

PCR-RFLP 法および PCR-SSCP 法によるフグ種の鑑別

山口県環境保健センター
吹屋貞子, 数田行雄

Identification of Puffer Fish Species by PCR-RFLP and PCR-SSCP

Sadako FUKIYA, Ikuo KAZUTA
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

フグ種は、体表の色彩、棘の有無、尾ひれの形・色彩など形態学的特徴から鑑別されるが、皮を除去した身欠きや刺身・切り身等では形態による鑑別ができない。しかし実際には、加工食品やフグ中毒発生時の食べ残しなど、形態によらない鑑別が必要となる事態は多くあり、食品衛生上、正確なフグ種鑑別技術の確立が必要である。

近年、DNA 分析による種鑑別が様々な食品を対象に行われている。今回、ミトコンドリア DNA 分析によるフグ種の鑑別法として、PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法について検討を行ったので、その結果を報告する。

材料と方法

1 材料

フグは、形態により種を鑑別した後、 -20°C で保存し、その筋肉を用いた。山口県内で普通に食用とされる種（トラフグ、カラス、マフグ、シマフグ、ショウサイフグ、ナシフグ、コモンフグ、ヒガンフグ、クサフグ、ゴマフグ、サンサイフグ、クロサバフグ、シロサバフグ、カナフグ、ヨリトフグ）およびドクサバフグを使用した。

DNA の抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）を用いて行い、吸光度測定により濃度を確認し調整したものを DNA 試料とした。

2 PCR-RFLP 法

PCR は、DNA 試料を、プライマー-L14735 と H15573（表 1）を用いて表 2、表 3 の条件で行った。その後、反応液の一部についてアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、PCR 産物（889 bp）ができていることを確認した。

制限酵素による切断は、Bsa I、BsaJ I、Stu I、Ssp I および BsrD I の 5 種類の制限酵素（New England Biolabs 社）により行った。PCR 産物液 3 ～ 5 μL 、制限酵素 1 μL とバッファー

を混合し、全体量 20 μL で、表 4 に示す条件にて反応を行った。バッファーは、制限酵素に付属のものを使用した。

反応後の産物について、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを確認した。

表 1 ミトコンドリア DNA シトクロム b 領域の一部を増幅するためのプライマー ^{1) 2)}

Primers	Sequence (5' to 3')
L14735	AAAAACCACCGTTGTATTCAACTA
H15573	AATAGGAAGTATCATTCGGGTTTGATG
CYTb1	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
CYTb2	GCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCTCA

表 2 PCR 反応液の組成 (25 μL)

	量 (μL)
10 $\times$ ExTaqBuffer	2.5
dNTP (2.5 mM each)	2.0
primer1 (50 μM)	0.1
primer2 (50 μM)	0.1
ExTaq (5 U/ μL)	0.1
DNA 試料 (5 ng/ μL)	5.0
水	15.2

表 3 PCR 条件

95 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
95 $^{\circ}\text{C}$	1 min	} $\times 35$
50 $^{\circ}\text{C}$	1 min	
72 $^{\circ}\text{C}$	2 min	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
4 $^{\circ}\text{C}$		

表 4 制限酵素反応条件

制限酵素	温度 (°C)	時間 (分)
Bsa I	50	60
BsaJ I	60	120
Stu I	37	360
Ssp I	37	150
BsrD I	65	180

3 PCR-SSCP 法

PCR は、DNA 試料を、プライマー-CYTb1 と CYTb2（表 1）を用いて表 2、表 3 の条件で行った。その後、反応液の一部についてアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、PCR 産物（367 bp）ができていることを確認した。

PCR 産物液 4 μ L とサンプルバッファー（95%Formamide, 20 mmol/L EDTA, 0.05% Bromophenol blue）16 μ L を混合して 95°C で 5 分間反応（変性）させ、氷水で急冷した後、電気泳動を行った。泳動ゲルは、CleanGel DNA Analysis kit（GE Healthcare 社）を用いた。電気泳動装置は、Multiphor II（Pharmacia 社）を用いた。染色は、DNA Silver Staining kit（GE Healthcare 社）を用いた。

結果

1 PCR-RFLP 法

図 1～5 にそれぞれの制限酵素処理後の泳動像を示す。

5 種のフグ（12:クロサバフグ、13:シロサバフグ、14:カナフグ、15:ドクサバフグ、16:ヨリトフグ）については、Bsa J I 処理にてそれぞれ異なる切断パターンを示しており、鑑別が可能であった（図 2）。

他の 11 種については、表 5 に一覧表にしている。トラフグとカラス、マフグとサンサイフグ、ショウサイフグとゴマフグについては、これら 5 つの制限酵素では同じ切断パターンを示し鑑別できなかったが、シマフグ、ナシフグ、コモンフグ、ヒガンフグおよびクサフグについては、複数の制限酵素を組み合わせにより他と異なる切断パターンを示し、鑑別可能であった。

表 5 PCR-RFLP 結果（トラフグ属 11 種）

	Bsa I	BsaJ I	Stu I	Ssp I	BsrD I
トラフグ	○	○	○	○	○
カラス	○	○	○	○	○
マフグ	●	○	○	○	○
シマフグ	●	○	○	☆	☆
ショウサイフグ	○	●	●	○	○
ナシフグ	○	○	○	○	☆
コモンフグ	○	○	●	○	○
ヒガンフグ	●	☆	○	○	○
クサフグ	●	☆	○	○	○
ゴマフグ	○	●	●	○	○
サンサイフグ	●	○	○	○	○

