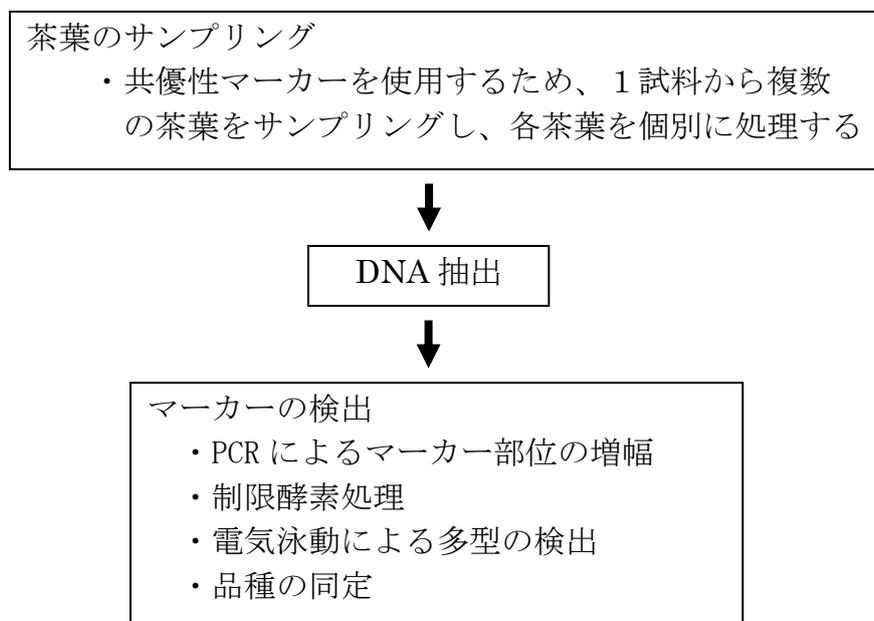


(参考資料 7)

## DNA分析による製茶品種の識別

独立行政法人野菜茶業研究所

### 1 CAPS マーカーを用いた茶品種識別の流れ



### 2 CAPS マーカーを用いた茶品種識別法

#### (1) DNA 抽出

茶葉 1 枚ごとに DNA を抽出する。サンプル間のクロスコンタミネーションに注意する。

DNA 抽出については、様々な市販のキットが出ており (QIAGEN 社 DNeasy Plant Mini Kit、ニッポンジーン社 ISOPLANT II など)、これらをメーカーの推奨するプロトコルに従い使用しても茶葉からの DNA 抽出が可能だが、キットを使用しなくても簡易な CTAB (臭化トリメチルアンモニウム) 法での抽出が可能である。ここでは、CTAB 法による抽出手順を示す。

(必要な試薬)

(試薬)	(最終濃度)
CTAB	2 % (w/v)
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
500 mM EDTA (pH 8.0)	20 mM
NaCl	1.4 M
PVP (Polyvinylpyrrolidone)	1 % (w/v)

- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| • RNaseA 溶液 (試薬)      | (最終濃度)   |
| RNaseA                | 10 mg/ml |
| 1 M Tris-HCl (pH 7.5) | 10 mM    |
| NaCl                  | 15 mM    |
- CIA クロロホルムとイソアミルアルコールを 24:1 の割合で混合
- イソプロピルアルコール
- 70 % (v/v) エタノール
- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| • TE バッファ (試薬)        | (最終濃度) |
| 1 M Tris-HCl (pH 8.0) | 10 mM  |
| 500 mM EDTA (pH 8.0)  | 1 mM   |

(方法) 試料が新鮮葉の場合

- ① 組織 50-100 mg 程度を液体窒素下、乳鉢乳棒などを用いて粉末状にすりつぶす。
- ② うち 30 mg 程度を取り、あらかじめ 1.5 ml マイクロチューブ (以下チューブ) に分注して 65 °C に温めておいた CTAB 液 650  $\mu$ l に加え、1 hr インキュベートし茶葉の細胞を破壊する。
- ③ 等量 (650  $\mu$ l) の CIA を加え、よく転倒混和する。
- ④ 短時間 (遠心機の最大回転数で 1 min) 遠心してクロロホルム層 (下層) と水層 (上層) に分画し、水層 (400  $\mu$ l) を新しいチューブに移す。
- ⑤ 等量のイソプロピルアルコールを加え、転倒混和後④と同様に遠心する。
- ⑥ 上清を捨て、沈殿を 70 % エタノールでリンスした後乾燥させる。
- ⑦ 250-300  $\mu$ l の TE バッファに溶解し、DNA 試料とする。

