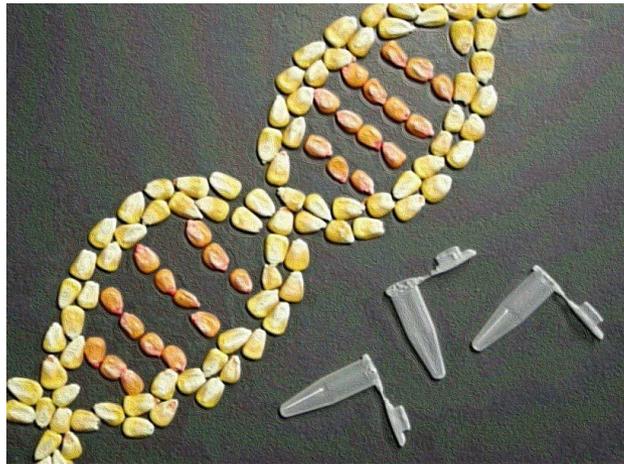


「植物異物同定用プライマーセット」 技術資料集



株式会社 ファスマック
遺伝子検査事業部

I. 食品における異物とは...

本来その製品中にあるべきではないもの、つまり使用原料以外に当該製品中に混入した物質



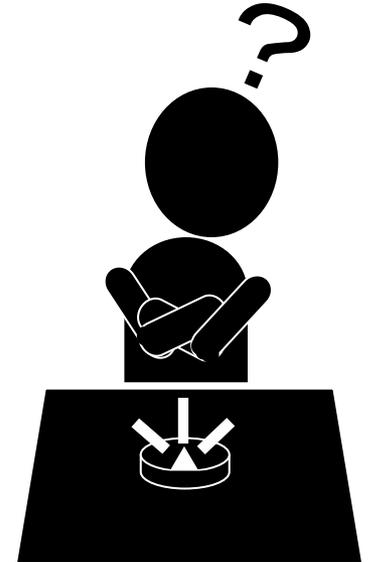
II. 植物に由来する異物の同定方法

(1) 形態的特長を用いた同定

- ・現在の主流な同定方法
- ・異物は微量であったり、加熱等での変性のため、熟練された解析技術が必要

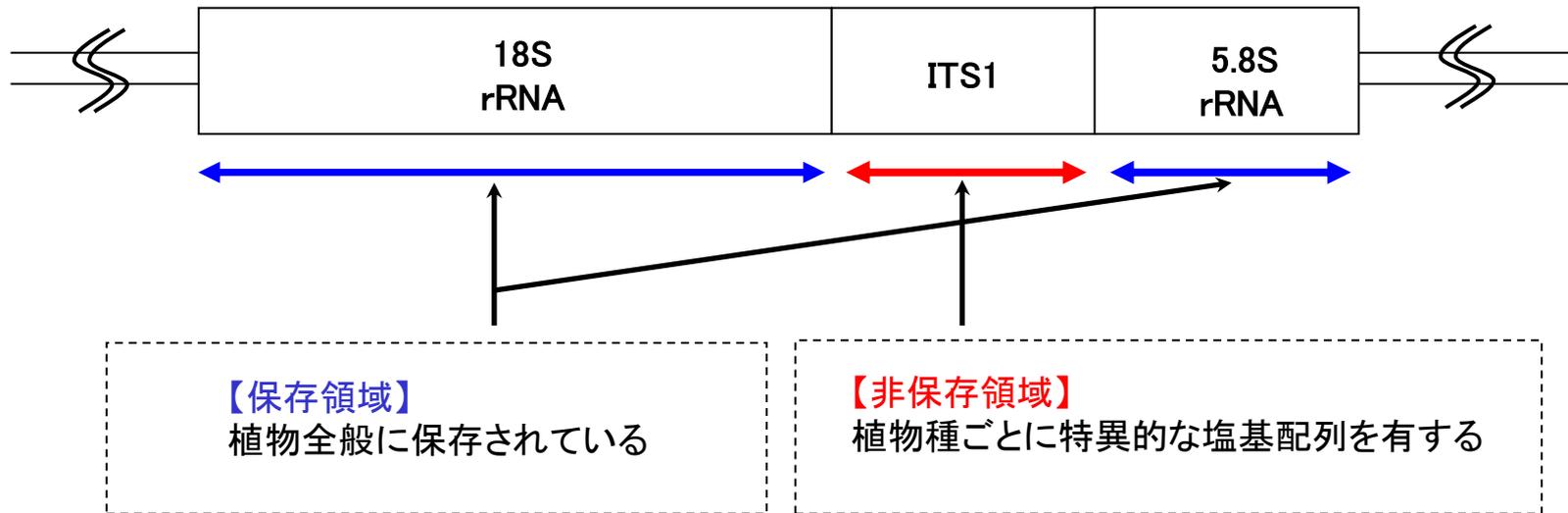
(2) DNA塩基配列情報を用いた同定 (本方法)

