

DNA分析による皮革の識別について

田中 康統*, 松本 健志*, 中山 清貴*

Identification of leather by DNA Analysis

Yasunori TANAKA*, Tsuyoshi MATSUMOTO*, Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Identification of animal species in natural leather using optical and scanning electron microscopes sometimes face difficulties because of the morphological similarities among some kinds of animals and loss of morphological characteristics through manufacturing processes. In this study, we tried to identify vegetable tanned cow leather and chromium-tanned cow leather through DNA analysis. It was found that DNA extracted from the two kinds of leather samples was degraded to less than 200 bp. As a result of examining enzymatic treatments, DNA extraction, PCR conditions, etc., we successfully identified the leather samples by PCR-based detection and could also determine species in the vegetable tanned-leather sample by DNA sequencing analysis.

1. 緒 言

皮革は、輸入通関において、適正な関税分類のために、革製品か否かの確認を含め、原料種の確認が必要である他、ワシントン条約等規制対象品目かどうかの確認も必要となっている。

皮は表皮層と真皮層からなり、表皮層は人間の髪の毛にも含まれているケラチンを主成分とし、真皮層はコラーゲンを主成分としている¹⁾。革は皮に鞣しを行ったものをいい、鞣しを行うことで耐熱性、微生物に対する抵抗性、柔軟性を与えることができる²⁾。鞣しとして代表的なものにタンニン鞣しとクロム鞣しがある。前者は植物に含まれているタンニンを鞣し剤として使用し、鞣しに時間がかかる分、丈夫な革に仕上がる。後者は塩基性硫酸クロムを鞣し剤とし、鞣しに時間がかからず、柔軟性のある革に仕上がる³⁾。

皮革の原料種の識別は、従来から、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡等を用いた形態観察により行っている⁴⁾。しかしながら、皮革の原料となる動物種の中には表皮等の構造が似ているものがある他、製革工程において形態学的特徴が失われているものがあり、それらを形態観察から識別することは困難である。

最近では、機器分析による皮革の鑑別が検討されており、DNA分析も選択肢の1つと考えられている⁵⁻⁷⁾。皮革は、鞣し工程の中で加えられる熱処理や薬品処理によりDNA断片化されている他、なめし剤等、PCR反応を阻害する物質を含むために、煩雑なDNA抽出方法を必要とし、PCR法による100~400 bp程度の短いバンド検出で判別する例が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

本研究では、タンニン鞣し及びクロム鞣しの牛革を対象に、皮

革試料の洗浄、酵素反応等を工夫すると共に、高反応性のPCR酵素を使用することで、比較的簡易なDNA抽出法でPCR法に基づくバンド検出及び塩基配列比較による原料種の判別を行う方法を検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

タンニン鞣し牛革、クロム鞣し牛革、ぬか鞣し牛革、牛肉、豚肉、羊肉、山羊肉（いずれも市販品）

2.2 試 薬

- ・塩化ナトリウム、クロロホルム、エタノール、2-プロパノール（いずれも試薬特級、和光純薬工業社製）
- ・1M Tris-HCl (pH8.0)、0.5M EDTA (pH8.0)、TE buffer（いずれも遺伝子工学研究用 和光純薬工業社製）
- ・ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（生化学用、和光純薬工業株式会社製）
- ・フェノール（結晶）、エチジウムプロマイド（いずれも和光純薬工業株式会社製）
- ・ポリビニルピロリドン（不溶性）（東京化成工業株式会社）
- ・プロテイナーゼK（タカラバイオ社製）
- ・コラゲナーゼ（タイプB、動物由来物フリー）（コスモ・バイオ社製）
- ・電気泳動用アガロース：Agarose LO3（タカラバイオ社製）
- ・SYBR GREEN I（ロンザジヤパン社製）

- DNA サイズマーカー : 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ社製), λ /Hind III digest (タカラバイオ社製)
- Lysis Buffer
終濃度が 50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM EDTA (pH8.0), 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 50mM NaCl になるように調整したもの

2.3 プライマー

Mexime ら¹⁰⁾の種特異的プライマーを使用した他, DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に登録された偶蹄類の mtDNA Cytochrome *b* の塩基配列から, 保存された領域 (Appendix 1) に新規に共通プライマーを設計した. 本研究で使用したプライマーの情報を Table 1 に示す.

