

Agilent 2100 バイオアナライザを用いた イチゴとキイチゴの識別

アプリケーション

食品

著者

Malcolm Burns, Rebecca Sanders,
and Amy Burrell
Bio-Molecular Innovation Team, LGC,
Queens Road, Teddington
Middlesex, TW11 0LY
UK

概要

食品の信頼性確認分析は重要かつ急速に拡大している分析領域であり、分子レベルでの新たな手法の開発が必要とされています。食品偽装防止検査の目的は、高価な食品成分の偽装を防止することや、パック済み食品の成分表記の誤りを正すことにあります。本アプリケーションノートでは、イチゴとキイチゴの DNA 識別にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 測定法と DNA 1000 チップを用いた Agilent 2100 バイオアナライザによる分析を併用するという手法の開発について報告します。この手法を用いて、イチゴとキイチゴそれぞれに特異的な DNA 発現プロファイルを Agilent 2100 バイオアナライザで作成することが出来ます。この手法は食品偽装防止検査に有用です。



Agilent Technologies

はじめに

食品偽装防止検査は、現行の国際的な取り決めに則った食品管理を徹底させ、食品のラベル表示や成分に関する規則を遵守させるために必要とされており、重要かつ急速に拡大している分析領域です。

キイチゴ (属名: ルブス *Rubus*) は、生食用、あるいは冷凍品として消費されるだけでなく、さまざまな食品、たとえば、ピューレ、ジャム、パイ、ケーキ、パン、デザートのおトッピング、ジュース、ワイン、アイスクリームやヨーグルトといった乳製品などにも使用されています。キイチゴの葉はハーブティーに利用されることが多く、果肉も健康増進の為に食べられることがあります。イチゴ (属名: フラガリア *Fragaria*) も、世界中で栽培され、流通している一般的な果物です。

しかし、最近の調査 [1, 2] によれば、特定の果実の含有を表示している食品や飲料 (特にフルーツジュース) のなかには、その植物種の果実をほとんど、あるいはまったく含まないものや、その果実を別の食用果実で代用または混ぜ合わせているものがあると報告されています。こうした事態は、意図的な偽装や不注意による加工ミス (果実の不十分な洗浄や他の果実との混在加工) によって発生します。こうした事態は法律に抵触するものであるため、規制の遵守や消費者保護という観点から、関係者 (食品小売業者や規制当局など) すべてから、食品成分を正確に同定できる検査法が求められています。また、食品成分の正確な同定は、食品の成分表記の信憑性を保証するためにも重要な作業です。特に食品中に含まれるアレルゲンを明記する場合や、高価な食物成分の偽装を暴く場合には不可欠です。

ここでは、イチゴとキイチゴの DNA 識別に Agilent 2100 バイオアナライザを利用するという新たな手法について説明します。この手法は、マイクロサテライトマーカ―を利用し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物の有無やサイズの違いを特定してイチゴとキイチゴの DNA を識別するというものです。PCR 産物の有無やサイズの違いは、DNA 1000 チップによって簡単に測定できます。

実験手法

PCR プライマー

Ashley ら [3] により報告されている下記のマイクロサテライトマーカ―を使用してイチゴとキイチゴの DNA を識別しました。

Fvi11 順方向プライマー: GCATCATCGTCATAATGAGTGTC

Fvi11 逆方向プライマー: GGCTTCATCTCTGCAATTCAA

Fvi20 順方向プライマー: GAGTTTGTCTCCTCAGACACC

Fvi20 逆方向プライマー: AGTGACCCAGAACCCAGAA

サンプル

サンプル A および B として使用した確認済み DNA サンプルは、SCRI (英国ダンディ) から提供を受けました。それぞれ、商用育種プログラムのナンバードセレクション (シリーズ番号の付いた選定品種) に由来するイチゴサンプルと、Glen Moy という品種に由来するキイチゴサンプルです。

キイチゴ (サンプル D) は、英国内のスーパーマーケットチェーン店で購入したもので、「キイチゴ (スペイン産)」というラベルが貼られたパック (225 g) で販売されていたものです。イチゴ (サンプル C) も「イチゴ」というラベルが貼られたパックに入ったもので、同じスーパーマーケットで同時に購入しました。それぞれのパックから 2 つずつ果実を選んで DNA を抽出し、サンプル C1 と C2、サンプル D1 と D2 というラベルを貼りました。

