

3 飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験法

橋本 仁康^{*1}, 篠田 直樹^{*2}

PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal-derived DNA in Animal Feeds

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*1} and Naoki SHINODA^{*2}

^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,

^{*2}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

In Feed Analysis Standards detection of prohibited animal-derived proteins by PCR is determined only by amplicon size. However the determination of only amplicon size may make a miss judge to determine the same size that is non-specific amplicon, it is necessary to confirm whether or not the positive result is due to a non-specific reaction. DNA sequencing is the best method, but it is not suitable in routine analysis. Restriction enzymatic fragment length polymorphism (RFLP) is suitable method for identification of amplicon because it is easy and quick. A method for confirming identification of bovine tissue in animal feed has been developed on the basis of PCR-RFLP analysis in this study. Amplicon by mammal-specific primers was identified by restriction enzyme; *Sml*I and *Mbo*I. Amplicon by ruminant-specific primers was identified by *Bln*I. Amplicon by cattle-specific primers was identified by *Hpy*188III. This PCR-RFLP method, which ensures identification of prohibited animal species in feed, is useful for enhancing the reliability of feed inspection for BSE prevention.

Key words: feed ; animal-derived DNA ; animal protein ; restriction enzyme ; RFLP ; PCR

キーワード：飼料；動物由来 DNA；動物由来たん白質；制限酵素；制限酵素断片長多型；ポリメラーゼ連鎖反応

1 緒 言

日本において牛海綿状脳症（BSE）の感染が確認されたことから、感染の拡大防止のために、反すう動物用飼料を除く家畜用飼料への動物由来たん白質の利用が制限されている。肉骨粉等の反すう動物由来たん白質の家畜用飼料への利用をはじめ、牛用飼料への動物由来たん白質の利用は、原則として禁止されている¹⁾。

現在、飼料分析基準では、飼料中の動物由来たん白質や動物由来 DNA の検出法として、顕微鏡鑑定法、ELISA 法及び PCR 法の 3 つの方法が規定されている²⁾。

PCR 法による動物由来 DNA の検出は、混入を確認したい動物由来たん白質遺伝子に対応するプライマーを用いて、PCR 反応を行い、規定されている増幅産物の大きさで混入の有無を判定してい

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

る。こうした増幅産物の同定は、一般的にシーケンスによる塩基配列の確認を行っているが、日常的検査においては実行上困難である。増幅産物の大きさによる判定は、非特異反応によって同一サイズの増幅産物が生成されている可能性も否定できない。

そこで、今回 PCR 増幅産物の制限酵素切断によって、増幅産物の同定を行うことにより RFLP 法 (Restriction Fragment Length Polymorphism) を用いた迅速で簡便な PCR 反応の確認試験^{3),4)}の検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

- 1) TAE (tris-acetate, EDTA) 緩衝液
50×TAE (ニッポンジーン製) 20 mL を水で希釈して 1,000 mL とした。
- 2) 2.5 %アガロースゲル
Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加熱して溶かし、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成型に流し込み、ゲルとコームの間に気泡が入らないよう慎重にコームを差し込み、室温に放置して固化させた。
- 3) 5 %アガロースゲル
Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加熱して溶かし、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成型に流し込み、ゲルとコームの間に気泡が入らないよう慎重にコームを差し込み、室温に放置して固化させた。
- 4) 電気泳動用色素溶液
6×Lording dye (タカラバイオ製)
- 5) ゲル染色液
臭化エチジウム 10 mg を滅菌した水 1,000 μ L に溶かして臭化エチジウム原液を調製し、使用時にこの原液 50 μ L に TAE 緩衝液 1,000 mL を加えて染色液とした。
- 6) PCR 反应用酵素 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 製)
- 7) PCR 緩衝液 10×PCR Gold buffer (Applied Biosystems 製)
- 8) 2 mmol/L dNTP Mix (Applied Biosystems 製)
- 9) 25 mmol/L 塩化マグネシウム (Applied Biosystems 製)
- 10) プライマー溶液 ほ乳動物検出用プライマー対 (2 μ mol/L), 反すう動物検出用プライマー対 (2 μ mol/L), 牛検出用プライマー対 (2 μ mol/L) (いずれも BEX 製)
- 11) 陽性対照 牛ミトコンドリア DNA (BEX 製)
- 12) PCR 反応液
水 4.7 μ L, PCR 緩衝液 2.0 μ L, 2 mmol/L dNTP Mix 2.0 μ L, 25 mmol/L 塩化マグネシウム 1.2 μ L, 2 μ mol/L 5'プライマー溶液 4.0 μ L, 2 μ mol/L 3'プライマー溶液 4.0 μ L 及び PCR 反应用酵素 0.1 μ L (0.5 unit) を PCR チューブ 1 本あたりの必要量として、それぞれ必要本数分の量を量って順次マイクロチューブ (容量 1.5 ml) に加えて、振り混ぜ調製した。
- 13) DNA 分子量マーカー
100 bp Ladder (100~1,500 bp (base pair)) 及び 20 bp Ladder (20~1,000 bp) (タカラバイオ製) を使用した。

