

Agilent 2100 バイオアナライザによる 食用魚類の魚種同定 アプリケーション

食品安全性

著者

Steve Garrett and John Dooley
Molecular Biology Group, Dept. of Chemistry and Biochemistry
Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping
Campden
Gloucestershire, GL55 6LD
UK

要旨

このアプリケーションノートでは、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) フラグメント分析による食用魚類魚種の同定で Agilent 2100 バイオアナライザを応用した例を示します。まず、すべての魚類に共通して見いだされる シトクロム-b遺伝子から464 bpのターゲット配列を増幅し、次にその増幅産物を制限酵素で分解しました。得られたDNA断片は DNA500 LabChip® 上で分析しました。精度の高いサイズ判定によって、標準品から得られるプロファイルと試料のそれが簡単に比較できるようになり、PCR-RFLP フラグメント分析においてバイオアナライザの分析が、従来法であるゲル電気泳動とゲルの染色によるDNA検出に比べ大変優れていることが示されました。

はじめに

近年、消費者が入手できる魚製品の種類は大幅に増えています。高級な魚の切り身から低価格なフィッシュスティックまで、さまざまな製品が出回っています。しかも、世界的なネットワークで結ばれた複数の業者によって魚が捕獲、加工、流通される為に、製品に使用されている魚の魚種や産地等の表示の信頼性を証明する必要が出てきています。

そのため、食品表示法 (EC 評議会規則 No.104/2000 および EC 委員会規則 No.2065/2001) の遵守および施行をサポートするための、信頼性が高くしてシンプルな魚種同定法が必要となってきました。

形態上の特徴に基づいて魚種を特定する方法は魚一匹全体を識別するには適していますが、いったん加工してしまうと魚種の同定はかなり難しくなります。こういった場合の魚種の同定にはタンパク質のプロファイリングが使用されます。しかし、この方法ではサンプルと併行して魚種の確定した標準魚肉を分析する必要があります。しかもこの方法は、加工食品に対する分析においてはタンパク質が加工過程で変性するため、信頼性があまり高くありません。そこで、特に高度な加工がされていない限りあらゆるサンプルで検出できるDNAベースの分析方法が、それに代わるアプローチとして魚種の同定に使用されてきています。

塩基配列を直接解析するのが最も確実な同定法ですが、1種類以上の種が含まれていることが疑われるサンプルでは簡単には適用できません。そこで、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用し、DNA フィンガープリントパターンに基づいて魚種を同定する分析法を開発しました。使用した分析法は、RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSCP (single strand DNA conformation polymorphism) および PCR-RFLP です。

シトクロム b 遺伝子の464 bpの領域をPCR増幅した産物を制限酵素で分解して DNA プロファイルを作成する PCR-RFLP 法は、これまでの研究でもサケ科の魚種の同定方法として確立されていました [1、2]。



Agilent Technologies

この研究の目的は、従来のゲル電気泳動とゲル染色のステップを バイオアナライザに置き換えることによって、サケその他の魚種の同定法を向上させることです。バイオアナライザの使用により得られる個々の DNA 断片の正確なサイズと定量値を組み合わせ、種特異的な PCR-RFLP プロファイルを得ることによって、使いやすさ、スピード、精度の面でゲルベースのアプローチを上回る分析を行うことができました。

実験材料と方法

特に言及していない場合、この研究で使用された化学物質はすべて Sigma-Aldrich 社から入手しました。すべて分子生物学グレードあるいはそれと同等のものを使用しました。PCR プライマーは MWG-Biotech UK Ltd. から入手しました。PCR 反応は、Applied Biosystems 社の AmpliTaq® Gold DNA ポリメラーゼを使用しました。制限酵素は New England Biolabs 社から入手し、メーカーの指示に従って使用しました。各 PCR 産物の制限消化物を DNA500 LabChip キットを用い、バイオアナライザによって分析してプロファイルを得ました。

魚類サンプル

商業的に重要なサケ科およびタラ科魚類の標準サンプルは、イギリス、カナダ、アラスカ、ニュージーランドおよび日本の漁業研究機関から入手しました。個体差による影響を最小限にする為に全ての試料は5個体より抽出しました。それぞれの魚種の実サンプルは、イギリス国内の小売り業者から入手しました。

