



# F-Kit NEWS FOOD ANALYSIS

(株) J.K. インターナショナル

環境分析・食品分析 No. 15

August 2001

## 最新製品情報

### GMO試薬キットの発売予定

R-Biopharm社からGMO検出キットの発売を予定しています。製品はPreparation kitとAmplification & Detection kitに分かれ最初は下記製品を計画しています。

キットはGMO項目をPCR\*法で増幅し、ELISA法又は定量PCR装置(LightCycler)などにより検出します。

GMOs

- RoundUP Ready™ Soja (MONSANTO)  
Resistant to Glyphosate (Roundup®)
- BT11 Corn, Bt176Corn (NOVARTIS)  
Resistant to European Corn Borer ("Maiszünsler")
- T25 Corn (AgrEvo)  
Resistant to Phosphinoic acid
- LibertyLink Canola (PLANT GENETIC SYSTEMS)  
Resistant to Glufosinate (Liberty)
- 35S promoter/NOS terminator screening

さらに、その他のGMOs 検出キットを提供していく予定です。

(注) Sure Food GMOキットには Taq Polymerase は含まれていません。

\*PCRプロセスはHoffman-La Roche社が特許を所有しています。

### F-キット 蓚酸 今秋再発売

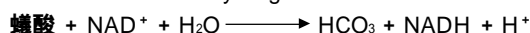
Cat. No. 755 699 10回用(近紫外外部吸光度測定法)

蓚酸脱炭酸酵素を用いた蓚酸定量キットを今秋再発売の予定です。酵素阻害が少ない本法では、活性炭で前処理をすることがなく野菜などの食品、尿などの生体試料を定量できます。また、反応液量を簡単にスケールダウンでき経済的です。

【測定原理】 oxalate decarboxylase



formate dehydrogenase



## ホームページの開設

ホームページを開設しました。当社の製品情報を迅速にお届けできるようになります。

食品・一般生化学用分析試薬(F-キットなど)や、PCR関係機器および試薬などをご紹介します。

ホームページ URL: <http://www.jki.co.jp>

詳細な資料およびお問い合わせは当社までご連絡下さい。

E-mail : [jki@vesta.ocn.ne.jp](mailto:jki@vesta.ocn.ne.jp)

TEL : 03-5362-2907

FAX : 03-5362-7079

## 目次

## ページ

### 最新製品情報

GMO試薬キットの発売予定 .....	1
F-キット 蓚酸 .....	1

### ホームページの開設

製品情報 .....	1
------------	---

### 酵素法の分析

酵素法による分析の基礎 .....	1
酵素法を用いた最近の欧米の食品分析公定法一覧 .....	5

### 最近の食品分析

リアルタイムPCRによるGMOの定量 .....	7
--------------------------	---

### お知らせ

平成13年度・酵素法による食品分析研究会講演会 .....	8
-------------------------------	---

## 酵素法の分析

### 酵素法による分析の基礎

#### 【はじめに】

酵素法は、数多くの食品成分を迅速に、信頼性高く測定します。従来法では測定困難な成分をも測定可能にします。酵素法によって正確な測定をするには試薬の性質や反応形式を良く知っておくことが要求されます。ここでは、酵素反応の基本や実際に応用する場合の注意などをまとめてみました。

#### 【食品分析における生化学試薬】

酵素は生体内代謝における生化学的触媒です。複雑な化学反応が酵素によって調節され、触媒されています。細胞から単離された酵素を複雑な食品の分析用の試薬とするのは、特異性の高い触媒としての機能によるものです。

#### 【酵 素】

すでに述べましたように、酵素は特異性の高い生化学的触媒です。全ての触媒と同様に酵素は次のような性質を持っています。

- 極めて微量で機能する
- 反応によって変化しない
- 化学平衡には影響せず反応速度を促進する

蛋白質としての酵素は特定の三次元構造をもち、この構造は、化学結合、水素結合、ファンデルワールス力、静電結合などによって保持されています。インタクトな構造をもつ酵素のみが活性をもっています。基質は酵素の活性中心といわれる部分に結合し、酵素基質複合体を形成します。このために酵素がある特定のインタクトな構造をとることが要求されるわけです。酵素の基質特異性にも同様に特定の構造が必要とされます。(図1)

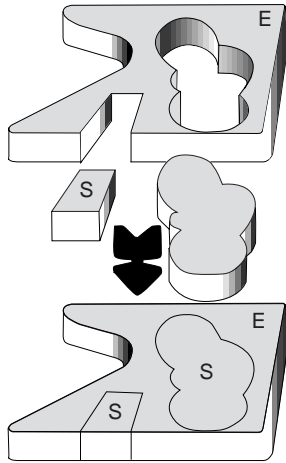


図 1

三次元構造が破壊され、完全に不可逆的に酵素活性を失った場合は、酵素が変性したといえます。変性は、高温、強い酸またはアルカリ、極めて強い機械的振とうなどによって起こります。酵素反応のためには、インタクトな構造を保ち、それによって活性を維持することが重要です。

#### 【温度の影響】

温度を上げると、一般の化学反応と同様に反応速度が増加します。しかし、酵素反応においては、ある温度以上になると、酵素の活性が失われます。酵素蛋白が変性し、失活するわけです。酵素が失活する温度は、酵素によって異なりますが、大体 50 ないし 60 の範囲になります。温度を高くすると、反応の初期には反応速度が増加しますが、同時に酵素の安定性が失われます。(図 2)