- 14) 水 滅菌超純水（高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 分間）した超純水（電気伝導率 5.6 $\mu\text{S}/\text{m}$ 以下（比抵抗 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上））
- 15) 制限酵素
ほ乳動物検出用プライマー増幅産物用：*Sml*I, (New England Biolab 製), *Mbo*I (タカラバイオ製)
反すう動物検出用プライマー増幅産物用：*Bln*I (タカラバイオ製)
牛検出用プライマー増幅産物用：*Hpy*188III (New England Biolab 製)

2.2 装置及び器具

- 1) DNA 増幅装置：Applied Biosystems 製 PE9700 型
- 2) 電気泳動装置：アドバンス製 Mupid2
- 3) 電気泳動パターン撮影システム：アトー製 AE-6911CX

2.3 試験方法

- 1) PCR 反応
 - i) PCR 反応液 18 μL を PCR チューブ（容量 200 μL ）に入れ，DNA 試料液 2.0 μL を加えて混合し，PCR 反応に供する試料溶液とした。
同時に，陽性対照 2.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 18 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し，陽性対照液を調製した．また，水 2.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 18 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し，陰性対照液を調製した．
 - ii) 試料溶液，陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ，95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）で PCR 反応を行った．
- 2) 電気泳動
 - i) TAE 緩衝液を入れた泳動槽に 2.5 %アガロースゲルを入れ，10 分間 100 V の定電圧をかけて予備泳動をした．
 - ii) PCR 反応の終了した反応液 5 μL に約 1 μL の電気泳動用色素溶液を加えて混合し，その全量をアガロースゲルのウェルに注入した．
 - iii) DNA 分子量マーカーは，100 bp Ladder または 20 bp Ladder 2.5 μL に約 1/5 量の電気泳動用色素溶液を加えて混合し，その全量をアガロースゲルのウェルに注入した．
 - iv) 100 V の定電圧をかけ，ブロモフェノールブルーがウェルから 3~4 cm 移動するまで約 20 分間電気泳動を行った．
 - v) 電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に約 30 分間浸して染色した．
 - vi) 電気泳動パターン撮影システムでアガロースゲルに 312 nm の紫外線を照射し，DNA 分子量マーカーのバンド位置と比較して DNA 断片サイズを決定した．
- 3) PCR 反応による増幅の判定
陽性対照 DNA の PCR 増幅産物と同一サイズの PCR 増幅産物が検出されたことを確認し，検出された PCR 増幅反応液を次の制限酵素反応に供する増幅反応液とした．

4) 制限酵素反応

- i) 増幅反応液 9 μL 及び各プライマー増幅産物に対応する各制限酵素 (Table 1) 1 μL を PCR チューブ (容量 200 μL) に加えた.
- ii) i) を DNA 増幅装置に入れ, 37 $^{\circ}\text{C}$ (*SmlI* のみ 55 $^{\circ}\text{C}$) で 1 時間反応させた.

