（参考資料６）

ＤＮＡ分析による小豆のあん品種の識別

北海道立中央農業試験場
独立行政法人農業生物資源研究所

１　小豆加糖餡からの DNA 抽出

加糖餡からの DNA 抽出は独立行政法人農林水産消費技術センターの「JAS 分析試験ハンドブック　遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 2 版）基本操作編」“3.3 CTAB を用いた DNA の抽出”に準じて行った。DNA 抽出の操作を以下に示す。

加糖餡からの DNA 抽出（CTAB 法）

① 加糖餡約 300mg を 1.5ml チューブに移して CTAB 抽出液 1ml を加え撹拌し、60℃で 30 分間保温した後、14,000rpm、３分間遠心分離する。上清約 700μｌを新しいチューブに移す。

② 試料溶液に等量の PCI を加え、２分間激しく振とうし、14,000rpm、15 分間遠心分離する。上層を新しいチューブに移し、等量の CIA を加え、２分間激しく振とうし、14,000rpm、３分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

③ 試料溶液と等量の２-propanol を加え、転倒混和し、12,000rpm、３分間遠心分離する。上清を捨て、70％エタノール 800μｌを加え、転倒混和し、12,000rpm、３分間遠心分離する。上清を捨て、沈殿物を乾燥する。

④ 沈殿物に TE100μｌ、RNase A（10mg／ml）２μｌを加え、37℃で 30 分間保温する。保温後、CTAB 抽出液を 400μｌ加える。

⑤ 試料溶液に 500μｌの CIA を加え、軽く混和し、12,000rpm、15 分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

⑥ 試料溶液と等量の２-propanol を加え、転倒混和し、12,000rpm、３分間遠心分離する。上清を捨て、沈殿物を乾燥する。

⑦ 滅菌水 100μｌを加え、DNA を溶解する。DNA 濃度を測定し（3.1.7 項参照）、30μｇ／ml に希釈した DNA 溶液を調製し、1μｌ（30ng）を PCR に使用する。

使用する試薬溶液

CTAB 抽出液：（２％ CTAB, 0.1M Tris-HCl pH8.0, 1.4M NaCl, １％ PVP）
PCI：(TE saturated phenol / Chloroform / Isoamylalchohol) 25：24：１ (v/v/v)
CIA：(Chloroform / Isoamylalchohol) 24：１ (v/v)
２-propanol、70％エタノール、TE、RNase A（10mg／ml）

2　SSR マーカーによる加糖餡の品種識別

小豆加糖餡では加熱等により DNA の断片化が予想される。このため、増幅断片長が短く共優性の SSR マーカーを用いて、国産及び輸入加糖餡の識別性を検討した。

(1) PCR の条件等

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社の Gene Amp PCR System 9700、合成酵素は同社の AmpliTaq Gold を使用した。反応液量は 20μl とし、鋳型 DNA は 30ng を添加、プライマー濃度は上流、下流各 0.3μM とした。合成酵素は 0.5units を使用、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が 10mM Tris-HCl(pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM each of dNTPsとなるよう調製した。

PCR の温度サイクルは 94℃；7 分の後、94℃；15 秒、60℃；15 秒、72℃；15 秒を 40 回繰り返し、最後に 72℃；7 分を付加した。

・ 反応液組成

DNA 溶液（30ng/μl）	1.0μl
10×PCR Buffer	2.0μl
25mM $MgCl_2$	1.2μl
２mM each of dNTPs	2.0μl
F-primer（５pmol/μl）	1.2μl
R-primer（５pmol/μl）	1.2μl
Taq polymerase（５u/μl）	0.1μl

滅菌水を加えて 20μl とする。

・ PCR の温度条件

94℃	７分	
94℃	15 秒	｝ 40 回繰り返し
60℃	15 秒	
72℃	15 秒	
72℃	７分	
４℃	∞	

(2) PCR 産物の電気泳動

電気泳動の条件等は小豆種子と同様であるが、泳動槽は BIO-RAD 社の PROTEAN II を使用、350V で３時間 30 分泳動した。

(3) 小豆加糖餡の品種識別

国産の加糖餡３点、中国産加糖餡５点を供試した結果、国産加糖餡-１は「エリモショウズ」、国産加糖餡-２は「きたのおとめ」、国産加糖餡-３は「しゅまり」に遺伝子型が一致した。また、中国産の加糖餡とは増幅断片のパターンが異なり、識別が可能であった。中国産の加糖餡では増幅断片の泳動像が明瞭ではなく、遺伝子型の判定が困難な試料があった（表１、図１）。