(方法) 試料が製茶された茶葉の場合

- ① 茶葉 1 枚を 1.5 ml マイクロチューブ (以下チューブ) に取り、650  $\mu$ l の CTAB 液を加え 65°C, 5-10 min インキュベートする。
- ② マイクロチューブ用ホモジナイザーですりつぶし、RNaseA 溶液 2  $\mu$ l を加え、65°C, 1 hr インキュベートし茶葉の細胞を破壊する。

以下新鮮葉の場合の③以降に同じ

サンプル数によるが、おおよそ 1 時間半~2 時間半程度の操作で抽出が完了する。約 5 mg の茶葉から、40-100 ng/ $\mu$ l 程度の DNA が抽出できる (製茶葉の場合)。

## (2) PCR

反応液量は 25  $\mu$ l (もしくはその半量でも可能) とし、その組成は、プライマーを 0.25  $\mu$ M ずつ、dNTP を 200  $\mu$ M、MgCl<sub>2</sub> を 2 mM、1×ExTaq buffer、DNA ポリメラーゼ (TaKaRa ExTaq DNA polymerase) 0.625 U を含み、DNA 溶液は、1 反応あたり 1  $\mu$ l 使用し、滅菌蒸留水で全体の液量を 25  $\mu$ l (もしくは 12.5  $\mu$ l) に合わせる。

PCR プライマーと増幅領域、制限酵素を表 1 に示す。

PCR 反応プログラムは、図 1 に示す通り。

表 1 増幅する領域と増幅用プライマー、制限酵素<sup>1)</sup>

増幅する領域		プライマー(5' → 3')	制限酵素
PAL exon 1	Fw	TCCATCAATCTATACACCTACCTG	<i>Hpa</i> II
	Rv	CCTTCTTTGGTCCTCCTATGTGA	
PAL intron	Fw	CACATAGGAGGACCAAAGAAGG	<i>Dde</i> I
	Rv	GGCAATGTAAGATAGGGGGACT	
PAL exon 2	Fw	AGTCCCCCTATCTTACATTGCC	<i>Taq</i> I
	Rv	ATAGAAGAAACCAAGCCGGAAC	
CHS exon 2	Fw	AAACCCAAATGTGTGTGCCTAC	<i>Bsp</i> HI, <i>Rsa</i> I
	Rv	AGGATAAACAACACACAAGCGC	
DFR intron 3	Fw	CCAGGAACACCAACAACCCGT	<i>Hind</i> III
	Rv	CCATGCTGCTTTCTCTGCCAA	
DFR intron 4+5	Fw	AACATTCCCACCAAGCCTAATC	<i>Hpa</i> II
	Rv	ATGAGAACGACACAACACTGGCAA	

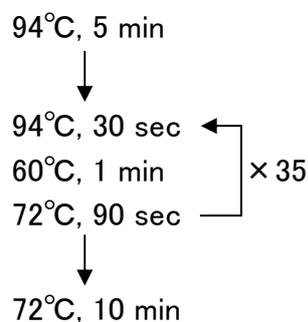


図 1 PCR プログラム

(3) 制限酵素処理

PCR反応液を3  $\mu$ l、10 $\times$ 制限酵素バッファを2  $\mu$ l、制限酵素0.2  $\mu$ l、滅菌蒸留水で液量を20  $\mu$ lに合わせ、制限酵素ごとに至適反応温度で1時間半~2時間インキュベートする。ここで使用する制限酵素では、*Taq* Iのみ反応温度が65  $^{\circ}$ Cで、残りはいずれも37  $^{\circ}$ Cで反応させる。

(4) 電気泳動

制限酵素処理が終了した溶液にローディングバッファを加え、2%アガロースゲルで電気泳動し、緑茶葉1枚ごとの遺伝子型を決定する(図2)。この遺伝子型を、既に明らかにされている茶品種の遺伝子型と比較することで、品種の同定を行う。現在、61の品種(表2)について遺伝子型が明らかにされており(附表)、これらの同定が可能である<sup>2)</sup>。

また、ある品種に他の品種が混入された場合、混入率が7%以上であれば1緑茶試料につき24枚の茶葉について品種を同定することにより、信頼度95%で検出が可能<sup>3)</sup>。

