

収去・検出標準作業手順書（案）
（対象：遺伝子組換え酵母）

平成27年8月3日

製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

目次

第1章 はじめに.....	2
第2章 収去.....	3
1. 収去のための準備.....	3
2. 収去の方法の決定.....	3
3. 収去方法.....	4
(1) 土壌からの試料採取.....	4
(2) 排水等からの試料採取.....	4
(3) 壁や床からの試料採取.....	5
第3章 生菌の検出.....	6
1. 生菌検出のための準備.....	6
2. 生菌の検出方法.....	7
(1) 土壌からの生菌の検出（論理的検出下限：100cfu/g）.....	7
(2) 排水等からの生菌の検出（論理的検出下限：未希釈時（10cfu/ml）、希釈時（100cfu/ml）	8
(3) 壁や床面からの生菌の検出（論理的検出下限：1cfu/cm ² ）.....	8
第4章 PCRによる検出.....	9
1. 検出のための準備.....	9
2. 生菌が確認されたコロニーのPCR法による検出.....	9
第5章 PCRで増幅された産物のシーケンス.....	10
1. シーケンスのための準備.....	10
2. シーケンスによる確認.....	10
別紙.....	12

第1章 はじめに

本手順書は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第32条に基づき、経済産業大臣から立入検査における収去の指示により収去による検査をする際の組換え酵母を検出するための手順書である。以下の図1に主な収去・検出作業の流れを示す。

