

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4102116号
(P4102116)

(45) 発行日 平成20年6月18日 (2008. 6. 18)

(24) 登録日 平成20年3月28日 (2008. 3. 28)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z

G O 1 N 27/447 (2006. 01)

G O 1 N 27/26 3 1 5 Z

G O 1 N 27/26 3 2 5 E

請求項の数 11 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2002-171417 (P2002-171417)
 (22) 出願日 平成14年6月12日 (2002. 6. 12)
 (65) 公開番号 特開2004-16008 (P2004-16008A)
 (43) 公開日 平成16年1月22日 (2004. 1. 22)
 審査請求日 平成17年1月5日 (2005. 1. 5)

(73) 特許権者 591190955
 北海道
 北海道札幌市中央区北3条西6丁目1番地
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行
 (74) 代理人 100092886
 弁理士 村上 清

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豆類の品種判別

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 および配列番号 2 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 3 および配列番号 4 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 5 および配列番号 6 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 7 および配列番号 8 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 9 および配列番号 10 の塩基配列を有する D N A の対、ならびに配列番号 11 および配列番号 12 の塩基配列を有する D N A の対からなるグループより選ばれる D N A の対の少なくとも 1 組からなる豆類の品種判別のための D N A プライマー対。

【請求項 2】

配列番号 1 および配列番号 2 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 3 および配列番号 4 の塩基配列を有する D N A の対、配列番号 5 および配列番号 6 の塩基配列を有する D N A の対からなるグループより選ばれる D N A の対の少なくとも 1 組からなる、白インゲンマメの品種を判別するためのプライマー対。

【請求項 3】

判別する白インゲンマメの品種が、雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピーブーン、および小白芸豆からなるグループより選ばれる請求項 2 に記載のプライマー対。

【請求項 4】

白インゲンマメの品種をその他の豆類から判別するための請求項 2 に記載のプライマー対。

【請求項 5】

10

20

配列番号 7 および配列番号 8 の塩基配列を有する DNA の対、配列番号 9 および配列番号 10 の塩基配列を有する DNA の対、ならびに配列番号 11 および配列番号 12 の塩基配列を有する DNA の対からなるグループより選ばれる DNA の対の少なくとも 1 組からなる、アズキの品種を判別するためのプライマー対。

【請求項 6】

判別するアズキの品種がエリモショウズ、きたのおとめ、およびしゅまりからなるグループより選ばれる請求項 5 に記載のプライマー対。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のアズキの品種をその他のアズキの品種から判別するための請求項 5 または 6 に記載のプライマー対。

【請求項 8】

(1) 品種判別または原料品種の判定を行いたい、豆類または豆類加工品のサンプルから DNA を抽出する工程、

(2) 抽出した DNA に請求項 1 に記載した 1 組以上のプライマー対を加えて、PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行う工程、

(3) PCR で増幅した DNA フラグメントを検出し、増幅断片の有無、断片が存在する場合はその大きさおよび断片のバンドの発色の濃さ (相対比) を調べる工程、

(4) 検出された DNA 断片の大きさおよびそのパターンに応じて豆類の品種を判別する工程、

を含む、豆類の品種判別または豆類加工品の原料品種の判定の方法。

【請求項 9】

サンプルが、豆類の少なくとも 1 粒の種子、小葉または豆類の加工品である、豆類の品種判別または豆類加工品の原料品種の判定のための請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

豆類の加工品が餡、煮豆、甘納豆である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のプライマー対を少なくとも一つ含む豆類の品種判別または豆類加工品の原料品種の判定のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分子生物学的手法を利用して、簡便で精度の高い豆類の品種判別法に使用するための DNA プライマーに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、豆類の品種判別においては、圃場栽培により品種間の特徴の違いに基づいて品種同定が行われてきた。これは豆類の長期にわたる栽培を通じてその成育過程における特徴を追跡するもので、品種の判定に少なくとも約 1 年を要する。

【0003】

一方、豆類の遺伝子多型から、品種を同定する方法は迅速で簡便な判定方法となり得る。近年、PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) による遺伝子増幅法が種々の分野で活用されている。この PCR 法は極微量の DNA を鋳型として、目的 DNA 領域を短時間に数十万倍に増幅する手法で、精度の高い診断法として医学や微生物の分野での利用が進んでいる。作物分野では RAPD (random amplified polymorphic DNA: 増幅 DNA 断片多型) 法によるコメの品種判別法が確立された。DNA 鑑定による品種判別法は、一般に圃場栽培による品種判別法と比較して格段に迅速で明確な判別方法である。

【0004】

RAPD 法では 10 塩基程度のごく短いランダムなプライマーを用いてサンプル DNA を

10

20

30

40

50

鋳型にPCRを行い、比較したい品種のサンプルについてPCR産物に特異断片が生じるプライマーをRAPDマーカースとして選択する。そして複数のRAPDマーカースを用いて、品種ごとに現れるPCR産物中の特異断片の有無を調べ、用いたRAPDマーカースと特異断片の有無のそれぞれの情報を統合してある品種を同定するための情報のパターンを見いだすことで品種同定を行う。ランダムなプライマーからRAPDマーカースを選択するため、同定したい品種のゲノム情報なしに、品種同定を行うことができるという利点がある一方で、10残基程度のごく短いプライマーを用いるため、アニーリング温度が低く、ミスアニーリングによる非特異的な増幅を生じやすいという欠点もある。また、一般にRAPDマーカースを用いたPCRでは判定に必要な特異断片および不必要な断片も含めて、複数のPCR産物が生じるため、再現性にやや難点があり、また判定には熟練が必要である。

10

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、分子生物学的手法を利用した簡便で精度の高い、豆類の品種判別を行うことにある。形状や色などの特徴が大きく異なる豆類を区別することは目視により容易に行えるが、近縁の品種である場合など、外見上の特徴で見分けることが困難である場合には、遺伝子レベルでの多型の解析による品種判別が簡便で精度が高く、有効である。したがって、本発明が解決しようとする課題は、特に、外見上の特徴で見分けることが困難な豆類の品種判別を行うことにある。

【0006】

20

本発明で解決しようとする豆類の品種判別とは、望ましくは白インゲンマメの品種；望ましくは雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、および小白芸豆、ベニバナインゲンマメ；たとえば大白芸豆、ライマメ；たとえば、ベビーライマおよびバタービーン、を非限定的に含む品種を判別することにある。特に望ましくは、上述の白インゲンマメの品種をそれぞれ判別し、そして、その他の豆類との判別を行うことにある。

