

PCRを利用した肉種鑑別法の検討

常政 典貴 末田 義博

はじめに

最近、ミートホープ牛肉偽装、比内鶏の鶏肉偽装、エツヒロ下関産フグ偽装、日本ライス偽コシヒカリなど食の安全・安心を脅かす事件が数多く発生しており、市民の食への懸念が益々高まっている。

一方、これらの鑑別法については、現在、固有の遺伝子(DNA)の違いに着目した手法が有力視されている。この手法については、技術的課題もあり、現在のところ公定法も示されていないが、技術確立に向けた取り組みの重要性は高まっている。

そこで今回は、マルチプレックスPCR法による食肉及び食肉製品の肉種鑑別¹⁾や国立医薬品食品衛生研究所を中心とするチームにより報告されている、ニワトリ・ウシ・ヒツジ・ブタ・ウマを同時に測定する方法²⁾を参考にし、各肉種の鑑別を行う基礎的な分析技術の確立を目的として、市販されているキットを用い、定性PCRによる肉種鑑別を試みたので報告する。

単な分離方法で分離できること、小さなゲノムサイズであること、生体のいたるところにあること、母性遺伝することなどから、進化学・集団遺伝学および分子生物学的研究対象として多くの種で研究されている。サンプルの採取の際には、加工時の包丁使用などによる汚染を考慮し、表面の肉を削り取り中心に近い部分から採取した。ミトコンドリア DNA の抽出には、和光純薬工業株式会社製 mtDNA エキストラクターCT キットを用いた。操作手順は図 2 参照。

(3)PCR 反応

ミトコンドリア DNA のチトクローム b 遺伝子の増幅を行った。プライマーを変えることにより、ニワトリ・ウシ・ヒツジ・ブタ・ウマの DNA を増幅した。PCR 反応には、株式会社アステック PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC350 および株式会社ベックス製肉種鑑別 Kit を使用した。PCR 条件と反応温度条件は表 1, 表 2 のとおり。

方法

1 標準品の鑑別

(1) 試料

業者から入手した各肉種のブロックを用いて、肉種の鑑別を行った。肉種は、ニワトリ・ウシ・ヒツジ・ブタ・ウマとした。(図 1)

(2) ミトコンドリア DNA の抽出

約 50mg の動物組織からミトコンドリア DNA を抽出した。ミトコンドリア DNA は、比較的簡

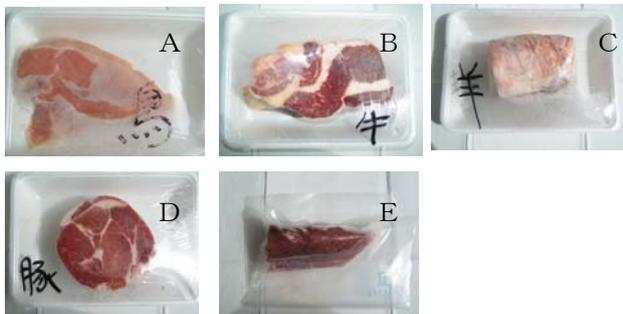


図 1 実験に使用した各肉種のブロック

A: ニワトリ B: ウシ C: ヒツジ
D: ブタ E: ウマ

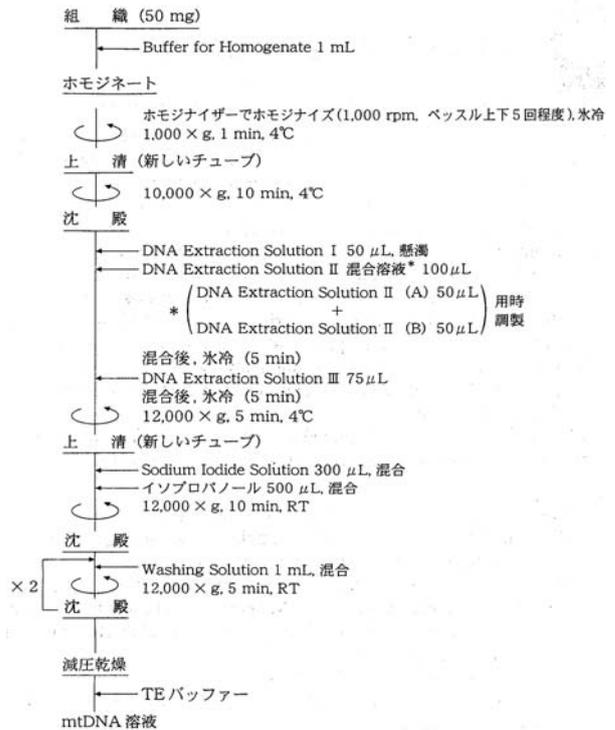


図 2 mtDNA エキストラクター CT キット操作手順

表 1 PCR 条件

鋳型 DNA	1 μ l
Taq Polymerase	0.2 μ l
5 \times PCR Buffer	5 μ l
2mM dNTPs	2 μ l
Forward Primer	1 μ l
各 Reverse Primer	1 μ l
精製水	14.8 μ l
合計	25 μ l