DNA 抽出

DNA 抽出は、CTAB メソッドを修正した方法によって行いました。試料魚肉(湿重量 2g)を、5 mL の CTAB バッファ (2%CTAB[臭化セチルトリメチルアンモニウム],100 mM Tris-HCl,20 mM EDTA,1.4 M NaCl,pH8.0)で懸濁し、40 µL のプロテイナーゼ K 溶液 (20 mg/mL)を加えました。試料を良く混合し、60 °C で一晩インキュベートしました。インキュベーションの後、上清1 mLを 2.0 mL のエッペンドルフチューブに移して室温まで冷却し、13,000 g で10 分間、遠心しました。上清を回収し、等容のクロロホルムを加えました。この溶液をボルテックスした後、16,000 g で15 分間遠心し、上清を 1.5mL のエッペンドルフチューブに移しました。これに等容のイソプロパノールを加え、室温で 30 分間、DNA が沈殿するのを待ちました。16,000 g で15 分間、遠心して DNA をペレット状に沈殿させた後、70% エタノールで洗浄し、室温で 30 分間、風乾しました。DNA

ペレットは 100 µL の滅菌蒸留水で再溶解した後、Promega 社の DNA精製用樹脂 (Wizard®) をメーカーのプロトコルに従って使用して精製しました。吸着したDNAは、50 µL の 1 × TE (10mM Tris-HCl,pH7.4 ; 1mM EDTA,pH8.0) バッファで溶出,回収しました。得られたDNA の濃度 (ng/ µL) は、GeneQuant pro (Pharmacia) を使って測定しました。

DNA の増幅

PCR 産物(シトクロム b 遺伝子中の 464bp の配列をターゲットとしたもの)は 上記の DNA 抽出物 (50 ng)を 20 µL の反応溶液中で増幅することによって調製しました。反応溶液の組成は、AmpliTaQ Gold PCR バッファ (Applied Biosystems), 各プライマー 300 nM (L14735:5'-AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A-3' および H15149:5'-GCI CCT CAR AAT GAY ATT TGT CCT CA-3') ,200nM の dNTP,5mM の MgCl₂, および 0.05 U/ µL の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) からなります。増幅プロファイルは (94 °C を 5 分間 [変性] の後、以下を 40 サイクル : 94 °C を 40 秒間、50 °C を 80 秒間、72 °C を 80 秒間 [増幅] さらに72 °C を 7 分間 [最終延長]) とし、PCR 装置 は PE9600 (Applied Biosystems) を使用して実行しました。増幅の確認は PCR 産物 (1 µL) を そのままバイオアナライザで分析して行いました。

PCR-RFLP プロファイリング

未精製の PCR 産物 (2.5 µL) に、2〜5 ユニットの制限酵素を使用し 3 時間以上消化しました (反応液量は5 µL)。反応後は 65 °C で 10 分間インキュベーションして酵素を失活させました。分解された PCR 産物は 5 µL の 20mM EDTA と混和させ、DNA500 LabChip にロードする前に EDTA の最終濃度を 10mMに調整しました。この反応混合液の一部 (1 µL) をバイオアナライザでメーカーの指示通りに分析しました。

結果

バイオアナライザで得られた PCR-RFLP プロファイルによる魚種の同定

始めにサケ科の魚類の PCR-RFLP プロファイル进行分析しました。

増幅した DNA 断片を制限酵素で切断し、バイオアナライザで種特異的な PCR-RFLP プロファイルを得ました。図 1 には Ddel および HaeIII による切断で得られたサケおよびマスの PCR-RFLP プロファイルの例を示しました。

