

全自動電気泳動装置を用いた DNA 分析の導入検討

高嶋 康晴

Yasuharu TAKASHIMA

要 約

多くの PCR 法では、電気泳動により分離された特定塩基長の PCR 産物や制限酵素で断片化された DNA 断片の塩基長のパターンを目視で検出し生物種や品種等の判定を行う。電気泳動にかかる一連の操作を手作業で行うことによる分析者への負担の軽減及び分析処理の効率化を図るために、マグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種判別法について、アガロースゲル電気泳動と全自動電気泳動装置による電気泳動の比較検討を行った。その結果、全自動電気泳動装置は、従来のアガロースゲル電気泳動と同様に PCR 産物や DNA 断片の塩基長の検出が可能であり、各魚種の判別に問題は生じなかった。また、全自動電気泳動装置による電気泳動では、アガロースゲル電気泳動で分離が困難な 10-15 bp 程度の差がある DNA 断片の塩基長の分離及び検出が困難な 25-80 bp 程度の短い DNA 断片の塩基長の検出が可能であった。

判定に用いる DNA 断片の検出において、塩基配列から推定した理論上の DNA 断片の塩基長と分子量マーカー算出された DNA 断片の塩基長の値(測定値)との間に大きな差がみられる場合もあったが、各 DNA 断片の塩基長の測定値の標準偏差は一部の DNA 断片を除いて 5 bp 以下であり、一定の測定値をとるものと考えられた。

1. はじめに

農林水産消費安全技術センターの食品表示監視業務で用いている DNA 分析法では、アガロースゲル電気泳動により特定塩基長の PCR 産物の有無や制限酵素で断片化された DNA を塩基長ごとに分離し、そのパターンの確認により生物種や品種等の判別を行っている。アガロースゲル電気泳動では、ゲルの作成、電気泳動、画像撮影の一連の操作を手作業で実施しており、分析にかかる負担が大きく、処理件数の制限につながっている。近年、この電気泳動に関する操作の自動化が進められ、試料(PCR 産物又は PCR 産物の制限酵素処理溶液等の DNA 試料)及び試薬を装置にセットし、ソフトウェア上の簡単な操作で DNA を検出し、DNA サイズ等のデータ解析を自動で行う装置が開発されている。今回、食品の表示監視業務に活用しているマグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種判別法について自動電気泳動装置による電気泳動とアガロースゲル電気泳動とを比較し、導入にあたって分析法の同等性の確認を行った。

2. 実験方法

マグロ属魚類及びサケ科魚類の種判別法では、マグロ属魚類及びサケ科魚類の試料から抽出した DNA 溶液を鋳型として PCR-RFLP 法によりマグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種判別を行う。PCR には、マグロではミトコンドリア DNA の ATCO 領域 (ATPase 6 遺伝子領域の一部から cytochrome c oxidase subunit III (COIII) 遺伝子領域の一部にまたがる領域) (増幅長 915 bp)、サケ科魚類ではミトコンドリア DNA の cytochrome b (Cytb) 遺伝子の部分配列 (増幅長 314 bp) に特異的なプライマーを用いた。得られた PCR 産物を制限酵素で処理し、断片化された DNA のパターンの違いによりマグロ属魚類及びサケ科魚類の魚種を判別する。

実験操作のうち、マグロ属魚類の DNA 抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動については、「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」¹⁾に従い実施した。サケ科魚類の DNA 抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動については、Russel らの報告²⁾及び「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」を参考にサケ科魚類用に改変したもののうち 4 制限酵素を選択して実施した。