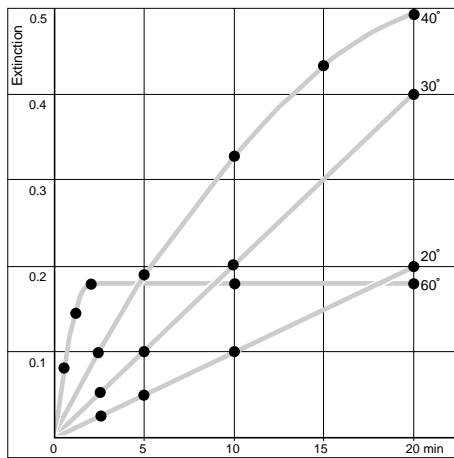


図 2

食品分析における酵素反応は、室温またはそれに近い温度で、十分に速い速度で進行します。二、三の例外的な場合には、酵素分析を妨害するような酵素を変性させるために加熱または沸騰することがあります。典型的な例は、ハチミツ中のサッカロースを測定する場合で、このときは大量に含まれるグルコースをグルコースオキシダーゼとカタラーゼで酸化し、次にこれらの酵素は次のサッカロース分析を妨害しますので、加熱変性させます。

低温では、他の化学反応と同様に、酵素反応の速度は低下します。この場合は、酵素の安定性が低下するのではなく(実際には安定性は増加します)反応速度そのものが低下します。そこで分析に用いる酵素は、低温(例えば 4 )で保存されます。場合によっては氷点以下で保存される場合もあります。

#### 【pHの影響】

pH に対する酵素活性の依存性は、酵素分析において重要です。

例えば、鉛、水銀、砒酸、カドミウムなど

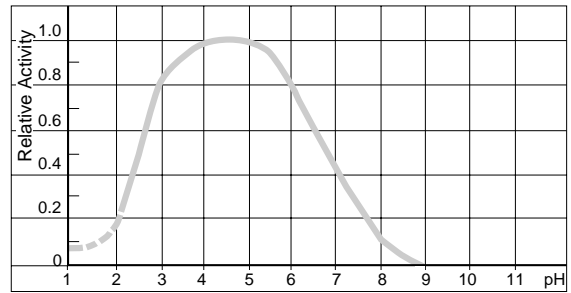


図 3

図 3 には -フルクトシダーゼの pH 依存性が示されています。この酵素の至適 pH は 4.5 ~ 4.6 です。酵素分析は、可能な限り、至適 pH 付近で行われます。酵素反応は、pH の移動をおさえ、至適 pH で反応が進むようにバッファー中で行います。酸を用いて除蛋白を行った強い酸性の試料は、酵素分析をする前に中和することもあります。

#### 【塩やアルコールの影響】

高濃度の塩やアルコールは酵素活性を阻害する場合があります。このような試料では希釈して、妨害効果を下げることができます。高濃度のアルコールを含む飲料でもこのようにして酵素分析を行うことができます。

#### 【アクチベーターと阻害剤】

アクチベーターとしては例えば塩が考えられます。アミラーゼは塩素イオンを必要とし、また二、三の脱水素酵素はマグネシウム、亜鉛、マンガンなどを必要とします。しかし、高濃度になると阻害作用を示すことがあり、このような場合には EDTA やクエン酸のようなキレーターを用います。逆にキレーターが酵素反応を低下させる場合もあり、このような場合にはイオンを添加して調べることができます。食品中のキレーター(例えばフルーツジュース中のクエン酸)の濃度は低く、問題を引き起こすことはまれです。

シアンや重金属イオンが阻害効果をもつことがあります。重金属、例えば鉛、水銀、砒酸、カドミウムなどは、活性中心に SH 基をもつ酵素を阻害します。食品中のこれら重金属の濃度は非常に低いのですが、もし多量に含まれる場合には EDTA などを用います。安息香酸、PHB-エステル、ソルビットのような保存剤や人工染料、抗酸化剤などは通常、酵素分析を阻害しません。

#### 【定義】

酵素量は通常、活性によって測定されます。酵素活性は酵素単位によって表されます。一単位は、標準条件のもとで、1 分間に 1 マイクロモルの基質を変化させる酵素活性に相当します。標準条件とは、基質濃度、pH、温度、バッファーを指します。酵素の比活性は U/mg という単位で表されます。

#### 【サイドアクティビティ】

酵素が他の基質をも変化させる時は、その活性をサイドアクティビティとよびます。この活性は、主活性のパーセントで表されます。サイドアクティビティは酵素の固有の活性ですから、酵素を精製しても除去できません。

#### 【混在活性】

酵素標品が他の酵素を含む場合には、これを混在活性といい、主活性のパーセントで表されます。サイドアクティビティや混在活性は通常非常に低いので、クリーブ反応が導かれる程度であり、これは外挿法によって除去することができます。

#### 【酵素活性の測定】

過剰の基質を加え、基質の変化量を測定します。反応が完了するまで待つ必要はなく、単に反応速度を測定すれば十分です。

### 【酵素の動力学】

酵素Eは基質Sと結合し、酵素基質複合体を形成し、つぎにこれが酵素Eと生成物Pに分解します。



したがって反応速度は酵素基質複合体の濃度に比例します。

最大速度  $V_{max}$  は全ての酵素(Et)が酵素基質複合体となる時に得られます。

$$(1) V = K \times [ES]$$

$$(2) V_{max} = K \times [Et]$$

$$(3) \frac{V}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[Et]}$$

酵素基質複合体の量は、基質作用の法則に従います。

$$(4) \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = K_m$$

$K_m$ は酵素基質複合体の解離定数でミカエリス定数とよばれます。 $K_m$ 値はpH、温度バッファーによって変化します。(1)-(4)の式から次のミカエリスメンテンの式が導かれます。

$$(5) V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

$K_m$ 値は、反応速度が最大速度の半になる時の基質濃度に相当します。高い $K_m$ 値は、基質との親和性が低いことを意味します。 $K_m$ 値はラインウィーバーパフの方法によって決定されず。(図4)