表１　SSR マーカーによる加糖餡の品種識別（目視による増幅断片の塩基対数）

加糖餡	G029	G008	G024	G015	G007	判　定
1国産加糖餡-1	185	120	144	206	128	エリモショウズ
2国産加糖餡-2	185	118	144	206	128	きたのおとめ
3国産加糖餡-3	179	120	144	206	128	しゅまり
4中国産加糖餡-1	185	70/100	144	204	128	
5中国産加糖餡-2	185	100	136/144	210	128	
6中国産加糖案-3	179	90/100	130/144	170/204	128	
7中国産加糖餡-4	185	104	130/144	210	128	
8中国産加糖餡-5	179	100	136	206	128	

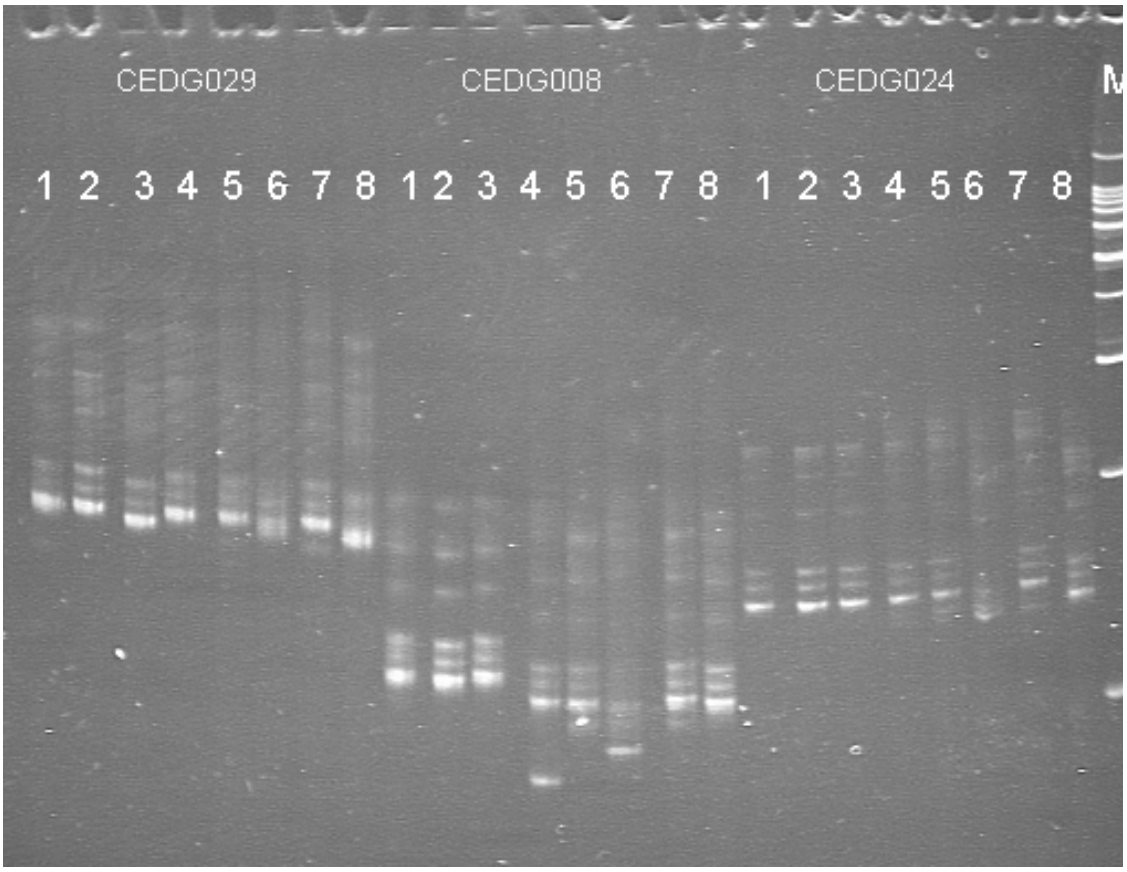

図１　SSR マーカーによる増幅結果（数字は表１に対応、M は 100bp ラダー）

中国産加糖餡では増幅 DNA の電気泳動像が明瞭ではない試料が認められた。原料となる中国小豆の遺伝子型が均一でないことが原因と考えられる。輸入小豆の東北小豆５粒から DNA を抽出し、１粒ずつ単独の試料と５粒の DNA を均等に混合した試料を作成し、SSR マーカーによる増幅を行った。比較として「きたのおとめ」を供試、混合試料と「きたのおとめ」を等量混ぜた試料も供試した。その結果、５粒はいずれも異なる遺伝子型を示し、混合試料では遺伝子型の頻度を反映して DNA 断片の増幅が認められた。さらに、混合試料と「きたのおとめ」を等量混ぜた鋳型では、泳動像がさらに不明瞭となった（表２、図２）。