全自動電気泳動法では、装置及び専用キットの操作プロトコールに従って実施した。

2.1 試料

実験に用いるマグロ属魚類には、魚種を確認して入手した太平洋産クロマグロ *Thunnus orientalis*、大西洋産クロマグロ *T. thynnus*、ミナミマグロ *T. maccoyii*、メバチ *T. absus* α タイプ及び β タイプ、キハダ *T. albacares* 並びにビンナガ *T. alalunga* の 5 種 7 遺伝子型を試料とした。サケ科魚類も同様に、魚種を確認して入手したサケ *Oncorhynchus keta*、ギンザケ *O. kisutch*、ベニザケ *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbusha*、サクラマス *O. masou*、マスノスケ *O. tshawytscha*、ニジマス *O. mykiss* 並びにタイセイヨウサケ *Salmo salar* の 8 種を試料とした。

2.2 DNA 抽出

DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いた。試料 10-25 mg を採取し 180 μ L の Buffer ATL (キット添付試薬) 及び 20 μ L の Proteinase K (キット添付試薬) を添加後、55 $^{\circ}$ C に保温し、試料が完全に溶解するまで 2 時間以上放置した。次に、100 mg/mL RNase A (QIAGEN 社) を 4.0 μ L 添加し、室温で 2 分間静置した。200 μ L の Buffer AL (キット添付試薬) を添加し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。200 μ L の試薬特級エタノール (和光純薬社) を添加し、溶液全量を付属のカラムに負荷した。カラムを室温で 6,000 \times g で 1 分間遠心した。カラムに Buffer AW1 (キット添付試薬) を 500 μ L 加え、室温にて 6,000 \times g で 1 分間遠心し、さらに、カラムに Buffer AW2 (キット添付試薬) を 500 μ L 加え、室温で 12,000 \times g で 3 分間遠心し、カラムを洗浄した。DNA の溶出には Buffer AE (キット添付試薬) を 200 μ L 加え、室温で 1 分間静置後、6,000 \times g で 1 分間遠心し、もう 1 度 Buffer AE を 200 μ L 加え、1 回目の溶出液と合わせて遠心操作を行い、溶出液を DNA 溶液とした。

2.3 PCR

PCR 反応液の組成は、マグロ属魚類では、3.75 Units の DNA ポリメラーゼ AmpliTaq GoldTM (Life Technologies 社)、1 \times PCR Buffer II (AmpliTaq GoldTM 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture

(AmpliTaq Gold™ 添付試薬)、1.5 mmol/L MgCl₂ (AmpliTaq Gold™ 添付試薬) 0.5 μmol/L プライマーセットを含む反応液系に 5.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 50 μL とした。サケ科魚類では、1.25 Units の DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold™、1×PCR Buffer II、0.2 mmol/L dNTP Mixture、1.5 mmol/L MgCl₂、0.5 μmol/L プライマーセットを含む反応液系に 10.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 50 μL とした。マグロ属魚類判別用プライマーセットには、5'プライマーとして L8562 : CTTCGACCAATTTATGAGCCC、3'プライマーとして H9432 : GCCATATCGTAGC CCTTTTTG (増幅長 915 bp) を用い、サケ科魚類判別用プライマーセットには、5'プライマーとして LSml-cytb : ATGGCCAACCTCCGAAAAAC、3'プライマーとして HSml-cytb : CCRTARTAAAGTC CHCGGGCGA (増幅長 314 bp) を用いた。マグロ属魚類の PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 94 °C で 8 分、次に (1) 熱変性として 94 °C で 1 分、(2) アニールリング (プライマーと熱変性した DNA を結合させる工程) として 53 °C で 1 分、(3) 伸長反応として 71 °C で 1 分 30 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 71 °C で 7 分反応させた。サケ科魚類の PCR の温度サイクルでは、最初の熱変性として 95 °C で 8 分、次に (4) 熱変性として 94 °C で 30 秒、(5) アニールリングとして 55 °C で 15 秒、(6) 伸長反応として 72 °C で 1 分の (4) ~ (6) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。両魚種判別法における PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies 社) を用いて行った。

