

## 魚介類種判別法の DNA 抽出法の検討

笠原 正輝

Masaki Kasahara

### 要 約

農林水産消費安全技術センターでは各種魚介類の種判別法が開発され、表示監視業務で利用されている。現行の判別法では DNA の抽出に、DNeasy Blood & Tissue Kit を使用しているが、分析の効率化及び試験者の負担の軽減を図るため、一度に多検体の DNA を抽出できる DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用可能か検討した。その結果、マグロ属魚類及びサケ科魚類の DNA 抽出に DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用しても、現行の DNeasy Blood & Tissue Kit と同様に、PCR によって DNA 増幅産物が得られることが分かった。

### 1. はじめに

「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）」における「生鮮食品品質表示基準」及び「水産物品質表示基準」が、平成 12 年 7 月 1 日から施行された。表示に当たっては販売業者等が「名称」、「原産地」、冷凍したものを「解凍」したものである場合にはその旨及び「養殖」されたものである場合にはその旨を社会的に検証（確認）した上で記載することとされている。

農林水産消費安全技術センターでは、魚介類の「名称」を科学的に判別する技術として、「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」をはじめとして複数の魚介類種判別法を開発してきた。これらの判別法は、センターの表示監視業務で実際に利用されている。現在の魚介類種判別法で使用されている DNA 抽出法は、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）を用いているが、試料数が多くなると分析者にとって負担が大きくなるため、現場から試験の効率化と試験者の負担の軽減が求められていた。同メーカーから一度に最大 96 点の試料から DNA 抽出可能な DNeasy 96 Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）が販売されているので、現在使用されている DNeasy Blood & Tissue Kit で抽出した DNA を鋳型とした場合と同様に PCR 増幅産物を得ることができれば、試験を効率化し、試験者の負担を軽減できると考えられる。

本研究では、マグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種判別法に DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いた DNA 抽出が適用可能か検討した。

---

（独）農林水産消費安全技術センター 本部

## 2. 実験方法

マグロ属魚類及びサケ科魚類の種判別法では、試料から抽出した DNA 溶液を鋳型として、PCR-RFLP 法により魚種を判別する。実験操作のうち、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた DNA 抽出は、現在の魚種判別法のプロトコルに従った。DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いた DNA 抽出は、キットに添付されているプロトコルを一部変更して使用した (Incubate at 56 °C → Incubate at 55 °C に変更)。PCR 及びアガロースゲル電気泳動は「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」<sup>1)</sup>及び Russel らの報告<sup>2)</sup>を参考にした。

### 2. 1 試料

マグロ属魚類及びサケ科魚類は小売店で購入したものを試料として用いた。内訳は表 1.1 及び表 1.2 に示した。

表1.1 マグロ属魚類試料の内訳

試料No.	魚種	部位	状態
M-01	クロマグロ	血合い	天然・生
M-02		筋肉(赤身)	天然・生
M-03		筋肉(赤身)	天然・解凍
M-04		筋肉(中トロ)	養殖・解凍
M-05		筋肉(大トロ)	天然・解凍
M-06	ミナミマグロ	筋肉(中トロ)	養殖・解凍
M-07	メバチ	筋肉	解凍
M-08		筋肉	解凍
M-09	ビンナガ	筋肉	解凍

表1.2 サケ科魚類試料の内訳

試料No.	魚種	加工品の品目
S-01	サケ(シロザケ)	切り身(生)
S-02		白子(生)
S-03		すじこ(生)
S-04		いくら(生)
S-05		いくら(醤油漬)
S-06	ベニサケ	切り身(塩蔵(塩分濃度8%))
S-07		すじ子(醤油漬)
S-08	ギンザケ	切り身(塩蔵)
S-09	トラウトサーモン	切り身(生)
S-10	マスノスケ(キングサーモン)	切り身(西京漬)
S-11	タイセイヨウサケ(アトランティックサーモン)	切り身(生)

### 2. 2 DNA抽出

各試料から、5-10 mg の試料を採取して DNA 抽出に供した。DNA 抽出は各試料 2 点ずつ実施した。

DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた抽出では、試料に 180 µL の Buffer ATL (キット添