【0007】

または、本発明で解決しようとする豆類の品種判別とは、望ましくはアズキの品種；たとえばエリモショウズ、きたのおとめ、しゅまり、十育130号（十系494号）、十系486号、十育143号、十育137号、十育138号、十系796号、ベニダイナゴン、カムイダイナゴン、光小豆、早生大粒1号、早生大納言、斑小粒系-1、斑小粒系-2、京都大納言、Acc2402（山梨県産）、Acc259（愛媛県産）、円葉（刈63号）、赤豆（韓国産）、Acc727（韓国産）、Acc934（韓国産）、Acc2288（ブータン産）、Acc2312（ブータン産）、Acc2266（ブータン産）、Acc2114（米国産）Acc2062（米国産）、Acc2113アルゼンチン、Acc2240（Bloodwood）を含み、Acc2565（中国産）、Acc2112（中国産、宝清小豆）、Acc2550（中国産）、および天津小豆、ヤブツルアズキであるAcc2515（石川県産）、ツルアズキであるAcc2498（タイ産）、ヒメツルアズキであるAcc951（韓国産）、およびヒナアズキであるAcc2496（沖縄県産）を非限定的に含む品種の判別を行うことにある。特に望ましくは、上述のアズキの品種のうち、エリモショウズ、きたのおとめ、およびしゅまりをそれぞれ判別し、さらに、上述の3種のアズキと中国品種であるAcc2565（中国産）、Acc2112（中国産、宝清小豆）、Acc2550（中国産）、および天津小豆、との判別を行うことである。

30

40

【0008】

さらに、本発明が解決しようとする課題は上記の豆類の品種判別だけでなく、その加工品の原料となった豆類の品種の判定をも含む。

本発明は、上記の課題を解決することを目的とした、DNAプライマーを設計し、それを用いた豆類およびその加工品の品種判別方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

50

本発明のプライマーはSP01f(配列番号1)、SP01r(配列番号2)、SP02f(配列番号3)、SP02r(配列番号4)、SP03f(配列番号5)、SP03r(配列番号6)、SV01f(配列番号7)、SV01r(配列番号8)、SV02f(配列番号9)、SV02r(配列番号10)、SV03f(配列番号11)、およびSV03r(配列番号12)であり、配列表においてそれぞれの配列番号に示した配列を有する。

【0010】

これらプライマーは後述の実施例に示すように、ランダムな10塩基程度のプライマー群の中から、RAPD(ランダム増幅多型DNA: random amplified polymorphic DNA)マーカーと成り得るプライマーを選択し、選択したRAPDマーカーとなるプライマーを用いたPCRによるPCR産物中の特異断片をクローニングし、塩基配列を決定し、その特異断片の一部を特異的に増幅するプライマーを設計することで得られた。本発明のプライマーは当業者に既知の化学合成法、たとえばホスホル

10

【0011】

本発明の一つの態様では、本発明はSP01f(配列番号1)およびSP01r(配列番号2)をプライマー対SP01として、SP02f(配列番号3)およびSP02r(配列番号4)をプライマー対SP02として、SP03f(配列番号5)およびSP03r(配列番号6)をプライマー対SP03として、SV01f(配列番号7)およびSV01r(配列番号8)をプライマー対SV01として、SV02f(配列番号9)およびSV02r(配列番号10)をプライマー対SV02として、およびSV03f(配列番号11)およびSV03r(配列番号12)をプライマー対SV03としてこれらのプライマー対の少なくとも一つを用いる。

20

【0012】

本発明のプライマーを用いて豆類の品種のうち、白インゲンマメの品種;雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、および小白芸豆、を判別することができ、および、上記白インゲンマメの品種と、ベニバナインゲンマメ;たとえば大白芸豆、およびライマメ;たとえば、ベビーライマおよびバタービーン、とを判別することができる。また、本発明のプライマーを用いて豆類の品種のうち、アズキの品種;エリモショウズ、きたのおとめ、および、しゅまり、の品種を判別し、および、この3種のアズキと中国産の品種、特にAcc2565(中国産)、Acc2112(中国産、宝清小豆)、Acc2550(中国産)、および天津小豆(中国産)とを判別することができる。

30

【0013】

本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の方法は、次の工程からなる:

- (i) 品種判別または原料品種の判定を行いたい、豆類または豆類加工品のサンプルからDNAを抽出する工程、
- (ii) 抽出したDNAに本発明のプライマー対を少なくとも1組の、望ましくは2組以上のプライマー対を加えてPCR(polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応)を行う工程、
- (iii) PCRで増幅したDNAフラグメントを検出し、増幅断片の有無、断片が存在する場合はその大きさおよび断片のバンドの発色の濃さ(相対比)を調べる工程、
- (iv) 検出されたDNA断片の大きさおよびそのパターンに応じて豆類の品種を判別する工程、を含む。