2.4 制限酵素処理

マグロ属魚類の魚種判別法では、3 種類の制限酵素 *Alu* I (Fermentas 社)、*Mse* I (New England biorabs 社) 及び *Tas* I (Fermentas 社) を使用した。サケ科魚類の魚種判別法では、4 種類の制限酵素 *Alu* I、*Dde* I (TOYOBO 社)、*Sau* 3AI (TOYOBO 社) 及び *Mva* I (Fermentas 社) を使用した。*Alu* I は 5 Unit、*Mva* I は 4 Unit、*Mse* I (TOYOBO 社) 及び *Tas* I (Fermentas 社) は 2.5 Unit 使用し、制限酵素反応液は PCR 産物 10 μL に滅菌水を加えて全量 20 μL に調整した。制限酵素処理は、*Alu* I、*Mse* I、*Dde* I、*Sau* 3AI 及び *Mva* I 制限酵素反応液を 37 °C、*Tas* I 制限酵素反応液を 65 °C でそれぞれ 1.5 時間、GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies 社) を用いて実施した。

2.5 電気泳動

2.5.1 アガロースゲル電気泳動 (従来法)

アガロース電気泳動のアガロースは Agarose LE (和光純薬社) を用い、ゲルの濃度は 3.0 % (w/v) とし、エチジウムブロミド (和光純薬社) をゲル 100 mL 当たり 2 μL 使用し、電気泳動緩衝液は TAE 緩衝液を用いた。分子量マーカーとして 100 bp ラダー (プロメガ社) を使用した。電気泳動装置は、Mupid-II (コスモバイオ社) を使用した。電気泳動結果は電気泳動撮影装置 AE-6931FXCF (アトー社) を用いて画像データで記録した。なお、TAE 緩衝液は、8 mmol/L Tris-HCl、8 mmol/L 酢酸、0.2 mmol/L EDTA で調製したものをを用いた。

2.5.2 全自動電気泳動装置による電気泳動

マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (島津製作所社) 用の電気泳動キットのうちマグロ属魚類の魚種判別法では DNA-1000 キットを、サケ科魚類の魚種判別法では DNA-500 キットを用いた。

電気泳動操作は電気泳動装置及びキットのプロトコールとおりに使用した。キット外の試薬としては、TE 緩衝液 (pH 8.0) (和光純薬社)、SYBR Gold® (インビトロジェン社)、分子量マーカーとして、DNA-500 キットについては 25 bp ラダー (プロメガ社)、DNA-1000 キットについては、 $\phi \times 174$ DNA/Hae III Makers (プロメガ社) 及び 100 bp ラダー (プロメガ社) を使用した。電気泳動結果は電気泳動イメージとして画像データとして保存した。

ノイズや目的外のピークを除去するために、S/N 比 10 以上及び 1 ng/ μ L 以上をピークと認識するように解析ソフトウェアのピーク検知条件を設定した。電気泳動結果は装置のソフトウェア上で電気泳動イメージとして作成し保存した。

また、分子量マーカーから算出された DNA 断片の塩基長の測定値について評価するために、マグロ属魚類では、PCR 産物を制限酵素 *Alu I* 及び *Mse I* でそれぞれ処理した DNA 断片、サケ科魚類については、PCR 産物を制限酵素 *Dde I* 及び *Alu I* で処理した DNA 断片の計 4 制限酵素処理液の電気泳動を異なる実験日で 7 回実施し、判別に用いる DNA 断片の塩基長の測定を行った。

3. 結果及び考察

マグロ属魚類及びサケ科魚類の判別について、従来法であるアガロースゲル電気泳動と全自動電気泳動装置による電気泳動の比較を行った (図 1、図 2)。判定に用いるすべての DNA 断片はピークの検出条件 S/N 比 10 以上及び 1 ng/ μ L 以上で検出された。さらに、DNA-500 キットでは、アガロースゲル電気泳動では分離できなかった 10-15 bp 差の DNA 断片の検出が可能であり、さらに、アガロースゲル電気泳動で検出が困難な 25-80 bp の短い DNA 断片の検出が可能であった。