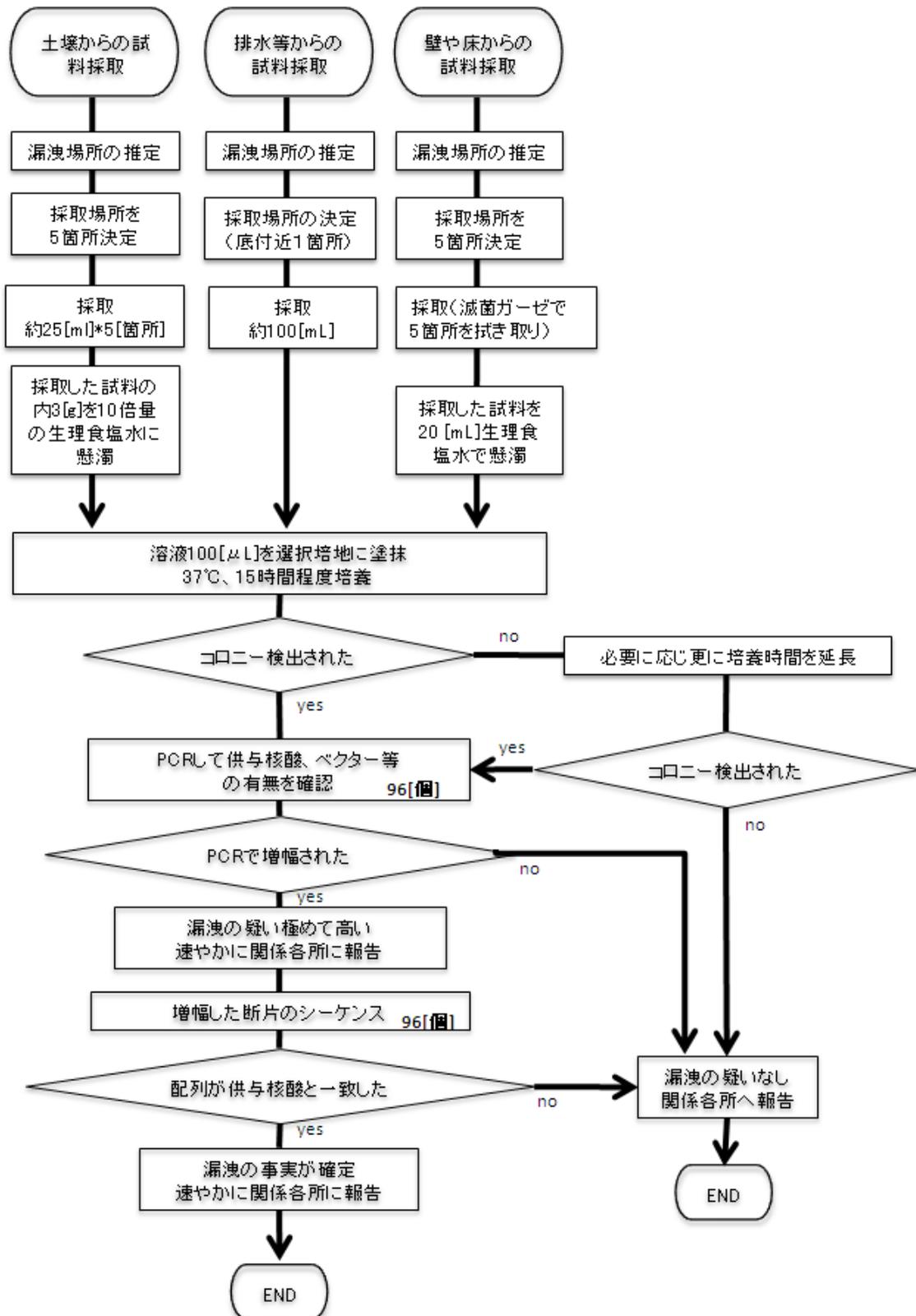


図1 主な収去・検出作業の流れ

第2章 収去

1. 収去のための準備

収去する環境試料は、立入検査の現場において現地調査、聞き取り調査等を行い総合的な判断をもって収去対象、及び収去範囲を決定する。よって、いかなる環境からも収去ができるように、次の「収去用具の区分」に示す器具類を原則として全て持参することとする。ただし、収去対象があらかじめ既知の場合においては、適宜、必要な器具を選択し持参してもよい。また、第3章での生菌の検出ができるよう選択培地等をあらかじめ準備すること（詳細は第3章を参照）。

収去した試料の検出実験の全ての作業は、NITE バイオテクノロジーセンター内の「遺伝子組換え実験安全管理規程」第15条に基づき承認を受けた立入検査における収去検査用の実験室（以下、「検査場所」という。）にて行い、収去した環境試料の取扱いは安全キャビネット内にて行うこと¹。

「収去用具の区分」

① 土壌採取用器具一式

- ・ 試料採取用滅菌済み容器（遠沈管 50～250ml 容量） 5 個以上
- ・ 滅菌済み採取用移植ごて 5 個以上
- ・ メジャー
- ・ 滅菌済み葉さじ

② 水採取用器具一式

- ・ 試料採取用滅菌済み容器（遠沈管 50～250ml 容量） 5 個以上
- ・ 滅菌済み採水用器具

③ 壁面等ふき取り採取器具

- ・ 滅菌ガーゼ（小サイズ、例「滅菌ハイディアー」折りたたまれた状態で 5cm×5cm サイズ）
- ・ 50ml 滅菌済みチューブ 20 個以上
- ・ 滅菌済みピンセット 20 本以上
- ・ メジャー
- ・ 生理食塩水（0.9%食塩水）

④ その他共通器具

- ・ 運搬用クーラーバック
- ・ 滅菌用 70%エタノール
- ・ 収去器具持ち帰り用オートクレーブバック
- ・ 洗浄、清掃用器具
- ・ キムワイプ・キムタオル
- ・ 使い捨てグローブ
- ・ 保護衣、マスク、保護メガネ
- ・ 保冷剤（現地購入）
- ・ パラフィルム
- ・ チャック付きビニル袋
- ・ 滅菌水
- ・ ガムテープ
- ・ 油性ペン

2. 収去の方法の決定

- ① 立入検査員は、漏洩等の事故の日時、量、状態について記録用紙に記載する。
- ② 立入検査員は、漏洩事故後に不活化処理が行われている場合は、その具体的な方法を記録用紙に記載する。

¹ 遺伝子組換え実験の全ての実験及び保管について適用する。

- ③立入検査員は、上記①、②のほか必要な情報を記録用紙に記録した後、収去する範囲を決定し、記録用紙に記載する。
- ④立入検査員は、決定した収去範囲の対象となる環境を確認し、記録用紙に記載する（必要に応じて被検査者の了解を得た後、写真撮影する）。
- ⑤立入検査員は、収去対象に応じて収去方法を決定し、記録用紙に記載する。
- ⑥立入検査員は、収去対象及びサンプル数を NITE バイオテクノロジーセンターの検出検査を行う担当者（以下、「検出検査担当者」という。）に連絡をする。
- ⑦立入検査員は、収去する旨を被検査者に伝えるとともに、経済産業省及び被検査者等から遺伝子組換え生物等に関し必要と思われる情報は可能な限り入手する。

