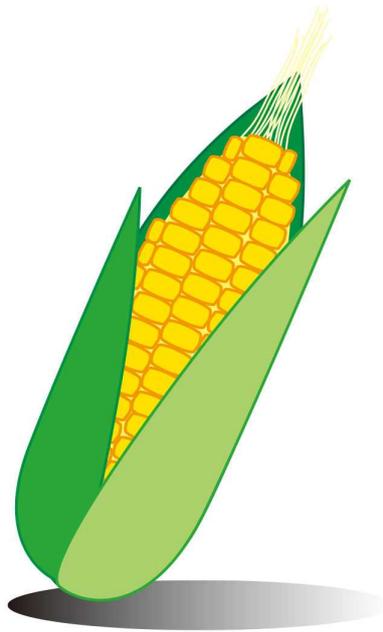


LAMP 法専用試薬

**GM トウモロコシ
CBH351 系統検知キット**

GM Maize Detection CBH351

取扱説明書
Version 2.0



ニッポン・ジーン

LAMP 法専用試薬

GM トウモロコシ CBH351 系統検知キット

取扱説明書

Version 2.0

【はじめにお読みください】

この度は、GM トウモロコシ CBH351 系統検知キットをお買い上げいただき、誠にありがとうございます。
この取扱説明書をよく読んでからキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いて遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統の定性分析を行うための試験研究用試薬です。医療行為及び臨床診断、その他の目的、用途では使用できません。
2. 取扱説明書及び検査用チューブ以外の試薬は-20℃ の冷凍庫内に遮光して保管し、購入後 6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却及び試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。
3. 本キットを使用する際は、取扱説明書の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法及び使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
4. 本キットの判定結果を他用する際は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常、不良によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。
5. 本キットは試験研究用試薬であり、確定診断を保証しておりません。
6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルのオートクレーブ高圧滅菌処理は避けてください。万が一、検査環境に汚染が認められた場合は、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を染み込ませたペーパータオル等を用いて拭き取りによる汚染除去操作を行ってください。なお、次亜塩素酸ナトリウムは人体に有害ですので吸入しないようご注意ください。
7. LAMP 法を用いた遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統検知技術は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所及び株式会社ニッポンジーンが特許を保有しています。また、株式会社ニッポンジーンはLAMP 法を用いた遺伝子組換え食品検知キットの製造及び販売を栄研化学株式会社より許諾されています。
8. 本キットに含まれている試薬と含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページ上にて製品安全データシート (MSDS) を公開しておりますので、ご参照ください。
ニッポンジーン遺伝子診断試薬部; <http://nippongene-analysis.com/>
9. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚などに試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

目次

ページ

1. キット説明	1
GM トウモロコシ CBH351 系統検知キットの概要及び原理	
CBH351 系統とその検知	
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法	
2. キット内容	2
キット内容 (48 テスト用)	
3. 必要な機器、試薬	3
4. キット使用方法	5
トウモロコシ穀粒からの検査フローチャート	
簡易マニュアル	
サンプルの準備	
器具、機器の準備	
検査環境	
GM トウモロコシ CBH351 系統検知	
5. トラブルシューティング	13
6. 参考文献	14
7. 付録	15
品質管理	
系統	
陽性コントロール	

1. キット説明

【GM トウモロコシ CBH351 系統検知キットの概要及び原理】

本キットは、LAMP法を利用して遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統 (StarLink; 以下、CBH351 系統と呼称)の定性分析を行う検査キットです。LAMP法は SARS (重症急性呼吸器症候群) コロナウイルス感染の診断及びノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP法により CBH351 系統ゲノム DNA の一部を増幅し、増幅の有無から CBH351 系統の存在を判定します。

操作はきわめて簡便であり、CBH351系統の混入が疑われるトウモロコシ穀粒から抽出したゲノムDNA溶液をサンプルとして検査溶液 (DNA増幅試薬、酵素液、蛍光発色液、プライマーセットの混合液) に添加し、60-65°Cに1時間保温するだけで完了します。サンプル中にCBH351系統ゲノムDNAが存在した場合に限り、DNA増幅反応が進行します。

