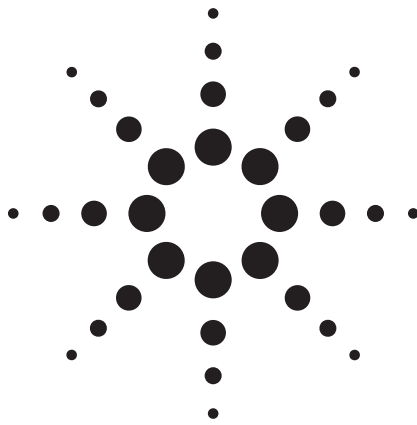




## Agilent 2100バイオアナライザによる 遺伝子組み換え作物の検出

### アプリケーション

Anne-Céline Minvielle, Ph.D.

Hafida Oujati

Séverine Dameron



### 概要

EU(欧州連合)では2000年1月以降、遺伝子組み換え作物（GMO）の含有量が1%を越える食品に表示を義務付けています。表示の透明性と正確さを確保するためには、遺伝子組み換え食品と非組み換え食品とを識別する手法が必要とされます。Genolife社により、ラウンドアップレディー大豆（RRS）の検出法と、5種類のトウモロコシ組み換え遺伝子（Bt176、Bt11、MON810、T25、GA21）を検出するためのマルチプレックスPCR法が開発されました。マルチプレックスPCR産物の分析については、Agilent 2100バイオアナライザとDNA 500 LabChip® キットにより、操作が簡単で処理能力が高く、標準化された分析を行うことが可能です。Genolife社により開発された手法では、食品中のRRSを0.01%まで検出することができます。また、MON810、GA21、Bt11の各遺伝子の検出限界は10コピー、Bt176、T25の検出限界は100コピーです。



Agilent Technologies

## はじめに

バイオテクノロジーが急速に発展したことにより、遺伝子組み換え作物（GMO）からつくられた製品が食品市場に出回るようになっていきます。しかし、一般市民のあいだでは、遺伝子組み換え技術に対する懸念が広がっています。遺伝子組み換え食品を消費者に受け入れてもらうためには、食品情報を明示し、透明性を保つことが不可欠です。EUでは、新規食品に関する規則258/97/EEC<sup>1</sup> および1139/98/EEC<sup>2</sup> により、GMOのラベル表示が義務付けられています。最近では、表示義務付けの対象となる食品を規定した「最低基準規則」49/2000/EEC<sup>3</sup> が承認されました。各食品のGMO含有量が1%を越える場合は、その旨を明示するよう定められています。さらに、GMOが偶発的に食品中に混入する可能性を回避するために適切な措置をとっていることを証明しなければなりません。透明性と表示の正確性を確保するためには、原材料だけでなく加工食品においても、遺伝子組み換え作物と非組み換え作物を識別できる手法が重要となります。

遺伝子組み換え食品中の核酸の組み換え配列を定量する手法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を使用した複数の分析法が開発されています<sup>4,5</sup>。しかしこうした手法では、1回の分析で、1種類の遺伝子組み換え作物につき1つの組み換え配列しか検出できません。1種類の遺伝子組み換え作物から複数の配列を検出したり（内在性遺伝子1つと複数の組み換え遺伝子マーカー）、1回の分析で複数のGMOをスクリーニングしたりすることができれば、分析の効率は大幅に向上します。そこで当社では、Monsanto社製ラウンドアップレディー大豆（RRS）の検出法と、トウモロコシ内在性遺伝子1種と組み

換え遺伝子5種（うちBt176、Bt11、MON810、T25の4種類はEUで認可、GA21は非認可）の検出法を開発しました。Agilent 2100バイオアナライザとDNA 500 LabChip<sup>®</sup> キットを使用すれば、操作が簡単で処理能力が高く、標準化された分析を行うことが可能です。

## 結果と考察

### 食品成分中のRRS検出

市販の遺伝子組み換え大豆標準品（Fluka）、およびGenolife社の策定した基準に基づく複数の食品サンプル（レシチン、大豆タンパク、大豆粉末）からDNAを抽出しました。各サンプルにつき、4回のPCR反応を行いました。うち1回は、内在性遺伝子（ACC1、115 bp）を増幅させ、抽出DNAの質を確認する目的で行いました。残りの3回のPCR反応により、RRS配列（T1: 167 bp、T2: 141 bp、T3: 189 bp）を特定しました。増幅

後、PCR産物を混合し、DNA 500 LabChipキットを装備したAgilent 2100バイオアナライザにより、各混合PCR産物につき1 µlを分析しました。Agilent 2100バイオアナライザでは、25 bpから500 bpまでのサイズのDNA断片を分析することができます。12種類のサンプルを同時に分析し、2100バイオアナライザにより未加工データを出力し、複数のフォーマットで解析しました。解析結果は、ゲルライクイメージとエレクトロフェログラムで表示されます。データテーブルにはそれぞれのピークが表示され、各断片のサイズや濃度といった情報が出力されます。分析結果を図1に示します。非組み換え大豆では、内在性遺伝子に対応するバンド（115 bp）のみが現れますが、1 % RRSおよび0.1 % RRSでは、内在性遺伝子（115 bp）および3種類のRRSの固有配列（141、167、189 bp）に対応する4つのバンドが現れています。