3. 収去方法

立入検査員は収去対象となる環境に応じ、以下（1）～（3）に従い収去を行う。

（1）土壌からの試料採取

- ①試料採取地点は、図2に示す漏洩場所の中心点A、及び中心点Aから4つの方向に等距離をとったB～E地点の5ポイントとし、採取地点を別紙「立入検査用記録用紙」に記録する。なお、中心点AからB～E地点までの距離は、漏洩範囲に応じ立入検査員が適宜決定する。また必要な場合は、図2に示す漏洩がおよんでいないはずの地点F～Iについてもネガティブコントロール試験用の試料として採取を行い、同様に記録する。
- ②試料採取地点から殺菌済みの採取器具を用いて25ml容量を目安に表面から深さ3cm程度までの土壌を採取し、滅菌済みの容器に入れ密閉する。
- ③採取した容器に採取した区画等について、シールの貼付等による方法で明記する。
- ④試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。なお、保冷剤が容器に直接接触することにより試料が0℃以下とならないように、保冷剤が直接容器に接触しないように工夫する。
- ⑤試料は検査期間中、低温で保存する。

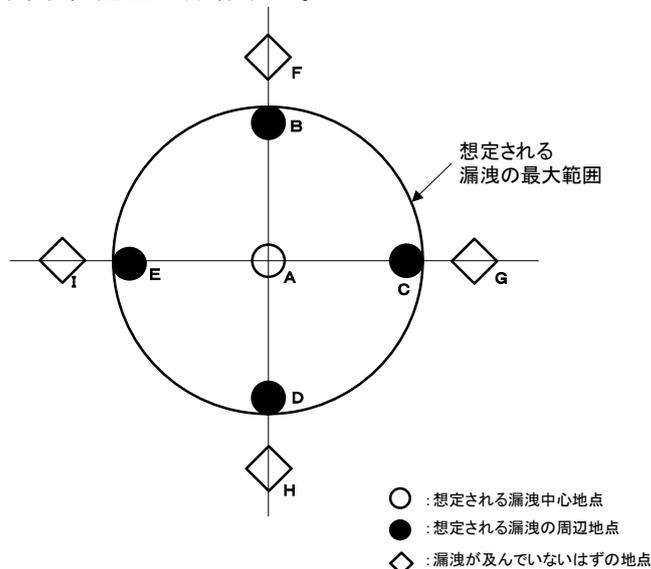


図2 5地点の採取法（例）

（2）排水等からの試料採取

- ①滅菌済みの採取器具を用いて、漏洩事故状況を勘案して、最も漏洩した遺伝子組換え生物等が含まれていると考えられる箇所（例えば排水マス）について、任意の5箇所から採水する。採水する深さは、採水する地点の底付近とし、100ml程度を採水し、滅菌済みの容器に入れ密閉する。
- ②採取した容器表面に、採取した場所、深さ（例えば排水マスの底部中心と四方4箇所等）

等について、シールの貼付等による方法で明記する。

- ③試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。なお、保冷剤が容器に直接接触することにより試料が0℃以下とならないように、保冷剤が直接容器に接触しないように工夫する。
- ④試料は検査期間中、低温で保存する。

（3）壁や床からの試料採取

ケース 1 亀裂の入った壁面（内外両方実施）

- ①収去範囲を亀裂の周囲 5cm 幅とする（図 3 参照）。
- ②50ml チューブにあらかじめ滅菌済みの生理食塩水を 3ml 入れておく。
- ③滅菌ガーゼを 50ml 容チューブ内で 3ml の生理食塩水で湿らせる。
- ④滅菌済みピンセットで前記③の湿らせた滅菌済みガーゼを挟み壁面を拭く。
- ⑤拭いたガーゼを生理食塩水の入った 50ml 容チューブに入れ、更に 17ml の生理食塩水を加え、密閉する（合計 20ml の生理食塩水を使用）。
- ⑥10cm 区画を拭き取ったごとにガーゼをかえ②③を繰り返し、収去範囲全てをふき取る。
- ⑦採取した容器に採取した区画等について、シールの貼付等による方法で明記する。
- ⑧試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。なお、保冷剤が容器に直接接触することにより試料が0℃以下とならないように、保冷剤が直接容器に接触しないように工夫する。
- ⑨試料は検査期間中、低温で保存する。