判定にDNA増幅反応の進行を蛍光発色液の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを完全閉鎖系 (同一反応チューブ内) で行うため、簡易かつ安全に短時間で CBH351系統ゲノムDNAを検出することが可能です。

本キットには、CBH351 系統に特徴的な *cry9C* 遺伝子発現カセット内部の配列を認識するプライマーセット及びトウモロコシ内在性 *Starch Synthase IIb* 遺伝子の配列を認識するプライマーセットが添付されています。

【CBH351系統とその検知】

CBH351 系統は、既存栽培種のトウモロコシゲノムに土壌細菌 *Bacillus thuringiensis subspecies tolwothi* 由来の殺虫タンパク質遺伝子である *cry9C* 遺伝子発現カセットを導入し、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性を獲得させた遺伝子組換えトウモロコシです。米国における安全性審査の過程において、*cry9C* タンパク質はヒトの体内における消化が困難であり、アレルギー様物質として作用する可能性が懸念されていました。米国において CBH351 系統は家畜及び環境に対する安全性のみが先に認められ、飼料用トウモロコシとしての利用は許可されました。しかしながら、流通の過程で食品用トウモロコシへの混入が発生したため、その後安全性審査の諮問が取り下げられ、ヒトに対する安全性が未承認のままとなり、現在では作付けが禁止されています。日本においても、飼料用として1%までの混入が認められていますが、食品用としては混入が認められていません。

日本は食品用、飼料用のトウモロコシ供給のほとんどを米国からの輸入に頼っていますが、食品として消費されるトウモロコシは大半がデント種であり、CBH351 系統もその種のトウモロコシに分類されます。既に米国での栽培実績がなくなった現在においても、CBH351 系統が他のトウモロコシに混入して日本に輸入される場合があり、より信頼性の高い検査が必要とされています。

これまでに、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法やPCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた遺伝子組換え作物の検知技術が開発されましたが、ELISA法及びそれに準ずるイムノクロマトグラフィ法は抗血清や抗体を必要とします。また、加工食品を検知する際には、検知対象をタンパク質とする場合、変性や分解によって発生する偽陰性が生じる可能性があります。現在では、PCR法によるDNA増幅反応が遺伝子組換え作物の検知において妥当な手段とされていますが、PCR法は最低でも2段階の温度変化の繰り返しを必要とする上、判定には電気泳動によるDNAの分離操作が不可欠であり、検査分野への応用においてその複雑な操作が課題でした。

【LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術であり、従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応及び簡易検出が可能である等、数々の利点を有する方法です。LAMP法の詳細な原理については栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

Eiken GENOME SITE; <http://loopamp.eiken.co.jp/>

2. キット内容

【キット内容 (48 テスト用)】

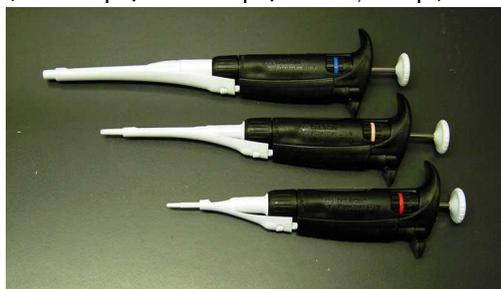
試薬	頭部ラベル表記	ラベル色	内容量	保管条件
取扱説明書	-	-	1 部	室温
検査用チューブ	-	-	48 本	室温
2x DNA 増幅試薬	2x RM	赤色	600 μ l	-20°C (遮光)
酵素液	EM	黄色	48 μ l	-20°C (遮光)
蛍光発色液	FD	紫色	48 μ l	-20°C (遮光)
陽性コントロール	PC	灰色	30 μ l	-20°C (遮光)
ミネラルオイル	MO	青色	1 ml	-20°C (遮光)
10x CBH351 検出用プライマーセット	10x PM CBH351 1st	緑色	30 μ l	-20°C (遮光)
10x 内在性 SSI II b 検出用 プライマーセット	10x PM zSSI II b	黄色	60 μ l	-20°C (遮光)
10x CBH351 確認用プライマーセット	10x PM CBH351 2nd	橙色	30 μ l	-20°C (遮光)
核酸フリー水	H ₂ O	青色	300 μ l	-20°C (遮光)