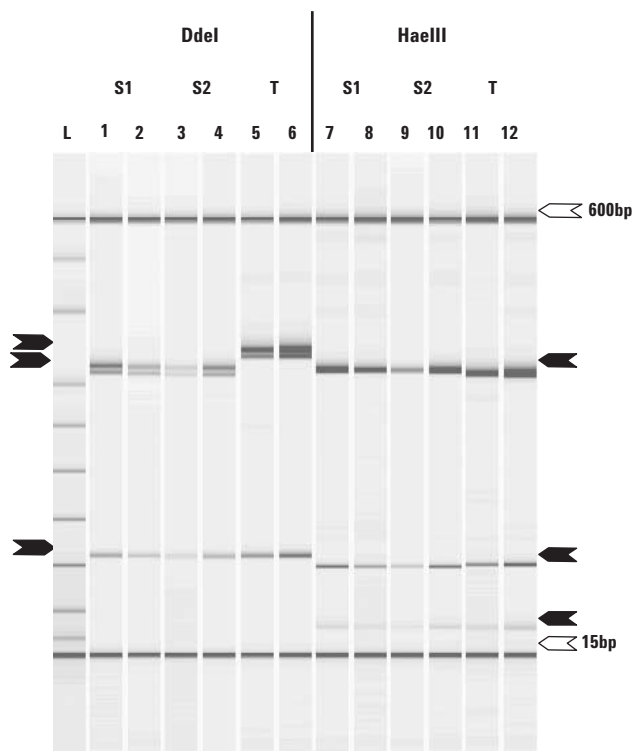


図1. Ddel および HaeIII によって得たサケおよびマスの PCR-RFLP プロファイル。この PCR-RFLP プロファイルは、2 匹のサケ (S1,S2) および 1 匹のマス (T) から増幅した DNA断片を Ddel (1-6)あるいは HaeIII (7-12) によって分解したものをバイオアナライザで分析して得たものです。左端のレーンには 15 bp～600 bp の範囲の分子量マーカー (ラダー L) が示されています。すべてサンプルには、15bp と 600bp サイズマーカーが含まれています。各 DNA 断片には黒矢印が、サイズマーカーには白矢印が付いています。

使用する制限酵素毎に予想される断片サイズと実測された断片サイズを 4 つのサケ科の魚類について、まとめたものが表 1 です。この表より、得られたプロファイルは既に報告されているものとよく一致していることが分かります [1,2]。

予測された長さが 25 bp よりも長い DNA 断片は容易に検出されましたが、それより短い断片は LabChip の分析範囲 (25bp～500bp) 外であるために信頼できる DNA 断片サイズを得ることは出来ませんでした。いくつかの試料ではこれまで報告されることがなかった小さな DNA 断片 (25bp～100bp) も観察されました [2]。これは、このメソッドがゲル電気泳動法よりも高感度で高分解能であることをはっきりと示しています。この分解能の向上は Ddel による生成プロファイルでも示されており、そこでは 4 つの魚種すべてで、予想される値よりも 9bp ほど小さい別の断片が検出されています。これはプライマー H15149 の配列にも Ddel の制限サイトが存在しているためです。

O. gorbuscha および *O. mykiss* では *NlaIII* による消化で 3 つの断片が生じることが予想されますが、実際には 2 つしか検出されませんでした。これは、大きい方の 2 つの断片が分離せず重なって泳動したためと考えられます。*O. mykiss* の 464 bp 増幅産物の塩基配列を解析すると、*NlaIII* による切断で 192bp,180bp および 91bp の断片が生じるはずであることが示されています。これらはそれぞれ Russell らによって報告された 210bp,190bp, および 100bp の断片 (2000) に相当しています。(表 1 参照) 配列データからはこれらの断片の分子量が一致する方向に向かわせるような状況、例えば小さい方 (180bp) の断片が A や G 塩基 (C, T 塩基より大きい) をより高い比率で含んでいる、あるいは逆に大きい方の断片 (192bp) が C または T 塩基をより高い比率で含んでいることを示す証拠は見つかっていません。

表1. 使用酵素毎の PCR-RFLP で期待される断片サイズおよび実測されたサイズ

		各酵素での断片サイズの期待値* (E)および測定値 (O) (bp)				
種		Ddel**	Bsp1286I	HaeIII	NlaIII	Sau3AI
<i>O. nerka</i>						
(ベニザケ)	E	360, 130	300, 200	350, 130	310, 180	390, 120
	O	353, 346, 114	289, 172	320, 102, 35 あるいは 421	272, 160	340, 115
<i>O. gorbuscha</i>						
(カラフトマス)	E	360, 130	U/C***	U/C	210, 190, 100	390, 120
	O	349, 343, 112	464	421	181, 92	338, 115
<i>S. salar</i>						
(タイセイヨウサケ)	E	350, 130	300, 200	350, 130	U/C	410, 110
	O	321, 312, 110	287, 172	318, 98, 35	438	370, 88
<i>O. mykiss</i>						
(ニジマス)	E	360, 130	300, 200	350, 130	210, 190, 100	U/C
	O	348, 339, 111	279, 174	313, 100, 33	185, 92	451

* Russell らの報告によるサイズ。(2000)。

** 測定された Ddel プロファイルの余分な断片は、プライマー H15149 にも同酵素による制限サイトがあるために生じたものです。

*** U/C 酵素による切断なし。

ただ、DdeI 消化産物では 9 bp しか差のない断片が分離出来ている事を考えれば、この 2 つの断片の分子量が近いという理由で分離出来なかったとは考えにくいことを示しています。しかし、これら 2 つの断片が分離することなく 1 つの断片として検出されることは首尾一貫して観察されるため、種の同定の信頼性を損なうことはありません。