ケース 2 通常の壁面及び舗装面

- ①収去範囲を 10cm 間隔で区分する。
- ②50ml チューブにあらかじめ滅菌済みの生理食塩水を 3ml 入れ、滅菌ガーゼを 50ml 容チューブに入れ、滅菌済みの生理食塩水で湿らせる。
- ③選択した区画を滅菌済みピンセットで湿潤させた滅菌済みガーゼを挟み設定した 5 区画（10cm 角）の壁面等を拭く。
- ④拭いたガーゼを滅菌済みの 50ml 容チューブに入れ、更に 17ml の生理食塩水を加え、密閉する（合計 20ml の生理食塩水を使用）。
- ⑤採取した容器に採取した区画等について、シールの貼付等の方法で明記する。
- ⑥試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。なお、保冷剤が容器に直接接触することにより試料が0℃以下とならないように、保冷剤が直接容器に接触しないように工夫する。
- ⑦試料は検査期間中、低温で保存する。

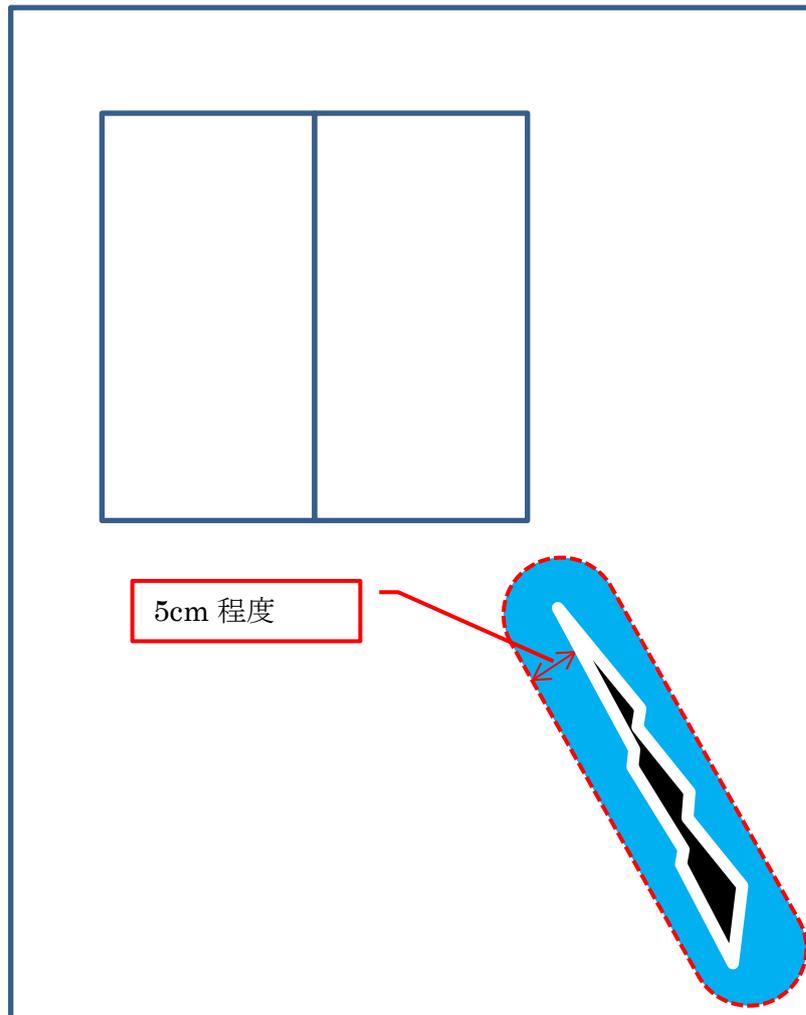


図3 亀裂での収去範囲（例）

第3章 生菌の検出

1. 生菌検出のための準備

検出検査担当者は、原則として大臣からの立入検査の指示後、立入検査時まで、対象案件の申請書の遺伝子組換え生物等に関する情報から選択培地（利用できる抗生物質等の選択マーカーも利用）を選び、以下に示す生菌を検出するための機械・器具等を準備すること。特に、第2章2.⑦の連絡後速やかに④の選択培地プレートを用意すること。検出までの標準作業期間は原則として収去翌日から7日とする。

