

## RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法を用いた多型解析の活用

### 1. 緒言

食品の安全性確保において、有害微生物に起因するリスクの低減は極めて重要な課題であり、コンプライアンスや消費者の食に対する安全・安心への関心の高まりから、問題が発生した場合には正確かつ短期間で解決しなければならない。

また、問題となる汚染源の調査にあたっては、製造に関する重要管理点を見直すと共に、検出された微生物を同定し、その情報を用いて汚染経路を特定しなければならない。近年、DNAシーケンサーと配列データベースの普及によって、従来よりも精度が高い遺伝子解析法による同定法が広く導入され、企業の衛生管理の現場でも使用されるようになった。しかしながら、一方では十分な知識を持っていないことによって誤った結果を導き出したり、BLASTデータベースが更新されたことによって、以前に検索したものと結果が異なってしまう、比較ができない等の現象がみられている。このような状態になった場合には、適切な対応がとれなくなる恐れがある。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法はゲノムDNAを鋳型として用い、10base程度の短い1本のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、増幅されたバンドパターンを2種類以上の試料と比較する方法である。増幅されたDNA断片は、菌株によって数や長さが異なるため、電気泳動によって簡単に検出することができる。従って、定性的に短期間で試料間の差を見分ける場合に有効であり、由来源の調査などに活用することができる。しかしながら、本法は

バンドパターンの判定を視覚的な判断に頼るため、認識に個人差が発生するなどの課題がある。そこで今回、我々が行った課題の解決手法と、これに基づいて行った細菌を中心とした多型解析の活用方法を紹介する。

### 2. 試験方法

#### 2.1 16SrRNA塩基配列解析

抽出したゲノムDNAを用いて16S Ribosomal RNA遺伝子の先端塩基配列約500bpの領域をPCR法により増幅、シーケンスを行った後、塩基配列の解析および相同性検索を行った。DNAの増幅からシーケンスに至る試薬類および機器はすべてApplied Biosystems社製を用い、相同性検索はMicroSeq Microbial Identification System Software v.1.4.1 (Applied Biosystems社製)を用いた。

#### 2.2 RAPD-PCR

抽出したゲノムDNAを所定の濃度に調整した。濃度の調整はNanoDrop1000 (スクラム社製)を用いて行った。Ready-To-Go RAPD Analysis Kit (GE社製)と混合し、PCR法により増幅したものを試料とした。PCR溶液の組成は1試料につき鋳型DNA40ng, SiglePrimer25pmol, 酵素beads 1個, 滅菌蒸留水を添加して25 $\mu$ Lとな

95°C	5分	} 45サイクル
95°C	1分	
36°C	1分	
72°C	2分	
72°C	5分	
4°C	$\infty$	

第1図 RAPD-PCRの加熱サイクル

るように調整した。サーマルサイクルは第1図に示す条件で行った。試料は5  $\mu$ Lを用い、1  $\times$  TAEをバッファとして150V $\times$ 150分のアガロースゲル電気泳動を行った。分子量マーカーは100bp DNA Ladder (タカラバイオ) を使用し、アガロースゲルは目的とする増幅断片が1,500 ~ 100bpの場合にはNusieve 3 : 1 Agarose (Lonza) を用い、それ以上の場合にはLD<sub>NA</sub> Agarose (Lonza) を用いた。電気泳動を終えたアガロースゲルはethidium bromide (和光純薬) を用いて染色した。

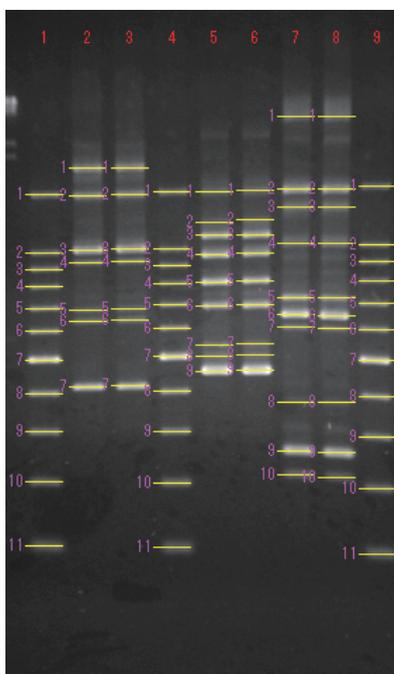
### 2. 3 バンドパターンの解析

バンドパターンはE-Graph AE-9000 (ATTO社製) を用いて画像解析 (デンシトリー) を行い、マーカーの分子量を基にパターンプロファイルを作成した後に試料の分子量を算出した。操作は添付のプロトコールによった。