付試薬) 及び 20  $\mu\text{L}$  の Proteinase K (キット添付試薬) を添加後、55  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置し、試料を完全に溶解させた。4.0  $\mu\text{L}$  の 100 mg/mL RNase A (QIAGEN 社) を添加し、室温で 2 分間静置した。200  $\mu\text{L}$  の Buffer AL (キット添付試薬) を添加し、70  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱した。200  $\mu\text{L}$  のエタノール (分子生物学用) (和光純薬社) を添加し、溶液全量をキット添付のカラムに負荷した。カラムを室温で 6,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。カラムに 500  $\mu\text{L}$  の Buffer AW1 (キット添付試薬) を加え、室温で 6,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。カラムに 500  $\mu\text{L}$  の Buffer AW2 (キット添付試薬) を加え、室温で 12,000  $\times g$  で 3 分間遠心した。200  $\mu\text{L}$  の Buffer AE を加え、室温で 1 分間静置後、6,000  $\times g$  で 1 分間遠心し、DNA を溶出した。DNA 溶出は同様にしてもう一度繰り返し、1 回目の溶出液と合わせて試料の抽出 DNA 溶液とした。

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いた抽出では、試料に 180  $\mu\text{L}$  の Buffer ATL (キット添付試薬) 及び 20  $\mu\text{L}$  の Proteinase K (キット添付試薬) を添加後、55  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置し、試料を完全に溶解させた。4.0  $\mu\text{L}$  の 100mg/mL RNase A (QIAGEN 社) を添加し、室温で 5 分間静置した。410  $\mu\text{L}$  の Buffer AL (キット添付試薬) を添加してボルテックスでよく攪拌した後、フラッシュ遠心した。溶液全量を DNeasy 96 Plate に添加した。室温で 6,000  $\times g$  で 10 分間遠心した。500  $\mu\text{L}$  の Buffer AW1 (キット添付試薬) を加え、室温で 6,000  $\times g$  で 5 分間遠心した。500  $\mu\text{L}$  の Buffer AW2 (キット添付試薬) を加え、室温で 6,000  $\times g$  で 12 分間遠心した。200  $\mu\text{L}$  の Buffer AE を加え、室温で 1 分間静置後、6,000  $\times g$  で 2 分間遠心し、DNA を溶出した。DNA 溶出は同様にしてもう一度繰り返し、1 回目の溶出液と合わせて試料の抽出 DNA 溶液とした。

### 2. 3 PCR

PCR 反応液の組成は、3.75 Units の AmpliTaq Gold (Life Technologies 社)、1  $\times$  PCR Buffer II (AmpliTaq Gold 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (AmpliTaq Gold 添付試薬)、1.5  $\mu\text{mol/L}$  MgCl<sub>2</sub> (AmpliTaq Gold 添付試薬) 及び 0.5 mmol/L プライマーセットを含む反応液に、5.0  $\mu\text{mol/L}$  の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 50  $\mu\text{L}$  とした。マグロ属判別用プライマーセットには、5' プライマーとして L8562 : CTTGACCAATTTATGAGCCC、3' プライマーとして H9432 : GCCATATCGTAGCCCTTTTGG (増幅長 915 bp) を用い、サケ科魚類判別用プライマーセットには、5' プライマーとして LSm1-cytb : ATGGCCAACCTCCGAAAA AC、3' プライマーとして HSm1-cytb : CCRTARTAAAGTCCHCGGGCGA (増幅長 314 bp) を用いた。マグロ属の PCR 温度サイクルは、最初の熱変性として 94  $^{\circ}\text{C}$  で 8 分、次に (1) 熱変性として 94  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分、(2) アニーリングとして 53  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分、(3) 伸長反応として 72  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分 30 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 71  $^{\circ}\text{C}$  で 7 分反応させた。サケ科魚類の PCR 温度サイクルは、最初の熱変性として 95  $^{\circ}\text{C}$  で 8 分、次に (4) 熱変性として 94  $^{\circ}\text{C}$  で 30 秒、(5) アニーリングとして 55  $^{\circ}\text{C}$  で 15 秒、(6) 伸長反応として 72  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分の (4) ~ (6) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72  $^{\circ}\text{C}$  で 7 分反応させた。PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies 社) を用いて行った。

## 2. 4 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は Agarose L03 (タカラバイオ社)を用い、ゲルの濃度は3.0 % (w/v)とし、エチジウムブロミド (和光純薬工業社) をゲル 100 mL 当たり 5  $\mu$ L 使用し、電気泳動緩衝液は TAE 緩衝液を用いた。分子量マーカーとして 100 bp ラダー (ニッポンジーン社) を用いた。電気泳動装置は、Mupid-II (コスモ・バイオ社)を用いた。電気泳動結果は Molicular Imager FX (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)を用いて撮影した。

## 3. 結果及び考察

マグロ属魚類及びサケ科魚類の DNA 抽出について、DNeasy Blood & Tissue Kit 及び DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いて抽出した DNA を鋳型として、PCR 及び電気泳動を実施した結果を比較した (図1)。