- ・近年開発が進んできた、客観性のある同定方法
- ・異物が微量であったり、変性していても抽出したDNAを用いて同定が可能



『正確』に植物由来の異物を同定する、DNA塩基配列情報を用いた検査方法が求められている

III.プライマーの設計

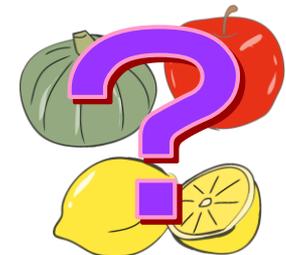
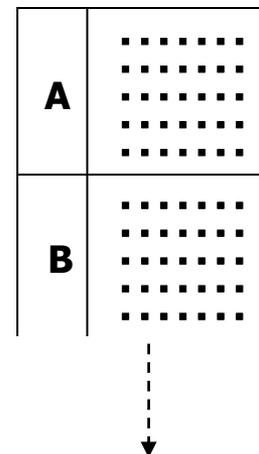
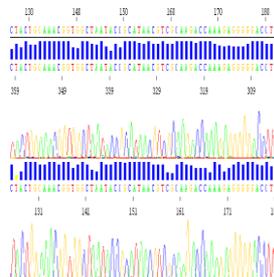
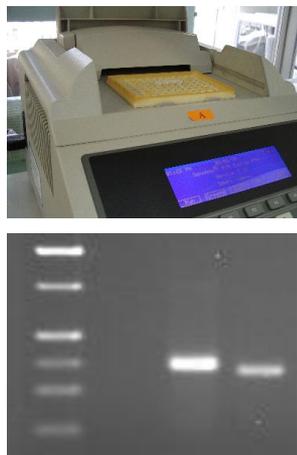
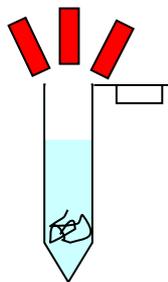
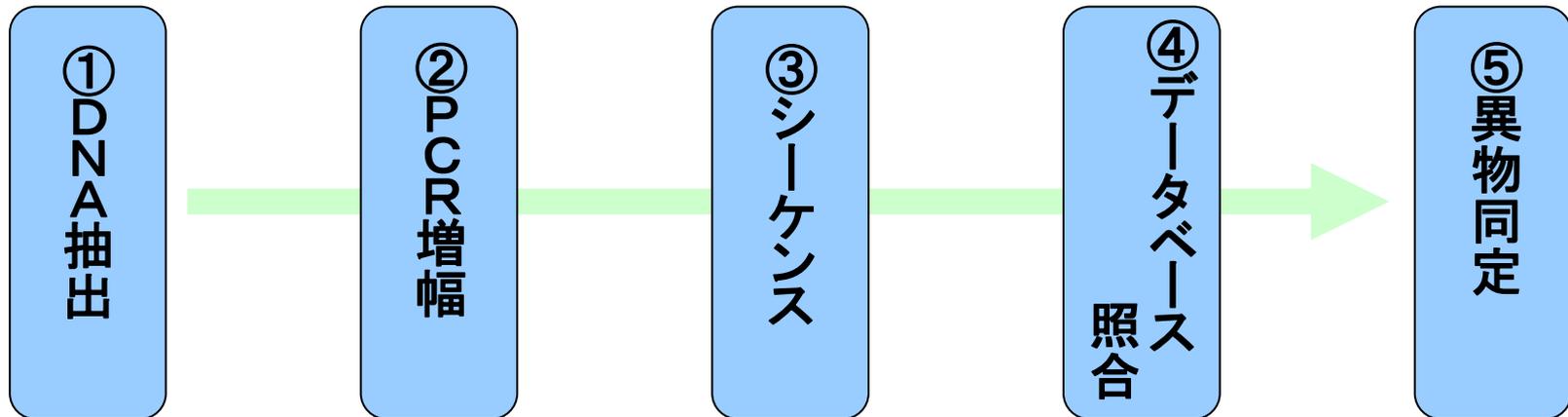