取扱上の注意

- * 取扱説明書、検査用チューブ以外の試薬は-20°C の冷凍庫内に遮光して保管し、ご購入後 6 ヶ月以内にご使用ください。
- * 過度の冷却は避けてください。
- * 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度-20°C の冷凍庫内に保管してください。過度の凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保管してください。
- * 酵素液を室温あるいは4°C の冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却により凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。
- * 陽性コントロールは、CBH351 系統に特徴的な *cry9C* 遺伝子発現カセット内部の配列の一部及びトウモロコシ内在性 *Starch Synthase IIb* 遺伝子の配列の一部を組み込んだ DNA 断片です。

3. 必要な機器、試薬

- マイクロピペット
(0.5-10 μ l、10-100 μ l、200-1,000 μ l)



- フィルター付マイクロチップ (滅菌済)



- 使い捨て手袋 (ラテックス製)



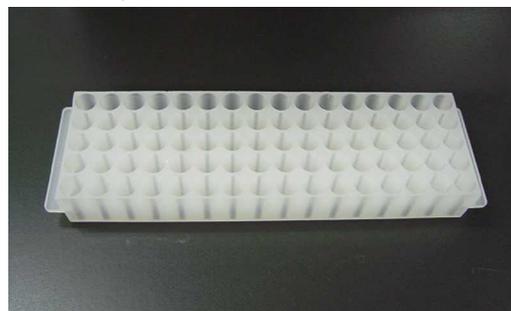
- 1.5 ml チューブ (滅菌済)



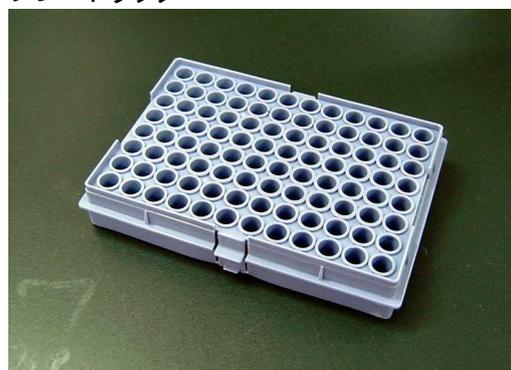
- 氷 (クラッシュアイス)



- チューブラック



- プレートラック



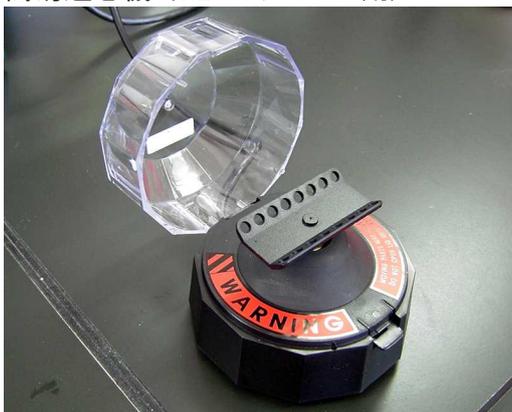
- ボルテックスミキサー



- 簡易遠心機 (1.5 ml 滅菌チューブ用)



- 簡易遠心機 (0.2 ml チューブ用)



- UV 照射装置

蛍光発色液による検出の際に使用します。
240–260 nm あるいは 350–370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。



- UV 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド



- ピンセット

- インキュベーター (恒温器)

ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアークューベーター等、60–65°C を一定時間保持できる機器が必要です。

- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液

- 70%エタノール

- 50 ml チューブ

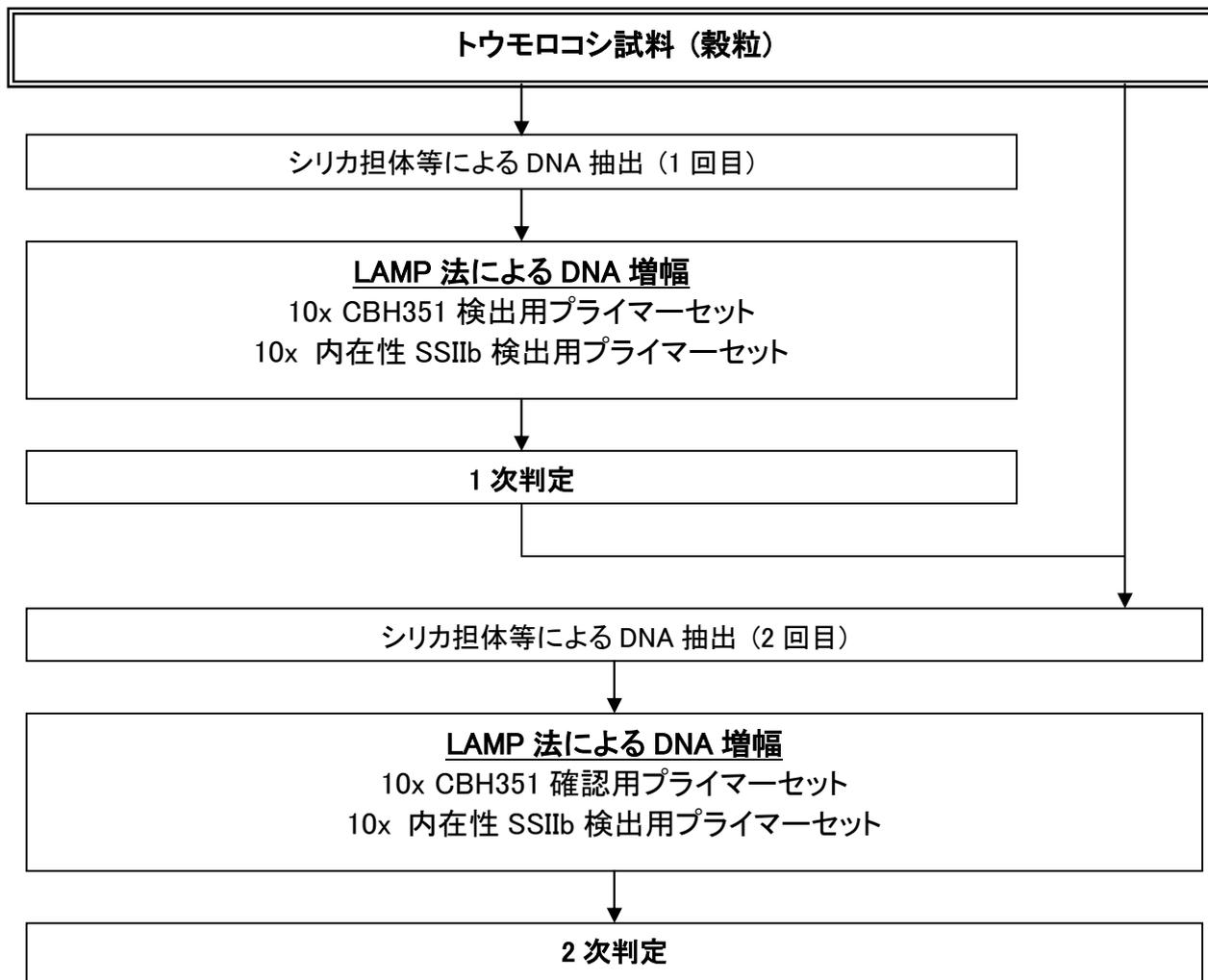
- ペーパータオル

- DNA 抽出キット

4. キット使用方法

【トウモロコシ穀粒からの検査フローチャート】

* 本キットの詳細な使用方法に関しては 7 ページ以降を参照してください。



【簡易マニュアル】

* 本キットの詳細な使用方法に関しては7ページ以降を参照してください。

1 トウモロコシ試料から抽出したゲノム DNA を準備する

2 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1 テスト分
2x DNA 増幅試薬	12.5 μ l
10x プライマーセット	2.5 μ l
蛍光発色液	1.0 μ l
酵素液	1.0 μ l
核酸フリー水	5.5 μ l
合計	22.5 μ l