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in this study⁷⁾

Name	Sequence 5'-3'	Anneal Temp.	Product Size	Target species	Remarks
PIG85L530	ACATACAAATATGTGACCCA	55°C	87bp	Pig	Mexime <i>et al.</i> ¹⁰⁾
PIG85ANCR1	TTAATGCACGACGTACATAGG				
BOV8516335F	ACCCCCAAAGCTGAAGTCT	59°C	84bp	Cow	Mexime <i>et al.</i> ¹⁰⁾
BOV85REVR1	TTAACATACTGATAAGGCTC				
ovisCR1F	CATAATGGTAAGCATGGGCAT	55°C	61bp	Sheep	Mexime <i>et al.</i> ¹⁰⁾
ovisCR1R	CACGATACAGCAGATATGTC				
CAP732F	ACTRTATATCTACCCACAC	46°C	72bp	Goat	Mexime <i>et al.</i> ¹⁰⁾
CAP732R	CATAAAATGTAATGTACATACA				
ARcytb-F1	GAGGACAAATATCATTCTGAGGAGC	60°C	220bp	Artiodactyl	designed in this study
ARcytb-R1	GGGTTGTTGGAKCCKGTTCGTG				
ARcytb-F2	CACGAAACMGGMTCCAACAACC	60°C	171bp	Artiodactyl	designed in this study
ARcytb-R2	GGTGTAGTTRCTGGGTCTCC				

2.4 装 置

サーモミキサー : Eppendorf ThermoMixer comfort
PCR 増幅装置 : Veriti 96well Thermal cycler (Applied Biosystems)
電気泳動装置 : MUPID ミニゲル槽 (ADVANTEC)
画像解析装置 : BIO-PROFILE System2 (VILBER LOURMAT)
DNA シークエンサー : 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

2.5 実 験

2.5.1 試料の採取及び洗浄

タンニン鞣し牛革及びクロム鞣し牛革については, 吉岡らの方法⁸⁾を参考に, まず表面及び裏面のコーティング層を滅菌したやすり等で除去した後, 灰色したカッター等で細分化した. この細片 25mg を 1.5 mL チューブに採取し, Lysis Buffer を 1 mL 程度加え, 55°C の温浴上に置いた. 液が濁るたびに遠心, デカンテーションを行い, 濁りが無くなるまで繰り返し洗浄した. 上記の作業工程を Fig. 1 に示す.

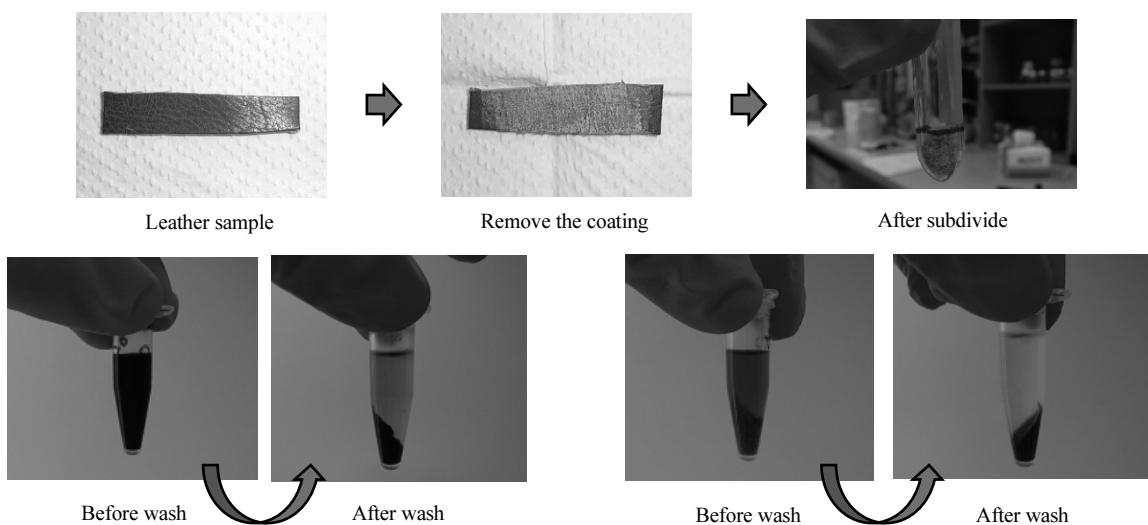


Fig. 1 Flow of sample washing

2.5.2 酵素処理

2.5.2.1 使用する酵素の検討

下記の2通りの方法で牛革試料の加水分解を行い、結果を比較した。

(1) コラゲナーゼのみを使用した場合

洗浄したタンニン鞣し牛革にLysis Bufferを600 μL, ポリビニルピロリドン20 mg, コラゲナーゼを10 mg加え, 55°Cの条件下で12時間処理後に上澄み(約500 μL)を新しい1.5 mLチューブに採取し, CTAB法で抽出を行った。