## 3. 結果

### 3. 1 デンシトリーによるバンド検出と解析

デンシトリーによりバンドを検出した画像を

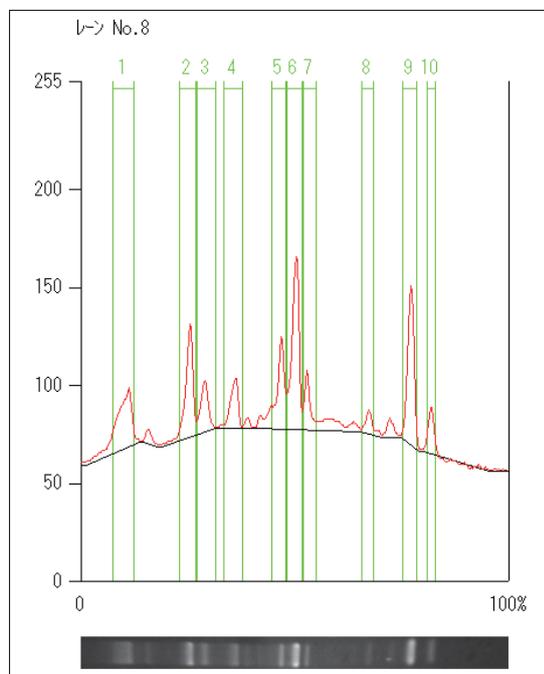


第2図 アガロースゲルのデンシトリー画像 (カラー図表をHPに掲載 C032)

第2図に示す。これにより得られた各レーンでのバンドプロファイル画像と算出した分子量を第3図および第1表に示す。第2図を見ると画像上でレーンごとに検出したバンドに番号が付与されることによって、認識に個人差が生じなくなった。また、第3図によって同一レーン内の輝度の強さをピークとして確認することができるため、希薄なバンドであっても、相対的に認識することができた。また、第1表にあるデータを使用することによって検量線の作成が可能となり、より正確な測定が可能となった。

### 3. 2 同一名称を持つ細菌の解析

16SrDNA塩基配列解析から *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* と高い相同性を示す細菌を4菌株選定して解析を行ったところ、第4図に示す画像が得られた。いずれも同様の名称を持つ細菌であったが、同じバンドパターンを示したのは右側の2レーンであった。これにより、菌株間の差異についても確認できることが分かり、由来源の特定に寄与できる手法であることが確認された。



第3図 レーンNo.8のバンドプロファイル画像 (カラー図表をHPに掲載 C033)



第4図 16SrDNA塩基配列解析

第1表 レーンNo.8の分子量測定結果

バンド数	分子量
1	2,127
2	1,486
3	1,310
4	1,019
5	724
6	651
7	605
8	381
9	263
10	216

とにバンドが異なるため、由来源の特定などに対して、定性的に判断できる有効な手法の一つであり、微生物検査などで検出した菌株において多数の試料がある場合には、スクリーニングに活用することができる。

今後は、真菌類などへの活用や特異的な細菌の検出・判別などへの適用を検討する。

本報は平成22年度の「第59回缶詰技術大会（日本缶詰協会）」にて発表した。

（大和製罐株式会社 総合研究所

第3研究室 永田洋平）

#### 4. まとめと今後の展開

本手法はデンシメトリーを取り入れたことによって、定性的な判断が可能となり、測定者に起因する判断誤差も生じ難くなった。また、菌株ご

別刷り合本をご利用ください

### ヘルスフード科学と予防医学

東京海洋大学大学院水産学研究科教授 矢澤一良 著

本書は現代人がもつ様々な健康上の問題点を解決するための食の果たす役割を、「ヘルスフード」と「予防医学」の視点よりとらえ直した有益な解説書です。ご希望の方は下記であらお申し込みください。

B5判／本文202ページ 定価3,800円（送料別）

《内容》 予防医学と健康の三原則／ヘルスフード科学の概念と特定保健用食品／DHAとEPA－魚食と健康Ⅰ・Ⅱ－／マリンビタミンの機能とその応用／ストレス障害と疲労回復／活性酸素と抗酸化物質／食品中の抗酸化物質Ⅰ／食品中の抗酸化物質Ⅱ－トコトリエノール－／ブレインフードⅠ－ホスファチジルセリン－／ブレインフードⅡ－イチョウ葉エキス－／インド伝統医療の応用－バコパの抗不安作用－／西欧ハーブ医療食品－ビンカマイナー－／抗ストレス食品－睡眠改善ミルクペプチド－／補酵素食品Ⅰ／補酵素食品Ⅱ－α-リポ酸－／酵素阻害食品Ⅰ－ペプチドによる高血圧抑制－／酵素阻害食品Ⅱ－糖質吸収抑制成分による抗糖尿病作用－／QOL改善食品Ⅰ－グルコサミン－／QOL改善食品Ⅱ－ノコギリヤシ果実エキスによる前立腺肥大抑制作用－／食べる美容食品－アスタキサンチン－／骨粗鬆症とイソフラボン－女性ホルモン様作用天然成分－／動物性食物繊維とその応用－キチン・キトサン－／腸内細菌食品－免疫乳酸菌－／抗肥満食品－脂肪燃焼ネットワーク－／抗疲労食品－カレー香辛料からの新素材探索－／マリンビタミン－海産性アミノ酸およびペプチド類の有用性／日本の伝統食品Ⅰ－ヘルスフードとしての米－／日本の伝統食品Ⅱ－ヘルスフードとしてのタマゴ－／食の安全性を考える－機能性食品素材と薬の相互作用－／食育とアンチエイジング－2006年の食と健康に関わる研究と開発－／ヘルスフード開発の特許戦略と起業／ヘルスフード研究・開発の今後の方向性－最新のトクホ情報－／ヘルスフード科学研究の進め方－東京海洋大学の場合－／食による予防医学の展望－米国にみるヘルスフードの潮流－／食品の保存性・安全性とおいしさを求めて－ヘルスフードから見た缶詰－

問い合わせ・申込み先 缶詰技術研究会 電話 03(3663)7251 ファックス 03(3663)7253