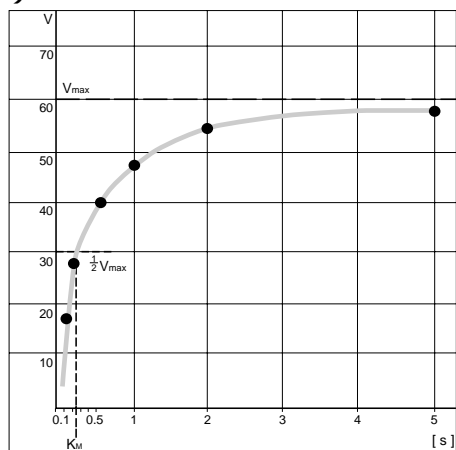


図 4

### 酵素の反応

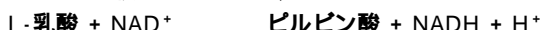
#### 【反応の平衡】

酵素反応も、多くの化学反応と同様に、反応の平衡に達するまで進行します。Kを平衡定数とすると、



$$K = \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}$$

乳酸定量について例をとりますと、



この反応の平衡定数は  $K = 2.76 \times 10^{-12}$  であり、乳酸とNADの側に傾いています。乳酸を定量するには、したがってNADの濃度を上げるか生成物の濃度を下げなければなりません。

この目的のために

- (1) アルカリ性で反応を行う。
- (2) ピルビン酸をヒドラジンと反応させる。
- (3) GPTの存在下でピルビン酸をアラニンに変える。

#### 【分光学的測定】

酵素的測定法ではNAD(P)またはNAD(P)Hがよく使われます。

NAD(P)Hは図5に示すように340 nm 附近に吸収を持っています。これに反しNAD(P)は殆ど吸収がありません。

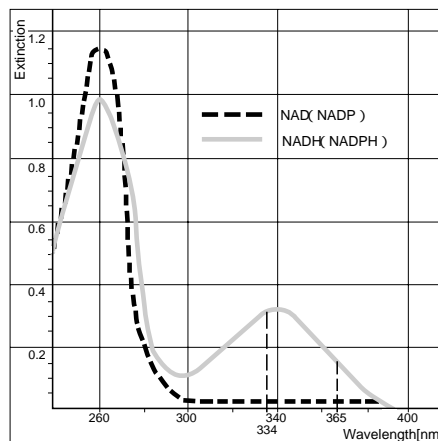


図 5

### 食料成分の定量的測定

#### 【試料の取扱い方】

酵素的測定法は、蒸留、カラムクロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィのような分離操作をせずに食品試料中の特定物質を再現性良くしかも正確に測定することができます。また個々の糖、例えばサッカロース、グルコース、フルクトース、ラクトースなどを、他の酸化還元性物質が共存する試料でも同時に測定することができます。有機酸も酵素法によって特異的に定量ができます。有機酸のエステルは、従来法では酸として定量される場合がありますが、酵素法では、適当な加水分解を行えば、有機酸とそのエステルを個別に定量することができます。また酵素法は、有機酸の光学異性体をも区別して定量ができます。D-およびL-乳酸の個別定量はその一例です。またクレアチニンとクレアチンを個別に定量することもできます。酵素的アルコール定量法は、揮発性物質が多い試料やアルコール含量の低い試料のアルコール定量に適しています。酵素的定量法では、試料の複雑な前処理は必要とせず、単に測定すべき物質を溶液状態にすることだけが要求されます。

#### 【濾過及び遠心】

試料が濁っている場合には、濾過または遠心を行います。エマルジョンは一般には過塩素酸などの酸で処理します。

#### 【除蛋白】

過塩素酸が食品分析における除蛋白によく用いられます。過塩素酸は、KOHで中和する際に除去されます。酸性で加水分解される物質を定量する場合には、Carrez 試薬を用います。

#### 【脂肪の抽出】

一般には濾過を行います。場合によっては濾過前に低温で、20 ~ 30分放置します。

#### 【着色物質の影響】

多量の着色物質が含まれる場合は、希釈するか脱色を行います。

#### 【脱色】

よく用いられる脱色剤は、活性炭、ゲラチン、ポリアミド、ポリビニルピロリドンなどです。

#### 【酵素反応】

典型的反応カーブを図6、図7に示しました。図の Eを用いて計算します。

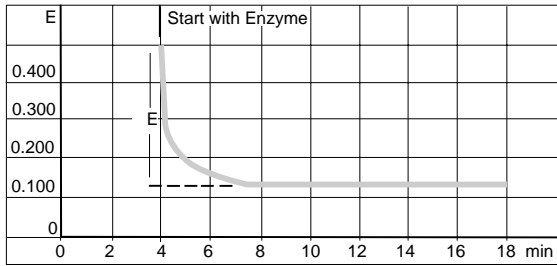


図 6

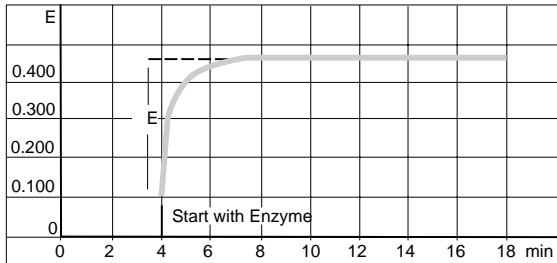


図 7

**【外挿法】**

主反応が完了した後でも、副反応が遅い速度で進行する場合があります。このいわゆるクリープ反応は、直線部分の勾配から測定できます。直線部分を反応開始時までのばして E を求めます。(下図 8)