DNA 抽出

C と D のどちらのサンプルについても、DNA の抽出には、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 緩衝液 (50 mM の Tris-HCl 4 M の NaCl、1.8 % の CTAB; 25 mM の EDTA) を使用しました。まず、それぞれの果実サンプルから約 100 mg を計量してホモジナイズし、次に上記の CTAB 緩衝液で DNA を抽出してから 100 μ L の 1x TE 緩衝液で再懸濁し、最後に分光光度計で定量しました。

PCR サイクル条件

以下のものから 25 μ L の PCR 反応混合液を作成しました。12.5 μ L の 2x Fast Start PCR Master 混合液 (製品番号 04710436001、ロシュ社); 300 nM の適切な順方向プライマー; 300 nM の適切な逆方向プライマー; 15 ng の試料ゲノム DNA; および、終容量を 25 μ L に調整するために加える滅菌蒸留水。

PCR サイクルは (MJ Research Tetrad #2 PCR 装置): 95 °C で 6 分間加熱後; 括弧内のサイクルを 40 回 (95 °C で 1 分間、60 °C で 1 分間、72 °C で 1 分間); その後、72 °C で 10 分間、4 °C で保持。

Agilent 2100 バイオアナライザでの DNA 1000 チップの使用

すべてのチップは、Agilent DNA 1000 LabChip キットの添付指示書に従って調製しました。ゲル色素混合液は、400 μ L のゲルマトリックスに 20 μ L の色素濃縮液を混ぜてからスピンドーターでろ過したものです。ゲル混合液と色素混合液を DNA1000 チップに充填し、各サンプルウェルに 5 μ L のマーカ―を加えます。各サンプルウェルにサンプル (各 1 μ L) を、所定のラダーウェルにキット付属の DNA サイズマーカ― (ラダー) (1 μ L) を加え、専用 Vortex で攪拌/混合したのち、Agilent 2100 バイオアナライザで分析しました。

結果と考察

Fvi11 による解析

文献 [3, 4] によれば、「Fvi11 は、(GA)₁₆ 反復モチーフの配列であり、栽培種イチゴに塩基長 137 bp 前後のアンプリコンを発現させるが、同時にフラガリア属内でアンプリコンサイズに多型性も見られる」とあります。ただ、Fvi11 はイチゴと交差反応しないため、イチゴ試料による反応ではアンプリコンは検出されないはずで

今回の研究の結果 (図 1A および 1B) を見ると、Fvi11 との反応では各イチゴサンプル (A および C) に 122 bp 前後のアンプリコンのあることが分かります。282 bp と 290 bp にもアンプリコンが散見されますが、本調査の限られた実験データの範囲内では、十分な再現性は認められませんでした。図 1A と 1C を見ると、Fvi11 はイチゴサンプル (B および D) と交差反応していないことが分かります。

ネガティブコントロールでは、検出可能な増幅が見られませんでした。さらに、Fvi11 が、イチゴ果汁 40 パーセント入りと明記されている市販のイチゴソースサンプルに対し陽性結果を示し、他の試料と同じ塩基長 122-bp のアンプリコンを生じたことは (図 1D)、この分析法を当該果実を含む加工食品にも適用可能なことを示唆しています。

