

動物毛の DNA 検査プロトコル (全7ページ)

2008. 8. 21

愛知県産業技術研究所
食品工業技術センター

2008.7.2 からの変更点：

- ・ p2 **注意事項**とマルチプレックス PCR 反応組成
- ・ p7 DNA 簡易抽出試薬 (セルイーズ) の使用例を追加

【1】 DNA の抽出 (所要時間 約2時間半)

使用するもの

- ・ 滅菌プラスチックシャーレ
- ・ 洗浄用 70%エタノール
- ・ 動物毛試料 (事前に顕微鏡観察をして写真撮影を済ませておく)
- ・ 使い捨てカミソリ刃
- ・ 使い捨て手袋
- ・ ピンセット
- ・ マイクロピペット (P1000, P 200, P 20)
- ・ マイクロピペット用チップ (P1000, P 200, P 20 用: フィルター付きが望ましい)
- ・ 1.5mL エッペンチューブ
- ・ DNA 抽出試薬 QIAamp DNA Micro Kit(50) (QIAGEN 社 Cat.no. 56304 ¥30,000)
- ・ 特級エタノール、DDT (上記キット使用時に必要)
- ・ 微量遠心機
- ・ サーモミキサーまたは恒温槽

手順

付着物を取り除くため滅菌プラスチックシャーレに70%エタノールを注ぎ、動物毛試料を軽く洗浄し、以下のようにサンプリングする。

- ア) 毛根がある場合: 毛根部 5mm をカットして 1.5ml エッペンチューブに採取する。
- イ) 毛根がない場合や不明の場合: 毛先の方が細くなっているため、反対の毛根に近い側から半分程度を約 5mm にカットして使用する。(残す必要がなければ全量を使用すればよい)
- ウ) ピンセットは70%エタノールに浸してバーナーで軽く焼いてから使用する。

QIAamp DNA Micro Kit のプロトコル に従って、キャリア RNA を添加する方法で DNA を抽出し、最終的にバッファ-AE 20 μ l を加えて溶出し、約 15 μ l の DNA 溶液とする。

<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000191&lid=JA>

抽出キットについての補足

- ・ 毛根がある場合、ニッポンジーン社の ISOHAIR でも抽出した実績があり、抽出効率は比較的良い。同じく毛根がある場合、簡易抽出試薬である Cell Ease(関東科学)や Prepman Ultra Reagent (ア°ライト°マイクシスス°) などを使用できる。

【2】動物特異的 PCR (所要時間 約2時間)

使用するもの

- PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN 社 Cat.no. 203743 ¥22,000)
他の PCR 用酵素によるテストは、現在のところ行っていない。
- 動物 DNA 検出プライマー (濃度 10 μ M)

注意事項：マルチプレックス PCR の際、各 3 種類の動物検出プライマーを混合して冷凍保存したものを用いたところ、非特異的増幅反応が起こる場合があったため、面倒ですが単品の動物検出プライマーをその都度反応液に加えて下さい。

- マイクロピペット (P 200, P 20)
- マイクロピペット用チップ (P 200, P 20 用：フィルター付きが望ましい)
- PCR チューブ
- PCR 反応装置 (Gene Amp PCR System 9700 など)

手順

動物種が推定できない場合は、始めに 1 2 種類に対応するマルチプレックス PCR を行い、次にシングル PCR で確認を行う。動物の候補が 4 種類程度に絞れる場合は、始めからシングル PCR を行えばよい。

- 1 2 種類マルチプレックス PCR を行う場合の反応組成 (4 本の PCR チューブ)

	チューブ A	チューブ B	チューブ C	チューブ D
PCR Master Mix	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
10 \times Coraload Dye	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
動物検出プライマー	牛プライマー 1 μ l 豚プライマー 1 μ l 鶏プライマー 1 μ l	馬プライマー 1 μ l 羊プライマー 1 μ l 山羊プライマー 1 μ l	兎プライマー 1.25 μ l 犬プライマー 1.25 μ l 猫プライマー 0.5 μ l	ドブネズミプライマー 1 μ l クマネズミプライマー 1 μ l ハツカネズミプライマー 1 μ l
抽出した DNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
RNase free H ₂ O	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l
Total	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

- シングル PCR を行う場合の反応組成 (確定試験：3 本の PCR チューブ)

	サンプル (S)	ポジティブコントロール (P)	ネガティブコントロール (N)
PCR Master Mix	10 μ l	10 μ l	10 μ l
10 \times Coraload Dye	2 μ l	2 μ l	2 μ l
動物検出プライマー	1 μ l	1 μ l	1 μ l
template DNA *	抽出 DNA 1 μ l	コントロール DNA 1 μ l	RNase free H ₂ O 1 μ l
RNase free H ₂ O	6 μ l	6 μ l	6 μ l
Total	20 μ l	20 μ l	20 μ l

* template DNA の量は適宜変更可能。

以下のプログラムで PCR を行う。(約 1 時間半)