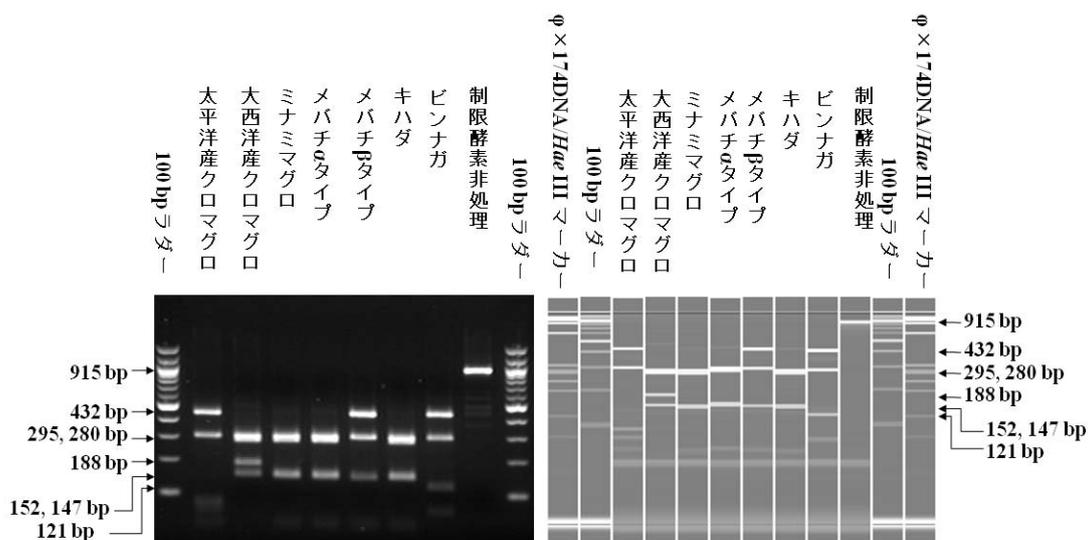


図 1. 1 マグロ属魚類 *Alu I* 処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動 (左) 及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ (右)

