

ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法による肉種の鑑別

加 藤 時 信, 出 来 三 男*

動物肉の種類を簡単に迅速に鑑別することを目的として、ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法の応用について検討した。試料は生鮮肉からの水抽物を用いた。電気泳動法における支持体には 厚さ 1mm で 5% のポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲル用緩衝液としては pH8.3 のトリス緩衝液を用い、電極槽用緩衝液には pH8.2 のほう酸緩衝液を用いる不連続緩衝液系によって電気泳動を行なった。泳動終了後ポリアクリルアミドゲルはアミドブラック 10B で染色し、得られた蛋白質の分離像はデンストメーターにより記録した。全操作の所要時間は約 8 時間であった。この方法により、牛、豚、馬、羊、鯨、鶏及び七面鳥の生肉に含まれる水溶性蛋白質を分離した結果、肉の種類によってそれぞれ特徴的な泳動パターンが得られた。

1 緒 言

畜肉の乏しいわが国では、多くの種類の肉が冷凍、塩蔵、混合肉など種々の形態で多量に輸入されている。これらの輸入肉は肉の種類によって関税率及び輸入制度が異なっているため、肉種を鑑別することは税関にとっても重要な課題の一つである。

肉種の鑑別法としては、従来から食肉加工品の検査等の立場から多くの研究報告がなされている。現在実用化されている肉種鑑別法の主なものは、組織形態観察¹⁾と免疫学的²⁾な方法である。これらのうち、顕微鏡等による組織形態観察による方法は、経験と熟練が要求され、結果の判定に主観的な要素がはいるために個人差が大きいという欠点がある。一方、免疫学的方法としては、免疫拡散法とか免疫電気泳動法などがあるが、この方法では、生化学的に調製された各種動物の抗体が必要であり、これらの抗体は高価であるうえ、長期保存にも問題があるため、恒常分析として使用するには難点がある。このほか、肉に含まれている特定の生体成分、例えば、グリコーゲン、不飽和脂肪酸、不けん化物³⁾ エステラーゼ⁴⁾ ミオグロビン⁵⁾ 等による肉種鑑別法もあるが、このような生体代謝成分を多種類の肉種鑑別に応用するには問題

がある。

ポリアクリルアミドゲルを支持体とする Zone electrophoresis は、酵素をはじめとして多数の生体蛋白質の分離分析に広く利用されている。筋肉蛋白質の電気泳動による分析はそれほど多くないが、これまでに Coduri ら⁶⁾、Hofmann⁷⁾ 及び Payne⁸⁾ は、ポリアクリルアミドゲルを支持体とするディスク電気泳動法により動物肉種の鑑別法を検討している。ディスク法はゲルの調製、染色などが煩雑であり、常に均一なゲルが調製できないので、比較分析法として良好な方法とはいえない。

ここでは、主として動物肉の種類を鑑別するために、平板ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動法について検討し、迅速分析法として利用できることを知ったので報告する。

