+	+
16		Ham (RH)	+	+
17	M+C9	Ham (CT)	N	-
18		Ham (CT)	N	-
19	M+C10	Ham (10%)	N	-
20		Ham (10%)	N	-
21	M+C11	Ham (15%)	N	-

22		Ham (15%)	N	—
23	M+C12	Ham (20%)	N	—
24		Ham (20%)	N	—
25	M+C13	德昌炭燒角豆乾	+	+
26		德昌炭燒角豆乾	+	+
27	M+C14	德昌五香豆乾	+	+
28		德昌五香豆乾	+	+
29	M+C15	德昌大溪五香豆乾	+	+
30		德昌大溪五香豆乾	+	+
31	M+C16	RRS powder	+	+
32		RRS powder	+	+
33	M+C17	Non-GM soybean powder	+	—
34		Non-GM soybean powder	+	—
35		negative control (無 DNA)	—	—
36		negative control (無 primer)	—	—
37		positive control (plasmid DNA)	+	+

+：檢定結果陽性。
 —：檢定結果陰性。
 N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。

LE1 基因分析 (118 bp) 結果，4 號檢體為陰性，檢驗結果符合其商品成分標示 (並無標示含大豆蛋白)。9 到 12 號檢體的檢驗結果出現了非預期大小的增幅片段。

RRS 基因分析 (121 bp) 結果，在加工肉製品的部分，1 號、7 號和 8 號檢體呈陽性，1 號和 4 號檢體的檢驗結果出現了非預期大小的增幅片

段。至於加工豆製品（豆乾）的部分，結果均呈陽性，與其商品之標示（黃豆「基因改造」）相符。

下午柏葉晃一博士及兒玉貴志先生要求我今天交出初步的報告（見附件三十六）以決定這一週要進行的實驗。

八月二十六日（二）

原本以為做完定性 PCR 分析後，接著要繼續做定量分析。但是兒玉貴志先生表示，這些產品已經過度加工，DNA 已斷裂成許多破碎小片段，copy number 也低。加工品方面，他們曾經做過豆漿、豆腐等的定量分析，目前他們還是認為只有種子最適合做定量。至於加工食品，只需做到定性即可。

因此這一週要進行的實驗，要將之前結果為 LE1 基因（-）但是 RRS 基因（+）以及出現非預期大小增幅片段的檢體，再次進行定性 PCR 的再確認工作。

上午依進度進行定性 PCR（LE1 及 RRS 基因）的檢測，測定四種方法抽出的 9-12 號檢體 DNA。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [4（樣本數）×4（抽取方法）×2（重覆數）+negative control（無 DNA）+negative control（無 primer）+positive control（使用 plasmid DNA）] ×2（兩種基因）=70 管。詳細藥品配置與操作方法見附件三十七。

中午用餐的路上，兒玉貴志先生接到一通電話得知他爺爺過世的消息，下午匆匆趕回爺爺的老家奔喪。

下午將 PCR 產物進行電泳分析。電泳圖見附件三十八。結果整理如下表：

進行定性 PCR 再確認之電泳結果與先前結果之比較				
Well 編號	檢體編號	樣品名	今日	先前

			LE1	RRS	LE1	RRS
1	CT9	Ham (CT)	N	–	N	–
2		Ham (CT)	N	–	N	–
3	CT10	Ham (10%)	–	–	–	–
4		Ham (10%)	–	–	–	–
5	CT11	Ham (15%)	N	–	–	–
6		Ham (15%)	N	+	–	–
7	CT12	Ham (20%)	N	N	–	–
8		Ham (20%)	–	–	–	–
9	M9	Ham (CT)	N	–	N	–
10		Ham (CT)	N	–	N	–
11	M10	Ham (10%)	N	–	N	–
12		Ham (10%)	N	–	N	–
13	M11	Ham (15%)	–	N	–	–
14		Ham (15%)	+	–	–	–
15	M12	Ham (20%)	N	–	–	+
16		Ham (20%)	N	–	–	–
17	M+C9	Ham (CT)	N	–	N	–
18		Ham (CT)	N	–	N	–
19	M+C10	Ham (10%)	N	–	N	–
20		Ham (10%)	N	–	N	–
21	M+C11	Ham (15%)	N	–	N	–
22		Ham (15%)	N	–	N	–
23	M+C12	Ham (20%)	N	–	N	–

24		Ham (20%)	N	—	N	—
25	G9	Ham (CT)	N	—	N	—
26		Ham (CT)	+N	—	N	—
27	G10	Ham (10%)	N	—	+N	—
28		Ham (10%)	N	—	—	—
29	G11	Ham (15%)	N	—	N	+
30		Ham (15%)	N	—	N	—
31	G12	Ham (20%)	+	—	N	—
32		Ham (20%)	N	—	N	—
33		negative control (無 DNA)	—	—		
34		negative control (無 primer)	—	—		
35		positive control (plasmid DNA)	+	+		
+：檢定結果陽性。 —：檢定結果陰性。 N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。						

LE1 基因分析 (118 bp) 結果，除了 CTAB 法的 10 號檢體檢驗結果為陰性之外，其他檢體幾乎都還是出現非預期大小的增幅片段，且至少有五種以上不同大小的增幅片段。RRS 基因分析 (121 bp) 結果，CTAB 法的 11 和 12 號檢體，以及 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法的 11 號檢體二重複結果不一致。CTAB 法的 11 號檢體檢驗結果之一為陽性。今天和先前結果的比較，今天出現非預期大小增幅片段的情況似乎更嚴重。

八月二十七日（三）

上午拿昨天的結果與日野明寬博士討論後，決定今天下午用韓國鄭明恩抽的 DNA 來試。由於兒玉貴志的爺爺過世，他臨時趕回家奔喪，加上實驗室大部份的人都休假（為期一週的暑假），今天實驗室空盪盪，在場的人沒人知道鄭明恩 DNA 的放置位置，所以今天定性 PCR 只試了部分鄭明恩的 DNA 和我之前結果為 LE1 基因(-)但是 RRS 基因(+)的 DNA 檢體。

下午進行定性 PCR(LE1 及 RRS 基因)的檢測。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [[4 (樣本數) × 3 (抽取方法) + 1 (CTAB 法 1 號檢體) - 1 (遍尋不著鄭明恩的 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法 9 號檢體)] × 2 (重覆數) - 1 (鄭明恩的 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法 12 號檢體只夠做一重覆) + negative control (無 DNA) + negative control (無 primer) + positive control (使用 plasmid DNA)] × 2 (兩種基因) = 52 管。詳細藥品配置與操作方法見附件三十九。

下午三點多農林水產省橫濱植物防疫所的一群工作人員來此參訪，由任職於橫濱植物防疫所、目前同樣在此研習的奧田智勇先生來解說。據奧田智勇先生表示，橫濱植物防疫所（附件四十與四十一）才剛剛成立 GMO group，目前尚未添置任何的定量設備，預計明年度會購買 ABI 7900。他們隨後前往同樣位於筑波的獨立行政法人種苗管理センター。深深感受到日本各研究機構之間往來的密切。

八月二十八日（四）

接近中午時分兒玉貴志先生回來了，於是立刻進行定性 PCR (LE1 及 RRS 基因) 的檢測，補做昨日遍尋不著的鄭明恩 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法的 9 號檢體。使用 0.2 mL tube 進行 PCR 反應。共需 [1 (樣本數) × 2 (重覆數) + negative control (無 DNA) + negative control (無 primer)]

+ positive control (使用 plasmid DNA)) x2 (兩種基因) = 10 管。詳細藥品配置與操作方法見附件四十二。

由於明天就要離開，結束為期四星期的研習，下午除了忙著整理報告之外，也忙著到處分送紀念品，以感謝他們一個月來對我的照顧。

晚上和兇玉貴志先生討論前天實驗的結果。Prima Ham Company 製造的 9 到 12 號檢體聲稱不含有大豆蛋白，為什麼有時 PCR 之後電泳檢驗結果卻呈陽性？兇玉貴志先生說，依照他之前曾經讀過的資料，認為應該是生產線污染的緣故，一家廠商生產的產品很多，但是生產線卻不可能這麼多，共用生產線的結果，可能導致污染。我繼續詢問，同樣的檢體，PCR 之後電泳結果卻有所不同，應該如何決定其檢驗結果？兇玉貴志先生表示，若三次檢驗中有兩次結果呈現陰性，則斷定為陰性。我向兇玉貴志先生要求能不能找出相關的資料給我參考，他上網查出一份去年農林水產省綜合食料局公佈的「有機大豆使用食品緊急調查結果」（見附件四十三）。日本的檢驗步驟為：(一) 加工食品 DNA 之定性 PCR 檢驗。若商品標示非基因改造，但檢驗結果出現陽性者，則(二)查看加工廠原料的 IP (Identity Preserved) handling system，並使用公權力取得原料，再進行(三)加工食品原料 DNA 之定性 PCR 檢驗。

八月二十九日（五）

今天是在筑波研習的最後一天了，但是部分實驗仍未完成。上午將 PCR 產物進行電泳分析。電泳圖見附件四十四。結果整理如下表：

進行定性 PCR 再確認之電泳結果				
Well 編號	檢體編號	樣品名	LE1	RRS
1	CT9 (韓)	Ham (CT)	N	—

2		Ham (CT)	N	—
3	CT10 (韓)	Ham (10%)	N	+
4		Ham (10%)	N	—
5	CT11 (韓)	Ham (15%)	N	—
6		Ham (15%)	N	—
7	CT12 (韓)	Ham (20%)	+N	—
8		Ham (20%)	N	—
9	M10 (韓)	Ham (10%)	N	—
10		Ham (10%)	+N	—
11	M11 (韓)	Ham (15%)	+N	+
12		Ham (15%)	+N	—
13	M12 (韓)	Ham (20%)	+N	—
14	G9 (韓)	Ham (CT)	—	—
15		Ham (CT)	—	—
16	G10 (韓)	Ham (10%)	+	+
17		Ham (10%)	+	+
18	G11 (韓)	Ham (15%)	+	+
19		Ham (15%)	+	+
20	G12 (韓)	Ham (20%)	+	+
21		Ham (20%)	+	+
22	CT1	Chicken nugget	+	—
23		Chicken nugget	—	—
24		negative control (無 DNA)	—	—
25		negative control (無 primer)	—	—

26		positive control (plasmid DNA)	+	+
27	M9 (韓)	Ham (CT)	-	-
28		Ham (CT)	-	-
29		negtive control (無 DNA)	-	-
30		negtive control (無 primer)	-	-
31		positive control (plasmid DNA)	-	+

+：檢定結果陽性。
 -：檢定結果陰性。
 N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。

前天的 PCR 電泳，positive control 居然出現 LE1 陰性的結果，由於當天使用的是新拆封的質體 DNA，和前幾天使用的不同，我立刻將結果告知兪玉貴志先生，他表示會去確認這批質體 DNA 是否有問題。

將全部電泳結果整理如下：

定性 PCR 之電泳結果總整理					
檢體編號	PCR 日期	LE1	RRS	樣品名	結果
CT1	20030820	-	+	Chicken nugget	此樣品為炸雞塊的麵粉皮，與其他肉類加工之樣品不同，實驗結果顯示 CTAB 法似乎較不適用於雞塊
	20030820	+	-		
	20030827	+	-		
	20030827	-	-		
M1	20030818	+	+		
	20030818	+	+		
M+C1	20030822	+	+		
	20030822	+	+N		
G1	20030819	+	+		

	20030819	+	+		麵粉皮之 DNA 抽取。		
CT2	20030820	+	-	Chibini ham	僅 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit 法 之結果出現 RRS 陽 性，推測此 樣品應不含 基因改造大 豆。		
	20030820	+	-				
M2	20030818	+	-				
	20030818	+	-				
M+C2	20030822	+	-				
	20030822	+	-				
G2	20030819	+	+				
	20030819	+	-				
CT3	20030820	+	-			Sausage (H)	無法判定是 否含基因改 造大豆，可 能是生產線 污染的結 果，需與廠 商聯繫做進 一步分析方 可得知。
	20030820	+	+				
M3	20030818	+	-				
	20030818	+	+				
M+C3	20030822	+	-				
	20030822	+	-				
G3	20030819	+	+				
	20030819	+	+				
CT4	20030820	-	-	White sausage	此樣品檢驗 結果不含基 因改造大 豆，與包裝 上標示相		
	20030820	-	-				
M4	20030818	-	-				
	20030818	-	-				
M+C4	20030822	-	N				

	20030822	-	-		符。		
G4	20030819	-	-				
	20030819	-	-				
CT5	20030820	+	-	Sausage (A)	僅 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit 法之結果出現 RRS 陽性，推測此樣品應不含基因改造大豆。		
	20030820	+	-				
M5	20030818	+	-				
	20030818	+	-				
M+C5	20030822	+	-				
	20030822	+	-				
G5	20030819	+	+				
	20030819	+	-				
CT6	20030820	+	-			Sliced ham	僅 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit 法之結果出現 RRS 陽性，推測此樣品應不含基因改造大豆。
	20030820	+	-				
M6	20030818	+	-				
	20030818	+	-				
M+C6	20030822	+	-				
	20030822	+	-				
G6	20030819	+	+				
	20030819	+	+				
CT7	20030820	+	+	FrankFruite sausage	無法判定是否含基因改造大豆，可能是生產線		
	20030820	+	-				
M7	20030818	+	-				
	20030818	+	-				

M+C7	20030822	+	+		污 染 的 結 果，需與廠 商聯繫做進 一步分析方 可得知。		
	20030822	+	+				
G7	20030819	+	+				
	20030819	+	-				
CT8	20030820	+	+	Ham (RH)	無 法 判 定 是 否 含 基 因 改 造 大 豆，可 能 是 生 產 線 污 染 的 結 果，需與廠 商聯繫做進 一步分析方 可得知。		
	20030820	+	+				
M8	20030818	+	-				
	20030818	+	-				
M+C8	20030822	+	+				
	20030822	+	+				
G8	20030819	+	-				
	20030819	+	+				
CT9	20030820	N	-			Ham (CT)	出 現 許 多 非 特 異 性 幅 產 物，但是檢 驗 結 果 為 陰 性。與 Prima Ham Company 聲 稱 不 含 大 豆 蛋 白 相 符。
	20030820	N	-				
	20030826	N	-				
	20030826	N	-				
	20030827 (韓)	N	-				
	20030827 (韓)	N	-				
M9	20030818	N	-				
	20030818	N	-				
	20030826	N	-				

	20030826	N	—		
	20030828 (韓)	—	—		
	20030828 (韓)	—	—		
M+C9	20030822	N	—		
	20030822	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
G9	20030819	N	—		
	20030819	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	+N	—		
	20030827 (韓)	—	—		
	20030827 (韓)	—	—		
CT10	20030820	—	—	Ham (10%)	韓國鄭明恩女士的CT10及G10檢體檢驗結果出現RRS陽性，但本人抽取的檢體
	20030820	—	—		
	20030826	—	—		
	20030826	—	—		
	20030827 (韓)	N	+		
	20030827 (韓)	N	—		

M10	20030818	N	—		抽取的檢體檢驗結果均為 RRS 陽性，推測應是鄭明恩女士抽取 DNA 步驟時污染所致。雖然出現許多非特异性幅產物，但是檢驗結果應為陰性。與 Prima Ham Company 聲稱不含大豆蛋白相符。
	20030818	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
	20030827 (韓)	N	—		
	20030827 (韓)	+N	—		
M+C10	20030822	N	—		
	20030822	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
G10	20030819	+N	—		
	20030819	—	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
	20030827 (韓)	+	+		
	20030827 (韓)	+	+		
CT11	20030820	—	—	Ham (15%)	部分結果呈現 RRS 陽性，但是 LE1 結果卻
	20030820	—	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	+		

	20030827 (韓)	N	—		不是陽性。可能在 primer 的設計上，對於 RRS 的檢測較敏感，可測出極低濃度的基因改造大豆（可能是生產線污染所致）。韓國鄭明恩女士的 G11 檢體檢驗結果出現 LE1 及 RRS 陽性，應是抽取 DNA 步驟時污染所致。
	20030827 (韓)	N	—		
M11	20030818	—	—		
	20030818	—	—		
	20030826	—	N		
	20030826	+	—		
	20030827 (韓)	+N	+		
	20030827 (韓)	+N	—		
M+C11	20030822	N	—		
	20030822	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
G11	20030819	N	+		
	20030819	N	—		
	20030826	N	—		
	20030826	N	—		
	20030827 (韓)	+	+		
	20030827 (韓)	+	+		
CT12	20030820	—	—	Ham (20%)	QIAGEN

	20030820	—	—	Genomic-tip 20/G kit 法 抽 取 之 DNA，PCR 結果容易出 現陽性，可 能其為開放 式 留 洗 管 柱，容易造 成檢體污染 的情形。
	20030826	N	N	
	20030826	—	—	
	20030827 (韓)	+N	—	
	20030827 (韓)	N	—	
M12	20030818	—	+	
	20030818	—	—	
	20030826	N	—	
	20030826	N	—	
	20030827 (韓)	+N	—	
M+C12	20030822	N	—	
	20030822	N	—	
	20030826	N	—	
	20030826	N	—	
G12	20030819	N	—	
	20030819	N	—	
	20030826	+	—	
	20030826	N	—	
	20030827 (韓)	+	+	
	20030827 (韓)	+	+	

CT13	20030820	+	+	德昌炭燒角豆乾	LE1 及 RRS 結果均呈陽性，與其商品之標示(黃豆「基因改造」)相符。		
	20030820	+	+				
M13	20030818	+	+				
	20030818	+	+				
M+C13	20030822	+	+				
	20030822	+	+				
G13	20030819	+	+				
	20030819	+	+				
CT14	20030820	+	+			德昌五香豆乾	LE1 及 RRS 結果均呈陽性，與其商品之標示(黃豆「基因改造」)相符。
	20030820	+	+				
M14	20030818	+	+				
	20030818	+	+				
M+C14	20030822	+	+				
	20030822	+	+				
G14	20030819	+	+				
	20030819	+	+				
CT15	20030820	+	+	德昌大溪五香豆乾	LE1 及 RRS 結果均呈陽性，與其商品之標示(黃豆「基因改造」)相符。		
	20030820	+	+				
M15	20030818	+	+				
	20030818	+	+				
M+C15	20030822	+	+				
	20030822	+	+				
G15	20030819	+	+				
	20030819	+	+				

＋：檢定結果陽性。
－：檢定結果陰性。
N：出現非特異性 (non-specific) 之 PCR 增幅產物。

下午一直在整理報告 (附件四十五)，完成之後列印出來給柏葉晃一博士和兒玉貴志先生看過，確定沒問題之後，總算可以放心離開，結束這四週有笑有淚的研習。

八月三十日 (六)

難得的假日，於東京街頭感受迥異於筑波園區的氣氛，突然視線為朝日啤酒公司總部的建築所吸引。位於東京的朝日啤酒公司總部大樓，完成於一九八九年，有著琥珀色的玻璃外牆及啤酒泡造型的標幟，非常獨特。

八月三十一日 (日)

上午十點，自下榻飯店出發，往成田機場。搭乘長榮航空 BR2197 班機，飛回闊別一個月台北溫暖的家。

參、心得及建議

此次赴「日本農林水產省獨立行政法人食品綜合研究所」學習加工食品的檢驗技術及方法，為期四週的研習期間，不論在實驗技術及生活態度上，皆受益良多。

- 一、基因改造加工食品的檢驗研究。此次檢驗之基因改造加工食品有添加植物性蛋白的加工肉製品及加工大豆製品，添加植物性蛋白的加工肉製品包括冷凍炸雞塊和各種香腸火腿產品，加工大豆製品則為鹽分很高的豆乾。加工肉製品先前已由韓國鄭明恩女士完成玉米 DNA 定性分析的部分，因此樣品之處理方式及實驗過程有前人經驗可參考，較為容易。至於豆乾為台灣名產，鹽分高且硬度高，日本並無類似之加工食品，也因此整個實驗都是在一邊討論一邊摸索之下進行，以樣品的均質工作為例，我們嘗試了濕磨與乾磨、粉碎前加水或粉碎後加水、調整不同的加水量等等數種方式，以期能做到做好的結果。DNA 的抽取工作也分別以 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit、QIAGEN DNeasy Maxi Kit、CTAB 法以及 QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 四種方法抽取，相互比較以找尋最適合的 DNA 抽取方式。結果顯示，雖然以 QIAGEN Genomic-tip 20/G kit 方式抽取之 DNA 濃度較其他方式高出許多，但其為開放式流洗管柱，極易造成樣品間污染，原則上不建議使用。冷凍炸雞塊麵粉皮的 DNA 以 CTAB 法萃取效果不佳，使用 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法效果最好。QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 方法並沒有達到預期優於 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 的結果，香腸火腿類產品仍以 QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽取 DNA 最佳，抽取之 DNA 濃度高於 CTAB 法。至於加工大豆製品則較適用以 CTAB 法，抽取之 DNA 濃度高於 QIAGEN DNeasy Maxi Kit。

二、實驗室規劃及實驗操作。日野明寬博士實驗室雖然沒有將各類實驗的操作分隔成獨立的操作室，但是所有實驗人員均遵循實驗室規定，抽取 DNA、定性、定量、電泳均有專門的操作台，操作台上的實驗用具都以標籤標示其所屬的操作台，因此各操作台上的實驗用具也都非常齊全，包括全套各種體積大小的微量分注器、70%酒精、紙巾、剪刀、標籤紙、標示用奇異筆等等，避免各操作台間用具混用造成污染問題。在實驗開始之前，操作台面須以 70%酒精仔細擦拭，並鋪設乾淨保鮮膜。實驗的操作上，不但空間分隔，連操作順序都需留意。例如同時間有 PCR 及電泳兩項工作，由於電泳所鑑定的檢體為經過大量增幅的 DNA，濃度很高，所以須先進行 PCR 的操作，以避免污染。實驗操作完畢，操作台及使用工具如試管架等，須以 70%酒精仔細擦拭並晾乾，以方便下一位操作者的使用。各試劑套組或消耗品的放置也盡量擺放在接近該操作台的位置，且使用紀錄詳實，每罐藥劑的購入日期、開封日期、使用量及存貨量皆詳細紀錄。這些實驗室的規劃可使任何新進人員很快熟悉工作環境，實驗過程中減少不必要的時間浪費，使得實驗進行的流程非常順暢，也不容易發生錯誤及污染問題。

三、實驗操作方法明確。實驗室中有專門放置各種實驗操作方法的鐵櫃，操作方法的細節步驟，包括特殊步驟的實驗技巧或可能遇到的情形都描述得非常詳盡。實驗室人員的流動在所難免，加上日野明寬博士實驗室常有不同單位的人員來此研習，有此實驗室標準操作程序，可使任何新進人員在最短時間內熟悉實驗操作，也減少指導訓練的人力。

四、政府與民間單位合作交流。於食品綜合研究所為期四週的研習期間，遇見來自其他政府單位及各民間企業的研究人員。藉由人員相互合

作，彼此技術交流，政府單位不需多支付薪資，卻可擁有更多的研究人才，提升研究效率。台灣政府與民間單位合作交流情形雖仍不普遍，但目前部份研究單位及大學紛紛開始設置育成中心，和民間廠商交流，促進產學合作，不論對於研究單位或是企業皆有很大的幫助。國內目前有數個研究單位從事基因改造食品的檢驗及研究，某些大型食品企業亦對基因改造食品重視，若能加強各單位間的交流，相信對於國內日後執行基因改造食品相關政策必有所助益。

五、研究紀錄的保存。所有日野明寬博士實驗室的成員，包括正式員工、其他政府單位公務人員、民間企業的研究人員以及短期研習之人員，實驗過程都必須完整詳實紀錄，在研習結束或完成階段性工作任務時，繳交書面及數位之研習報告，書面研習報告有專門的鐵櫃存放，數位研習報告則燒製成光碟片，並在內外以標籤標示清楚光碟片的內容，依照研究時間先後順序整齊存放於專門的抽屜中。若有需要翻閱之前人員的實驗紀錄，都可以在第一時間內查詢到所需的資料。

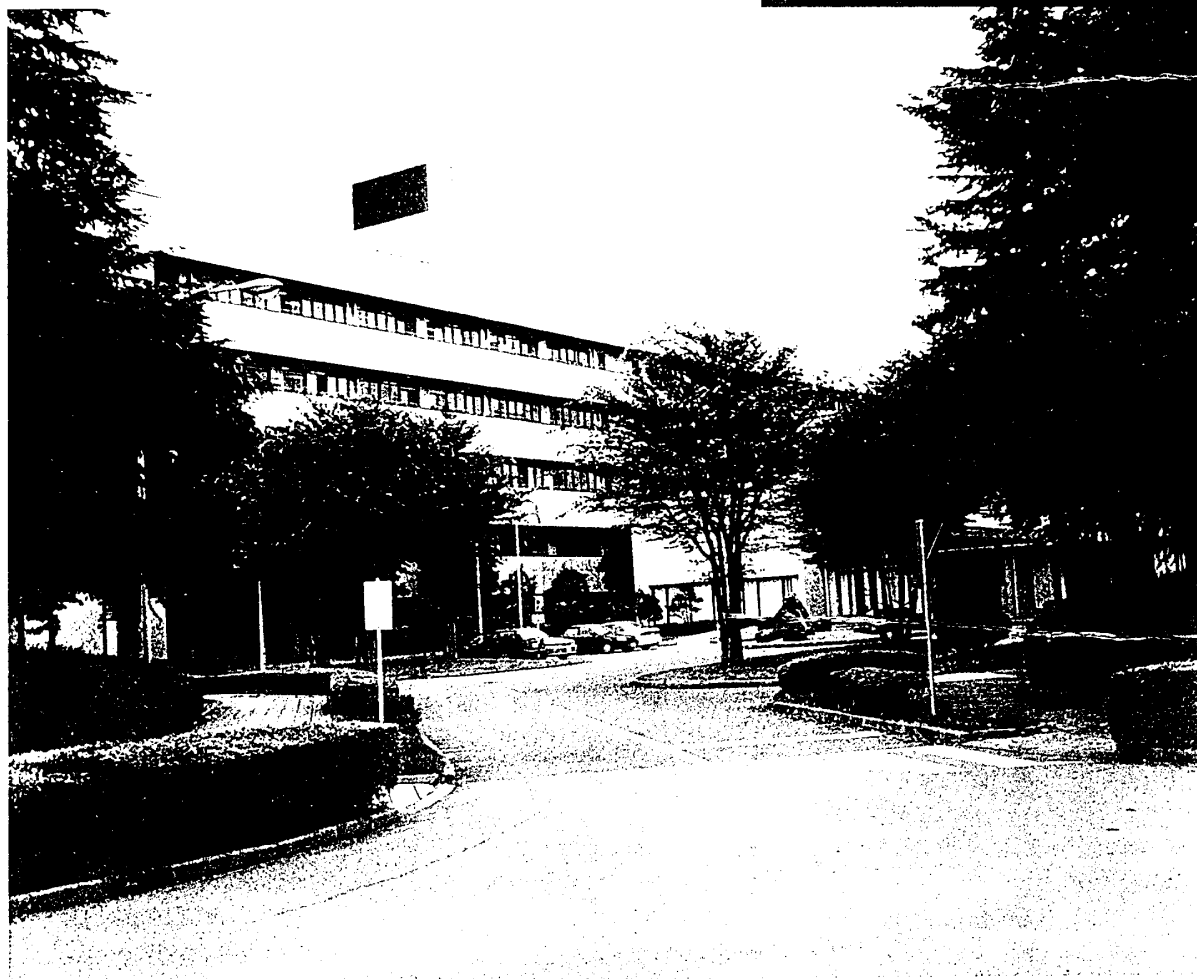
六、實驗室的向心力與歸屬感。日本人態度的認真及對於工作的要求是眾所皆知的。依據觀察，實驗室每星期一的清潔日，不需任何人的指揮，也不需指定分配工作，所有成員都自動自發，分別拿起掃把、吸塵器、拖把開始打掃。即使在平常日，有不清潔的地方，大家也都會主動清理。藉由共同清潔及維持實驗室環境，培養彼此默契與情感，從日常生活的小地方做起，進而增進對實驗室的向心力與歸屬感。每日早晨前往實驗室的路上，即使是不認識的人，遇到一定會相互問好，進了實驗室，大家也都親切的打招呼，一天的工作在非常愉快的氣氛下開始，自然而然工作效率也會提升許多。

本人於藥物食品檢驗局服務未滿一年，即能有機會赴日研習新的檢驗技術及方法，除感謝本局長官的重視之外，亦感謝本組施養志組長以及闕麗卿研究員極力爭取經費始能成行，並感謝本組其他同仁在本人赴日前及赴日期間提供寶貴的經驗及協助，同時感謝日本農林水產省獨立行政法人食品綜合研究所食品機能部味覺機能研究室室長日野明寬博士以及柏葉晃一博士後研究在研習期間所提供的各方面幫助。

肆、附 件



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

Contact our Research Planning and Coordination Division for Collaboration and/or Information:

- () 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

- ① Development of measures for food protection
- ② Food function and quality
- ③ Promotion of genome information analysis of useful microorganisms for fermentation industry
- ④ Creation of functionally-strengthening macromolecules based upon protein engineering, 3D analyses and bioinformatics
- ⑤ Development of micro-channel arrays and their applications including blood rheology measurement



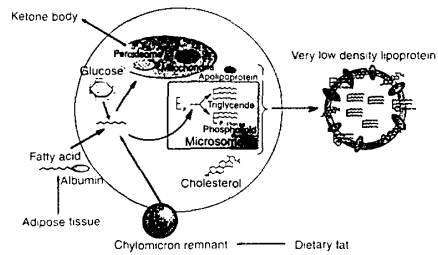
Staphylococcus aureus

Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7

Food Function Division

The nutritional, gustatory, physical and physiological functionalities of foods and food components

- ① The physiological activity of food components to reduce serum lipid and prevent obesity
- ② Mechanism of taste response and its physiological regulation
- ③ Physicochemical properties of food and the physiological effects on humans
- ④ Research into functional food factors in vegetables and fruits and their effects
- ⑤ Mechanism of digestion and absorption, and improving effects on brain function

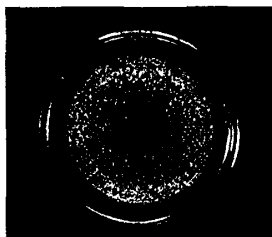


Lipoprotein production and hepatic fatty acid metabolism

Food Safety and Quality Division

Food safety and preservation of quality during distribution of food resources and foods

- ① Evaluation and method development of safety of food resources and foods
- ② Control of microorganisms and microbial toxins contaminating food resources and foods
- ③ Quality control of vegetables and fruits based on physiological properties
- ④ Food packaging and quality maintenance of packaged foods
- ⑤ Ecology, physiology and control of food insect pests



Aspergillus flavus: aflatoxin-producing fungus

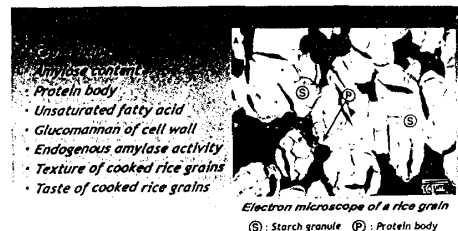


Trichogramma chilonis Ishii, the egg parasitoid of *Coryca cephalonica* Stainton

Food Material Division

Biochemical and structural properties of food ingredients and development of new technologies for processing of agricultural products

- ① Development of new food carbohydrates and related enzymes
- ② Evaluation of quality and function of food proteins
- ③ Elucidation of structure and function of lipophilic micronutrients
- ④ Clarification of factors affecting rice quality and development of technology for quality evaluation and utilization
- ⑤ Development of new food manufacturing technology of cereals



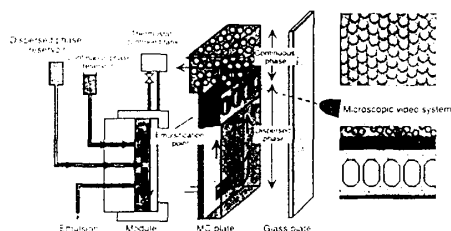
Electron microscope of a rice grain
S: Starch granule P: Protein body

The differences between *Japanica* 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

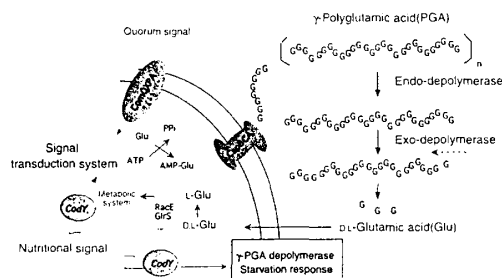


Microchannel(MC) Emulsification Mechanism

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 γ -polyglutamic acid (the sticky polymer of Natto) production
- Development of enzymatic system for the production of useful amino sugars