(2) コラゲナーゼとプロテイナーゼKを併用した場合

洗浄したタンニン鞣し牛革にLysis Bufferを600 μL, ポリビニルピロリドン20 mg, プロテイナーゼKを5 μL加え, 55°Cの条件下で12時間処理後にコラゲナーゼを10 mg加え, さらに12時間処理後に上澄み(約500 μL)を新しい1.5 mLチューブに採取し, CTAB法で抽出を行った。

2.5.2.2 酵素処理時間の検討

洗浄したタンニン鞣し牛革に対してLysis Bufferを600 μL, ポリビニルピロリドン20 mg, プロテイナーゼKを5 μL, コラゲナーゼを10 mg加え, 55°Cの条件下で8時間, 16時間及び24時間処理した他, 比較のために酵素を加えずに24時間処理したもの用意した。酵素処理済の各溶液についてCTAB法でDNA抽出を行い, 酵素処理時間の違いで得られるDNA量に影響があるか確認した。

2.5.3 DNA抽出方法の検討

2.5.3.1 キット法

2.5.2 で得られた酵素処理液について, DNeasy[®]Blood Mini Kit(以下「キット法」という)を使用し, 添付のプロトコルに従ってDNA抽出を行った。DNA抽出物は, 0.8%アガロースゲル電気泳動により分離した後, エチジウムプロマイドで染色し, 確認した。

2.5.3.2 フェノール／クロロホルム法(イソプロパノール沈殿)

2.5.2 で得られた酵素処理液に同量の平衡済フェノールを加えて30分間転倒攪拌させた後, 遠心分離(室温, 13,000 rpm, 10分)した。水層を新しいマイクロチューブに移し, 同量のクロロホルムを加えて30分間転倒攪拌した。再度同じ条件で遠心分離した後, 水層(約400 μL)を新しいマイクロチューブに移し, 5M NaClを100 μL加え, 攪拌後, 遠心分離(室温, 13,000 rpm, 15分)し, 上澄み(約400 μL)を新しいマイクロチューブに移した。溶液と同量のイソプロパノールを加えて攪拌し, 遠心分離(室温, 14,000 rpm, 15分)後, 上澄みを除き, 更に70%エタノールを750 μL加えて軽く攪拌した後, 遠心分離(4°C, 14,000 rpm, 10分)した。溶液をデカンテーションで除き, 乾燥させた後, TE bufferを100 μL加えDNA抽出液とした。DNA抽出物の確認についてはキット法と同様の方法で行った。

2.5.4 PCR反応

(1) TaKaRa Ex TaqTMの場合

PCR溶液は, TaKaRa Ex TaqTMに添付のマニュアルに従い,

DNA抽出液1 μL, プライマー(5 μM)各2 μLの他, 必要な試薬等を加え, 30 μLの系で調製した。PCR反応は, 热変性95°C(4分)を行った後, 95°C(30秒), 46~59°C(1分; Table 1に記載の各プライマーのAnnealing Temp.を参照), 72°C(30秒)のサイクルを40回繰り返した後, 15°Cで保持した。

(2) MightyAmpTMDNA Polymerase Ver.3の場合

PCR溶液は, MightyAmpTMDNA Polymerase Ver.3に添付のマニュアルに従い, DNA抽出液1 μL, プライマー(5 μM)各1.8 μLの他, 必要な試薬等を加え, 30 μLの系で調製した。PCR反応は, 热変性98°C(2分)を行った後, 98°C(10秒), 46~59°C(40秒; Table 1に記載の各プライマーのAnnealing Temp.を参照), 68°C(15秒)のサイクルを40回繰り返し, 15°Cで保持した。

2.5.5 シーケンス反応

增幅が確認されたPCR産物について, 以下の要領でイソプロパノール沈殿を行い, 残存プライマーを除去した。

25 μLのPCR産物に対して3 μLの5M-NaCl, 22 μLの滅菌水, 50 μLの2-プロパノールを加えて混和した後, 遠心分離(室温, 14,000 rpm, 10分)を行った。マイクロチューブから溶液を取り除いた後, 90 μLの70%エタノール(-20°C)を加えて混和後, 遠心分離(4°C, 14,000 rpm, 10分)し, 溶液を取り除いた後, 乾燥させた。これにPCR産物の量に応じてTE bufferを5~20 μL加えた。