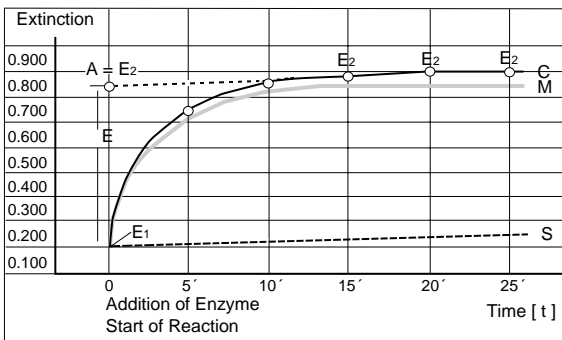


図 8 “ Creep reaction ” and graphic extrapolation

- M true extinction curve of main reaction
- S extinction curve of side reaction
- C “ creep reaction ”: sum of M + S
- Extension of the straight line E2' to E2' to the point of intersection A. A is identical with the true extinction E2.

**【濃度の計算】**

Lambert-Beer の法則から

$$E = C \times d$$

ここで

- E : 吸光度
- C : 濃度 ( mol/L )
- d : セルの長さ
- : モル分子吸光係数 ( L × mol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup> )

したがって

$$C = \frac{E}{d} \text{ (mol/L)}$$

化学反応に際して

$$C_1 - C_2 = \frac{E_1 - E_2}{d} \quad C = \frac{E}{d} \text{ (mol/L)}$$

分子量 ( MW ) が判っている場合には

$$C = \frac{E \times MW}{d \times 1000} \text{ (g/L) [ キュベット内 ]}$$

試料の濃度は反応液量 : 試料量 = V : v を考慮して

$$C = \frac{E \times V \times MW}{d \times v \times 1000} \text{ (g/L)}$$

もし試料を希釈した場合には、希釈倍数をさらに乗じます。

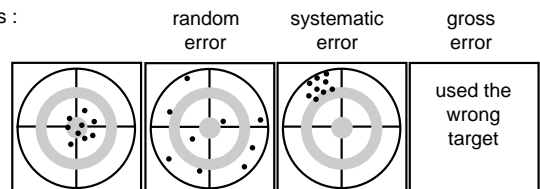
**正確性と精度 ( accuracy and precision )**

実験誤差には

- gross errors
- systematic errors
- random errors

があります。gross errors とは不注意 ( 操作ミスなど ) に基づく誤差で基本的には除去可能な誤差です。systematic errors とは真の値から一つの方向にずれる誤差です。random errors とは、平均値からのバラツキのことです。これらを表すと図 9 のようになります。

Error types :



Precision : optimal bad good  
Accuracy : optimal good bad

図 9

systematic errors が小さいほど、正確性 ( accuracy ) はより高くなります。random errors は精度 ( precision ) または再現性に関連しており、CV 値で表されます。

$$S = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1} \quad CV = \frac{100S}{\bar{X}} \%$$

$\bar{X}$  : 測定値の平均値

$X_i$  : 測定値  $X_1, X_2, X_3 \dots X_n$

n : 測定回数

**【キュベット】**

比色測定は、一般には 1 cm のキュベット中で行われます。石英、ガラス、プラスチック製のものが使われています。図 10 に各キュベットの透過率を图示しました。

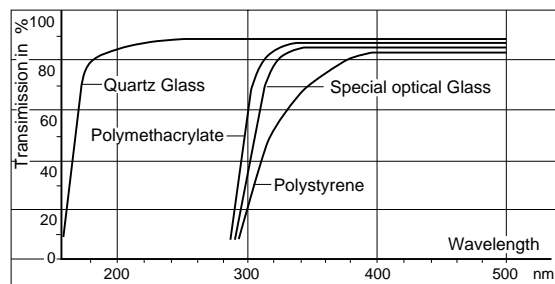


図 10

**【キュベットの吸収】**

cuvette material	340 nm	365 nm
quartz glass	0.045	0.045
polymethacrylate	0.080	0.050
special optical glass	0.095	0.050
polystyrene	0.200	0.100

**【ガラスピペット】**

公式に検定されたピペットの正確性は非常に高いものです。非検定の場合は、使用前チェックすることが望ましいと思われます。

**【ピストンタイプピペット】**

非常に速くピペットできるので時間の節約になります。正確性は一般には非常に秀れています。精度も高いのがふつうです。

試薬及び試薬溶液

【微生物に対する注意】

酵素は蛋白であり、したがって酵素溶液や懸濁液は、微生物の繁殖しやすい条件です。微生物による汚染で蛋白質(酵素)の構造は破壊され、活性が低下します。バッファーも微生物で汚染されます。pH値が変わり、バッファーの能力が低下します。試薬液をカバーなしで放置することは避けましょう。