表２　SSR マーカーによる中国小豆の検定（目視による増幅断片の塩基対数）

	G029	G008	G024
1きたのおとめ	185	118	144
2東北小豆-1	191	100	140
3東北小豆-2	193	118	134
4東北小豆-3	191	116	138
5東北小豆-4	169	90	140
6東北小豆-5	191	90	140
7東北小豆 Mix	169/191	90	140
8Mix+きたのおとめ	169/185	90/118	140/144

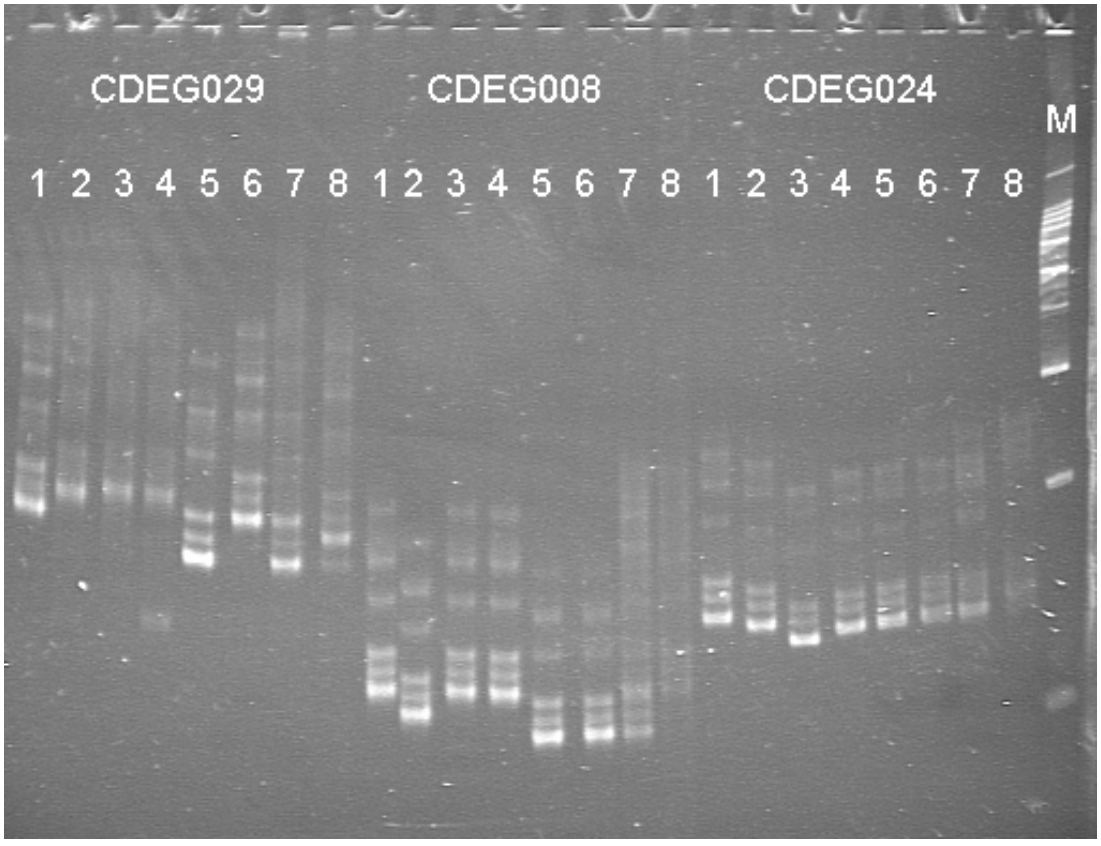

図２　SSR マーカーによる増幅結果（数字は表２に対応、M は 100bp ラダー）

以上の結果から、SSR マーカーによる小豆加糖餡の品種識別については、

① 日本品種を原料とした加糖餡では、抽出した DNA の遺伝子型は種子と一致し、品種判別が可能である。品種により固有の遺伝子型を示すので、中国小豆を原料とした加糖餡との識別も可能である。

