

## 厚生労働省より通知されている「遺伝子組換え食品検査方法」に則った、ロシュ社製リアルタイムPCR試薬（マスターミックス）の同等性試験の結果

本資料はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社と共同で作成しました。

### 背景

遺伝子組換え食品の安全性審査は、食品衛生法上の義務となっている。安全性未審査の遺伝子組換え作物の食品への混入に関する検査は、「遺伝子組換え食品検査方法」に従って実施される。検査に用いられるマスターミックスは「(別添) 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」の「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」に掲載されている方法により、すでに収載されている試薬と同等の性能を有するかどうかを確認することができる。

「検査方法の同等性確認方法」の「3. マスターミックスについて」より引用

「Ⅱ. 個別検査方法」記載のもの又は同等性が確認されたリアルタイムPCR 装置を用いて、検知対象作物試料（作物試料が入手可能な場合はそれを用い、入手できない場合は加工度が高くない加工製品等でもよい。）を用いて内在性遺伝子検知法試験を繰り返し3 回以上実施する。その結果、Ct 値やエンドポイントにおいて「Ⅱ. 個別検査方法」記載のものとは大きな差がないことを確認する。また、遺伝子組換え検知法部分については、市販の陽性プラスミドを希釈せずに用いて、3 回以上測定を行った結果、Ct 値やエンドポイント差が大きな差がないことを確認する（Ct 値に最大でも1 以上の差がない。）。

### 目的

「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法」に掲載のマスターミックスには、FastStart Universal Probe Master (Rox) (ロシュ・ダイアグノスティックス社)、TaqMan® Universal PCR Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、Eagle Taq Master Mix with ROX (ロシュ・ダイアグノスティックス社) と対象食品により様々であるが、「検査方法の同等性確認方法」に沿った同等性試験の実施により、対象食品の検査法に示されている試薬以外の試薬が同等の性能を有するかどうかを判断できる。

本試験では、ロシュ・ダイアグノスティックス社のEagleTaq Master Mix with ROXとFastStart Universal Probe Master (Rox) が、TaqMan® Universal PCR Master Mixと同等に使用できるかを「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法」で通知された試験法に基づき実施した。

### 方法

(別添) 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法 ([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/identshi/kensa/kensa.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/identshi/kensa/kensa.html)) に掲載されている「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」の「3. マスターミックスについて」に沿って実施した。

今回は「コメ (63Bt、NNBt、CpT1) の検査方法」のコメ陽性対照用試験にて、「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」の「3. マスターミックスについて」の内在性遺伝子検知法試験を試みた。

コメ粒より抽出したDNA試料原液を10 ng/μLに調製し、2併行抽出より得られたDNA試料液（1抽出あたり2ウェル並行）合計4wellで測定した。これを1回とし、1日1回、計3回繰り返し実施した。

#### 【通知収載試薬】

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Cat.No. 4304437) : サーモフィッシャーサイエンティフィック社

#### 【評価試薬】

EagleTaq Master Mix with ROX (Cat.No. 05876486001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社

FastStart Universal Probe Master (Rox) (Cat.No. 04913949001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社

### 条件

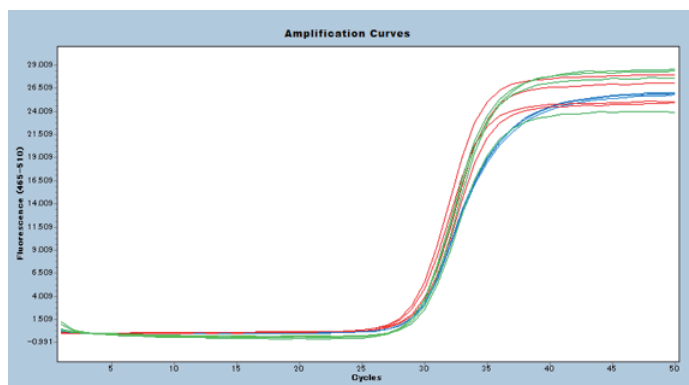
- 使用したPrimer/Probe… コメ内在性DNA PLDオリゴヌクレオチド 2 (Cat.No. R11-1M) : ファスマック社  
コメ内在性DNA PLDプローブ 2 (Cat.No. R11-2P) : ファスマック社  
PLD3959F : 5' -GCT TAG GGA ACA GGG AAG TAA AGTT-3'  
PLD4038R : 5' -CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'  
PLD-P : FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCGC-TAMRA
- 試料…コメ粒より抽出したDNA試料液 (10 ng/μL)
- 反応組成…通知試験法に準じた。
- 使用装置…LightCycler® 480 (通知収載機器)
- 反応条件…通知試験法に準じた。

