

有毒の高等植物 5 種の判別法

本検査法は、日本国内における有毒植物を原因とする食中毒事例全体の約 7 割を占めるバイケイソウ、チョウセンアサガオ、スイセン、および死亡事例のあるイヌサフラン、トリカブトを検知対象とした同定法である。

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

植物検体は以下のように DNA 抽出液を調製する。

- 1) 試料 (約 0.1 g) を蒸留水でよく洗浄する。
- 2) 液体窒素下、乳鉢および乳棒を用いてホモジナイズし、1.5 mL チューブに移す。
- 3) DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、プロトコールに従いゲノム DNA を抽出する。

食中毒原因植物残品は以下のように DNA 粗抽出液を調製する。

- 1) 葉を 10 分間煮沸した後、約 5 mm² を切り出し、1.5 mL チューブに移す。
- 2) Lysis Buffer (TaKaRa Bio) 100 μL を加え、ペレットミキサーを用いて破碎する。
- 3) Proteinase K (20 mg/mL) 1 μL を加え、65°C で 5 分間加温した後、98°C で 2 分間加熱して酵素を失活させる。
- 4) 遠心上清を DNA 粗抽出液とする。

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。

用いるプライマー対は別表 1 に示す。サーマルサイクラーは GeneAtlas S-02 (アステック) および同等の機種を用いる。

植物検体から調製した DNA を鋳型とする場合

[PCR 反応液組成]

10×Ex Taq Buffer		1 x	5.0	μL
dNTP Mixture (2.5 mM each)		0.2mM each	4.0	μL
TaKaRa Ex Taq HS (5U/μL)		1.25U/50μL	0.25	μL
100μM 5'-Primer	終濃度	10μM	0.5	μL
100μM 3'-Primer	終濃度	10μM	0.5	μL

Template DNA	50ng	1.0	μL
DW	全量 50μL とする量	18.75	μL

[PCR サーマルサイクル]

98°C	10 sec	
55°C	30 sec	30 cycles
72°C	1 min	
4°C		∞

食中毒原因植物残品から調製した DNA を鋳型とする場合

[PCR 反応液組成]

2×Gflex PCR Buffer	1 x	25.0	μL
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25U/μL)	1.25U/50μL	1.0	μL
10μM 5'-Primer	終濃度 0.25μM	1.25	μL
10μM 3'-Primer	終濃度 0.25μM	1.25	μL
Template DNA (上清)		2.5	μL
DW	全量 50μL とする量	18.75	μL

[PCR サーマルサイクル]

94°C	1 min	
98°C	10 sec	
55°C	15 sec	30 cycles
68°C	30 sec	
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 μL with PCR products 50 μL
- 2) Load mixture onto SV column, standing for 1 min and centrifuge at 13000 ×g, for 1 min
- 3) Wash column twice, with mem wash solution. 700 μL (500 μL)
- 4) Ex. 13000 ×g, 1 min
- 5) Load 50 μL of DW onto column, standing 1 min and centrifuge at 13000 ×g, for 1 min
- 6) Provide the frow-through to Restriction enzyme treatment

目的に応じた制限酵素を用いる。反応条件は 37°C で 5 分間。

[酵素反応液組成] (例) 50 μ L 反応系

Buffer	5.0	μ L
RE (DNA 1 μ g に対して 10 units 使用)	1.0	μ L
Purified PCR products	2.0	μ L
DW	42.0	μ L

4 アガロースゲル電気泳動による判定

反応液の一部 (10 μ L) を Agarose (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]

<i>Bgl</i> III		<i>Bgl</i> III	
バイケイソウ	オオバギボウシ・ ギョウジャニンニク	チョウセン アサガオ	ゴボウ
390 182	572	286 166	452
	切断されない		切断されない

<i>Eco</i> RV		<i>Nco</i> I	
スイセン	ニラ	イヌサフラン	ギョウジャ ニンニク
255 107	362	276 105	381
	切断されない		切断されない

<i>Pst</i> I	
トリカブト	ニンソウ
379 219	598
	切断されない

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

正確な種別判定を目的とする。

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 にて洗浄する。
- 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。

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の配列と組み合わせは別表 2 に示す。リアルタイム PCR 機器には LightCycler® 96 (Roche Applied Science) または同等の機器を用いる。

[PCR 反応液組成] (例) 25 μ L 反応系

Stock solution	Final conc.	μ L/reaction
2x FastStart Universal Probe Master	x1	12.50
50 μ M F primer	0.5 μ M	0.25
50 μ M R primer	0.5 μ M	0.25
10 μ M probe	0.2 μ M	0.50
PCR Template		2.50
DW	全量 25 μ L とする	9.0

調製した各 PCR 反応液を 25 μ L/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。

[PCR サーマルサイクル] ホットスタート法

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	45 cycles
60°C	60 sec	

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。

(別表 1)

