

ノート

豚肉及び牛肉から構成される混合挽肉の組成割合についての考察 (PCR 法による定量性の検討 <第 1 報>)

赤崎 哲也*，国吉 直樹*，隅野 隆永*，平木 利一*，長井 哲也*

Consideration of the Component's Rate of Minced Meat, which is consisted of Pork and Beef - Examination of Quantitative Analysis by PCR(1) -

Tetsuya AKASAKI*, Naoki KUNIYOSHI*, Takanaga SUMINO*

Toshikazu HIRAKI* and Tetsuya NAGAI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-0076 Japan

On the basis of Japanese Tariff Schedule, all foods and foodstuffs imported into Japan are classified, and import duty, as prescribed for each item and other taxes are then levied. In case of minced meat, which consists of swine and bovine animals, it is classified corresponding to the component or components, which predominate, by weight. Under the present condition of Japanese Customs Laboratory, this problem would be dealt with quantitative analysis of electrophoresis. However, composition of protein that composes meat, is different in accordance with parts of animals. Alternatively, quantitative PCR is not influenced as the above instance, because of having same information in any parts of animal's tissue, which is generally used for eating. Quantification of gene expression by using RT-PCR has been reported on several papers, however, a method which estimate component ratio of mixed meat by using quantitative PCR has not been referred. The principle of this method is based on increasing the amount of PCR product exponentially in early cycles of the reaction. In this study, we examined possibility to quantify by using Electrophoresis of protein and PCR method. As the result, we could get a linea calibration curve using these methods. But we will have to improve our trial in addition to considering the influence of fats on next chance.

1. 緒 言

現在、海外から輸入される物品については、品目毎に定められた関税等が課されている。豚肉及び牛肉から構成される挽肉についても、どちらかが、より多くの成分を占めるかにより、関税分類及び税率が決定される。

この様な物品については、電気泳動法により食肉中のたんぱく質を分離し、標準品との比較を行い、各成分特有のバンドの濃度比を比較することにより、食肉の構成割合を推定することが考えられる。しかしながら、この方法は、食肉原料の加工部位、品種等により構成されるたんぱく質組成が異なることがないとは限らない。一方、豚及び牛に特有の遺伝子を選択的に增幅するプライマーを用いて、定量的 PCR を行い、各構成割合を推定することが可能であれば、前者の様な問題は、解決されるものと思われる。

本研究では、この様な物品について、PCR 法を用いて構成成

分の定量が可能かどうかについて検討し、若干の知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2. 1 試 料

豚挽肉、牛挽肉（いずれも市販品）

2. 2 装 置

DNA サーマルサイクラー (PJ2000)

: TaKaRa BIOMEDICALS

画像解析装置 (BIO - PRINT system)

: M & S Instruments Trading Inc.

冷却遠心分離器 (Avaniti™30 Centrifuge)

: BECKMAN

電気泳動装置 (MUPID)

: コスモバイオ株

紫外分光光度計 (Gene Quant)

: Amersham Pharmacia Biotech Ltd.

電気泳動装置 (Phast System)

: Amersham Pharmacia Biotech Ltd.

ケルダール窒素定量装置 (KJEL - AUTO)

: 三田村理研㈱

2 . 3 実験方法

2 . 3 . 1 試料調製

購入した豚挽肉及び牛挽肉について , 各々 50g 程度を予め減

菌したホモジナイザーで均質化し , その一部を豚挽肉 : 牛挽肉 = 2 : 1 , 1 : 1 , 1 : 2 になるように量り取り , 更に滅菌したホモジナイザーで均質化した。

2 . 3 . 2 試料の組成分析

2 . 3 . 1 で均質化した豚挽肉及び牛挽肉について , 水分 (105 °C , 4h), 粗たんぱく質 (ケルダール法) 及び粗脂肪分 (ソックスレー抽出 , 8h) を測定した。測定結果を Table 1 に示す。

Table 1 components of each minced meats used in this study

Products	Component	(%)	Method
Minced Pork	Moisture	56.2	105°C, 4h
	Protein	16.3	Kjeldahl method
	Fat	27.0	Soxhelt extraction method
Minced Beef	Moisture	56.5	105°C, 4h
	Protein	15.8	Kjeldahl method
	Fat	26.9	Soxhelt extraction method