全体としては、バイオアナライザで得られたプロファイルは、塩基配列から予想される数値またはこれまでに報告されている数値と良く一致していました [1,2]。このことは、魚種の同定にこのアプローチを使用することが妥当であることを示しています。

実験の再現性

アッセイの再現性 (特にラボチップ間での変動の程度) を判定するため、サンプル (2 匹のサケと 1 匹のマス) からの PCR 反応を 2 回 繰り返して行いました。増幅した断片は DdeI を切断し、分析までの間 4 °C で保存しました。分析は、2 つのゲルマトリックス A または B を充填した DNA500 LabChip を使用して行い、合計 4 個のラボチップを使用しました。2 つのラボチップは新品のゲルマトリックス (マトリックス A) を使って分析し、3 つめのラボチップはゲルマトリックス A を開封して 1 週間たってから分析しました。4 番目のラボチップは 3 番目のラボチップと同じ日に分析しましたが、新品のゲルマトリックス (マトリックス B) を使って分析しました。全体の再現性 (ラボチップ、PCR, ゲルマトリックスの違いによる誤差を含み

ます) は、酵素 DdeI による消化後にこれら 4 つのラボチップで分析した結果をまとめた表 2 に示されています。表には、同じラボチップ上で分析したそれぞれの種の異なる PCR 反応物から測定された断片サイズの平均値を表示してあります。一つのラボチップ中での断片サイズの誤差、つまり同じサンプルに対して別個に行った PCR の産物または 2 つのサケサンプルの間の差は 2 bp 未満で、しかもサイズの大きい断片 (>300bp) だけに観察されました。ラボチップ、PCR, およびゲルマトリックスが異なるために起こる各断片のサイズの誤差は、それよりも少し大きい結果となりました。最も大きい誤差はサケ (327 bp から 321 bp) の 320 bp 断片に対する 6 bp でした。

魚種の同定

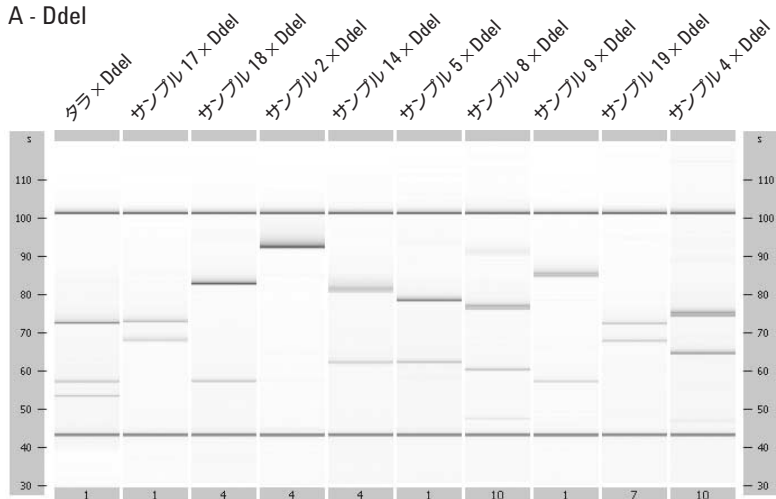
10 種の異なるタラ科魚類の塩基配列データから、数種の制限酵素消化により理論的に得られる PCR-RFLP プロファイルを作成しました。これら理論上のプロファイルをよく調べると、すべてのタラ科の魚種を識別するためには わずか 3 つの酵素だけで良いということがわかりました。種の同定がこれらの 3 つの酵素だけで可能であることを確認するために、実際に測定を行ってプロファイルを作成しました。この解析の結果が図 2 に記されており、そこでは酵素を 1 つだけ使って生成したプロファイルで、10 の種のうち 9 つを同定できたことが示されています。残りの 2 つの種は、他の 2 つの酵素を使って識別出来ました。