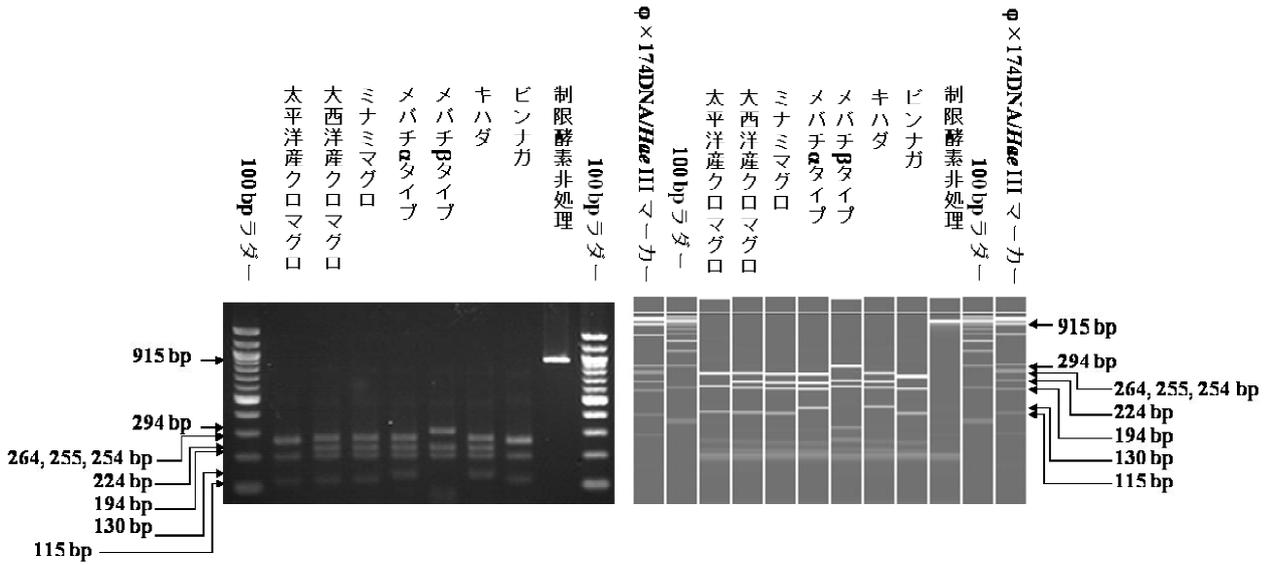


図1. 2 マグロ属魚類 *Mse* I処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動（左）及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ（右）

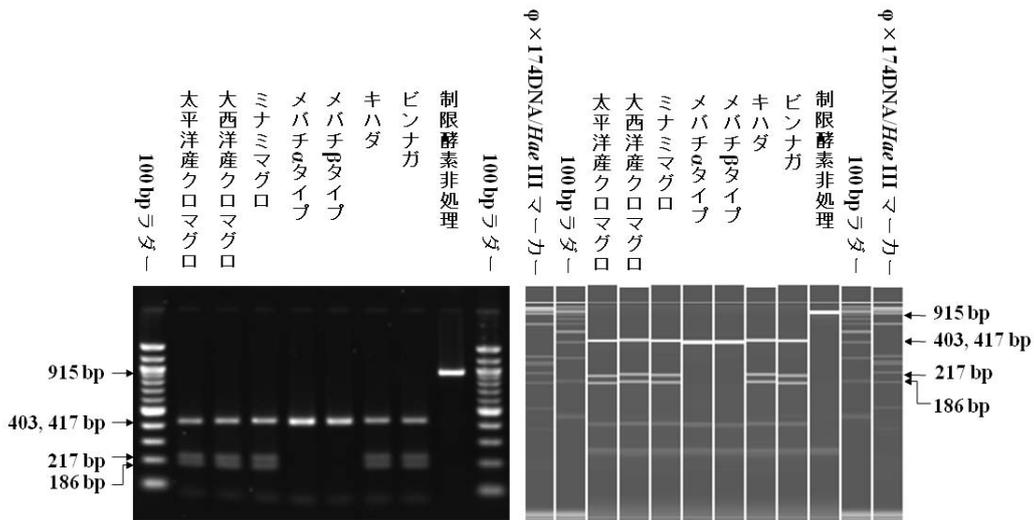


図1. 3 マグロ属魚類 *Tas* I処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動（左）及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ（右）