2 . 3 . 3 SDS - PAGE 及び等電点電気泳動法

SDS - PAGE については , 2 . 3 . 1 で均質化した各資料を SDS 及びメルカプトエタノール等を用いて , Linear な状態にしえ水溶液に溶解させ , 濃度 15mg/ml に調製し , 20% - SDS ポリアクリルアミドゲル (Amersham Pharmacia 製) を用いて分離した。

等電点電気泳動法については , 2 . 3 . 1 で均質化した各試料のうちの一定量をガラスホモジナイザーに移し取り , 適量の蒸留水を加えて十分に混合して静置した後 , 上澄みを試料溶液とし , IEF3 - 9 ゲル (Amersham Pharmacia 製) を用いて分離した。

2 . 3 . 4 DNA 抽出

2 . 3 . 1 で均質化した各試料について , 0.8mm 角程度を NP - 40 buffer (140mM - NaCl , 1.5mM - MgCl₂ , 100mM - Tris/HCl , 0.5%NP - 40 , pH8.5) を 70 μl 加えた 1.5ml 溶エッペンドルフチューブに移した後 , 更に滅菌処理した小型はさみで微小片にカットした。この試料溶液に Cell lysis SDSbuffer (1.2%SDS , 12mM - EDTA , 120mM - NaCl) を 500 μl と 10mg/ml の Proteinase K を 10 μl 加え , 55 °C のウォーター・バスで 2 ~ 4 時間 , 又は 37 °C のインキュベーターで一晩反応させ , 組織片を完全に消化させた。この消化溶液をフェノ-

ル・クロロホルム溶液およびエタノール溶液で精製し , 50 μl の TE buffer (1mM EDTA , 10mM Tris - HC1 , pH8.0) に溶かして DNA 抽出溶液とした。この DNA 抽出溶液について , 吸光度 (OD₂₆₀) を測定し , 濃度 80ng/μl に調製し , PCR 用 DNA テンプレートとした。

2 . 3 . 5 PCR による定量

目的遺伝子を增幅するのに使用した 3 種類のプライマー・セットを Table 2 に示す。

PCR 反応は , 0.5ml 容のエッペンドルフチューブで行い , DNA 抽出溶液 1 μl , プライマー・セット (200ng/μl) 各 1 μl を用い , TaKaRa Ex Taq の標準プロトコールに従い , 150 μl の容量で調製した。この反応混合溶液に数滴のミネラルオイルを滴下した後 , 以下の様な条件で PCR 反応を行った。

プレヒート (pre - heat)	94 °C	8 分	24cycles
結合 (annealing)	55 °C	1 分	
伸長 (extension)	72 °C	1 分	
変性 (denature)	94 °C	30 秒	

PCR 反応中 , 10 サイクルから 24 サイクルの間 , 2 サイクル毎に 10 μl 程度分取し , 氷中に保存した。

これら PCR 産物を NUSIEVE GTG agarose ゲル (FMC

Table 2 Three kinds of primer set used in this study

Art2(LINE)

Art2-F1 : 5'-AGCATATT(A/G)AAAAGCAGAGA-3'
CAR1 : 5'-AAGTCGCTTCAGTC(A/G)TGT-3'

PRE1 (SINE)

PIG-F1 : 5'-GGAGTTCCCATC(A/G)TGGCTCA-3'
PIG-R1 : 5'-ATGGAGGTTCCCAGGCTAGG-3'

CHR1 (SINE)

CHR-1F : 5'-GTGGCACAGTGGTTAAGAATCTG-3'
CHR-1R : 5'-CTGCACAGCTTGTGGGATC-3'

BioProducts), TAE buffer(20mM Tris - Acetic acid, 0.5mM EDTA)で電気泳動し、画像解析装置で各バンドの濃淡を解析