①機器

- ・オートクレーブ
- ・安全キャビネット
- ・ミキサー（又は振とう機）
- ・インキュベーター（恒温槽）
- ・直示式天秤

②器具

- ・滅菌済みシャーレ 100枚程度（直径9cm程度）
- ・100ml用滅菌済み容器（密栓可のもの）
- ・滅菌済み10mlメスピペット
- ・滅菌済み1mlメスピペット
- ・安全ピペッター
- ・100 μ l用マイクロピペット

- ・滅菌済み 100 μ l 用ピペットチップ 100 本程度
- ・コロニーカウンター又はマジック等
- ・試薬皿（又は薬包紙等）
- ・培地調整用フラスコ等（容量は試料数に応じて調整）
- ・（コンラージ棒）
- ・滅菌済み 15ml 用チューブ 10 本程度

③試薬

- ・滅菌済み生理食塩水 1L 程度
- ・選択培地等
- ・70%エタノール

④選択培地プレート（平板培地）

【遺伝子組換え酵母の場合】

- 原則として YPD 寒天培地を利用する。
- 三角フラスコ等に選択培地等を規定量で調製し、軽く封をして 121°C・15min で滅菌する。
- 滅菌後、60°C程度になるまで封をしたまま冷却後、カナマイシンとクロラムフェニコールを添加する（抗生物質濃度 共に 50ug/ml）。また目的の遺伝子組換え生物等の選択培養に利用できる抗生物質等の選択マーカがある場合は、適宜至適量を加える。なお、嫌気培養においても、カビの増殖が認められる場合は、抗カビ剤（0.2% プロピオン酸ナトリウム等）を培地に加えて、カビの増殖を防ぐ。
- 安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で、冷めた培地を手早くシャーレに 20ml 程度ずつまき、蓋をする。
- 試料数の 5 倍以上の枚数のプレートを作成する。
- 培地が固まるまで安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内に置いておく。

⑤ポジティブコントロール試験

- ・目的の遺伝子組換え生物等を選択培養する場合は、原則として以下例のポジティブコントロール試験を行う。
 - 漏洩した遺伝子組換え生物等と同じ、又は、同等の遺伝子組換え生物等を、ストックしている場合は、環境試料と同様に収去し、平板培養で生育してきたコロニーを観察する。
 - 検出実験に使用する同一な寒天培地を使用して、生育することがあらかじめ分かっている遺伝子組換え生物等を利用して平板培養を行い、生育することを確認する。

2. 生菌の検出方法

検出検査担当者は収去した試料に応じ、以下（1）～（3）に従い生菌の検出を行う。

（1）土壌からの生菌の検出（論理的検出下限：100cfu/g）

「3.（1）土壌からの試料採取」の方法により 5 地点から採取した土壌試料の全てを以下の方法によって、それぞれ生菌の検出を行う。また必要に応じて適宜漏洩が及んでいないネガティブコントロールとして採取した試料についても生菌が検出されないことを確認する。

- ①収去した土壌をボルテックスミキサー等によりよく攪拌する。
- ②土壌 2g 程度を直示式天秤で量り取る。
- ③滅菌済みの 50ml の容量の容器（50ml 遠沈管）に土壌を移し、10 倍量の生理食塩水を（土壌が 2g であれば 20ml になるように加え栓をする。
- ④容器をミキサー等で振り混ぜ懸濁する。
- ⑤懸濁した溶液を用意した平板培地に 100 μ l ずつまきコンラージ棒で塗抹し、素早く蓋をする（原則として不活化処理後の試料を想定しているが、漏洩後の処理状況等の情報に合わせ希釈が必要な場合は適宜希釈すること）。
- ⑥試料を塗抹する平板培地の枚数は 5 枚（n=5）とする。
- ⑦試料を塗抹した平板培地を嫌気培養用の角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れ、

脱酸素・炭酸ガス発生剤を入れ、素早く密閉する。

- ⑧角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れた平板培地を至適温度（例：酵母は 30℃）で 3 日間程度（コロニーの直径 1mm 程度になるまで適宜時間を調整）嫌気培養する。（長時間培養することにより、他の菌が増殖してくる場合があるので注意する。）
- ⑨培養後、発生したコロニーを選別し、その数を計測する。
- ⑩コロニーが見られなかったときは、必要に応じてさらに培養を継続することとする。
- ⑪宿主と同種と思われるコロニーを検出した場合は直ちにその旨を関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。宿主と同種と思われるコロニーは検出されなかった場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