* サンプル 2.5 μ l を添加して1テストあたり 25.0 μ l とする。

* 分注時の液量の不足を防ぐため、0.5-1 テスト分程度多めに作製する。

3 検査溶液を 22.5 μ l ずつ分注する

4 サンプル 2.5 μ l を添加する

陰性コントロール → 検査対象サンプル → 陽性コントロール

5 ミネラルオイルを 20.0 μ l 程度入れる (必要時)

6 65°C で 1 時間保温する (検査反応)

7 80°C で 2 分間保温する (反応停止)

8 判定を行う

検査の準備

【サンプルの準備】

■ コントロール

本キットには、検査の成否を確認するための陽性コントロールが添付されています。検査を実施する際は、陽性コントロールを添加する「陽性コントロール検査溶液」及び陽性コントロールを添加しない「陰性コントロール検査溶液」を検査ごとに作製してください。

■ サンプルの準備

サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣及び器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチューブ、検査後サンプル等は二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルのオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

<トウモロコシ穀粒の粉碎に関して>

市販のフードミル等の粉碎機を用いてあらかじめ粉碎したトウモロコシ穀粒を用意してください。乾燥試料に適した粉碎機を選択し、超音波ホモジナイザーは使用しないでください。コンタミネーションに備え、各部品を分解して十分な洗浄が可能である粉碎機を推奨しております。

また、粉碎後、メッシュ等を通した粉碎物が DNA 抽出用試料として適しています。

<シリカ担体等を用いた DNA 抽出に関して>

本キットでは、DNeasy Plant Maxi Kit (株式会社キアゲン) あるいは同等の性能を有するキットの使用を推奨しております。キットの使用方法に関しては、各キットに添付の取扱説明書を参照してください。

抽出した DNA の濃度は 10 ng/μl 以下にならないようにしてください。また、1 mM を超える EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 等のキレート化合物を含むと、誤判定の原因となります。本キットでは、最適な溶媒として超純水あるいは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を推奨しております。

【器具、機器の準備】

■ インキュベーター (恒温器)

インキュベーター (恒温器) の電源を入れ、温度を 65°C に設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要しますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて温度が 65°C に到達していることを確認してください。

【検査環境】

検査環境に陽性コントロールや検査後サンプル等、鋳型 DNA となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことがきわめて困難になります。LAMP 反応産物のキャップは絶対に開けないでください。

■ 作業区域

核酸抽出及び核酸増幅を実施していないクリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、試薬調製作業区域では陽性コントロール及び LAMP 法において鋳型 DNA となる核酸を含むサンプルの取り扱いを行わないでください。

■ 核酸除去操作

作業前後には、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。高温環境下における劣化が著しいため、2%水溶液調製後、経過日数や保存温度に注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。

<方法>

- ・ あらかじめ、有効塩素濃度 20,000 ppm (2%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用意します。
- ・ 作業前後に次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
- ・ 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。
- ・ 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	試薬調製作業区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	試薬調製作業区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブなど、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ (滅菌済)	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップなど、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	試薬調製作業区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	試薬調製作業区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

GM トウモロコシ CBH351 系統検知

1. トウモロコシゲノム DNA の抽出

1-1. トウモロコシ試料の粉砕

トウモロコシ穀粒をフードミル等の粉砕機を用いて粉砕し、トウモロコシ粉末試料を調製します。粉砕後、メッシュ等を通した粉砕物が DNA 抽出用試料として適しています。

1-2. トウモロコシゲノム DNA の抽出

市販の DNA 抽出キットを用いてトウモロコシゲノム DNA を抽出します。本キットでは、**DNeasy Plant Maxi Kit (株式会社キアゲン) あるいは同等の性能を有するキット**の使用を推奨しております。キットの使用方法に関しては、各キットに添付の取扱説明書を参照してください。