植物異物同定用プライマーの特徴

- ・植物種ごとに特異的な塩基配列を有するITS領域を挟む保存領域の塩基配列から設計
- ・植物全般に保存され、かつカビ・酵母と配列が異なる塩基配列から設計
- ・PCR増幅産物長(約350~400 bp)が短いためDNAが加熱等で損傷していても増幅し易い

IV. 検査手順

植物異物同定用プライマー使用



V. 検証事例

(1) モデル食品を用いた例

それぞれのモデルサンプルの大きさは1mgと10mgとして検証を行った。
(食品中の異物として見つかる植物片の多くが数mgのため)

A. 焦げたタマネギの皮
105°C、16hr処理後の乾燥皮



B. 表面に他の植物組織が付着したタマネギの皮
B1: カレーパウダー中に2ヶ月浸した乾燥皮
B2: レトルトソース中の具材だったタマネギ



C. 原料や野菜の非可食部

C1: リンゴ果柄 C2: かぼちゃのヘタ C3: 落花生の種皮



A~CのそれぞれからDNAを抽出し、鋳型DNAとする。

<PCR反応液組成>

	final conc.	ul
dH ₂ O	-	14.875
10 × PCR buffer II (-MgCl ₂)	× 1	2.5
dNTP mixture	0.2mM	2.5
25mM MgCl ₂	1.5mM	1.5
forward primer (25uM)	0.5uM	0.5
reverse primer (25uM)	0.5uM	0.5
AmpliTaq Gold (5U/ul)	0.625U	0.125
template DNA	適当量	2.5
トータル液量		25ul

<PCRサイクル>

°C	min	
94°C	9min	
96°C	1min	35 cycles
58°C	1min	
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	



PCR反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅を確認する。

PCR増幅結果

PCR産物の塩基配列を決定し
BLAST検索 (GenBank) の結果

モデルサンプル	重量	PCR (350bp)
A 焦げたタマネギ皮	10mg	+
	1mg	+
B1 カレーパウダーに浸した タマネギ皮	10mg	+
	1mg	+
B2 レトルトソース中の 具材タマネギ	100mg ^(※)	+
	10mg ^(※)	+
C1 リンゴ果柄	10mg	+
	1mg	+
C2 カボチャのヘタ	10mg	+
	1mg	+
C3 落花生の種皮	10mg	+
	1mg	+

サンプルの状態、場所
によらず、PCR産物が検出された

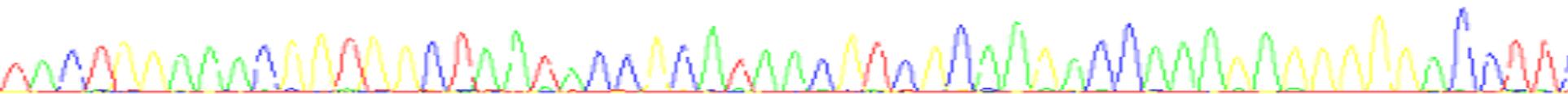
○タマネギ (*Allium cepa*) サンプルA、B1、B2
・上位7データが*Allium*属

○リンゴの果柄 (*Malus domestica*) サンプルC1
・*Malus*属に分類される植物データが上位に並んだ

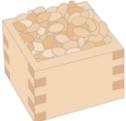
○カボチャのヘタ (*Cucurbita moschata*) サンプルC2
・カボチャ属に分類される植物データが上位に並んだ