Metabolism of γ -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

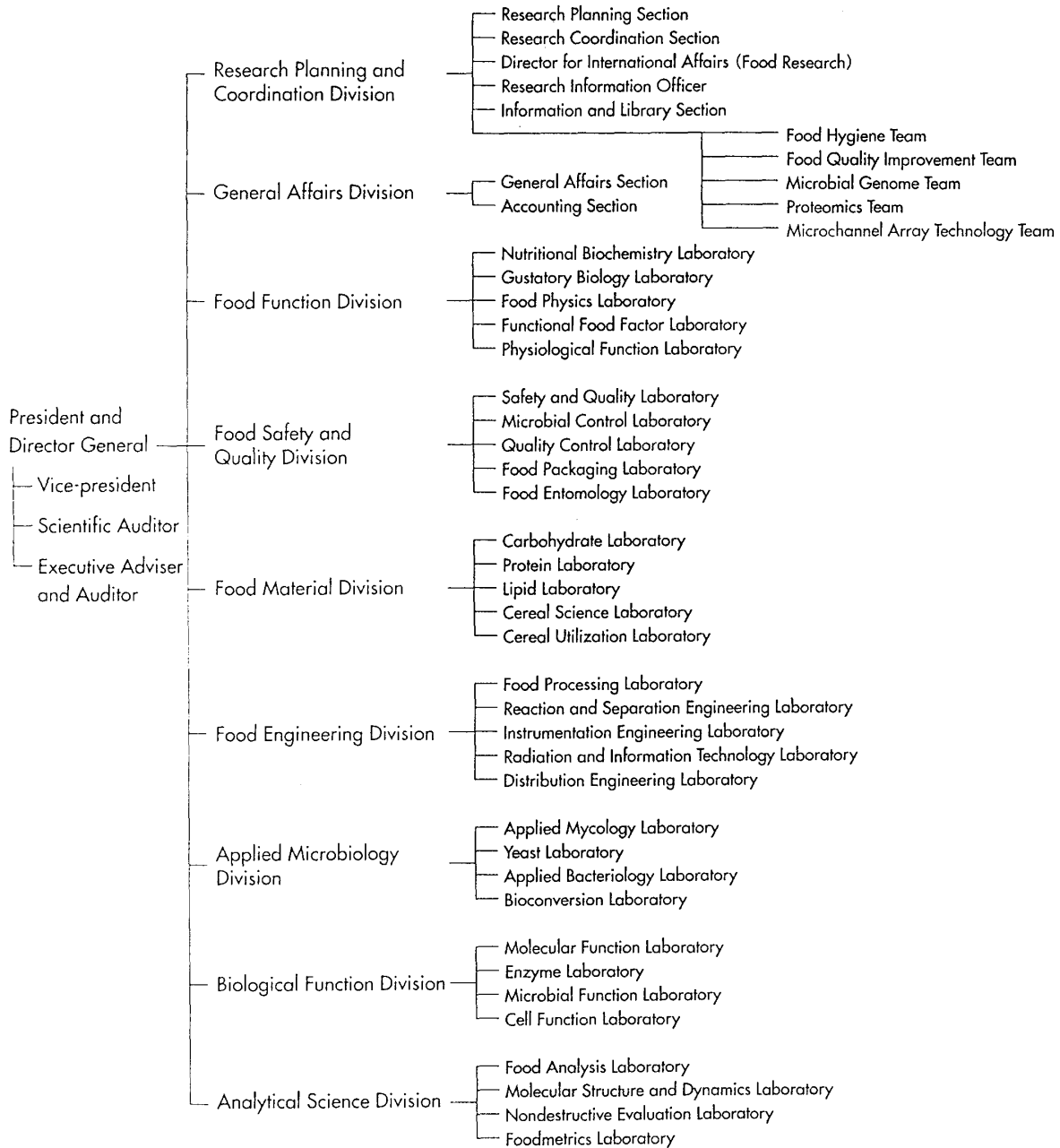
Studies on food analysis and quality evaluation

- 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

Organization



History

- 1934 Established as Rice Utilization Laboratory
- 1947 Renamed as Foods Research Institute
- 1972 Renamed as National Food Research Institute
- 1979 Moved from Tokyo to Tsukuba, the present address
- 2001 National Food Research Institute became an independent administrative institution

Access

■ By JR Joban Line

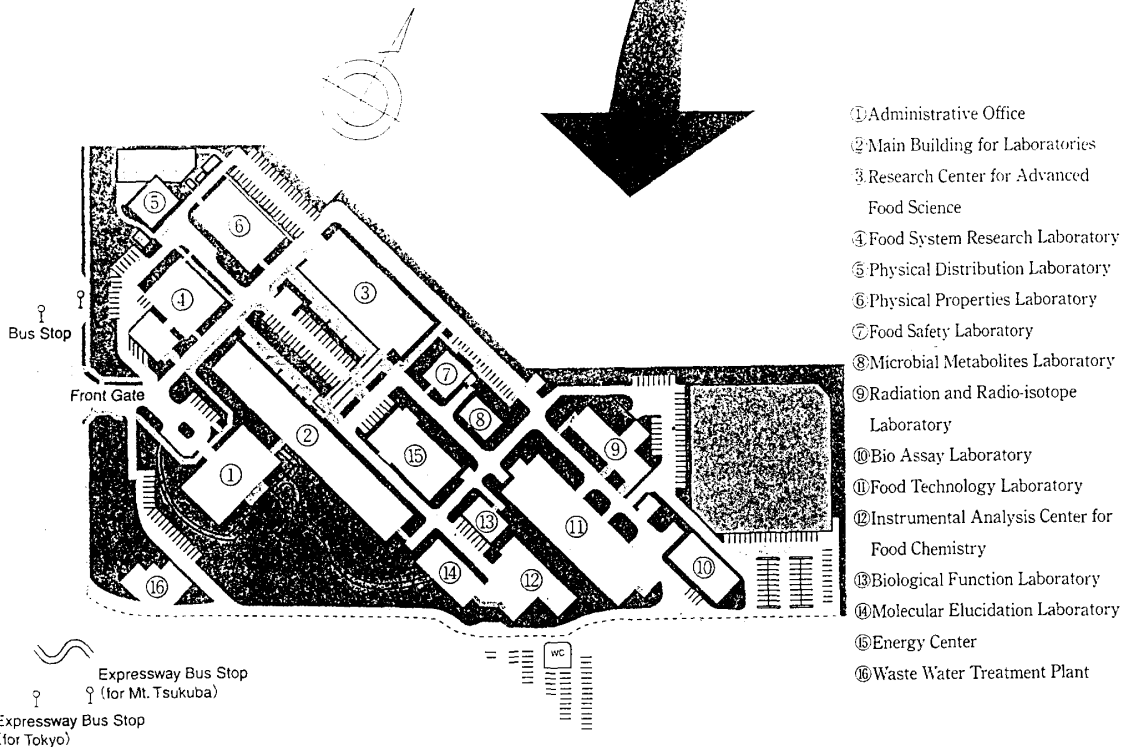
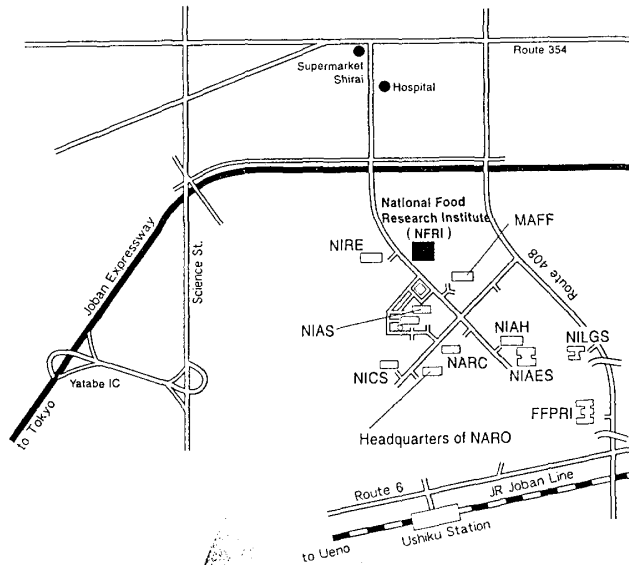
60 minutes from Ueno station in Tokyo to Ushiku station (20 minutes from Ushiku sta. to NFRI by bus)

■ By Express Bus

70 minutes from Tokyo bus terminal (Yaesu South Exit of JR Tokyo station) to NFRI

■ By Car

Approximately 60 minutes from Tokyo down town to Yatabe IC by Expressway



National Food Research Institute

Address : 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan
 Telephone : +81-298-38-7971
 Fax : +81-298-38-7996
 URL : <http://www.nfri.affrc.go.jp>

附件二

Wako 高速穀物 DNA 抽出 kit

	藥品或檢體	使用量	方法與步驟
1	玉米	100 mg	稱重並置於 1.5 mL tube 中。
2	RNase	4 μ L	加於管壁上。
3	Solution 1	800 μ L	加入後 vortex 均勻。
4			室溫下不斷彈動管壁 5 min。
5	Solution 2	100 μ L	加入後 vortex 均勻。
6			冰浴 5 min。
7			4°C 下離心 5 min (12000-15000 rpm)。
8	上清液	700 μ L	移至乾淨 2 mL tube 中。
9	Solution 3	350 μ L	加入後上下翻轉混合。
10	isopropanol	450 μ L	加入後上下翻轉混合。
11			濾膜套上 5 mL 注射器前端。
12			倒入先前配置的溶液，注射 (廢液直接注入水槽)。
13	Wash buffer 1	5 mL	加入後注射 (廢液直接注入水槽)。
14	Wash buffer 2	5 mL	加入後注射 (廢液直接注入水槽)。
15			取下濾膜，套上 1 mL 注射器前端。
16			注射器後端接上 air duster 噴 10 sec 以乾燥濾膜 (壓住濾膜以免濾膜噴出)。
17	TE buffer	150 μ L	置於 parafilm。
18			以 1 mL 注射器前端吸取 TE buffer。
19			室溫下靜置 3 min。
20			注射 1 mL 注射器並收集流洗液於 1.5 mL tube 中。
21			反覆注射幾次確保流洗液皆收集於管中。

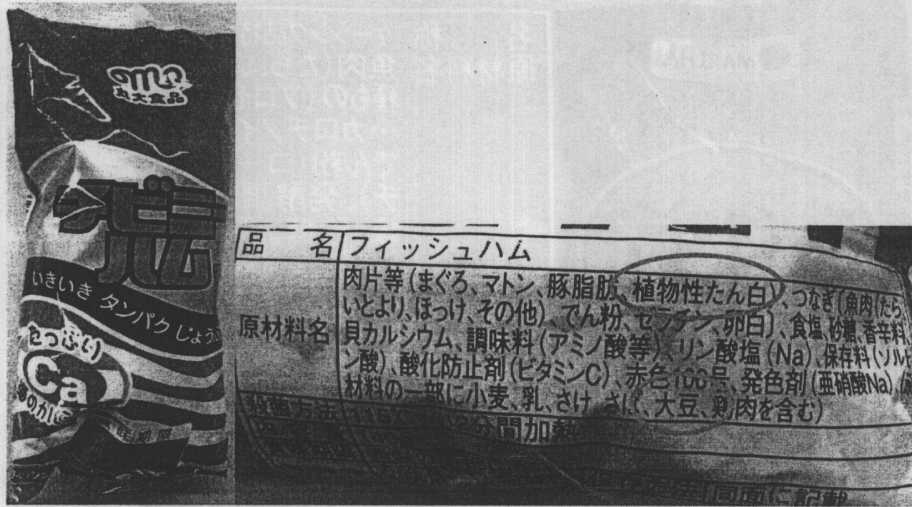
附件三

編號	樣品名	大豆蛋白	樣品來源
1	Chicken nugget	含	市場 (Nippon Ham Company)
2	Chibini ham	含	市場 (Marudai Foods Company)
3	Sausage (H)	含	市場 (Maruha Company)
4	White sausage	不含	市場 (Maruha Company)
5	Sausage (A)	含	市場 (Prima Ham Company)
6	Sliced ham	含	市場 (Prima Ham Company)
7	FrankFruite sausage	含	市場 (Prima Ham Company)
8	Ham (RH)	含	市場 (Prima Ham Company)
9	Ham (CT)	不含	Prima Ham Company
10	Ham (10%)	不含	Prima Ham Company
11	Ham (15%)	不含	Prima Ham Company
12	Ham (20%)	不含	Prima Ham Company
13	德昌炭燒角豆乾	含	市場 (德昌)
14	德昌五香豆乾	含	市場 (德昌)
15	德昌大溪五香豆乾	含	市場 (德昌)
16	RRS powder	含	
17	Non-GM soybean powder	含	

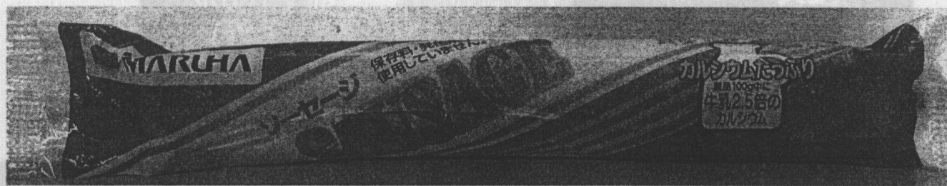
1. Chicken nugget



2. Chibini ham



3. Sausage (H)



4. White sausage

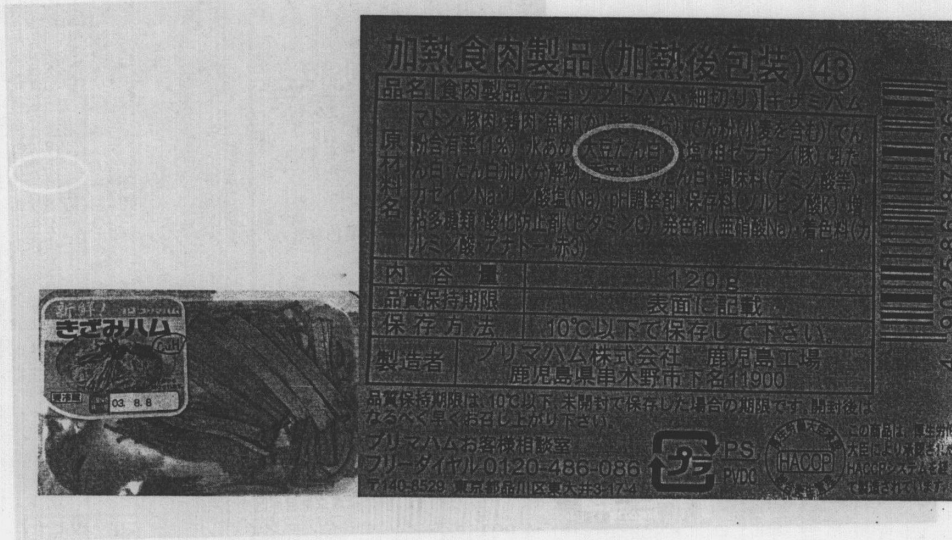
名称 ケーシング詰特種かまぼこ
 原材料名 魚肉(たら、いとより)種もの(プロセスチーズ、カロチノイド色素)、でん粉(コーンスターチ)、発酵調味料、食塩、砂糖、調味料(アミノ酸等)、酒精、酸味料(原材料の一部に卵を含む)。
 加熱方法 120℃で4分間加熱
 内容量 12g×14g×8本入り
 保存方法 直射日光を避け常温または冷蔵で保存して下さい。
 製造者 プリマハム株式会社UTN
 〒100-0001 東京都千代田区
 大手町1-1-2

5. Sausage (A)

アハレンジャーソーセージ
加熱食肉製品(包装後加熱)
 品名 加圧加熱ウインジャーソーセージ
 原材料名 豚肉、鶏肉、結着材料(でん粉、酸化防止剤(ビタミンE)、たん白)、水あめ、食塩、香辛料、たん白加水分解物、卵殻Ca、調味料(アミノ酸等)、リン酸塩(Na-K)、保存料(ソルビン酸)、酸化防止剤(ビタミンC)、発色剤(亜硝酸Na)、クエン酸鉄Na、赤色106号、香辛料抽出物。
 でん粉含有率 7% 殺菌方法 120℃で4分間加熱
 内容量 52g
 品質保持期限 箱側面のフィルムに記載
 保存方法 直射日光を避け、常温で保存して下さい。
 製造者 プリマハム株式会社 茨城工場
 茨城県土浦市巾着原 6-3-5
 ●品質保持期限は、未開封で保存した場合の目安としてお示ししております。開封後はなるべく早くお召し上がり下さい。●必ず外袋のフィルムを留め金を取り外してお召し上がり下さい。●留め金は捨ててください。●表面に黒い点が見えますが香辛料ですので品質に問題ありません。●プリマハム(株)お客様相談室フリーダイヤル 0120-466-086

6. Sliced ham

(HR) msH .8



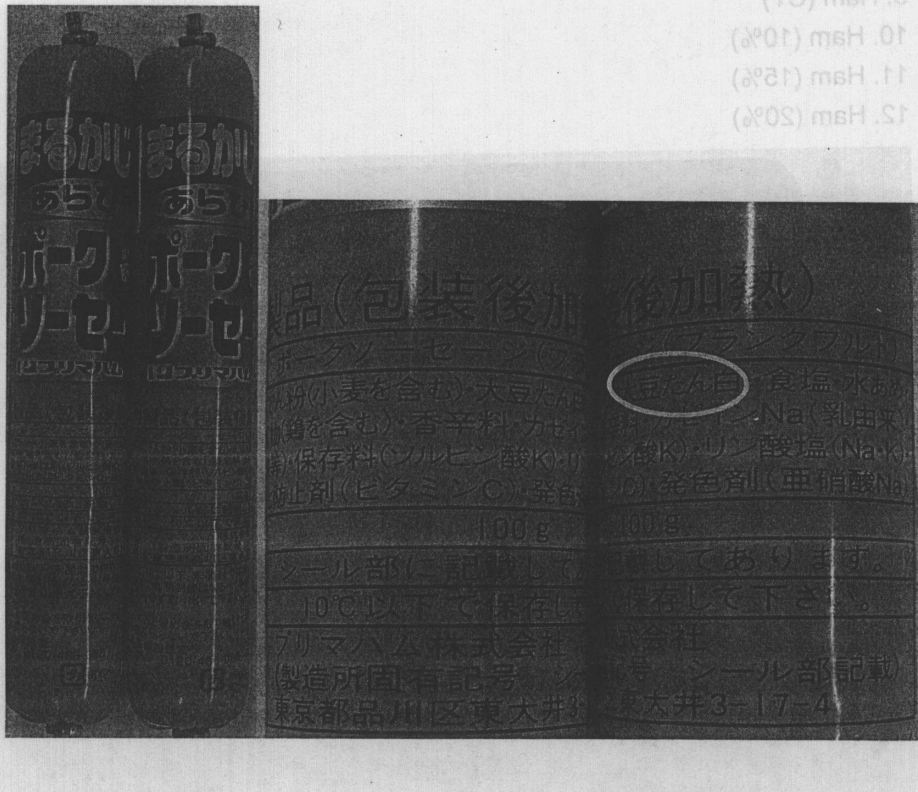
7. FrankFruite sausage

(TC) msH .9

(10%) msH .10

(15%) msH .11

(20%) msH .12



8. Ham (RH)

この製品は、厚生労働省の衛生基準に適合したHACCPシステムを遵守して製造されています。

チヨップドハム
加熱食肉製品 (加熱後包装)

品名 食肉製品 (チヨップドハム・スライス)

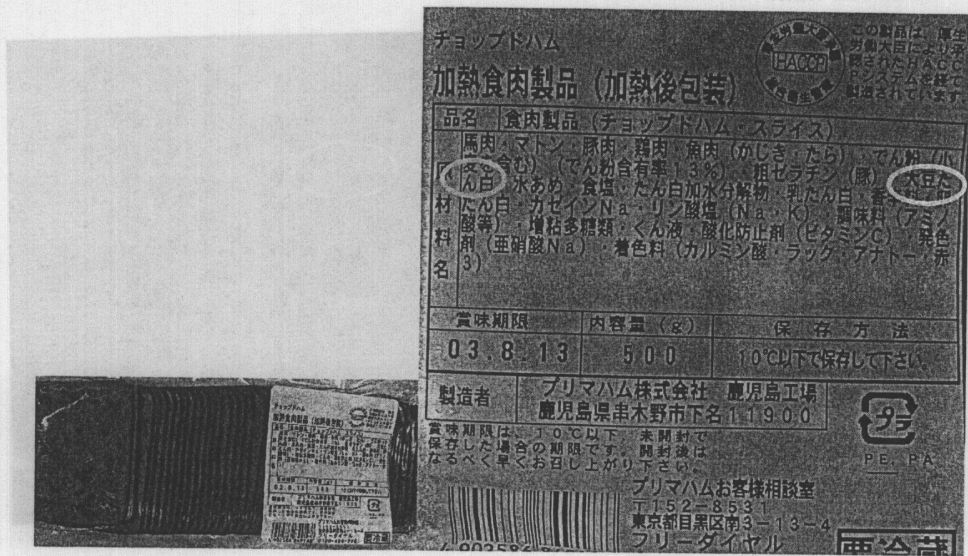
馬肉、マトン、豚肉、鶏肉、魚肉 (かじき、たら)、でん粉、(水)、(でん粉含有率13%)、阻セラチン (豚)、大豆たんぱく、水あめ、食塩、たん白加水分解物、乳たん白、香料、たん白、カゼインNa、リン酸塩 (Na・K)、調味料 (アミノ酸等)、増粘多糖類、くん液、酸化防止剤 (ビタミンC)、発色剤 (亜硝酸Na)、着色料 (カルミン酸、ラック、アナーチン3)

賞味期限	内容量 (g)	保存方法
03.8.13	500	10℃以下で保存して下さい。

製造者 プリマハム株式会社 鹿児島工場
鹿児島県串木野市下名1-19-00

賞味期限は、10℃以下、未開封で保存した場合の期限です。開封後はなるべく早くお召し上がり下さい。

プリマハムお客様相談室
TEL 152-853
東京都目黒区南3-13-4
フリーダイヤル



- 9. Ham (CT)
- 10. Ham (10%)
- 11. Ham (15%)
- 12. Ham (20%)

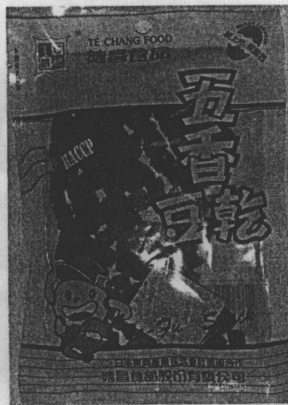


13. 德昌炭燒角豆乾



品名：炭燒角豆乾
 原料成份：黃豆「基因改造」、砂糖、調味料、香辛料、己二烯酸鉀(防腐劑)、苯甲酸(防腐劑)在法定安全食用量以下、食用色素紅色40號、食用色素黃色6號
 重量：50g ± 5%
 保存期限：8個月(貯存於陰涼場所)
 保存日期：標示於封口處(拆封後請冷藏)

14. 德昌五香豆乾



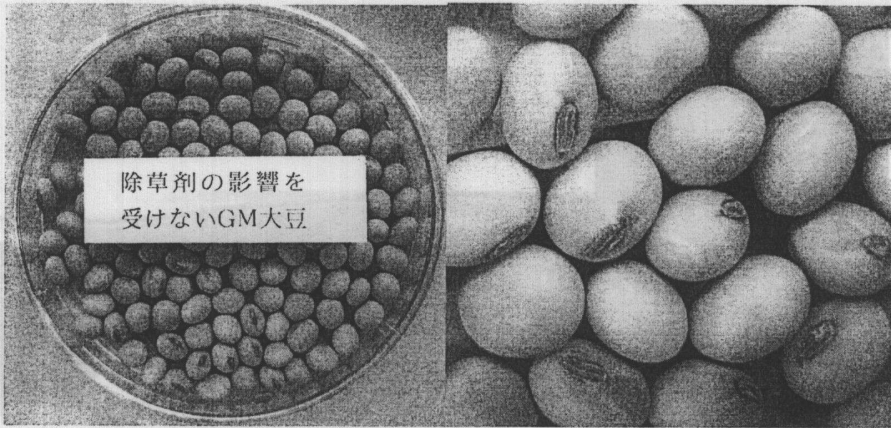
品名：五香豆乾
 原料成份：黃豆「基因改造」、砂糖、調味料、香辛料、己二烯酸鉀(防腐劑)、苯甲酸(防腐劑)在法定安全食用量以下、食用色素紅色40號、食用色素黃色5號。
 重量：95g ± 5%
 保存期限：8個月(貯存於陰涼場所)
 保存日期：標示於封口處(拆封後請冷藏)

15. 德昌大溪五香豆乾



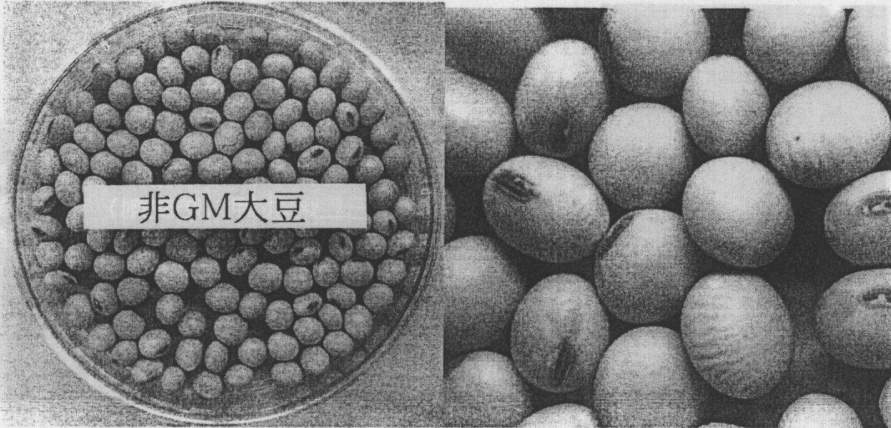
16. RRS

大豆の栽培と品質 . 81

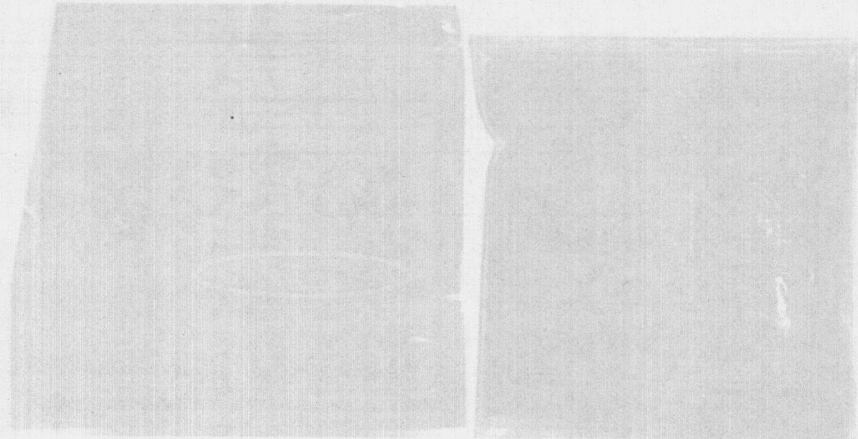


17. Non-GM soybean

大豆の栽培と品質 . 81



大豆の栽培と品質 . 81



附件四

加工肉製品與加工大豆製品樣本均質

	方法與步驟			
	雞塊	香腸	塊狀豆乾	片狀豆乾
1	剝下麵粉皮	剪刀剪成小塊	不特別處理	剪刀剪成小片
2	秤取檢體 5 g		秤取檢體 5 g	
3			以攪拌器研磨成粉末	
4	移至研鉢中			
5	加滅菌水 5 mL			
6	研磨成泥狀			
7	依後續實驗所需檢體重量秤取檢體至 50 mL 離心管， 並標示清楚，剩餘檢體亦保留在 50 mL 離心管中作 stock。			
G	2 g			
M	1 g			
CT	250 mg		100 mg	
M+C	1 g			
8	管口以 parafilm 密封，再以封口袋密封，-80°C 保存。			

使用器具（包括鉢、杵、攪拌器、稱匙、剪刀）之處理

	方法與步驟
1	清潔劑清洗。
2	RO 水 rinse。
3	噴灑 70%酒精。
4	紙巾擦乾。

附件五

FRITSCH miller 研磨黃豆



方法與步驟			
1	取下覆蓋於研磨機上的塑膠布。		
2	兩種不同粗細的磨環。	0.2 mm	用於研磨玉米
		0.5 mm	用於研磨黃豆（此次使用）
3	磨環上的箭頭標誌朝上置入研磨機。		
4	蓋蓋子，插上漏斗，周圍全部包覆上保鮮膜以防止粉末飄出污染機器及桌面。		
5	按下「start」，調整「speed」至「maxi speed」（20000 rpm）。		
6	將黃豆從漏斗緩緩倒入。		
7	調整「speed」至最低，再按下「stop」。		
8	磨碎的黃豆粉移至 50 mL 離心管。		
9	依後續實驗所需檢體重量秤取檢體至 50 mL 離心管，並標示清楚。	G	2 g
		M	1 g
		CT	500 mg
		M+C	1 g
10	管口以 parafilm 密封，再以封口袋密封，-80°C 保存。		

使用器具之處理

方法與步驟		
1	熱水沖洗。	
2	清潔劑清洗。	
	研磨機內部	其他使用的器具
3	磨環	漂白水浸泡。
4	強力吸塵器將粉末吸淨。	換手套後以清水清洗。
5	噴灑 70%酒精。	噴灑 70%酒精。

附件六

**Japan Agricultural Standards
Testing and Analysis Handbook Series**

**Instruction Manual for
Testing and Analyzing Genetically Modified Foods
— Part 2 —
Basic Procedures**

June 20, 2002

The Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services

I. Introduction

Based on Article 7, Section 1 of the Standards for the Labeling of Processed Foods Derived from Genetically Modified Crops promulgated under the Law for the Standardization and Labeling of Agricultural Products (1950 Law No. 175), so-called the “JAS Law,” and the Standards (MAFF Notice No. 517 of March 31, 2000) published by the Minister of Agriculture, Forestry and Fisheries under Article 7, Section 1 of the Standards for the Labeling of Fresh Food, food labeling for the contents of recombinant materials was mandated in Japan on April 1, 2001. Labeling food products as “non-GMO” is made possible through use of the identity preserved (IP) handling system, in which GM and non-GM crops are strictly segregated and documented throughout the life of the crops at issue from production through transportation, importation and processing to retail distribution. The Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services (hereinafter referred to as the “Center”) is responsible for, as part of the JAS regulations compliance monitoring program, the testing of food products for the contents of recombinant materials. The Instruction Manual for Testing and Analyzing Genetically Modified Foods (hereinafter referred to as the “Manual”) were developed to establish the standardized methods for this purpose.

This part of the Manual describes the basic procedures involved in the *qualitative* PCR screening to determine the presence or absence of recombinant materials in food crops and processed foods derived from such crops, according to the stages of the screening process.

1. Purchase and documentation of food samples
2. Sample preparation
3. DNA extraction
4. PCR amplification and gel electrophoresis
5. Determination as either GM or non-GM food.

II. General precautions

PCR is so powerful that even a trace amount of a template DNA can be amplified to a detectable level. It is thus critical to prevent the contamination of samples by undesired DNA, especially carryover PCR products, and by the DNases excreted from human skin that enzymatically degrade PCR samples. While ~~Part 5—Prevention of Contamination~~ of the Manual describes in detail the proper procedures to prevent contamination, the following general precautions may be useful:

- (1) Autoclave all solutions other than those that are sensitive to heat. For the purpose of this Manual, “pure water” means deionized water with a conductivity of 0.0056 mS/m or below at 25 °C, and “sterilized water” means the pure water autoclaved at 121 °C for no less than 15 minutes.
- (2) Use disposable micropipette tips and sample tubes to avoid cross-contamination.
- (3) Use micropipettes, tips and 1.5- and 0.2-ml sample tubes only after they have been autoclaved and completely dried in a dryer or, if possible, dry heat-sterilized.
- (4) Prior to handling DNA samples, disinfect the surface of the laboratory bench with ethanol. Always wear rubber gloves also disinfected with ethanol. Gloves should

be powder-free. If your gloves are powdered, wash your hands thoroughly after wearing the gloves. Gloves should be ethanol-disinfected frequently during the procedure. Use a laminar flow clean bench if necessary.

- (5) It is recommended that each analyst re-prepare his/her own sterilized water and TE buffer at least once every month. Note that the quality of sterilized water and TE buffer is critical to successful PCR. DNase contamination, among others, can have extensive and serious effects on PCR including failed reactions and false results.

III. Handling and management of reagents

Some of the chemicals and compounds used in laboratory activities involving genes are powerful mutagens. Proper management of reagents and effluents is thus imperative for laboratories engaged in GM food testing. Handle and manage them properly in accordance with the instructions of reagent suppliers' manuals and *Part 4—Preparation of Reagents* of the Manual.

IV. Basic procedures

1 Purchase and documentation of food samples

See *Part 1—Handling of Test Samples* of the Manual for the documentation of food samples. For a food product to be tested, purchase three packages each on the retail market.

2 Sample preparation

See *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual for the preparation of test samples.

3 DNA extraction

One DNA sample is extracted from each package of the food product to be tested. In other words, three DNA samples will normally be taken for a food product from three different packages.

DNA samples may be extracted from prepared food samples using spin columns with silica matrices, ion exchange columns or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Of these options, the spin and ion exchange column methods are recommended in view of obtained DNA sizes that fit for PCR as well as health and environmental considerations. Described below are the extraction procedures using Qiagen's DNeasy Plant Maxi kit as an example of the spin column method and those using Qiagen's Genomic tip 20/G as an example of the ion exchange column method. While these kits and procedures are given only as examples, any alternative method to be selected should be able to provide the same quality^(Note 1) of DNA extracts.

^(Note 1) For the purpose of Stage 3 "DNA extraction" of this part of the Manual, the "same quality" means that not only the obtained DNA solution has the same purity as determined by the $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ ratio, but also the selected method successfully extracts DNA samples suitable for PCR from each of the long array of food products listed in *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual. The Center verifies the suitability of a method by comparing the results from the quantification of the DNA sequence specific to an endogenous gene of a crop plant,

Precautions

- Use sterilized laboratory utensils and equipment.
- Take all necessary measures to prevent contamination, such as wearing disinfected gloves.

3.1 DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

3.1.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, digestion by RNase, and removal of proteins and other impurities, followed by adsorption of DNA to a silica-gel membrane in the presence of high concentrations of chaotropic salt, and finally elution of purified DNA in a low-salt buffer or sterilized water.

3.1.2 Authority

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).