上記の精製済PCR産物について, PCR反応と同じプライマー(Table 1参照)を用いて, Big Dye[®]Terminator v1.1により, 添付のマニュアルに沿って5'側及び3'側の両方向からサイクルシーケンス反応を行った。

サイクルシーケンス反応後, CENTRI-SEPカラム(PRINCETON SEPARATIONS社製)を用いて未反応の蛍光色素を除去し, DNAシーケンサーにより各PCR産物の塩基配列を決定した。

3. 結果及び考察

3.1 酵素処理法の検討結果

2.5.2.1の(1)及び(2)により, タンニン鞣された牛革から抽出したDNAの電気泳動像をFig. 2(A)に, 2.5.2.2に沿って酵素処理時間を8時間, 16時間及び24時間とし, 抽出されるDNA量を確認した結果をFig. 2(B)に示す。

コラゲナーゼのみを使用して加水分解を行うよりも, プロテイナーゼKとコラゲナーゼを併用した方が, 電気泳動におけるバンドの濃さからDNA抽出量が多いことがわかった。

酵素処理時間については, 8時間, 16時間及び24時間と延長しても, 抽出されるDNA量にそれ程差異が見られなかつたため, 以後の実験の酵素処理時間は8時間とした。なお, 酵素を添加せずに24時間保持したものからは, DNAを抽出することができなかつた。

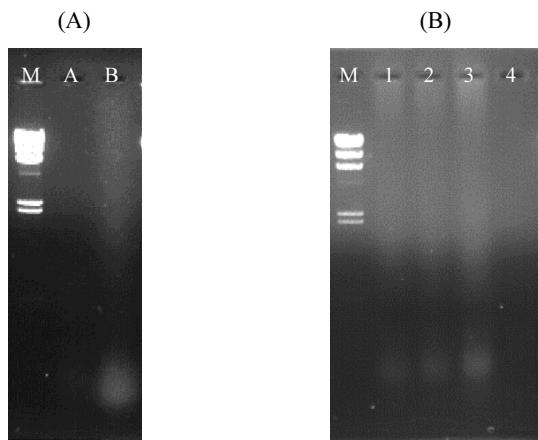


Fig. 2 Electrophoresis of vegetable-tanned cow leather's DNA extracted through: (A) different enzymatic digestion processes, and (B) different digestion times.

Lane A, Use collagenase only; Lane B, Use collagenase and proteinase K; Lane 1, 8-hour treatment; Lane 2, 16-hour treatment; Lane 3, 24-hour treatment; Lane 4, 24-hour treatment without enzyme, Lane M, DNA size marker (λ /Hind III digest).

3.2 DNA抽出方法の検討結果

牛革試料を2.5.2.2の方法でそれぞれ8時間酵素処理を行った後, 2.5.3.1のキット法及び2.5.3.2のフェノール法の各々で精製し, 電気泳動法で分離した結果をFig.3に示す.

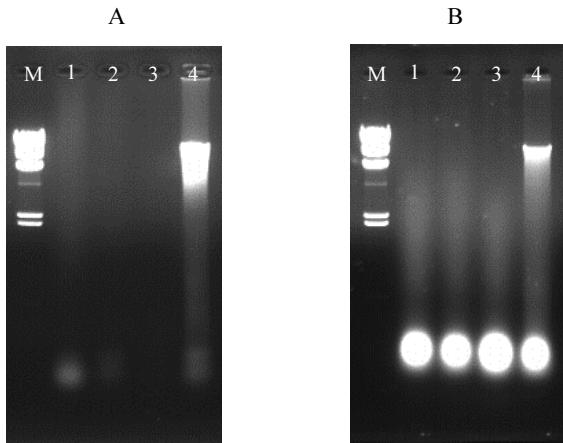


Fig. 3 Electrophoresis of vegetable-tanned cow leather's DNA extracted: (A) by kit method and (B) by phenol method

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef meat (reference); Lane M, DNA size marker (λ /Hind III digest).

Fig.3 (A)の電気泳動像から, タンニン鞣し牛革, クロム鞣し牛革から抽出したDNAは, 100~200 bp程度に断片化されていることを確認した.