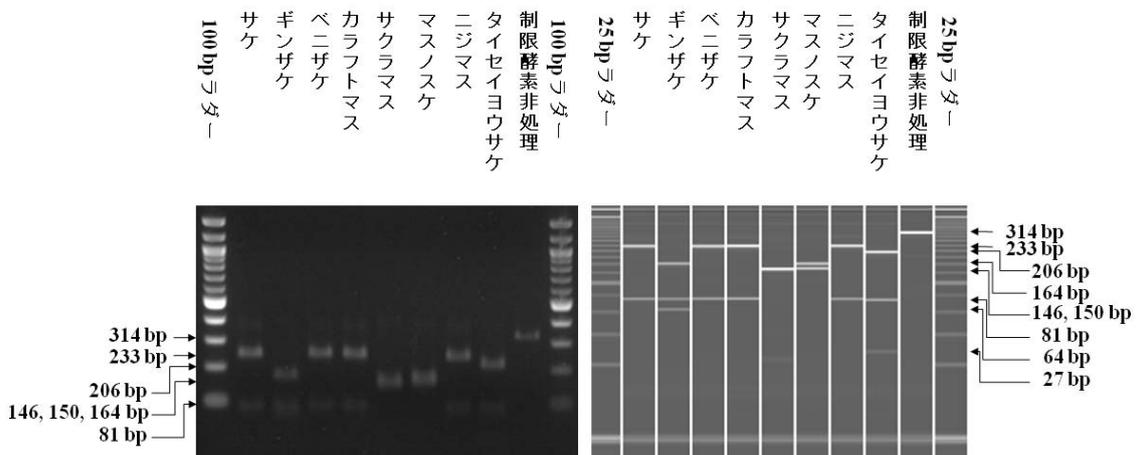


図2. 1 サケ科魚類 *Dde* I処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動（左）及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ（右）

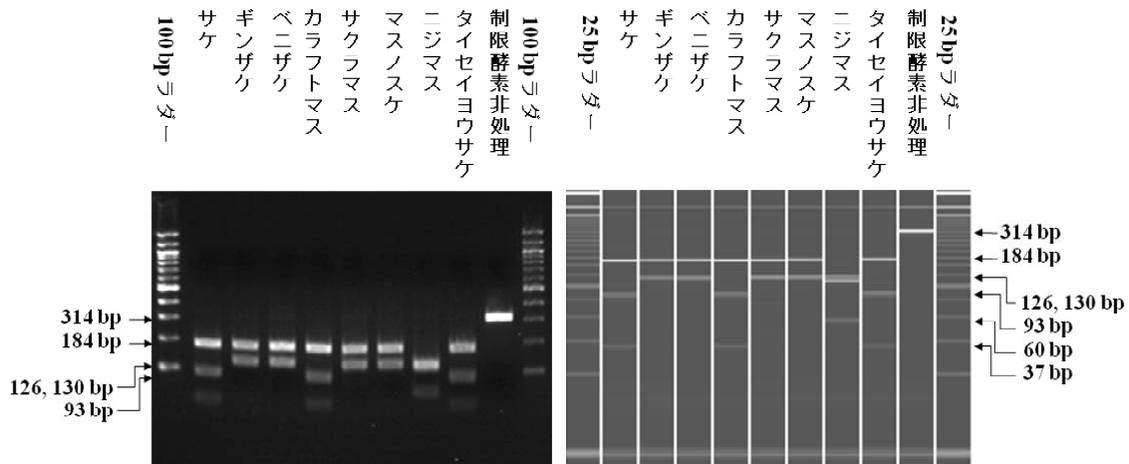


図 2. 2 サケ科魚類 *Alu I* 処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動 (左) 及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ (右)

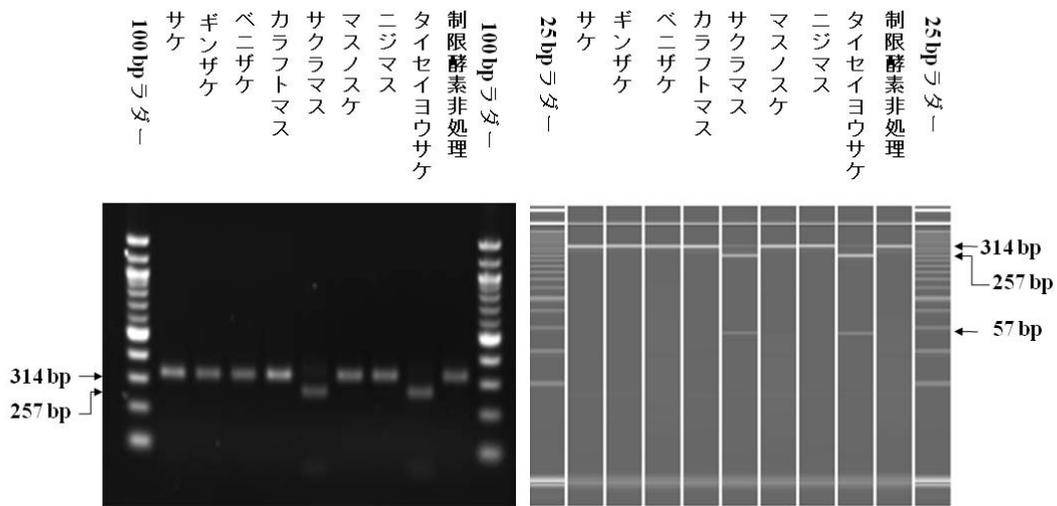


図 2. 3 サケ科魚類 *Sau 3A I* 処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動 (左) 及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ (右)

