

# 遺伝子検査における牛レバー及び馬レバーの DNA 抽出法の検討

中山恵利・宮崎悦子

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Study on Extraction DNA from Cattle Liver and Horse Liver For Gene Detection Assay

Eri NAKAYAMA and Etsuko MIYAZAKI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### 要約

平成 24 年に牛レバー、続く平成 27 年に豚レバーの生食用提供が禁止された。現在、馬レバーには規制がなく、安価な牛レバーを馬レバーと称し生食用として提供する飲食店等が現れる懸念がある。牛レバー及び馬レバーの目視での判別は困難であるため、遺伝子による肉種鑑別が必要である。

今回は対象が生肉であるため、一般的に広く用いられているコンベンショナル PCR による肉種鑑別に適した DNA 抽出法の検討を行った。その結果、DNA 抽出には、従来、他の検査で使用している QIAamp DNA Micro Kit よりシカジーニクス DNA 抽出キットの方が DNA の収量は少ないものの、純度に差はなく、迅速性に優れていた。また、PCR 反応液あたり鋳型 DNA 量 2.5~10 ng/μL の範囲内において、牛レバー及び馬レバーの鑑別が可能であった。

**Key Words** : 牛レバー cattle liver, 馬レバー horse liver, DNA 抽出 DNA extraction  
コンベンショナル PCR conventional PCR

## 1 はじめに

平成 23 年に飲食チェーン店で生肉の喫食による腸管出血性大腸菌食中毒事件が発生し、多数の重症患者が報告された。この事件を受け、生食用食肉について基準が設けられ、牛レバーは生食用としての販売・提供が禁止となった<sup>1)</sup>。その後、豚肉や豚レバーについても生食用としての販売・提供が禁止となった<sup>2)</sup>。

現在、馬レバーの生食に関する規制はないため、馬レバーに比べ安価で入手も比較的容易な牛レバーを馬レバーと称して提供する飲食店が現れる懸念がある。牛レバー及び馬レバーについて目視での鑑別が困難であるため、保健所の食品衛生監視員から遺伝子による肉種鑑別法の整備について要望が挙げられた。当所では既にリアルタイム PCR による食肉加工品中の肉種鑑別が可能であるが<sup>3)</sup>、今回は対象が生肉であり遺伝子の損傷もないと考えられるため、一般的に広く利用されており、安価なコンベンショナル PCR を用い、肉種鑑別に適した DNA 抽出法の検討を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

平成 27 年に福岡市内の食肉店で購入した牛レバー(和牛)、馬レバー(カナダ産)各 1 検体。

### 2.2 試薬等

- ・ QIAamp DNA Micro Kit : QIAGEN 社製
- ・ シカジーニクス total DNA prep Kit : 関東化学社製
- ・ エタノール : 和光純薬工業社製, 生化学用
- ・ QIAGEN Fast Cycling PCR Kit : QIAGEN 社製
- ・ 動物の識別用プライマーセット : BEX 社製
- ・ アガロース X : ニッポンジーン社製
- ・ Gel Red : 和光純薬工業社製

### 2.3 使用機器

- ・ 分光光度計 : Thermo Scientific 社製 NanoDrop ND-1000
- ・ サーマルサイクラー : BIO-RAD 社製 iCycler

### 2.4 条件および方法

牛レバー及び馬レバーからの DNA 抽出は、QIAamp DNA Micro Kit (以下 QIAamp と省略) と、シカジーニース total DNA prep Kit (以下シカジーニースと省略) の 2 種を用いて行った。QIAamp は付属のプロトコルに従い、一夜溶解後、キャリア DNA を添加する方法で抽出した。

抽出した DNA 溶液の吸光度を測定し、濃度および純度を確認した。その後、滅菌水にて 10 ng/μL に調整した。さらに DNA 溶液は、5 ng/μL および 2.5 ng/μL となるよう滅菌水で希釈した。

## 2.4.2 PCR 条件

PCR 用反応液の組成は表 1 のとおりである。サーマルサイクラーを用いて、95°C で 5 分間加熱後、96°C 5 秒、60°C 5 秒、68°C 9 秒を 1 サイクルとして 45 サイクルの増幅反応を行った。