キット法及びフェノール法を比較すると, フェノール法を行った方が濃いバンドを示しているが, これはLysis Bufferに含まれる塩等がDNA抽出溶液中に残存し, 電気泳動像にて発色した可能性があることから, 単純にDNA抽出量が多いとは言えない.

3.3 PCR条件の検討

タンニン鞣し牛革からプロテイナーゼKとコラゲナーゼの併用でそれぞれ8時間加水分解した後, フェノール法で抽出したDNAについて, 減菌水で5倍, 10倍, 30倍, 50倍, 100倍希釈したもの及び精製したものを検体とし, ARcytB-F2及びARcytB-R2を使用して, 2.5.4の(1)及び(2)の条件でPCR反応を行った結果をFig.4に示す.

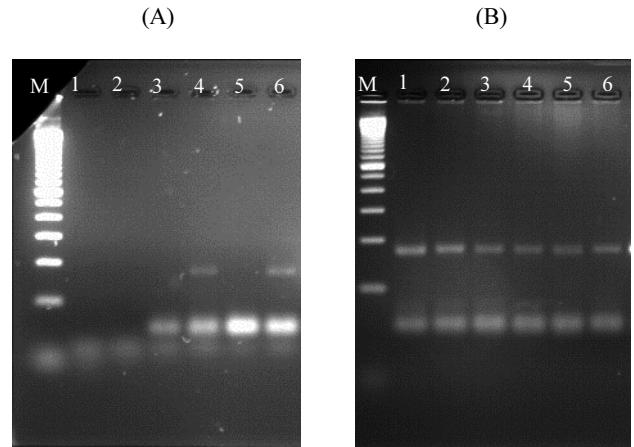


Fig. 4 PCR amplifications of vegetable-tanned cow leather using Artiodactyl common primer set (ARcytB-F2 and ARcytB-R2) with: (A) TaKaRa Ex TaqTM and (B) MightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3

Lane 1, Diluted DNA (x5); Lane 2, Diluted DNA (x10); Lane 3, Diluted DNA (x30); Lane 4, Diluted DNA (x50); Lane 5, Diluted DNA (x100); Lane 6, Refined DNA; Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

TaKaRa Ex TaqTMを使用した場合, 鞍した牛革を含む一部の検体からPCR産物が得られなかったが, PCR阻害物質に対する抵抗性の高いMightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3を使用した場合は, 全ての検体からPCR增幅産物を確認することができた. このことから, 以下の実験(PCR反応)は, 抽出したDNAを50倍希釈し, MightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3を用いて行った.

3.4 種特異的プライマーを用いたPCRによる皮革の原料種判別

各試料から3.3と同様の方法でDNA抽出を行い, Meximeら¹⁰⁾の種特異的プライマーを使用してPCR反応を行った結果をFig.5に示す.

全ての牛革(ぬか鞣し牛革, タンニン鞣し牛革, クロム鞣し牛革)について, 牛特異的プライマーを用いたPCRでバンド検出できた他, リファレンスとして使用した牛肉, 豚肉, 羊肉及び山羊肉それぞれから採取したDNAについても, 各種特異的プライマーを用いたPCRにより, 正常にバンド検出することが可能であった. このことから, 本研究のDNA抽出法とMeximeら¹⁰⁾の種特異的プライマーとの組み合わせで, 豚革, 羊革及び山羊革についても対応できる可能性が示唆された.

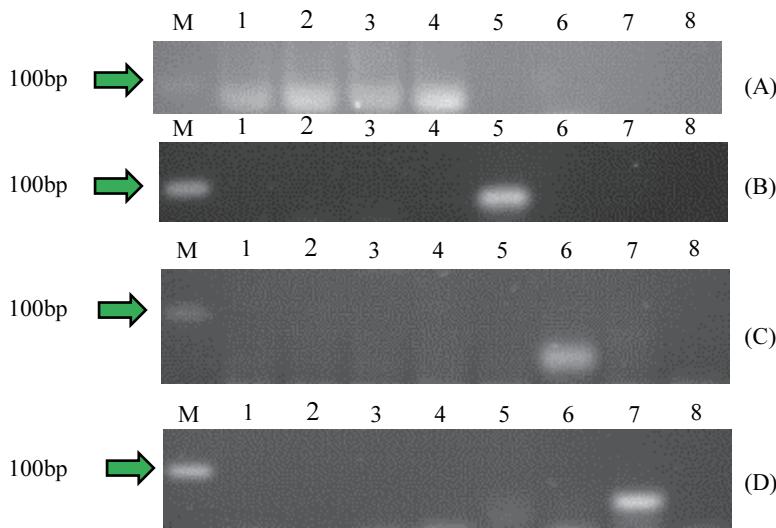


Fig. 5 Result of PCR detections using species-specific primer sets for (A) cow; (B) pig; (C) sheep; (D) goat, all of which are listed in Table 1.