【水】

試薬の調製に用いる水は次のようにしてつくられます。

- 二回蒸留水
- 一回蒸留水をイオン交換樹脂で脱イオンしたもの
- メンブランフィルターをとおした脱イオン水

微生物は空気中やガラス表面にも存在します。このため使用する器具は蒸気で殺菌することが望ましいのです。バッファーなど保存溶液は冷蔵庫に保存し、必要量だけ別の容器にうつして使用するようにしましょう。

【温度】

試薬液は低温で保存します。これは微生物の繁殖を防ぐ効果もあります。凍結乾燥品や酵素溶液は冷蔵庫温度より氷点以下の温度の方が一般には安定ですが、酵素液を凍らせることは一般にはすすめられません。分析中は、酵素液は氷中で保存します。バッファーは大量に使用するので室温に保存します。

【光】

一般には光を避けて保存することが望まれます。光による試薬の破壊を防ぐためです。

【酸素】

酸素の影響は通常小さいので、しっかりと栓をしておけば効果的と思われます。

【湿度】

NAD(P) とくにNAD(P)Hの乾燥品が湿気を吸収すると、含量が変化するばかりでなく、脱水素酵素の阻害剤が生成します。分解した補酵素を用いると、酵素反応は遅くなります。NAD(P)溶液は、一般には一週間以内に使用するのが望まれます。特に乾燥品は、シリカゲルを用いたデシケーター中で保存することが望まれます。溶液状態での分解はpHによって左右されず。NAD(P)HはpH7.5以上で安定ですが、これに反しNAD(P)は酸性 pH9 付近で最も安定です。

【安定性】

凍結乾燥品、硫酸懸濁液、50%グリセロール溶液の形をとっている酵素標品は長期間、例えば一年以上安定とされています。補酵素も乾燥状態で適当に保存されれば長期間安定です。F-キット試薬は、有効期限を明示してあります。

酵素を用いた最近の欧米の食品分析公定法一覧

Official methods (Numerous enzymatic determinations have been recognised by the following international standardization and regulation authorities)

ISO (International Standardization Organisation)

No.	Title	Measurement Item	Sample	Note
ISO 2963 (1997)	Methods for chemical analysis of cheese. Determination of citric acid content of cheese and processed cheese products	citric acid	cheese processed cheese	enzymatic method
ISO 4133 (1979)	Determination of glucono-delta-lactone content reference method	glucono-delta-lactone	meat & meat products	
ISO 4134 (1999)	Determination of L-glutamic acid content	L- glutamic acid	meat & meat products	reference method
ISO 8069 (1986)	Methods for analysis of dried milk and dried milk products	lactic acid and lactates	dried milk and milk products	
ISO 8451 (1991)	Determination of starch content	starch	tobacoo	enzymatic method
ISO 11213 (1995)	Determination of the acetyl content	acetyl	modified starch	enzymatic method
ISO 13965 (1998)	Methods of test for meat and meat products. Determination of starch and glucose contents	starch, glucose	meat & meat products	enzymatic method
ISO/DIS 5765-1 (1998)	Determination of the lactose content milk powder, Part1:Enzymatic determination in measuring the glucose content of lactose	lactose	icecream powder & processed cheese	measuring the glucose content of lactose
ISO/DIS 5765-2 (1998)	Determination of the lactose content - Part 1: Enzymatic milk powder determination in measuring the galactose content of lactose	lactose	icecream powder & processed cheese	measuring the galactose content of lactose

AOAC (American Association of Analytical Chemists)

No.	Title	Measurement Item	Sample	Note
AOAC Official Method 984.15	Lactose in Milk	lactose	milk	enzymatic method
AOAC Official Method 985.09	Glucose and Fructose in Wine	glucose & fructose	wine	enzymatic method
AOAC Official Method 985.11	Citric Acid in Wine	citric acid	wine	enzymatic method
AOAC Official Method 993.05	L-Malic acid Ratio in Apple Juice	L-malic acid	apple juice	enzymatic method

IFU (International Federation of Fruit Juice Producers) Measurement Item (method)

IFU 22 L-Citric acid (enzymatic), 1985	IFU 55 Fructose (enzymatic), 1985	IFU 76 D- Gluconic acid in grape juice, 2001
IFU 22 Ethanol (enzymatic), 1996	IFU 56 Sucrose (enzymatic), 1998	IFU 77 Glycerol in grape juice, 2001
IFU 53 D/L-Lactic acid (enzymatic), 1996	IFU 62 Sorbitol (enzymatic), 1995	Starch enzymatic recommended
IFU 54 D-Isocitric acid (enzymatic), 1984	IFU 64 D-Malic acid (enzymatic), 1995	

IDF (International Dairy Federation)

No.	Measurement Item	Sample	Note
IDF 34C (1992)	Citric acid	cheese, processed cheese and milk	enzymatic
IDF 69B (1987)	D-/L-Lactic acid	dried milk	enzymatic
IDF 79B (1991)	Lactose/D-Galactose	galactose moiety in processed cheese, whey powder	enzymatic
IDF 79B (1991)	Lactose/D-Glucose	glucose moiety in dried milk, dried ice-mixes, whey powder	enzymatic
IDF 97A (1984)	Nitrate/(Nitrite)	milk products and whey powder	enzymatic
IDF 175 (1995)	Lactose/D-Glucose (Lactulose)	milk	enzymatic

MEBAK (Mittleeuropäische Brautechnische Analysenkommission - Central European Brewing Committee for Analysis)