(2) 排水等からの生菌の検出（論理的検出下限：未希釈時（10cfu/ml）、希釈時（100cfu/ml）
「3.（2）排水等からの試料採取」の方法により 5 地点から採取した試料の全てを以下の方法によって、それぞれ生菌の検出を行う。

- ①試料の濁度を目視で確認し、試料を直接プレートに塗抹できるか判断し、必要に応じて、以下の②～④の操作をする。
- ②安全キャビネット内で、安全ピペッターを使用してメスピペットで試料 1ml はかり、15ml 容滅菌済み容器に入れる。
- ③安全ピペッターを使用してメスピペットで滅菌済み生理食塩水 9ml はかり、試料の入った 15ml 容容器に加え 10 倍希釈する。
- ④容器を振とうさせ、攪拌する。
- ⑤試料を平板培地に 100 μ l ずつまきコンラージ棒で塗抹し、素早く蓋をする（原則として不活化処理後の試料を想定しているが、漏洩後の処理状況等の情報に合わせ希釈が必要な場合は適宜希釈すること）。
- ⑥試料を塗抹する平板培地の枚数は 5 枚（n=5）とする。
- ⑦試料を塗抹した平板培地を嫌気培養用の角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れ、脱酸素・炭酸ガス発生剤を入れ、素早く密閉する。
- ⑧角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れた平板培地を至適温度（例：酵母は 30℃）で 3 日間程度（コロニーの直径 1mm 程度になるまで適宜時間を調整）嫌気培養する。（長時間培養することにより、他の菌が増殖してくる場合があるので注意する。）
- ⑨培養後、発生したコロニーを選別し、その数を計測する。
- ⑩コロニーが見られなかったときは、必要に応じてさらに培養を継続することとする。
- ⑪宿主と同種と思われるコロニーを検出した場合は直ちにその旨を関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。宿主と同種と思われるコロニーは検出されなかった場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

(3) 壁や床面からの生菌の検出（論理的検出下限：1cfu/cm²）

「3.（3）壁や床からの試料採取」の方法により 5 地点から採取した試料の全てを以下の方法によって、それぞれ生菌の検出を行う。①安全キャビネット内でガーゼの入った 15ml 容容器に安全ピペッターを使用してメスピペットで滅菌済み生理食塩水 10ml はかり栓をする。

- ②容器を振とうさせ、攪拌する。
- ③試料を平板培地に 100 μ l ずつまきコンラージ棒で塗抹し、素早く蓋をする（原則として不活化処理後の試料を想定しているが、漏洩後の処理状況等の情報に合わせ希釈が必要な場合は適宜希釈すること）。
- ④試料を塗抹する平板培地の枚数は 5 枚（n=5）とする。
- ⑤試料を塗抹した平板培地を嫌気培養用の角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れ、脱酸素・炭酸ガス発生剤を入れ、素早く密閉する。
- ⑥角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れた平板培地を至適温度（例：酵母は 30℃）

で3日間程度（コロニーの直径1mm程度になるまで適宜時間を調整）嫌気培養する。
（長時間培養することにより、他の菌が増殖してくる場合があるので注意する。）

- ⑦培養後、発生したコロニーを選別し、その数を計測する。
- ⑧コロニーが見られなかったときは、必要に応じてさらに培養を継続することとする。
- ⑨宿主と同種と思われるコロニーを検出した場合は直ちにその旨を関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。宿主と同種と思われるコロニーは検出されなかった場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

第4章 PCRによる検出

1. 検出のための準備

収去した遺伝子組換え生物等の宿主、ベクター、挿入DNAのPCR増幅による判別が可能なように大臣指示後直ちに、対象案件の申請書から特異的プライマーが設計できるか検討を行うこと。申請書で塩基配列情報が入手できない等の理由によりプライマーが設計出来ない場合は、申請書情報の生物種及び遺伝子情報を参考に公共のデータベースから塩基配列情報を入手し、特異的プライマーを複数組設計すること。検出検査開始前までにプライマーを注文し入手する。