3.1.3 Applicability of the procedure to different food products

See Part 3—Specific Procedures by Food Product of the Manual

3.1.4 Equipment

- Centrifuge with a swing-bucket rotor and capable of spinning 50 ml polypropylene tube at 3,000 x g;
- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μl ^(Note 2);
- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.1.5 Reagents

Qiagen's DNeasy Plant Maxi kit.

using the method described in Part 6—Quantitative PCR of the Manual, that are present in the DNA extracts from the quoted and alternative extraction methods.

^(Note 2) These volume ranges are only examples. (??)

3.1.6 Extraction procedure

3.1.6.1 Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube and add 20 μ l RNase (supplied in the kit) using a 10-100 μ l micropipette and 10 ml Buffer AP1 preheated to 65°C using a 1,000-5,000 μ l micropipette. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Incubate the solution for one hour in a 65°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (3) Spin the solution at 3,000 x g for 10 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (4) Transfer 7 ml of the supernatant into a new 15 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface.
- (5) Add 2.5 ml AP2 buffer to the 15 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution at maximum speed on a vortex tube mixer for 10 seconds, and incubate in an ice-water bath for 15 minutes.
- (6) Spin the solution at 3,000 x g for 35 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (7) Aspirate 8 ml of the supernatant using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface, to load it onto the QIA shredder spin column (lilac).
- (8) Spin the solution at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (9) Transfer 7.5 ml of the supernatant into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the column.
- (10) After mixing on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, transfer 6.8 ml of the solution into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette.
- (11) Add 10.2 ml AP3/Et-OH buffer using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, and load the entire solution onto the DNeasy spin column (colorless) by decanting.
- (12) Spin the column at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor and discard the eluate.
- (13) Add 12 ml Buffer AW to the spin column using a 1,000-5,000 μ l micropipette and spin the column at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (14) Place the spin column in a new 50 ml tube and add 1 ml sterilized water preheated to 65°C in a separate spin column.

- (15) After leaving at room temperature for 5 minutes, spin at 3,000 x g for 10 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (16) Using a 100-1,000 μ l micropipette, measure the volume of the eluate and transfer it to a 2 ml sample tube. Add an equal volume of isopropanol to the tube using a 100-1,000 μ l micropipette.
- (17) After mixing by slowly turning the tube upside down 10 times, leave the solution at room temperature for five minutes.
- (18) After spinning the tube at 12,000 x g at 4°C for 15 minutes in a swing-out rotor, discard the supernatant using a 100-1,000 μ l micropipette.
- (19) Add 500 μ l 70% ethanol using a 100-1,000 μ l micropipette and tap the end of the tube with a finger until the precipitate on the bottom of the tube is completely resuspended in the solution.
- (20) After spinning at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C in a swing-out rotor, discard the entire supernatant using a 10-100 μ l micropipette and dry the precipitate.
- (21) Add 100 μ l TE buffer, pH 8.0, using a 10-100 μ l micropipette to dissolve the precipitate. See 3.1.10 *Additional notes* for further information.
- (22) Repeat tapping the tube with a finger and spinning it until the liquid drops on the tube wall completely disappear. Incubate the solution overnight (12-24 hours) in a refrigerator.
- (23) A DNA lysate is finally produced when the solution is free from any visible insoluble matter. If any visible insoluble matter is still present even after 24 hours of incubation, use the supernatant obtained by spinning the solution at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C and transferred to a new tube as a DNA lysate. Store the DNA lysate as well as the precipitate at -20°C or below.

3.1.6.2 Procedure B: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube and add 10 μ l RNase (supplied in the kit) using a 0.5-10 μ l micropipette and 5 ml Buffer AP1 preheated to 65°C using a 1,000-5,000 μ l micropipette. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Incubate the solution for one hour in a 65°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (3) After adding 1.8 ml Buffer AP2 to the tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette and mixing the solution at maximum speed for 10 seconds on a vortex tube mixer, incubate the tube in an ice-water bath for 15 minutes.
- (4) Spin the solution at 3,000 x g for 15 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (5) Aspire 4.2 ml of the supernatant using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface, to

load it onto the QIA shredder spin column (lilac).

- (6) Spin the solution at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor.
- (7) Transfer 4 ml of the supernatant into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the column.
- (8) After mixing on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, transfer 3.4 ml of the solution into a new 50 ml tube using a 1,000-5,000 μ l micropipette.
- (9) Add 5.1 ml AP3/Et-OH buffer using a 1,000-5,000 μ l micropipette, mix the solution on a vortex tube mixer at maximum speed for 10 seconds, and load the entire solution onto the DNeasy spin column (colorless) by decanting.
- (10) Spin the column at 3,000 x g for 5 minutes at room temperature in a swing-out rotor and discard the eluate.

For the subsequent steps (11) through (21) under 3.1.6.2 *Procedure B: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*, refer steps (13) through (23), respectively, under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*.

3.1.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Aspirate 5 μ l of the DNA lysate solution using a 0.5-10 μ l micropipette and add TE buffer to give a total volume of 50 μ l. Scan the UV absorbance in the wavelength range from 200 to 300 nm to measure the absorbance at 230, 260 and 280 nm^(Note 3), ^(Note 4). Calculate the concentration of DNA by converting an absorbance (O.D.) of 1.0 at 260 nm to 50 ng of DNA per μ l^(Note 5). Prepare a PCR solution with a DNA concentration of 10ng/ μ l using sterilized water. If the concentration of the extracted DNA was too low for use as a PCR solution, perform the DNA extraction procedure again. If the concentration of the re-extracted DNA was still too low for use as a PCR solution, use the undiluted DNA solution as a PCR solution.

3.1.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by these procedures as determined by the OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratios will be approximately 1.7-2.0.

3.1.9 Record keeping

Record the dilution factor, absorbance readings, and OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratio. Also record in detail any deviation from the standard procedures you used to obtain the DNA solution for PCR.

3.1.10 Additional notes

In Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*,

^(Note 3) The absorbance spectrum for DNA has a dip at 230 nm and a peak at 260 nm whereas impurities such as proteins have highest absorbances at around 280 nm.

^(Note 4) Dilution should be adjusted depending on the DNA yield of an extraction procedure.

^(Note 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)).

adjust the dilution factor depending on the yield of extracted DNA. We recommend using 100 µl TE buffer for soybeans and 50 µl TE buffer for maize and maize products.

3.1.10 Additional notes

In Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*, adjust the dilution factor depending on the yield of extracted DNA. We recommend using 100 µl TE buffer for soybeans and 50 µl TE buffer for maize and maize products.

If the concentration of the DNA solution was too low for use in PCR, try the following operations:

1. Concentrate the DNA solution by ethanol precipitation.
2. Perform the DNA extraction procedure from the beginning in accordance with this protocol except that you add 20 µl TE buffer rather than 100 µl in Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit*.

If the above operations still do not provide the concentration of DNA solution the PCR procedure normally requires, use the DNA solution finally obtained as a starting DNA solution for PCR. Record the volume of DNA in the solution used in PCR.

3.2 DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G

3.2.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, digestion by RNase, and removal of proteins and other impurities, followed by adsorption of DNA to an ion-exchange column in the presence of low concentrations of chaotropic salt, and finally elution of purified DNA in a high-salt buffer.

3.2.2 Authority

The QIAGEN Genomic-tip protocol for DNA isolation has been modified to meet the requirements of the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) guidelines, *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques* (MHLW Food Announcement No. 110 of 27 March 2001), and the amendment to the guidelines (MHLW Food Announcement No. 158 of 25 May 2001).

3.2.3 Applicability of the procedure to different food products

See *Part 3—Specific Procedures by Food Product* of the Manual

3.2.4 Equipment

- Centrifuge with a swing-out rotor and capable of spinning 50 ml polypropylene tube at 3,000 x g;
- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000

µl^(Note 6);

- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.2.5 Reagents

QIAGEN Genomic-tip 20/G (Cat. No. 10223) ion-exchange column;

QIAGEN RNase A (Cat. No. 19101);

QIAGEN Proteinase K (Cat. No. 19131 or 19133);

Buffers G2, QBT, QC and QF^(Note 7).

3.2.6 Extraction procedure: DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G

- (1) Measure an appropriate amount of the ground sample into a 50 ml tube, add 7.5 ml Buffer G2 using a 1,000-5,000 µl micropipette, and vigorously mix the solution on a vortex tube mixer.
- (2) Add another 7.5 ml of Buffer G2 using a 1,000-5,000 µl micropipette, 200 µl QIAGEN Proteinase K using a 100-1,000 µl micropipette, and 20 µl RNase A using a 10-100 µl micropipette to the tube. After mixing the contents of the tube by repeatedly turning the tube upside down until no visible sample remains on the bottom of the tube, mix the solution on a vortex tube mixer.
- (3) Incubate the solution for one hour in a 50°C water bath. Every 15 minutes during incubation or 15, 30 and 45 minutes after incubation started, mix the solution by vigorously inverting the tube several times and then mix it at maximum speed on a vortex tube mixer.
- (4) Spin the solution at 3,000 x g for 15 minutes at 4°C in a swing-out rotor.
- (5) Transfer the entire supernatant into either a new 15 ml or 50 ml tube using a 1,000-5,000 µl micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube or film on the liquid surface.
- (6) Flash centrifuge the tube.
- (7) Equilibrate QIAGEN Genomic-tip 20/G with 1 ml Buffer QBT.
- (8) Load the entire supernatant onto the QIAGEN Genomic-tip 20/G in 2 ml aliquots using either a 100-1,000 or 1,000-5,000 µl micropipette, carefully avoiding the precipitate on the bottom of the tube. Allow the supernatant to move through the QIAGEN Genomic-tip 20/G by gravity flow.
- (9) Wash the column by loading 2 ml Buffer QC onto the tip using either a 100-1,000 or 1,000-5,000 µl micropipette and allowing the buffer to move through the QIAGEN Genomic-tip 20/G by gravity flow.

^(Note 6) These volume ranges are only examples. (??)

^(Note 7) Prepare these buffers according to the instructions of the supplier's protocol. You may also purchase either Qiagen's Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Cat. No. 13323) or Qiagen's Genomic DNA buffer set (Cat. No. 19060) in which these buffers are supplied.

- (10) Repeat Step (9) washing operation additional two times.
- (11) Place the tip over a 1.5 ml tube and add 750 μ l Buffer QF prewarmed to 50°C using a 100-1,000 μ l micropipette to elute DNA (Eluate 1).
- (12) Place the tip over a new 1.5 ml tube and add again 750 μ l Buffer QF prewarmed to 50°C using a 100-1,000 μ l micropipette to elute DNA (Eluate 2).
- (13) Measure the volumes of Eluates 1 and 2 and add to each eluate an equal volume of isopropanol using a 100-1,000 μ l micropipette. After mixing the eluates by gently inverting the tubes 10 times, leave them at room temperature for 5 minutes.
- (14) After spinning at 12,000 x g at 4°C for 15 minutes in a fixed angle rotor, discard the supernatant using a 200-1,000 μ l micropipette.
- (15) Add 1,000 μ l 70% ethanol using a 100-1,000 μ l micropipette and mix by slowly turning the tube upside down 10 times.
- (16) After spinning at 12,000 x g at 4°C for 3 minutes in a fixed angle rotor, discard the entire supernatant using either a 10-100 or 100-1,000 μ l micropipette and dry the precipitate.
- (17) Add 50 μ l TE buffer (pH 8.0) to the tube containing Eluate 2 using a 10-100 μ l micropipette and resuspend the precipitate by shaking at 65°C for 15 minutes on a shaker.
- (18) Transfer the entire contents of the tube containing Eluate 2 to the one containing Eluate 1 using a 10-100 μ l micropipette and resuspend the DNA by shaking at 65°C for 15 minutes on a shaker.
- (19) Tap the tube with a finger and place it in a refrigerator for incubation for 12-24 hours.
- (20) A DNA lysate is finally produced when the solution is free from any visible insoluble matter. If any visible insoluble matter is still present even after 24 hours of incubation, use the supernatant obtained by spinning the solution at 12,000 x g for 3 minutes at 4°C and transferred to a new tube as a DNA lysate. Store the DNA lysate as well as the precipitate at -20°C or below.

3.2.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Same as 3.1.7.

3.2.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by this procedure as determined by the $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ratios will be approximately 1.7-2.0.

3.2.9 Record keeping

Same as 3.1.9.

3.2.10 Additional notes

Same as 3.1.10, except that Step 21 under 3.1.6.1 *Procedure A: DNA extraction using DNeasy Plant Maxi kit* should be read as Step 17 under 3.2.6 *Extraction procedure: DNA extraction using QIAGEN Genomic-tip 20/G*.

3.3 DNA extraction using CTAB

3.2.1 Brief description of the procedure

This procedure involves the lysis of the ground food sample in a lysis buffer, removal of proteins and other impurities, and digestion by RNase to extract DNA. Use of CTAB as the eluent effectively prevents polysaccharides from being extracted.

3.3.2 Authority

Murray, M.G., Thompson, W., *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*, *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325(1980), with partial modification.

3.3.3 Applicability of the procedure to different food products

See Part 3—Specific Procedures by Food Product of the Manual

3.3.4 Equipment

- Refrigerated centrifuge capable of spinning 2 ml microtubes;
- Micropipettes for volume ranges of 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μl ^(Note 8);
- Water bath; and
- Vortex test tube mixer.

3.3.5 Reagents

See Part 4—Preparation of Reagents of the Manual.

3.3.6 Extraction procedure: DNA extraction using CTAB

(1) Cell lysis of the sample

Weigh out an appropriate amount of the sample into a mortar^{(Note 9)(Note 10)}. Add a small amount of silica sand and 2 ml CTAB extraction buffer to the mortar and

^(Note 8) These volume ranges are only examples. (??)

^(Note 9) An excess amount of the sample will lead to an increased volume of the intermediate layer during phenol-mediated removal of proteins and make the subsequent operations more difficult.

^(Note 10) In weighing the sample, you can use the aluminum foil that has been used to wrap sterilized mortar as a replace for a glassine weighing paper. Do not pick up the samples directly with your fingers. Always use a sterilized spatula to scoop and transfer the sample.

grind them with a pestle. Transfer the ground mixture into 1.5 ml tubes^(Note 11).

After incubating at 60°C for 30 minutes, centrifuge at 14,000 rpm for three minutes^(Note 12).

Transfer 700 µl of the supernatant to a new tube.

(2) PCI-mediated removal of proteins

Add an equal volume of PCI to the tube containing the sample solution, vigorously shake the tube for two minutes, and then centrifuge at 14,000 rpm for 15 minutes at room temperature^(Note 13).

(3) Extraction with CIA

To remove phenol from the aqueous layer, add an equal volume of CIA to the tube containing the sample solution, vigorously shake the tube for two minutes, and then centrifuge at 14,000 rpm for three minutes at room temperature.

Remove the upper layer into a new tube. Pipette carefully to avoid drawing the intermediate layer.

(4) Alcohol precipitation

To precipitate DNA, add an equal volume of isopropanol to the tube containing the sample solution, invert the tube for 30 seconds, and then centrifuge for three minutes at 12,000 rpm or about 13,000 x g^(Note 14).

Discard the supernatant.

Wash the precipitate by adding 800 µl 70% ethanol, mix by inverting, incubate for three minutes, and centrifuge for three minutes at 12,000 rpm.

Discard the supernatant^(Note 15) and vacuum dry for five minutes using a centrifugal vacuum concentrator or a desktop desiccator. Visually confirm the dehydration of the sample.

(5) Dissolving DNA in TE buffer and removing RNA with CTAB eluent

Add 100 µl TE and 2 µl RNase A (10 mg/mL) to dissolve DNA.

After incubating the solution for 30 minutes at room temperature or 37°C, add 400 µl CTAB eluent.

^(Note 11) Proteinase digestion: If the sample is expected to have a high protein content and produce a thick intermediate layer during the PCI treatment, you can add 20 µl of a 20 mg/ml proteinase K solution to each tube to decrease the volume of the protein layer.

^(Note 12) Here, the centrifuge is assumed to be Eppendorf Centrifuge 5417R at 16,000 x g but use of the maximum speed with your centrifuge will generally produce satisfactory results.

^(Note 13) Record in detail the changes in the contents of the tube. If the solution does not successfully separate into layers, repeat either the spinning operation or the PCI-mediated removal of proteins. Perform all spinning operations at room temperature; lower temperatures will cause CTAB to precipitate and the solution does not separate properly.

^(Note 14) These conditions may need to be modified depending on salt concentrations and polysaccharide contents.

^(Note 15) After the supernatant is discarded, flash centrifuge the tube again at 5,000-12,000 rpm to thoroughly remove the supernatant. If the resulting precipitate is gel-like, wash the precipitate with alcohol several times to dehydrate it to some extent.

(6) Re-extraction with CIA

Add 500 μ l CIA and mix briefly. Centrifuge for 15 minutes at 12,000 rpm and transfer the top layer to a new tube.

(7) Alcohol precipitation

To remove phenol from the aqueous layer, add an equal volume of isopropanol to the tube containing the sample solution, invert the tube gently for 30 seconds, and then centrifuge for three minutes at 12,000 rpm or about 13,000 \times g^(Note 14).

Discard the supernatant^(Note 15) and vacuum dry for five minutes using a centrifugal vacuum concentrator or a desktop desiccator. Visually confirm the dehydration of the sample.

(8) Dissolving DNA in sterilized water

Add 100 μ l sterilized water^(Note 16) to make a DNA solution. Divide the solution into several single-use aliquots for frozen storage at -20°C or below because repeated freezing and thawing is not advisable.

3.3.7 Determination of the purity and yield of extracted DNA

Same as 3.1.7.

3.3.8 Purity of extracted DNA

The purities of the soybean and maize DNA extracted by these procedures as determined by the OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ratios will be approximately 1.8-2.0.

3.3.9 Record keeping

- (1) See 3.1.9. Also record the following:
- (2) The changes in the contents of the tube in Step (2) *PCI-mediated removal of proteins*; and
- (3) The manner in which precipitation proceeds in Step (4) *Alcohol precipitation* when an equal volume of isopropanol is added to the sample solution, the mixed solution is centrifuged and the supernatant is discarded.

3.3.10 Additional notes

Not applicable.

^(Note 16) In making the DNA solution, use of distilled water rather than TE buffer is recommended because EDTA in TE buffer can attract magnesium ion which can negatively affect PCR reactions.

4. PCR amplification and gel electrophoresis

4.1 Brief description of the procedure

PCR is performed using the extracted DNA as a template, a DNA polymerase and primers that specifically bind to the target sequences of genetically modified crops. The PCR products are then loaded on electrophoresis and visualized under UV light to determine whether the sample contains genetically modified crop varieties. At the same time, to determine that the target PCR products may be obtained, PCR amplification tests are performed using the primer pairs designed to amplify crop-specific endogenous genes.

Safety considerations for ethidium bromide

Personal protection:

The fluorescent dye ethidium bromide is a potent mutagen that can intercalate into a DNA strand. Always wear gloves when working with this dye and a mask when weighing the powder form.

Waste disposal:

For ethidium bromide solutions of lower concentrations, treat them using commercially available decontamination devices. For higher-concentration solutions, dispose of them through specialized hazardous waste treatment service providers.

4.2 Authority

- (1) For PCR, and the primers for soybean and maize samples, 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).
- (2) For the primers for potato samples, the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) guidelines, *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques* (MHLW Food Announcement No. 110 of 27 March 2001), and the amendment to the guidelines (MHLW Food Announcement No. 158 of 25 May 2001).
- (3) For the electrophoresis procedures, the QIAGEN Genomic-tip protocol for DNA isolation.

4.3 Applicability of the procedure to different food products

This procedure may be used to:

- (1) specifically detect the recombinant Roundup Ready soybean event 40-3-2;
- (2) specifically detect and screen for the five maize recombinants Bt11, Event 176, T25, MON810 and GA21; and
- (3) specifically detect the potato recombinants NewLeaf events Bt6 and SPBT02-05 and NewLeaf Plus events RBMT21-129, RBMT21-350 and RBMT22-82;

Note that this procedure screens maize samples for the 35S promoter from cauliflower mosaic virus and thus is not applicable to those processed food products that contain both maize and other plants that may be transformed using the promoter.

4.4 Equipment

4.4.1 PCR

- Thermal cycler:
Optional thermal cyclers include MJ Research's PTC-200 DNA Engine, Takara Bio's TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applied Biosystems's GeneAmp system 9700 with the MAX heating mode, and others that provide the same PCR results as the former three.
- Micropipettes in the volume ranges of, for example, 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μ ls.

4.4.2 Gel electrophoresis

- Gel electrophoresis apparatus:
Advance's Mupid[®]-2 gel electrophoretic system, or equivalent;
- Gel maker specified by your gel electrophoresis apparatus;
- Transilluminator;
- Photographic system;
- Micropipettes in the volume ranges of, for example, 0.5-10, 10-100, 100-1,000 and 1,000-5,000 μ ls.

4.5 Reagents

4.5.1 PCR

- Applied Biosystems' AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, or equivalent;
- 2 mmol/l deoxynucleoside triphosphate (dNTP) solution
(The AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase kit includes the solution.);
- 25 mmol/L magnesium chloride (MgCl₂) solution
(The AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase kit includes the solution.);
- 10 X PCR Buffer II
- Primer pairs
According to the target sequences you are detecting (see Tables 4.1(1)-(3)), you can either purchase your primer pairs or prepare them yourself. The sizes of target sequences to be amplified are shown in Tables 4.1(1)-(3). Primer pairs are available from Nippon Gene Co., Ltd. and FASMAC Co., Ltd. and they will meet most of your amplification needs.

Primer pairs to detect GM soybeans:

- Endogenous *le1* gene (Nippon Gene Cat # 313-05501, FASMAC Cat # S1-1M, or their bulk products); and
- Roundup Resistant soybeans-specific sequence (Nippon Gene Cat # 310-05511, FASMAC Cat # S2-1M, or their bulk products).

Primer pairs to screen for GM maize:

- Endogenous *SSI1b* gene (Nippon Gene Cat # 315-05441, FASMAC Cat # M1-1M, or their bulk products);
- CaMV 35S promoter (Nippon Gene Cat # 317-05521, FASMAC Cat # C1-1M, or their bulk products); and
- GA21-specific sequence (Nippon Gene Cat # 312-05451, FASMAC Cat # M2-1M, or their bulk products).

Primer pairs to detect specific GM maize lines:

- Endogenous *SSI1b* gene (Nippon Gene Cat # 315-05441, FASMAC Cat # M1-1M, or their bulk products);
- GA21-specific sequence (Nippon Gene Cat # 312-05451, FASMAC Cat # M2-1M, or their bulk products);
- Bt11-specific sequence (Nippon Gene Cat # 319-05461, FASMAC Cat # M3-1M, or their bulk products);
- Event 176-specific sequence (Nippon Gene Cat # 316-05471, FASMAC Cat # M4-1M, or their bulk products); and
- MON810-specific sequence (Nippon Gene Cat # 310-05491, FASMAC Cat # M6-1M, or their bulk products).

Primer pairs to detect GM potatoes:

- Endogenous *Pss* gene (Nippon Gene Cat # 315-05701, FASMAC Cat # G5-1, their bulk products, or self-prepared);
- NewLeaf-specific sequence (Note that no commercial product of primer pairs seems to be available at present that can be used to detect this GM line. For the time being, the GM line may be detected by combination of the primer pairs for the CaMV 35S promoter and the positive control plasmid for either Roundup Resistant soybeans or maize. However, this method should be used with utmost care because the target sequence of PCR is also present in plants infected with cytomegalovirus (CMV) and many GM crops.);
- NewLeaf Plus-specific sequence (Nippon Gene Cat # 312-05711, FASMAC Cat # G1-I, their bulk products, or self-prepared);

Reference plasmid solution^(Note 17) is available from Nippon Gene and FASMAC.

Reference plasmid for soybeans:

^(Note 17) The reference plasmid solution is used as a positive control for both PCR reactions and GM crop varieties. You can also use the DNAs of recombinants if they are available.

- Positive control plasmid for the detection of Roundup-resistant GM soybeans (Nippon Gene Cat # 311-04941, FASMAC Cat # PS-1, or their bulk products)

Reference plasmid for maize:

- Positive control plasmid for the detection of GM maize (Nippon Gene Cat # 314-04811, FASMAC Cat # PM-1, or their bulk products)

Reference plasmid for potatoes (see the Note in the second item under “*Primer pairs to detect GM potatoes*”):

- Positive control plasmid for the detection of NewLeaf Plus GM potatoes (Nippon Gene Cat # 311-05301, FASMAC Cat # PP-1, or their bulk products)

4.5.2 Gel electrophoresis

- Agarose gel
- TBE or TAE buffer
- Ethidium bromide
- Gel loading buffer (blue juice)
- DNA molecular weight marker:
Choose a marker with good resolution for your PCR products. A 100-bp ladder marker should be the best choice.

4.6 Procedure

4.6.1 PCR procedure

Precautions

- Use sterilized laboratory utensils and equipment.
- Take all necessary measures to prevent contamination, such as wearing disinfected gloves.

(1) Number of tubes needed for PCR

Perform PCR for each solution obtained by DNA extraction of a sample. Include the primer pairs that can detect the endogenous gene specific to the crop to be tested to confirm that the PCR successfully yields the product of expected length. Use of such primer pairs should be accompanied by both negative and positive controls. A negative control detects contamination of reagents by sequences that can serve as PCR templates. A positive control with a reference plasmid for the crop, signals that the primer pairs are of good quality, that the PCR solution is thoroughly mixed, and that the PCR reaction proceeds successfully. Set up a “no template” negative control when the primer pairs for the detection of GM varieties are included. Also include in every PCR at least one negative control that has a reference plasmid template but does not have primer pairs that can bind to any GM variety. This control detects contamination of reagents by such primer pairs. If you have the non-GM variety of the crop at issue, you can set up a

negative control with a template prepared from the DNA extracted from the non-GM variety. This control detects contaminants such the primer pairs that bind to the endogenous gene present in those that are designed to bind to GM varieties.

(2) Preparation of master mix

The composition of the master mix is shown in Table 4.2 *Composition of PCR Solution*. Note that primer pairs are added after all other components have been mixed. The number of sterilized 0.2 ml tubes is determined by that of the samples for which PCR is performed. The total volume of PCR solution is then determined on the basis of the number of tubes. Add an extra volume to allow for losses due to, for example, droplets adhering to the inside wall of the tube. The volumes of individual components other than template DNA solution are calculated based on their relative volumes shown in Table 4.2. Mixed solution is then transferred in 22.5 µl aliquots to each reaction tube. Choose your micropipette considering its volume range, especially the minimum volume.

For the “no primer” negative control, prepare a separate master mix in which no primer pairs are added.

(3) Addition of samples

After 2.5 µl aliquots of template DNA solution have been added to the tubes containing the master mix, add the samples to the tube in the order of the extracted DNA, negative control and positive control solutions.

(4) PCR amplification

After all solutions are added, perform PCR on the thermal conditions specified in Table 4.3 *Thermal Cycles*.

(5) Post-PCR procedure

When PCR is complete, store the PCR product in a refrigerator or a freezer, or otherwise immediately run electrophoresis.

4.6.2 Gel electrophoresis

Run gel electrophoresis according to 4.6.2.1 *Pre-staining gel electrophoresis* or 4.6.2.2 *Post-staining gel electrophoresis*. These and other gel electrophoresis procedures described in this manual are based on the Mupid[®]-2 electrophoresis apparatus (Advance Co., Ltd., Japan).

Precautions

- There is no need at this stage for the use of sterilized laboratory utensils and equipment.
- Wear gloves to protect you from contact with hazardous materials.

4.6.2.1 Pre-staining gel electrophoresis

(1) Preparing the gel ready

Assemble the gel maker module and prepare a 2-3% agarose gel. First, weigh out

an appropriate amount of agarose and add it to the TBE buffer^{(Note 18)(Note 19)}. Heat the gel solution to melt agarose^(Note 20). When agarose is completely melted, add the ethidium bromide solution to the gel solution so that each 100 ml gel solution contains 50 µg ethidium bromide. Pour the thoroughly mixed solution into the gel maker module and place the comb carefully so that no air bubble is formed around it. Leave the gel to cool at ambient temperature for about 30 minutes. When the gel has cooled and set, remove the comb carefully from the gel so that you don't make a hole through the well from which the sample solution can leak.

(2) Preparing the gel tank ready

Place the gel in the gel tank. Check to ensure that the wells are on the side of the negative electrode. While it is advisable that you immediately run the gel, you can store it in the buffer for a few days.

Flood the gel with the TBE buffer^(Note 18) to barely cover the gel surface. Note that excess buffer results in longer migration time due to reduced current density.

(3) Running electrophoresis

Add 1 µl gel loading buffer to 5 µl of the post-PCR sample DNA solution^(Note 21) and gently pour the mixture into the wells. Also load the molecular weight marker in one or two lanes on the same gel. Remember that taking too much time in pouring a sample solution into wells can diffuse the DNAs into the gel and produce smeared bands.

When the sample solution has properly been poured into the wells, turn on the power and run the gel at 100 volts. Check if bubbles are generated at the electrodes by the electrolysis of water to ensure that electrophoresis is occurring. Stop running the gel when the BPB marker dye added to the gel loading buffer has migrated half of the way down the gel. Although "half of the way down the gel" is only an indication, it is not advisable to run the gel over a longer distance because the size of the PCR product is relatively small.

Photograph the gel immediately after electrophoresis to prevent diffusion of DNAs resulting in lower resolution of bands.

(4) Photographing the gel

Cover the surface of a UV transilluminator with plastic wrap^(Note 22). Place the gel

^(Note 18) You may use TAE for TBE if it works. In that case, also use TAE in the electrophoresis buffer.

^(Note 19) A 100 ml gel solution is sufficient for two large and one small gels.

^(Note 20) The gel solution can conveniently be melted in the microwave. Handle the flask(?) carefully to avoid burn by sudden boiling.

^(Note 21) You need not to strictly adhere to the 1:5 ratio of the gel loading buffer to the sample DNA solution. Thus, you can make the mixture simply by: (1) aspirating five volumes of the sample solution into the micropipette tip; (2) placing one volume of the buffer on a laboratory film; and (3) mixing the two solutions by drawing and expelling them several times with the micropipette. If you wish to increase the volume of the mixture because of, for example, the size of the wells, you can add one volume of the gel loading buffer per six volumes of the mixture.

^(Note 22) Some food wrap films absorb the UV light depending on the wavelength and the band image may not appear. In that case, use a polyvinylidene chloride film.

on the wrap and turn on the transilluminator^(Note 23). Photograph the gel with a CCD camera and examine the pattern of bands against that of the DNA molecular weight marker to determine if the bands of interest are present.

4.6.2.2 Post-staining gel electrophoresis

(1) Preparing the gel ready

Assemble the gel maker module and prepare a 2-3% agarose gel. First, weigh out an appropriate amount of agarose and add it to the TBE buffer^{(Note 18)(Note 19)}. Heat the gel solution to melt agarose^(Note 20). Pour the thoroughly mixed solution into the gel maker module and place the comb carefully so that no air bubble is formed around it. Leave the gel to cool at ambient temperature for about 30 minutes. When the gel has cooled and set, remove the comb carefully from the gel so that you don't make a hole through the well from which the sample solution can leak.

(2) Preparing the gel tank ready

Place the gel in the gel tank. Check to ensure that the wells are on the side of the negative electrode. While it is advisable that you immediately run the gel, you can store it in the buffer for a few days.

Flood the gel with the TBE buffer^(Note 18) to barely cover the gel surface. Note that excess buffer results in longer migration time due to reduced current density.

(3) Running electrophoresis

Add 1 µl gel loading buffer to 5 µl of the post-PCR sample DNA solution^(Note 21) and gently pour the mixture into the wells. Also load the molecular weight marker in one or two lanes on the same gel. Remember that taking too much time in pouring a sample solution into wells can diffuse the DNAs into the gel and produce smeared bands.

When the sample solution has properly been poured into the wells, turn on the power and run the gel at 100 volts. Check if bubbles are generated at the electrodes by the electrolysis of water to ensure that electrophoresis is occurring. Stop running the gel when the BPB marker dye added to the gel loading buffer has migrated half of the way down the gel. Although "half of the way down the gel" is only an indication, it is not advisable to run the gel over a longer distance because the size of the PCR product is relatively small.

^(Note 23) UV transilluminators are available in a variety of wavelengths. Considering health risk and sensitivity, a UV light of about 312 nm is best recommended.

^(Note 18) You may use TAE for TBE if it works. In that case, also use TAE in the electrophoresis buffer.

^(Note 19) A 100 ml gel solution is sufficient for two large and one small gels.

^(Note 20) The gel solution can conveniently be melted in the microwave. Handle the flask(?) carefully to avoid burn by sudden boiling.

^(Note 21) You need not to strictly adhere to the 1:5 ratio of the gel loading buffer to the sample DNA solution. Thus, you can make the mixture simply by: (1) aspirating five volumes of the sample solution into the micropipette tip; (2) placing one volume of the buffer on a laboratory film; and (3) mixing the two solutions by drawing and expelling them several times with the micropipette. If you wish to increase the volume of the mixture because of, for example, the size of the wells, you can add one volume of the gel loading buffer per six volumes of the mixture.

Stain the gel immediately after electrophoresis to prevent diffusion of DNAs resulting in lower resolution of bands.

(4) Staining the gel

Transfer the electrophoresed gel to a plastic container filled with an amount of new electrophoresis buffer sufficient to flood the gel. Add 50 µg of ethidium bromide per 100 ml of buffer. Place the container on a shaker and gently shake the solution for about 30 minutes to stain the gel.

(5) Photographing the gel

Cover the surface of a UV transilluminator with plastic wrap^(Note 22). Place the gel on the wrap and turn on the transilluminator^(Note 23). Photograph the gel with a CCD camera and examine the pattern of bands against that of the DNA molecular weight marker to determine if the bands of interest are present.