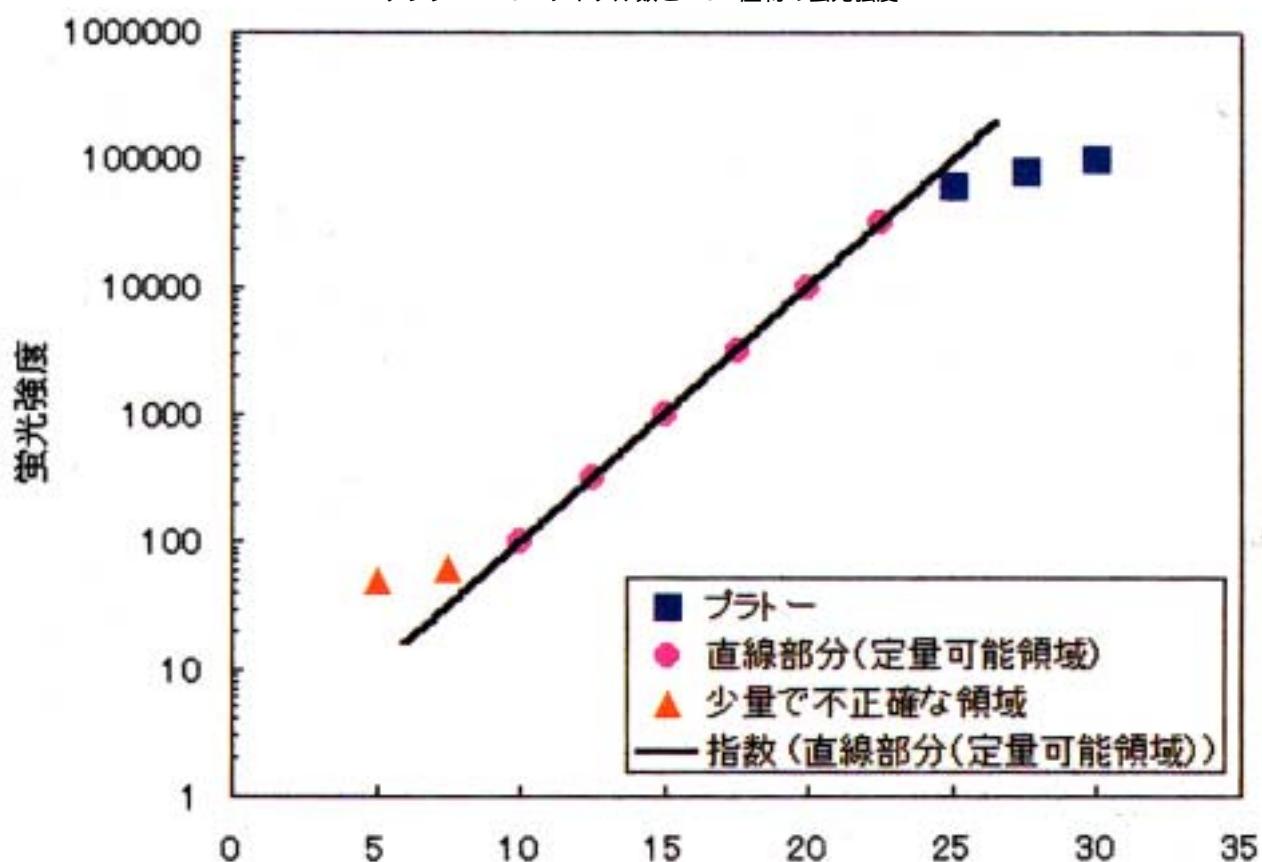
3. PCR法による定量の原理

PCRのカイネティクスでは、PCR生成物の量は反応初期には、ほぼ指数関数的に増加するが、ある程度増幅されたところでプラトーに達して増加が停止する。このため、PCR生成物量は必ずしも初期錆型量を反映しないことになる。したがって定量的PCRを行うためには、このPCRのカイネティクスの特性を考慮に入れる必要がある。

した。

実際に測定を行う場合、PCRサイクル数を変化させて反応生成物量を測定し、そのカイネティクスから定量性のあるPCRサイクル数の範囲を知ることが必要になる。グラフ1に示すように定量性を保ったまま測定できるサイクル数は、反応生成物量が検出器の検出下限以上に増幅されてからプラトーに達するまでの期間である。この間のPCR生成物の量は、PCRのカイネティクスから以下の理論式にほぼ合致しているものと考えられる。

グラフ1 PCRサイクル数とPCR産物の蛍光強度



$$Y = 1 \times E^n \quad (1 \quad E(\text{増幅率}) \quad 2, \quad : \text{初期錆型量}, n : \text{サイクル数}) \dots (1)$$

つまり数学的にいえば、実験的に得られたカイネティクス曲線から指数増加を示す直線部分のみを抽出して、その値を元に(1)式に基づく回帰分析を行い、定数E、nを求め、これを初期錆型量の推定値とすればよいことになる。

本実験では、2成分A及びBのA/Bを回帰分析により求め、A/B比からそれぞれの構成要素についての含有割合の推定を行った。

4. 結果及び考察

4.1 SDS-PAGE及び等電点電気泳動による定量実験

20%SDS-PAGE及び等電点電気泳動法による豚肉、牛肉

及び豚牛混合挽肉の電気泳動像をFig.1に示す。

20%SDSPPポリアクリルアミドゲルでは、豚肉及び牛肉に特異的なバンドを検出することができず、両者の鑑別に用いることはできなかった。(Fig.1A)