表 2. DdeI により切断した DNA を 4 つの異なる DNA500 ラボチップで分離した後に得られた PCR 断片のサイズ

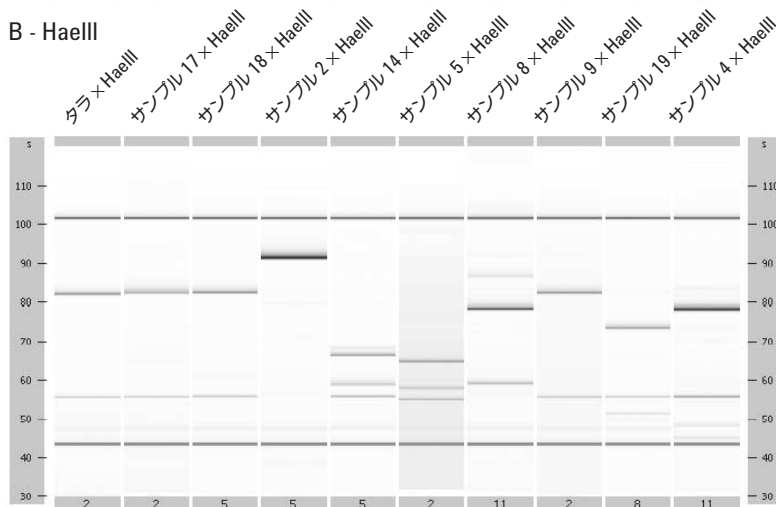
予想値 バンド サイズ (bp)	各ラボチップ上で観察された断片サイズ (bp)				平均	%RSD
	ラボチップ 1 (新品の マトリックス A)	ラボチップ 2 (新品の マトリックス A)	ラボチップ 3 (1 週間たった マトリックス A)	ラボチップ 4 (新品の マトリックス B)		
サケ解析*						
117	111	111	110	111	111	0.34
312	314	316	314	317	315	0.43
320	323	325	323	326	324	0.51
マス解析						
116	111	111	110	111	111	0.45
339	338	341	338	343	340	0.72
348	347	349	347	352	349	0.61

* サケに予想される 27bp の断片は、2100 バイオアナライザでは検出されませんでした。

A - Ddel



B - HaeIII



C - NlaIII

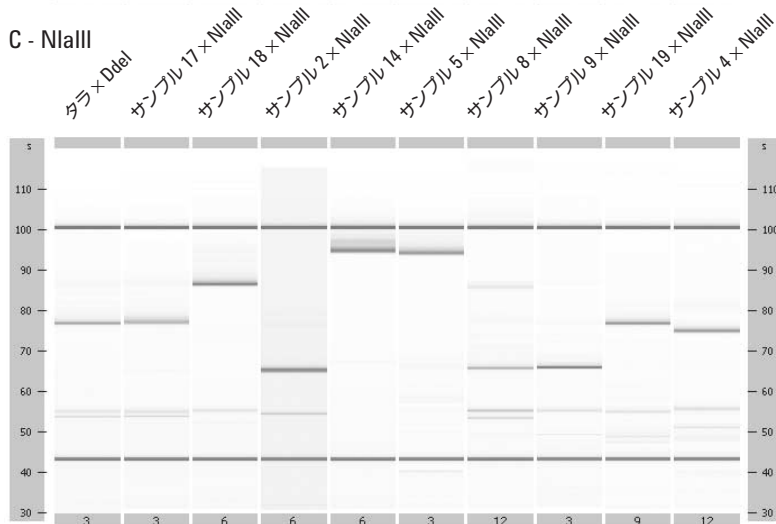


図2. 10種のタラ科魚類から得たPCR-RFLP プロファイル。このプロファイルは、酵素 Ddel (A), HaeIII (B) または NlaIII (C) を使って作成しました。それぞれのサンプル番号は異なった魚種を示しています。

さらに 9 種のサケ科の魚類についてもこれら 3 つの酵素だけを使って分析を試みました(データは示されていません)。その結果、サケ科の魚類もこれら 3 つの酵素による消化で識別できることが確認されました。調査した種のリストは表 3 に示されています。