2 実 験

2・1 試料及び試料の調製

実験に用いた肉は牛(肩、バラ)、豚(肩、バラ)、馬、羊(マトン、ラム)、鯨、鶏及び七面鳥の生肉で、いずれも冷凍したものをを用いた。

これらの肉は、脂肪の大部分を除去して、肉の部分に細断し、肉(約 5g)にほぼ等量の水(約 5ml)を加えて、氷冷しながらガラスホモゲナイザーを用いて磨碎

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

したのち、この粥状物を 3050g で 15 分間冷却下で遠心分離する。上澄液をさらにろ過してろ液を電気泳動用の試料とした。

2・2 試薬及び装置

使用した水はすべてイオン交換水である。

i) 電極槽用緩衝液

ほう酸 37g と苛性ソーダ 4g を水にとかして 2l とする。この緩衝液はほう酸又は苛性ソーダを用いて pH8.2 に調製する。

ii) ゲル調製用緩衝液

1M トリス溶液 200ml と 1M くえん酸溶液 35ml を混合し、水を加えて 1l とする。トリス又はくえん酸溶液を用いて pH8.3 に調製する。

iii) ゲル調製用保存液

A 液: アクリルアミド 23.75g と BIS1.25g をゲル調製用緩衝液にとかして 200ml にする。

B 液: TEMED1ml を水にとかして 100ml にする。

C 液: 過硫酸アンモニウム 100mg を水にとかして 100ml にする。

これらの溶液はいずれも冷暗所に保存する。

ⅲ) 染色液

アミドブラック 10B 2g, メタノール 100ml, 氷酢酸 20ml 及び水 100ml を混合する。

ⅴ) 脱色液

約 3% の酢酸水溶液。

ⅴ) 電気泳動装置

東洋 AE - 2 型免疫電気泳動装置(東洋ろ紙株式会社)。

ⅴ) デンシトメーター

CS910 型二波長薄層クロマトスキャナ(株式会社島津製作所)。

2・3 ゲルの調製

ゲル調製用保存液の A, B 及び C 液をそれぞれ A:B:C=4:3:3 の割合に混合し、 $1 \times 100 \times 170$ mm のゲル薄層作製容器に入れ、気泡が生じないようにガラス板で覆って空気を遮断し、2 時間以上明所に静置して十分に重合させてゲル薄層板を作成する。空気を遮断するためのガラス板には、ゲルに試料溝を作るためのつめ($0.5 \times 1 \times 5$ mm) が 14 個つけてある。この調製法によるとポリアクリルアミドゲル濃度は 5% となる。

2・4 電気泳動操作

2・3 で作成したポリアクリルアミドゲル薄層板の試料溝に 2・1 で調製した試料を 20 - 30 μ l づつ注入し、電気泳動装置にセットする。試料溝のうち 1 箇所には泳

動追跡用色素の BPB 水溶液を注入しておく。電気泳動装置には直流電源を接続し、ろ紙でゲルと電極槽を連結し、ゲルの巾 1cm 当たり 1mA の割合で定電流を通ずる。泳動の終了は BPB が約 7cm 移動したときとした。この条件で泳動時間は約 2 時間である。

2・5 染色及び脱色

泳動を終了したゲル板はアミドブラック 10B の染色液に約 3 分間浸漬して染色する。脱色は 3% 酢酸水溶液を用いて温浴上で加温 (60 ~ 65) しながら行った。約 10 分毎に脱色液を取りかえると、5 ~ 6 回で脱色は終了する。

2・6 デンシトグラムの作成

染色したゲルはデンシトメーターを用いて、620nm の波長で蛋白質の分離パターンを記録した。

3 結果と考察

3・1 ゲルの濃度と泳動像

前記実験条件のうち、ポリアクリルアミドゲルの濃度

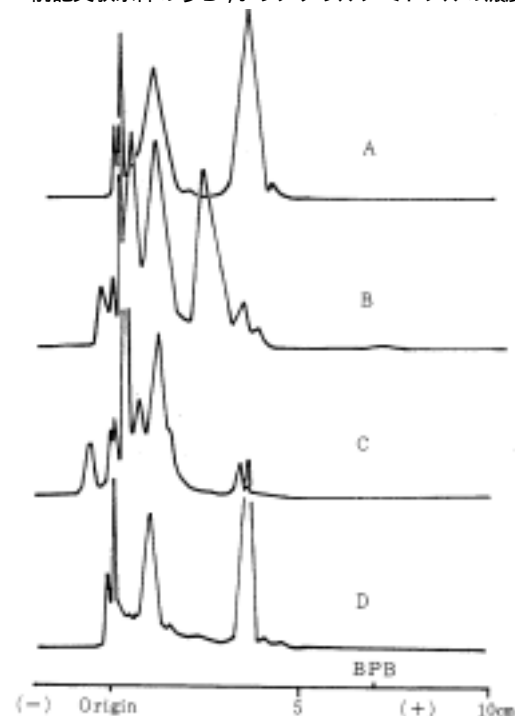


Fig.1 Densitograms of electrophoretogram separated with 9% polyacrylamide gel

A: Mutton extract, B: Horse meat extract,

C: Pork extract, D: Beef extract

を 9%, 8%, 5% 及び 4% と変えた場合の各種肉類蛋白質の泳動像の変化を比較した。

Fig.1 に示したように, 9%ゲルを用いた場合には, 各肉種間の泳動像に違いがみられるが, 原点付近に止まる蛋白質が多い。

ゲル濃度を 8% にすると, Fig.2 に示したように蛋白質の分離像がやや明瞭になってくる。

5%ゲルでは, Fig.3 に示したように, 低分子量の蛋白質は BPB の泳動位置にまで移動し, 蛋白質各質のバンドはテーリングの少ないシャープなバンドとして現われており, 各肉種間の泳動像の相違は明瞭である。

ゲルの濃度をさらに低くして 4%ゲルを用いた場合は, Fig.4 に示したように, 低分子量の蛋白質の分離が, 5%ゲルの場合に比較してやや悪くなっている。

3・2 体の部位による泳動像の変化

牛肉と豚肉について, それぞれ肩及び胸(バラ)肉の蛋白質の泳動像を比較した。Fig.3 に示したように, 牛の肩と胸の肉の泳動像は, 質的に差はないが, 各蛋白質バンド量に違いがみられる。このことは豚肉についても同様に認められた。