40

【0014】

本発明のプライマーを用いて品種を判別する豆類サンプルにはたとえば種子、小葉、および豆類からの加工品(例えば餡)が含まれるが、これらには限定されない。

【0015】

また、本発明のプライマーは豆類の品種判別のためのキットとして提供することもできる。

本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程におけるDNAの抽出は当業者に既知

50

の方法で行うことができる。たとえば、CTAB法(M. Reichardt and S. Rogers, Current Protocols in Molecular Biology 2.3.3-2.3.7、John Wiley & Sons, Inc., 1994)でDNAの抽出を行ってもよい。CTAB法による豆類のDNAの抽出では、抽出用のサンプルとして豆類の小葉または子実を用いてもよく、望ましくは豆類の小葉0.1g-0.5g(生鮮重)または子実0.01g-0.3gを用いてもよく、さらに望ましくは豆類の小葉0.3g(生鮮重)または子実0.05gを用いてもよい。破砕したサンプルに対して2xCTAB液(2%CTAB(Hexadecyltrimethylammonium bromide)、0.1M Tris-HCl pH8.0、20mM EDTA、1.4M NaCl、1%PVP)およびメルカプトエタノールを、たとえば、2xCTAB液0.5ml~2ml、メルカプトエタノール0.01ml~0.1ml、望ましくは2xCTAB液約0.8ml、メルカプトエタノール約0.02mlを加え、さらに磨砕する。適当な大きさのマイクロテストチューブに移し、約55~65℃で約20~60分間、望ましくは約55℃で約30分間加温した後、クロロホルム/イソアミルアルコール(約24:1)を等量、望ましくは0.8ml加え、20分~60分間、望ましくは約30分間振とうする。その後、テストチューブを遠心し、たとえば12000rpm~14000rpmで5~20分間、望ましくは約12000rpm(10000xg)で約15分間遠心し、上清を新しいテストチューブに移し、10%CTAB(10%CTAB、0.7M NaCl)および沈殿バッファー(1%CTAB、50mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA)を、たとえば10%CTAB 0.1倍量および沈殿バッファー1~1.5倍量、望ましくは10%CTAB約0.08mlおよび沈殿バッファー約1.2mlを加え、軽く攪拌する。テストチューブを遠心し、たとえば12000rpm~14000rpmで5分~20分間、望ましくは約12000rpm(10000xg)で約15分間遠心し、上清を捨て、RNase Aを加えた1M NaCl-TEバッファー(1M NaCl、10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA)をたとえば、0.2ml~1ml、望ましくは約0.5mlをテストチューブに加える。テストチューブを約50~65℃で約20~60分間、望ましくは55℃で30分間加温した後、イソプロパノールをたとえば0.5~2倍量、望ましくは約1ml加え、軽く攪拌し、たとえば12000rpm~14000rpmで5分~20分間、望ましくは約12000rpm(10000xg)で約15分間遠心する。上清を捨て、新たに70%エタノールを0.3ml~1ml、望ましくは約0.5ml加え、テストチューブの内壁を軽く洗い、たとえば12000rpm~14000rpmで5分~10分間、約12000rpm(10000xg)で約5分間遠心する。沈殿物(DNA)が落ちないようにエタノールを捨て、テストチューブを風乾する。エタノールが完全に乾燥したら、蒸留水を0.05ml~0.5ml、望ましくは約0.1ml加え、DNAを溶解する。DNA溶液の一部を希釈し、分光高度計で濃度を測定する。DNAを約30ng/μlの濃度にしてPCRの鋳型DNAとする。

【0016】

本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程におけるDNAの抽出はSDS-フェノール法(W. M. Strauss, Current Protocols in Molecular Biology 2.3.1-2.3.3、John Wiley & Sons, Inc., 1998)で行ってもよい。SDS-フェノール法による豆類のDNAの抽出では、抽出用のサンプルとして豆類の加工品、たとえば餡、煮豆、甘納豆を用いてもよい。サンプルはたとえば0.1g~0.5g、望ましくは約0.3gを用いてもよい。抽出操作は、サンプルに抽出液(0.2M Tris-HCl pH7.5、0.25M NaCl、25mM EDTA、0.5%SDS)をたとえば0.5ml~2ml、望ましくは1mlを加え攪拌し、55~65℃で20分~60分間、望ましくは約55℃で約30分間加温する。12000rpm~14000rpmで5分~20分間、望ましくは約14000rpm(15000xg)で約5分間遠心し、上清を新しいテストチューブに移す。テストチューブに約等量のフェノール/クロロホルム(TE-バ

10

20

30

40

50

ツファー飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=約25:24:1(v/v/v))を加え、振とうする。テストチューブを、12000rpm~14000rpmで5分~20分間、望ましくは約14000rpm(15000xg)で約5分間遠心し、上清を新しいテストチューブに移す。上清に0.5~2倍量、望ましくは約0.6~0.7倍量のイソプロパノールを加え、攪拌した後、12000rpm~14000rpmで5分~20分間、望ましくは約14000rpm(15000xg)で約5分間遠心する。イソプロパノールを捨てて沈殿物を風乾し、抽出DNAを得る。抽出したDNAは精製し、精製後のDNA溶液をPCRの鋳型DNAとする。

【0017】

本発明の一つの態様において、本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程におけるPCRは以下に示すように行ってよい。本発明のプライマーは一組以上のプライマー対を用いてもよく、反応液中のプライマー濃度はそれぞれ0.1μM~2μM、望ましくは約0.15μMである。反応液組成は、たとえば、10mM Tris-HCl (pH 9.0)、580mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTP、ならびに反応液量15μlあたり0.5~1ユニット望ましくは約0.75ユニットの合成酵素(たとえばTaqポリメラーゼ)である。PCRの温度サイクルは、約94℃;約2分の後、約94℃;約30秒、約55℃;約30秒、約72℃;約30秒を30回~45回繰り返し、望ましくは約35回繰り返した後、約72℃;約5分を付加して行ってもよい。または、PCRの温度サイクルは、94℃;15分の後、94℃;30秒、55℃;30秒、72℃;1分を繰り返し、望ましくは45回繰り返した後、72℃;5分を付加して行ってもよい。

【0018】

本発明の一つの態様において、本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程におけるPCRで増幅したDNAフラグメントの検出はゲル電気泳動により行ってよい。ゲル電気泳動は、アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで行ってもよく、アガロースゲルは1%~2%、望ましくは約1.5%アガロースゲルで行ってもよい。染色剤、たとえばエチジウムブロマイドまたはSYBR Green I(和光純薬)、特に望ましくはSYBR Green Iで染色した後、UV照射下で増幅断片の有無、断片が存在する場合はその大きさおよび断片のバンドの発色の濃さ(相対比)を確認する。UV照射下で写真撮影により記録してもよい。得られた写真を画像データとしてスキャンし記録してもよい。または、UV照射下でゲル中のバンドの状態を画像として直接スキャンして画像データとして記録してもよい。断片の有無および断片の大きさは目視により確認する。断片のバンドの発色の濃さ(相対比)は、目視で確認してもよく、または、イメージ解析ソフトウェア等を用いてほぼ定量的に解析してもよい。

【0019】

本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程における、検出されたDNAの大きさ、および、用いたプライマーとその検出されたDNA断片の有無の情報を統合して、ある品種を同定するための情報のパターンを見いだすことで、それに応じて白インゲンマメ類の品種を判別する工程は、以下のように行うことができる:

(i) プライマー対SP01(配列番号1および2)を白インゲンマメ(たとえば雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、あるいは小白芸豆)、ベニバナインゲン(たとえば大白芸豆)、およびライマメ(たとえば、ベビーライマあるいはバタービーン)についてPCRに供試すると、雪手亡および姫手亡にのみ286塩基対の増幅断片が生じる(表1)。したがって、プライマー対SP01を含むプライマー対を供試した際に約290塩基対の増幅断片を確認したときは、その豆の品種は雪手亡または姫手亡である。