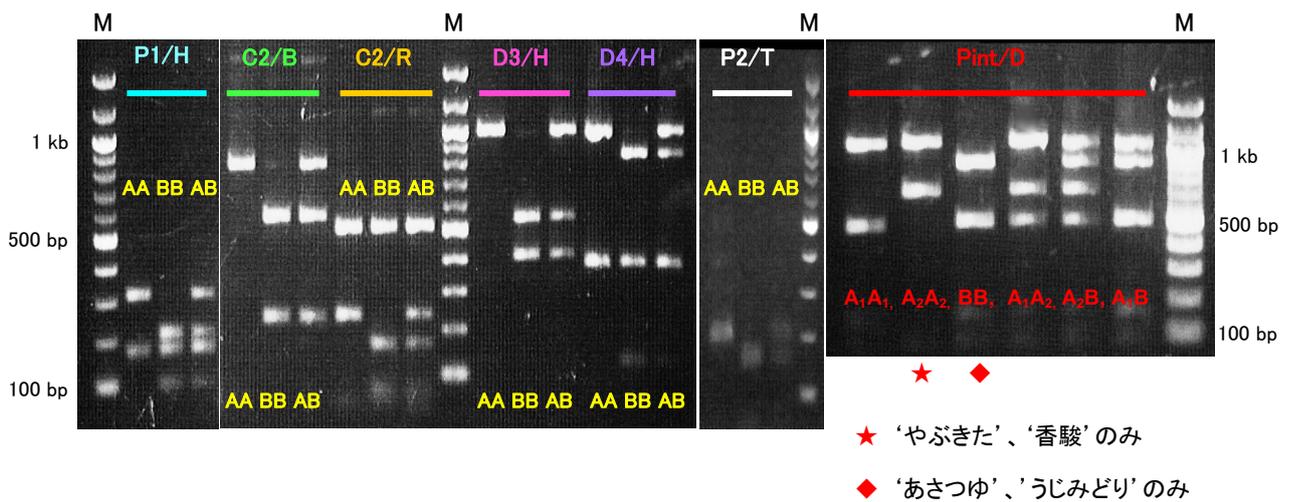


図2 品種識別に使用するマーカーの、各遺伝子型の電気泳動パターン

2% アガロースゲル(臭化エチジウム 0.5  $\mu$ g/ゲル 1mlを含む)で泳動した結果。

P1/H: PALexon1/*Hpa* II 処理 C2/B: CHSexon2/*Bsp*H I 処理 C2/R: CHS/*Rsa* I 処理

D3/H: DFRintron3/*Hind* III 処理 D4/H: DFRintron4+5/*Hpa* II 処理

P2/T: PALexon2/*Taq* I 処理 Pint/D: PALintron/*Dde* I 処理

M: 分子量マーカー(100 bp DNA ladder, NEB)

表 2 識別が可能な茶品種<sup>2)</sup>

識別が可能な品種
あさつゆ ふじかおり ふくみどり ふうしゅん ほうりょく かなやみどり くりたわせ くらさわ まきのはらわせ めいりょく なつみどり おおいわせ おくひかり おくみどり おくむさし おくゆたか りょうふう さえみどり さやまかおり さやまみどり しゅんめい するがわせ つゆひかり とよか やぶきた やえほ やまかい やまとみどり ゆたかみどり いずみ たかちほ たまみどり やまなみ あさぎり あさひ ごこう こまかげ さみどり うじみどり べにふじ べにふうき べにひかり べにほまれ はつもみじ からべに ただにしき Z1 香駿 ほくめい うじひかり ひめみどり みやまかおり さいのみどり そうふう はるもえぎ みなみかおり さきみどり さわみずか むさしかおり 山の息吹 あさのか

### 3 在来種について

現在、日本国内で栽培されているほとんどの品種が同定可能ではあるが、国内では、優良品種の他にも在来種と呼ばれる茶が栽培されている(図3)。在来種は遺伝的に非常に多様性に富むため、全ての遺伝子型を調査することは不可能であり、したがって、在来種がブレンドされた市販の緑茶を分析した場合、どの品種にも当てはまらないサンプルが出てくる可能性がある。

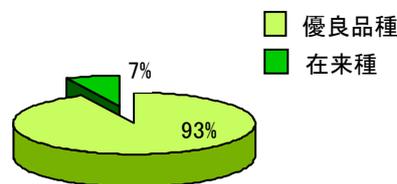


図3 茶の優良品種化率

(参考文献)

- 1) Kaundun, S.S. and Matsumoto S. (2003) Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *Theor. Appl. Genet.*, **106**, 375-383
- 2) Kaundun, S.S. and Matsumoto S. (2003) Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *J. Agr. Food Chem.*, **51**, 1765-1770
- 3) Ujihara, T., Matsumoto S., Hayashi, N. and Kohata K. (2005) Cultivar identification and analysis of the blended ratio of green tea production on the market using DNA markers. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 43-45



