

ツキヨタケの判別法

ツキヨタケは、シイタケやヒラタケ、ムキタケと誤認されやすい毒きのこの一種で、日本でのキノコによる食中毒の主要な原因キノコである。本検査法は、有毒きのこのツキヨタケと食用キノコであるシイタケ、ヒラタケ、ムキタケを対象とした食毒判別法、およびリアルタイム PCR を用いた同定法である。

I. PCR-RFLP 法

簡便な方法で、PCR とゲル電気泳動を用いる

1 PCR テンプレート調製

- 1) あらかじめヒートブロックを 100℃ に設定する。
- 2) 検体を DW にて洗浄し、表面についているゴミを取り除く。
- 3) 1.5mL 容 tube に wet 100 mg (or Dry 20 mg) 以上を移し、マッシャーで十分にすりつぶす。
- 4) PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400µL を添加し、ボルテックスにより懸濁する。
- 5) 懸濁液を 100 °C 下 10 分間、加温する。
- 6) 13000×g で 2 分間遠心し、残渣を沈殿させる。
- 7) 得られた上清を新しい 1.5mL 容 tube に移し、PCR テンプレートとする。

2 PCR

以下の表に記す PCR 反応組成および温度条件のもと PCR 試験を行う。

- 1) 生または冷凍または乾燥きのこの場合は ITS 領域 Primer(ITS1&ITS4B) を用いる。
- 2) 加熱・消化されたきのこを用いる場合は Short PCR Primer(shortPCR-F1&shortPCR-R1) を用いる。

[PCR 用プライマーの塩基配列]

Name	Sequence
ITS1	5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3'
ITS4B	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'
shortPCR-F1	5'- TGTAACAAAGGCATGTGCACG -3'
shortPCR-R1	5'- CAAGAGATCCGTTGCTGAAAGT -3'

[PCR 反応液組成] (例) 50µL 反応系

2×Ampdirect ®Plus	終濃度	1 x	25.0	µL
BIOTAQ™ HS DNA Polymerase (5U/µL)*		1.25U/50uL	0.25	µL
10µM 5'-Primer	終濃度	0.5µM	2.5	µL

10 μ M 3'-Primer	終濃度 0.5 μ M	2.5	μ L
Template DNA (上清)		1.0	μ L
DW	全量 50 μ L とする量	18.75	μ L

[PCR サーマルサイクル]

95°C	10 min	1 cycle
95°C	30 sec	
55°C	1 min	40 cycles
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 cycle
4°C		∞

3 制限酵素処理

PCR 産物を精製したのち、酵素処理を行う。

[PCR 産物の精製] (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system)

- 1) Load of Mem Bind Solution. 50 μ L with PCR products 50 μ L
- 2) Load mixture onto SV column, standing for 1 min and centrifuge at 13000 \times g, for 1 min
- 3) Wash column twice, with mem wash solution. 700 μ L (500 μ L)
- 4) Ex. 13000 \times g, 1 min
- 5) Load 50 μ L of DW onto column, standing 1 min and centrifuge at 13000 \times g, for 1 min
- 6) Provide the frow-through to Restriction enzyme treatment

[酵素反応液組成] (例) 10 μ L 反応系

10 \times FastDigest Green Buffer	0.67	μ L
Restriction Enzyme	0.33	μ L
(2 種の場合は半量ずつ混合して総量を合わせる)		
PCR product or Purified PCR products	3.0 or 70 ng 相当	μ L
DW	全量を 10 μ L とする量	μ L

酵素種類	温度条件	処理時間 (FastDigest)
<i>Sau96</i> I	37°C	5 min
<i>Bpu10</i> I		>30 min
<i>Sfc</i> I		5 min
<i>Drd</i> I / <i>Hinc</i> II		5 min

4 アガロースゲル電気泳動による判定

Agarose 21 (3% in TAE buffer)を用いて電気泳動し、得られたバンドパターンにより判定する。

[制限酵素処理断片の泳動パターンモデル(ITS 領域 Primer(ITS1&ITS4B)の PCR 産物の場合)]

<i>Sau96I</i>				<i>Bpu10I</i>			
ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ	ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ
	800				800	720	760
290		465	400	580			
220		255	200	220			
			160				
バンドパターンから品種を判別可能 シイタケ以外は処理断片のサイズで判定				制限酵素処理断片の有無でツキヨタケを判別 ツキヨタケの場合は、制限酵素処理断片を生じる			