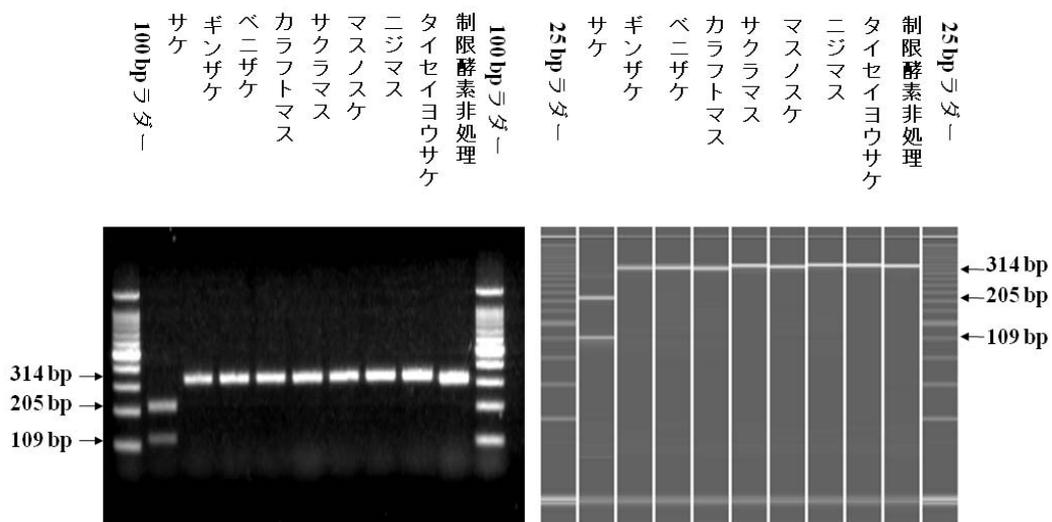


図 2. 4 サケ科魚類 *Mva I* 処理後の電気泳動パターン
アガロースゲル電気泳動 (左) 及び全自動電気泳動装置による電気泳動イメージ (右)

また、アガロースゲル電気泳動では目視で塩基長を推測し、検出の確認を行っているが、全自動電気泳動装置による電気泳動では、分子量マーカーから目的のDNA断片の塩基長の測定値が算出される。この算出された測定値について、DNA-500キット及びDNA-1000キットともに塩基配列から推定した理論上のDNA断片の塩基長と測定値の差が10 bp以上あるDNA断片の測定値がみられ(表1)、測定値からDNA断片の塩基長を特定することは困難であった。しかし、各DNA断片の塩基長の測定値の標準偏差は、DNA-1000キットにおけるマグロ属魚類判別用のPCR産物(915 bp)の測定値以外は5以下であり、同じ塩基長のDNA断片では安定した値をとるものと推定された。実際の検査では、検査試料由来のDNA断片と標準DNA由来のDNA断片の電気泳動を同一測定ランで実施し、標準のDNA断片の塩基長の測定値から分析法の安定性を確認し、その測定値を基に検査試料のDNA断片の検出を確認し、判別する必要があると思われる。

表1. 1 DNA断片の塩基長の測定値平均と標準偏差 (DNA-500)