Enzymatic Analysis for:		
Ethanol (also European Brewing Convention)	Acetic Acid (also European Brewing Convention)	Starch
Glycerol (also European Brewing Convention)	L-/D-Lactic Acid (also European Brewing Convention)	Ammonia
Formic Acid	Oxalic Acid	Sulfite (also European Brewing Convention)
L-Malic Acid	Glucose and Fructose	Nitrate (also European Brewing Convention)
Ascorbic Acid	Sucrose	
Citric Acid	Maltose	

European Norms (implemented in all European member states)

No.	Title	Measurement Item	Sample	Note
EN 1137 (1995)	Method for determination of citric acid (citrate) content of fruit and vegetable juices	citric acid	fruit and vegetable juices	NADH spectrometric method
EN 1138 (1995)	Method for determination of L-malic acid (L-malate) content of fruit and vegetable juices	L-malic acid	fruit and vegetable juices	NADH spectrometric method
EN 1139 (1994)	Method for determination of D-Isocitric acid content of fruit and vegetable juices	D-isocitric acid	fruit and vegetable juices	NADH spectrometric method
EN 1140 (1995)	Method for determination of D-glucose and D-fructose content of fruit and vegetable juices	D-glucose and D-fructose	fruit and vegetable juices	NADH spectrometric method
EN 1988 (1998)-2	Foodstuffs, Determination of sulfite	sulfite		Enzymatic method
EN 12014-3 (1998)	Foodstuffs, Determination of nitrate and/or nitrite content, spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite	nitrate and/or nitrite	meat products	
EN 12014-5 (1998)	Foodstuffs, Determination of nitrate and/or nitrite content, spectrometric determination of nitrate and nitrite content Enzymatic determination of nitrate content of vegetable-containing food for babies and infants	nitrate and/or nitrite	vegetable-containing food for babies and infants	
EN 12138 (1998)	Enzymatic determination of D-malic acid content	D-malic acid	fruit & vegetable juices	NAD-spectrometric method
EN 12146 (1997)	Enzymatic determination of sucrose content	sucrose	fruit & vegetable juices	NADP-spectrometric method
EN 12631 (1999)	Enzymatic determination of D- and L-lactic acid (lactate)	L-lactic acid	fruit & vegetable juices	NAD-spectrometric method
EN 12632 (1999)	Enzymatic determination of acetic acid (acetate) content	acetic acid	fruit & vegetable juices	NAD-spectrometric method

Commission Regulation EEC No. 2676/90 of 17 September 1990 determines community methods for the analysis of wine.

The annexe contains the following enzymatic methods

Glucose and Fructose	Citric acid	Lactic acid	L-Malic acid	D-Malic acid
----------------------	-------------	-------------	--------------	--------------

OIV (International Wine Office)

Glucose and Fructose (enzymatic method)	Glycerol (enzymatic method)	L-/D-Lactic acid (enzymatic method)
Citric acid (enzymatic method)	L-Malic acid (enzymatic method)	

DIN (German Norms - additional not covered by EN)

No.	Title	Measurement Item	Sample	Note
DIN 10325 (1986)	Determination of citric acid in processed cheese	citric acid	processed cheese	enzymatic method
DIN 10326 (1986)	Determination of sucrose and glucose in milk and milk products	sucrose & glucose	milk & milk products	enzymatic method
DIN 10344 (1982)	Determination of lactose and galactose in milk and milk products	lactose & galactose	milk & milk products	enzymatic method
DIN 10335 (1987)	Determination of L-/D-lactic acid in milk and milk products	L- / D-lactic acid	milk & milk products	enzymatic method
DIN 10381 (1979)	Examination of starch and starch products, determination of D-glucose and D-fructose	D-glucose and D-fructose	starch and starch products	enzymatic method
DIN 10471 (1997)	Determination of D-gluconat in milk and milk products	D-gluconate	milk & milk products	enzymatic method
DIN 10476 (2000)	Determination of nitrite and nitrate in milk products	nitrit and nitrate	milk products	enzymatic method
DIN 54604-1 (1988)	Examination of paper and cardboard, determination of starch	starch	paper & cardboard	enzymatic method

In article 35 of the German Food Law enzymatic methods for food analysis are laid down for the following products:

	食品一般	牛乳・乳製品	チーズ	鶏卵	肉・肉製品	パン・ケーキ	缶詰トマト	トマトケチャップ調味料	野菜ジュース	果実製品	果実ジュース	ビール	チョコレート	牛乳以外の幼児用食品	野菜ベークスの幼児用食品
亜硫酸															
乳糖															
ガラクトース															
L-乳酸															
D-乳酸															
D-グルコン酸															
琥珀酸															
D-3-ヒドロキシ酪酸															
グルコース															
果糖															
ショ糖															
クエン酸															
酢酸															
グルタミン酸															
スターチ															
総グルコース						*1									
ソルビトール															
蟻酸															
シュガー含有量															
イソクエン酸															
リンゴ酸															
エタノール												*2			
麦芽糖															
硝酸															