5) 電気泳動

- i) TAE 緩衝液を入れた泳動槽に 5 %アガロースゲルを入れ, 10 分間 100 V の定電圧をかけて予備泳動をした.
- ii) DNA 分子量マーカーは, 100 bp Ladder, 50 bp Ladder または 20 bp Ladder 2.5 μL に約 1/5 量の電気泳動用色素溶液を加えて混合し, その全量をアガロースゲルのウェルに注入した.
- iii) 制限酵素反応の終了した反応液及び制限酵素反応を行っていない増幅反応液 5 μL に約 1 μL の電気泳動用色素溶液を加えて混合し, その全量をアガロースゲルのウェルに注入した.
- iv) 100 V の定電圧をかけ, ブロモフェノールブルーがウェルから, 5~6 cm 移動するまで約 50 分間電気泳動を行った.
- v) 電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に約 30 分間浸して染色した.
- vi) 電気泳動パターン撮影システムでアガロースゲルに 312 nm の紫外線を照射し, DNA 分子量マーカーのバンド位置と比較して DNA 断片サイズを決定し, データベースで確認した断片と同等の断片が検出されているかを確認した.

3 結果及び考察

3.1 特異性の検討

ウシ, ブタ, ヒツジ, ヤギ, シカ, ウマ, ウサギ, マウス, ラット及びクジラのミトコンドリア DNA (以下「mtDNA」という.) について, 各プライマーで増幅される配列を Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より検索し, CLUSTAL W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) で比較し, MIKENORA RESEARCH version 4.0 (第一化学薬品工業) を用いて適切な制限酵素を検索した. 各制限酵素で切断される増幅断片のサイズは, Table 1 に示した.

Table 1 Predicted fragment sizes of the sequences to be amplified by each primer set based on sequence map analysis

primer	restriction enzyme	template DNA	undigested PCR product size (bp)	digested PCR product size (bp)
mammals	<i>Sml</i> I	cattle, deer, sheep, horse, pig, rat, mouse	176	142, 34
		goat	173	139, 34
		rabbit	176	117, 59
		whale	176	-
	<i>Mbo</i> I	cattle	176	148, 28
		deer, sheep, goat, horse, pig, rat, mouse, rabbit, whale	176	-
ruminants	<i>Bln</i> I	cattle, deer, sheep, goat	201	116, 85
cattle	<i>Hpy</i> 188III	cattle	126	58, 47, 21

同時に、PCR 反応を行い、増幅反応が認められたものに関してそれぞれ実際に制限酵素処理を行い、反応性を調べた (Fig.1~4).

Fig. 1 は、ほ乳動物検出用プライマー対で増幅した PCR 産物に対する *Sml*I の切断像である。A は未処理、B は *Sml*I にて 55 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ラット及びマウス mtDNA 由来の PCR 産物について同様の切断が確認され、Table 1 に示された配列より検索して想定される断片サイズと一致した。一方、ウサギ mtDNA については、他の動物種と切断像が異なるが、こちらも想定されたサイズの断片長であった。クジラ mtDNA については、配列からの想定通り切断は認められなかった。

Fig.2 は、ほ乳動物検出用プライマー対に対する *Mbo*I の切断像である。A は未処理、B は *Mbo*I にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシでは切断が確認され、配列より検索して想定される断片サイズと一致した。シカ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、マウス、ウサギ及びクジラ mtDNA 由来の PCR 産物については、配列からの想定通り切断されなかった。

Fig.3 は、反すう動物検出用プライマー対に対する *Bln*I の切断像である。A は未処理、B は *Bln*I にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ、シカ、ヒツジ及びヤギ mtDNA 由来の PCR 産物について同様の切断が確認され、これは配列より検索して想定される断片サイズと一致していた。

Fig.4 は、牛検出用プライマー対に対する *Hpy*188III の切断像である。A は未処理、B は *Hpy*188III にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ mtDNA 由来の PCR 産物で切断が確認され、これは配列より検索して想定される断片サイズと一致した。