【0020】

(ii) プライマー対SP02(配列番号3および4)を白インゲンマメ(たとえば雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、あるいは小白芸豆)、ベニバナインゲン(たとえば大白芸豆)、およびライマメ(たとえば、ベビーライマあるいはバター

10

20

30

40

50

ピーン)についてPCRに供試すると、雪手亡および白小芸豆に389塩基対、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、およびピーピンに564塩基対の増幅断片が生じる(表1)。また、ピーピンおよびグレートノーザンには約800塩基対の増幅断片も生じる。したがって、プライマー対SP02を含むプライマー対を供試した際に約390塩基対の増幅断片を確認したときは、その豆の品種は雪手亡または白小芸豆であり、約560塩基対の増幅断片を一つ確認したときはその豆の品種は姫手亡または銀手亡であり、約560塩基対および約800塩基対のバンドを二つ確認したときはその豆の品種はピーピンまたはグレートノーザンである。

【0021】

(iii) プライマー対SP03(配列番号5および6)を白インゲンマメ(たとえば雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピーピン、あるいは小白芸豆)、ペニバナインゲン(たとえば大白芸豆)、およびライマメ(たとえば、ベビーライマあるいはバターピーン)についてPCRに供試すると、雪手亡、姫手亡、およびピーピンに約450塩基対の増幅断片が生じる(表1)。したがって、プライマー対SP03を含むプライマー対を供試した際に約450塩基対の増幅断片を確認したときはその豆の品種は雪手亡、姫手亡またはピーピンのいずれかである。

【0022】

(iv) 一つのプライマー対を供試するだけでは、品種の判別が達成できない場合は、同一のサンプルに複数のプライマー対を逐次、または同時に導入してPCRを行う。そして、あるプライマー対に対して得られる増幅断片の有無を解析し、複数のプライマーにより得られた増幅断片の組み合わせから作製できるパターンに基づいて品種判別を行うことができる。

【0023】

たとえば、この例は本発明を限定するものではないが、ある豆類のDNAサンプルについてプライマー対SP01(配列番号1および2)およびSP02(配列番号3および4)を同時に用いて、約290塩基対のバンドおよび約390塩基対のバンドが生じた場合を例にして考える。約290塩基対のバンドはプライマー対SP01による増幅断片であるので、このサンプルは雪手亡または姫手亡の可能性がある。また、約390塩基対のバンドはプライマー対SP02による増幅断片であるので、このサンプルは雪手亡または小白芸豆の可能性がある。したがって、この二つの条件を満たす雪手亡がこのサンプルの品種であることが判別できる。

【0024】

(v) 豆の加工品のように、複数の品種の豆が混合されている可能性があるサンプルの原料の各品種の同定を行う場合は、PCR産物の有無およびその大きさだけでなく、検出されたバンドの発色の濃さに基づいて行うことができる。

【0025】

たとえば、この例は本発明を限定するものではないが、ある加工品のDNAサンプルについてプライマー対SP01(配列番号1および2)およびSP02(配列番号3および4)を同時に用いて、約290塩基対のもっとも濃いバンド、約390塩基対の次いで濃いバンド、および約560塩基対のもっとも薄いバンドが得られた場合を例にして考える。約290塩基対のバンドはプライマー対SP01により増幅された断片であるので、該サンプルは雪手亡あるいは、姫手亡を含む。また、約390塩基対のバンドはプライマー対SV02により雪手亡由来のDNAが増幅された断片であるので、該サンプルは雪手亡を含む。さらに、約560塩基対のバンドはプライマー対SP02により姫手亡由来のDNAが増幅された断片であるので、該サンプルは姫手亡を含む。また、約390塩基対のバンドと約560塩基対のバンドを比較すると、約390塩基対のバンドの方が濃く発色しているので、該サンプルは雪手亡が主原料であり、姫手亡も原料として含まれていると判別できる。

【0026】

【表1】

10

20

30

40

50

表 1.

プライマー対SP01, SP02又はSP03による白インゲンマメの品種判別

品種・銘柄名	SP01 290bp	390bp	SP02 560bp	800bp	SP03 450bp
雪手亡	+	+	+	+	+
姫手亡	+	+	+	+	+
銀手亡	+	+	+	+	+
グレートノーザン	+	+	+	+	+
ピービー	+	+	+	+	+
小白芸豆	+	+	+	+	+
大白芸豆	+	+	+	+	+
ベビーライマ	+	+	+	+	+
バタービー	+	+	+	+	+

【0027】

本発明のプライマーを用いた豆類の品種判別の工程における、検出されたDNAの大きさ、および、用いたプライマーとその検出されたDNA断片の有無の情報を統合してある品種を同定するための情報のパターンを見いだすことで、それに応じてアズキ類の品種を判別する工程は、以下のように行うことができる：

(i) プライマー対SV01(配列番号7および8)をアズキ(たとえば、エリモショウズ、きたのおとめ、しゅまり、Acc2565(中国産)、Acc2112(中国産、宝清小豆)、Acc2550(中国産)、または天津小豆)についてPCRに供試すると、きたのおとめ、Acc2565(中国産)、Acc2112(中国産、宝清小豆)、Ac

10

20

30

40

50

c 2 5 5 0 (中国産)、および天津小豆について5 6 0塩基対の増幅断片が生じる(表2)。したがって、プライマーS V 0 1を含むプライマー対を供試した際に約5 5 0塩基対の増幅断片を確認したときはそのアズキの品種はきたのおとめ、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、A c c 2 5 5 0 (中国産)、または天津小豆のいずれかである。

【0 0 2 8】

(i i) プライマー対S V 0 2 (配列番号9および1 0) をアズキ(たとえば、エリモショウズ、きたのおとめ、しゅまり、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、A c c 2 5 5 0 (中国産)、または天津小豆) についてP C Rに供試すると、エリモショウズおよびきたのおとめについて4 2 9塩基対の増幅断片が生じる(表2)。したがって、プライマー対S V 0 2を含むプライマー対を供試した際に約4 3 0塩基対の増幅断片を確認したときはそのアズキの品種はエリモショウズまたはきたのおとめのいずれかである。