4.7 Verification of successful PCR

Successful PCR can be verified on the photograph of the electrophoresed gel by the absence of any band in the lane for the negative control and the presence of the bands of predicted lengths in the lane for the positive control. Once successful PCR is verified, the presence or absence of GMOs in the sample can be determined according to the procedures described in 5. *Determination of the presence or absence of GMOs*. If contamination is found, immediately take necessary actions specified in Part 5 *Prevention of Contamination* and perform PCR again using, if necessary, newly extracted DNA.

4.8 Specificity (and sensitivity) of the procedure

Combined with the DNA templates extracted from soybean and maize seeds and potatoes using the DNeasy Plant Maxi kit, the PCR procedure described in this manual produces the bands only when the test sample contains the target GMOs. This PCR procedure is also plant-specific in that it produces no band when other main crops including rice, wheat and barley are used as test samples.

4.9 Record keeping

Keep the photographs of electrophoresed gels in the image data file.

4.10 Additional notes

Not applicable.

^(Note 22) Some food wrap films absorb the UV light depending on the wavelength and the band image may not appear. In that case, use a polyvinylidene chloride film.

^(Note 23) UV transilluminators are available in a variety of wavelengths. Considering health risk and sensitivity, a UV light of about 312 nm is best recommended.

5. Determination of the presence or absence of GMOs

Presence or absence of GMOs in a test sample is determined by the presence or absence of the target PCR products through electrophoresis. Presence of a GMO is determined when the PCR products contained the lengths of both the plant's endogenous gene and the GMO-specific gene.

If the PCR products did not contain the ones corresponding to the endogenous gene, first perform PCR again using already extracted DNA. If the resulting PCR products did not show the presence of the endogenous gene, then extract DNA again from the sample crop and carry out PCR. If the PCR still did not amplify the sequence of the endogenous gene, identify the sample crop as "undetectable."

Table 4.1(1)
Primer pairs for soybeans*

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous <i>Le1</i> gene	Le1-n02	118 bp	<i>Le1</i>	
Introduced <i>P-35S</i> gene	P35S-1	101 bp	<i>P-35S</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also binds to the genes of non-GM plants infected with CMV.
Introduced <i>NOS-ter</i> gene	NOS ter-2	151 bp	<i>NOS-ter</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also primes when the soil bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is present.
Introduced RRS-specific gene	RRS-01	121 bp	<i>cp4 epsps</i> from <i>P. hybrida</i>	

* The Japanese patents jointly applied for by the National Food Research Institute, Asahi Breweries, Ltd. and Nippon Flour Mills Co., Ltd. on these primer pairs are pending.

Table 4.1(2)
Primer pairs for maize**

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous <i>SSIIb</i> gene	SSIIb	151 bp	<i>zSSIIb</i>	
Introduced <i>P-35S</i> gene	P35S-1	101 bp	<i>P-35S</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also binds to the genes of non-GM plants infected with CMV.
Introduced <i>NOS-ter</i> gene	NOS-ter-2	151 bp	<i>NOS-ter</i>	The results should be evaluated carefully because this primer pair also primes when the soil bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is present.
Introduced Event 176-specific gene	E176-2	100 bp	<i>cryIA(b)</i> - PEPC intron #9	
Introduced Bt11 gene	Bt11-3	127 bp	<i>adh1-1S</i> - <i>cryIA(b)</i>	
Introduced GA21 gene	GA21-3	133 bp	OTP - <i>m-epsps</i>	
Introduced T25 gene	T25-1	149 bp	<i>Pat</i> - 35S-ter	
Introduced MON810 gene	M810-2	113 bp	<i>hsp70</i> - <i>cryIA(b)</i>	

** The Japanese patents jointly applied for by the National Food Research Institute, Asahi Breweries, Ltd. and Nippon Flour Mills Co., Ltd. on these primer pairs are pending.

**Table 4.1(3)
Primer pairs for maize**

Target gene	ID	Size	Amplified region	Remarks
Endogenous Pss gene	Pss 01n-5' Pss 01n-3'	216 bp	TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCGA	<i>S. tuberosum</i> sucrose synthase/ sense <i>S. tuberosum</i> sucrose synthase/ anti-sense
Introduced NewLeaf-specific gene				
Introduced NewLeaf Plus-specific gene	p-FMV02-5' PLRV01-3'	234 bp	AAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGA AAAAGAGCGGCATATCGGGTAAATCTG	p-FMV/ sense PLRV/ anti-sense

**Table 4.2
Composition of PCR solution.**

Components	Volume (µl) / tube	Final concentration
Sterilized water	15.375	
AmpliTaq™ Gold	0.125	0.625 U
10x PCR buffer II	2.5	1 x
dNTP (2 mmol/l each)	2.5	200 µmol/l each
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1.5	1.5 mmol/l
Primer pair (25 µmol/l each)	0.5	0.5 µmol/l each
Template DNA (10 ng/µl)	2.5	25 ng
Total volume	25.0	

Table 4.3
Thermal Cycles and Conditions

Stage	Temperature (°C)	Duration	Number of cycle repetitions
Denaturation in the first cycle	95	10 min	1 cycle
Denaturation in the second cycle and after	95	30 sec	39 cycles (2nd-40th)
Annealing	60	30 sec	40 cycles
Extension in the first 39 cycles	72	30 sec	39 cycles (1st-39th)
Extension in the final cycle	72	7 min	1 cycle
Storage	4	NA*	NA*

NA*: Not applicable

附件七

QIAGEN Dneasy Maxi Kit

	藥品或檢體	使用量	方法與步驟
1	樣品	1 g	於 50 mL 離心管中。
2	RNase	20 μ L	加於管壁上。
3	buffer AP1 (預熱 65°C)	10 mL	加入後高速 vortex 30 sec。
4			65°C 水浴一小時(每 15 分鐘高速 vortex 一次)。
5			室溫下離心 10 min (3000xg)。
6	上清液	7 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
7	buffer AP2	2.5 mL	加入後高速 vortex 10 sec。
8			冰浴 15 min。
9			室溫下離心 35 min (3000xg)。
10	上清液	8 mL	移至紫色的 spin column 中。
11			室溫下離心 5 min (3000xg)。
12	流洗液之上清部分	7.5 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
13			高速 vortex 10 sec。
14	前步驟之液體	6.8 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
15	buffer AP3	10.2 mL	加入後高速 vortex 10 sec。
16			移至無色的 spin column 中。
17			室溫下離心 15 min (3000xg)。
18			棄流洗液。
19	buffer AW	12 mL	加入無色的 spin column 中。
20			室溫下離心 15 min (3000xg)。
21			下方換上乾淨管子。
22	滅菌水 (預熱 65°C)	1 mL	加在無色 spin column 的膜上。
23			室溫下靜置 5 min。
24			室溫下離心 10 min (3000xg)。
25	流洗液	測定體積	移至 2 mL tube。
26	isopropanol	等體積	加入後上下溫和翻轉混合十次。
27			室溫下靜置 5 min。
28			4°C 離心 15 min (12000xg)。
29			移去上清液。
30	70% 酒精	500 μ L	洗沉澱物。
31			4°C 離心 3 min (12000xg)。
32			移去上清液後自然乾燥 15 min。
33	TE buffer	100 μ L	加入管中用以溶解沉澱, 4°C 下 12-24 hr。

附件八

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

個別品目編
(定性試験用)

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

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

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試験方法についても、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。特に、個別品目についての分析方法は、常により良い方法を模索し、適切な検査を行う必要がある。

ここにあげられている試験方法は、表紙に記載した日付において、各品目から分析可能な DNA の抽出を行うために適切と思われる方法である。試料の粉碎には、試料に滅菌水等を加えてホモジナイズする方法又は、試料をフリーズドライ等により乾燥させて粉碎する方法が考えられるが、本マニュアルでは、主に、試料に滅菌水を加えてホモジナイズする方法を記載している。なお、加工食品においては、その加工工程で DNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能な DNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

ii) 適用範囲

本編は、表示のモニタリングに資するため、食品からの遺伝子組換え体の定性 PCR における試料の前処理の方法及び抽出方法について記述している。ダイズ、トウモロコシ及びジャガイモの農産物及び加工食品に適用できる。

1 使用機器

粉碎机：試料の粉碎に用いる。粉碎机には、水分を含む試料に適した粉碎机と、乾燥試料に適した粉碎机があるので、試料の性状にあわせて選択する。また、粉碎机には、刃が回転するもの、粉碎ボールを利用するボールミル、遠心力と高速回転のローターにより粉碎する超遠心粉碎机等があるが、粉碎机はコンタミネーション防止のために、粉碎容器及びカッター等が分解でき、洗浄が充分行える粉碎机を用いる。さらに望ましくは、滅菌できるものが良い。粉碎容器及びカッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーは DNA を分解するので使用してはならない。

本マニュアルでは、水分を含む試料に適した粉碎机として、(株)日本精機製作所製エースホモジナイザー又は、同等品を想定している。粉碎容器及びカッターは洗浄後滅菌して用いる。乾燥試料に適した粉碎机は、粉碎容器及びカッター等が、超音波洗浄可能なものとする。粉碎容器及びカッター等は、超音波洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。

乳鉢及び乳棒：洗浄後滅菌して用いる。

2 農産物

2. 1 ダイズ (枝豆及びダイズもやしを含む。)

(1) ダイズ

試料パックを乾燥試料に適した粉砕器に入れ全量を粉砕する。十分に細かくなったものを抽出に供する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

(2) ダイズもやし

試料パックを 1 cm 程度に切断し、水分を含む試料に適した粉砕器に移し、試料重量と同じ重量の滅菌水を加えて粉砕する。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(3) 枝豆

試料パック (皮付きのものは皮付きのまま) (又は水分を含む試料に適した粉砕器に入る量) を水分を含む試料に適した粉砕器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。およそ均質になったものを抽出に供する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、50 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

2. 2 トウモロコシ

試料パックを乾燥試料に適した粉砕器に移し、粉砕する。

DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

2. 3 ジャガイモ

植物防疫法上、生のジャガイモは、日本に入っていない。

3. 1 ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズ Roundup Ready Soy (40-30-2 系統) を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、DNeasy PlantMaxikitを使用する場合は、1.0 gを採取し、基本操作編「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/Gを使用する場合は、2.0 gを採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」に従う。CTABを用いる方法も、適用可能であり、試料採取量は、各項目に示した。

3. 1. 1 豆腐・油揚げ類

(1) 豆腐

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加え粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、120 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) 油揚げ

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加え粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

厚揚げの場合、中の柔らかい部分のみを豆腐と同様に処理しても良い。

3. 1. 2 凍豆腐、おから及びゆば

(1) 凍豆腐

試料に試料重量の10倍量の滅菌水を加え、10分後に水分を含む試料に適した粉碎器に移し粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) おから

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）分を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま、粉碎する。均質な状態になったものからを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(3) ゆば

試料に試料重量の5倍量の滅菌水を加え、20分後に水分を含む試料に適した粉碎器に移し粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、150 mgを採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 3 納豆

ざる（注1）に一パックを開け、流水（水道水）で15分間洗浄して、表面のぬめりを除く。滅菌水で十分にすすいだ後、重量を測定し水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

（注1）台所用品の水切りネットを使い捨てで使用すると、便利である。

3. 1. 4 豆乳類

試料をよく振って混合したものを直接、抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、50 μ Lを採取する。石英砂を加える必要はない。

3. 1. 5 みそ

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

3. 1. 6 ダイズ煮豆

（1）水煮ダイズ

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

3. 1. 7 ダイズ缶詰及びダイズ瓶詰

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、200 mgを採取し、プロテインナーゼ処理を行う。

3. 1. 8 きな粉

試料をそのまま抽出に供する。

なお、CTABを用いる方法による場合は、100 mg採り、プロテインナーゼ処理を行う。

3. 1. 9 ダイズいり豆

試料一パックを乾燥試料に適した粉碎器に採り、粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 10 「3. 1. 1」から「3. 1. 9」までに掲げるものを主な原材料とするもの

(1) 液体

「3. 1. 4 豆乳類」に従う。

(2) 液体以外

ダイズのみ（又は、ダイズ以外）分離が可能なものについては分離し、原材料に従い3.

1. 1から3. 1. 9の各項目を参照する。

分離が困難なものについてはそのまま、試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま、粉碎する。均質な状態になったものから抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 11 ダイズ（調理用）を主な原材料とするもの

ダイズのみ（又は、ダイズ以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのままの、試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む試料についてはそのまま、粉碎する。均質な状態になったものから抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 12 ダイズ粉を主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ

3. 1. 13 ダイズたん白を主な原材料とするもの

(1) 魚肉ソーセージ

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、250 mg を採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

(2) その他

「3. 1. 11」に同じ

3. 1. 14 枝豆を主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ。

ただし、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、50 mg 採取し、分離が困難なものについては、100mg 採取し、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 1. 15 ダイズもやしを主な原材料とするもの

「3. 1. 11」に同じ。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、200 mg 採取し、分離が困難なものについては、100 mg 採取することとし、プロテイナーゼ処理を行う。

3. 2 トウモロコシ加工食品

遺伝子組換えトウモロコシ Bt11, Event176, T25, MON810 及び GA21 の5系統を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、DNeasy PlantMaxikit を使用する場合は、1.0 g を採取し、基本操作編「3. 1. 6. 2 DNeasy Plant Maxi kitによる DNA の抽出B」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g を採取し、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/Gによる DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法も適用可能であり、試料採取量は、各項目に示した。

3. 2. 1 コーンスナック菓子

(1) コーンチップス

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

(2) コーンパフ

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の2倍の重さの滅菌水を加え粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、400 mg を採取しする。

3. 2. 2 コーンスターチ

試料をそのまま抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

3. 2. 3 ポップコーン

試料パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料の3倍の重さの滅菌水を加えて粉碎する。均質な状態になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

3. 2. 4 冷凍トウモロコシ

試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

3. 2. 5 トウモロコシ缶詰及びトウモロコシ瓶詰

缶詰に含まれる水分を切った後、試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、試料重量と等重量の滅菌水を加えて粉碎する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

3. 2. 6 コーンフラワーを主な原材料とするもの

コーンフラワーのみ（又は、コーンフラワー以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのままの、試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む試料についてはそのまま、粉碎する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

3. 2. 7 コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。）

「3. 2. 6」に同じ。

3. 2. 8 トウモロコシ（調理用）を主な原材料とするもの

「3. 2. 6」に同じ。

3. 2. 9 「3. 2. 1」から「3. 2. 5」までに掲げるものを主な原材料とするもの

「3. 2. 6」に同じ。 試料一パック（又は水分を含む試料に適した粉碎器に入る量）を水分を含む試料に適した粉碎器に採り、乾燥した試料では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む試料についてはそのまま、粉碎する。均質になったものを抽出に供する。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

3. 3 ジャガイモ加工食品

遺伝子組換えジャガイモ New Leaf (Bt6 系統及び SPBT02-05 系統) 及び New Leaf Plus (RBMT21-129、RBMT21-350 系統及び RBMT22-82 系統) を検知するための前処理を示す。

次に記載する方法により、前処理をした後、基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」を、改変が必要なものは各項目に示したように操作する。試料採取量は、各項目に示す。

3. 3. 1 乾燥ジャガイモ

粉末のものにあつては、試料を、そのまま2.0 gを採取し、抽出に供する。粉末以外のものにあつては、試料一パック（又は、乾燥試料に適した粉碎器に入る量）を乾燥試料に適した粉碎器に採り、粉碎する。均質になったものから、2.0gを採取し、抽出に供する。また、2回目のG2緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が10 mLに満たない場合は10 mL負荷できるように、適宜G2緩衝液を添加し、50℃、1時間保温する。

3. 3. 2 冷凍ジャガイモ

試料一パック（一パック500 g以上のものは、500 g以上）を乳鉢に採り、乳棒で粉碎する。均質になったものから、2.0 gを採取し、抽出に供する。また、2回目のG2緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が10mLに満たない場合は10 mL負荷できるように、適宜G2緩衝液を添加し、50℃、1時間保温する。

3. 3. 3 ジャガイモでん粉

試料から10 gを採取し、そのまま抽出に供する。基本操作編「3. 2. 6 QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」の(1)及び(2)を次に示すように、変更して操作する。また、2回目のG2緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が10mLに満たない場合は10 mL負荷できるように、適宜G2緩衝液を添加し、50℃、1時間保温する。

(1) 試料適量を50 mL容チューブに計量し、1,000-5,000 µL容のマイクロピペットを用いて、15 mL 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 µL容のマイクロピペットを用いて15 mL G2緩衝液、100-1,000 µL容のマイクロピペットを用いて、200µL QIAGEN Proteinase K及び10-100 µL容のマイクロピペットを用いて、20 µL 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。太字は変更部分。

3. 3. 4 ポテトスナック菓子

試料一パックを、厚手のビニール袋に入れ、木づち等でたたき、粉末にする。ビニール袋をよく振り、混合した後、2.0 g採取する。また、2回目のG2緩衝液添加後において、試料の膨潤により、カラムに負荷する量が10 mLに満たない場合は10 mL負荷できるように、適宜G2緩衝液を添加し、50℃、1時間保温する。

3. 3. 5 乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、ジャガイモ澱粉及びポテトスナック菓子を主な原料とするもの

ジャガイモのみ（又は、ジャガイモ以外に）分離できるものについては、分離する。試料一パックについて、次のように操作する。いわゆる「はるさめ」等の乾燥品については、0.50 mmのメッシュがとおる程度に粉碎し、「3. 3. 3 ジャガイモ澱粉」の操作を行う。焼成した菓子については、「3. 3. 4 ポテトスナック菓子」の操作を行う。その他については、「3. 3. 2 冷凍ジャガイモ」の操作を行う。

3. 3. 6 ジャガイモ（調理用）を主な原材料とするもの

液体のものは、試料パックを良く混合した後に、2.0 gを採取し、抽出に供する。

液体以外の性状のものは、ジャガイモのみ（又は、ジャガイモ以外に）分離できるものについては、分離する。試料パックについて、「3. 3. 2 冷凍ジャガイモ」の操作を行う。

附件九

編號	樣品名	樣品來源
1	有機極小粒納豆	市場 (Topvalu Company)
2	有機ひきわり納豆	市場 (Topvalu Company)
3	極小粒有機大豆納豆	市場 (天狗納豆)
4	ひきわり納豆	市場 (天狗納豆)
5	テンペ	市場

1. 有機極小粒納豆



2. 有機ひきわり納豆



※包装材料/外装フィルム: ポリアリレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、ポリエチレン、
 アイロンの着色顔料、ごまの殻、ポリエチレン、ポリプロピレンの着色顔料、内装フィルム: ポリエチレン

3. 極小粒有機大豆納豆

③

極小粒

有機大豆納豆

天狗納豆

50g×3
たれ・からし付き

品名	数量
豆腐納豆小粒	1
豆腐納豆小粒	2
豆腐納豆小粒	3
豆腐納豆小粒	4
豆腐納豆小粒	5

4. ひきわり納豆

④

遺伝子組み換え大豆は
使用しておりません。

天狗納豆

たれ・からし付

50g×2

ひきわり納豆

03×08
03.08.12

5. テンペ



⑤

コレステロール 0
 イソフラボン
 食物繊維
 GABA (ギャバ)



03 826

CT 500 mg
 stock 30 mL

(器具用之處理) 均買條件不可 (autoclave)

1	清水沖洗
2	超音波 15 min
3	清潔液清洗
4	蒸籠水 1hase
5	160°C 4 或 5 小時

附件十

納豆樣本均質

方法與步驟			
1	納豆置入網中。		
2	沖水 15 min (一邊不停用稱匙攪拌)。		
3	納豆連同網子置入封口袋。		
4	加入滅菌水至淹蓋過樣本。		
5	納豆連同網子拿出並擠乾。		
6	置入另一封口袋。		
7	稱重 (扣除網和封口袋的重量)。 (因 5 號為塊狀, 所以未經水洗直接稱重)	1 號	112.71 g
		2 號	127.92 g
		3 號	159.06 g
		4 號	55.80 g
		5 號	83.94 g
8	將納豆自網中取出, 移至均質機。		
9	加入等量滅菌水。(其中 5 號情況特殊, 因其較乾, 均質時整塊卡在攪拌刀片上, 無法順利均質, 因此加二倍量的水)	1 號	113 mL
		2 號	128 mL
		3 號	159 mL
		4 號	56 mL
		5 號	168 mL
10	啟動均質機。		
11	均質完成後依後續實驗所需檢體重量秤取檢體至 50 mL 離心管, 並標示清楚, 剩餘檢體保留 50 mL 作 stock, 其餘棄置。	G	2 g
		M	1 g
		CT	200 mg
		stock	50 mL
12	管口以 parafilm 密封, 再以封口袋密封, 放入冰盒中帶回筑波處理。		

使用器具之處理 (均質機配件不可 autoclave)

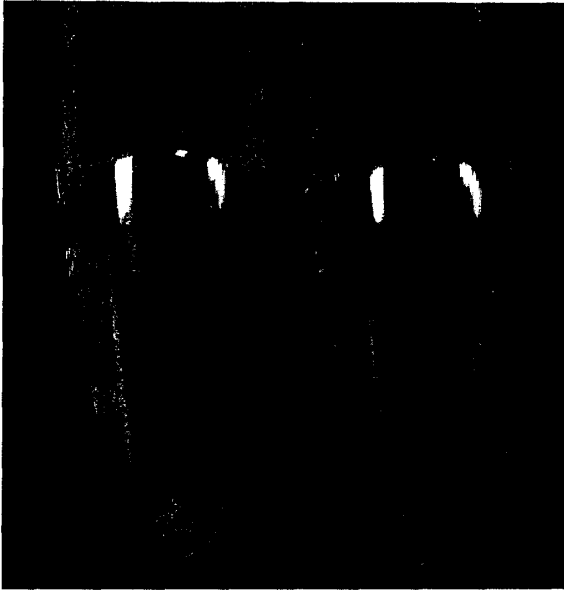
方法與步驟	
1	清水沖洗。
2	超音波 15 min。
3	清潔劑清洗。
4	蒸餾水 rinse。
5	160°C 4 或 5 小時。

附件十一

QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit

	藥品或檢體	使用量	方法與步驟
1	樣品	2 g	於 50 mL 離心管中。
2	G2 buffer	7.5 mL	加入後上下搖動混合。
3			加入後高速 vortex 30 sec。
4	G2 buffer	7.5 mL	加入管中。
5	QIAGEN Proteinase K	200 μ L	加於管壁上。
6	RNase	20 μ L	加於管壁上後上下搖動混合。
7			加入後高速 vortex 30 sec。
8			50°C 水浴一小時(每 15 分鐘高速 vortex 一次)。
9			4°C 離心 15 min (3000 \times g)。
10	上清液		移至乾淨 50 mL 離心管 (避免取到液面懸浮物)
11			4°C 離心 10 min (3000 \times g)。
12	Buffer QBT	1 mL	平衡 QIAGEN Genomic-tip 20/G 管柱。
13	上清液	一次 2 mL	全部注入管柱中，利用重力流洗。
14	Buffer QC	一次 2 mL	利用重力流洗三次。
15	Buffer QF (預熱 50°C)	750 μ L	注入管柱中，流洗並收集流洗液至 1.5 mL tube，此流洗液稱為 elute 1。
16	Buffer QF (預熱 50°C)	750 μ L	注入管柱中，流洗並收集流洗液至 1.5 mL tube，此流洗液稱為 elute 2。
17	elute 1 及 elute 2	測定體積	
18	isopropanol	等體積	加入後上下溫和翻轉混合十次。
19			室溫下靜置 5 min。
20			4°C 離心 15 min (12000 \times g)。
21			移去上清液。
22	70% 酒精	1 mL	加入後上下溫和翻轉混合十次洗沉澱物。
23			4°C 離心 3 min (12000 \times g)。
24			移去上清液後自然乾燥 15 min。
25	TE buffer (pH 8.0)	50 μ L	加入 elute 2 管中，65°C 加熱 15 min (不時彈管壁) 用以溶解沉澱。
26	elute 2 DNA		加入 elute 1 管中，65°C 加熱 15 min (不時彈管壁) 用以溶解沉澱。
27			4°C 12-24 小時。

elute 1 與 elute 2 經過 isopropanol 混合及酒精沉澱的步驟後，沉澱物的比較：



elute 1 的沉澱明顯比 elute 2 的多，但是為增加 DNA 抽出量，仍收集第二次流洗液之沉澱一併溶解。

附件十二

CTAB method

	藥品或檢體	使用量	方法與步驟
1	樣品	250 mg	於 50 mL 離心管中。
2	CTAB extraction buffer	2 mL	加入後高速 vortex 30 sec。
3	前步驟之液體	1.4 mL	移至 1.5 mL tube。
4	proteinase K	20 μ L	加於管壁上後上下搖動混合。
5			60°C 水浴 30 min (每 10 min 上下翻轉混合一次)。
6			室溫下離心 3 min (14000 rpm)。
7	上清液	700 μ L	移至乾淨 1.5 mL tube。
8	PCI (phenol/chloroform isopropanol)	700 μ L	加入後高速 vortex 2 min。
9			室溫下離心 15 min (14000 rpm)。
10	上層液	測定體積	移至乾淨 1.5 mL tube。
11	CIA (chloroform isopropanol alcohol)	等體積	加入後高速 vortex 2 min。
12			室溫下離心 3 min (14000 rpm)。
13	上層液	測定體積	移至乾淨 1.5 mL tube。
14	isopropanol	等體積	加入後上下溫和翻轉混合 30 sec。
15			室溫下離心 3 min (13000 \times g)。
16			移去上清液。
17	70% 酒精	800 μ L	加入後上下溫和翻轉 30 sec 洗沉澱物。
18			室溫下靜置 3 min。
19			室溫下離心 3 min (12000 rpm)。
20			移去上清液後自然乾燥。
21	TE buffer (pH 8.0)	100 μ L	加入管中以溶解沉澱。
22	RNase A (10 mg/mL)	2 μ L	加於管壁上後混合均勻。
23			室溫下靜置 30 min。
24	CTAB extraction buffer	400 μ L	加入後混合均勻。
25	CIA	500 μ L	加入後輕彈管壁混合。
26			室溫下離心 15 min (12000 rpm)。
27	上層液	測定體積	移至乾淨 1.5 mL tube。
28	isopropanol	等體積	加入後上下溫和翻轉混合 30 sec。
29			室溫下離心 3 min (13000 \times g)。
30			移去上清液，抽真空乾燥 5 min。
31	滅菌水	100 μ L	加入管中以溶解沉澱，-20°C 保存。

DNA/Oligo Quant ^{附件十三}

ReadSamples RawData Method SaveClear Print Quit

Results file: A:\WORK_RES

Method name: A:\DEFAULT

Assay type: 260/230 & 260/280 Ratios & Conc. Background corr: [Yes] 320.0nm
Sampling device: None Pathlength: 1.0000 cm
Read average time: 0.50 sec Conc. factor: 50.000 at 260.0nm ↓ ↑

Sample ID	Net Abs 230.0nm	Net Abs 260.0nm	Net Abs 280.0nm	260.0/230.0	260.0/280.0	Dil Fact.	Conc.
1	0.0626	0.0097	0.0047	0.15498	2.06084	50.000	24.25975
1 Chicken Nugget	0.3847	0.7271	0.3969	1.89007	1.83175	50.000	1817.673
2 Chibini Ham	0.5121	1.0820	0.5879	2.11305	1.84064	50.000	2705.067
3 meat Sausage	0.6890	1.4831	0.7990	2.15246	1.85617	50.000	3707.824
4 W.S (White Sausage)	0.1959	0.2703	0.1444	1.37960	1.87202	50.000	675.7608
5 SAUSAGE	0.3593	0.6929	0.3727	1.92816	1.85910	50.000	1732.207
6 PIGMEET	0.2721	0.4707	0.2515	1.72961	1.87186	50.000	1176.733
7 CUTHAM	0.2859	0.4842	0.2574	1.69366	1.88123	50.000	1210.375
8 REDHAM	0.2494	0.4092	0.2201	1.64087	1.85955	50.000	1023.058
9 CT	0.2595	0.4294	0.2332	1.65479	1.84101	50.000	1073.498
10 10%	0.2494	0.4055	0.2219	1.62581	1.82773	50.000	1013.842
11 15%	0.2204	0.3445	0.1869	1.56346	1.84340	50.000	861.3101
12 20%	0.2336	0.3871	0.2121	1.65684	1.82475	50.000	967.7997
13 炭烧角	0.4173	0.8357	0.4454	2.00267	1.87637	50.000	2089.312
14 L 五香豆粒	0.2623	0.4416	0.2368	1.68353	1.86489	50.000	1104.001
15 S 五香豆粒(大溪)	0.4106	0.8589	0.4544	2.09202	1.89020	50.000	2147.272
16 GM	0.6220	0.5140	0.3083	0.82647	1.66710	50.000	1285.085
17 NONGM	0.4357	0.4464	0.2683	1.02445	1.66399	50.000	1115.965
19						50.000	

DNA/Oligo Quant 附件十四

ReadSamples RawData Method SaveClear Print Quit

Results file: A:\WORK_RES

Method name: A:\DEFAULT

Assay type: 260/230 & 260/280 Ratios & Conc. Background corr: [Yes] 320.0nm

Sampling device: None

Pathlength: 1.0000 cm

Read average time: 0.50 sec

Conc. factor: 50.000 at 260.0nm ↓ ↑

Sample ID	Net Abs 230.0nm	Net Abs 260.0nm	Net Abs 280.0nm	260.0/230.0	260.0/280.0	Dil Fact.	Conc.
1	-0.0091	-0.0022	-0.0023	0.23858	0.93427	10.000	-1.08001
2	-0.0258	0.0008	-0.0022	0.03106	0.35934	10.000	0.4001
3	0.4479	0.3234	0.1736	0.72206	1.86319	10.000	161.692
4	0.3423	0.2126	0.1106	0.62104	1.92290	10.000	106.3005
5 Blank	-0.0050	-0.0004	-0.0004	0.07014	0.90614	10.000	-0.17571
6 (1) Chicken Nugget	0.4279	0.3144	0.1724	0.73472	1.82372	10.000	157.2069
7 (2) Chibini Ham	0.3412	0.2118	0.1132	0.62079	1.87144	10.000	105.9079
8 (3) Fish meat sausage	0.3199	0.2683	0.1446	0.83896	1.85602	10.000	134.1709
9 (4) White Sausage	0.1811	0.0719	0.0375	0.39688	1.91853	10.000	35.93795
10 (5) sausage	0.1945	0.1148	0.0609	0.59009	1.88423	10.000	57.39423
11 (6) Sliced Ham	0.2538	0.2259	0.1219	0.89008	1.85384	10.000	112.9571
12 (7) FrankFruite Sausage	0.1927	0.1087	0.0571	0.56426	1.90350	10.000	54.35818
13 (8) Red Ham	0.1825	0.1048	0.0543	0.57431	1.93145	10.000	52.39388
14 (9) Ham (CT)	0.3036	0.1184	0.0623	0.39010	1.90144	10.000	59.22289
15 (10) Ham 16%	0.3571	0.0292	0.0111	0.08188	2.62704	10.000	14.61932
16 (11) Ham 15%	0.4180	0.0766	0.0373	0.18322	2.05088	10.000	38.29550
17 (12) Ham 20%	0.5605	0.1200	0.0594	0.21405	2.01831	10.000	59.98737
18 (13) 皮烧肉	0.2645	0.1117	0.0579	0.42244	1.92989	10.000	55.87436
19 (14) 五香豆乾	0.3132	0.0989	0.0502	0.31574	1.96964	10.000	49.44895
20 (15) 大漠五香豆乾	0.3574	0.0936	0.0461	0.26204	2.02995	10.000	46.82211
21 (16) GM	0.3373	0.2750	0.1482	0.81513	1.85585	10.000	137.4830
22 (17) Non GM	1.4382	2.8578	1.5364	1.98707	1.86000	10.000	1428.880

附件十五

QIAGEN DNeasy Maxi Kit + CTAB method

	藥品或檢體	使用量	方法與步驟
1	樣品	1 g	於 50 mL 離心管中。
2	RNase	20 μ L	加於管壁上。
3	AP1/CTAB (1%) buffer (預熱 65°C)	10 mL	加入後高速 vortex 30 sec。
4			65°C 水浴 1 hr (每 15 min 高速 vortex 一次)。
5			室溫下離心 10 min (3000 \times g)。
6	上清液	7 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
7	buffer AP2	2.5 mL	加入後高速 vortex 10 sec。
8			冰浴 15 min。
9			室溫下離心 35 min (3000 \times g)。
10	上清液	8 mL	移至紫色的 spin column 中。
11			室溫下離心 5 min (3000g)。
12	流洗液之上清部分	7.5 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
13			高速 vortex 10 sec。
14	前步驟之液體	6.8 mL	移至乾淨 50 mL 離心管中。
15	buffer AP3	10.2 mL	加入後高速 vortex 10 sec。
16			移至無色的 spin column 中。
17			室溫下離心 15 min (3000 \times g)。
18			棄流洗液。
19	buffer AW	12 mL	加入無色的 spin column 中。
20			室溫下離心 15 min (3000 \times g)。
21			下方換上乾淨管子。
22	滅菌水 (預熱 65°C)	1 mL	加在無色 spin column 的膜上。
23			室溫下靜置 5 min。
24			室溫下離心 10 min (3000 \times g)。
25	流洗液	測定體積	移至 2 mL tube。
26	isopropanol	等體積	加入後上下溫和翻轉混合十次。
27			室溫下靜置 5 min。
28			4°C 離心 15 min (12000 \times g)。
29			移去上清液。
30	70% 酒精	500 μ L	洗沉澱物。
31			4°C 離心 3 min (12000 \times g)。
32			移去上清液後自然乾燥 15 min。
33	TE buffer	100 μ L	加入管中用以溶解沉澱, 4°C 下 12-24 hr。