抽出したトウモロコシゲノム DNA の濃度は 10 ng/μl 以下にならないようにしてください。また、1 mM を超える EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 等のキレート化合物を含むと、誤判定の原因となります。本キットでは、最適な溶媒として超純水あるいは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を推奨しております。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

DNA 増幅試薬、検査に用いる 10x プライマーセット、核酸フリー水を取り出し、室温で完全に融解します。酵素液及び蛍光発色液は -20°C では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

2-2. 混合とスピンドウン



チューブを数回軽く叩いて混合（以下、タッピング）するか、ボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の攪拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下、スピンドウン）、試薬を氷上に静置します。

2-3. 検査溶液の作製



1.5 ml 滅菌チューブに下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の攪拌により混合した後、スピンドウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置します。以下の表を参照してください。

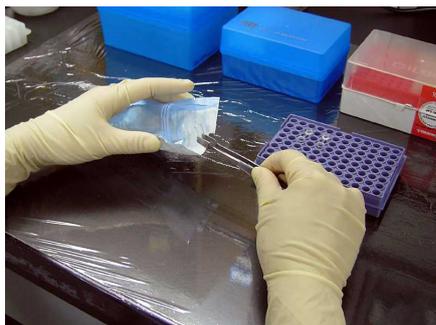
<1 テスト容量（サンプル 2.5 μl を添加して 25.0 μl とする）>

試薬	1 テスト分
2x DNA 増幅試薬	12.5 μl
10x プライマーセット	2.5 μl
蛍光発色液	1.0 μl
酵素液	1.0 μl
核酸フリー水	5.5 μl
合計	22.5 μl

重要

10x 内在性 SSIIb プライマーセットによる検査反応はトウモロコシ試料ごとに必ず行ってください。

2-4. 検査溶液の分注



核酸の汚染がないピンセットなどで検査用チューブを袋から取り出し、プレートラックに立てて検査用チューブ1本あたり検査溶液 22.5 μ l を分注します。

重要

本キットに添付の検査用チューブと容量、形状、及び材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、ご注意ください。

2-5. サンプルの添加

最初に、陰性コントロール検査溶液のチューブに核酸フリー水 2.5 μ l を添加し、キャップを閉じます。次に、トウモロコシゲノム DNA サンプル 2.5 μ l を検査溶液に添加し、キャップを閉じます。全てのサンプルを添加した後、陽性コントロール 2.5 μ l を陽性コントロール検査溶液のチューブに添加します。

蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますので、必要に応じて本キットに添付のミネラルオイルを 20.0 μ l 程度添加してください。

2-6. 検査反応



エアークューベーター

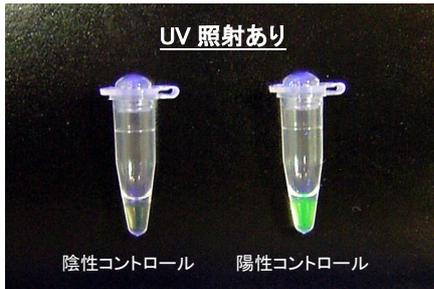


ヒートブロック

全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 \times 3 回の攪拌にて混合した後、スピンドウンを行い、インキュベーターを用いて 65°C で 1 時間保温します。

3. 判定

3-1. 検査の成否の判定



1 時間経過後、80°C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の蛍光発色液は淡赤色を呈しておりますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UV を照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途 UV 照射装置（波長：240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力）及び UV 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を全て無効とし、原因を究明してください。

重要

80°C での熱処理による反応停止は必ずしも必要ではありません。

本キットでは、検査結果の判定は 1 時間が経過した時点で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

3-2. サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中に CBH351 系統が存在する可能性があります。

<判定のポイント>

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「CBH351 系統陽性」と判定します。仮に蛍光の発色が微弱である場合でも、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められるサンプルは全て「CBH351 系統陽性」と判定してください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「CBH351 系統陰性」と判定します。