10

【0 0 2 9】

(i i i) プライマー対S V 0 3 (配列番号1 1および1 2) をアズキ(たとえば、エリモショウズ、きたのおとめ、しゅまり、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、A c c 2 5 5 0 (中国産)、または天津小豆) についてP C Rに供試すると、きたのおとめ、しゅまり、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、および天津小豆について3 4 3塩基対の増幅断片が生じる(表2)。したがって、プライマー対S V 0 3を含むプライマー対を供試した際に約3 4 0塩基対の増幅断片を確認したときはそのアズキの品種はきたのおとめ、しゅまり、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、または天津小豆である。

20

【0 0 3 0】

(i v) 一つのプライマー対を供試するだけでは、品種の判別が達成できない場合は、同一のサンプルに複数のプライマー対を逐次、または同時に導入してP C Rを行う。そして、あるプライマー対に対して得られる増幅断片の有無を解析し、複数のプライマーにより得られた増幅断片の組み合わせから作製できるパターンに基づいて品種判別を行うことができる。

【0 0 3 1】

たとえば、この例は本発明を限定するものではないが、ある豆類のD N Aサンプルについてプライマー対S V 0 1 (配列番号7および8) およびS V 0 2 (配列番号9および1 0) を同時に用いて、約5 5 0塩基対のバンドおよび約4 3 0塩基対のバンドが生じた場合を例にして考える。約5 5 0塩基対のバンドはプライマー対S V 0 1による増幅断片であるので、このサンプルはきたのおとめ、A c c 2 5 6 5、A c c 2 1 1 2 (宝清小豆)、A c c 2 5 5 0または天津小豆の可能性がある。また、約4 3 0塩基対のバンドはプライマー対S V 0 2による増幅断片であるので、このサンプルはエリモショウズ、または、きたのおとめの可能性がある。したがって、この二つの条件を満たすきたのおとめがこのサンプルの品種であることが判別できる。

30

【0 0 3 2】

(v) 豆の加工品のように、複数の品種の豆が混合されている可能性があるサンプルの原料の各品種の同定を行う場合は、P C R産物の有無およびその大きさだけでなく、検出されたバンドの発色の濃さに基づいて行うことができる。たとえば、この例は本発明を限定するものではないが、ある加工品のD N Aサンプルについてプライマー対S V 0 1 (配列番号7および8) およびS V 0 2 (配列番号9および1 0) を同時に用いて、約5 5 0塩基対のもっとも濃いバンド、および約4 3 0塩基対の薄いバンドが得られた場合を例にして考える。約5 5 0塩基対のバンドはプライマー対S V 0 1により増幅された断片であるので、該サンプルはきたのおとめ、A c c 2 5 6 5 (中国産)、A c c 2 1 1 2 (中国産、宝清小豆)、A c c 2 5 5 0 (中国産)、または天津小豆を含む。また、約4 3 0塩基対のバンドはプライマー対S V 0 2により増幅された断片であるので、該サンプルはエリモショウズまたはきたのおとめを含む。さらに、約5 5 0塩基対のバンドと約4 3 0塩基

40

50

対のバンドを比較すると、約 430 塩基対のバンドの方が濃く発色しているので、該サンプルはエリモショウズが主原料であると判別できる。

【0033】

【表2】

表2. プライマー対 SV01、SV02、または SV03 によるアズキの品種判別

品種名または整理番号（導入先）		SV01 550bp	SV02 430bp	SV03 340bp
エリモショウズ		—	+	—
きたのおとめ		+	+	+
しゅまり		—	—	+
Acc2565	中国	+	—	+
Acc2112（宝清小豆）	中国	+	—	+
Acc2550	中国	+	—	—
天津小豆A		+	—	+
天津小豆B		+	—	+

10

【0034】

20

【発明の効果】

本発明のプライマーを用いて試験する豆類のDNAのPCRによる増幅を行い、試験する豆類に特異的な増幅断片の生じるパターンに基づいて、簡便で精度の高い豆類の品種判別を行うことができる。また、本発明のプライマーは目的の断片を特異的に増幅し、その他のバンドを増幅することはないので、一度のPCRに2種以上のプライマー対を導入するマルチプレックスPCRにも適用することができる。このことは、試験時間の短縮に貢献する。さらに、本発明のプライマーはゲノム中の比較的短い、1000塩基対以下の断片を特異的に増幅するため、ゲノムが切断されているような加工品に対しても、特異的な断片を増幅することができ、したがって、豆類あるいはその加工品のどちらにも適用できる方法を提供できる。

30

【0035】

以下の実施例は本発明を実施するに当たっての参考にするための具体例であり、本発明を限定するものではない。

【0036】

【実施例】

実施例1：白インゲンマメ品種判別用RAPDマーカーの選抜。

白インゲンマメの品種のうち、雪手亡、姫手亡および銀手亡の小葉0.3g（生鮮重）または子実0.05g（直径2.5mmのドリルで試料を削りだした）から、CTAB法によりDNAを抽出した。CTAB法による抽出はほぼ以下に行った。豆類の小葉または子実を乳鉢で磨砕し、2×CTAB液（2%CTAB（Hexadecyltrimethylammonium bromide）、0.1M Tris-HCl pH 8.0、20mM EDTA、1.4M NaCl、1%PVP）0.8ml、およびメルカプトエタノール0.02mlを加え、さらに磨砕した。2.2mlのマイクロテストチューブに移し、55℃で30分加温した後、クロロホルム/イソアミルアルコール（24：1）を0.8ml加え、30分間振とうした。その後、テストチューブを12000rpm（10000×g）で15分間遠心し、上清を新しいテストチューブに移し、10%CTAB（10%CTAB、0.7M NaCl）を0.08mlと沈殿バッファー（1%CTAB、50mM Tris-HCl pH 8.0、10mM EDTA）1.2mlを加え、軽く攪拌した。テストチューブを12000rpm（10000×g）で15分間遠心し、沈殿物が流れ落ちないように上清を捨て、RNase Aを加えた1M

40

50

NaCl - TEバッファー (1M NaCl、10mM Tris - HCl pH 8.0、1mM EDTA) を0.5mlテストチューブに加えた。テストチューブを55℃で30分間加温した後、1mlのイソプロパノールを加え、軽く攪拌し、12000rpm (10000×g) で15分間遠心した。沈殿物が落ちないように上清を捨て、新たに0.5mlの70%エタノールを加え、テストチューブの内壁を軽く洗い、12000rpm (10000×g) で5分間遠心した。沈殿物 (DNA) が流れ落ちないようにエタノールを捨て、テストチューブを風乾した。エタノールが完全に乾燥したら、0.1mlの蒸留水を加え、DNAを溶解した。DNA溶液の一部を希釈し、分光光度計で濃度を測定した。DNAを30ng/μlの濃度にして続くPCRの鋳型DNAサンプルとした。