\*1: スターチ換算

\*2: 低濃度ビール

## 最近の食品分析

### リアルタイムPCRによるGMOの定量

酒井栄一 1 森光子 2 中川原寛一 3

1; 株式会社 日本遺伝子研究所 遺伝子部

2; 同部長 3; 同所長

#### 【はじめに】

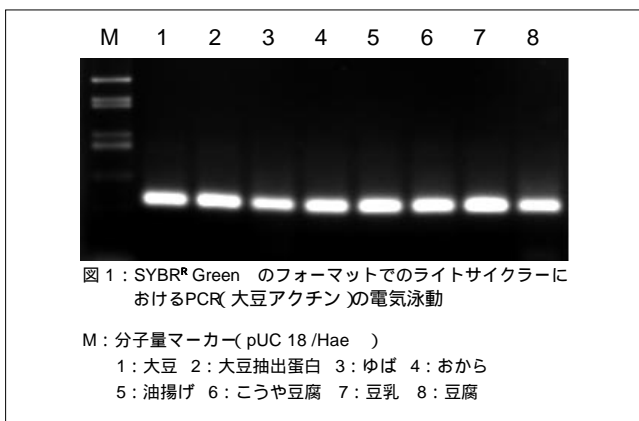
GMO (Genetically Modified Organism : 遺伝子組換え作物) は社会問題となっており、昨今、新聞紙上をにぎわしている。このような状況の中、遺伝子組換え作物の使用に関する表示が義務化された。これらの検査の社会的要求から、当社においても、GMOの受託検査を行っている。GMOの検出に関しては、大別するとPCR法とELISA法による検査に分けられ、いずれにおいても定性および定量検査がある。さらに、GMOの定量法は、競合的PCRかリアルタイムモニタリングによるPCRに大別される。通常のPCRは指数増殖期の特定のサイクル数において定量しなければならないが、リアルタイムモニタリングによるPCRは指数増殖期に入る直前、いわばPCR産物の検出限界を超えるPCRのサイクル数を用いて定量する点が異なっている。最近、このリアルタイムモニタリングによる定量が注目を浴びている。本講演ではリアルタイムモニタリングを行うことができる装置としてライトサイクラー™システムを紹介するとともに、GMOの定量のHigh Throughput化するのに必要な核酸の自動抽出機としてMagNA Pure LCを紹介する。

#### 【MagNA Pure LCの原理と特徴】

MagNA Pure LCの核酸抽出には磁性体粒子が用いられる。この技術を用いて、MagNA Pure LCでは特別にデザインされたピペットチップ内で全ての操作(サンプルの分取、溶解、磁性体粒子への結合、洗浄、および溶出)を行う。精製過程において遠心やその他、手動の操作は一切含まれない。この機器を使用して植物試料からDNAを抽出する場合にはこの機器にかける前に、前処理が必要となるが、非常に簡単な操作である。MagNA Pure LCの機能として核酸抽出だけでなく、抽出したサンプルの分注も行うことができる。抽出された核酸およびPCR反応液を調製するために必要な全ての試薬を遠心用アダプターまたはライトサイクラーのカローセルにセットしたキャピラリーに、直接分注することが可能である。

#### 【MagNA Pure LCによるDNA抽出】

図1に実際にMagNA Pure LCで抽出したDNAの実験例を示した。大豆原料だけではなく、様々な大豆加工品からも抽出可能である。大豆原材料の場合、収量は20~30µg、260/280は1.8~2.0以内にはいっている。



全てのサンプルで目的のバンド(117 bp)が検出された。

#### 【ライトサイクラー™システムの原理と特徴】

ライトサイクラーはPCRを短時間で終了すると同時に、PCR産物の増幅をリアルタイムかつオンラインでモニターできるように設計されている。温度のサイクルは加熱された空気と室温空気を使い分けることで実現している。形状がない空気は通常のヒートブロックやウォーターバス方式と比較し、温度変化のサイクルプロセスを著しく速めることができ、1秒間に20という極めて速い熱伝導により、2~3秒で設定温度に達する。反応容器であるプラスチック/ガラス合成キャピラリーは容量に対する表面積の比が高いため、空気と反応液の温度平衡はほぼ同時に達成する。キャピラリーのガラス光学的特性は、蛍光測定用キュベットとして最適で、蛍光が持つ特性としてシグナル強度はPCR産物量に比例するため、PCR反応中に同時にモニターすることが可能となる。ライトサイクラーにはキャピラリーの先端から蛍光を測定する光学ユニットがあり、シグナルは光ファイバーと同様な方法でキャピラリーの先端に導かれるため、先端には強い蛍光シグナルが集束することになる。光学ユニットは3種類の検出チャンネルと1種類の光源(発光ダイオード; LED)で構成されている。LEDからの青色光(470 nm)はそれぞれのキャピラリーの先端に焦点が合わされ、それにより蛍光色素が励起される。蛍光色素から放出された蛍光はフィルターとミラーにより、3種類のチャンネル(チャンネル1; 530 nm、チャンネル2; 640 nm、チャンネル3; 710 nm)で検出される波長に分光される。各チャンネルで測定されたシグナルは直ちに画面上にプロットされるため、モニタリングはリアルタイムかつオンラインで実行される。

ライトサイクラーの蛍光フォーマットにはSYBR<sup>®</sup> Green とハイブリダイゼーションプローブがあるが、紙面の都合上SYBR<sup>®</sup> Greenの説明は省略する。ハイブリダイゼーションプローブはPCR産物の検出を配列特異的に行うため、PCR産物の同定において最大の特異性が得られる。ハイブリダイゼーションプローブは2種類の配列特異的なオリゴヌクレオチドを使用する。1種類は3'末端がフルオレセインで標識され、もう一方は5'末端がLCRED 640で標識され、3'末端がプライマーとして動かないように、リン酸化されている。アニーリングで2種類のプローブが1 bpの間隔において、PCR産物にハイブリダイズする。フルオレセインはLEDで励起され、蛍光を放出する。2種類の蛍光色素は近接しているので、この放出されたエネルギーはLCRED 640を励起し、蛍光を放出する。この蛍光(チャンネル2で測定)はアニーリング時に記録されることによりシグナルが検出される。