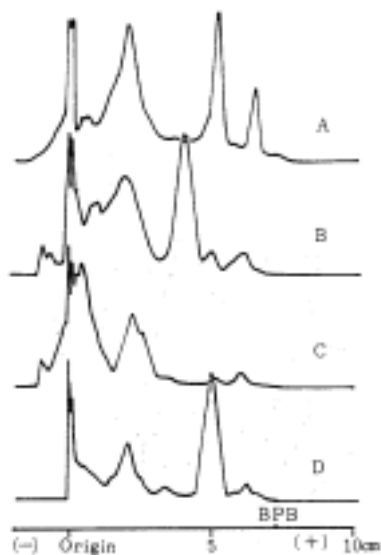


Fig.2 Densitograms of electrophoretogram separated with 8% polyacrylamide gel

A: Mutton extract, B: Horse meat extract, C: Pork extract, D: Beef extract,

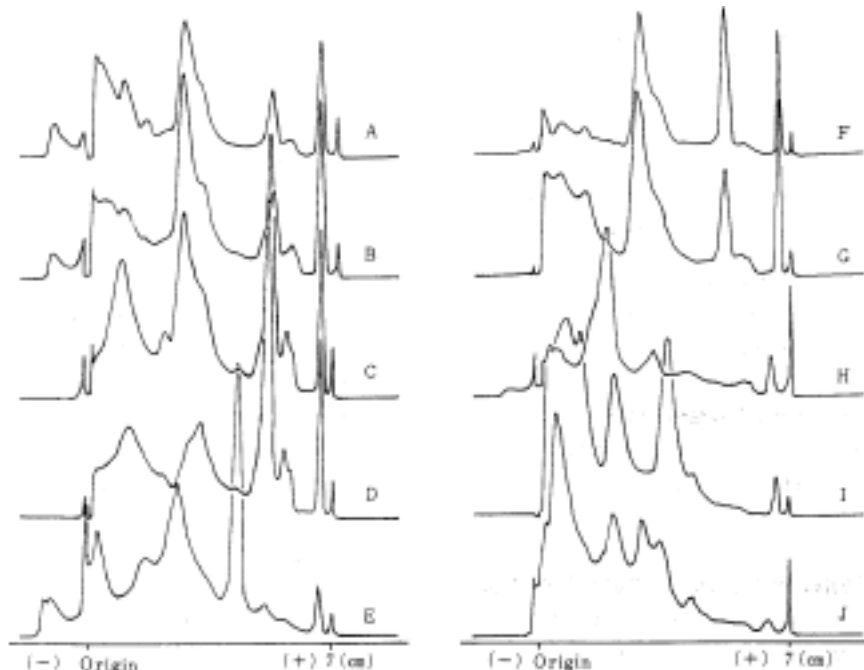


Fig.3 Densitograms of electrophoretogram separated with 5% polyacrylamide gel

A: Pork breast extract, B: Pork shoulder extract, C: Beef breast extract, D: Beef shoulder extract, E: Horse meat extract, F: Mutton extract, G: Lamb extract, H: Whale meat extract, I: Chicken extract, J: Turkey meat extract

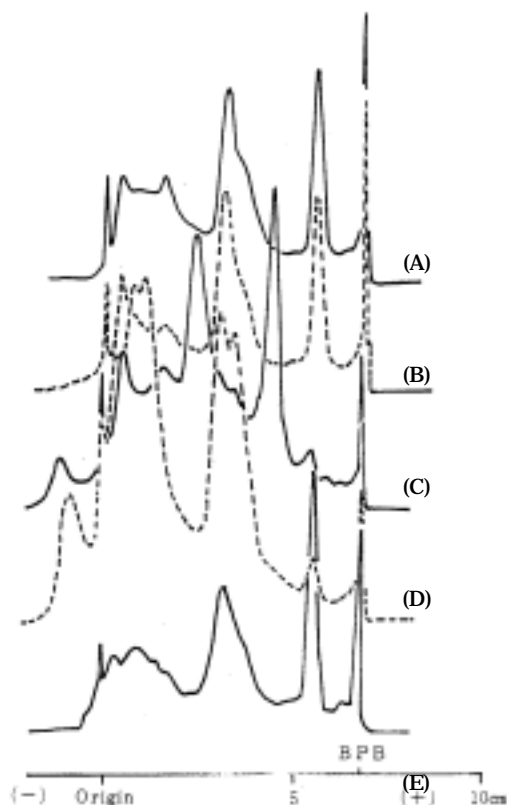


Fig.4 Densitograms of electrophoretogram separated with 4% polyacrylamide gel

A: Lamb extract, B: Mutton extract,
C: Horse meat extract, D: Pork extract,
E: Beef extract