表 1 PCR 反応液の組成

	液量 (μL)
QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix	10
10×CoralLoad Fast Cycling Dye	2
RNase free Water	6
Primer set (10 μM)	1
DNA 溶液	1
(total)	20

## 3 結果および考察

### 3.1 PCR

QIAamp とシカジーニースの 2 種のキットを用いて行った DNA の抽出結果を表 2 に示す。QIAamp は試料の溶解に一夜必要となるのに対し、シカジーニースは 1~2 時間程度で溶解可能であり、その後の操作も少ない。QIAamp より DNA 収量は少ないものの、DNA 純度には差はなく、迅速性に優れていた。両キットとも濃度、精製度共に PCR に供するための条件は満たすことから、迅速性が求められる場合はシカジーニースが適していると考えられた。

表 2 DNA 濃度と純度

	QIAamp DNA Micro Kit		シカジーニース	
	DNA 濃度 (ng/μL)	DNA 純度 (260/280)	DNA 濃度 (ng/μL)	DNA 純度 (260/280)
牛	412.8	1.89	120.6	1.87
馬	649.1	1.90	118.1	1.95

抽出した DNA を用いた PCR の結果を図 1 に示す。牛レバー(137bp)及び馬レバー(183bp)の鑑別が可能であった。PCR に供する DNA 濃度の検討した結果、2.5~10 ng/μL (PCR 反応液 20μL 中) の範囲内で検出可能であった。また、既報<sup>3)</sup>のリアルタイム PCR を用いた方法でも検出でき、両レバーを混合した場合も鑑別が可能であった。

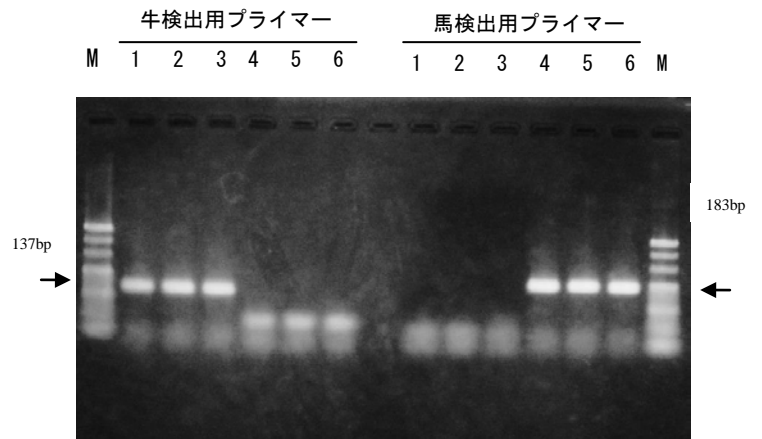


図 1 牛及び馬検出用 PCR の結果

M: 20bp Ladder Marker(TAKARA), 1~3:牛レバー-DNA (順に 10, 5, 2.5ng/μL), 4~6:馬レバー-DNA (順に 10, 5, 2.5ng/μL), 3%アガロース

## 4 まとめ

遺伝子検査による牛レバー及び馬レバーの肉種鑑別に適した DNA 抽出法の検討を行った。DNA 抽出には、QIAamp よりシカジーニースの方が収量は少ないものの、DNA 純度に差はなく、迅速性に優れていた。PCR 反応液あたりの鋳型 DNA 量は 2.5~10 ng/μL の範囲内において、牛レバー及び馬レバーの鑑別が可能であった。

今回検討した方法を用いることで、迅速に、また特別な機器を用いることなく低コストで馬レバー及び牛レバーの鑑別が可能であり、飲食店等の指導に活用できるものと考えられる。

## 文献

- 1)平成 24 年厚生労働省告示第 404 号
- 2)平成 27 年厚生労働省告示第 289 号
- 3)本田己喜子・鶴田小百合・赤木浩一:リアルタイム PCR による食肉加工品の肉種鑑別, 福岡市保健環境研究所所報, 34, 73-76, 2009