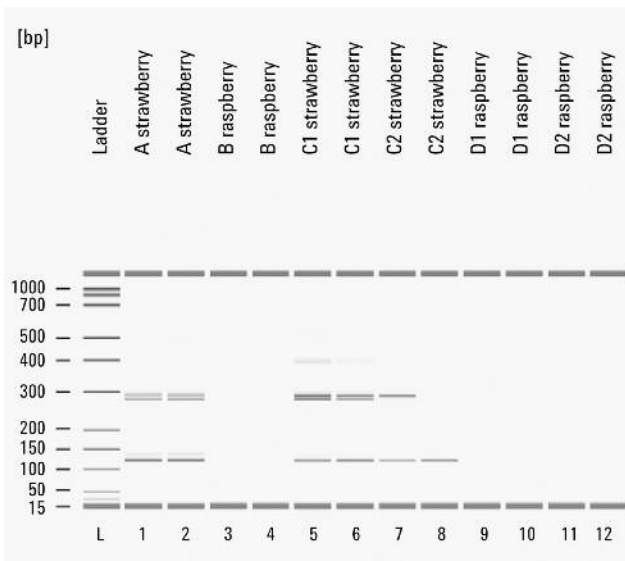


図 1A: Fvi11 と各サンプルの反応物を分析したゲルイメージ

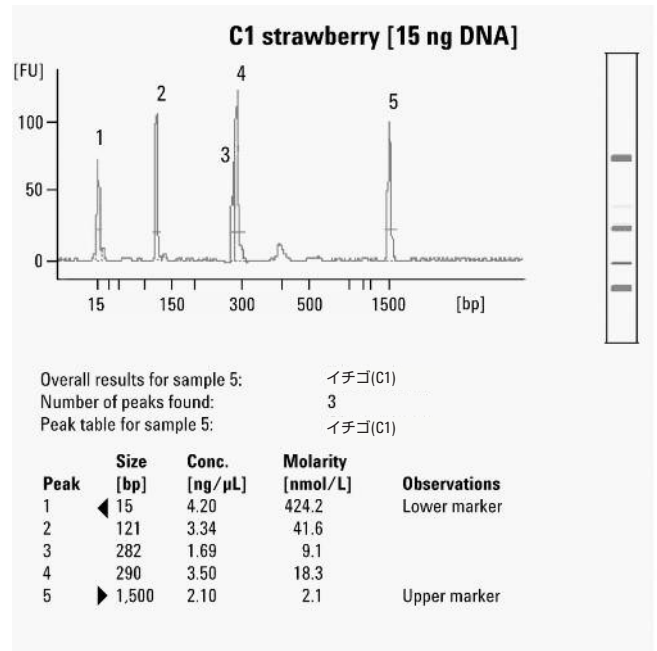


図 1B: Fvi11 とイチゴ由来 DNA の反応物を分析したときのエレクトロフェログラム

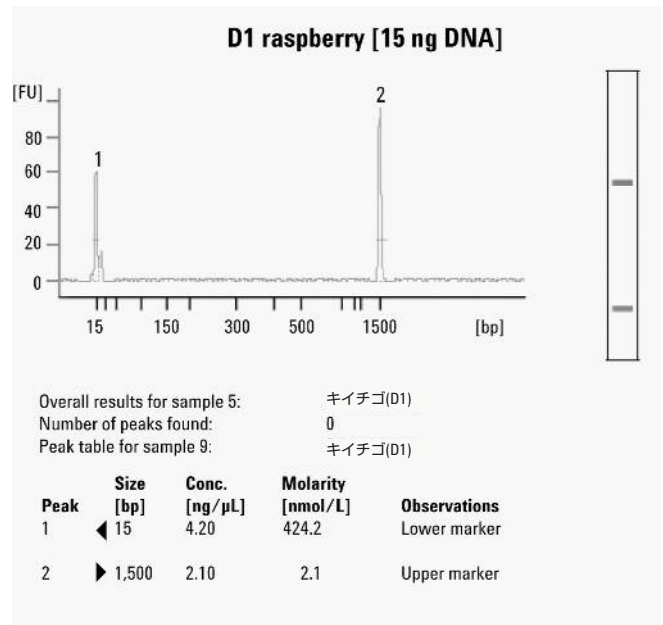


図 1C: Fvi11 とイチゴ由来 DNA の反応物を分析したときにはバンドが観測されないことを示すエレクトロフェログラム

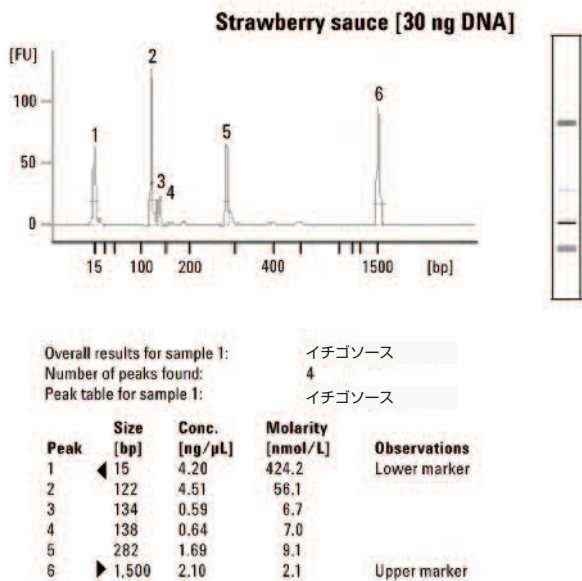


図 1D. Fvi11 とイチゴソースサンプル由来 DNA の反応物を分析したときの特異的エレクトロフェログラム

Fvi20 による解析

文献 [3, 4] によれば、「マイクロサテライトマーカー Fvi20 は、(GA)₂₀ 単純反復配列モチーフの配列であり、フラガリア属は塩基長 162 bp 付近に 1 つまたは複数のバンドを発現させるが、キイチゴ (ルブス) 属にはアンプリコンを 1 つしか発現させない」とあります。