表3. 酵素 DdeI、HaeIII および NlaIII を使用した PCR-RFLP 法で識別することができた魚種

通称(イギリス/日本)	ラテン名
Atlantic cod/ニシマダラ	Gadus morhua
Pacific cod/マダラ	Gadus macrocephalus
Coley (Saithe) /黒魚(セイス)	Pollachius virens
Haddock/ハドック	Melanogrammus aeglefinus
European hake/ ヨーロッパヘイク	Merluccius merluccius
South African hake/ 南アフリカヘイク	Merluccius paradoxus
European plaice/ブレイス	Pleuronectes platessa
Whiting/ホワイティング	Merlangus merlangus
Alaskan (Walleye) Pollock/ アラスカ(ウォールアイ)ポロック	Theragra chalcogramma
Hoki/ホキ	Macruronus novaezelandiae
Atlantic salmon/ タイセイヨウサケ	Salmo salar
Red (Sockeye) salmon/ ベニザケ	Oncorhynchus nerka
Pink (Humpback) salmon/ カラフトマス	Oncorhynchus gorbuscha
Chinook salmon/チヌックサケ	Oncorhynchus tshawytscha
Coho (Silver) salmon/ギンザケ	Oncorhynchus kisutch
Keta (Chum) salmon/サケ	Oncorhynchus keta
Cut-throat trout/ カッツスロートトラウト	Oncorhynchus clarki clarki
Dolly Varden/オシヨロコマ	Salvelinus malma malma
Cherry salmon/サクラマス	Oncorhynchus masou masou

考察

サンプル中にある魚種を同定するのに事前知識がまったくない場合は広く一般的に適用できるメソッドが必要となります。シトクロム b 遺伝子の様なすべての魚種に共通して

存在する遺伝子を PCR-RFLP プロファイリングし、データベースでプロファイルと比較可能にすることも、そのような一般的なアプローチの 1 つです。

従来の PCR-RFLP による断片分析ではゲル電気泳動が必須であり、PCR-RFLP プロファイルを分析するには大きくて(30cm² 以上) 薄い(<2mm) アクリルアミドゲルが必要でした。これは取り扱いと染色が困難で、大きな装置と泳動緩衝液などの薬品が多量に必要になります。これらの要素はすべて、この方法を、時間がかかり、時に不安定な結果を生むのみならず実験者の健康に潜在的な危険性を伴うものにします。そのため、このままでは迅速で堅牢な検出法が必要とされる監督官庁のラボや品質管理ラボには適していません。

それに代わる分析法として Agilent2100 バイオアナライザは、従来のキャピラリー電気泳動(CE)技術を使いやすいチップに組み込み、個々の DNA 断片の正確なサイズ測定と定量を可能にしています。ラボチップの小ささ(5 cm角)とあわせて、このシステムには使いやすさとスピード、安全性に関して従来のゲルベースの分析法にはない大きな利点があります。そのため、バイオアナライザは PCR-RFLP プロファイルで検出されるような多数の小さな DNA 断片を分析するのに最適です。

バイオアナライザを使うことにより、これまでに公表されているサケ科魚類の分析結果と極めて良く似た PCR-RFLP プロファイルを得ることができました。しかも、バイオアナライザでは断片の分解能が大きく向上しているので 従来のゲル電気泳動では検出されなかった、より小さい断片まで検出した PCR-RFLP プロファイルを得ることができました。

また、バイオアナライザで得られた PCR-RFLP プロファイルはゲル電気泳動と比較してより再現的でした。このため、3 つの酵素、DdeI, NlaIII, HaeIII を使って、商業的に重要な 19 の魚種を同定するためのプロファイルを得ることが出来ました。さらなる研究によって、より多くの魚種をデータベースに登録し、魚類製品の産地を調べるための重要なツールとしていくことが望まれます。

このアッセイの開発に関する詳細、魚肉製品中の魚種を同定するアプリケーション、およびラボ間での再現性に関する研究についての論文が最近、発表されていますのでご参照ください [3,4,5]。

謝辞

この研究は、英国食品基準庁 (FSA) のプロジェクトQ01069の一環であり、食品基準庁の財政支援を受けています。

参考文献

1. G. L. Hold, V. J. Russell, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, et al., (2001) , Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. European Food Research and Technology, 212, 385-389.
2. V. J. Russell, G. L. Hold, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, et al., (2000) . Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (6) , 2184-2188.
3. J. J. Dooley, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. (2005) Food Control 16 (7) , 601-607.
4. J. J. Dooley, M. A. Clark, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, (2005) . Fish species identification using PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an Inter-laboratory study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (9) , 3348-3357.
5. J. J. Dooley, M. A. Clark, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, (2004) Application of a chip-based capillary electrophoresis system to enable simple PCR-RFLP identification of fish species. FSA Final Report, Q01069

さらに詳しくは...

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト
(www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilentは、この文書に含まれる誤りあるいは本資料の提供、履行、使用に関連して生じた付随的または間接的な損害について責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

AmpliTaq® は、Roche Molecular Systems, Inc.の米国における登録商標です。

LabChip® は、Caliper Technologies, Inc.の米国における登録商標です。

Wizard® はPromega Corporationの米国における登録商標です。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
May 13, 2005
5989-2982.JAJP



Agilent Technologies