#### 【ライトサイクラーによる定量】

ライトサイクラーにより、GMOの定量を行い、混入率を算出するには組換え遺伝子を測定するだけではなく、該当する作物が必ず持っている内在性遺伝子(レクチンなど)も測定し、その比から混入率を算出する。また、混入率を算出するGMO作物において必ずしも組換え遺伝子:内在性遺伝子が1:1である保証はなく、この比率がずれている可能性が高い。従って、100%のGMO作物における組換え遺伝子/内在性遺伝子(内標比)を算出しておき、定量を試みる作物の組換え遺伝子/内在性遺伝子をさらにこの内標比で割ることにより、混入率を算出する。図2はMagNA Pure LCにより抽出されたDNAと、段階希釈した組換え遺伝子のスタンダードの増幅の検出を示している。初期濃度に依存して、シグナル強度の上昇は異なるサイクル数で始まっている。対数直線性領域のシグナルがバックグラウンドシグナルと区別できるようなサイクル数を同定することで、サンプル中のターゲットを定量することができる。同様に内在性遺伝子も測定し、前述のように混入率を算出し、良好な結果を得ることができた。

(次ページへ)

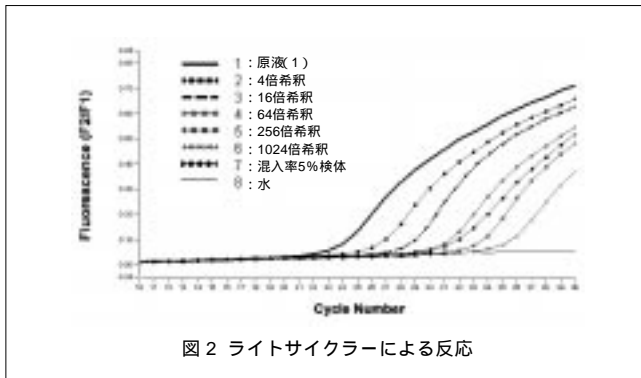


図2 ライトサイクラーによる反応

【おわりに】

GMOの迅速，簡便な定量にはライトサイクラーは非常に有用であり、さらに MagNA Pure LC を用いて DNA を抽出することにより、測定をスピードアップすることができる。今後、GMOの検査においてこれらの機器が繁用されることが望まれる。

お知らせ

平成13年度・酵素法による食品分析研究会講演会

主催：酵素法による食品分析研究会

日時：平成13年9月14日(金)

講演 1 11:00 ~ 12:30

総 13:30 ~ 14:00

ポスターセッション 14:00 ~ 15:00

講演 2 15:00 ~ 16:00

講演 3 16:00 ~ 17:00

懇親会 17:30 ~

会場：東洋大学白山キャンパス 1号館 3階 1305番 教室ほか  
 東京都文京区白山 5-28-20 電話：03-3945-7223  
 交通：都営地下鉄三田線「白山」駅  
 または営団地下鉄南北線「本駒込」駅下車、徒歩約5分

演題：

1. 「食品分野における酵素法の現状と展望」

R-Biopharm社 Stella Lindeke 氏

2. 「遺伝子組換え食品の安全性確保をめぐる国内・外の動向」

食品総合研究所 一色賢司氏

3. 「リアルタイムPCR法を用いたGMCC(遺伝子組換え作物)の検出と定量」

(株)日本遺伝子研究所 酒井栄一氏

ポスターセッション：

- ・HPLC-NAM蛍光法によるCoASHの高感度酵素分析法
- ・残留農薬測定のためのイムノアッセイキットの適用性
- ・アンペロメトリー法によるアルキルフェノールの簡易測定
- ・オルニチンセンサを用いたエビ類の腐敗度計測
- ・電極内蔵型酵素センサを用いた食肉の微生物汚染度測定
- ・酵素固定化フロースルーカーボンフェルト検出器によるグルコースの定量
- ・K値に基づいた原料魚の鮮度管理用バイオサーモメーターの開発
- ・D-アラニンバイオセンサーの実際への応用
- ・酵素活性からみた食鳥肉の鮮度の検討
- ・エチルアミンオキシダーゼの特性評価とその応用
- ・エチルアミンオキシダーゼの固定化とその応用
- ・Arthrobacter sp.KAIT-B-021由来のテアニンヒドロラーゼとその応用
- ・酵素法によるL-テアニン測定法の改良
- ・ヒスタミンオキシダーゼによる魚肉中のヒスタミン計測
- ・酵素法によるヒスチジンとヒスタミンの同時計測とその応用

参加費：会員・学生 無料

協賛学会員 1,000円 その他 2,000円

問い合わせ先：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52-1

(財)日本食品分析センター内

酵素法による食品分析研究会事務局 金谷、織本

(Tel. 03-3469-7131 FAX. 03-3469-7156)

製造元



ロシュ・ダイアグノスティクス社

世界総発売元



バイオフーム社



総輸入・発売元

(株)J.K.インターナショナル

〒160-0022 東京都新宿区新宿2-9-22 SVAX新宿ビル

TEL.03-5362-2907(代) FAX.03-5362-7079

URL:http://www.jki.co.jp E-mail:jki@vesta.ocn.ne.jp