3・2 マトンとラムの泳動像の相違

マトン（親羊）とラム（子羊）の泳動像は Fig.3 及び 4 に示したようにほとんど類似したパターンを示している。

3・4 泳動像に対する SDS 及び尿素添加の影響

ポリアクリルアミドゲルに 1% の SDS を添加して泳動すると、肉の水抽出物に含まれる蛋白質の大部分は移動度が大きくなり、各肉種間の泳動像の違いは SDS 無添加の場合と比較して不明瞭になる。8%ゲルに SDS を添加した場合の泳動像を Fig.5 に示す。

ゲルに 1% の尿素を添加した場合の泳動像は、尿素無添加のものと著しい差はなかった。

ゲルに 1% の尿素を添加した場合の泳動像は、尿素無添加のものと著しい差はなかった。

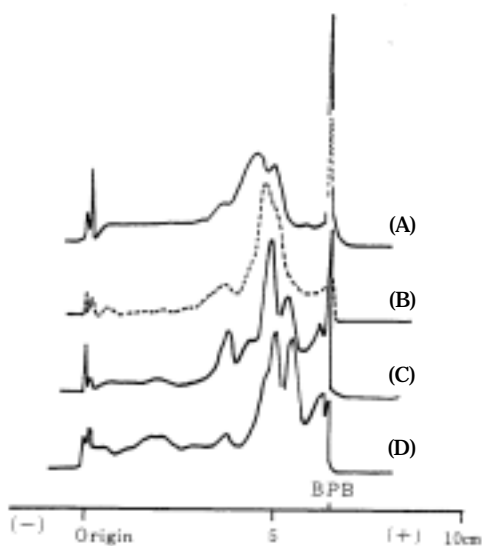


Fig.5 Densitograms of electrophoretogram separated with 8% polyacrylamide gel containing 1% SDS

A: Mutton extract, B: Horse meat extract, C: Pork extract, D: Beef extract

3・5 ゲルの厚さによる泳動像の変化

厚さ 1mm のゲルと 4mm のゲルを用いて巾 1cm 当り 1mA の定電流で泳動した結果を比較すると、BPB が原点から 7cm 移動するのに要する時間は、厚さ 1mm のゲルでは約 2 時間であるが厚さ 4mm のゲルでは 8 時間以上の長時間を必要とした。しかも、厚さ 4mm のゲルを用いた場合の泳動像は蛋白質のバンドが広くなり、蛋白質バンド相互の分離が悪くなる。

4 要 約

肉種の簡易迅速鑑別法の開発を目的としてポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法の基礎的な条件を検討した。

この方法による生肉の水抽出物の電気泳動像は、肉種によってそれぞれ特徴的なパターンを示し、この方法が肉種鑑別の手段の一つとして有効であることを知った。

文 献

- 1) 西尾重光：畜産試験場年報，昭和 37 年度，195 (1962) .
- 2) a. H. G. Fugate , Jr. and S. R. Penn : *JAOAC* , **54** , 1152 (1971) .
 b. B. J. Culliford : *Nature* , **201** , 1092 (1964) .
 c. 小沢総一郎他：日本畜産学会誌，**40** , 357 (1969) .
- 3) G. E. Martin : *JAOAC* , **44** , 881 (1961) .
- 4) R. R. Thompson : *ibid.* , **51** , 746 (1968) .
- 5) T. Höyem and B. Thorson : *J. Agr. Food Chem.* , **18** , 737 (1970) .
- 6) R. J. Coduri , Jr. and A. G. Rand , Jr. : *JAOAC* , **55** , 461 (1972) .
- 7) K. Hofmann : *Z. Anal. Chem.* , **267** , 355 (1973) .
- 8) W. R. Payne , Jr. : *JAOAC* , **46** , 1003 (1963) .

Identification of Meat Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

Tokinobu KATO, and Mitsuo DEKI*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
 531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken,
 271 Japan

Polyacrylamide gel electrophoresis of fresh meat protein extracted with water by the thin layer plate technique was studied as a method for the rapid determination and identification of mixed meat species.

An acrylamide gel (5%) in conjunction with tris - citrate (pH8.3), borate (pH8.2) discontinuous buffer system, produced satisfactory resolution for the separation of meat proteins. After electrophoresis, the gel was stained with 0.2% Amido Black 10B in 9% acetic acid and 45% methanol. The electrophoretogram was traced by densitometer. Distinct electrophoretic patterns were obtained for meat extracts from different meat species. This technique can be used to detect the meat species of beef, pork, horse, mutton, whale, chicken and turkey, respectively.

- Received Sep. 30. 1976 -