SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. B106

MCE

遺伝子に基づく食品中の肉種の判別

食の安心、安全を守るために、食品衛生法や JAS 法等の法令に基づいて、原産地や肉種、部位などを表示するよう定められています。また、イスラム教やユダヤ教では宗教上、豚肉の摂取は厳しく禁じられており、食肉および食肉製品に含まれる肉種の情報は非常に重要です。このように様々な消費者の安心と品質を保証するための肉種判別技術が求められています。

肉種を判別する方法は、タンパク質に基づく方法（ELISA：酵素結合免疫吸着法）と遺伝子に基づく方法（PCR：ポリメラーゼ連鎖反応）があります。タンパク質に基づく方法は比較的簡単で安価に分析できますが、種の近いものの判別や加工食品からの分析には向かないとされています。一方、遺伝子に基づく方法は DNA が比較的熱に対して安定なことから、加工食品でも分析が可能とされています。遺伝子による肉種判別では、ミトコンドリア DNA 上のシトクロム b 遺伝子がターゲット配列として用いられます。ここでは、ウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ヤギからの DNA 検出例に加えて、食肉加工品からの肉種判別の分析例について紹介いたします。

Sogabe

図 1　精肉試料：ウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ヤギ

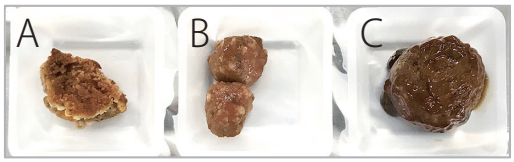


図 2　食肉加工品 3 点（A、B、C）

サンプルおよび前処理

サンプルとしてウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ヤギの精肉および食肉加工品 3 点（A、B、C）を用いました。サンプルの前処理から肉種判別までの流れは図 3 に従って実施しました。

精肉サンプル 5 mg に 100 μL の試料溶解液（表 1）を加えました。食肉加工品については 50 から 100 mg のサンプルに対して 500 μL 試料溶解液を加えました。上記サンプル試料溶液にφ2 mm のジルコニアビーズを加え、ビーズ式細胞破砕装置にて 5000 rpm、30 sec、25 ℃の条件で試料を粉砕しました。試料懸濁液を 5000 rpm、5 min、25 ℃にて遠心し、できるだけ固形物を除きました。上清を別のチューブに移し、95 ℃、5 min 加熱処理して Proteinase K を失活させました。この試料溶液を PCR の鋳型試料として用いました。

表 1　試料溶解液

Tris･HCl pH8.0	20 mM
EDTA	5 mM
NaCl	400 mM
SDS	0.30 %
Proteinase K	200 μg/mL

PCR

前処理で得られたサンプル懸濁液のうち 0.5 μL を PCR の鋳型として用いました。PCR の方法は松永らの論文（日本食品化学工学会誌, 46(3), 187, 1999）を参考にしました。PCR の反応液の組成と PCR プログラムは表 2 の通り実施しました。

表 2　PCR 条件

反応液		PCRプログラム
2x Ampdirect™ plus	10 μL	95 ℃, 10 min
BIOTAQ™	0.5 U	94 ℃, 30 sec
primer-F	2 μM	60 ℃, 60 sec　35 cycles
primer-R	2 μM	72 ℃, 90 sec
Distilled Water	up to 20 μL	72 ℃, 7 min

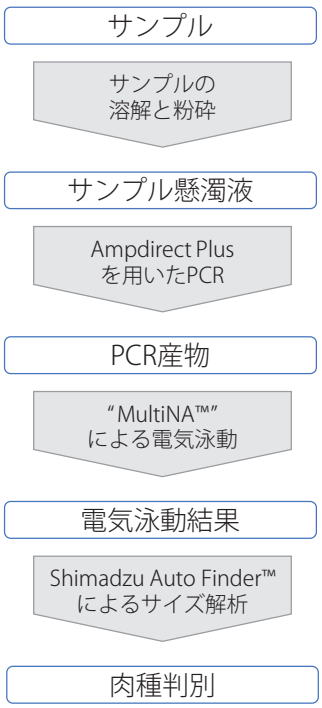


図 3　分析プロトコル

■電気泳動と肉種判別

PCR 産物をマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA で電気泳動を行い、サイズの確認を行いました。MultiNA での分析は MultiNA 専用の DNA-500 キットを用いました。食肉加工品サンプルの分析データについては Shimadzu Auto Finder を用いて肉種特有のサイズを検出し、肉種の同定を行いました。