【0037】

この鋳型DNAサンプルについて、ubcプライマー (set # 1 - 7; プリティッシュコロンビア大学NAPSユニット (カナダ) より購入) 700種を供試してPCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行った。反応液量は15μlとし、鋳型DNAは30ng (1μl) を、プライマー濃度は各0.2μMとした。合成酵素はAmpliTaq Gold (アプライドバイオシステム社) を0.5unitsを用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が10mM Tris - HCl (pH 9.0)、50mM KCl、0.1% Triton X - 100、2mM MgCl₂、0.2mM 各dNTPsとなるように調製した。温度制御にはGene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステム社) のサーマルサイクラーを用い、95℃; 7分の後、94℃; 1分、36℃; 1分、72℃; 2分のサイクルを45回繰り返す、最後に72℃; 7分を付加した温度サイクルで反応を行った。

【0038】

PCR産物は4μlをTAE (0.04M Tris - acetate、1mM EDTA、pH 8.0) バッファー中で1.5%アガロースゲルを用い、100Vで約20分間電気泳動した。電気泳動後のゲルをSYBR Green I (和光純薬) で染色後、UV照射下で写真撮影し、多型断片の有無および断片が存在する場合はその大きさを確認した。

【0039】

供試した700種のプライマーのうち、ubc105 (1000bp)、ubc157 (500bp)、ubc218 (1500bp)、ubc245 (500bp)、ubc276 (1300bp)、およびubc289 (1900bp)、の6種のプライマーは雪手亡、姫手亡と銀手亡の間に多型が生じた (括弧内は多型が生じる断片の大きさ) のでこれらを選抜し、ubc355 (1200bp) およびubc375 (1200bp) の2種のプライマーは雪手亡と姫手亡、銀手亡の間に多型が生じた (括弧内は多型が生じる断片の大きさ) ので選抜した (表3)。これら8種の選抜したプライマーをRAPD (Random amplified polymorphic DNA; ランダム増幅多型DNA) マーカーとした。

【0040】

【表3】

10

20

30

40

表3. 手亡品種判別用 RAPD マーカー

プライマー	塩基配列	多型断片 (bp)	雪手亡	姫手亡	銀手亡
ubc105	ctc ggg tgg g (配列番号 13)	1000	+	+	-
ubc157	cgt ggg cag g (配列番号 14)	500	+	+	-
ubc218	ctc agc cca g (配列番号 15)	1500	+	+	-
ubc245	cgc gtg cca g (配列番号 16)	500	+	+	-
ubc276	agg atc aag c (配列番号 17)	1300	+	+	-
ubc289	atc aag ctg c (配列番号 18)	1900	+	+	-
ubc355	gta tgg ggc t (配列番号 19)	1200	+	-	-
ubc375	ccg gac acg a (配列番号 20)	1200	+	-	-

10

20

30

40

【0041】

実施例2：RAPDマーカーによる品種判別および特異プライマーの設計。

実施例1で選抜した8種のRAPDマーカーを用いて白インゲンマメ（雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、および白芸豆）、ペニバナインゲン（大白芸豆）、およびライマメ（ベビーライマおよびバタービーン）由来のDNAについて検定した。鋳型DNAサンプルは実施例1に示したようにCTAB法で抽出し、PCR条件ならびにPCR産物の解析も実施例1に示したように行った。

50

【 0 0 4 2 】

それぞれの品種についてRAPDマーカーによる多型を表4に示した。

【 0 0 4 3 】

【表4】

表4. RAPDマーカーによる白インゲンマメの品種間多型（増幅断片の有無）	
品種・銘柄名	ubc105 1000bp ubc157 500bp ubc218 1500bp ubc245 500bp ubc276 1300bp ubc289 1900bp ubc355 1200bp ubc375 1200bp
インゲンマメ	
雪手亡	+
姫手亡	+
銀手亡	-
グレートノーザン	+
ビービー	+
小白芸豆	-
ベニバナインゲン	
大白芸豆	-
ライマメ	
ベビーライマ	-
バタービー	-

【 0 0 4 4 】

ここで、ubc218(1500bp)、ubc375(1200bp)、およびubc289(1900bp)の3種のマーカーを用いることで白インゲンマメの品種の判別ができることから、これらのマーカーによる多型の特異断片の配列をクローニングし、当業者に既知の方法により配列解析を行った。ubc218(1500bp)、ubc375(1200bp)、およびubc289(1900bp)の特異断片の配列はそれぞれ配

10

20

30

40

50

列番号 21、22、23 に示した。配列の解析の結果から、これらの特異断片の一部の配列を特異的に増幅するプライマーを設計した。

【0045】

雪手亡および姫手亡で増幅される u b c 218 (1500 bp) の特異断片 1548 塩基のうち、97 塩基目から 21 塩基を上流プライマー SP01f (配列番号 1)、382 塩基目までの 21 塩基に相補的な配列を下流プライマー SP01r (配列番号 2) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対 SP01 として利用した。

【0046】

雪手亡で増幅される u b c 375 (1200 bp) の特異断片 1068 塩基のうち、235 塩基目からの 20 塩基を上流プライマー SP02f (配列番号 3)、623 塩基目までの 21 塩基に相補的な配列を下流プライマー SP02r (配列番号 4) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対 SP02 として利用した。

【0047】

雪手亡および姫手亡で増幅される u b c 289 (1900 bp) の特異断片 1850 塩基のうち、778 塩基目からの 19 塩基を上流プライマー SP03f (配列番号 5)、1224 塩基目までの 19 塩基に相補的な配列を下流プライマー SP03r (配列番号 6) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対 SP03 として利用した。

【0048】

実施例 3：PCR による白インゲンマメ (手亡類) の品種判別。

白インゲンマメ類 (雪手亡、姫手亡、銀手亡、小白芸豆、およびピービーン)、ベニバナインゲン (大白芸豆)、および、ライマメ (ベビーライマおよびバタービーン) の小葉 0.3 g (生鮮重) または子実 0.05 g (直径 2.5 mm のドリルで試料を削りだした) から、CTAB 法により DNA を抽出した。CTAB 法による抽出は実施例 1 に示したのと同様に行った。