○落花生の種皮 (*Arachis hypogaea*) サンプルC3
・最も近いデータは*Arachis hypogaea*
・2番目以下も*Arachis*属に分類

C T A C T G G A A A C G G T G G C T A A T A C C G C A T A A C G T C G (A A G A C C A A A G A G G G G G A C C T T)
359 349 339 329 319 309



(2)原料を用いた例1 (相同性の高い上位5つを記載)

サンプル	Sequence Entry	Accession No	%
トウモロコシ (学名: <i>Zea mays</i>) 	<i>Zea mays</i> clone 1503689 mRNA sequence	EU955045	96.65
	<i>Zea mays</i> cultivar line X17 16S ribosomal RNA,16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	DQ369917	96.3
	<i>Zea mays</i> cultivar line T62 16S ribosomal RNA,16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	DQ369910	96.3
	<i>Zea mays</i> clone Contig488 mRNA sequence	BT016655	95.91
	<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> x <i>Zea perennis</i> 16S ribosomal RNA, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer,partial sequence	DQ369908	95.17
大豆 (学名: <i>Glycine max</i>) 	<i>Glycine max</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ʒribosomal RNA gene, partial sequence	FJ609734	100
	<i>Glycine max</i> cultivar Hwangkeum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene,partial sequence	EU118312	100
	<i>Glycine soja</i> cultivar IT182932 18S ribosomal RNA ene,partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU118313	100
	<i>Glycine max</i> voucher PS1684MT01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2,complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ980442	100
	<i>Glycine max</i> isolate 48Hidatsa internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed space 2, partial sequence	AF144654	99.47
キウイ (学名: <i>Actinidia deliciosa</i> あるいは <i>Actinidia chinensis</i>) 	<i>Actinidia deliciosa</i> genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, partial and complete sequence	AB253775	99.66
	<i>Actinidia henanensis</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	AF323841	99.62
	<i>Actinidia deliciosa</i> clone 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	AF323830	99.62
	<i>Actinidia callosa</i> var. <i>strigillosa</i> clone 20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	AF323829	99.62
	<i>Actinidia callosa</i> var. <i>strigillosa</i> clone 10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	AF323827	99.61

上位5つ全てが
トウモロコシ属 (*Zea*)

上位5つ全てが
大豆属 (*Glycine*)

上位5つ全てが
マタタビ属 (*Actinidia*)

(2)原料を用いた例2(相同性の高い上位5つを表示)

サンプル	Sequence Entry	Accession No	%
トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) 	Solanum lycopersicum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, cultivar: Momotaro	AB373816.1	100%
	Solanum lycopersicum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, note: itomate creollo	AB373815.1	100%
	Solanum lycopersicum var. cerasiforme genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	AB373814.1	100%
	Solanum pimpinellifolium genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	AB373813.1	100%
	Lycopersicon esculentum internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF244747.1	100%
リンゴ (学名: <i>Malus pumila</i>) 	Malus domestica cultivar Ashmeads Kernal internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF186480.1	97%
	Malus domestica cultivar Reinette Simerenko internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF186478.1	97%
	Malus sieversii isolate sieversiiJ5 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF186490.1	97%
	Malus sieversii isolate sieversiiJ8 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF186493.1	97%
	Malus sieversii isolate sieversiiJ7 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	AF186492.1	97%
グレープフルーツ (学名: <i>Citrus x paradisi</i>) 	Citrus x paradisi bio-material SOFRI:STGBC603 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ641956.1	99%
	Citrus maxima bio-material BIRDI:SH-TKD5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ641954.1	99%
	Citrus maxima bio-material BIRDI:SH-P36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ641953.1	99%
	Citrus maxima bio-material BIRDI:SH-P9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ641952.1	99%
	Citrus maxima bio-material FRDC:SH-P47 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ641951.1	99%

上位がSolanum属
5位のLycopersicon esculentumは、
以前にトマトの学名として広く用いられていた

上位5つ全てがリンゴ属(Malus)

Citrus x paradisi、
またはCitrus属になった

※ グレープフルーツはCitrus maximaを
親として交配したものと言われている