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef; Lane 5, pork; Lane 6, mutton (sheep); Lane 7, chevon (goat); Lane 8, Water (negative control); Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

3.5 塩基配列比較による皮革の原料種判別

3.4において、ぬか鞣し牛革、タンニン鞣し牛革、クロム鞣し牛革、牛肉、豚肉、羊肉、山羊肉から抽出したDNAについて、ARcytb-F1及びARcytb-R1を使いPCR反応を行った結果をFig.6に示す。

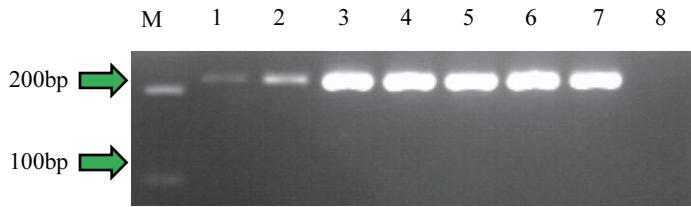


Fig. 6 Result of PCR amplification for leather samples and animal meats using the artiodactyl common primer set (ARcytb-F1 and ARcytb-R1) with MightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef; Lane 5, pork; Lane 6, mutton (sheep); Lane 7, chevon (goat); Lane 8, Water (negative control); Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

各PCR增幅産物について、2.5.5の要領でシーケンス反応を行い、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を解読したところ、クロム鞣し牛革を除く、全てのPCR增幅産物の塩基配列を決定することができた。

得られた各PCR産物の塩基配列について、DDBJのBLAST検索サービスを利用して相同性検索を行った結果、原料種の識別を行うことが可能であった (Appendix 2 参照)。

今後は、クロム鞣し牛革についての条件検討の他、当該直接塩基配列決定法の再現性の確認を行うとともに、豚、羊及び山羊の鞣した革について実際に適応可能か確認が必要である。

4. 要 約

DNA分析による鞣した牛革の原料種判別を検討した。タンニン鞣し牛革及びクロム鞣し牛革について、DNA抽出方法を検討した結果、細片化した試料をLysis Bufferで洗浄した後、プロテイナーゼKとコラゲナーゼを併用してたんぱく質を加水分解処理し、フェノール／クロロホルム法(イソプロパノール沈殿)で抽出することで、100～200 bpに断片化したDNAが得られた。

上記の抽出DNAは、60～72 bpの増幅産物が得られる既知の種特異的プライマー及びPCR阻害物質に強いDNAポリメラーゼであるMightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3を使用することによりPCR増幅が可能であり、SYBR GREEN I染色した電気泳動ゲルにおいてバンドを明瞭に確認することができた。

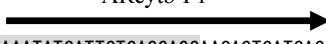
更に、上記のDNA抽出物については、新規開発した偶蹄類用の共通プライマーARcytb-F1及びARcytb-R1を用い、MightyAmpTM DNA Polymerase Ver.3でPCR増幅が認められ、クロム鞣し牛革を除く、すべての試料の塩基配列の決定とDDBJを利用した相同性検索による種判別が可能であった。

今後は、クロム鞣し牛革について更なる条件検討を進める他、当該分析法の再現性の確認を行うとともに、豚、羊及び山羊の鞣した革について適用可能かどうか確認を進める必要がある。