【0049】

それぞれの DNA サンプルについて、プライマー SP01f (配列番号 1) およびプライマー SP01r (配列番号 2) の対 (SP01)、プライマー SP02f (配列番号 3) およびプライマー SP02r (配列番号 4) の対 (SP02)、またはプライマー SP03f (配列番号 5) およびプライマー SP03r (配列番号 6) の対 (SP03)、をそれぞれ用いて PCR 増幅を行った。

【0050】

反応液量は 15 μ l とし、鋳型 DNA は 30 ng (1 μ l) を、プライマー濃度は上流、下流各 0.15 μ M とした。合成酵素は AmpliTaq Gold (アプライドバイオシステム社) を 0.75 units を用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM 各 dNTPs となるように調製した。温度制御には Gene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステム社) のサーマルサイクラーを用い、94 ; 2 分の後、94 ; 30 秒、55 ; 30 秒、72 ; 1 分のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72 ; 5 分を付加した温度サイクルで反応を行った。

【0051】

PCR 産物は 4 μ l を TAE (0.04 M Tris-酢酸、1 mM EDTA、pH 8.0) バッファー中で 1.5% アガロースゲルを用い、100 V で約 20 分間電気泳動し、SYBR Green I (和光純薬) で染色後、UV 照射下で写真撮影し、増幅断片の有無および断片が存在する場合はその大きさを確認した。

【0052】

PCR 産物の電気泳動による解析の結果を表 1 に示した。SP01 のプライマー対を用いた場合には雪手亡および姫手亡に 286 bp の DNA 断片の増幅が確認でき、一方でその他の豆には増幅断片は現れなかった。SP02 のプライマー対を用いた場合には、雪手亡および小白芸豆に 389 bp、姫手亡、銀手亡、グレートノーザンおよびピービーンに 5

10

20

30

40

50

64bpのDNA断片の増幅が確認でき、グレートノーザンおよびピービーンには約800bpのDNA断片の増幅が確認できた。SP03のプライマー対を用いた場合には雪手亡、姫手亡およびピービーンに約450bpのDNA断片の増幅が確認でき、一方でその他の豆には増幅断片は現れなかった。

【0053】

したがって、SP01およびSP02のプライマー対を併用することにより白インゲンマメの判別ができることが明らかとなった。さらに、SP03のプライマー対を併用するとより精度の高い判別を行うことができる。

【0054】

実施例4：マルチプレックスPCRによる白インゲンマメ品種判別。

10

実施例2に示したプライマー対SP01（配列番号1および2）およびプライマー対SP02（配列番号3および4）を用いて、それぞれのプライマー対を混合して同時にPCR反応を行うマルチプレックスPCRにより一度の反応での白インゲンマメの品種判別を行った。

【0055】

判別に用いた品種は白インゲンマメ類（雪手亡、姫手亡、銀手亡、グレートノーザン、ピービーン、小白芸豆）、ベビーライマ、およびバタービーンであり、DNAの抽出法は上述の実施例1に記載したとおりである。

【0056】

PCRは、2種のプライマー対をPCR反応溶液中に混合させた他は実施例1に示したのと同様に行った。PCR産物は実施例1に記載したように1.5%アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分離し、増幅断片の有無、断片が存在する場合はその大きさおよび断片のバンドの発色の濃さ（相対比）を確認した。

20

【0057】

アガロースゲル電気泳動の結果を図1に示す。雪手亡（レーン1）では、約290bpおよび約390bpに二つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SP01による286bpの増幅断片およびプライマー対SP02による389bpの増幅断片によるもの）。姫手亡（レーン2）では、約290bpおよび約560bpに二つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SP01による286bpの増幅断片およびプライマー対SP02による564bpの増幅断片）。銀手亡（レーン3）では、約560bpに一つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SP02による564bpの増幅断片）。グレートノーザン（レーン4）およびピービーン（レーン5）では、約560bpおよび約800bpに二つの増幅断片のバンドを確認した。小白芸豆（レーン6）では、約390bpに一つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SP02による389bpの増幅断片）。ベビーライマ（レーン7）、バタービーン（レーン8）、およびネガティブコントロール（レーン9）では増幅断片のバンドは確認されなかった。

30

【0058】

したがって、本発明のプライマー2種を用いたマルチプレックスPCRによって白インゲンマメの品種判別が一度のPCR反応で可能となった。特に、雪手亡、姫手亡および銀手亡と他の品種との判別が可能となった。

40

【0059】

実施例5：PCRによる白餡原料の判定。

本発明のプライマー対SP01（配列番号1および2）、SP02（配列番号3および4）、またはSP03（配列番号5および6）の中から一組のプライマー対を一組用いたPCRによる白餡原料の判別を行った。

【0060】

白餡に含まれるDNAは、白餡0.3gを採取し、一般的なSDS-フェノール法により抽出した。抽出操作は具体的には、餡0.3gに抽出液（0.2M Tris-HCl pH7.5、0.25M NaCl、25mM EDTA、0.5% SDS）1mlを加え攪拌し、55℃で30分間加温した。14000rpm（15000×g）で5分間遠

50

心し、上清を新しいテストチューブに移した。テストチューブに等量のフェノール/クロロホルム (TE - バッファー飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 (v/v/v)) を加え、振とうした。テストチューブを、14000 rpm (15000 × g) で5分間遠心し、上清を新しいテストチューブに移した。上清に0.6から0.7倍量のイソプロパノールを加え、攪拌した後、14000 rpm (15000 × g) で5分間遠心した。イソプロパノールを捨てて沈殿物を風乾し、抽出DNAを得た。抽出したDNAはQIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社) を用いて添付のプロトコルに従って精製した。DNAは50 μlの溶出液として得て、このうち1 μlを用いてPCRを行った。

【0061】

反応液量は15 μlとし、鋳型DNAはDNA溶出液1 μlを、一組のプライマーを混合し、プライマー濃度は上流、下流各0.15 μMとした。合成酵素はAmpliTaq Gold (アプライドバイオシステム社) を0.75 unitsを用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM 各dNTPsとなるように調製した。温度制御にはGene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステム社) のサーマルサイクラーを用い、95 ; 15分の後、94 ; 30秒、55 ; 30秒、72 ; 1分のサイクルを45回繰り返し、最後に72 ; 5分を付加した温度サイクルで反応を行った。