DNA断片の塩基長 (bp)	判別魚種・制限酵素	測定値平均 (bp)	測定値平均との差 (bp)	標準偏差
314	サケ科魚類・Dde I	326.5	12.5	3.5
233	サケ科魚類・Dde I	237.5	4.5	3.4
206	サケ科魚類・Dde I	211.7	5.7	2.8
164	サケ科魚類・Dde I	168.1	4.1	3.1
150	サケ科魚類・Dde I	153.6	3.6	2.1
81	サケ科魚類・Dde I	90.6	9.7	1.1
64	サケ科魚類・Dde I	75.4	11.4	1.4
27	サケ科魚類・Dde I	30.0	3.0	1.5
314	サケ科魚類・Alu I	323.0	9.0	2.8
184	サケ科魚類・Alu I	181.0	2.7	2.7
130	サケ科魚類・Alu I	134.2	4.2	2.2
124	サケ科魚類・Alu I	128.0	4.0	2.8
93	サケ科魚類・Alu I	102.3	9.3	1.9
60	サケ科魚類・Alu I	68.0	8.0	0.5
37	サケ科魚類・Alu I	38.3	1.3	1.5

表1. 2 DNA断片の塩基長の測定値平均と標準偏差 (DNA-1000)

DNA断片の塩基長 (bp)	判別魚種・制限酵素	測定値平均 (bp)	測定値平均との差 (bp)	標準偏差
915	サケ科魚類・Alu I	958.7	43.7	15.9
432	サケ科魚類・Alu I	414.2	17.8	3.7
295	サケ科魚類・Alu I	296.8	1.8	1.8
280	サケ科魚類・Alu I	280.0	0.0	3.0
188	サケ科魚類・Alu I	182.4	5.6	1.8
152	サケ科魚類・Alu I	146.3	5.8	0.9
147	サケ科魚類・Alu I	142.5	4.5	1.6
121	サケ科魚類・Alu I	120.6	0.4	2.0
915	サケ科魚類・Mse I	968.0	53.0	5.9
294	サケ科魚類・Mse I	293.0	1.0	4.7
264	サケ科魚類・Mse I	262.1	1.9	2.9
254, 255	サケ科魚類・Mse I	253.9	0.6	2.3
224	サケ科魚類・Mse I	221.5	2.5	1.2
194	サケ科魚類・Mse I	194.3	0.3	1.3
130	サケ科魚類・Mse I	128.5	1.5	1.2
115	サケ科魚類・Mse I	112.5	2.5	1.2

4. まとめ

マグロ属魚類及びサケ科魚類の判別法について、全自動電気泳動装置による電気泳動とアガロースゲル電気泳動を比較したところ、全自動電気泳動装置による電気泳動でもアガロースゲル電気泳動と同様にマグロ属魚類並びにサケ科魚類の魚種判別のための DNA 断片の塩基長の検出が可能であることが明らかとなった。さらに、全自動電気泳動装置では、DNA 断片の塩基長の分離能が高く、アガロースゲル電気泳動では分離できなかった 10-15 bp 差の DNA 断片の分離や検出できなかった 25-80 bp の短い塩基長の DNA 断片の検出が可能となることが確認できた。分子量マーカーから算出した DNA 断片の塩基長の測定値は、塩基配列から推定した理論上の DNA 断片の塩基長と 10 bp 以上差がある測定値もあり、測定値から DNA 断片の塩基長を特定することは難しいが、測定値の標準偏差は 5 以下であり、同一 DNA 断片の塩基長では一定の範囲の測定値をとるものと考えられた。

5. 文 献

- 1) 「マグロ属魚類の魚種判別マニュアル」, 農林水産消費技術センター/水産総合研究センター、平成 17 年 4 月 27 日 (平成 18 年 12 月 14 日一部改正)
- 2) Russell J V, Hold L G, Pryde E S, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Sotelo G C, Perez-Martin I R, Santos T A, Rosa C., Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species, *J. Agric. Food Chem.*, **48**(6), 2184-2188, 2000