一方、IEF3-9ゲルを用いた等電点電気泳動法では、いくつかの豚肉及び牛肉に特異的なバンドを検出した。本研究では、数個の特異的なバンド中、Fig.1B中に矢印で示した豚肉及び牛肉に特異的な2つのバンドを用い、その濃淡で構成割合の推定を行った。Fig.2にその結果を示す。豚牛混合挽肉の構成割合について、比較的良好な検量線を作成することができた。

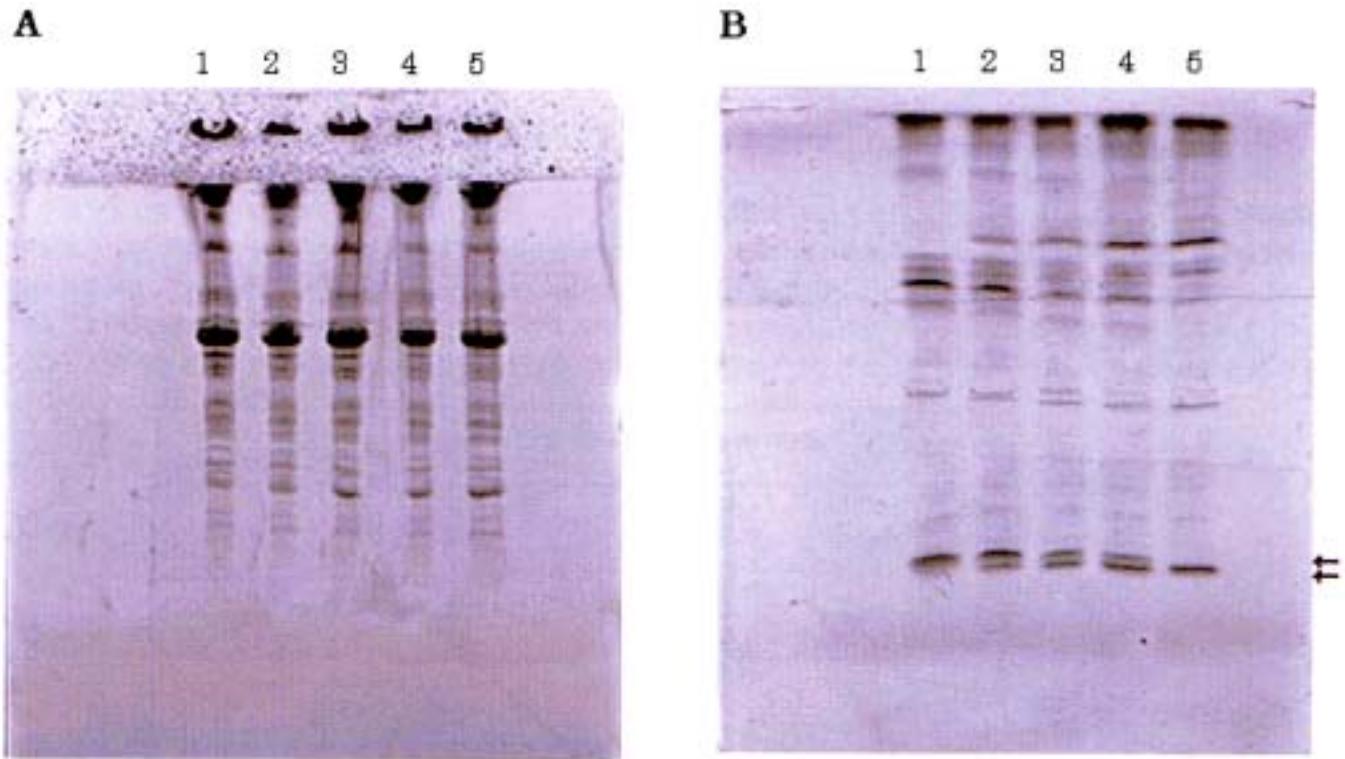


Fig.1 Separation of proteins consisted minced pork, beef and mix meat using two independent methods of electrophoresis. (A) 20%SDS-PAGE showing separations of several different mix ratio of minced pork and beef. 1: pork, 2: pork and beef (2:1), 3: pork and beef (1:1), 4: pork and beef (1:2), 5: beef. (B) IEF3-9 showing separation of several differen mix ratio of minced pork and beef. 1: pork, 2: pork and beef (2:1), 3: pork and beef (1:1), 4: pork and beef (1:2), 5: beef.