以上のように、どの酵素においても配列より検索して想定される断片のサイズと一致した。

よって、この方法は PCR 増幅産物の同定に有用であることが示唆され、動物由来 DNA 検査の信頼性を高めることが可能であると考えられた。

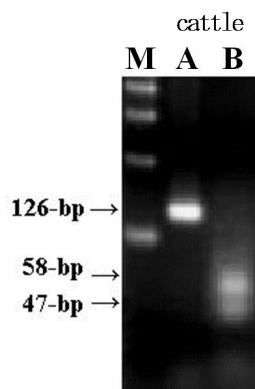


Fig.4 Agarose gel electrophoresis of the fragments produced by *Hpy188III* digestion of the PCR product generated with the cattle-specific primers.

(A): undigested PCR products, (B): digested PCR products, M: DNA size markers (100 bp ladder)

3.2 共同試験

RFLP 法による確認試験法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

配合飼料、豚肉骨粉及び魚粉に牛肉骨粉を 1 %添加した試料より抽出した mtDNA 並びに豚及び羊 mtDNA (BEX 製)の計 5 種類の mtDNA を用い、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターの 6 試験室で共同試験を実施した。

配布試料は、牛肉骨粉を 1 %添加した配合飼料、豚肉骨粉及び魚粉については、飼料分析基準に従って抽出した mtDNA を分注し、そこからランダムに抽出した 5 サンプルについて、均質性の確認試験を行い均質性を確認した後、各試験室に配布した。豚及び羊 mtDNA については市販の陽性コントロールを分注して、同様に均質性を確認した後、各試験室に配布した。

Table 2 に示したように、全ての試験室において、PCR 増幅産物が制限酵素によって消化されると想定されるものについて、全て想定される断片サイズが得られた。また、切断されないと想定されるものについては、全て切断された断片は認められなかった。

以上の共同試験の結果から、RFLP 法を用いた確認試験法の再現性が確認された。

Table 2 Collaborative study results of PCR-RFLP

Lab. No.		mammal-specific primers									
		<i>Sml</i> I					<i>Mbo</i> I				
		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal	
		Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep	Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep
1	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
2	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
3	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
4	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
5	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
6	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	

Lab. No.		ruminat-specific primers					cattle-specific primers				
		<i>Bln</i> I					<i>Hpy</i> 188III				
		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal	
		Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep	Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep
1	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
2	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
3	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
4	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
5	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
6	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	

○ : Amplicon was detected and predicted size fragment is detected.

× : Amplicon was detected but predicted size fragment is not detected/

— : Amplicon was not detected

4 まとめ

飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験について検討したところ、次の結果を得た。

- 飼料分析基準の動物由来 DNA 検出法に使用されているプライマーにより増幅される各動物種について、データベースにてその増幅産物の配列を検索し、その増幅産物を切断可能である制限酵素を検索したところ、ほ乳動物検出用プライマーについては、*Mbo*I 及び *Sml*I、反すう動物用プライマーについては、*Bln*I、牛由来 DNA 検出用プライマーについては *Hpy*188III が適用可能であった。
- データベースより検索できた制限酵素について、実際に分析を行った結果、想定とおりの結果が得られた。
- 6 試験室による共同試験を行った結果、全試験室で想定された結果と一致し、試験の再現性が確認された。
- 以上の結果から、ほ乳動物検出用プライマーの PCR 増幅産物については、制限酵素 *Mbo*I 及び *Sml*I、反すう動物用プライマーの PCR 増幅産物については、*Bln*I、牛由来 DNA 検出用プライマ

一の PCR 増幅産物については *Hpy188III* が、確認試験に適用するのに十分な精度を有していると考えられた。

文 献

- 1) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林水産省令第 35 号 (1976).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) M. Rojas, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P.E. Hernandez, T. Garcia, R. Martin: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J AOAC Int.*, **91**(6), 1416-1422 (2008).
- 4) C. Wolf, J. Rentsch, P. Hubner: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J Agric Food Chem.*, **47**(4), 1350-1355 (1999).