付表 識別可能な茶品種の遺伝子型<sup>2)</sup>

品種	マーカー						
	P1/H	Pint/D	P2/T	C2/B	C2/R	D3/H	D4/H
あさつゆ	AA	BB	AB	AA	BB	AA	AA
ふじかおり	BB	A1A2	BB	BB	AB	AB	BB
ふくみどり	BB	A2B	BB	AB	BB	AB	AB
ふうしゅん	AB	A1A2	AB	AB	AB	AA	AA
ほうりよく	BB	A1A1	AB	BB	AB	AA	AA
かなやみどり	AB	A1A2	AB	AA	BB	AB	AB
くりたわせ	AA	A1A2	AA	AB	AB	AA	AB
くらすわ	AB	A1A2	BB	AA	BB	BB	BB
まきのはらわせ	AA	A1A1	AA	AA	BB	AA	AA
めいりよく	AA	A1A2	AB	AB	AB	AB	AB
なつみどり	AA	A2B	BB	AB	AB	AA	AB
おおいわせ	BB	A1A2	AB	AB	BB	AB	BB
おくひかり	BB	A1A2	AB	AB	AB	AB	BB
おくみどり	BB	A1A2	BB	BB	AA	AB	AB
おくむさし	BB	A1B	BB	BB	AB	AA	AB
おくゆたか	BB	A2B	AB	AA	BB	AA	AA
りょうふう	AB	A1A2	AB	BB	AB	AB	AB
さえみどり	AB	A2B	BB	AA	BB	AB	AB
さやまかおり	BB	A1A2	BB	BB	AB	BB	BB
さやまみどり	AB	A1A1	AB	BB	AA	AB	AB
しゅんめい	AA	A1A1	AB	AA	BB	AB	AB
するがわせ	BB	A1A2	BB	AB	BB	AB	BB
つゆひかり	AA	A1B	AA	AA	BB	AA	AA
とよか	AB	A1A2	BB	AB	AB	AB	AB
やぶきた	AB	A2A2	BB	AB	AB	BB	BB
やえほ	AB	A1A1	AA	BB	BB	AA	AB
やまかい	AB	A1A2	AB	AB	AB	AB	BB
やまとみどり	BB	A1B	BB	BB	AB	AB	BB
ゆたかみどり	AB	A1B	AB	AB	BB	AB	AB
いずみ	AB	A1B	BB	BB	AB	AB	AB
たかちほ	AB	A2B	AB	AB	BB	AB	AB
たまみどり	AA	A1A2	AA	AA	BB	AB	BB
やまなみ	AB	A1A2	AB	BB	AA	AA	AA
あさぎり	AA	A1A2	BB	AB	AB	AA	AB
あさひ	AA	A1B	AA	AA	BB	BB	BB
ごこう	AB	A1B	AA	AA	BB	AB	AB
こまかげ	AA	A1A1	AA	AB	BB	AB	BB
さみどり	AA	A1A1	AA	AB	AB	AB	BB
うじみどり	AA	BB	AB	AB	AB	AB	AB
べにふじ	AB	A1B	AB	BB	BB	AB	BB
べにふうき	BB	A1A1	BB	BB	BB	BB	BB
べにひかり	BB	A1A1	BB	BB	AA	AA	AB
べにほまれ	BB	A1A1	AB	BB	BB	AB	BB
はつもみじ	BB	A1A1	AB	AB	AB	AA	AB
からべに	AB	A1A2	AB	AB	AB	AB	AB
ただにしき	AB	A1A1	AB	BB	AA	AA	AA
Z1	AA	A1A1	AA	AB	AB	AA	AB

品種	マーカー						
	P1/H	Pint/D	P2/T	C2/B	C2/R	D3/H	D4/H
香駿	BB	A2A2	BB	AA	BB	BB	BB
ほくめい	BB	A1A1	BB	AB	AB	AA	AA
うじひかり	BB	A1B	AA	AA	BB	AA	AA
ひめみどり	AA	A1B	AA	AA	BB	AA	AB
みやまかおり	AA	A1B	AA	BB	AB	BB	AB
さいのみどり	BB	A1A2	AB	AB	AA	BB	BB
そうふう	AB	A1A2	AB	BB	AA	BB	BB
はるもえぎ	AA	A1A2	AB	AB	BB	AB	BB
みなみかおり	BB	A1A2	BB	AB	AB	AB	BB
さきみどり	AB	A1A2	AB	BB	AB	AB	BB
さわみずか	AA	A1A2	AB	AA	BB	AB	AB
むさしかおり	BB	A1A2	BB	AB	AB	AB	AB
山の息吹	AB	A1A2	BB	BB	AB	AB	AB
あさのか	BB	A2B	AB	AB	BB	AB	BB