4 . 2 PCR 法による定量実験

PCR 法による定量に先立って、3 種類のプライマー・セットを用い、豚肉及び牛肉について、電気泳動により PCR 産物のバンド長を確認した。その結果を Fig.3 に示す。牛特有の Art 2 (LINE) 遺伝子の内部配列からをデザインした Art 2 プライマー及び豚特有の Pre 1 (SINE) 遺伝子の内部配列からデザインした PIG - 1 プライマーでは、各々を単独で用いた場合には、それぞれ種に特異的な単一なバンドを示したが、各々を同時に混合して使用し競合的な PCR を行った場合には、豚のバンドのみが増幅された。偶蹄類 (Ruminant) に特異的な散在性繰り返し配列 (SINE) の内部配列からデザインした CHRI プライマーでは、牛においては単一なバンドを示したが、豚の場合には、牛のバンドと同位置に微弱なバンドを生じ、このバンドが定量に影響を与えたため、実際の定量分析には、Art 2 及び PIG - 1 プライマーを用いた。

Fig.4A に Art 2 及び PRE1 プライマー各々独立に使用し、3 種類の異なる混合割合に調製した挽肉(豚・牛)中の豚及び牛に特異的な遺伝子配列について、各 PCR サイクル毎における PCR 産物の電気泳動像を示す。豚及び牛の混合挽肉中の豚及び牛それぞれに特異的なバンドは、サイクル数が増加するに従い、その濃度が濃くなっているのが分かる。また、それぞれの混合比に調製した挽肉についての増加曲線を Fig.4B に示す。この増加曲線中の PCR 産物が直線的に増加しているサイクルの部分について回帰分析し、求められた初期錆型量についての比から作成した検量線を Fig.5 に示す。この結果、

Art 2 及び PIG - 1 プライマーにより、比較的良好な検量線を作成することができた。

5 . 要 約

豚肉及び牛肉からなる混合挽肉について、それぞれの構成割合を推定するためにたんぱく質組成及び定量的 PCR からのアプローチを試みた。

たんぱく質の組成分析では、SDS - PAGE 及び等電点電気泳動法を行った。このうち等電点電気泳動法では、豚肉及び牛肉に特異的ないいくつかのバンドを検出することができ、その濃淡が構成割合の推定に対するある程度の指標になることがわかった。

PCR を用いた定量については、豚及び牛に特異的な散在性繰り返し配列 (SINE 及び LINE) を検出に用い、各サイクル毎のバンドの濃度をトレースすることによりそれぞれの初期錆型量を推定し、構成割合の推定を行った。この結果、構成要素の割合を推定できる可能性を有していることがわかった。

しながら、今回用いた試料では、構成成分中の粗脂肪分が等しかったために考慮する必要がなかったが、実際の試料については、産地・種類により構成成分中の粗脂肪分が異なることが考えられる。

今後は、この点に留意するとともに、CHR 1 配列の解析を行い、競合的な PCR を行うための最適化されたプライマーをデザインする予定である。

最後に、本研究に際し、プライマーについての知見をご教示
に深謝します。
しただいた東京工業大学の岡田典弘教授及びスタッフの皆様方

文 献

- 1) Hiroki N, Hiromichi Y and Jun F: Nucl Acides Res20 : 4939,1992
- 2) 木下朝博，下遠野邦忠：蛋白質核酸酵素：Vo132, No.2,135-134,1992
- 3) 松永孝光，柴田清弘，山田順一，新村裕：日本食品科学工業会誌，第46巻,第3号, 187-194, 1999(3月)
- 4) Russell H, Gavin D, P. Sean W and Robert G:BIO/TECHNOLOGY VOL10.413-417,1992
- 5) Mitsuru S, Hiroshi Y, Kazuhiko O, Hideaki A, Hidehiro K, Toshiya K, Mutsuo G, Isao M. and Norihiro O : Nature388:666-670,1997
- 6) 中山広樹：バイオ実験イラストレイテッド3⁺,秀潤社
- 7) Paul D. Siebert and James W. Lerrick : Nature359:557-558,1992
- 8) Tomohiro K, Jun Imamura, Hirokazu N, and Kunitada S: Anal Biochem 2 06-231-235,1992