☆：他と異なる切断パターン

○及び●：それぞれの処理で同じ切断パターン

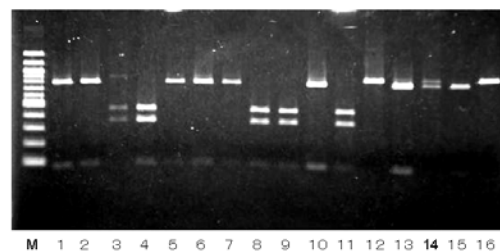


図 1 Bsa I 処理

1:トラフグ 2:カラス 3:マフグ 4:シマフグ 5:ショウサイフグ
6:ナシフグ 7:コモンフグ 8:ヒガンフグ 9:クサフグ
10:ゴマフグ 11:サンサイフグ 12:クロサバフグ
13:シロサバフグ 14:カナフグ 15:ドクサバフグ 16:ヨリトフグ
M : 100 bp DNA ラダー

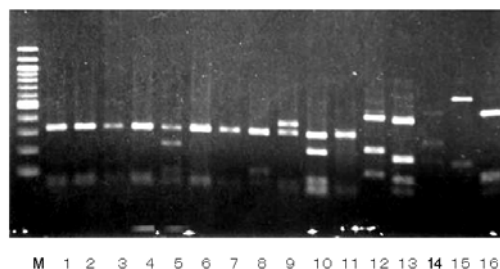


図 2 Bsa J I 処理

レーンの番号とフグの種類は図 1 に同じ。

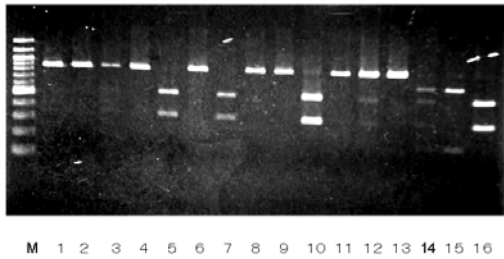


図3 Stu I 処理

レーンの番号とフグの種類は図1に同じ。

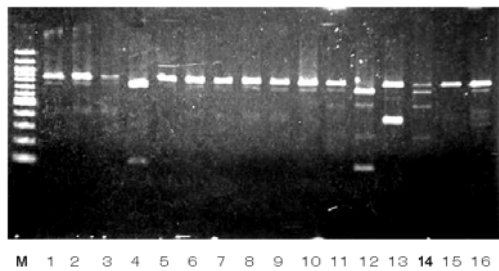


図4 Ssp I 処理

レーンの番号とフグの種類は図1に同じ。

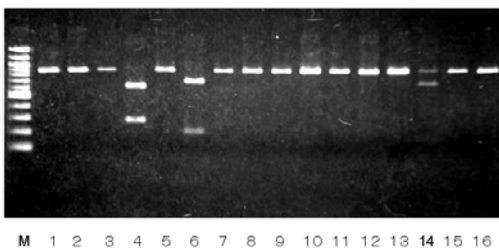


図5 BsrDI 処理

レーンの番号とフグの種類は図1に同じ。

2 PCR-SSCP 法

図6に、トラフグ属 9 種 (トラフグ、マフグ、シマフグ、ナシフグ、ショウサイフグ、コモンフグ、ヒガンフグ、クサフグ、ゴマフグ) について PCR-SSCP 法を行った電気泳動像を示す。いずれも異なったパターンを示し、鑑別可能であった。

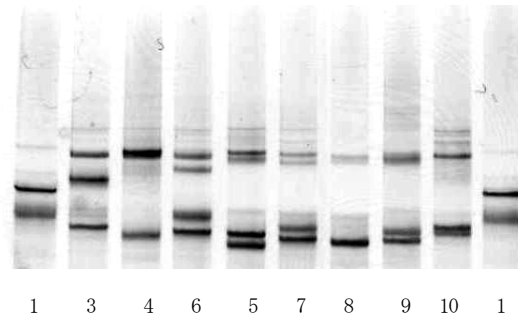


図6 PCR-SSCP 法による電気泳動像

1:トラフグ 3:マフグ 4:シマフグ 6:ナシフグ
5:ショウサイフグ 7:コモンフグ 8:ヒガンフグ
9:クサフグ 10:ゴマフグ

考察

PCR-RFLP 法および PCR-SSCP 法により、15 種類のフグ種が鑑別可能であった。トラフグとカラスについては区別ができないが、この 2 種は遺伝学的に近く、鑑別は困難と思われる。

最近では、シーケンサーの普及により、DNA の塩基配列決定が比較的手軽に行えるようになった。このことにより、特に食中毒の原因魚種の調査等、検体数が少ない場合やフグ以外の魚種も想定される場合には、RFLP 法や SSCP 法を行うよりも、PCR 産物の塩基配列を決定してそれにより種鑑別を行う方が合理的となった。

一方、RFLP 法と SSCP 法が有用である場合もあると考える。例えば、ある程度まとまった数の検体について、ある種類のフグであるかどうかを確認したい場合や、食用にできないドクサバフグや捕獲海域の制限があるナシフグが混入していないかどうかを調べたい場合などがそうである。

DNA による種鑑別方法については、今後、塩基配列決定による手法もとりいれ、幅広いニーズに対応できるようにしていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Quinterio, J., Sotelo, C. G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., Pérez-Matrin, R. I., Rey-Méndez, M., Macskie, I. M. :J. Agric. Food Chem. 46, 1662-1669 (1998)
- 2) Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U. :J. AOAC Int. 78(6), 1542-1551 (1995)