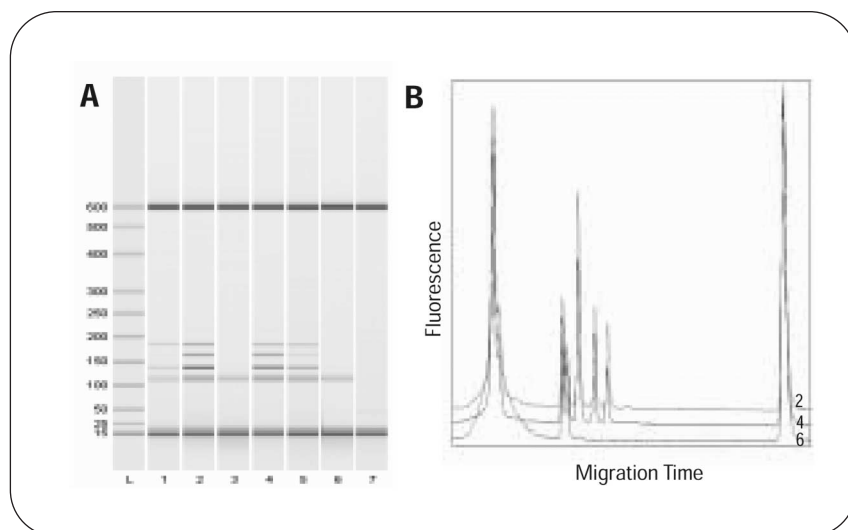


図1

### RRS大豆の検出

A) ゲルイメージ：1-大豆タンパク、2-レシチン、3-大豆粉末、4-1 %RRS、5-0.1 %RRS、6-非組み換え大豆、7-PCRブランク

B) レーン2、4、6のエレクトロフェログラムの重ね書き表示

Agilent 2100バイオアナライザ・ソフトウェアを使用すれば、未知のサンプルと市販の遺伝子組み換え大豆標準品とを比較することができます。大豆タンパクとレシチンは遺伝子組み換え品（115、141、167、189 bpの4バンド）、大豆粉末は非遺伝子組み換え品（内在性遺伝子に対応する115 bpのバンドのみ）です。2100バイオアナライザのソフトウェアは分析前に各サンプルに加えた内部標準（マーカー）のバンドの濃さと各サンプルのDNAバンドの濃さを比較する事により定量を行います。市販の遺伝子組み換え大豆標準品を既定量混入させたサンプルにおける組み換え遺伝子バンドの濃度と各サンプルのそれを比較すると、今回分析した大豆タンパクの組み換え遺伝子含有量は0.1%未満、逆にレシチンは1 % より多く含まれていると推定できました（表1）。本PCR分析法におけるRRSの検出限界は0.01 %でした。

|        | RR1 % | RR 0.1 % | 大豆<br>タンパク | レシチン |
|--------|-------|----------|------------|------|
| 141 bp | 1     | 0.24     | 0.12       | 1.3  |
| 167 bp | 0.1   | -        | -          | 0.34 |
| 189 bp | 1     | 0.56     | 0.48       | 1.3  |

表1  
組み換え遺伝子マーカーに対応するバンドのDNA濃度(ng/μl)

## マルチプレックスPCR法による食品成分中のGM0トウモロコシの検出

EUでは、4種類のGM0トウモロコシが認可されています。その内訳は、Novartis社の耐虫性トウモロコシ2種（Bt11、Bt176）、Monsanto社の耐虫性トウモロコシ1種（MON810）、Agrevo社のグルホシネート耐性トウモロコシ1種（T25）となっています。筆者らは、抽出DNAの品質確認に用いる内在性遺伝子1種とともに、これら4種のトウモロコシの遺伝子配列を一齐に検出できるマルチプレックスPCR法を開発しました。また、Monsanto社製グルホシネート耐性トウモロコシGA21を検出する複数のプライマーも追加しました。GA21は米国で認可されているため、認可種とともにEUに輸出される可能性があります。内在性遺伝子152bp、Bt176遺伝子343bp、T25遺伝子149bp、MON810遺伝子199bp、Bt11遺伝子

110bp、GA21遺伝子270bpを、マルチプレックスPCRにより増幅した分析結果を図2に示します。内在性遺伝子は、PCRブランクを除くすべてのレーンで増幅されています。PCRチューブにBt176トウモロコシのみが存在する場合は、Bt176遺伝子（343bp）のみが示されています（レーン4）。各トウモロコシについて、特異性を確認しました（レーン5：Bt11、レーン6：T25、レーン7：GA21、レーン8：MON810）。レーン1から3には、全トウモロコシ遺伝子配列をまとめて分析した際のPCR産物が示されています。本マルチプレックスPCR法では、それぞれ0.2 %レベル（レーン3）で存在するトウモロコシ5種の配列を検出することが可能です。検出限界は、MON810、GA21、Bt11の各組み換え遺伝子で10コピー、Bt176およびT25で100コピーでした。

