

ノート

等電点電気泳動法による肉種の鑑別

鈴木 稔, 川 端 省 三*

Identification of Meat Species by Isoelectric Focusing

Minoru SUZUKI and Shozo KAWABATA*

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

A technique has been developed for the separation of proteins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel.

Isoelectric focusing of fresh meat proteins extracted with water showed clearly separated bands in 1 mm-thick pH gradient (pH 3~10) 4% polyacrylamide gel.

This technique can be used to destructure beef from pork.

1 緒 言

肉種の鑑別法は、生鮮肉（冷蔵及び冷凍品を含む）については、免疫学的方法及びポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法^{1), 2)}が報告されている。また、加熱処理した肉については、SDS - ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法による報告³⁾がある。

電気泳動法の一つとしてポリアクリルアミドゲル内に両性電解質（両性担体）を用いて安定な pH 勾配を形成し、たんぱく質をそれぞれに特有な等電点と同一な pH 域まで電氣的に泳動する等電点電気泳動法が知られている。この方法は、通電によって一旦形成された pH 勾配が通電している間、安定なため通電中に分離成分の移動の停止と濃縮が起こり、高い分離能が得られる。

ここでは、この高分離能を利用して明確な肉種の鑑別法の開発を目的として等電点電気泳動法による肉種の鑑別法について検討したので結果を報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

試薬及び試料の調製には、イオン交換水を使用した。

- (1) 両性担体：pharmalyte pH3 ~ 10 及び pH6.5 ~ 9 (Pharmacia) (40%溶液)
- (2) アクリルアミド溶液：アクリルアミド 20g, メチレンビスアクリルアミド 9g を水に溶かし 100ml にした。
- (3) 50%グリセリン溶液：グリセリン 50g に水を加えて 100ml にした。
- (4) BPB 溶液：少量のプロムフェノールブルーを適当量の水に溶かし、グリセリンを 2~3 滴加えた。
- (5) 電極槽液：陰極側（上部電極槽）0.02M NaOH, 陽極側（下部電極槽）0.01M H_3PO_4
- (6) 染色液：クマシーブリリアントブルー R 0.75g をメタノール 225ml に溶解し、水 465ml を加

* 大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

えた後、スルフォサリチル酸 22.5g, トリクロロ酢酸 75g を加えた。

(7) 脱色液: エタノール 250ml, 酢酸 80ml に水 670ml を加えた。

(8) 電気泳動装置: SJ - 1060 型・SGD 型スラブゲル電気泳動装置 (アトー)

(9) 電源装置: PS - 1510 型 (東洋) (C・C・0~100mA, C・V・0~1500V)

2. 2 試料及び試料の調整

冷凍牛肉, 生鮮豚肉, 市販のハム及び冷凍コンビーフを用いた。

牛肉及び豚肉各々 5g に水 10ml を加え, ホモジナイズしたものを 8000r.p.m. で 10 分間遠心分離し, 上澄液をろ過し, ろ液を検体とした。また, 上記上澄液を 65 及び 95 °C 恒温槽に各々 5 分間及び 10 分間入れた後, ろ過し, ろ液を濃縮したものを検体とした。

市販のハム, ソーセージ及びコンビーフ各々 5g に水 10ml を加え, ホモジナイズしたものを 8000r.p.m. で 10 分間遠心分離し, 上澄液を透析膜で 3 日間透析した後, ろ過し, ろ液を濃縮したものを検体とした。

各々の検体 (0.9ml) に pharmalyte pH3 ~ 10 0.06ml, 50%グリセリン溶液 0.24ml, BPB 溶液 1 μ l を加えたものを泳動用試料とした。

2. 3 ゲルの調製

文献⁴⁾及び予備実験により, ポリアクリルアミドゲル濃度 4%, ゲルの厚さ 1mm のものが良好であったので以下この条件で作成したゲルを用いた。

アクリルアミド溶液 4ml, 50%グリセリン溶液 2ml, phamalyte (pH3 ~ 10 または pH6.5 ~ 9) 1ml, 水 12.8ml, 過硫酸アンモニウム 20mg を混合し, 5 分間脱気した後, N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 5 μ l 加え, あらかじめ, ゲル調製台上に組立てたガラスプレート (132mm×111mm) の間に流し込み, 試料溝用コームを挿入し, 明所に 3 時間以上静置した。