<i>Sfc I</i>				<i>Ded I/Hinc II</i>			
ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ	ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ
	800	720	760	800			
640					610	550	540
160					190	170	180
							40
制限酵素処理断片の有無でツキヨタケを判別 ツキヨタケの場合は、制限酵素処理断片を生じる				主に食・毒の判定 食用きのこの場合は、制限酵素処理断片を生じる			

制限酵素処理によって断片を生じない場合のバンドサイズを**太字**で示した。

注) 実際は上記以外にエクストラバンドも出ることがあるので、判別には注意を要する

[制限酵素処理断片の泳動パターンモデル(Short PCR Primer(shortPCR-F1&shortPCR-R1)の PCR 産物の場合)]

<i>Sfc I</i>				<i>Ded I/Hinc II</i>			
ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ	ツキヨタケ	シイタケ	ヒラタケ	ムキタケ
	240	230	260	230			
170					120	130	150
60						100	75
							35
主に食・毒の判別 ツキヨタケの場合は、制限酵素処理断片を生じる				主に食・毒の判定 食用きのこの場合は、制限酵素処理断片を生じる			

制限酵素処理によって断片を生じない場合のバンドサイズを**太字**で示した。

注) 実際は上記以外にエクストラバンドも出ることがあるので、判別には注意を要する

II. Real-time PCR を用いた判別法

正確なツキヨタケの判定を目的とする。

1 DNA 抽出精製

QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 使用する。手順は以下に示す。

- 1) あらかじめヒートブロックを 65°C に設定する。
- 2) 検体を DW にて洗浄し、表面についているゴミを取り除く。
- 3) 1.5mL 容 tube に wet 100 mg (or Dry 20 mg) 以上を移し、マッシャーで十分にすりつぶす。
- 4) 400 μ L の Buffer AP1 と 4 μ L の RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) を添加し、激しくボルテックスする。
- 5) 混合液を 65°C で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中にチューブを 2 ~ 3 回転倒混和する。
- 6) 130 μ L の Buffer P3 をライセートに添加後、混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
- 7) 20,000 x g (14,000 rpm) で 5 分間ライセートの遠心操作を行なう。
- 8) 2 mL コレクションチューブ中にセットした QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) にライセートをピペットで入れ、20,000 x g (14,000 rpm) で 2 分間遠心操作する。
- 9) 新しい 2.0mL 容 tube (別途準備) に移した清澄済みライセートに 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
- 10) ステップ 9 の混合液 650 μ L を、2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column にピペットで移す。6,000 x g 以上で 1 分間遠心操作し、ろ液を棄てる。混合液がなくなるまでこれを繰り返す。
- 11) DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、Buffer AW2 500 μ L を添加し、6,000 x g 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液を棄て、さらに 500 μ L の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000 x g で 2 分間遠心してメンブレンを乾燥させる。
- 12) DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5mL 容 tube (別途準備) に移し、40 μ L の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、溶出する。
- 13) ステップ 12 をもう一度繰り返し、得られた溶出液を合わせて PCR テンプレートとする。

生のきのこ検体の場合は DNA 濃度を測定し、10ng/ μ L に調製する。

加熱・消化された検体の場合は、溶出液をそのまま用いる。

2 Real-time PCR

反応液組成と検知対象ごとのプライマープローブ組み合わせは以下に記す。(配列は別表に示す)

試薬	Stock 濃度	1 reaction (25uL)	反応液中の 最終濃度
FastStart Universal Probe Master	x2	12.5 uL	x1
Forward Primer	25 nmol/L	0.3 uL	0.3 μM
Reverse Primer	25 nmol/L	0.3 uL	0.3 μM
probe	10 nmol/L	0.5 uL	200 nM
DW		全量 50μL と する量	
PCR template			2.5 ng 相当

[Real-time PCR 用プライマーおよびプローブの塩基配列]

Name	Sequence
Forward primer (OM_V-02f)	5'- TGAAATGAAAGCAGACAGAGCAA -3'
Reverse primer (OM_V-66r)	5'- TGGTTTGACAAGGCTCTTTGGT -3'
Probe (OM_V-15_Taq)	5' FAM-AGTTGCAGCTATCCC-MGB 3'

調製した各 PCR 反応液を 25μL/well となるよう測定用プレートに分注し、専用のシーリングホイルで密封する。以下の温度条件で測定を開始する。

step	description	cycles
1	95°C for 600 sec	1
2	95°C for 15 sec 60°C for 60 sec	45

得られたデータは用いた PCR 機器専用の解析ソフトを用いて解析する。