② 中国小豆は SSR マーカーによる遺伝子型が多様で、一定の傾向は示さない。このため、中国小豆を原料とした加糖餡では、銘柄の特定は難しい。

③ 原料として中国小豆に日本品種を混合した場合、対象となる中国小豆の遺伝子型が多様なため、日本品種の混入が少量の場合は検出が難しい。今後、少量の日本品種の混入を検出するためには、日本品種のみに特異的なマーカーの開発が必要である。

3　シークエンサーを用いた加糖餡の品種識別

加糖餡では複数の品種が混合されていることも考えられるので、一種類の蛍光化 SSR プライマーを用いた PCR を行い、加糖餡の品種同定を試みた。解析手順は参考資料５「DNA 分析による小豆品種の識別（４）シークエンサーによる品種識別」とほぼ同様に行った。

(1) PCR の条件等

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社のGeneAmp® PCR System 9700、PCRにはQIAGEN社のQIAGEN® Multiplex PCR Kitを使用した。反応液量は10μlとし、キットに含まれる２x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix及び５ｘQ-solutionに、鋳型DNA10ngと各プライマー対（５pmol/μl）を混合した。PCRの温度サイクルは95℃；15分のポリメラーゼの活性化後、94℃；30秒、57℃；90秒、72℃；１分を40回繰り返し、最後に72℃；10分の伸長反応を行った。

・ 反応液組成

DNA 溶液（10ng/μl）	1.0μl
２x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5.0μl
５x Q-solution	2.0μl
プライマー対（5pmol/μl）	0.4μl
精製水	1.6μl

・ PCR の温度条件

95℃	15 分	
94℃	30 秒	｝ 40 回繰り返し
57℃	90 秒	
72℃	1 分	
72℃	10 分	
4℃	∞	

(2) アリールデータの取得

小豆の品種識別に用いるSSRマーカーは、$(AG)_n$からなる２塩基の反復配列を含むので、図３のように約２bpおきにスタッターとよばれる複数のピークが現れる。そのなかで一番右の最も高いピークのbp値をアリールデータとして記録した（図３、①と②の矢印)。遺伝的に異なる複数の品種が混合された試料の場合はスタッターが数多く出現するが、それらが重なり合わなければ容易に解釈できる。また図３の①＋②では、一番右のピークがその左隣のピークよりも低くなっている。このような状態は①と②のDNAが混じっている時に現れる。また、餡などの加工製品における品種の混合比率は不明なので、複数のアリールが認められた場合は最高の蛍光強度(rfu)を示したピークから、その約１/１０程度の蛍光強度のピークまでをアリールとし、bp値を記録した。

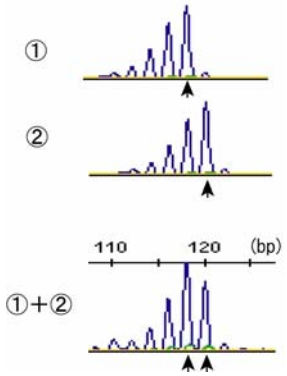

図３　品種識別に用いたピーク（例 CEDG008、矢印）

(3) 小豆加糖餡の品種識別

国産加糖餡２点、中国産加糖餡５点を検定した結果、国産加糖餡Ａは「エリモショウズ」と「きたのおとめ」の混合品、国産加糖餡Ｂは銘柄のとおり「しゅまり」であった(表３、図４)。日本品種を原料とした国産加糖餡は遺伝子型が均一なのに対し、中国産加糖餡では複数のアリールが検出された。このことから、原料となった中国小豆の遺伝子型は雑多と考えられる。

表３　中国産及び国産加糖餡の検定結果　(数値はシークエンサーで測定された bp 値)

	中国産加糖餡					国内産加糖餡				
マーカー	A	B	C	D	E	A	B	きたのおとめ	エリモショウズ	しゅまり
CEDG029	186	176	186	176	186	186	180	186	186	180
		178		178	188					
		180		180						
		182		182						
CEDG008	86	94	102	108	102	118	120	118	120	120
	110	102	110		110	120				
		108								
		110								
CEDG015	212	212	212	198	208	212	212	212	212	212
	218		216	206	210					
	247		247	216	212					
					218					
					247					
CEDG024	129	129	113	131	129	141	141	141	141	141
	139		129	133	133					
	141		133		141					
			141							
CEDG007	128	126	128	128	128	130	130	130	130	130
	130	130	130	130	130					