2. 4 電気泳動操作

2. 3 で調製したガラスプレート間のゲルから試料溝用コームを引き抜き, 上部電極槽液で試料溝を洗い, 下部電極槽液がゲル下端から数 mm 浸るように電気泳

動装置にセットし, 2. 1 で調製した試料を 5 ~ 10 μ l マイクロシリンジで試料溝に注入する。

上部電極槽に陰極用電極液を満たし, 電気泳動装置を保冷库 (4 °C) に入れて冷却しながら, 定電圧下, 150V - 30 分, 200V - 1 時間, 300V - 1.5 時間通電し, 泳動先端 (BPB の泳動位置) が, ゲル下端から 20 ~ 30mm 程度となった時, 通電を停止した。

pH 勾配を調べるため, pH3 ~ 10 及び pH6.5 ~ 9 の二種類のゲルについてゲルの右または左端を幅 1cm で 1cm 間隔で切断し, 各ゲル切片に 1ml の水を加えてよく攪拌し, 1 時間後, pH を測定した。

2. 5 染色及び脱色

泳動終了後, ゲルを染色液に浸し, 60 °C に加温, 15 分間染色した。

脱色は, 脱色液を数回取り替え, 十分脱色した。

3 結果及び考察

泳動後のポリアクリルアミドゲル内の pH 勾配は, Fig. に示すように pharmalyte pH3 ~ 10 及び pH6.5 ~ 9 を用いたものは, 共にほぼ直線的な pH 変化を示し, 良好な pH 勾配を形成していることがわかった。なお, pH6.5 ~ 9 のゲル下端が, pH6.7 から pH3.0 に急激に変化しているのは, ゲル下端が陽極用電極槽液 (0.01M H_3PO_4 , pH2.4) に浸っていたためと考えられる。

冷凍牛肉及び生鮮豚肉の泳動像は, pH3 ~ 10 のゲルのもので pH7 付近及び pH5 付近のバンドが明らかに異なっている (Photo. 1, A, D, Photo. 3, A, B)。

加熱処理の程度による泳動像の変化は, 65 °C 5 分間, 10 分間の条件で牛肉は, pH8 付近のバンドが消失し, 豚肉では, pH7 ~ 6 付近のバンドがほとんど消失した (Photo. 1)。95 °C, 10 分間の加熱条件では, 牛肉及び豚肉共にほとんどのバンドが消失した (Photo. 2)。これは牛肉及び豚肉の水溶性たんぱく質は, 加熱処理 (一般的なハム等の食肉調製の条件) の程度により, 相当量減少したことによるものと考えられる。

市販のハムのうち豚肉と表示されたもの (Photo. 3, C, D) は, pH4 付近のバンドが認められるが, 豚肉及び牛肉と表示されたもの (Photo. 3, E) は,



Photo.1

A : frozen beef, B : 65℃, 5 min. boiled beef, C : 65℃, 10min. boiled beef, D : fresh pork, E : 65℃, 5 min. boiled pork, F : 65℃, 10min. boiled pork



Photo.2

A : frozen beef, B : 65℃, 10min. boiled beef, C : 95℃, 10min. boiled beef, D : fresh pork, E : 65℃, 10min. boiled pork, F : 95℃, 10min. boiled pork