文 献

- 1) 岡村 浩, 村田 正見: 新版 皮革科学 P.4, P.5 (日本皮革技術協会)
- 2) 岡村 浩, 村田 正見: 新版 皮革科学 P.46 (日本皮革技術協会)
- 3) レザーガイド P.11, P.14 (株式会社ストック小島)
- 4) 関税中央分析所ホームページ「404 皮革の分析試験法」(http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_404_j.pdf)
- 5) Y. Izuchi, T. Takashima, N. Hatano : Mass Spectrom. **5**, A004b (2016).
- 6) A. Vuissoz, M. Worobey, N. Odegaard, M. Bunce, C.A. Machado, N. Lynnerup, E.E. Peacock : J. Archaeol. Res. **34**, 823 (2007).
- 7) A. Schlumbaum, P.F. Campos, S. Volken, M. Volken, A. Hafner, J. Schibler : J. Archaeol. Res. **37**, 1247 (2010).
- 8) 吉岡陽一郎: 天然皮革のDNA鑑別 P127-P133 (皮革科学 第49巻 第3号 (平成15年10月))
- 9) 高瀬 和弥, 寺嶋 真理子, 吉村 圭司: 皮革からのDNA抽出法の検討 P.17 (皮革科学 第58巻 第1号 (2012))
- 10) M. Maxime, V. Stéphane, M. Thierry, H. Catherine : Res. J. Biotech. **10**, 65 (2015)

Appendix 1 Multiple alignment of Artiodactyls' mt cytochrome *b* partial sequence.

ARcytb-F1 

Bos tauras AF492351	401:CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCATACATCGGCACAAATTAGTCGAATCTGAGGCGG	500
Bos tauras GQ129207	401:.....	500
Sus scrofa DQ518915	401: C.....T.....G.....A.....T.....AC.....T.....T.....T.....A.....G.....CC.....C.....A.....G.....	500
Sus scrofa AF034253	401: C.....T.....G.....A.....T.....AC.....T.....T.....T.....A.....G.....CC.....C.....A.....G.....	500
Ovis aries AF010406	401:.....T.....T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....CC.....G.....A.....	500
Ovis aries AY858379	401:.....T.....T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....CC.....R.....A.....	500

ARcytb-R1 

Bos tauras AF492351	501:CACGAAACAGGCTCCAACAACCCAAACAGGAATTTCCTCAGACGTAGACAAAATCCATTCCACCCCTACTATACCATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTCT	600
Bos tauras GQ129207	501:.....	600
Sus scrofa DQ518915	501: C.....T.....C.....C.....A.....C.....T.....C.....G.....C.....T.....CC.....CC.....C.....AGCC.....A.....T.....C.....G.....	600
Sus scrofa AF034253	501: C.....T.....C.....C.....A.....C.....C.....G.....C.....T.....CC.....CC.....C.....AGCC.....A.....T.....C.....G.....	600
Ovis aries AF010406	501:.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....GC.....CC.....C.....T.....C.....G.....	600
Ovis aries AY858379	501:.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....GC.....CC.....C.....T.....C.....G.....	600

Note: alphabets and numbers after species names mean accession nos of Genbank.

Appendix 2 Results of homology search

• vegetable-tanned cow leather

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 327 bits (165), Expect = 4e-86

Identities = 172/173 (99%), Gaps = 1/173 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacaccttatcagcaatccatacatcggcacaaattttagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14942 aacagtcatcaccaacaccttatcagcaatccatacatcggcacaaattttagtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctacccgattctcgcttccattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctacccgattctcgcttccattt 15061

Query: 121 tattcctccatttatcatcagtagcaattgccatagtccacctactattcctc 173

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15062 tattcctccatttatcatca-tagcaattgccatagtccacctactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, complete genome.

Length = 16339

Score = 327 bits (165), Expect = 4e-86

Identities = 172/173 (99%), Gaps = 1/173 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacaccttatcagcaatccatacatcggcacaaattttagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14943 aacagtcatcaccaacaccttatcagcaatccatacatcggcacaaattttagtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctacccgattctcgcttccattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctacccgattctcgcttccattt 15062

Query: 121 tattcctccatttatcatcagtagcaattgccatagtccacctactattcctc 173

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15063 tattcctccatttatcatca-tagcaattgccatagtccacctactattcctc 15114

• rice bran-tanned cow leather

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcggcacaaatttagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14942 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcggcacaaatttagtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaaggcaacccttacccgattctcgcttccattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagtagacaaaggcaacccttacccgattctcgcttccattt 15061

Query: 121 tattttccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15062 tattttccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, complete genome.

Length = 16339

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcggcacaaatttagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14943 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcggcacaaatttagtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaaggcaacccttacccgattctcgcttccattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagtagacaaaggcaacccttacccgattctcgcttccattt 15062

Query: 121 tattttccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

• beef (reference sample)

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcgccacaatattgtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14942 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcgccacaatattgtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagttagacaaggcaaccctacccgattctcgcttcattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagttagacaaggcaaccctacccgattctcgcttcattt 15061

Query: 121 ttcctccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15062 ttcctccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, complete genome.