一方、今回検定した中国産加糖餡には、北海道の登録品種「きたのおとめ」や「しゅまり」が混入したものは認められなかった。ただし、今回の中国産加糖餡の識別に最も有効であった SSR マーカーCEDG008（図４）がなければ、中国加糖餡Ａ，Ｃ及びＥは「きたのおとめ」と全マーカーでアリールが一致し（表３）、「きたのおとめが含まれる」という結果になった可能性がある。このように加工品では複数の品種が混在する可能性があるので、今後日本品種特異的なマーカーの開発やマーカー数の増加などによって識別精度を向上させる必要がある。

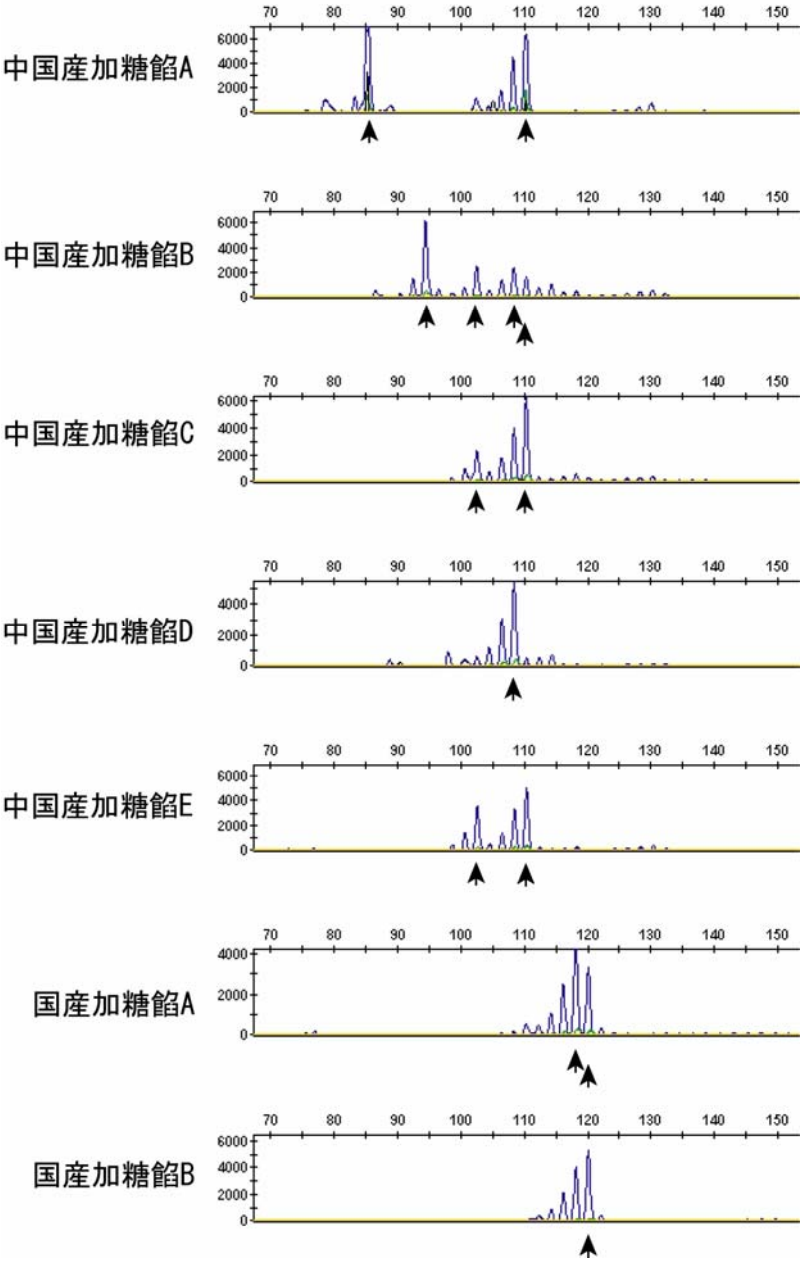

図４　SSR マーカーCEDG008 による中国産加糖餡及び国産加糖餡の解析結果（矢印はアリールとして記録したピークを示す）