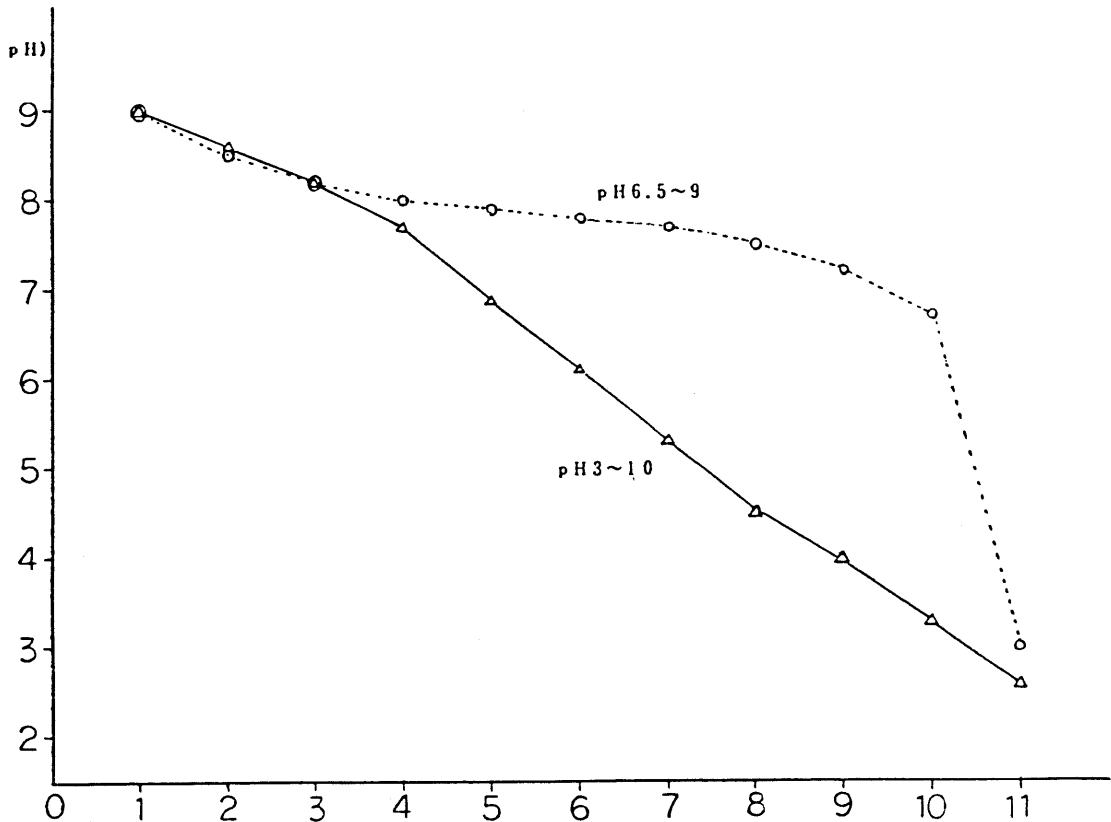


Fig. Difference of pH slope between the kinds of carrier ampholytes

pH6~5 付近にバンドを示し、前記ものと異なる。

また、Photo. 4 に示すように、ハム及びコンビーフにおいても pH6~4 付近のバンドの違いが認められる。

加熱処理した調製肉の水溶性たんぱく質は、少量と考えられ、水溶性たんぱく質の等電点電気泳動像による肉種の鑑別は、かなり困難と思われる。

今後、加熱処理した肉種の鑑別には、難溶性たんぱく質の等電点電気泳動法を検討する必要があると考えられる。

的な条件を検討した。

4% - ポリアクリルアミドゲル(132mm × 111mm 厚さ 1mm, 最終濃度 2% pharmalyte (pH3~10)) を用い、この方法による生肉の水抽出物の電気泳動像は、肉種(牛肉及び豚肉)によって明らかに異なる泳動像を示し、この方法が肉種の鑑別法の一つとして有効であることが判明した。

4 要 約

肉種の鑑別法を目的として等電点電気泳動法の基礎

ノート 等電点電気泳動法による肉種の鑑別



Photo. 3

A: frozen beef, B: fresh pork, C: ham I (pork), D: ham II (pork), E: ham (pork and beef), F: frozen beef

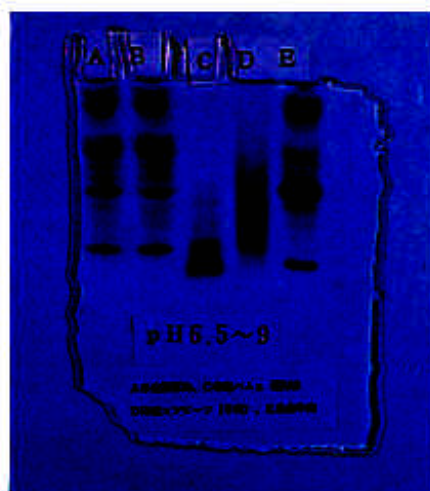


Photo. 4

A, B: frozen beef, C: ham I (pork), D: corned beef (beef), E: fresh beef

文 献

- 1) 加藤時信, 出来三男: 本誌, 17, 17 (1977)
- 2) 加藤時信, 川端省三, 出来三男: 本誌, 19, 57 (1979)
- 3) 加藤時信, 出来三男: 本誌, 18, 17 (1978)
- 4) 宇井信生, 堀尾武一: 等電点電気泳動と等速電気泳動 (別冊蛋白質核酸酵素'78-9), 共立出版(株) (1978)