表 2 反応温度条件

94 $^{\circ}$ C	5 分	1 サイクル
94 $^{\circ}$ C	30 秒	
60 $^{\circ}$ C	30 秒	
72 $^{\circ}$ C	30 秒	35 サイクル

(4) 電気泳動

増幅後の PCR 産物をアガロースゲルに負荷して電気泳動を行った。ゲルは LONZA 製 NuSieve[®] 3:1Agarose 2% を用い, BIO RAD 製 Power Pac[™] Basic Power Supply 75 V で行った。

(5) DNA の確認

電気泳動の後, 紫外線を照射してバンドの位置を確認した。それぞれの DNA は, ニワトリ (227bp)・ウシ(274bp)・ヒツジ(331bp)・ブタ(398bp)・ウマ(439bp)の位置にバンドとして確認した。

2 市販品の鑑別

試料はウシとブタのミンチ肉 (非加熱) を用いた。分析法は標準品の鑑別と同じ。

結 果

1 標準品の鑑別

標準品からは各肉種のレーンに, 肉種固有の DNA のバンドを検出することが出来た。(図 3)

2 市販品の鑑別

市販品の分析では, B と P のレーンにバンドが検出され, ウシとブタのミンチであることが確認出来た。(図 4)

ま と め

今回, 各肉種のブロックと, ウシとブタのミンチ肉を使用し, 市販のキットを利用して定性 PCR を行い, 肉種の鑑別を試みた。その結果, 各肉種のブロックと市販のミンチから, 各肉種に固有の DNA を検出することができた。

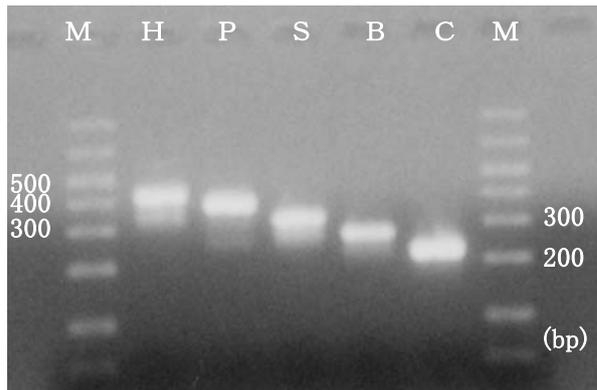


図 3 標準品の分析結果

C:ニワトリ B:ウシ S:ヒツジ P:ブタ
H:ウマ M:マーカー

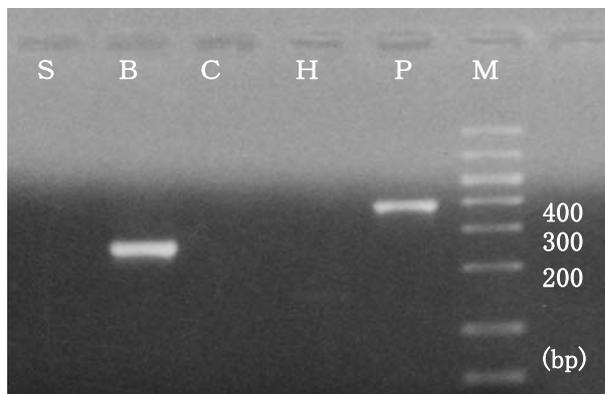


図 4 市販品の分析結果

しかしながら, この手法を行政検査に使用した場合, わずかな肉の混入でも検出されてしまうため, JAS 法の表示基準 5%未満の混入に対して, どのように対応するかが今後の課題となる。

謝 辞

PCR法を利用した肉種鑑別法の実施にあたっては, 福岡市保健環境研究所の赤木浩一, 本田己喜子, 鶴田小百合の各氏に技術的なご指導をいただいた。ここに記して感謝申し上げます。

文 献

- 1) 松永孝光 他:マルチプレックスPCR法による食肉及び食肉製品の肉種鑑別. 日本食品科学工学会誌, 46, 187~194(1999)
- 2) Soichi Tanabe et al:A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton and Horseflesh in Foods. Biosci. Biotechnol. Biochem, 71, 3131~3135(2007)