また想定されるPCR産物長を算出し、適切なサイズマーカを選択するなど、事前に実験の準備を行うこと。

PCRによる検出の標準処理期間は原則として収去翌日から1週間とする。

①機器

- ・PCR用サーマルサイクラー
- ・電気泳動装置
- ・滅菌済み竹串等
- ・ゲルスキャナー

②器具

- ・PCR用96ウェルプレート
- ・チューブラック、プレートラック
- ・マイクロピペット
- ・0.2、0.5、1.5、2ml等マイクロチューブ

③試薬

- ・PCR用試薬
- ・プライマー（宿主²、ベクター、挿入DNA用）
- ・電気泳動用ゲル（アガロース）
- ・電気泳動用バッファー
- ・ゲル染色用試薬（エチジウムブロミド等の染色試薬）

2. 生菌が確認されたコロニーのPCR法による検出

- ①選択培地に生えた宿主と想定されるコロニーから96個を目安に選び出す。コロニーの総数が96個に満たない場合は、全数を対象とする（ただし、収去現場の状況やサンプル数等によっては、更に数を増やしてもよい。）。
- ②96ウェルPCRプレートにTEあるいは滅菌蒸留水等20 μ lを加える。
- ③滅菌済み竹串（爪楊枝及びチップでも可）でコロニーをつつき、96ウェルPCRプレートの滅菌蒸留水に植菌し、懸濁する。
- ④コロニー懸濁液20 μ l入りの96ウェルPCRプレートから半分の10 μ lを再試験用として平底プレートに移し替え、シールをして保管する（再試験用に適宜液体培地を入れて培養を行い、グリセロールストック等としても保管する。PCR反応は液体培養後あるいはグリ

² 宿主用プライマー：16S rDNA領域（細菌）、26S（28S）rDNA領域（真菌）

セロールストック等の保管試料から PCR 反応を行ってもよいが、再試験以外はコロニーダイレクト PCR を優先的に行う。)

- ⑤10 μ l のコロニー懸濁液が入った 96 ウェル PCR プレートは、5 分間ボイルした後、2 μ l 程度を PCR 増幅用の鋳型とする。ただし、PCR 反応の鋳型量は PCR 反応液量の 1/10 を越えないように注意する。
- ⑥過去において 16S 又は 26S (28S) rDNA 等の PCR 増幅が可能な市販の PCR キットを利用して、キットの至適条件で PCR 反応を行う (反応液量は 25 μ l 以上とする)。
- ⑦PCR 反応後、電気泳動用ゲルのコームに PCR 反応液をバンドが確認できると推察される適量をローディングダイに混ぜた後に入れ、泳動マーカールとともに電気泳動を行う。
- ⑧電気泳動後、ゲル染色用試薬で染色反応を行う。
- ⑨染色したゲルのバンドの有無を確認する。
- ⑩宿主、ベクター、挿入 DNA のいずれの領域も増幅されたコロニーがないか確認する。
- ⑪宿主、ベクター、挿入 DNA のいずれの領域でも増幅されたコロニーを確認した場合は直ちにその旨を関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。宿主と同種と思われるコロニーは検出されなかった場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

第 5 章 PCR で増幅された産物のシーケンス

1. シーケンスのための準備

宿主、ベクター、挿入 DNA の全てで増幅が見られたコロニーが検出された場合は、申請書のほか必要に応じて文献等を調査し、シーケンス用プライマーの設計を行うこと。挿入 DNA の情報については、立入検査員から入手すること。シーケンスによる判定の標準処理期間は原則として収去翌日から 2 週間とする。

①機器

- ・サーマルサイクラー
- ・DNA シーケンサー

②器具

- ・PCR 用 96 ウェルプレート
- ・チューブラック、プレートラック
- ・マイクロピペット
- ・0.2、0.5、1.5、2ml 等マイクロチューブ

③試薬

- ・シーケンス用試薬
- ・シーケンス用プライマー

2. シーケンスによる確認

- ①PCR 産物各 96 個ずつを目安にテンプレートとしてシーケンス反応を行う (PCR 反応はサーマルサイクラーに合わせ、過去の実験において最も安定して解析可能な反応条件を適宜利用する)。
- ②宿主、ベクター及び挿入 DNA のシーケンス反応後、それぞれ 96 ウェルプレート毎に DNA シーケンサーで解析する。
- ③宿主、ベクター、挿入 DNA の配列それぞれを決定する。
- ④宿主、ベクター、挿入 DNA の配列が申請書等 (申請書に配列情報が記載されていない場合は、立入検査において入手した配列情報等あるいは公共のデータベース等から宿主、ベクター、挿入 DNA とされる配列情報を入手する) の情報と一致している否かの確認を行う。
- ⑤全て一致したコロニーが存在した場合は、遺伝子組換え体を検出した事実及びその検出量について、直ちに関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。漏洩したとされる遺伝子組換え生物等と異なる場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