反応条件	
95	5min
96	5sec
60	5sec
68	9sec
} 45 サイクル (50 程度まで適宜変更可能)	
72	1min

反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行うまで、氷上または - 20 で保存する。

表 動物検出プライマーと増幅サイズ

プライマーセット	動物	増幅サイズ (bp)
A	牛	137
	豚	230
	鶏	159
B	馬	183
	羊	224
	山羊	160
C	兔	167
	犬	122
	猫	220
D	ドブネズミ	237
	クマネズミ	102
	ハツカネズミ	116

- 【3】 アガロースゲル電気泳動と UV 撮影(所要時間 約 1 時間半 ゲル作製は PCR 反応時間中か、動物毛溶解中に行っておくこと)
バイオアナライザー等を用いる場合は不要

使用するもの

- ・ TAE バッファー (または TBE バッファー)
- ・ DNA 電気泳動用アガロース Agarose1000(Invitrogen)あるいは NuSieve3:1 Agarose(タカラバイオ) など
- ・ 300mL 三角フラスコ
- ・ DNA サイズマーカー (2-Log Ladder(NEB 社)、100bp Ladder, 20bp Ladder (タカラバイオ) など)
- ・ マイクロピペット (P20) とチップ
- ・ エチジウムブロマイド染色液
- ・ ミニゲル電気泳動装置、ゲルメーカー (耐熱性のものが望ましい)
- ・ UV 撮影装置

手順

4%アガロースゲル/TAEの作製 (濃度が高く危険なので、以下の方法で)

マルチプレックス PCR を行わない場合は 2%アガロースゲルで充分。

300mL 三角フラスコに、TAE バッファー 150 ml + 蒸留水約 10ml (蒸発分)とスターラーマグネットを入れ、攪拌しながら Agarose 6 g を少しずつ入れる。マグネットを除いて 15 分間静置し膨潤させる。

ラップなどでフタをして、ピンホールを空ける。

電子レンジの弱 or 中で 1 分間加熱し、振り混ぜて 15 分間放置する。

電子レンジの弱 or 中で 2 分間加熱し、振り混ぜた後、電子レンジの強で加熱し、1 分間沸騰状態を保つ。

コームを差したゲルメーカーに注入して固化させる。

電気泳動と検出

TAE バッファーを満たしたミニゲル電気泳動装置に、アガロースゲルをセットする。

DNA マーカー 5 μ l (適宜) PCR 産物各 5 μ l (Dye は含まれている) をアプライして、100V で約 50 分間、サンプルの赤色 Dye やマーカーの BPB が先端に来る程度まで泳動する。

エチジウムブロマイド染色液で 10~15 分程度適宜染色し、UV 撮影する。

判定

各動物検出プライマーによって既定のサイズにバンドがあるとき、陽性とする。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールの結果も確認する。バンドが薄い場合は、テンプレート DNA 量を増やすか、PCR サイクル数を増やして再度 PCR を行う。

顕微鏡観察の結果や動物毛が接触していた原料動物を考慮して、総合的に判定する。

【4】 参考資料

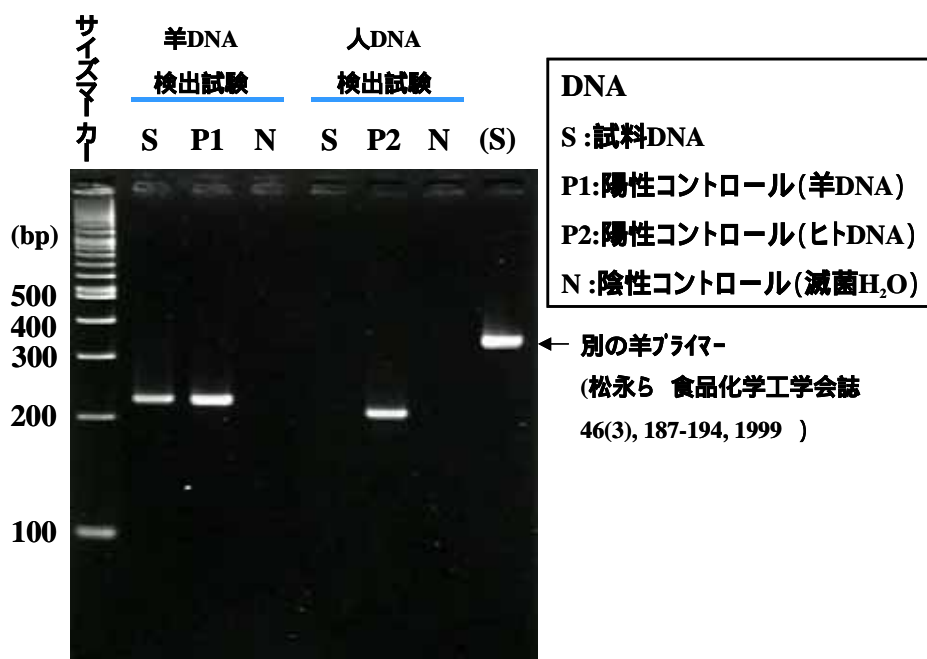
以下に、本キットを用いた実験例を示す。また、本キット中の12種類の動物DNAで陽性バンドが出なかった場合は、人毛であったり、他の動物毛であったり、あるいはDNAが抽出できなかったという可能性がある。このような場合の対処法にも参考までに触れておく。