附件十七

BECKMAN DU-7000

Date: 03/08/08
Time: 10:32

DNA/Oligo Quant

ReadSamples RawData Method SaveClear Print Quit

Results file: A:\WORK_RES

Method name: A:\DEFAULT

Assay type: 260/230 & 260/280 Ratios & Conc. Background corr: [Yes] 320.0nm
Sampling device: None Pathlength: 1.0000 cm
Read average time: 0.50 sec Conc. factor: 50.000 at 260.0nm ↓ ↑

Sample ID	Net Abs 230.0nm	Net Abs 260.0nm	Net Abs 280.0nm	260.0/230.0	260.0/280.0	Dil Fact.	Conc.
1	0.0114	0.0011	0.0002	0.09683	6.49987	1.0000	0.05528
1	0.3621	0.4042	0.2297	1.11609	1.75984	50.000	1010.404
2	0.2320	0.2203	0.1258	0.94994	1.75111	50.000	550.8543
X	0.0996	0.1264	0.0707	1.26964	1.78810	50.000	316.1241
4	0.0900	0.0634	0.0360	0.70443	1.75990	50.000	158.4460
5	0.0177	0.0128	0.0069	0.72319	1.84950	50.000	✓31.94674
6	0.0233	0.0594	0.0331	2.54947	1.79373	50.000	148.3956
7	0.1781	0.2359	0.1291	1.32448	1.82650	50.000	589.6622
8	0.2203	0.2683	0.1488	1.21794	1.80242	50.000	670.6342
9) X	0.0029	0.0014	0.0017	0.46297	0.79400	50.000	✓3.38566
10) 177 X	0.0107	0.0065	0.0042	0.60688	1.52288	50.000	✓16.16356
11	0.0037	0.0042	0.0023	1.13267	1.82375	50.000	✓10.56899
12	0.0104	0.0075	0.0046	0.72348	1.64785	50.000	✓18.86953
13	0.0187	0.0197	0.0112	1.05179	1.75654	50.000	49.29562
14	0.0039	0.0063	0.0036	1.62071	1.74584	50.000	✓15.86726
15	0.0026	0.0250	0.0145	9.64179	1.72192	50.000	62.47851
16	0.0461	0.0937	0.0513	2.03400	1.82588	50.000	234.2766
17	0.0378	0.0680	0.0374	1.80035	1.81962	50.000	170.0397
19						50.000	

附件十八

BECKMAN DU-7000

Date: 03/08/11
Time: 09:54

DNA/Oligo Quant

ReadSamples RawData Method SaveClear Print Quit

Results file: A:\WORK_RES Method name: A:\DEFAULT

Assay type: 260/230 & 260/280 Ratios & Conc. Background corr: [Yes] 320.0nm
Sampling device: None Pathlength: 1.0000 cm
Read average time: 0.50 sec Conc. factor: 50.000 at 260.0nm ↓ ↑

Sample ID	Net Abs 230.0nm	Net Abs 260.0nm	Net Abs 280.0nm	260.0/230.0	260.0/280.0	Dil Fact.	Conc.
1	-0.0022	0.0004	0.0006	-0.19669	0.70187	1.0000	0.0220
② M9	0.0993	0.2581	0.1417	2.59907	1.82174	50.000	645.306
③ M10	0.0762	0.1973	0.1092	2.58765	1.80594	50.000	493.190
4 未知 DNA	0.1063	0.1492	0.0828	1.40360	1.80140	50.000	372.895
5 M125	0.1681	0.3790	0.2113	2.25469	1.79349	50.000	947.425
6 RRS	0.0593	0.1288	0.0705	2.17387	1.82817	50.000	322.036
7						50.000	

Date 2003/8/18

Maxi

Sample	粉砕日	Extraction method	抽出日	試料W/L	λ 230	λ 260	λ 280	λ 260/λ 230	λ 260/λ 280	希釈倍率	(DNA) ng/μL	(DNA) μL	TE 1 L	作製量
M 1	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.3621	0.4042	0.2297	1.116	1.7597	50	1010.50	0.297	29.703	30
M 2	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.2320	0.2203	0.1258	0.950	1.7512	50	550.75	0.545	29.455	30
M 3	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0996	0.1264	0.0707	1.269	1.7878	50	316.00	0.949	29.051	30
M 4	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0900	0.0634	0.0360	0.704	1.7611	50	158.50	1.893	28.107	30
M 5	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0177	0.0128	0.0069	0.723	1.8551	50	32.00	9.375	20.625	30
M 6	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0233	0.0594	0.0331	2.549	1.7946	50	148.50	2.020	27.980	30
M 7	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.1781	0.2359	0.1291	1.325	1.8273	50	589.75	0.509	29.491	30
M 8	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.2203	0.2683	0.1488	1.218	1.8031	50	670.75	0.447	29.553	30
M 9	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月11日	1g	0.0993	0.2581	0.1417	2.599	1.8215	50	645.25	0.465	29.535	30
M 10	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月11日	1g	0.0762	0.1973	0.1092	2.589	1.8068	50	493.25	0.608	29.392	30
M 11	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0037	0.0042	0.0023	1.135	1.8261	50	10.50	28.571	1.429	30
M 12	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0104	0.0075	0.0046	0.721	1.6304	50	18.75	16.000	14.000	30
M 13	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0187	0.0197	0.0112	1.053	1.7589	50	49.25	6.091	23.909	30
M 14	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0039	0.0063	0.0036	1.615	1.7500	50	15.75	19.048	10.952	30
M 15	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0026	0.0250	0.0145	9.615	1.7241	50	62.50	4.800	25.200	30
M 16	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0461	0.0937	0.0513	2.033	1.8265	50	234.25	1.281	28.719	30
M 17	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit	8月7日	1g	0.0378	0.0680	0.0374	1.799	1.8182	50	170.00	1.765	28.235	30
								#DIV/0!	#DIV/0!		0.00	#DIV/0!	#DIV/0!	

Protocol for qualitative PCR

date: 0308(8) (-)

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (30 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

附件二十

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	1001 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	1001 μL
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	801 μL
total				2803 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL.

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for	1 tube	for	77 tubes
Sterilized ultra pure water			15.375 μL		1183.875 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold		6.5 μL		503.5 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL		0.125 μL		9.625 μL
total			22 μL		1694 μL

Master Mix B	Final conc.	for	1 tube	for	37 tubes
Master Mix A			22 μL		814 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM		0.25 μL		9.25 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM		0.25 μL		9.25 μL
total			22.5 μL		832.5 μL

Master Mix B	Final conc.	for	1 tube	for	37 tubes
Master Mix A			22 μL		814 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM		0.25 μL		9.25 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM		0.25 μL		9.25 μL
total			22.5 μL		832.5 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

- # prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).
- # Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

- # Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.
- # Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

	for	1 tube
Master Mix A		22 μL
Sterilized ultra pure water		0.5 μL
Template DNA (positive control)		2.5 μL
total		25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

No.	Sample name
1	Chichen nugget 1
2	Chichen nugget 2
3	Baby ham 1
4	Baby ham 2
5	Sausage (H) 1
6	Sausage (H) 2
7	White sausage 1
8	White sausage 2
9	Sausage (A) 1
10	Sausage (A) 2
11	Sliced ham 1
12	Sliced ham 2
13	FrankFruite sausage 1
14	FrankFruite sausage 2
15	Ham (RH) 1
16	Ham (RH) 2
17	Ham (CT) 1
18	Ham (CT) 2
19	Ham (10%) 1
20	Ham (10%) 2
21	Ham (15%) 1
22	Ham (15%) 2
23	Ham (20%) 1
24	Ham (20%) 2
25	Tanchaushau 1
26	Tanchaushau 2
27	Uhsian 1
28	Uhsian 2
29	Dahsi 1
30	Dahsi 2
31	GM (RRS) 1
32	GM (RRS) 2
33	nonGM 1
34	nonGM 2
35	negative (no DNA)
36	negative (no primer)
37	positive (hamid)

Date 2003/8/19

G-tip

PCR用DNA溶液: 10 ng/ μ L

Sample	物碎日	Extraction method	抽出日	試料量	λ 230	λ 260	λ 280	λ 260/ λ 230	λ 260/ λ 280	希釈倍率 (DNA) μ L	(DNA) μ L	TE 1L	作製量
G 1	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.3847	0.7271	0.3969	1.890	1.8318	50	1817.75	0.165	29.835
G 2	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.5121	1.0820	0.5879	2.113	1.8406	50	2705.00	0.111	29.889
G 3	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.6890	1.4831	0.7990	2.152	1.8562	50	3707.75	0.081	29.919
G 4	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.1959	0.2703	0.1444	1.380	1.8720	50	675.75	0.444	29.556
G 5	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.3593	0.6929	0.3727	1.928	1.8591	50	1732.25	0.173	29.827
G 6	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2721	0.4707	0.2515	1.730	1.8719	50	1176.75	0.255	29.745
G 7	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2859	0.4842	0.2574	1.694	1.8812	50	1210.50	0.248	29.752
G 8	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2494	0.4092	0.2201	1.641	1.8596	50	1023.00	0.293	29.707
G 9	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2595	0.4294	0.2332	1.655	1.8410	50	1073.50	0.279	29.721
G 10	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2494	0.4055	0.2219	1.626	1.8277	50	1013.75	0.296	29.704
G 11	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2204	0.3445	0.1869	1.563	1.8434	50	861.25	0.348	29.652
G 12	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2336	0.3871	0.2121	1.657	1.8248	50	967.75	0.310	29.690
G 13	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.4173	0.8357	0.4454	2.003	1.8764	50	2089.25	0.144	29.856
G 14	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.2623	0.4416	0.2368	1.684	1.8649	50	1104.00	0.272	29.728
G 15	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.4106	0.8589	0.4544	2.092	1.8902	50	2147.25	0.140	29.860
G 16	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.6220	0.5140	0.3083	0.826	1.6671	50	1285.00	0.233	29.767
G 17	8月5日	QIAGEN Genomic-tip 20/G	8月11日	2g	0.4357	0.4464	0.2683	1.024	1.6640	50	1116.00	0.269	29.731
									#DIV/0!		0.00	#DIV/0!	

Protocol for qualitative PCR

date: 030819(二)

附件二十二

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	1001 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	1001
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	601
total				2600 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 77 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	1183.875 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	500.5 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	9.625 μL
total		22 μL	1694 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 37 tubes
Master Mix A		22 μL	814 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
total		22.5 μL	832.5 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 37 tubes
Master Mix A		22 μL	814 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
total		22.5 μL	832.5 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).

Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

	for 1 tube
Master Mix A	22 μL
Sterilized ultra pure water	0.5 μL
Template DNA (positive control)	2.5 μL
total	25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

G-tip	
No.	Sample name
1	Chichen nugget 1
2	Chichen nugget 2
3	Baby ham 1
4	Baby ham 2
5	Sausage (H) 1
6	Sausage (H) 2
7	White sausage 1
8	White sausage 2
9	Sausage (A) 1
10	Sausage (A) 2
11	Sliced ham 1
12	Sliced ham 2
13	FrankFruite sausage 1
14	FrankFruite sausage 2
15	Ham (RH) 1
16	Ham (RH) 2
17	Ham (CT) 1
18	Ham (CT) 2
19	Ham (10%) 1
20	Ham (10%) 2
21	Ham (15%) 1
22	Ham (15%) 2
23	Ham (20%) 1
24	Ham (20%) 2
25	Tanchaushau 1
26	Tanchaushau 2
27	Uhsian 1
28	Uhsian 2
29	Dahsi 1
30	Dahsi 2
31	GM (RRS) 1
32	GM (RRS) 2
33	nonGM 1
34	nonGM 2
35	negative(no DNA)
36	negative(no primer)
37	positive(Plasmid)

附件二十三

電泳

方法與步驟		
1 3% agarose gel 的製作		
藥品	使用量	方法
1X TAE buffer	100 mL	
agarose	3 g	加入 TAE buffer 中，微波加熱並搖動至均勻透明。
EtBr (10 mg/mL)	5 μ L	加入後搖晃均勻，避免氣泡產生。
		趁熱倒入鑄膠模型，插上齒梳。
		覆蓋保鮮膜，靜置 30 min 待乾。
2 將 PCR 產物注入膠體齒槽中。		
	PCR 產物 5 μ L + 6X loading dye 1 μ L	
	Marker (100 bp ladder) 2 μ L	
3 電壓 100 伏特進行電泳 25 min。		
4 電泳完畢，取出膠體置於紫外線下，拍照並存檔。		

使用器具之處理

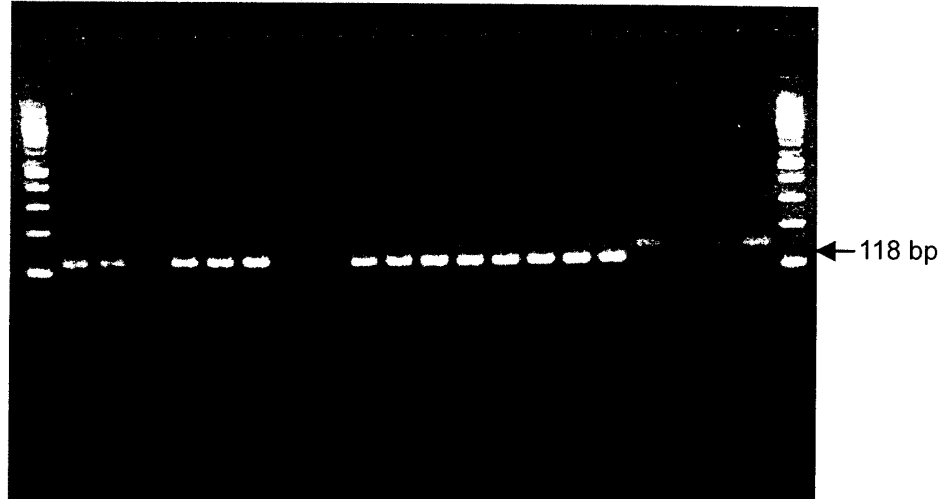
方法與步驟	
1	浸泡漂白水。
2	清潔劑洗淨（使用專用的海綿，不可與清洗一般器具的海綿混用）。

附件二十四

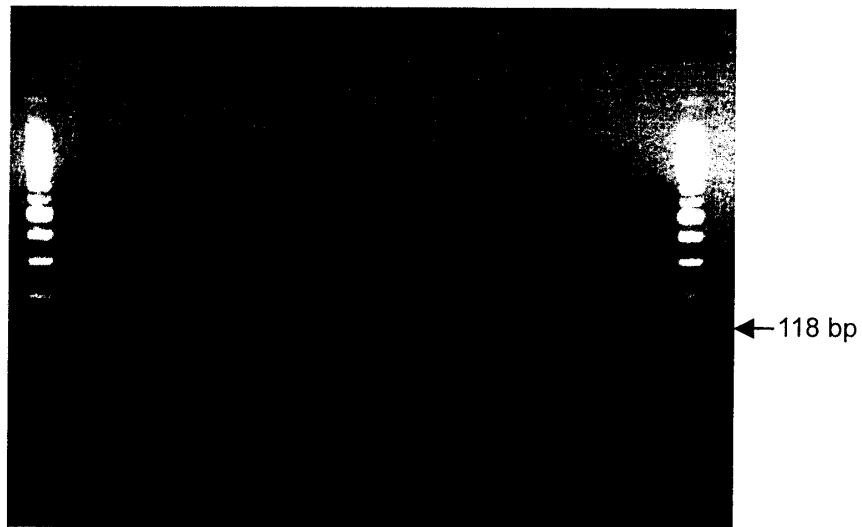
QIAGEN DNeasy Maxi Kit 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳圖結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

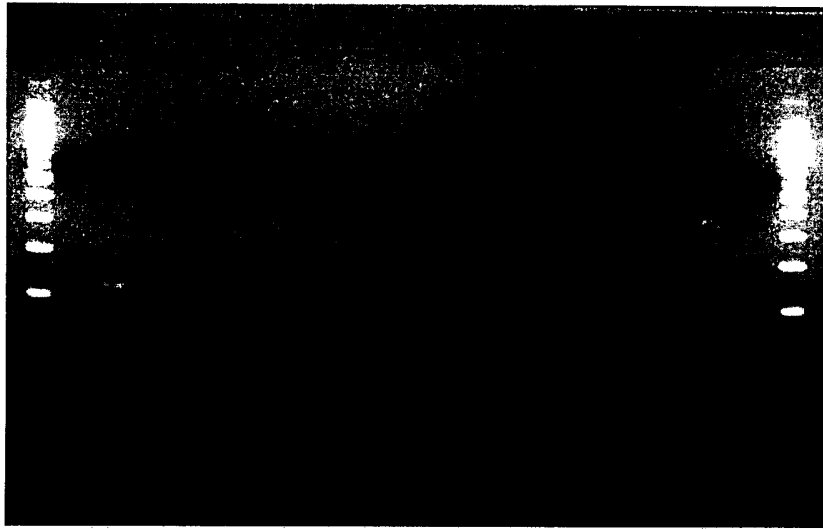


M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



←121 bp

M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



←121 bp

C71/B

Date 2003/8/20

Sample	物碎日	Extraction method	抽出日	試料量	ε230	ε260	ε280	ε260/ε230	ε260/ε280	稀释因子(DNA)	(DNA) ng/L	(DNA) μL	作製量
C 1	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.4279	0.3144	0.1724	0.735	1.8237	10	157.20	1.908	28.092
C 2	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.3412	0.2118	0.1132	0.621	1.8710	10	105.90	2.833	27.167
C 3	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.3199	0.2683	0.1446	0.839	1.8555	10	134.15	2.236	27.764
C 4	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.1811	0.0719	0.0375	0.397	1.9173	10	35.95	8.345	21.655
C 5	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.1945	0.1148	0.0609	0.590	1.8851	10	57.40	5.226	24.774
C 6	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.2538	0.2259	0.1219	0.890	1.8532	10	112.95	2.656	27.344
C 7	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.1927	0.1087	0.0571	0.564	1.9037	10	54.35	5.520	24.480
C 8	8月5日	CTAB	8月12日	250 mg	0.1825	0.1048	0.0543	0.574	1.9300	10	52.40	5.725	24.275
C 9	8月5日	CTAB	8月13日	250 mg	0.3036	0.1184	0.0623	0.390	1.9005	10	59.20	5.068	24.932
C 10	8月5日	CTAB	8月13日	250 mg	0.3571	0.0292	0.0111	0.082	2.6306	10	14.60	20.548	9.452
C 11	8月5日	CTAB	8月13日	250 mg	0.4180	0.0766	0.0373	0.183	2.0536	10	38.30	7.833	22.167
C 12	8月5日	CTAB	8月13日	250 mg	0.5605	0.1200	0.0594	0.214	2.0202	10	60.00	5.000	25.000
C 13	8月5日	CTAB	8月13日	100 mg	0.2645	0.1117	0.0579	0.422	1.9292	10	55.85	5.372	24.628
C 14	8月5日	CTAB	8月13日	100 mg	0.3132	0.0989	0.0502	0.316	1.9701	10	49.45	6.067	23.933
C 15	8月5日	CTAB	8月13日	100 mg	0.3574	0.0936	0.0461	0.262	2.0304	10	46.80	6.410	23.590
C 16	8月5日	CTAB	8月13日	500 mg	0.3373	0.2750	0.1482	0.815	1.8556	10	137.50	2.182	27.818
C 17	8月5日	CTAB	8月13日	250 mg	1.4382	2.8578	1.5364	1.987	1.8601	10	1428.90	1.400	198.600
					#DIV/0!			#DIV/0!			0.00	#DIV/0!	#DIV/0!

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

附件二十六

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	1078 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	1078
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	647
total				2800 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 85 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	1306.875 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	552.5 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	10.625 μL
total		22 μL	1870 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 40 tubes
Master Mix A		22 μL	880 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
total		22.5 μL	900 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 40 tubes
Master Mix A		22 μL	880 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
total		22.5 μL	900 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

- # prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).
- # Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

- # Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.
- # Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

for negative control#2(no primer)	for 1 tube
Master Mix A	22 μL
Sterilized ultra pure water	0.5 μL
Template DNA (positive control)	2.5 μL
total	25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

CTAB

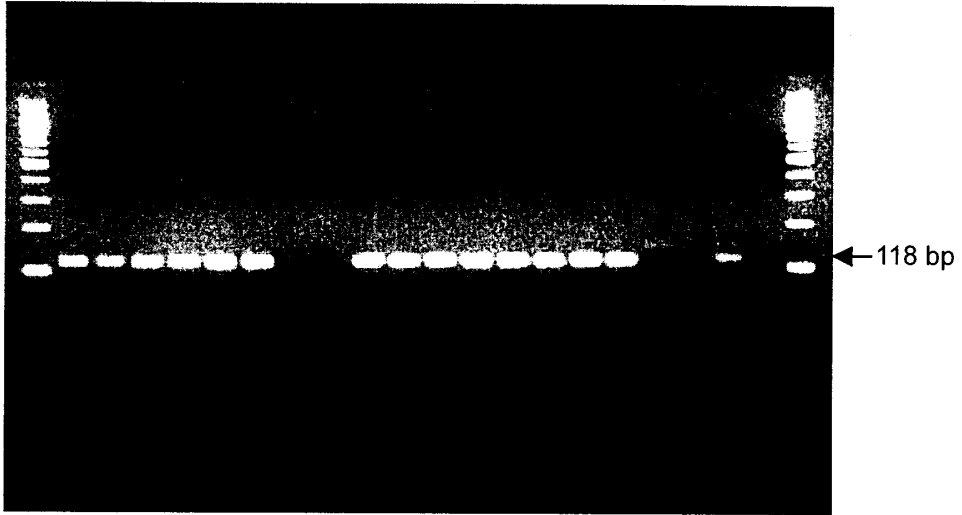
No.	Sample name
1	Chichen nugget 1
2	Chichen nugget 2
3	Baby ham 1
4	Baby ham 2
5	Sausage (H) 1
6	Sausage (H) 2
7	White sausage 1
8	White sausage 2
9	Sausage (A) 1
10	Sausage (A) 2
11	Sliced ham 1
12	Sliced ham 2
13	FrankFruite sausage 1
14	FrankFruite sausage 2
15	Ham (RH) 1
16	Ham (RH) 2
17	Ham (CT) 1
18	Ham (CT) 2
19	Ham (10%) 1
20	Ham (10%) 2
21	Ham (15%) 1
22	Ham (15%) 2
23	Ham (20%) 1
24	Ham (20%) 2
25	Tanchaushau 1
26	Tanchaushau 2
27	Uhsian 1
28	Uhsian 2
29	Dahsi 1
30	Dahsi 2
31	GM (RRS) 1
32	GM (RRS) 2
33	nonGM 1
34	nonGM 2
35	negative(no DNA)
36	negative(no primer)
37	positive(Plasmid)

附件二十七

QIAGEN Genomic-tip 20/G Kit 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳圖結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M

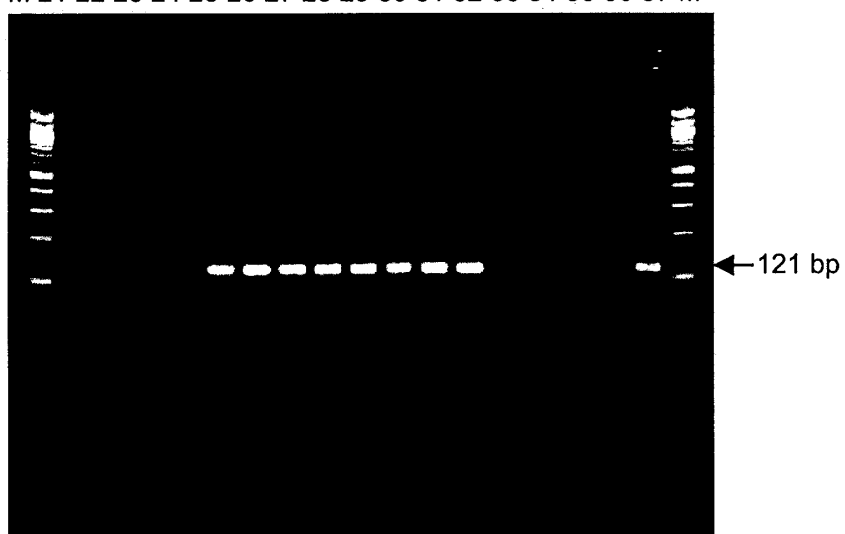


RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M

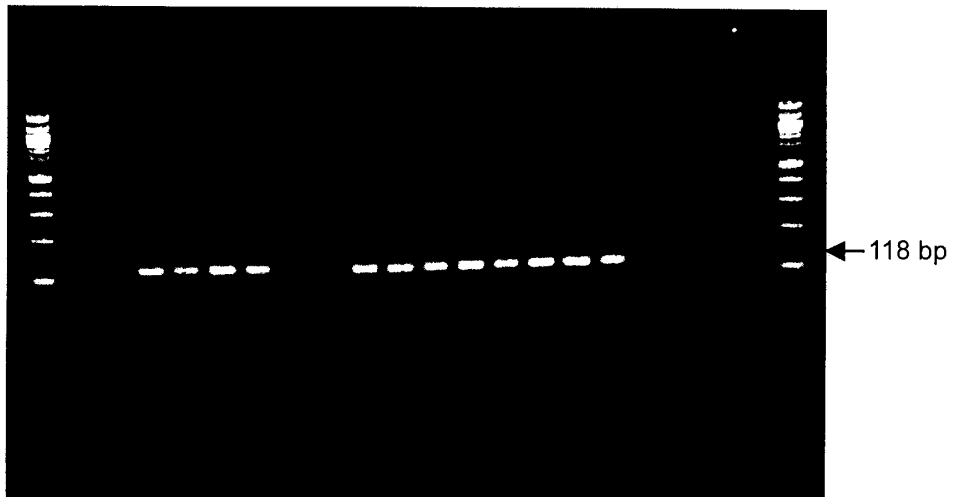


附件二十八

CTAB 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳圖結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M

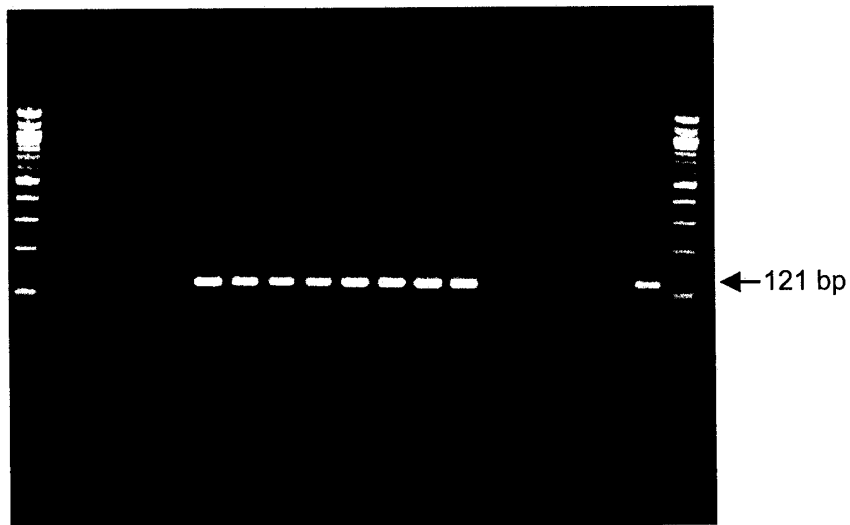


RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



附件二十九

重新 Maxi+CTAB

BECKMAN DU-7000

Date: 03/08/21
Time: 09:42

DNA/Oligo Quant

ReadSamples RawData Method SaveClear Print Quit

Results file: A:\WORK_RES

Method name: A:\DEFAULT

Assay type: 260/230 & 260/280 Ratios & Conc. Background corr: [Yes] 320.0nm

Sampling device: None

Pathlength: 1.0000 cm

Read average time: 0.50 sec

Conc. factor: 50.000 at 260.0nm ↓ ↑

Sample ID	Net Abs 230.0nm	Net Abs 260.0nm	Net Abs 280.0nm	260.0/230.0	260.0/280.0	Dil Fact.	Conc.
4 X	0.0585	0.0207	0.0109	0.35379	1.90216	10.000	10.3475
5	0.0377	0.0043	0.0008	0.11434	5.74129	10.000	2.1563
9	0.0265	0.0062	0.0025	0.23218	2.47724	10.000	3.0810
1	0.0933	0.1324	0.0714	1.41919	1.85518	10.000	66.1971
5	0.0431	0.0274	0.0143	0.63681	1.92294	10.000	13.7242
11	0.0443	0.0274	0.0141	0.61760	1.93802	10.000	13.6936
12	0.0794	0.0909	0.0494	1.14402	1.83961	10.000	45.4418
14	0.0626	0.0530	0.0271	0.84610	1.95454	10.000	26.4911
16	0.1574	0.1603	0.0885	1.01841	1.81211	10.000	80.1547
10						10.000	

Date 2003/8/22

Maxi+CTAB

PCR用DNA溶液: 10 ng/μL

Sample	粉砕日	Extraction method	抽出日	試料量	ε230	ε260	ε280	ε260/ε230	ε260/ε280	希釈倍率	(DNA) ng/μL	(DNA) μL	TE μL	作製量
M+C-1	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.5338	0.6480	0.3635	1.214	1.7827	10	324.00	1.235	38.765	40
M+C-2	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.6323	0.5525	0.3164	0.874	1.7462	10	276.25	1.086	28.914	30
M+C-3	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.3774	0.3971	0.2241	1.052	1.7720	10	198.55	1.511	28.489	30
M+C-4	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.0662	0.0394	0.0224	0.595	1.7589	10	19.70	15.228	14.772	30
M+C-5	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0377	0.0043	0.0008	0.114	5.3750	10	2.15	15.000	0.000	15
M+C-6	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.1191	0.2472	0.1361	2.076	1.8163	10	123.60	2.427	27.573	30
M+C-7	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.1977	0.3249	0.1792	1.643	1.8131	10	162.45	1.847	28.153	30
M+C-8	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月14日	1g	0.0819	0.1249	0.0679	1.525	1.8395	10	62.45	4.804	25.196	30
M+C-9	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0265	0.0062	0.0025	0.234	2.4800	10	3.10	15.000	0.000	15
M+C-10	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0933	0.1324	0.0714	1.419	1.8543	10	66.20	4.532	25.468	30
M+C-11	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0443	0.0274	0.0141	0.619	1.9433	10	13.70	21.898	8.102	30
M+C-12	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0794	0.0909	0.0494	1.145	1.8401	10	45.45	6.601	23.399	30
M+C-13	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月15日	1g	0.0272	0.0612	0.0333	2.250	1.8378	10	30.60	9.804	20.196	30
M+C-14	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.0626	0.0530	0.0271	0.847	1.9557	10	26.50	11.321	18.679	30
M+C-15	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月15日	1g	-0.0204	0.0778	0.0437	-3.814	1.7803	10	38.90	7.712	22.288	30
M+C-16	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月21日	1g	0.1574	0.1603	0.0885	1.018	1.8113	10	80.15	3.743	26.257	30
M+C-17	8月5日	DNeasy Plant Maxi kit+CTAB	8月15日	1g	0.1329	0.2326	0.1282	1.750	1.8144	10	116.30	2.580	27.420	30
									#DIV/0!		0.00	#DIV/0!	#DIV/0!	

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	1078 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	1078
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	647
total				2800 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL.

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 85 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	1306.875 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	552.5 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	10.625 μL
total		22 μL	1870 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 40 tubes
Master Mix A		22 μL	880 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
total		22.5 μL	900 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 40 tubes
Master Mix A		22 μL	880 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	10 μL
total		22.5 μL	900 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).

Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

	for 1 tube
for negative control#2(no primer)	
Master Mix A	22 μL
Sterilized ultra pure water	0.5 μL
Template DNA (positive control)	2.5 μL
total	25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

Maxi+CTAB	
No.	Sample name
1	Chichen nugget 1
2	Chichen nugget 2
3	Baby ham 1
4	Baby ham 2
5	Sausage (H) 1
6	Sausage (H) 2
7	White sausage 1
8	White sausage 2
9	Sausage (A) 1
10	Sausage (A) 2
11	Sliced ham 1
12	Sliced ham 2
13	FrankFruite sausage 1
14	FrankFruite sausage 2
15	Ham (RH) 1
16	Ham (RH) 2
17	Ham (CT) 1
18	Ham (CT) 2
19	Ham (10%) 1
20	Ham (10%) 2
21	Ham (15%) 1
22	Ham (15%) 2
23	Ham (20%) 1
24	Ham (20%) 2
25	Tanchaushau 1
26	Tanchaushau 2
27	Uhsian 1
28	Uhsian 2
29	Dahsi 1
30	Dahsi 2
31	GM (RRS) 1
32	GM (RRS) 2
33	nonGM 1
34	nonGM 2
35	negative(no DNA)
36	negative(no primer)
37	positive(Plasmid)

大豆抽出DNAの阻害確認

Sample	塩添加	測定値(コピー数)				相対値(コピー数)			
		260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値	260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値
Soy2回目-1	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
Soy2回目-2	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
Soy3回目-1	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
Soy3回目-2	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20

結果
*阻害物質のLe1値と比較したところ自立した阻害は認められない
*2回目抽出2試料ではLe1が高めで、RRSが低めで、結果的に相対値に相入率が低く出ている可能性がある
塩添加抽出物の阻害確認(MILLIPORE社MICROCON)による定量への影響

Sample	塩添加	測定値(コピー数)				相対値(コピー数)			
		260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値	260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値
Soy2回目	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
Soy3回目	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20

結果
*阻外抽出によりDNA中のLe1、RRSの相対値が増加する。その傾向は相対分子量が大きいほど大きい
*阻外抽出により求められる分子重量を増加していない場合に加えて
参考:他機関での分析値

分析機関	相入率	測定値(コピー数)				相対値(コピー数)			
		260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値	260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値
食品分析七	1%	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	5%	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
食研院	1%	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20
	5%	1.81	1.81	2469.12	610.20	1.81	1.81	2469.12	610.20

結果
*ばらつきは大きいのが全体的にコピー数に低めになっている
*上に表示していないのが5-60抽出のコピー数より低い

塩添加による比較

Sample	塩添加	測定値(コピー数)				Log2相対値	P値	相対値
		260/230	260/280	濃度(ng/μL)	Le1値			
Maize	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.106	0.28	0.39
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.106	0.28	0.39
Soy	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39
Soy 2回目	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39
Soy 3回目	+	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39
	-	1.81	1.81	2469.12	610.20	-1.201	0.005	0.39

結果
*Maizeは塩添加により相入率に有意差無し、Soyは有意差あり
*Soyは塩添加の場合Le1、RRSのコピー数が半分以上
*Soyは塩添加の場合260/230の低いものが多いが、高い場合でもLe1コピー数は変わらない

1) 内標比

試料：各 GMO を 12g、ロータースピードミルで粉碎し、1g×3 点 Maxi kit で抽出し、阻害を
 認後、定量した。阻害が認められるものは再抽出を行った。

定量 PCR：サンプル#1～3 を 2 人で各 3 回反復した。

統計処理：スミルノフ・グラブス検定で外れ値をはじいた後、F 検定及び t 検定を行った。

●MON863

Table 1 MON863 の内標比(ABI PRISM 7700 及び 7000)

		標 名		ABI PRISM 7700	
		Target		MON863	
		P/P-mix		MON863c5-2	
		Target/SSD _b	各runのS.D.	Target/SSD _b	各runのS.D.
run1	#1	0.526853014	0.0094898	0.510377406	0.0299137
	#2	0.533077766		0.502110459	
	#3	0.514437726		0.55755904	
run2	#1	0.587013716	0.0254832	0.675906225	0.0223438
	#2	0.538539857		0.593345133	
	#3	0.54926503		0.620257755	
run3	#1	0.561714956	0.02080475	0.505645894	0.0215489
	#2	0.523823756		0.54831814	
	#3	0.55765915		0.538326775	
平均		0.54359122		0.54956291	
S.D.		0.022440846		0.041115214	
検定値 = 0.54679					
α = 0.05, 自由度 = 各8					
全体のF値 = 3.29776564		≤	4.433	等分散でないとはいえない	
P = 0.05669545		>	0.025	等分散でないとはいえない 両側検定	
T値 = 0.4081501		≤	2.12	有意差があるとはいえない	
P値 = 0.68957335		>	0.05	有意差があるとはいえない	
		>	0.01	有意差があるとはいえない	
			臨界値 = 2.12	α = 0.05, 自由度 = 16	
			臨界値 = 2.921	α = 0.01, 自由度 = 16	
MON863の内標比 = 0.55					

<ABI PRISM 7700>

2 人のデータの分散は等分散 (P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はない。

内標比は、0.55 であった。今後は、疑似混入試料を測定し、内標比 0.55 が妥当かどうか確認する予定である。

		標 名		ABI PRISM 7000	
		Target		MON863	
		P/P-mix		MON863c5-2	
		Target/SSD _b	各runのS.D.	Target/SSD _b	各runのS.D.
run1	#1	0.517542073	0.12568567	0.691760838	0.0502137
	#2	0.303336763		0.834719914	
	#3	0.524359245		0.59165837	
run2	#1			0.523244729	0.0258515
	#2			0.473888129	
	#3			0.511836402	
run3	#1	0.545700386	0.08535414	0.594098437	0.0108011
	#2	0.468902649		0.573040452	
	#3	0.639333974		0.587742219	
平均		0.507716143		0.57574385	
S.D.		0.16355114		0.065347827	
検定値 = 0.541346					
α = 0.05, 自由度 = 各8					
全体のF値 = 2.79371849		≤	4.433	等分散でないとはいえない	
P = 0.083767255		>	0.025	等分散でないとはいえない 両側検定	
T値 = 1.56707757		≤	2.12	有意差があるとはいえない	
P値 = 0.13205815		>	0.05	有意差があるとはいえない	
		>	0.01	有意差があるとはいえない	
			臨界値 = 2.12	α = 0.05, 自由度 = 16	
			臨界値 = 2.921	α = 0.01, 自由度 = 16	
MON863の内標比 =					

<ABI PRISM 7000>

左の run2 が NTC cross しており、参考値である。(再試験の予定)

2 人のデータの分散は等分散 (P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はない。

内標比は、0.54 であった。再試験の後、疑似混入試料を測定し、内標比 0.54 が妥当かどうか確認する予定である。

(※ 7000 の左の run2 は NTC cross しており、参考値)

●NK603

・複数粒粉砕試料の内標比

<ABI PRISM 7700>

2人のデータの分散は等分散(P=0.05、両側検定)であった。P=0.05、両側検定で有意差があったが、P=0.01、両側検定で有意差がなかった。

内標比は、0.53(*)であった。今後は、疑似混入試料を測定し、内標比 0.53(*)が妥当かどうかを確認する予定である。

<ABI PRISM 7000>

スミルノフ・グラブス検定で左のrun3、サンプル1 (taget / SSIb = 0.240) が外れ値となった。

2人のデータの分散は等分散(P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はない。

内標比は、0.51 であった。今後は、疑似混入試料を測定し、内標比 0.51 が妥当かどうかを確認する予定である。

Table 2 NK603 の内標比(ABI PRISM 7700 及び 7000)

機 種 名		ABI PRISM 7700							
Target		NK603							
P/P-mix		NK603u							
	Target/SSIb	各runのS.D	サンプルID	Target/SSIb	各runのS.D	サンプルID			
run1	#1	0.459113267	0.02711934	0.05669	0.558744154	0.0382039	#1		
	#2	0.50584439						0.511706521	0.0222202
	#3	0.458635002						0.58737129	
run2	#1	0.486977158	0.0085801	0.03491	0.56989905	0.0168674	#2		
	#2	0.502785354						0.565177453	0.026788
	#3	0.500683115						0.538610705	
run3	#1	0.56822415	0.02301993	0.034352	0.527099401	0.0088272	#3		
	#2	0.564722371						0.535530656	0.035674
	#3	0.526717077						0.517882135	
平均	0.505126376			0.545780152					
S.D	0.0396036			0.025740522					
				検平均 = 0.526084					
				α = 0.05, 自由度 = 各8					
全体のF値 = 2.36743673		≤ 4.433		等分散でないとはいえない					
P = 0.122131059		> 0.025		等分散でないとはいえない 両側検定					
T値 = 2.38761436		> 2.12		有意差あり(*)					
P値 = 0.02964047		≤ 0.05		有意差あり(*)					
		> 0.01		有意差があるとはいえない(*)					
		臨界値 = 2.12		α = 0.05, 自由度 = 16					
		臨界値 = 2.921		α = 0.01, 自由度 = 16					
NK603の内標比 = 0.53 (*)									

機 種 名		ABI PRISM 7000							
Target		NK603							
P/P-mix		NK603u							
	Target/SSIb	各runのS.D	サンプルID	Target/SSIb	各runのS.D	サンプルID			
run1	#1	0.516693139	0.05627735	0.014653	0.514560231	0.04806	#1		
	#2	0.518480964						0.422545179	0.046123
	#3	0.615049983						0.49261951	
run2	#1	0.537415312	0.04129265	0.07032	0.565529729	0.0506769	#2		
	#2	0.52935703						0.553944134	0.026792
	#3	0.462205488						0.47253723	
run3	#2	0.545351415	0.14780358	0.096586	0.473460565	0.0454364	#3		
	#3	0.436325581						0.390013269	0.015165
		0.240:run3の#1を棄却						0.462894891	
平均	0.532609980			0.433122746					
S.D	0.06651931			0.056831624					
				検平均 = 0.507866					
				α = 0.05					
全体のF値 = 1.51361		≤ 3.500460386		等分散でないとはいえない					
P = 0.286072992		> 0.025		等分散でないとはいえない 両側検定					
T値 = 1.60949363		≤ 2.131450856		有意差があるとはいえない					
P値 = 0.12834769		> 0.05		有意差があるとはいえない					
		> 0.01		有意差があるとはいえない					
		臨界値 = 2.131450856		α = 0.05, ν = 16					
		臨界値 = 2.948725454		α = 0.01, ν = 16					
NK603の内標比 = 0.51									

・複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料の内標比の比較

複数粒粉碎物の内標比と一粒粉碎物(mini kit)の内標比の比較を行った。(Table 3)

2人のデータと一粒の分散は等分散(P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はなかった。

Table 3 NK603の内標比の比較(複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料)

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		NK603	
P/P-max		NK603u	
複数粒	Target: SS1b	一粒	Target: SS1b
#1	0.459113267	#1	0.542127552
#2	0.50564439	#2	0.509959355
#3	0.456635032	#3	0.57828414
#4	0.486977152	#4	0.54267564
#5	0.502765354	#5	0.539520937
#6	0.500663115	#6	0.493973291
#7	0.56822415	#7	0.522937949
#8	0.564722371	#8	0.548272271
#9	0.526717077		
F均	0.506186676		0.534797642
S.D	0.03960561		0.025773746
F値 = 2.367339034		α = 0.05, ν = 15 両側検定	
P = 0.12569029 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 1.67035822 ≤		2.064 有意差があるとはいえない	
P = 0.12664103 >		0.05 有意差があるとはいえない	
		0.01 有意差があるとはいえない	
		α = 0.05, ν = 15	
総平均 = 0.521492			

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		NK603	
P/P-max		NK603u	
複数粒	Target: SS1b	一粒	Target: SS1b
#1	0.550744154	#1	0.542127552
#2	0.511705521	#2	0.509959355
#3	0.50737129	#3	0.57828414
#4	0.56989906	#4	0.54267564
#5	0.565177453	#5	0.539520937
#6	0.538610705	#6	0.493973291
#7	0.527099431	#7	0.522937949
#8	0.535530656	#8	0.548272271
#9	0.517882135		
F均	0.545780152		0.534797642
S.D	0.025740532		0.025773746
F値 = 1.02582395		α = 0.05, ν = 15 両側検定	
P = 0.53399571 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 0.90631403 ≤		2.064 有意差があるとはいえない	
P = 0.39403471 >		0.05 有意差があるとはいえない	
		0.01 有意差があるとはいえない	
		α = 0.05, ν = 15	
総平均 = 0.540289			

●T25

・複数粒粉碎試料の内標比

<ABI PRISM 7700>

2人のデータの分散は等分散(P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はない。

内標比は、0.39 (旧 Plasmid では 0.34 [栗原 食衛学会 2003.5])であった。今後は、疑似混入試料を測定し、内標比 0.39 が妥当かどうか確認する予定である。

<ABI PRISM 7000>

左の run2 が NTC cross しており、参考値である。(再試験の予定)2人のデータの分散は等分散(P=0.05、両側検定)でないので、Welch の方法で有意差検定を行った。有意差(P=0.05、両側検定)はない。

内標比は、0.44 (旧 Plasmid では 0.40 [栗原 食衛学会 2003.5])であった。再試験の後、疑似混入試料を測定し、内標比が妥当かどうか確認する予定である。

Table 4 T25 の内標比(ABI PRISM 7700 及び 7000)

		ABI PRISM 7700						
		Target		T25new		T25c5		
		P/P-mix						
		Target/SSlb	各runのS.D	サンプル数	Target/SSlb	各runのS.D	サンプル数	
run1	#1	0.368320871	0.03337168	#1	0.351175818	0.0247457	#1	
	#2	0.430633574			0.399224827			0.017809
	#3	0.420150782			0.385471844			
run2	#1	0.351223815	0.03268068	#2	0.37324523	0.0661449	#2	
	#2	0.336963939			0.350343059			0.025628
	#3	0.399298351			0.474630558			
run3	#1	0.373584859	0.03866263	#3	0.386420964	0.0359266	#3	
	#2	0.376868456			0.388138452			0.04597
	#3	0.442131892			0.449468613			
平均		0.365799704			0.395348796		総平均 = 0.392074	
S.D		0.036366495			0.041722812			
		全体のF値 = 1.31612304		≤	4.433	等分散でないとはいえない		
		P = 0.353466288		>	0.025	等分散でないとはいえない 両側検定		
		T値 = 0.35497371		≤	2.12	有意差があるとはいえない		
		P値 = 0.72724516		>	0.05	有意差があるとはいえない		
				>	0.01	有意差があるとはいえない		
					臨界値 = 2.12	α = 0.05, 自由度 = 各8		
					臨界値 = 2.921	α = 0.01, 自由度 = 18		
T25newの内標比 = 0.39								

		ABI PRISM 7000						
		Target		T25new		T25c5		
		P/P-mix						
		Target/SSlb	各runのS.D	サンプル数	Target/SSlb	各runのS.D	サンプル数	
run1	#1	0.40773147	0.10806118	#1	0.461133175	0.0091358	#1	
	#2	0.338851628			0.475688763			0.015632
	#3	0.550540455			0.477975821			
run2	#1	0.479875922	0.07758492	#2	0.430046827	0.0126197	#2	
	#2	0.363179179			0.445688902			0.038434
	#3	0.510097635			0.455020141			
run3	#1			#3	0.442705172	0.0533025	#3	
	#2				0.39940052			0.025231
	#3				0.505415111			
平均		0.432712152			0.45478717		総平均 = 0.44375	
S.D		0.072533528			0.030590943			
		全体のF値 = 5.62201361		>	4.433	等分散でない		
		P = 0.012399125		≤	0.025	等分散でない 両側検定		
		T値(Welchの方法) = 0.84126811		≤	2.23	有意差があるとはいえない		
		P値 = 0.41985979		>	0.05	有意差があるとはいえない		
				>	0.01	有意差があるとはいえない		
					臨界値 = 2.228139238	α = 0.05, 内8 10.76		
					臨界値 = 3.189261618	α = 0.01, 内8 10.76		
T25newの内標比 =								

(※ 7000 の左の run3 は NTC cross しており、参考値)

複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料の内標比の比較

複数粒粉碎物の内標比と一粒粉碎物(mini kit)の内標比の比較を行った。(Table 5)

2人のデータと一粒の分散は等分散(P=0.05、両側検定)であり、有意差(P=0.05、両側検定)はなかった。

Table 5 T25 の内標比の比較(複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料)

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		T25new	
P/P-mix		T25c5	
複数粒	Target SS:lb	一粒	Target SS:lb
#1	0.358320871	#1	0.387503477
#2	0.430653574	#2	0.363641614
#3	0.420150752	#3	0.4290212
#4	0.351223615	#4	0.400450551
#5	0.336963939	#5	0.422028643
#6	0.399299351	#6	0.425057389
#7	0.373584059	#7	0.456833116
#8	0.376868456	#8	0.416339984
#9	0.442131892		
平均	0.388799734		0.412635785
S.D.	0.036368455		0.028422962
		検平均 = 0.400703	
F値 = 1.637238611		α = 0.05, ν = 15 両側検定	
P = 0.26041163 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 1.53795956 ≤		2.064 有意差があるとはいえない	
P = 0.15717805 >		0.05 有意差があるとはいえない	
		0.01 有意差があるとはいえない	
		α = 0.05, ν = 15	

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		T25new	
P/P-mix		T25c5	
複数粒	Target SS:lb	一粒	Target SS:lb
#1	0.351175672	#1	0.387503477
#2	0.399224027	#2	0.363641614
#3	0.354718444	#3	0.4290212
#4	0.37024523	#4	0.400450551
#5	0.350343059	#5	0.422028643
#6	0.474630550	#6	0.425057389
#7	0.386420964	#7	0.456833116
#8	0.380138452	#8	0.416339984
#9	0.449488613		
平均	0.395348796		0.412635785
S.D.	0.041122612		0.028422962
		検平均 = 0.400703	
F値 = 2.154007466		α = 0.05, ν = 15 両側検定	
P = 0.15292271 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 1.01518448 ≤		2.064 有意差があるとはいえない	
P = 0.34122278 >		0.05 有意差があるとはいえない	
		0.01 有意差があるとはいえない	
		α = 0.05, ν = 15	

●TC1507

・複数粒粉碎試料の内標比

<ABI PRISM 7700>

スミルノフ・グラブス検定で左の run2、サンプル 2 (taget / SSIb = 0.453) が外れ値となった。2人のデータの分散は等分散(P=0.05、両側検定)であった。P=0.05、両側検定で有意差があったが、P=0.01、両側検定で有意差がなかった。

内標比は、0.29 (*)であった。また、TC1507 T1S1(F2 種子)の複数粒の内標比は、0.353 (n=1)であった。

Table 6 TC1507 の内標比(ABI PRISM 7700)

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		TC1507	
P/P-mix		cry1F014-ORF011	
	Target/SSIb	各runのS.D.	各runのS.D.
run1	#1 0.329384952 #2 0.330496112 #3 0.335665325	0.00335158	0.027673
run2	#1 0.305800336 #2 0.328855172	0.01708005	0.032329
run3	#1 0.243295016 #2 0.274232157 #3 0.273198144	0.01757068	0.044171
0.453:run2の#3を棄却			
平均	0.302753432		0.272636293
S.D.	0.034915351		0.022349636
		ν = 7	ν = 8
全体のF値 = 2.44058427		≤ 3.500460366	等分散でないとはいえない
P = 0.117302051		> 0.025	両側検定
T値 = 2.14438519		> 2.131450856	有意差あり(*)
P値 = 0.04879112		≤ 0.05	有意差あり(*)
		> 0.01	有意差があるとはいえない(*)
		臨界値 = 2.131450856	α = 0.05, ν = 15
		臨界値 = 2.946726454	α = 0.01, ν = 15
TC1507の内標比 = 0.29 (*)			

・Probe の 2 ロットの比較

Table 7 TC1507 Probe の 2 ロットの比較(ABI PRISM 7700)

機器名		ABI PRISM 7700	
現在通常使用しているProbe			
	SS II b	TC1507	TC1507/SSIIb
#1	25638.70	7044.03	0.275
#2	24048.40	6617.18	0.275
#3	24651.20	6846.75	0.278
平均 0.276			
太田さんが新系統Plasmidの検出に使用したProbe			
	SS II b	TC1507	TC1507/SSIIb
#1	25638.70	7579.69	0.296
#2	24048.40	7162.83	0.298
#3	24651.20	7154.67	0.290
平均 0.295			

低い内標比の原因が Probe のロット不良かどうかを確認するために、1 plate 上で 2 ロットの TC1507 Probe をもちいて、同一サンプルの定量を行った。

2 ロット共に内標比が 0.33 以下であり、Probe のロット不良が原因とは考えにくい。

※ TC1507 には 64 粒確認して 1 粒の nonGMO がコンタミしている。GM 種子の純度Qの推定範囲(危険率 5%)は、95% ≤ Q ≤ 101%となる。この時、混入率の値が、0~5%高めにでる。(内標比が 0~5%低くなる)

・複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料の内標比の比較

複数粒粉碎物の内標比と一粒粉碎物(mini kit)の内標比の比較を行った。(Table 8)

複数粒の内標比は 0.29 で、一粒の内標比は 0.38 であり、明らかに複数粒の内標比が低い。

2 人のデータと一粒の分散は等分散(P=0.05、両側検定)であったが、共に P=0.05 及び 0.01、両側検定で有意差があった。

なぜ、複数粒と一粒の内標比が有意に違うのか、原因不明である。

Table 8 TC1507 の内標比の比較(複数粒粉碎試料と一粒粉碎試料)

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		TC1507	
P/P-mix		cry1F014-ORF011	
複数粒	Target SS1b	一粒	Target SS1b
#1	0.29384952	#1	0.352219594
#2	0.330495112	#2	0.371651
#3	0.335665325	#3	0.369507184
#4	0.305800336	#4	0.399756357
#5	0.329955172	#5	0.423035708
#6	0.243295016	#6	0.368024528
#7	0.274232157	#7	0.392260971
#8	0.273199144	#8	0.354120636
平均	0.302753432		0.376827072
SD	0.024915361		0.024341376
F値 = 2.057567054		α = 0.05, ν = 14 両側検定	
P = 0.16824929 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 5.23278871 >		2.064 有意差あり	
P = 0.00017557 >		0.05 有意差あり(*)	
		0.01 有意差あり(**)	
		α = 0.05, ν = 14	

機器名		ABI PRISM 7700	
Target		TC1507	
P/P-mix		cry1F014-ORF011	
複数粒	Target SS1b	一粒	Target SS1b
#1	0.2742361749	#1	0.352219594
#2	0.22818112	#2	0.371651
#3	0.258458437	#3	0.369507184
#4	0.253270692	#4	0.399756357
#5	0.253663158	#5	0.423035708
#6	0.274645949	#6	0.368024528
#7	0.262521103	#7	0.392260971
#8	0.300702904	#8	0.354120636
#9	0.267409529		
平均	0.272538289		0.376827072
SD	0.022349606		0.024341376
F値 = 1.196150537		α = 0.05, ν = 15 両側検定	
P = 0.43237649 >		0.025 等分散でないとはいえない	
T値 = 9.68670443 >		2.064 有意差あり	
P = 1.1535E-07 >		0.05 有意差あり(*)	
		0.01 有意差あり(**)	
		α = 0.05, ν = 15	

・疑似混入試料の測定

疑似混入試料：M863、NK603、TC1507 及び T25 の 4 系統(内標比測定用と同じ粉碎物)が、non-GMO(QTI 2001 年)に各 0、0.1、0.5、1、3、5 及び 10%混入するように、50 mL チューブに総重量 1 g(0.1%と 0.5%は 2 g)となるように混合し、その全量を抽出に供した。(0.1%と 0.5%は、遠心後の AP1 の上澄みを 2 等分した) 阻害確認後、定量に使用した。

内標比 0.29 を用いて妥当な定量値(corr. 0.995)が得られた。定量下限は、0.5%であった。また、得られた raw copy unit 数から、逆算した内標比は 0.29 であり、内標比測定試験の結果と同じ値であった。

Table 9 疑似混入試料の測定(TC1507 系統)

1回目	SS II b	TC1507	混入率	2回目	SS II b	TC1507	混入率
0%-1	28592.01	0.00	0	0%-1	27738.88	0.00	0.000
0.1%-1	22999.42	3.92	0.059	0.1%-1	22029.72	9.34	0.144
0.5%-1	18558.82	27.30	0.507	0.5%-1	19933.77	26.48	0.458
1.0%-1	21718.21	57.15	0.907	1.0%-1	21045.84	74.85	1.226
3.0%-1	26387.62	216.59	2.631	3.0%-1	29366.74	277.51	3.259
5.0%-1	25944.51	330.13	4.388	5.0%-1	25131.60	378.02	5.187
10.0%-1	19878.48	614.53	10.660	10.0%-1	22432.67	746.52	11.475

	混入率 (内標比 0.29)			内標比の推定値			備考
	run 1	run 2	平均	run 1	run 2	平均	
0.0%	0.000	0.000	0.00	0.170	0.418	0.29	20 copy unit 以下
0.1%	0.059	0.144	0.10	0.294	0.266	0.28	
0.5%	0.507	0.458	0.48	0.263	0.356	0.31	
1.0%	0.907	1.226	1.07	0.254	0.315	0.28	
3.0%	2.631	3.259	2.94	0.254	0.301	0.28	
5.0%	4.388	5.187	4.79	0.309	0.333	0.32	
10.0%	10.660	11.475	11.07	疑似混から推定される内標比		0.29	

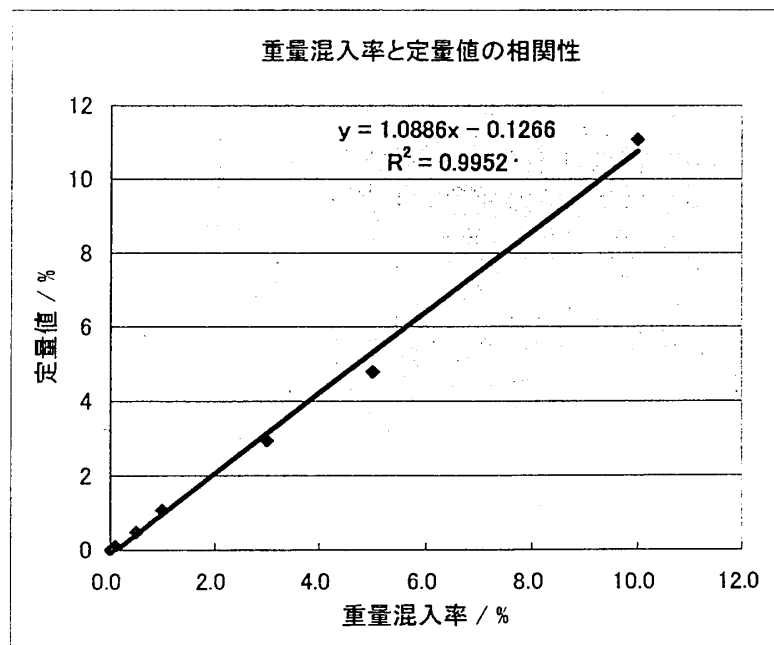


Figure 1 重量混入率と定量値の相関性

2) NTC 変更検討

方法：定量の際に、3 種類の NTC(colE1、TE 及び滅菌水)を使用し、Threshold Line 決定表上に各 NTC を記録・比較する。

検討を開始して以降、1 度も Rox Dropping が起こっていないため、Dropping が起きた際に TE 及び滅菌水がどのような Amplification Plot を示すかは不明である。

Rox Dropping が起こらない場合で、かつ Background として NTC が最後まで見える際には、colE1、TE 及び滅菌水に差は見られない。(Figure 2)

今後も、検討していく予定である。

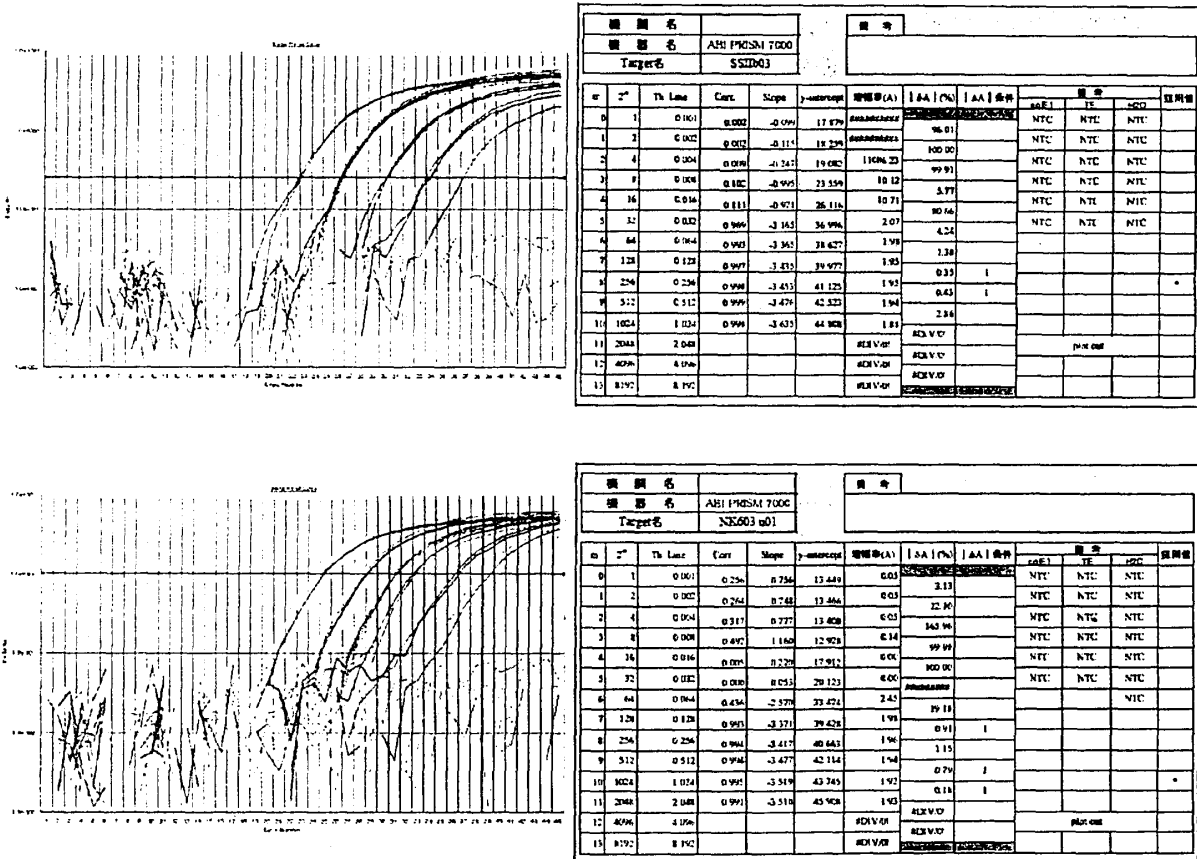
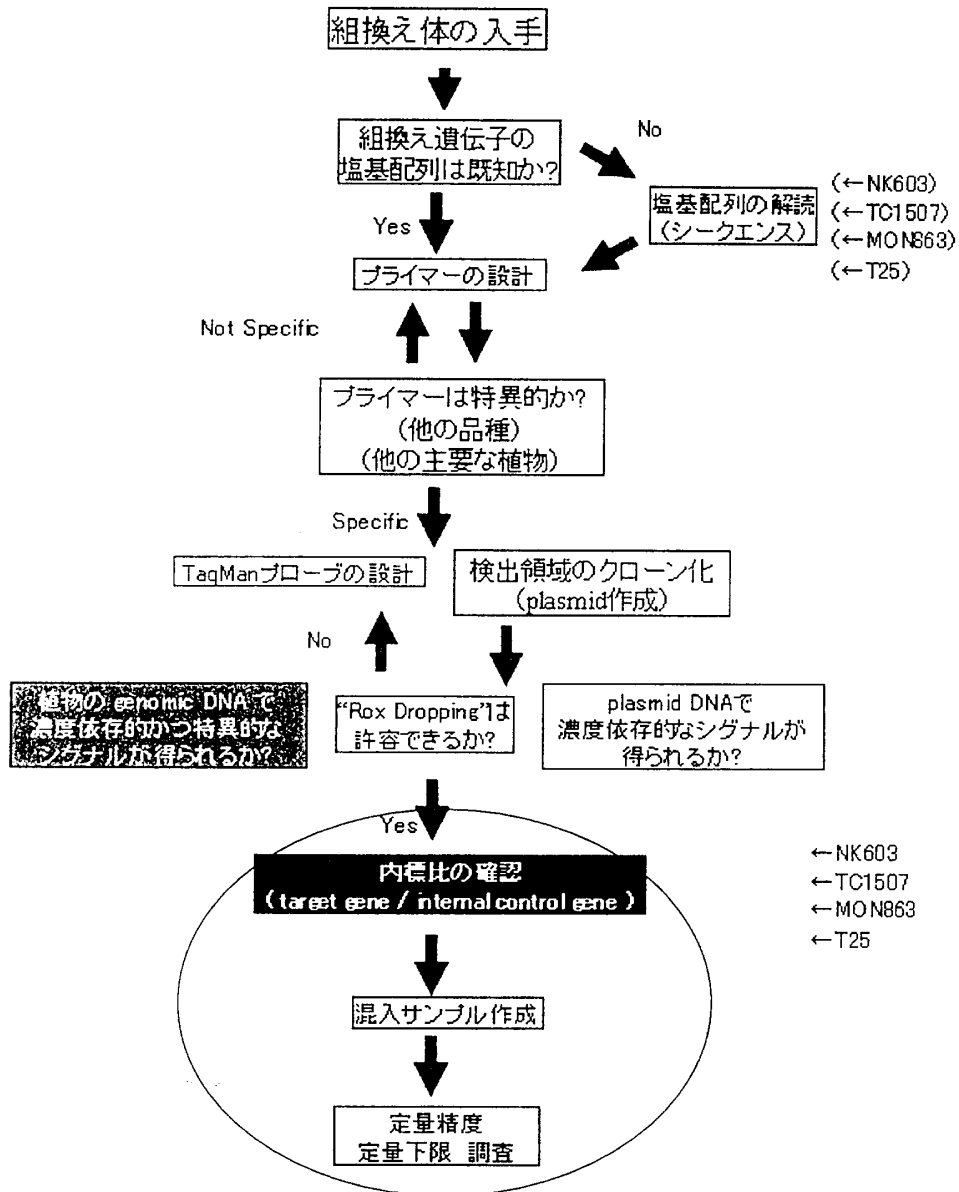


Figure 2 3 種類の NTC(colE1、TE 及び滅菌水)の比較

3)現在のステータス

内標比確認及び定量精度・定量下限調査

Scheme for Developing Protocol “GM Quantification Analysis”