Length = 16339

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcgccacaatattgtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 14943 aacagtcatcaccaacctttatcagcaatccatacatcgccacaatattgtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagttagacaaggcaaccctacccgattctcgcttcattt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagttagacaaggcaaccctacccgattctcgcttcattt 15062

Query: 121 ttcctccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 15063 ttcctccatttatcatcatagcaattgccatgtccacctactattcctc 15114

• pork (reference sample)

>KT626638|KT626638.1 Sus scrofa isolate SP89 cytochrome b (cytb)
gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 tacggcatcacaatctactatcagctatccttatcgaaacagacctcgtagaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 429 tacggcatcacaatctactatcagctatccttatcgaaacagacctcgtagaatg 488

Query: 61 aatctgaggggcttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattttcccttccactt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 489 aatctgaggggcttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattttcccttccactt 548

Query: 121 ttcatttcatttcattaccgcctcgccgtacatctcattccctg 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 549 ttcatttcatttcattaccgcctcgccgtacatctcattccctg 600

>KJ476223|KJ476223.1 Sus scrofa isolate RCSP766-AQ cytochrome b

(cytb) gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 tacggcatcacaatctactatcagctatccttatcgaaacagacctcgtagaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 429 tacggcatcacaatctactatcagctatccttatcgaaacagacctcgtagaatg 488

Query: 61 aatctgaggggcttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattttcccttccactt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 489 aatctgaggggcttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattttcccttccactt 548

Query: 121 ttcatttcatttcattaccgcctcgccgtacatctcattccctg 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 549 ttcatttcatttcattaccgcctcgccgtacatctcattccctg 600

• mutton (sheep) (reference sample)

>KY662385|KY662385.1 Ovis aries breed Afshari sheep cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagttattaccaaccccttcagcaattccatatattggcacaaacctagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 429 aacagttattaccaaccccttcagcaattccatatattggcacaaacctagtcgaatg 488

Query: 61 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctacccgattttcgcccttcactt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 489 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctacccgattttcgcccttcactt 548

Query: 121 tattttccattcatcatcgccatagttcacctactttccctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 549 tattttccattcatcatcgccatagttcacctactttccctc 600

>KY366508|KY366508.1 Ovis aries isolate 103Oo cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial.

Length = 1059

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagttattaccaaccccttcagcaattccatatattggcacaaacctagtcgaatg 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 405 aacagttattaccaaccccttcagcaattccatatattggcacaaacctagtcgaatg 464

Query: 61 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctacccgattttcgcccttcactt 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 465 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctacccgattttcgcccttcactt 524

Query: 121 tattttccattcatcatcgccatagttcacctactttccctc 172

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 525 tattttccattcatcatcgccatagttcacctactttccctc 576

- chevron (goat) (reference sample)

>KY564269|KY564269.1 *Capra hircus* breed Early British Improved
haplogroup A2 mitochondrion, partial genome.

Length = 16594

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcactaatcttcttcagcaatccatataattggcacaaacctagtcgaatg 60

Sbjct: 14532 aacagtcatcactaatcttcttcagcaatccatataattggcacaaacctagtgcatt 14591

Query: 61 aatctgaggggattctcagttagacaaagccactctcacccgattttcgccctccactt 120

Sbjct: 14592 aatctgaggggattctcagtagacaaagccacttcacccgattttcgcccttccatt 14651

Query: 121 tatcctcccattcatcatcacagccctgccatagtccacctgtcttcctc 172

Subj: 14652 tatcctccattcatcatcacagccctgccatagtccacctgcttcctc 14703

>KY564268|KY564268.1 *Capra hircus* breed Old Scottish haplogroup A2

mitochondrion, partial genome.

Length = 16633

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatcactaatcttcttcagcaatccatataattggcacaaacctagtgcattg 60

Sbjct: 14571 aacagtcatcactaatcttcttcagcaatccatataattggcacaaacctagtcgatg 14630

Query: 61 aatctgagggggattctcgatcagaacaaaggccactctccggattcttcgccttccactt 120

Sbjct: 14631 aatctgaggggattctcagtagacaagccactctcacccgattttcgccctccactt 14690

Query: 121 tatcctcccattcatcatcacagccctgccatagtccacctgctttcctc 172

|||||

Sbjct: 14691 tatcctccattcatcatcacagccctgccatagtccacctgcttcctc 14742