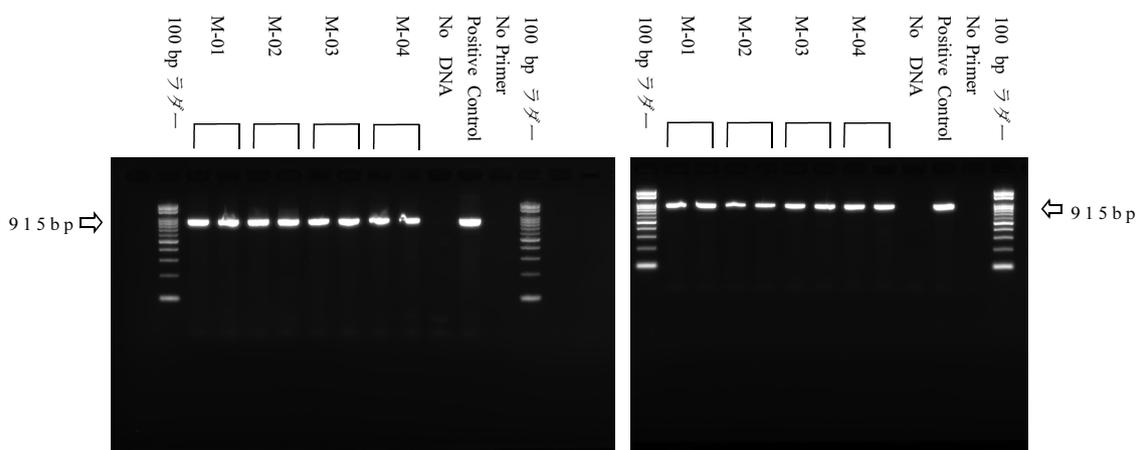


図1.1 M01-M04のDNeasy Blood & Tissue Kit (左) 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit (右) の電気泳動パターン

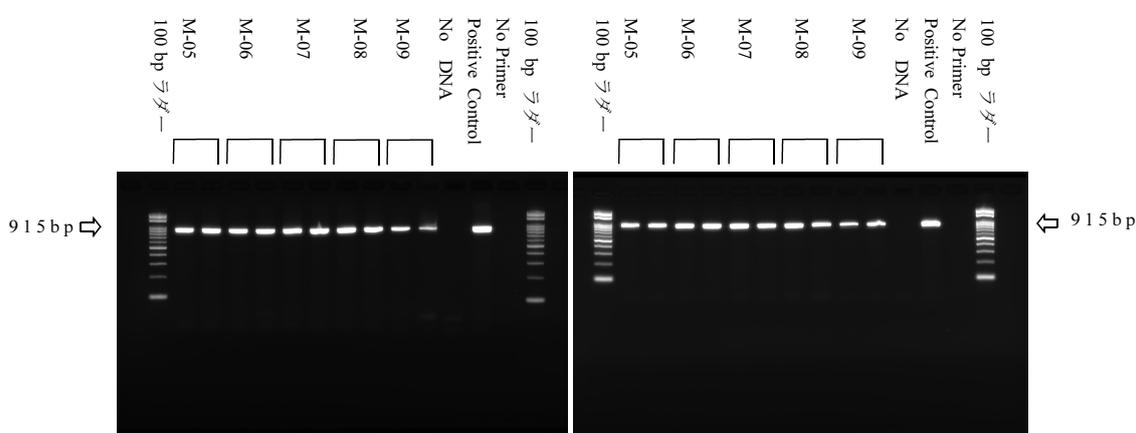


図1.2 M05-M09のDNeasy Blood & Tissue Kit (左) 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit (右) の電気泳動パターン