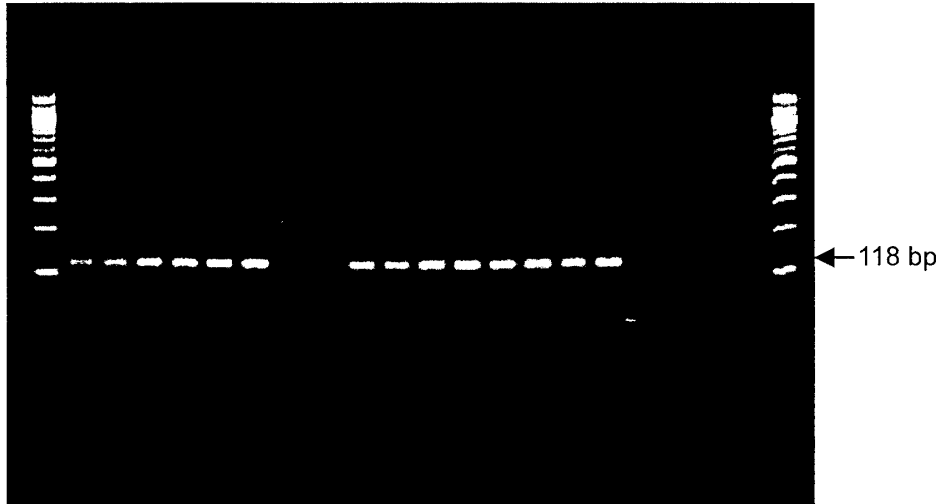


附件三十五

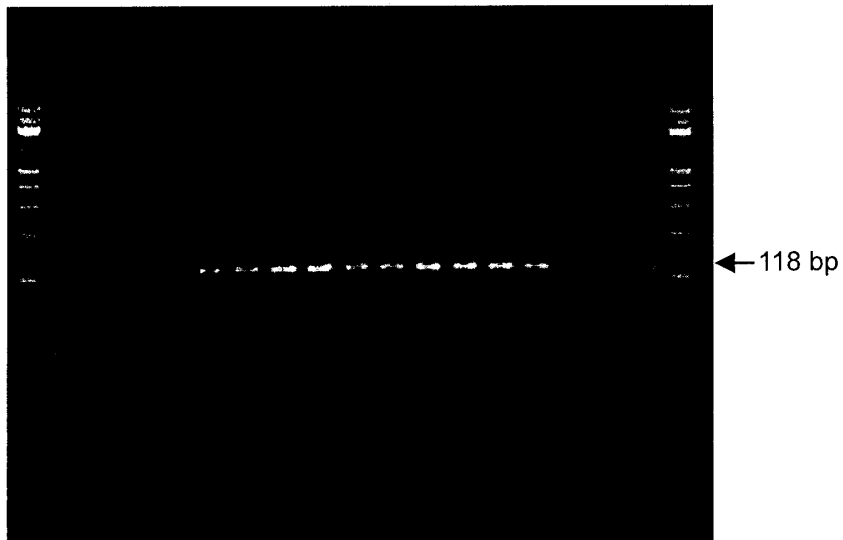
QIAGEN DNeasy Maxi Kit+CTAB 法抽出之 DNA 進行定性 PCR 之電泳圖
結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

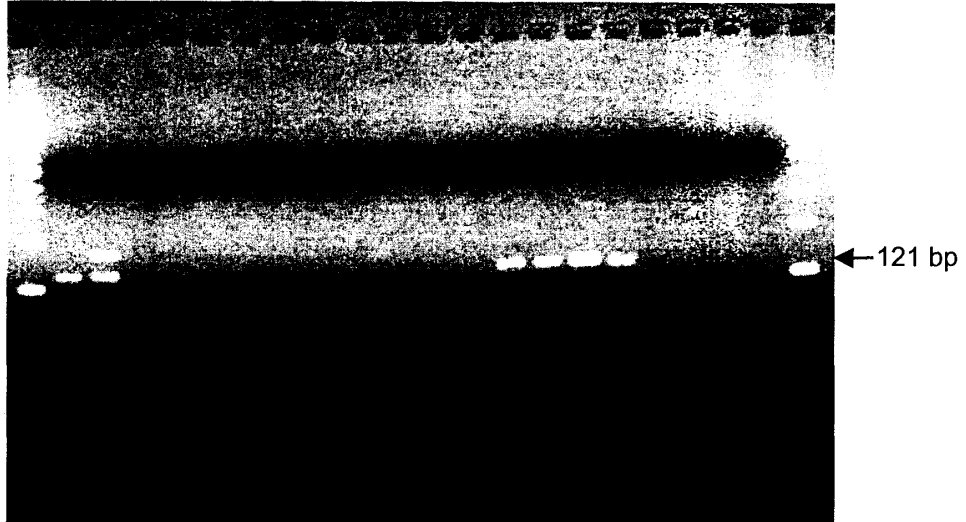


M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



**Study on the Qualitative PCR to
Detect the Presence of GMO in
Animal-derived and
Soybean-derived Products**

Hsieh, Pei-Chun

2003. 8. 4-25

Food Microbiology Division

Bureau of Food and Drug Analysis

Department of Health, Executive Yuan,

R.O.C

A. Materials

ID	Sample name	Information
1	Chicken nugget	Market
2	Baby ham	Market
3	Sausage (H)	Market
4	White sausage	Market
5	Sausage (A)	Prima Ham Company
6	Sliced ham	Prima Ham Company
7	FrankFruite sausage	Prima Ham Company
8	Ham (RH)	Prima Ham Company
9	Ham (CT)	Prima Ham Company
10	Ham (10%)	Prima Ham Company
11	Ham (15%)	Prima Ham Company
12	Ham (20%)	Prima Ham Company
13	德昌炭燒角豆乾	Market
14	德昌五香豆乾	Market
15	德昌大溪五香豆乾	Market
16	RRS powder	Positive control
17	Non-GM soybean powder	Negative control

All samples in this study content soy protein

B. Methods

1. DNA Extraction

- a. QIAgen Dneasy Maxi Kit
- b. QIAgen Genomic-tip 20/G
- c. CTAB
- d. QIAgen Dneasy Maxi Kit plus CTAB (final concentration 1%)

2. PCR Reaction

- 95°C for 10 min
- 95°C for 30 sec
- 60°C for 30 sec
- 72°C for 30 sec
- 72°C for 7 min
- 4°C forever

3. Electrophoresis

C. Results

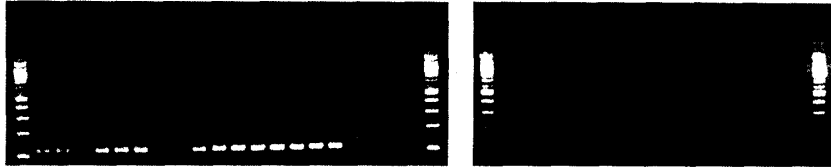
		DNA extraction	Maxi		Genomic-tip		CTAB		Maxi+CTAB	
		PCR date	2003/8/18		2003/8/19		2003/8/20		2003/8/22	
ID	Well.	Sample name	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS
1	1	Chicken nugget 1	+	+	+	+	-	+	+	+
	2	Chicken nugget 2	+	+	+	+	+	-	+	C&+
2	3	Baby ham 1	+	-	+	+	+	-	+	-
	4	Baby ham 2	+	-	+	-	+	-	+	-
3	5	Sausage (H) 1	+	+	+	+	+	-	+	-
	6	Sausage (H) 2	+	-	+	+	+	+	+	-
4	7	White sausage 1	-	-	-	-	-	-	-	D
	8	White sausage 2	-	-	-	-	-	-	-	-
5	9	Sausage (A) 1	+	-	+	+	+	-	+	-
	10	Sausage (A) 2	+	-	+	-	+	-	+	-
6	11	Sliced ham 1	+	-	+	+	+	-	+	-
	12	Sliced ham 2	+	-	+	+	+	-	+	-
7	13	FrankFruite sausage 1	+	-	+	+	+	+	+	+
	14	FrankFruite sausage 2	+	-	+	-	+	-	+	+
8	15	Ham (RH) 1	+	-	+	-	+	+	+	+
	16	Ham (RH) 2	+	-	+	+	+	+	+	+
9	17	Ham (CT) 1	A	-	A&B	-	A	-	A	-
	18	Ham (CT) 2	A	-	A	-	A	-	A&B	-
10	19	Ham (10%) 1	A	-	A&+	-	-	-	A	-
	20	Ham (10%) 2	A	-	-	-	-	-	A	-
11	21	Ham (15%) 1	-	-	A&B	+	-	-	A	-
	22	Ham (15%) 2	-	-	A	-	-	-	A&B	-
12	23	Ham (20%) 1	-	+	A	-	-	-	A	-
	24	Ham (20%) 2	-	-	A	-	-	-	A	-
13	25	德昌炭燒角豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	26	德昌炭燒角豆乾 2	+	+	+	+	+	+	+	+
14	27	德昌五香豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	28	德昌五香豆乾 2	+	+	+	+	+	+	+	+
15	29	德昌大溪五香豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	德昌大溪五香豆乾 2	+	+	+	+	+	+	+	+
16	31	GM (RRS) 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	32	GM (RRS) 2	+	+	+	+	+	+	+	+
17	33	nonGM 1	+	-	+	-	+	-	+	-
	34	nonGM 2	+	-	+	-	+	-	+	-
	35	negative(no DNA)	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	negative(no primer)	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	positive(Plasmid)	+	+	+	+	+	+	+	+

non-specific band length: A 160 bp, B 1 kb, C 170 bp and D 90 bp

1. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Dneasy Maxi Kit)

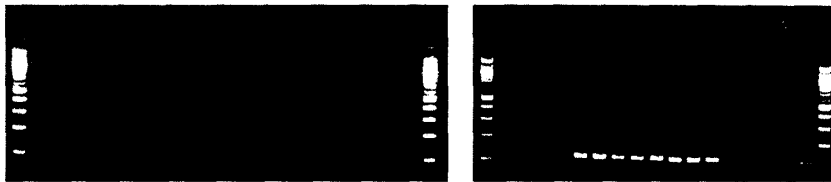
1.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



1.2 RRS primer

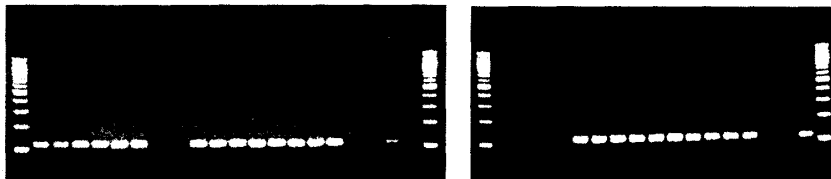
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



2. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Genomic-tip 20/G)

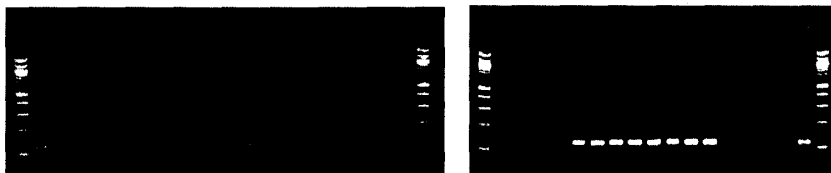
2.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



2.2 RRS Primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



3. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by CTAB)

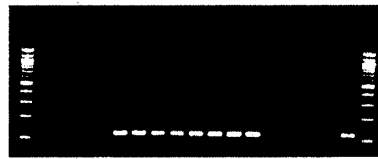
3.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



3.2 RRS primer

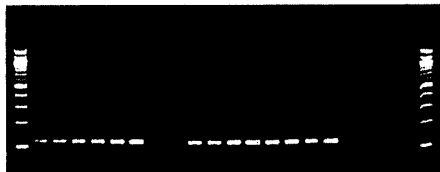
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



4. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Dneasy Maxi Kit plus CTAB (final concentration 1%))

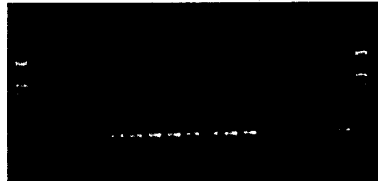
4.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



4.2 RRS primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	900.9 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	900.9 μL
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	64.1 μL
total				2346 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL.

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 77 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	1183.875 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	500.5 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	9.625 μL
total		22 μL	1694 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 37 tubes
Master Mix A		22 μL	814 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
total		22.5 μL	832.5 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 37 tubes
Master Mix A		22 μL	814 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	9.25 μL
total		22.5 μL	832.5 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).

Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

	for 1 tube
Master Mix A	22 μL
Sterilized ultra pure water	0.5 μL
Template DNA (positive control)	2.5 μL
total	25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

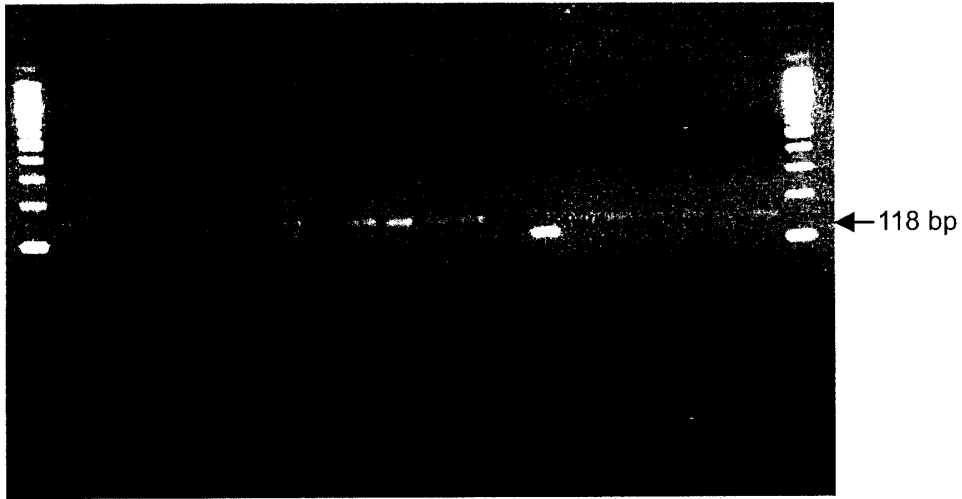
No.	Sample name
CTAB 9	1 Ham (CT) 1
CTAB 9	2 Ham (CT) 2
CTAB 10	3 Ham (10%) 1
CTAB 10	4 Ham (10%) 2
CTAB 11	5 Ham (15%) 1
CTAB 11	6 Ham (15%) 2
CTAB 12	7 Ham (20%) 1
CTAB 12	8 Ham (20%) 2
Maxi 9	9 Ham (CT) 1
Maxi 9	10 Ham (CT) 2
Maxi 10	11 Ham (10%) 1
Maxi 10	12 Ham (10%) 2
Maxi 11	13 Ham (15%) 1
Maxi 11	14 Ham (15%) 2
Maxi 12	15 Ham (20%) 1
Maxi 12	16 Ham (20%) 2
M+C 9	17 Ham (CT) 1
M+C 9	18 Ham (CT) 2
M+C 10	19 Ham (10%) 1
M+C 10	20 Ham (10%) 2
M+C 11	21 Ham (15%) 1
M+C 11	22 Ham (15%) 2
M+C 12	23 Ham (20%) 1
M+C 12	24 Ham (20%) 2
G-tip 9	25 Ham (CT) 1
G-tip 9	26 Ham (CT) 2
G-tip 10	27 Ham (10%) 1
G-tip 10	28 Ham (10%) 2
G-tip 11	29 Ham (15%) 1
G-tip 11	30 Ham (15%) 2
G-tip 12	31 Ham (20%) 1
G-tip 12	32 Ham (20%) 2
	33 negative (no DNA)
	34 negative (no DNA)
	35 positive (hamid)

附件三十八

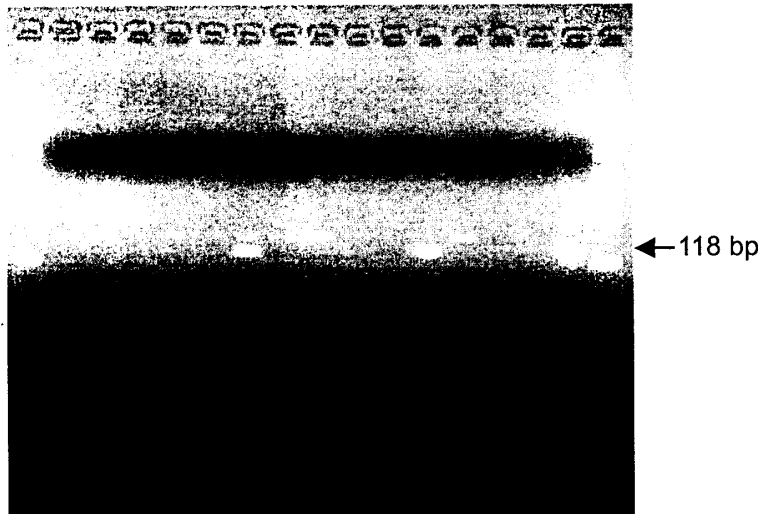
進行定性 PCR 再確認之電泳圖結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

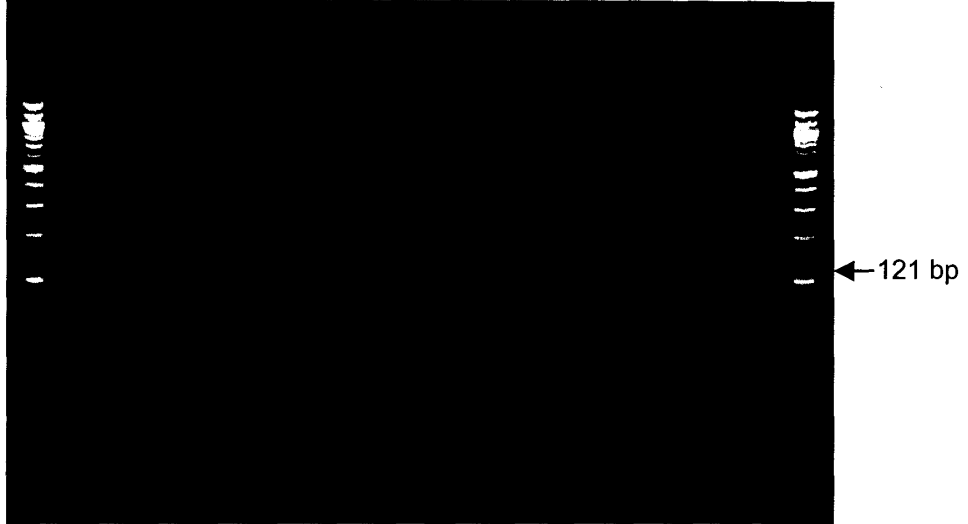


M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 M



RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 M



附件三十九

Protocol for qualitative PCR date: 2003/8/27

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	900.9 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	900.9
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	541
total				2340 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL.

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 70 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	1076.25 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	455 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	8.75 μL
total		22 μL	1540 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 33 tubes
Master Mix A		22 μL	726 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	8.25 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	8.25 μL
total		22.5 μL	742.5 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 33 tubes
Master Mix A		22 μL	726 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	8.25 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	8.25 μL
total		22.5 μL	742.5 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).

Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

for negative control#2(no primer)		for 1 tube
Master Mix A		22 μL
Sterilized ultra pure water		0.5 μL
Template DNA (positive control)		2.5 μL
total		25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	

No.	Sample name	
CTAB 9	1 Ham (CT) 1	Korea
CTAB 9	2 Ham (CT) 2	Korea
CTAB 10	3 Ham (10%) 1	Korea
CTAB 10	4 Ham (10%) 2	Korea
CTAB 11	5 Ham (15%) 1	Korea
CTAB 11	6 Ham (15%) 2	Korea
CTAB 12	7 Ham (20%) 1	Korea
CTAB 12	8 Ham (20%) 2	Korea
x Maxi 9	9 Ham (CT) 1	Korea
x Maxi 9	10 Ham (CT) 2	Korea
Maxi 10	11 Ham (10%) 1	Korea
Maxi 10	12 Ham (10%) 2	Korea
Maxi 11	13 Ham (15%) 1	Korea
Maxi 11	14 Ham (15%) 2	Korea
Maxi 12	15 Ham (20%) 1	Korea
x Maxi 12	16 Ham (20%) 2	Korea
G-tip 9	17 Ham (CT) 1	Korea
G-tip 9	18 Ham (CT) 2	Korea
G-tip 10	19 Ham (10%) 1	Korea
G-tip 10	20 Ham (10%) 2	Korea
G-tip 11	21 Ham (15%) 1	Korea
G-tip 11	22 Ham (15%) 2	Korea
G-tip 12	23 Ham (20%) 1	Korea
G-tip 12	24 Ham (20%) 2	Korea
CTAB 1	25 Chichen nugget 1	mine
CTAB 1	26 Chichen nugget 2	mine
	27 negative(no DNA)	
	28 negative(no primer)	
	29 positive(Plasmid)	

NOTICE!

Plant Quarantine

- Prevents introduction of injurious agricultural pests and diseases from abroad
- Protects agriculture and green resources of Japan. ■

Your understanding and cooperation is solicited. ■

When you take plants or plant products to Japan, you must undergo plant quarantine,

Here are some reminders for you.

1. Prohibited items

In order to prevent the invasion of quarantine pests that may cause significant damage to agricultural products in Japan, host plants of quarantine pests, quarantine pests, and soil are prohibited to entry.

2. Plants subject to quarantine inspection

This covers practically all plants other than the import prohibited items. They must be inspected and confirmed for the freedom from quarantine pests and the conformity with quarantine requirements of Japan.

When you take plants or plant products out of Japan,

Many countries undertake plant quarantine and regulate import of plants by imposing prohibitions, restrictions, disinfection treatments and/or inspections, etc. You may consult with the Plant Quarantine Office for detailed information before your departure.

Plant Quarantine Office (TEL No.)

Yokohama Plant Protection Station 045-211-7152

Sapporo Sub-Station 011-852-1808

Shin-Chitose Airport Annex 0123-24-6154

Shiogama Sub-Station 022-362-6916

Sendai Airport Annex 022-383-4585

Niigata Sub-Station 025-244-4401

Narita Sub-Station 0476-32-6694

Haneda Airport Branch 0476-34-2352

Tokyo Sub-Station 03-5756-0229

Nagoya Plant Protection Station 03-3599-1139

Nagoya Plant Protection Station 052-651-0112

Nagoya Airport Branch 0568-28-0510

Fushiki Sub-Station 0766-44-0990

Shimizu Sub-Station 0543-52-3775

Kobe Plant Protection Station 078-331-1350

Kansai Airport Sub-Station 0724-55-1936

Osaka Sub-Station 06-6571-0801

Hiroshima Sub-Station 082-251-9593

Hiroshima Airport Annex 0848-86-8261

Sakaide Sub-Station 0877-46-4108

Moji Plant Protection Station 093-321-2601

Fukuoka Sub-Station 092-291-2504

Fukuoka Airport Branch 092-477-7575

Kagoshima Sub-Station 099-222-1046

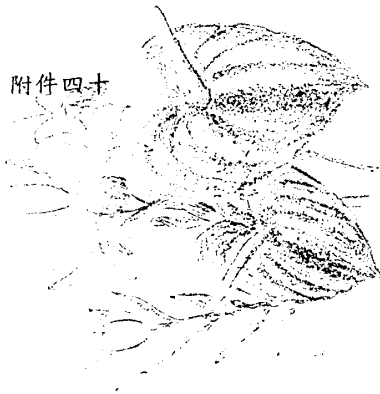
Kagoshima Airport Branch 0995-58-2428

Naze Sub-Station 0997-52-0459

Naha Plant Protection Station 098-868-2850

Naha Airport Branch 098-857-0054

附件四十



FROM PLANT QUARANTINE — JAPAN —



Plant Protection Station
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries JAPAN
<http://www.pps.go.jp>

If you carry any plants, please come to the Plant Quarantine Office before customs inspection.

- Seeds
- Bulbs and tubers
- Living plants
- Seedlings & scions
- Cutflowers
- Fresh fruits
- Fresh vegetable fruits
- Vegetables
- Grains
- Beans
- Spices
- Herbs
- Dried flowers
- Others (Soil, live insect or mushroom injurious to plants)

Arrival Passengers

Immigration

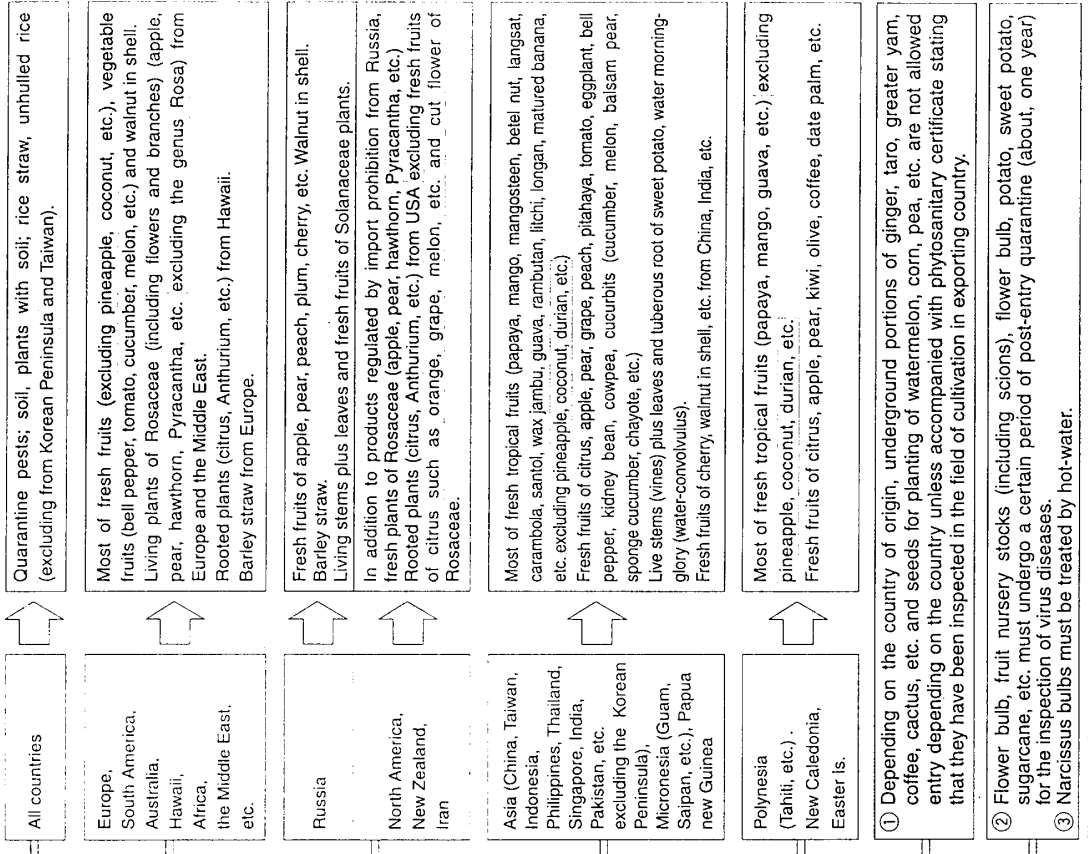
Plant Quarantine
Take plant inspection before the customs inspection.

Customs

Entry

IMPORT PROHIBITED ITEMS
No one is allowed to bring these items into Japan.
This restriction also applies to purchases from duty free shops and items imported from a third country.

ITEMS SUBJECT TO IMPORT INSPECTION
All plants other than the import prohibited must be inspected for the freedom from quarantine pests upon entry.



- ① Depending on the country of origin, underground portions of ginger, taro, greater yam, coffee, cactus, etc. and seeds for planting of watermelon, corn, pea, etc. are not allowed entry depending on the country unless accompanied with phytosanitary certificate stating that they have been inspected in the field of cultivation in exporting country.
- ② Flower bulb, fruit nursery stocks (including scions), flower bulb, potato, sweet potato, sugarcane, etc. must undergo a certain period of post-entry quarantine (about, one year) for the inspection of virus diseases.
- ③ Narcissus bulbs must be treated by hot-water.

These are typical examples.
Please call the **Plant Quarantine Office** for further information. (See reverse side for contact)
Some plants are prohibited from import or export by the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Washington Convention). For particular information, call the Agriculture and Marine Product Office, Trade Control Department, Ministry of Economy, Trade and Industry (METI 03-3501-1511) or the Customs Office.

海外へお出かけのあなたに

植物検疫とは

外国から侵入しようとする
病害虫から日本の『農作物』と
『緑』を守るために
『植物』の『検疫』を行っています。
万が一、病害虫が侵入すると
とり返しのつなかい被害を与える
ことがあります。■
植物検疫にご協力をお願いします。■

外国から植物を 持ち込む場合は？

外国からの植物類はすべて植物検疫が
必要です。
その植物類は次の2つに区分されます。

「輸入禁止品」(日本に持ち込めません。)
我が国の農作物に大きな被害を
与えるおそれのある検疫病害虫
が日本に侵入することを防ぐた
め、その病害虫が寄生する植物
や、病害虫、土は輸入が禁止さ
れています。

「輸入検査品」(検査を受けて合格すれば
持ち込めます。)

輸入禁止品に該当しない植物は、
検疫病害虫付着の有無の検査や
検査条件の確認などを受けなけ
ればなりません。

外国へ植物を

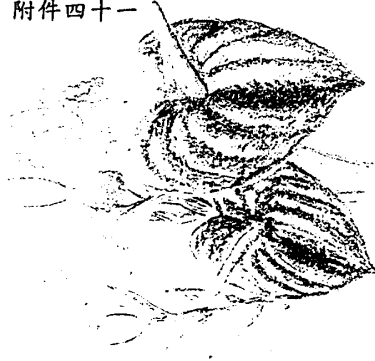
持ち出す場合は？

諸外国でも日本と同様に「植物検疫」が
行われています。国によって、「輸入禁止」、
「制限」、「検査」、「消毒」などさまざま
条件が設けられています。
詳しくは、外国に到着される前に最寄り
の植物検疫所へおたずねください。

主な問い合わせ先

横浜植物検疫所 045-211-7152
札幌支所 011-852-1808
新千歳空港分室 0123-24-6154
瑞穂支所 022-362-6916
仙台空港分室 022-383-4585
新潟支所 025-244-4401
成田支所(成田空港) 0476-32-6694
羽田支所(第1PTB) 0476-34-2352
羽田支所(第2PTB) 03-5756-0229
東京支所 03-3599-1139
名古屋植物検疫所 052-651-0112
名古屋支所 0568-28-0510
伏木支所 0766-44-0990
清水支所 0543-52-3775
神戸植物検疫所 078-331-1350
関西支所 0724-55-1936
大阪支所 06-6571-0801
広島支所 082-251-9593
広島空港分室 0848-86-8261
坂出支所 0877-46-4108
門司植物検疫所 093-321-2601
福岡支所 092-291-2504
福岡空港出張所 092-477-7575
鹿児島支所 099-222-1046
鹿児島空港出張所 0995-58-2428
名瀬支所 0997-52-0459
那覇植物検疫事務所 098-868-2850
那覇空港出張所 098-857-0054

件四十一



植物検疫の

しおり



農林水産省 植物防疫所

<http://www.pps.go.jp>

植物などをお持ちの方

- 種子
- 球根
- 苗
- 苗木 (観木)
- 切花・切枝
- 生果実
- 野菜
- 穀類
- 豆類
- し好香辛料
- 薬用植物
- ドライフラワー
- 植物を材料にしたもの (民芸品、ワラ製品等)
- その他 (土、生きた昆虫及びキノコなど、病害虫そのもの)

海外から到着

輸入禁止品

持ち込むことができません。
免税店で購入された品に該当する禁止品は、持ち込むことができません。
禁止品は、持ち込むことができません。
免税店で購入された品に該当する禁止品は、持ち込むことができません。
禁止品は、持ち込むことができません。



輸入検査品

植物類は輸入禁止品に該当しなくても、病害虫の付着のないことを確認する検査が必要です。

これらは代表的な例です。詳しくは最寄りの植物防疫所へおたずねください。
野生動物保護のためのワシントン条約により輸入及び輸出できないものがあります。
(詳しいことは経済産業省 (代表: 03-3501-1511) 貿易管理部農水産室又は税関相談官室におたずねください。)

附件四十二

Protocol for qualitative PCR date: 2003/8/28

[Reagents]

- # Sterilized ultra pure water
- # 10 x PCR Buffer II (Applied Biosystems)
- # dNTPs (Applied Biosystems)
- # MgCl₂ (Applied Biosystems)
- # Ampli Taq Gold (5U/μL) (Applied Biosystems)
- # Forward Primer (50 μM)
- # Reverse Primer (50 μM)

[Preparation of pre mix]

Prepare pre mix solution for AmpliTaq Gold according to the following table.

	Initial conc.	Pre mix conc.	Final conc.	Volume
PCR Buffer II	10 fold	3.85 fold	1 fold	1078 μL
dNTP	2 mM	0.77 mM	0.2 mM	1078
MgCl ₂	25 mM	5.775 mM	1.5 mM	647
total				2800 μL

[preparation of samples]

Dilute extracted DNA with sterilized ultra pure water to a concentration of 10ng/μL.

[Preparation of reaction solution]

<1. Preparation of Master Mix>

Prepare two 1.5ml tube. Mix the reagents as following to prepare the Master Mix A and B:

Master Mix A	Final conc.	for 1 tube	for 20 tubes
Sterilized ultra pure water		15.375 μL	307.5 μL
Pre Mix (3.85 fold)	1 fold	6.5 μL	130 μL
Ampli Taq Gold (5U/μL)	0.025 U/μL	0.125 μL	2.5 μL
total		22 μL	440 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 8 tubes
Master Mix A		22 μL	176 μL
Le1-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	2 μL
Le1-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	2 μL
total		22.5 μL	180 μL

Master Mix B	Final conc.	for 1 tube	for 8 tubes
Master Mix A		22 μL	176 μL
RRS-5' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	2 μL
RRS-3' (50 μM)	0.5 μM	0.25 μL	2 μL
total		22.5 μL	180 μL

After Master Mix is prepared, vortex at maximum speed for about three seconds and then spin down.

<2. Delivering of Master Mix>

prepare 0.2 mL tubes for each sample, positive control, and negative control#1(no DNA).

Deliver 22.5 μL of Master Mix B to each 0.2 mL tube.

<3. Adding template DNA into 0.2mL tubes>

Add 2.5 μL of each sample into the 0.2 mL tube.

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[Preparation of reaction solution for negative control#2(no primer)]

Prepare one 0.2 ml tube. Mix the reagents as following:

	for 1 tube
Master Mix A	22 μL
Sterilized ultra pure water	0.5 μL
Template DNA (positive control)	2.5 μL
total	25 μL

Mix by tapping the bottom of tube, then spin down.

[PCR Cycles]

Perform amplification according to the following PCR step-cycle program.