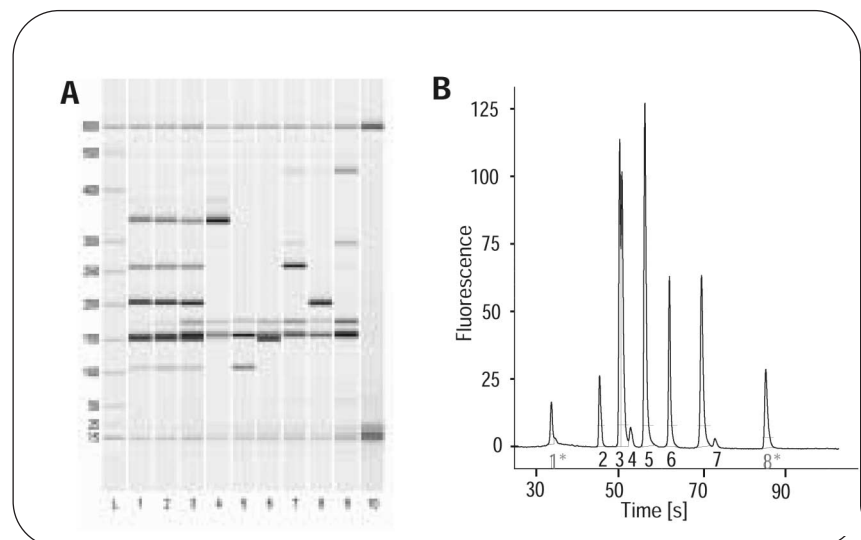


図2

マルチプレックスPCRによるGM0トウモロコシの検出

A) 1-Bt176 5 %, Bt11 2 %, T25 5 %, GA21 5 %, MON810 5 %, 2-Bt176 2 %, Bt11 2 %, T25 2 %, GA21 2 %, MON810 2 %, 3-Bt176 0.2 %, Bt11 0.2 %, T25 0.2 %, GA21 0.3 %, MON810 0.3 %, 4-Bt176 2 %, 5-Bt11 2 %, 6-T25 2 %, 7-GA21 2 %, 8-MON810 2 %, 9-非GM0トウモロコシ, 10-PCRブランク

B) レーン2のエレクトロフェログラム（各品種2 %ずつのトウモロコシ混合品によるマルチプレックスPCR）。各ピークは、Bt11トウモロコシ(2)、T25トウモロコシ(3)、内在性遺伝子(4)、MON810トウモロコシ(5)、GA21トウモロコシ(6)、Bt176トウモロコシ(7)を示す。

## 結論

食品成分中のGMO大豆およびGMOトウモロコシの検出法を開発しました。Agilent 2100バイオアナライザでマルチプレックスPCR産物を分析すれば、GMO含有量の半定量分析が可能です。本アプリケーションでは、RRSの検出法と、GMOトウモロコシの検出法をご紹介します。RRS分析の検出限界は0.01 %、マルチプレックスPCR法によるトウモロコシ分析の検出限界は10コピーおよび100コピーでした。

## 参考文献

1.  
Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. (新規食品および新規食品成分に関する欧州議会および理事会規則No 258/97、1997年1月27日) Official Journal L 043, 14/02/1997 p.0001-0007.

2.  
Council Regulation (EC) No 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labeling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. (特定の遺伝子組み替え作物から製造される特定食品のラベル表示義務 (79/112/EEC指令で規定されているものは除く) に関する欧州理事会規則No 1139/98、1998年5月26日) Official Journal L 159, 03/06/1998 p.0004-0007.

3.  
Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labeling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. (欧州委員会規則No 49/2000、2000年1月10日——特定の遺伝子組み替え作物から製造される特定食品のラベル表示義務 (79/112/EEC指令で規定されているものは除く) に関する欧州理事会規則No 1139/98の修正規則) Official Journal L 006, 11/01/2000 p.0013-0014.

4.  
Vaitilingom M., Pijnenburg H., Gendre F., Brignon P. (1999) Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in some representative Foods. J. Agric. Food Chem., 47, 5261-5266.

5.  
Zimmermann A., Hemmer W., Liniger M., Luthy J., Pauli U. (1998) A sensitive Detection Method for Genetically Modified MaisGarda Corn using a Nested PCR-system. Lebensm. Wiss. u. Technol., 31, 664-667.

Anne-Celine Minvielle (博士)、Hafida Oujati、Severine Dameronは、フランス、クレルモン・リマーニュにあるGenolife社の科学的研究員です。

[www.agilent.com/chem/labonachip](http://www.agilent.com/chem/labonachip)



LabChip® およびLabChipロゴは Caliper Technologies Corp.の商標として、米国および世界各国で登録されています。

Copyright© 2001 Agilent Technologies All Rights Reserved. 明示による許可のない本文書の複製・転載・翻訳を禁じます。ただし、著作権法により認められている場合を除きます。  
2001年11月1日発行、  
発行番号 (Publication Number) 5988-4847JAJP



Agilent Technologies