今回の研究の結果 (図 2A および 2B) に基づいて、イチゴサンプル (A および C) に対して Fvi20 による解析を適用してみると、144、162、および 175 bp 付近に 1 つまたは複数のアンプリコンのバンドが現れました。本研究で調べた、限られた数のイチゴサンプルでは、144-bp の DNA 断片は必ず現れ、しかも主産物となりました。これに比べ、他のバンドの生成量は少なく再現性も乏しい結果となりました。

キイチゴサンプル (B および D) に Fvi20 による解析を適用した結果 (図 2A および 2B) には、136 bp にバンドが 1 本現れています。このバンドは、イチゴ栽培品種に特異的に発現する 144 bp 前後のアンプリコンと容易に区別することができます。

ネガティブコントロールと抽出ブランクでは、検出可能な増幅は見られませんでした。また、市販のイチゴソースサンプルに Fvi20 による解析を適用したプロファイルには、イチゴ DNA に特異的な 143 bp と 161 bp 付近のバンドが現れています (図 2D)。

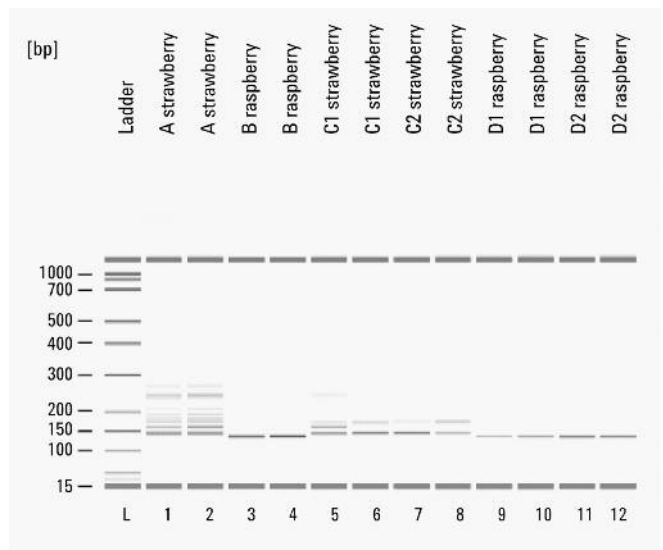


図 2A. Fvi20 と各サンプルの反応物を分析したゲルイメージ

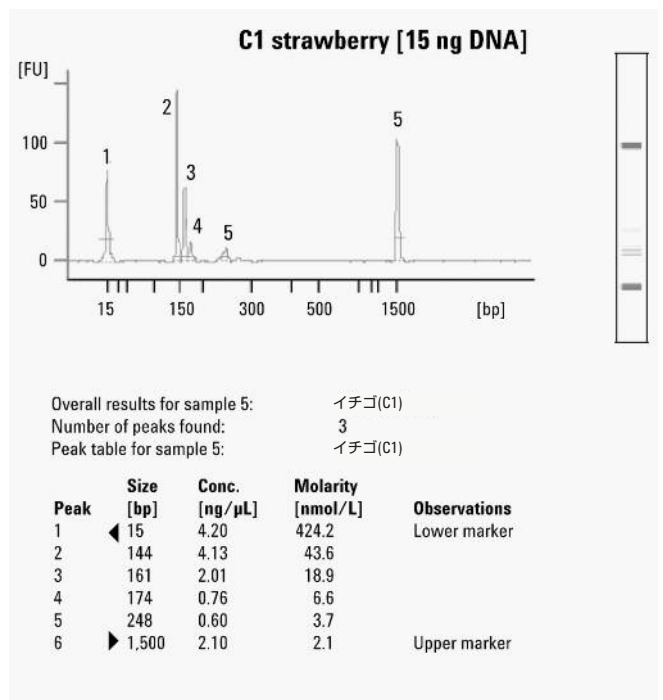


図 2B. Fvi20 とイチゴ由来 DNA の反応物を分析したときのエレクトロフェログラム

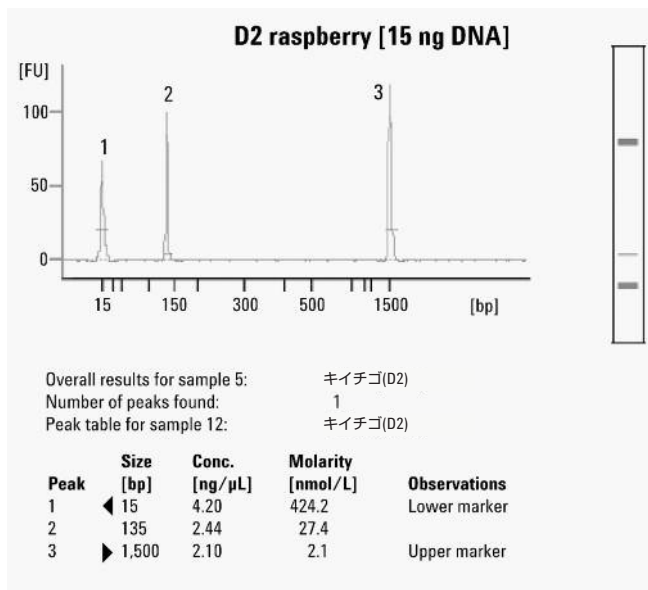


図 2C. キイチゴ由来 DNA に Fvi20 解析を適用したときにはバンドが 1 本のみ現れることを示すエレクトロフェログラム

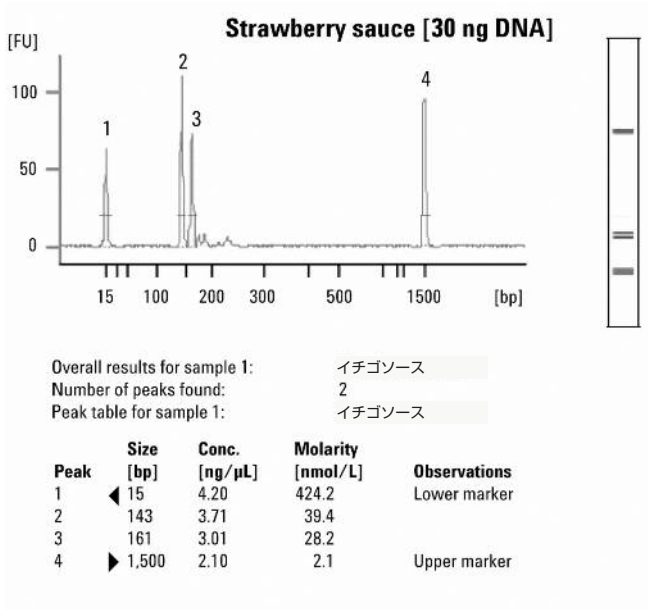


図 2D. イチゴソースサンプルに Fvi20 解析を適用したときに見られるイチゴ DNA 特異的なエレクトロフェログラム

結論

これまで Fvi11 と Fvi20 のマイクロサテライトマーカーはイチゴ類 (フラガリア属) の遺伝的変異を調べるのに用いられて来ました。今回の研究結果は、PCR と Agilent 2100 バイオアナライザの併用によるイチゴとキイチゴの DNA 識別を目的とした 2 つのプライマー (Fvi11 と Fvi20) の新たな利用法を示しました。このアプリケーションノートに示した、実験結果とアンプリコンサイズから判断して、この手法は食品偽装防止検査に役立つものと思われます。また、この研究結果は、フラガリアとルプスという特定の種に限られたものではありません。PCR 産物を Agilent 2100 バイオアナライザで分析すれば、従来の PCR を使用してイチゴとキイチゴの DNA 識別を明確に行えることも示しています。

参考文献

1. Food Commission Survey results, The Food Magazine, 25 February 2008, http://www.foodmagazine.org.uk/press/food_flavourings/
2. A. Stój and Z. Targonski, "Use of amino acid analysis for estimation of berry juice authenticity," Acta Sci. Pol., Technol. Aliment (2006) 5(1):61-72
3. M.V. Ashley, J.A. Wilk, S.M.N. Styan, K.J. Craft, K.L. Jones, K.A. Feldheim, K.S. Lewers, T.L. Ashman, "High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae)," Theor. Appl. Genet. (2003) 107:1201-1207
4. K.S. Lewers, S.M.N. Styan, S.C. Hokanson, "Strawberry GenBank-derived and Genomic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers and Their Utility with Strawberry, Blackberry, and Red and Black Raspberry," J. Amer. Soc. Hort. Sci. (2005) 130(1):102-115

謝辞

イチゴサンプル A とキイチゴサンプル B をご提供いただいた SCRI の Julie Graham 氏に謝意を表します。

本研究は、「英国政府化学者育成プログラム (2008~2011)」の一環として英国イノベーション・大学・技能省からの資金提供を受けて実施されたものです。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
January 19, 2009
5990-3327JAJP



Agilent Technologies