PCR-RFLP 法で用いるプライマー対

Species	Region	Primer name	Direction	Sequence (5'→3')
バイケイソウ	rbcL	BG-rF1	Forward	GTCTTGATCGTTACAAAGGACG
オオバギボウシおよび ギョウジャニンニク		BG-rR2	Reverse	CATTACGATAGGAACTCCCAATTC
チョウセンアサガオ	rbcL	CG-rF12	Forward	AGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCC
ゴボウ		CG-rR13	Reverse	CATTCATAAACAGCTCTACCGTAG
トリカブト	matK	TN-mF3	Forward	CCTATCCATCTGGAACTATTGGTTC
ニリンソウ		TN-mR4	Reverse	TGAATTTTCTAACATTTGACTCCTTAC
スイセン	rbcL	SN-rF5	Forward	ACTGTGTGGACTGATGGACTTACCA
ニラ		SN-rR6	Reverse	GCTCTACCGTAGTTTTTTGCGGATA
イヌサフラン	rbcL	CA-rF16	Forward	TTGACTTATTATACTCCTGA
ギョウジャニンニク		CA-rR17	Reverse	GAAAGTTTTGGAATAAGCAG

(別表 2)

5 種類の検出系プライマーペア, プローブ塩基配列

	sequence (5'-3')	amplicon size (bp)
スイセン検知系		
Narcissus_matK-F1	CTTTTGGAACCTTTTCTTGAACGAACAC	125
Narcissus_matK-R1	GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG	
Narcissus_matK-P1	FAM-TCCTATGAAAATCGTTACGA-MGB	
バイケイソウ検知系		
Veratrum_matK-F1	CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTCGA	119
Veratrum_matK-R1	GATCCATGTAAAGTAAAAGGAAAAAGGGT	
Veratrum_matK-P1	FAM-TTGATCTTCGCGCAAACA-MGB	
イヌサフラン検知系		
Colchicum_matK-F2	CAGGATCCATATCAACCAATTA AAAAACC	97
Colchicum_matK-R2	CATTTTGTTTTTGACCGCCAAGGG	
Colchicum_matK-P2	FAM-TCCTTTTGGGGGGATATTT-MGB	
チョウセンアサガオ検知系		
Datura_matK-F6	GAGGGATTCCATTTATTI*TGGAATG	122
Datura_matK-R6-2	GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAAG	
Datura_matK-P6	FAM-TATCTTCTTTCGAAGGC-MGB	
トリカブト検知系		
Aconitum_matK-F1	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100
Aconitum_matK-R1	ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATCG	
Aconitum_matK-P1	FAM-CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-BHQ1	

(参考)

陽性コントロールプラスミド ; pEX-K4J1-nvcd-matK

インサート (681bp)

cgcCGATTAACATCTTTTGGAACTTTTCTTGAACGAACACATTTCTATGGAAAATAGAACATCTTCAAATAGAAAATTTA
TAGTAATTTGTGCGTAACGATTTTCATAGGACCTCCTGGTTCTTCAAAGATCTTTCATGCATTATGccgAAGTACGGTACGC
AATGTTTTGAAAAGATTAGGTTTCGAGATTATTAGAGGAATCTTTACGGAAGAAGATCAAGTTATTTCTTTGATCTTCGCGC
AAACAACCCCTTTTCTTTTACTTTACATGGATCAGATAGAGAAccgAATGATCTAACATTTTGTGTTTTGACCGCAAGGGA
TTTATTAGTACACTTGAAAAATATCCCCCAAAGGAAGGAATGGTTTTTTAATTGGTTGATATGGATCCTGTATGAGTAAG
cggAATGATATCAGAGGGATTTCCATTTATTGTGGAATGCCGTTTTCTCTACgATTAATATCTTCTTTATCTTCTTTTCGAA
GGCAAAAAGATTTTAAAATCTCATAACTCCGATCAATTCATTCAACATTTCTTTTTTAGAGcggCTTTGATTGAATCACT
GGCTAAATCGAAATTTTGTAACTTATCAGGGCATCCCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCGATTTCATCCGATTCTGATATTATC
GATAGATTTGGTCGAATATGCAgcg

ベクター:

pEX-K4J1 (2391bp)

pEX Sequencing primerF:GGAGCAGACAAGCCCGTCAG

pEX Sequencing primerR: AATAATCTGGCTTTTTATATTCTCTGCCAATA

<<INSERT>>CTGTGCGTCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCAGAGAATA
TAAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTTGCTCTTCCGCTTCTCCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA
CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC
TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCGT
TCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA
GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC TACGGCTACA
CTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAA
ACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAAATATTCCGGAATTGC
CAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCAAGGATCTGATGGCG
CAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG
GCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGT
CAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCT
ATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTTCGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCCTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTG

GGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGA
AGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCG
CGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTT
CTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGA
GCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGC
CTTCTTGACGAGTTCTTCTGAACCGGTAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGA
ATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATT
ATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT
GACACATGCAGCTCAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC
CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTA CTGAGAGTGCACCAATT