1：人毛の可能性もある「白色の混入毛」の事例

肉眼では毛根のある白い毛であり、混入状況から、羊の毛か作業員の毛髪が疑われた。毛根部からDNAをプロトコルどおりに抽出し、羊DNAおよびヒトDNAの検出試験を行った。ヒトDNAの検出用プライマーは、 α -globin (human) Primer Set (タカラバイオ) のKM29およびPC04を用い、コントロールDNAは毛髪1本から調製したものを1/100量使用した(増幅長は205bp)。

KM29(forward)	d (GGTTG GCCAA TCTAC TCCCA GG)
PC04(reverse)	d (CAACT TCATC CACGT TCACC)

PCRの結果、羊DNAが検出され、ヒトDNAは検出されなかった。図には示さないが、残っていた毛幹部から抽出したDNAについても、羊DNAバンドが検出された。



本プロトコルによる成功事例

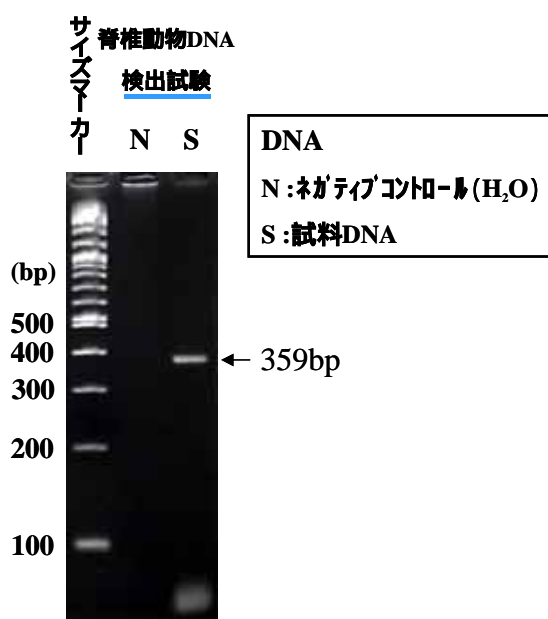
- ・ 100 の蒸し器で加熱された毛(クマネズミ DNA バンド検出)
- ・ レトルト食品中の肉種判別(牛 DNA バンド検出)
- ・ レトルト食品中のゴム状組織片(牛 DNA バンド検出)
- ・ 化粧品中の動物毛(犬 DNA バンド検出)

2 : DNA 抽出の確認試験、および他の動物毛の場合について

脊椎動物共通プライマー (VF, VR) を用いた PCR により、ネコの毛から抽出した試料 DNA 溶液の抽出確認を行った (増幅長 359bp : ミトコンドリア *cytb* 領域)。

VF(forward)	d (CCATC CAACA TCTCA GCATG ATGAA A)
VR(reverse)	d (GCCCC TCAGA ATGAT ATTTG TCCTC A)

反応組成		反応条件	
PCR Master Mix	10 μl	95	5min
10 × Coraload Dye	2 μl	96	5sec
VF/VR プライマー (10μM)	1 μl	58	5sec
調製した DNA 溶液	1 μl (適宜変更可)	68	12sec
RNase free H ₂ O	6 μl (適宜変更可)		} 45 サイクル
Total	20 μl		
陰性対照は添付滅菌水を使用		72	



脊椎動物共通プライマーで増幅した 359bp 断片をダイレクトシーケンスすることにより、多くの動物種の同定が可能である。また、制限酵素を用いた同定方法 (PCR-RFLP) も利用可能。(参考文献 : J Agric Food Chem. 2001 Aug;49(8):3775-81., BIOTOOLS 社 BIOFOOD IDENTIFICATION KIT マニュアル)

3 : CellEase (セルイーズ) 試薬による動物毛の DNA 簡易抽出と PCR の例

ここでは、操作手順のより少ない CellEase (関東化学 ¥20,000 100 回分) を用いて、「馬毛」および「ドブねズミ毛」の毛根部分から DNA を抽出し、動物特異的 PCR を行った例を紹介する。

操作 約 30 分 予め PCR 装置に反応温度と時間をプログラムしておく。

0.2ml マイクロチューブに、毛根部分を 2mm 程度切り取って入れる

5 μ l の滅菌水を添加

2 μ l の CellEase A 液を添加、混合

37 、 15 分インキュベート

2 μ l の CellEase B 液を添加、混合

70 、 10 分インキュベート つづいて

94 、 5 分インキュベート

3.5 μ l の CellEase C 液を添加、混合

全量 12.5 μ l のうち 2 μ l を、p2 「シングル PCR を行う場合の反応組成」の template DNA として使用し、それぞれ馬 DNA 検出プライマー、クマネズミ DNA 検出プライマーを用いた PCR を行った。PCR 条件はプロトコルの p2 と同様に 45 サイクル行った。

(残りの DNA 抽出液は - 20 で保存し、なるべく早く使用することが望ましい。)

結果 4% アガロースゲル電気泳動の結果、下図のように、馬 DNA 検出バンド、クマネズミ DNA 検出バンド共に確認された。