第 6 章 主な試薬の調整及び必要な器具

収去検出の実験作業で利用する汎用試薬は、原則として検査毎に調整することとする。また使用しないで保存する場合においても、四半期に1度は作り直すこととする。汎用プライマーやゲル染色試薬等を除き1度でも使用した場合は、その後の収去検出の実験作業には利用しないこと。

- ①滅菌蒸留水
 - ②70%エタノール
 - ③生理食塩水
 - ④マッコンキー寒天培地
 - ⑤プライマー
 - ⑥電気泳動用ゲル
 - ⑦電気泳動用バッファー
 - ⑧ゲル染色試薬
- ①滅菌蒸留水
超純水を 121℃、15 分以上オートクレーブで処理して使用する。オートクレーブ処理後、ガラスビン中で室温保存する。滅菌水はコンタミネーションの原因となり易いので、できるだけ使用量に見合う分ずつ小分けして、一度開封したものは再使用しないようにする。
 - ②70%エタノール
試薬特級のエタノールを①で調整した滅菌蒸留水を加え、70%に調整する。滅菌済みの瓶に入れ使用にあたっては、滅菌作業に利用する。
 - ③生理食塩水
塩化ナトリウムを超純水で 0.9%の濃度になるように調整し、121℃、15 分以上オートクレーブで処理して使用する。
 - ④YPD 寒天培地
酵母エキス 10 g、ペプトン 20 g、グルコース 20g、寒天 15 g を加熱して溶解させ、121℃、15 分以上オートクレーブした後、ある程度冷却させ、適宜抗生物質を添加し、シャーレに分注し、寒天培地を作製する。
 - ⑤プライマー
プライマーは、オリゴ合成会社等に発注し、発注先の品質確認データを入手し品質確認を行うこと。
プライマー溶液のコンタミネーション等の異常は、直接結果に影響を与えるので、取り扱いに当たっては、次の注意事項を厳密に守ること。
 - ・希釈に使用する TE および滅菌水は、できるだけ使用の間近に滅菌して使用する。
 - ・分注・希釈作業は、他の作業と別に行う（クリーンベンチ内が望ましい）。
 - ・コンタミネーションを起こした場合やそう思われる場合は速やかに処分する。
 - ・凍結融解を繰り返すまたは 4℃での保存で遮光をしないとプライマーは劣化するので、注意して使用する（100 反応ずつ小分けし凍結保存が望ましい）。
 - ⑥電気泳動用ゲル
NITE で利用頻度の高い、「SeakemGTG Agarose」等 DNA の分離能の確認されている電気泳動用ゲルを利用する。目的の分離したい DNA サイズによりゲル濃度を適宜調整する。
 - ⑦電気泳動用バッファー
原則として NITE で利用頻度の高い TBE バッファーとする。
 - ⑧ゲル染色試薬（エチジウムブロミド溶液等の染色試薬）
エチジウムブロミドの場合は、10mg/ml の濃度になるように超純水で溶液を作製しストックとする。
ゲルの染色の際は、エチジウムブロミド溶液等の染色試薬を最適な染色可能な濃度に希釈して染色する。
 - ⑨嫌気培養用器具等
 - ・脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ等）
 - ・角形ジャー容器（アネロパック・ケンキ角形ジャー等）
 - ・ダブルチャック付き袋（アネロパック・ケンキ用ダブルチャックパウチ袋等）

立入検査用記録用紙

	管理用仮番号：
1. 立入検査対象者の氏名及び住所、 代表者名及び収去立会人氏名	
2. 立入検査実施年月日	
3. 収去対象試料	
①遺伝子組換え微生物の情報（宿 主、ベクター、挿入 DNA 等）	
②漏洩等の事故の日時、量、状態 （培地等）	
③不活化処理の方法（処理日時、 薬剤等の別、濃度、投入量、攪 拌方法等）	
④漏洩等の事故以降の天候状態	
⑤その他収去試料に関する重要な 事項	
4. 収去場所施設名、位置、見取り 図、写真 ³	
5. 収去試料の量	
6. 立入検査員氏名	

³ 様式内に記載出来ない場合は適宜別紙を利用すること（他の項目も含む）。