



ESCO News Letter

第2巻 第10号

発行日 2013年5月20日

植物の遺伝子同定業務

スタート
しました！

虫に次いで多い植物片の検定依頼

食品をはじめ医薬品や化粧品などを製造する多くの事業所では、製品への異物混入防止に積極的に取り組んでいます。しかし、虫や毛髪、植物片、プラスチック片、金属片あるいは微生物の悪変も含め異物の混入クレームはなかなか減らないのが現状であり、弊社にも毎日のように異物検定の依頼が寄せられています。そのような中、虫に次いで植物片の検定依頼が多く、惣菜など植物性原料を扱う業種はもとより、最近ではそれ以外の業種でもの検定依頼の数が増加しています。弊社でも、事業所での異物混入防止への取組みを支援すべく、迅速かつ効果的な対策を講じるための分析技術の開

発や活用にも積極的に取り組んでいます。

「もっと詳細に」の声にお応えします。

これまで、植物片では生物顕微鏡を用いた観察が中心で、比較品と類似しているかどうかを見ることはできますが、何の植物かを特定するのは難しいのが現状です。そのような中、最近では「属レベルや種レベル」まで調べてほしいとの要望が増えてきており、弊社ではその要望に応えるべく、依頼されました植物片について遺伝子同定による検定の受入れ準備を進め、この度、微生物(ウイルスを除く)、虫に加えて、植物片の遺伝子同定の受入れを開始することになりました。



この号の内容

植物の遺伝子同定業務 スタートしました！	1
遺伝子分析検査の流れ	2

分析内容

- 植物異物よりDNAを抽出し、植物(藻類を除く)ではITS1領域を挟む保存領域、褐藻類ではミトコンドリアDNA内のCOI領域のDNA塩基配列解析を行います。
- 得られたDNA塩基配列を既知のデータベースと同一性検索を行い、同定および推定された植物種を報告致します。

分析方法

- 植物(藻類を除く)では株式会社ファスマック「植物異物同定用プライマーセット」の技術資料集に準じた方法を用い、褐藻類では「On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae(Phaeophyceae) including a novel extraction protocol」Phycological Research 2009 ; 57 : 131-141の方法に準じた方法を用いて、迅速で精度の高い同定を行います。

注意事項

- 検査には通常1g以上が必要です。検体量が少ない場合(約50mgを目安)、十分な量のDNAが得られない事がありますので事前にご相談下さい。
- 加圧、加熱、乾燥、発酵等によりDNAが著しく劣化していた場合、複数種の異物が混在し分離が不可能な場合、または付着物が多い場合などには同定が困難となる可能性があります。
- DNA塩基配列が得られてもデータベースに登録が無い種の場合、明確な結果が得られない事があります。
- 良好な結果が得られない場合、最大3回まで検査を行います。上記の原因を含め良好な結果が得られない場合は同定作業を中止させて頂きます。
- 同定作業が途中で終了した場合はそれまでに掛かった実費(10,000円)を申し受けます。

■カビを含む異物の混入が多発！！

食品などに混入した異物を検定してみると、異物の表面にカビが発生していることが実に多い。FT-IRによる異物分析を試みるものの、カビを反映してしまつて特定に至らないことも多いのが現状である。何とか異物本体の成分を調べてみると、当該食品の成分であることも多く、製造工程内での食品残渣にカビが発生したものが異物となって混入した可能性が高いものと判断される。ちなみに、カビを含む異物を培養してもカビの発育が見られないことも多く、その後の加熱工程を経て不活化されたものとも考えられる。

このような異物の混入を防止するためには、まず洗浄消毒計画の妥当性を確認することが重要である。「食品が露出しているラインでは頭上構造物から落下異物がないこと」が求められ、その点検や清掃のしつこさが適切に運用されなければならない。製造工程では、「清掃できないところ」や「清掃しにくいところ」、「ラインの溶接部」などが異物の混入箇所だったり、微生物の汚染源となる場合が多い。食品残渣に気付かず放置すればその間にカビが発生し、異物混入事故につながることになる。現場の声をいかに吸い上げられるかが重要であり、それを反映させる形で洗浄消毒計画を見直し科学的根拠に基づき再現性のあるものに仕立て上げることができれば、このような異物混入事故は自ずと減少していくはずである。

検査価格	納期※1
30,000円/試料	4~7営業日

※1：弊社総合分析センターに検体が午前中に到着した場合の納期となります。午後に検体が到着した場合は更に1営業日を頂きます。

遺伝子分析検査の流れ

[概要]

植物：株式会社ファスマック「植物異物同定用プライマーセット」の技術資料集に準じた下記の方法で同定を行い、植物種を推定します。

褐藻類：「On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae(Phaeophyceae) including a novel extraction protocol」Phycological Research 2009；57：131-141の方法に準じた下記の方法で同定を行い、褐藻類を推定します。

[試験方法]

■ DNA抽出

DNA 抽出キット「PrepMan Ultra Reagent(ライフテクノロジーズジャパン社製)」、または「DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN 社製)」を用いてDNA を抽出する。

■ PCR

下記のプライマーを用いて目的領域を増幅する。

	目的の遺伝子領域	プライマー	塩基配列
植物 (藻類を除く)	ITS1領域	株式会社ファスマック社製「植物異物同定用プライマーセット」	
褐藻類	COI領域	GazF2	5'-C CAAC CA(C/ T)AAAGATAT(A/T)GGT AC-3'
		GazR2	5'-GGATGACCAAA(A/ G)AAC CAAAA-3'

・使用機材

Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies 社製)

■ PCR産物の検出

PCR 後、アガロース電気泳動により目的領域の増幅を確認する。

植物(藻類を除く)：約350bp、褐藻類：約650bp

・使用機材

サブマリンゲル電気泳動装置 (ISEP-1010) (アズワン社製)

サブマージ・アガロース電気泳動装置 (AE-6100) (ATTO 社製)

■ 塩基配列の解析・判定

PCR 産物を蛍光標識し、シーケンサーでDNA 塩基配列を決定する。得られたDNA 塩基配列について公共のデータベース*と照合する。相同性の高い上位10 種をリストアップする。

※ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)

・使用機材

3730xl DNA Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン社製)

■ 検定報告書

検定報告書には、以下の項目が含まれます。

- ・ 検体写真
- ・ ご依頼の内容
- ・ 検定方法
- ・ 結果
所見
近縁上位10種の同一性 (%)



無断複写・複製はご遠慮下さい。
 本件に関してのお問合せは、
 03-3253-0640
 ホームページもご覧ください
<http://www.earth-kankyo.co.jp/>