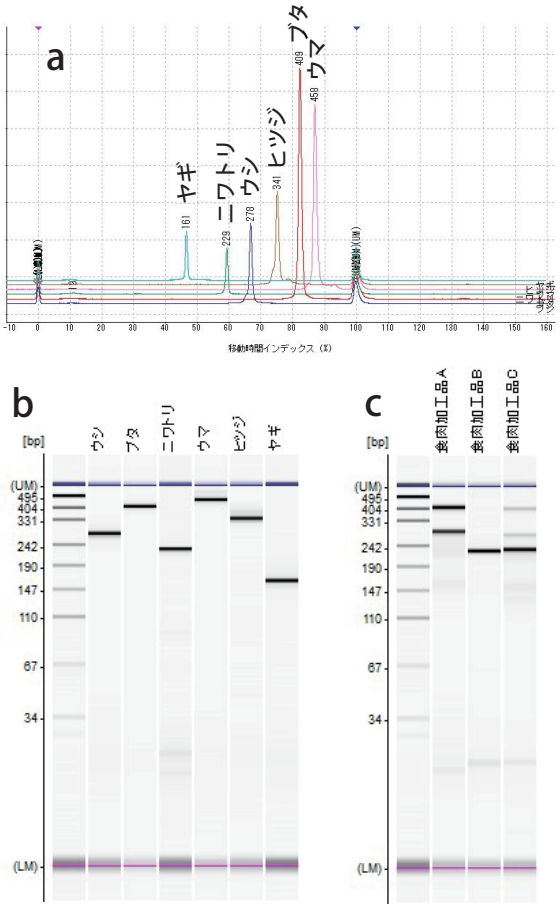
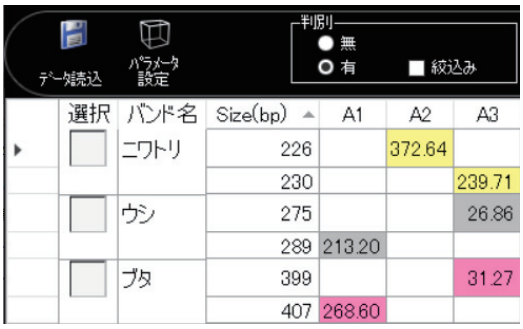


図 4　MultiNA による PCR 産物の電気泳動結果
（エレクトロフェログラムとゲルイメージ）
a：精肉サンプルのエレクトロフェログラム、
b：精肉サンプルのゲルイメージ、
c：食肉加工品 3 点のゲルイメージ



選択	バンド名	Size(bp)	A1	A2	A3
	ニワトリ	226		372.64	
		230			239.71
	ウシ	275			26.86
		289	213.20		
	ブタ	399			31.27
		407	268.60		

図 5　Shimadzu Auto Finder による食肉加工品三種の肉種判定結果
A1：食肉加工品 A、A2：食肉加工品 B、A3：食肉加工品 C
データ内の数字はピーク強度（mV）

■結果

6 種類の精肉と食肉加工品 3 点の分析結果を図 4 に示します。松永らの方法ではウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ヤギの精肉からの PCR によって増幅される DNA のサイズはそれぞれ 274 bp、398 bp、227 bp、439 bp、331 bp、157 bp とされています。本分析においてもそれぞれ明瞭に検出することができました（図 4a、b）。

食肉加工品については A からは 2 つ、B からは 1 つ、C からは 3 つの DNA が検出されました（図 4c）。MultiNA で得られたデータを Shimadzu Auto Finder で解析したところ、A からはウシとブタ、B からはニワトリ、C からはニワトリとウシ、ブタが同定されました（図 5）。B と C には商品パッケージがあり、そこに記載されていた原材料名の表記肉種と同じでした。

■まとめ

通常、遺伝子に基づく方法では DNA の抽出・精製が必要です。しかしながら、これらの作業は煩雑で、検体数が多い場合には多くの時間を費やします。Ampdirect plus はサンプル中のタンパク質や糖といった PCR 阻害物質に対する中和作用をもつため、DNA 精製をすることなく試料から直接 PCR が可能です。

MCE-202 MultiNA による電気泳動は試薬とサンプルをセットするだけで全自動で分析が実施されます。

また、MCE-202 MultiNA オプションソフトの Shimadzu Auto Finder は MultiNA から出力されたデジタルデータ中から特定サイズの DNA を検出することができます。

今回の分析事例のように Ampdirect と MultiNA システムを組合わせることにより遺伝子に基づく肉種判定を簡便に実施することが可能です。

Ampdirect、MultiNA、および Shimadzu Auto Finder は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
BIOTAQ は、BIOLINE REAGENTS LIMITED の商標です。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
島津コールセンター　0120-131691
(075) 813-1691

初版発行：2019 年 9 月

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。