<Cycle>	<time>	
95°C	10 min	} 40cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	for ever	---

Maxi+CTAB

No.	Sample name	
1	Ham (CT) 1	Korea
2	Ham (CT) 2	Korea
3	negative(no DNA)	
4	negative(no primer)	
5	positive(Plasmid)	

(参考)

附件四十三

平成14年10月30日
農林水産省総合食料局

プレスリリース

有機大豆使用食品緊急調査の結果について

有機大豆を使用した豆腐及び納豆について、表示を確認するため、平成14年6月から7月にかけて有機JAS格付品(54商品)及び「有機大豆使用」と強調表示したもの(22商品)合計76商品を買上げ、(独)農林水産消費技術センターが遺伝子分析を行ったところ、25商品から組換え遺伝子が検出された。(公表済み)この件について、立入検査及び原料大豆の遺伝子分析の結果は別紙のとおり。

[有機大豆使用食品緊急調査結果の概要]

1 調査対象商品数(公表済み)

	品目	調査商品数	組換え遺伝子検出	分析不能
有機JAS格付品	豆腐	29	9	0
	納豆	25	5	5
「有機大豆使用」強調表示品	豆腐	18	11	0
	納豆	4	0	2
合計		76	25	7

2 調査結果概要

	組換え遺伝子検出	立入検査の実施	有機JAS大豆使用	原料分析対象	定性分析結果	定量分析結果
有機JAS格付品	14商品(14工場)	14工場	使用 14工場	14商品	陰性 12商品	いずれも検出限界以下
			不使用 0工場		陽性 2商品	
強調表示品	11商品(11工場)	11工場	使用 9工場	5商品*	陰性 5商品	
			不使用 2工場		陽性 なし	

* 4商品については製品の分析結果から原料大豆由来でないことが明らかとなったため、対象から除外した。

3 本結果に対する措置

有機大豆を使用していた23工場における組換え遺伝子の検出は原料大豆に由来するものではなかった。また、これらの工場の製造過程を調査したところでは、JAS規格に違反する事実は認められなかった。したがって、これらの製品については、製造過程で微量の一般大豆の混入が起きた可能性があるとして推測される。

有機大豆を使用していなかった2工場については、JAS法に違反していることから、本日、関東農政局長及び東京都知事より指示が行われた。

<p>問い合わせ先 総合食料局品質課食品表示対策室 担当：龍口(内線3111) 電話：03-3502-8111(代表) 03-3507-8592(直通)</p>
--

(参考)

(別紙)

有機大豆使用食品緊急調査結果

製品から組み換え遺伝子が検出された 25 商品 (25 工場：有機 JAS 認定 14 工場、「有機原料使用」強調表示製品製造 11 工場) について調査を実施。

1 立入検査の結果 (製造過程の確認)

(1) 有機 JAS 認定 14 工場

有機 JAS 格付けされた大豆を使用していることを確認。

いずれの工場でも製造過程において、組換え遺伝子混入につながる認定の技術的基準に違反する行為はなかった。

(2) 「有機原料使用」強調表示製品製造 11 工場

9 工場では有機 JAS 格付けされた大豆を使用していることを確認。

2 工場では有機 JAS 格付けされた大豆以外の大豆を原料としていた事実が判明。

2 原料大豆の遺伝子分析の結果 (原料大豆の確認)

(1) 有機 JAS 認定 14 工場

2 工場が使用していた 2 点のアメリカ産大豆のみから定性分析で組換え遺伝子が検出されたものの、定量分析では検出下限以下の結果 (定量分析の検出下限は 0.1%)。通常、この程度の組換え遺伝子混入量では、製品で検出されない。

(2) 「有機原料使用」強調表示製品製造 11 工場

1 の(2)の の有機 JAS 大豆以外の大豆を原料として使用していた工場は原料分析の対象から除外した。

有機 JAS 大豆を使用していた 9 工場のうち 4 工場については、製品の遺伝子分析において、分析に供した同一製造ロット 3 点のうち一部のサンプルからのみ、組換え遺伝子が検出されたことから、組換え遺伝子の混入は原料大豆でなく、製造過程において組換え遺伝子の混入が起きたことが判明。そのため、原料大豆分析の対象から除外。

残り 5 工場について、製品の遺伝子分析において、全てのサンプルから組換え遺伝子が検出されたことから、組換え遺伝子が原料大豆に由来したものを確認するため、遺伝子分析を実施。いずれの原料大豆からも定性分析で組換え遺伝子は検出されなかった。

3 調査結果について

(1) 有機 JAS 認定 14 工場

製品から組換え遺伝子が検出されたものの、これは原料大豆に由来するものではなかった。また、工場において認定の技術的基準に違反する事実は認められなかった。

(2) 「有機原料使用」強調表示製品製造 11 工場

9 工場では有機 JAS 格付けされた大豆を使用していることを確認。工場における管理状況も含め、品質表示基準に違反する事実は認められなかった。

参考)

有機大豆使用食品調査結果

	品目	調査 商品数	組換え遺伝子 不検出	組換え 遺伝子検出	分析 不能
有機 JAS 格付品	豆腐	29	20	9	0
	納豆	25	15	5	5
有機大豆使用」 強調表示品	豆腐	18	7	11 ^④	0
	納豆	4	2	0	2
合計		76	44	25	7

原料大豆分析結果

	原料分析 対 象	定性分析 結 果	定量分析 結 果
有機 JAS 格付品	14商品の原料	陰性 12商品	
		陽性 2商品 (アメリカ産)	いずれも 検出限界以下 (0.1%以下)
有機大豆使用」 強調表示品	5商品*の原料	陰性 5商品	
		陽性 なし	

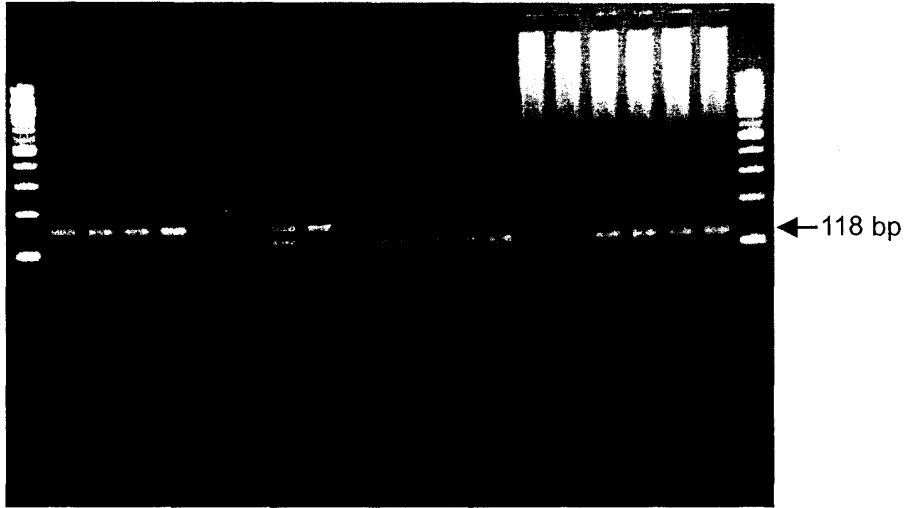
* ④ 11 商品のうち、4 商品は 3 点のうち一部のサンプルからのみ検出されたことから、原料大豆には組換え遺伝子混入がなかったと判明した。また、2 商品については、非有機大豆を使用したことが明らかになっている。このため、これら 6 商品については、原料大豆の分析対象から除外。

附件四十四

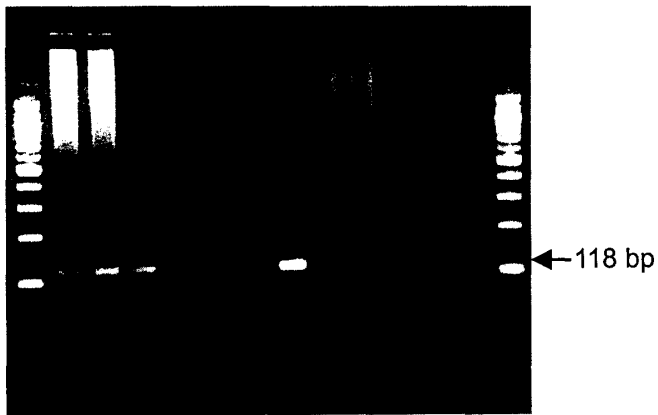
進行定性 PCR 再確認之電泳圖結果

LE1 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M



M 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 M

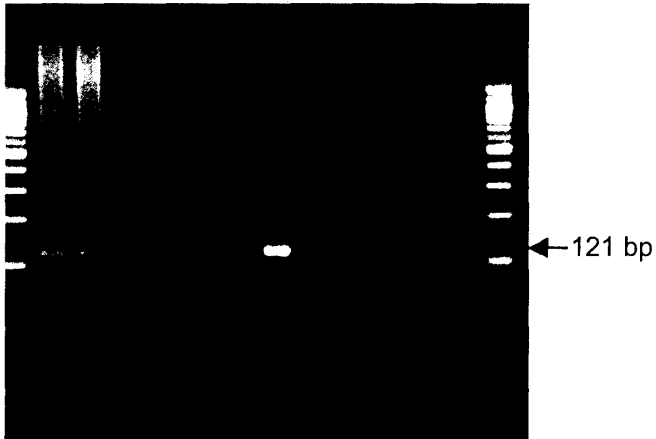


RRS 基因

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M



M 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 M



**Study on the Qualitative PCR to
Detect the Presence of GMO in
Animal-derived and
Soybean-derived Products**

Hsieh, Pei-Chun

2003. 8. 4-29

Food Microbiology Division

Bureau of Food and Drug Analysis

Department of Health, Executive Yuan,

R.O.C

A. Materials

ID	Sample name	Soy protein	Information
1	Chicken nugget	Yes	Market (Nippon Ham Company)
2	Chibini ham	Yes	Market (Marudai Foods Company)
3	Sausage (H)	Yes	Market (Maruha Company)
4	White sausage	No	Market (Maruha Company)
5	Sausage (A)	Yes	Market (Prima Ham Company)
6	Sliced ham	Yes	Market (Prima Ham Company)
7	FrankFruite sausage	Yes	Market (Prima Ham Company)
8	Ham (RH)	Yes	Market (Prima Ham Company)
9	Ham (CT)	No	Prima Ham Company
10	Ham (10%)	No	Prima Ham Company
11	Ham (15%)	No	Prima Ham Company
12	Ham (20%)	No	Prima Ham Company
13	徳昌炭角焼豆乾	Yes	Market (徳昌)
14	徳昌五香豆乾	Yes	Market (徳昌)
15	徳昌大溪五香豆乾	Yes	Market (徳昌)
16	RRS powder	Yes	Positive control
17	Non-GM soybean powder	Yes	Negative control

1. Chicken nugget



2. Chibini ham



品名 フィッシュハム
 原材料名 肉片等(まぐろ、マトン、豚脂肪、植物性たん白)、つなぎ(魚肉(たら、いどより、ほっけ、その他)、でん粉、ゼラチン、卵白)、食塩、砂糖、香辛料、貝カルシウム、調味料(アミノ酸等)、リン酸塩(Na)、保存料(ソルビン酸)、酸化防止剤(ビタミンC)、赤色106号、発色剤(亜硝酸Na)、原材料の一部に小麦、乳、さけ、さば、大豆、鶏肉を含む
 殺菌方法 115℃ 18分間加熱
 保存方法 同面に記載

3. Sausage (H)



名称 フィッシュソーセージ
 原材料名 魚肉(ひめし、ほっけ、たら、その他)、結着材(植物性たん白(小麦、大豆)、でん粉(コーンスターチ)、ゼラチン)、植物油、砂糖、食塩、たまねぎ、香辛料、炭酸カルシウム、保存料(ソルビン酸)、酸化防止剤(ビタミンC)、赤色106号(原材料の一部に小麦、乳、さけ、さば、大豆、鶏肉を含む)
 殺菌方法 120℃ 4分間加熱

A. Materials

ID	Sample name	Soy protein	Information
1	Chicken nugget	Yes	Market (Nissin Food Industry)
2	Chibini ham	Yes	Market (Nissin Food Industry)
3	Sausage (H)	Yes	Market
4	White sausage	No	Market
5	Sausage (A)	Yes	Market
6	Sliced ham	Yes	Market
7	Frankfurter sausage	Yes	Market
8	Ham (RH)	Yes	Market

4. White sausage

MARLHA

チーズがまぼこ
チーズ10%入り

おやつに!
おつまみに!

8本入り

名称 ケーシング詰特種かまぼこ
 原材料名 魚肉(たらいとより)種もの(プロセスチーズ、カロチノイド色素、でん粉(コーンスターチ)、発酵調味料、塩、砂糖、調味料(香辛料等)、酒精、酸味料、原材料の一部を含む。)

加熱方法 120℃4分間加熱
 内容量 12g(14g×8本入り)
 品質保持期限 箱側に記載してあります
 保存方法 直射日光を避け常温または冷蔵で保存して下さい。
 製造者 フリマム株式会社UTN
 茨城県土浦市甲田原695

5. Sausage (A)

カードがおおきくなって
たのしさアップ!

アバレンジャー
3Dカードつき!

勇者戦隊
ウルトラマン

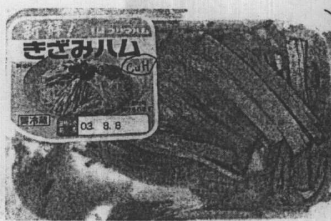
★カルシウム
★鉄が配合!

アバレンジャーソーセージ
加熱食肉製品(包装後加熱)

品名	加圧加熱ウインナーソーセージ		
原材料名	豚肉、鶏肉、結着材料(でん粉、大豆たんぱく質(重合たんぱく質)、大豆たんぱく質(たんぱく質)、水あめ、食塩、香辛料、たんぱく加水分解物、卵殻Ca、調味料(アミノ酸等)、リン酸塩(Na-K)、保存料(ソルビン酸)、酸化防止剤(ビタミンC)、発色剤(亜硝酸Na)、クエン酸鉄Na、赤色106号、香辛料抽出物		
でん粉含有率	7%	殺菌方法	120℃で4分間加熱
内容量	52g		
品質保持期限	箱側面のラベルに記載		
保存方法	直射日光を避けなるべく低温で保存して下さい。		
製造者	フリマム株式会社 茨城工場 茨城県土浦市甲田原695		

●品質保持期限は、未開封で保存した場合のおいしく召し上がれる期限です。開封後はなるべく早くお召し上がり下さい。●必ず外袋のフィルムと留め金を取り除いてお召し上がり下さい。●留め金は歯で噛み砕かないで下さい。●表面に黒い粒が見えますが香辛料ですので品質に問題ありません。●フリマム(株)お客様相談室 フリーダイヤル ☎0120-436086

6. Sliced ham



加熱食肉製品(加熱後包装) ④3

品名 食肉製品(チヨソブトハム・細切り)キサミハム

原材料名 マトウ豚肉・鶏肉・魚肉(かしきたら)でんぷん(小麦を含む)(でんぷん含有率1%)・水あめ・大豆たん白・食塩・糊セラチン(豚)・乳たん白・たん白加水分解物・香辛料・卵たん白・調味料(アミノ酸等)・カゼイン・Naリン酸塩(Na)・調整剤・保存料(ソルビン酸K)・増粘多糖類・酸化防止剤(ビタミンC)・発色剤(亜硝酸Na)・着色料(カルミン酸アトニー赤3)

内容量 120g

品質保持期限 表面に記載

保存方法 10℃以下で保存して下さい。

製造者 プリマハム株式会社 鹿児島工場
鹿児島県串木野市下名11900

品質保持期限は、10℃以下、未開封で保存した場合の期限です。開封後はなるべく早くお召し上がり下さい。

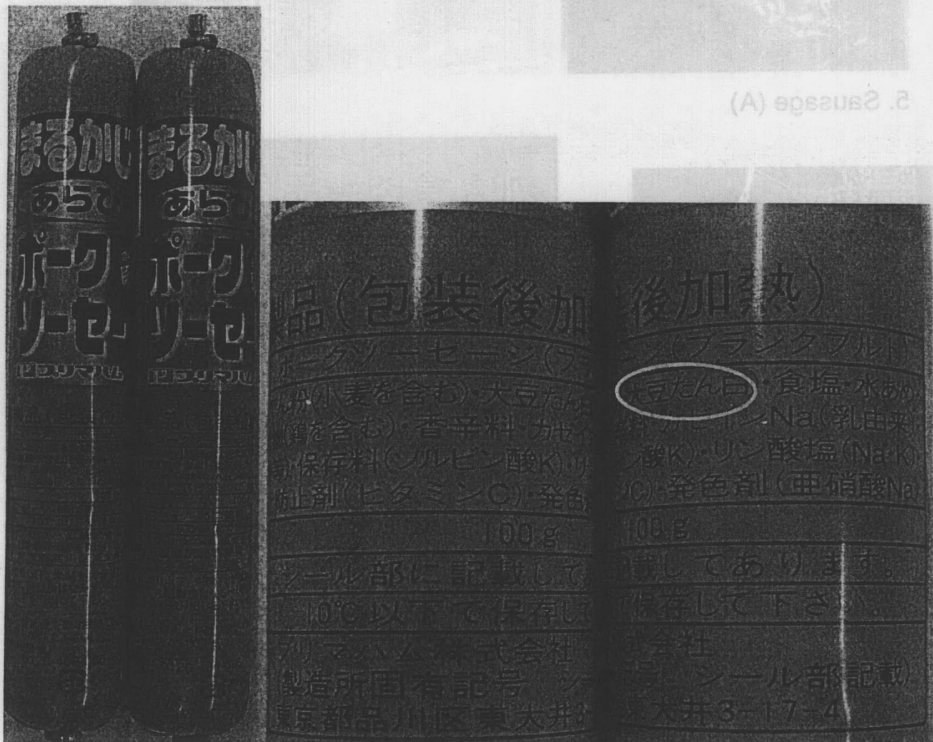
プリマハムお客様相談室
フリーダイヤル 0120-486-086
〒140-8529 東京都品川区東大井3-17-4

PS PVC HACCP

この商品は、厚生労働省より承認されたHACCPシステムを確立して製造されています。

4 902586 87586 1

7. FrankFruite sausage



品(包装後加熱)

品名 フランクフルトソーセージ

原材料名 小麦(小麦を含む)・大豆たん白・食塩・水あめ・糊セラチン(豚)・Naリン酸塩(Na)・乳由乳・卵たん白・たん白加水分解物・香辛料(カゼイン)・調整剤・保存料(ソルビン酸K)・リン酸塩(Na)・酸化防止剤(ビタミンC)・発色剤(亜硝酸Na)・着色料(カルミン酸アトニー赤3)

内容量 100g

品質保持期限 表面に記載

保存方法 10℃以下で保存して下さい。

製造者 プリマハム株式会社
鹿児島工場
鹿児島県串木野市下名11900

品質保持期限は、10℃以下、未開封で保存した場合の期限です。開封後はなるべく早くお召し上がり下さい。

プリマハムお客様相談室
フリーダイヤル 0120-486-086
〒140-8529 東京都品川区東大井3-17-4

PS PVC HACCP

この商品は、厚生労働省より承認されたHACCPシステムを確立して製造されています。

(A) 902586 2

13. 德昌炭角燒豆乾



品名：炭燒角豆乾
 原料成份：黃豆「基因改造」、砂糖、調味料、香料、己二烯酸鉀(防腐劑)、苯甲酸(防腐劑)在法定安全食用量以下、食用色素紅色40號、食用色素黃色5號。
 重量：150g ± 5%
 保存期限：6個月(貯存於陰涼場所)
 保存日期：標示於封口處(拆封後請冷藏)

14. 德昌五香豆乾

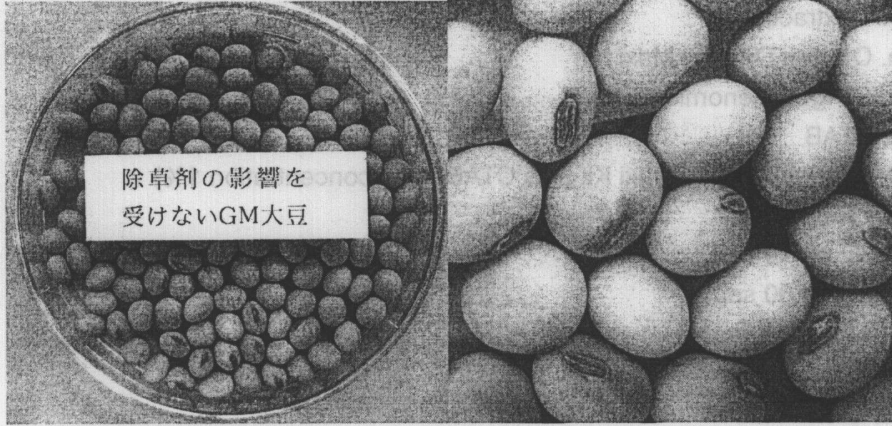


品名：五香豆乾
 原料成份：黃豆「基因改造」、砂糖、調味料、香料、己二烯酸鉀(防腐劑)、苯甲酸(防腐劑)在法定安全食用量以下、食用色素紅色40號、食用色素黃色5號。
 重量：95g ± 5%
 保存期限：8個月(貯存於陰涼場所)
 保存日期：標示於封口處(拆封後請冷藏)

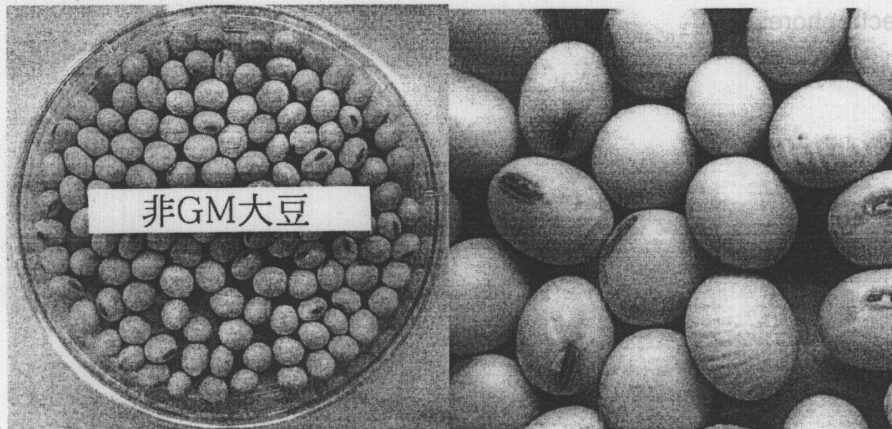
15. 德昌大溪五香豆乾



16. RRS



17. Non-GM soybean



B. Methods

1. DNA Extraction

- a. QIAgen Dneasy Maxi Kit
- b. QIAgen Genomic-tip 20/G
- c. CTAB
- d. QIAgen Dneasy Maxi Kit plus CTAB (final concentration 1%)

2. PCR Reaction

- 95°C for 10 min
- 95°C for 30 sec
- 60°C for 30 sec
- 72°C for 30 sec
- 72°C for 7 min
- 4°C forever

3. Electrophoresis

C. Results

ID	Well.	Sample name	DNA extraction		Maxi		Genomic-tip		CTAB		Maxi+CTAB	
			PCR date		2003/8/18		2003/8/19		2003/8/20		2003/8/22	
			Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS
1	1	Chicken nugget 1	+	+	+	+	-	+	+	+		
	2	Chicken nugget 2	+	+	+	+	+	-	+	N+		
2	3	Chibinii ham 1	+	-	+	+	+	-	+			
	4	Chibinii ham 2	+	-	+	-	+	-	+			
3	5	Sausage (H) 1	+	+	+	+	+	-	+			
	6	Sausage (H) 2	+	-	+	+	+	+	+			
4	7	White sausage 1	-	-	-	-	-	-	-			N
	8	White sausage 2	-	-	-	-	-	-	-			
5	9	Sausage (A) 1	+	-	+	+	+	-	+			
	10	Sausage (A) 2	+	-	+	-	+	-	+			
6	11	Sliced ham 1	+	-	+	+	+	-	+			
	12	Sliced ham 2	+	-	+	+	+	-	+			
7	13	FrankFuite sausage 1	+	-	+	+	+	+	+			
	14	FrankFuite sausage 2	+	-	+	-	+	-	+			
8	15	Ham (RH) 1	+	-	+	-	+	+	+			
	16	Ham (RH) 2	+	-	+	+	+	+	+			
9	17	Ham (CT) 1	N	-	N	-	N	-	N			
	18	Ham (CT) 2	N	-	N	-	N	-	N			
10	19	Ham (10%) 1	N	-	N+	-	-	-	N			
	20	Ham (10%) 2	N	-	-	-	-	-	N			
11	21	Ham (15%) 1	-	-	N	+	-	-	N			
	22	Ham (15%) 2	-	-	N	-	-	-	N			
12	23	Ham (20%) 1	-	+	N	-	-	-	N			
	24	Ham (20%) 2	-	-	N	-	-	-	N			
13	25	德昌炭角燒豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+			
	26	德昌炭角燒豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+			
14	27	德昌五香豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+			
	28	德昌五香豆乾 2	+	+	+	+	+	+	+			
15	29	德昌大溪五香豆乾 1	+	+	+	+	+	+	+			
	30	德昌大溪五香豆乾 2	+	+	+	+	+	+	+			
16	31	GM (RRS) 1	+	+	+	+	+	+	+			
	32	GM (RRS) 2	+	+	+	+	+	+	+			
17	33	nonGM 1	+	-	+	-	+	-	+			
	34	nonGM 2	+	-	+	-	+	-	+			
	35	negative(no DNA)	-	-	-	-	-	-	-			
	36	negative(no primer)	-	-	-	-	-	-	-			
	37	positive(Plasmid)	+	+	+	+	+	+	+			

(N) non-specific band

DNA extraction PCR date			Maxi 2003/8/18		Genomic-tip 2003/8/19		CTAB 2003/8/20		Maxi+CTAB 2003/8/22	
ID	No.	Sample name	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS
1	1	Chicken nugget 1	+	+	+	+	-	+	+	+
	2	Chicken nugget 2	+	+	+	+	+	-	+	N+
9	17	Ham (CT) 1	N	-	N	-	N	-	N	-
	18	Ham (CT) 2	N	-	N	-	N	-	N	-
10	19	Ham (10%) 1	N	-	N+	-	-	-	N	-
	20	Ham (10%) 2	N	-	-	-	-	-	N	-
11	21	Ham (15%) 1	-	-	N	+	-	-	N	-
	22	Ham (15%) 2	-	-	N	-	-	-	N	-
12	23	Ham (20%) 1	-	+	N	-	-	-	N	-
	24	Ham (20%) 2	-	-	N	-	-	-	N	-
	35	negative(no DNA)	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	negative(no primer)	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	positive(Plasmid)	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR date			2003/8/26		2003/8/26		2003/8/26		2003/8/26	
ID	No.	Sample name	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS
9	17	Ham (CT) 1	N	-	N	-	N	-	N	-
	18	Ham (CT) 2	N	-	N+	-	N	-	N	-
10	19	Ham (10%) 1	N	-	N	-	-	-	N	-
	20	Ham (10%) 2	N	-	N	-	-	-	N	-
11	21	Ham (15%) 1	-	N	N	-	N	-	N	-
	22	Ham (15%) 2	+	-	N	-	N	+	N	-
12	23	Ham (20%) 1	N	-	+	-	N	N	N	-
	24	Ham (20%) 2	N	-	N	-	-	-	N	-
	35	negative(no DNA)	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	negative(no primer)	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	positive(Plasmid)	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR date			2003/8/27		2003/8/27		2003/8/27			
ID	No.	Sample name	Le1	RRS	Le1	RRS	Le1	RRS		
1	1	Chicken nugget 1						*	-	*
	2	Chicken nugget 2						*	-	*
9	17	Ham (CT) 1	#*-	#*-	#-	#-	#N	#-		
	18	Ham (CT) 2	#*-	#*-	#-	#-	#N	#-		
10	19	Ham (10%) 1	#N	#-	#+	#+	#N	#+		
	20	Ham (10%) 2	#N+	#-	#+	#+	#N	#-		
11	21	Ham (15%) 1	#N+	#+	#+	#+	#N	#-		
	22	Ham (15%) 2	#N+	#-	#+	#+	#N	#-		
12	23	Ham (20%) 1	#N+	#-	#+	#+	#N+	#-		
	24	Ham (20%) 2			#+	#+	#N	#-		
	35	negative(no DNA)	-	-	-	-	-	-		
	36	negative(no primer)	-	-	-	-	-	-		
	37	positive(Plasmid)	+	+	+	+	+	+		

(*) PCR date: 2003/8/28

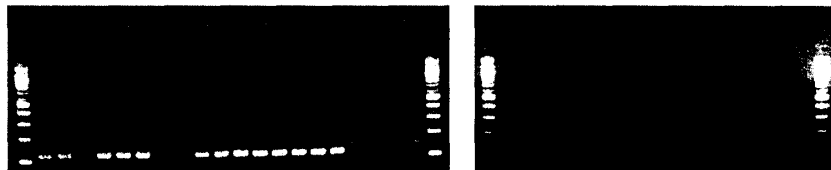
(N) Non-specific band

(#) Ms. Chung's sample

1. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Dneasy Maxi Kit)

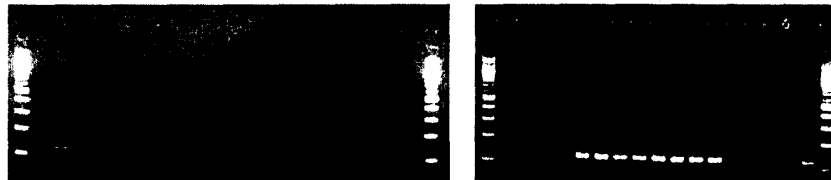
1.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



1.2 RRS primer

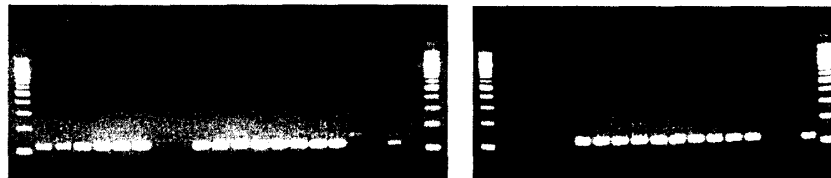
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



2. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Genomic-tip 20/G)

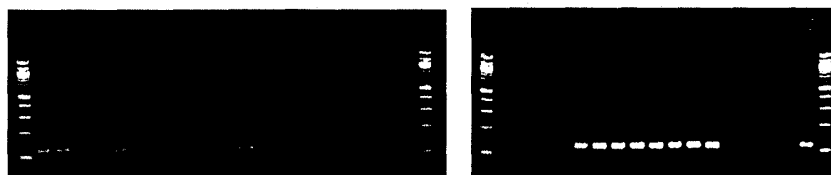
2.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



2.2 RRS Primer

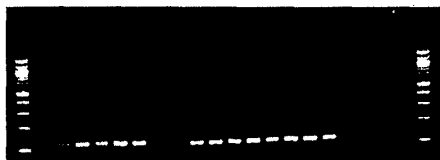
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



3. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by CTAB)

3.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



3.2 RRS primer

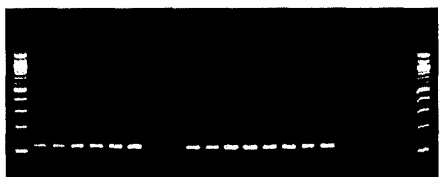
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



4. Results of Qualitative PCR (DNA Extracted by QIAgen Dneasy Maxi Kit plus CTAB (final concentration 1%))

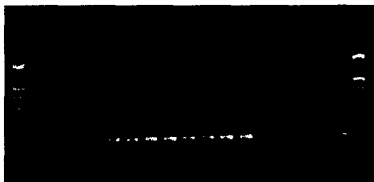
4.1 LE1 primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



4.2 RRS primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M

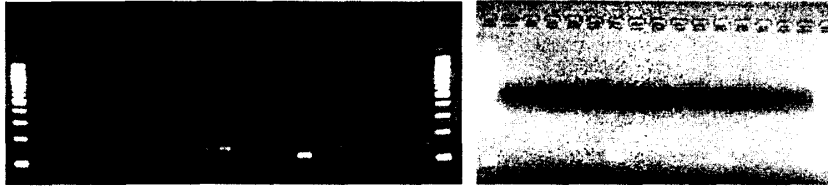


5. Results of Qualitative PCR (retry data)

5.1 LE1 primer

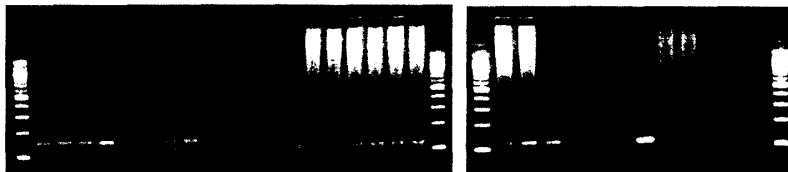
(---CTAB---)(---Maxi- ---)(---Maxi+CTAB---) (Genomic-tip)

M 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 35 36 37 M



(---CTAB---)(---Maxi---)(---Genomic-tip---)(CTAB) (Maxi)

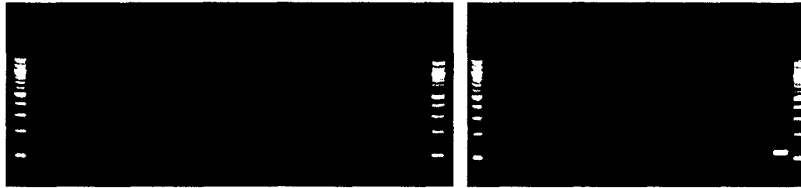
M 17 18 19 20 21 22 23 24 19 20 21 22 23 17 18 19 20 21 22 M M 23 24 1 2 35 36 37 17 18 35 36 37 M



5.2 RRS primer

(---CTAB---)(---Maxi- ---)(---Maxi+CTAB---) (Genomic-tip)

M 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 17 18 19 20 21 22 23 24 35 36 37 M



(---CTAB---)(---Maxi---)(---Genomic-tip---)(CTAB) (Maxi)

M 17 18 19 20 21 22 23 24 19 20 21 22 23 17 18 19 20 21 22 M M 23 24 1 2 35 36 37 17 18 35 36 37 M