10x CBH351 検出用プライマーセット及び 10x 内在性 SSI**II**b 検出用プライマーセットで増幅が認められたトウモロコシ試料に関しては再度トウモロコシゲノム DNA を抽出し、10x CBH351 確認用プライマーセットを用いた確認検査により最終的な判定を行ってください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーン 遺伝子診断試薬部までお問い合わせください。

問題点	原因及び対処法
検査溶液が黄色を呈して判定が困難である	A. サンプルの持ち込み量が過剰である。 →本キットはきわめて高感度です。過剰なサンプルの持ち込み（指定量以上の液量、高濃度なサンプル）は誤判定の原因となりますので、ご注意ください。
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	A. 陽性コントロールの添加量が過剰である。 →陽性コントロールの添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。陽性コントロールの添加量は本取扱説明書の指示に従ってください。 B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。 →陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型 DNA となる核酸の混入が疑われます。試薬及び検査環境の汚染モニタリング、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。 →EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず 蛍光発色液 が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は 蛍光発色液 の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 D. 反応温度、操作手順に誤りがある。 →検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。 → 蛍光発色液 は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず 蛍光 の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となりますので、保管及び取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	A. 反応チューブが均一に加熱されていない。 →ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、 検査用チューブ が均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の ミネラルオイル を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	A. 励起波長が合っていない。 →240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。また、波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも 蛍光 を発して見える場合がありますので、陰性コントロール検査溶液を必ず作製し、発色を比較してください。

6. 参考文献

1. Dardenne F, Seurinck J, Lambert B, Peferoen M. (1990) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a cryIA(c) gene variant from *Bacillus thuringiensis*. *Nucleic Acids Res.* 18 (18): 5546
2. Lambert B, Hofte H, Annys K, Jansens S, Soetaert P, Peferoen M. (1992) Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol.* 58 (8): 2536
3. Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vliet A, Peferoen M. (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl Environ Microbiol.* 62 (1):80
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (12): e63
5. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* 12 (3):358
6. T. Matsuoka, H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isshiki, M. Toyoda and A. Hino. (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J Agric Food Chem.* 50 (7): 2100
7. 松岡猛、栗原秀夫、末藤晴子、三浦裕仁、日下部裕子、穉山浩、合田幸広、一色賢司、豊田正武、日野明寛; (2001) 遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統からの組換え遺伝子の検知法; 食品衛生学雑誌 42 (3): 197
8. 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> (独立行政法人農林水産消費技術センター)
9. 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (厚生労働省)

7. 付録

【品質管理】

各プライマーセットに関して、キットに添付の**陽性コントロール** 2.5 µl を検定用サンプルとして 25 µl (1 テスト分) のスケールで DNA 増幅反応を行い、65°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

各プライマーセットに関して、キットに添付の**核酸フリー水** 2.5 µl を検定用サンプルとして 25 µl (1 テスト分) のスケールで DNA 増幅反応を行い、65°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色しないことを確認しています。

【系統】

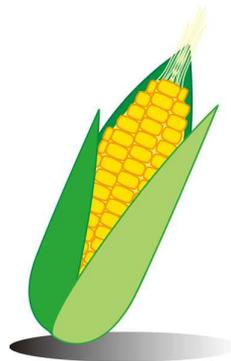
LAMP 法は 4 から 6 種類のプライマーを必要とする方法です。本キットに含まれる **10x 内在性 SSIIb 検出用プライマーセット**は、数系統のトウモロコシゲノム DNA の塩基配列中で特に保存された領域に基づいて設計されています。

【陽性コントロール】

本キットの陽性コントロールには、2.5 µl あたり約 400,000 コピーの標的配列が含まれています。



ニッポン・ジーン



- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2017 年 5 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーン WEB ページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン 遺伝子診断試薬部

TEL 076-442-3660

FAX 076-443-9120

E-mail gmo@nippongene-analysis.com

URL <http://nippongene-analysis.com>