結果

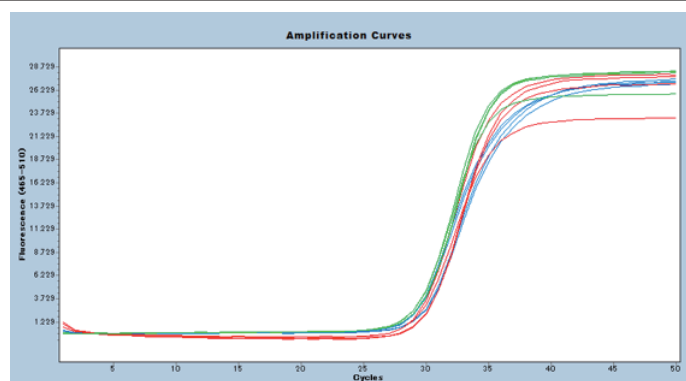
TaqMan® Universal PCR Master Mixのサイクル数 (Cp値) の平均を求め、ロシュ社試薬それぞれのCp値とのサイクル数の値の差 ( $\Delta Cp$ ) とエンドポイント蛍光シグナル値 (エンドポイント) を比較した (表1)。全ての反応で、サイクル数の値の差 ( $\Delta Cp$ ) は1以内となった。エンドポイントについても、各回で試薬による大きな差は見られなかった。

表 1：各試薬での内在性遺伝子検知法試験の結果

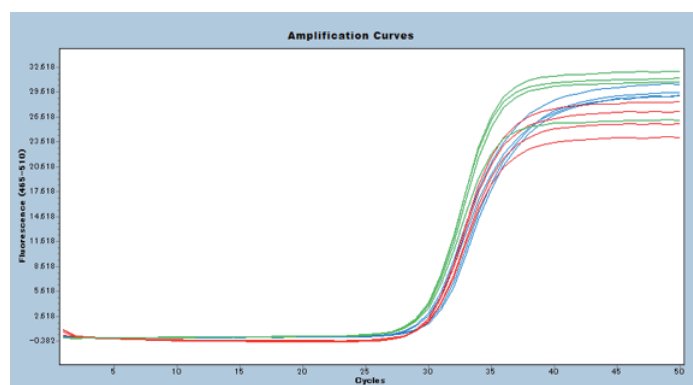
測定回	マスターミックス	DNA試料	Cp値		エンドポイント
第1回目	■ TaqMan® Universal PCR Master Mix	1-1	29.12	平均 : 29.14	25.92
			29.19		25.99
		1-2	29.15		25.80
			29.09		25.94
				$\Delta Cp$	
	■ FastStart Universal Probe Master (Rox)	1-1	29.28	0.14	24.92
			29.23	0.09	27.06
		1-2	28.71	-0.43	27.97
			28.76	-0.38	25.04
	■ EagleTaq Master Mix with ROX	1-1	29.33	0.19	23.94
			29.35	0.21	28.57
		1-2	28.99	-0.15	28.36
29.03			-0.11	27.63	



測定回	マスターミックス	DNA試料	Cp値		エンドポイント
第2回目	■ TaqMan® Universal PCR Master Mix	2-1	28.84	平均 : 29.24	27.08
			28.96		27.15
		2-2	29.59		26.86
			29.56		27.40
				$\Delta Cp$	
	■ FastStart Universal Probe Master (Rox)	2-1	29.05	-0.19	23.21
			29.10	-0.14	27.87
		2-2	29.70	0.46	27.66
			29.67	0.43	26.88
	■ EagleTaq Master Mix with ROX	2-1	28.91	-0.33	25.85
			29.03	-0.21	28.22
		2-2	29.27	0.03	28.29
29.29			0.05	28.10	



測定回	マスターミックス	DNA試料	Cp値		エンドポイント		
第3回目	■ TaqMan® Universal PCR Master Mix	3-1	30.16	平均 : 29.93	29.58		
			30.28		29.22		
		3-2	29.66		29.18		
			29.61		30.56		
						ΔCp	
		■ FastStart Universal Probe Master (Rox)	3-1		29.74	-0.19	24.19
	29.66			-0.27	27.34		
	3-2		29.67	-0.26	28.43		
			29.81	-0.12	25.83		
	■ EagleTaq Master Mix with ROX	3-1	29.32	-0.61	26.26		
			29.42	-0.51	31.33		
		3-2	29.50	-0.43	32.13		
29.53			-0.40	30.86			



まとめ

以上の結果から、コメ内在性遺伝子検知法において、FastStart Universal Probe Master (Rox) とEagleTaq Master Mix with ROXは、TaqMan® Universal PCR Master Mixと同等であると判断された。