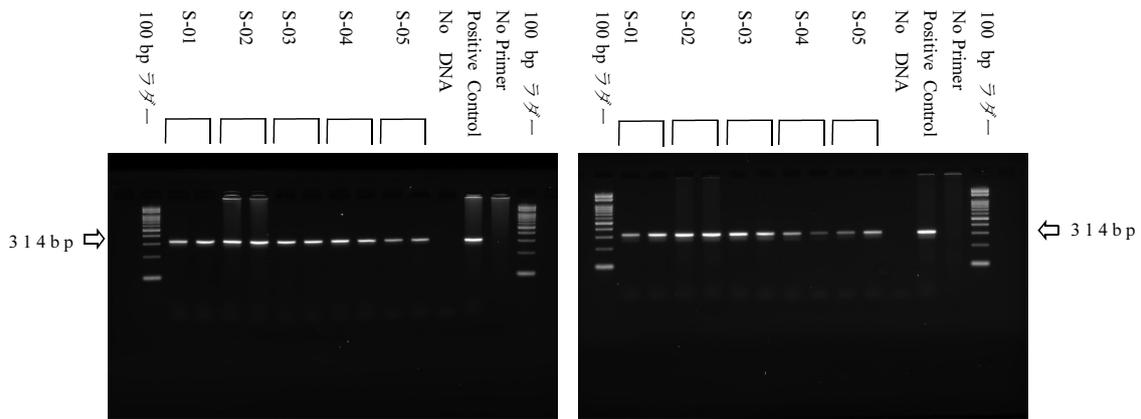


図1.3 S01-S05のDNeasy Blood & Tissue Kit (左) 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit (右) の電気泳動パターン

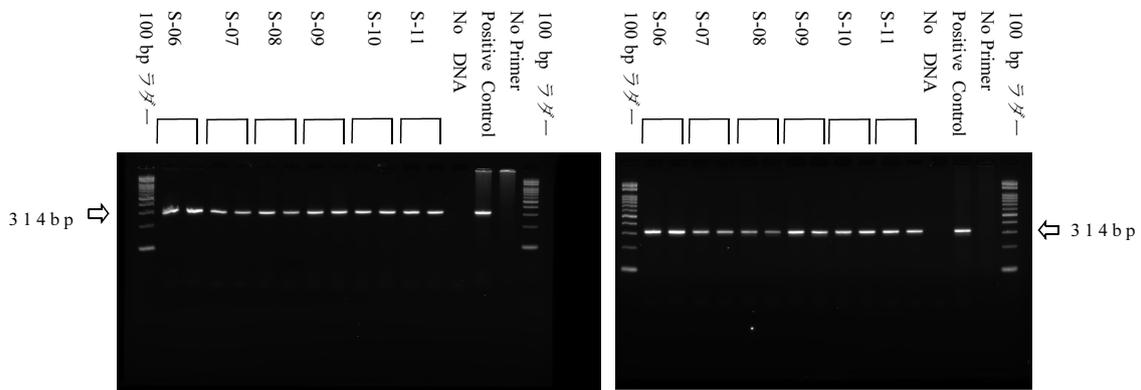


図1.4 S06-S11のDNeasy Blood & Tissue Kit (左) 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit (右) の電気泳動パターン

表2.1 マグロ属魚類のDNeasy Blood & Tissue Kit 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit で抽出したDNAを鋳型としたPCRの結果の比較

使用キット 識別番号	Tissue Kit	96well Tissue Kit
M-01	++	++
M-02	++	++
M-03	++	++
M-04	++	++
M-05	++	++
M-06	++	++
M-07	++	++
M-08	++	++
M-09	++	++

表2.2 サケ科魚類のDNeasy Blood & Tissue Kit 及びDNeasy 96 Blood & Tissue Kit で抽出したDNAを鋳型としたPCRの結果の比較

使用キット 識別番号	Tissue Kit	96 Tissue Kit
S-01	++	++
S-02	++	++
S-03	++	++
S-04	++	++
S-05	++	++
S-06	++	++
S-07	++	++
S-08	++	++
S-09	++	++
S-10	++	++
S-11	++	++

マグロ属魚類及びサケ科魚類ともに DNeasy Blood & Tissue Kit 及び DNeasy 96 Blood & Tissue Kit いずれの DNA 抽出キットで抽出した DNA を鋳型にしても、全ての試料で PCR 増幅産物が確認された (表 2.1 及び 2.2)。よって、マグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種判別法の DNA 抽出に DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用しても、現行の DNeasy Blood & Tissue Kit を使用した場合と同様の結果が得られる可能性が高いことが分かった。

#### 4. まとめ

マグロ属魚類及びサケ科魚類の判別法について、2 種類の DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅産物が得られるか比較したところ、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出した場合も、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた場合と同様に PCR 増幅産物が得られた。今後、マグロ属魚類及びサケ科魚類の判別法に DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いた抽出法を追記することで、多検体検査する場合には分析効率が上がり、分析者の負担が軽減できると考えられる。

#### 5. 文献

- 1) 「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」, 農林水産消費技術センター/水産総合研究センター, 平成 17 年 4 月 27 日 (平成 18 年 12 月 14 日一部改正)
- 2) Russell J V, Santos T A, Rosa C., Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species, J. Agric. Food Chem., 48(6), 2184-2188, 2000