【0062】

PCR産物の分子量の解析は実施例3に記載したようにアガロースゲル電気泳動により行った。

実施例6 : マルチプレックスPCRによる白餡原料の判定。

【0063】

本発明のプライマー対SP01 (配列番号1および2)、SP02 (配列番号3および4)、またはSP03 (配列番号5および6) の中から二組以上のプライマー対を用いた、マルチプレックスPCRによる白餡原料の判別を行った。鋳型DNAは実施例3に示したように白餡より抽出し、精製したDNA溶出液を用いた。

【0064】

反応液量は15 μlとし、鋳型DNAはDNA溶出液1 μlを、プライマー対はSP01 (配列番号1および2) およびSP02 (配列番号3および4) を用い、プライマー濃度は上流、下流各0.15 μMとした。合成酵素はQiagen HotStar Taq (キアゲン社) を0.75 unitsを用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM 各dNTPsとなるように調製した。温度制御にはGene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステム社) のサーマルサイクラーを用い、95 ; 15分の後、94 ; 30秒、55 ; 30秒、72 ; 1分のサイクルを45回繰り返し、最後に72 ; 5分を付加した温度サイクルで反応を行った。

【0065】

PCR産物の分子量の解析は実施例1に示したようにアガロースゲル電気泳動により行った。

ここでは、北海道産お菓子A、B、およびCの3種の白餡について試験を行った。その結果、お菓子A、およびBでは約290 bpおよび約560 bpに強い強度のバンドが現れ、約390 bpに相対的に弱いバンドが生じた (図1 : レーン10、および11、表5)。したがって、これらのお菓子の原料は姫手亡主体と判定した。一方でお菓子CではPCR産物は検出されなかったため、原料は手亡類以外の豆であることを判定した。

【0066】

【表5】

10

20

30

40

表5. マルチプレックス PCR による白餡の品種判別 (SP01+SP02)

品種名・製品名	290bp	390bp	560bp	判定
雪手亡	+	+	—	姫手亡主体
姫手亡	+	—	+	
お菓子A	+	—	+	
お菓子B	+	—	+	
お菓子C	—	—	—	雪手亡、姫手亡以外

10

【0067】

実施例7：アズキ品種判別用RAPDマーカーの選抜。

アズキの品種のうち、エリモショウズ、きたのおとめ、しゅまりの小葉0.3g(生鮮重)または子実0.05g(直径2.5mmのドリルで試料を削りだした)から、当業者に既知のCTAB法によりDNAを抽出した。CTAB法による抽出は実施例1に示したように行った。

【0068】

得られた鋳型DNAサンプルについて、ubcプライマー(set #1-8; プリティッシュコロニア大学NAPSユニット(カナダ)より購入)800種を供試してPCR(polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応)を行った。反応条件およびPCR産物の検出は実施例1に示したように行った。

20

【0069】

供試した800種のプライマーのうち、ubc033(700bp)、ubc072(1000bp)、ubc327(2000bp)、ubc468(950bp)、ubc516(700bp)、ubc569(700bp)、ubc777(1400bp)、およびubc791(600bp)の8種のプライマーはアズキの品種間に多型が生じた(括弧内は多型が生じる断片の大きさ)ので選抜した(表6)。これら8種の選抜したプライマーをRAPD(Random amplified polymorphic DNA; ランダム増幅多型DNA)マーカーとした。

30

【0070】

【表6】

表6. アズキ品種判別用 RAPD マーカー

プライマー	塩基配列	多型断片 (bp)	エリモシヨウズ	きたのおとめ	しゅまり
ubc033	cgc gct gga a (配列番号 24)	700	+	+	+
ubc072	gag cac ggg a (配列番号 25)	1000	-	-	-
ubc327	ata cgg cgt c (配列番号 26)	2000	+	-	-
ubc468	acg gaa gcg c (配列番号 27)	950	+	-	-
ubc516	agc gcc gac g (配列番号 28)	700	-	+	-
ubc569	cga att gct g (配列番号 29)	700	-	+	+
ubc777	gga gag gag a (配列番号 30)	1400	+	+	-
ubc791	gtg ggt tgt g (配列番号 31)	600	-	+	-

【0071】

実施例 8 : RAPD マーカーによる品種判別および特異プライマーの設計。

実施例 7 で選抜した 8 種の RAPD マーカーを用いてアズキの品種 ; エリモシヨウズ、きたのおとめ、しゅまり、十育 130 号 (十系 494 号)、十系 486 号、十育 143 号、十育 137 号、十育 138 号、十系 796 号、ベニダイナゴン、カムイダイナゴン、光小豆、早生大粒 1 号、早生大納言、斑小粒系 - 1、斑小粒系 - 2、京都大納言、Acc2402 (山梨県産)、Acc259 (愛媛県産)、円葉 (刈 63 号)、赤豆 (韓国産)、Acc727 (韓国産)、Acc934 (韓国産)、Acc2288 (ブータン産)、Acc2312 (ブータン産)、Acc2266 (ブータン産)、Acc2114 (米国産)、Acc2062 (米国産)、Acc2113 アルゼンチン、Acc2240 (Blood

10

20

30

40

50

wood)を含み、Acc2565(中国産)、Acc2112(宝清小豆)、Acc2550(中国産)、および天津小豆、ヤブツルアズキであるAcc2515(石川県産)、ツルアズキであるAcc2498(タイ産)、ヒメツルアズキであるAcc951(韓国産)、およびヒナアズキであるAcc2496(沖縄県産)由来のDNAについて検定した。鋳型DNAサンプルは実施例1に示したようにCTAB法で抽出し、PCR条件ならびにPCR産物の解析も実施例1に示したように行った。

【0072】

それぞれの品種についてRAPDマーカーによる多型を表7に示した。

【0073】

【表7】

表7. RAPD マーカーによるアズキの品種間多型

品種名または整理番号 (区分)	abc33 700bp	abc72 1000bp	abc327 2000bp	abc468 950bp	abc468 500bp	abc516 700bp	abc569 700bp	abc777 1600bp	abc777 1400bp	abc791 600bp
エリモシヨウズ	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
きたのおとめ	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
しゅまり	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Acc2565 (中国)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acc2112 (宝清小豆)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acc2550 (中国)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
十青 130 号 (十系 494 号)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
十系 486 号	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
十青 143 号	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十青 137 号	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
十青 138 号	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
十系 796 号	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ベニダイナゴン	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
カムイダイナゴン	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
光小豆	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
早生大粒 1 号	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
早生大納言	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
斑小粒系-1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
斑小粒系-2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
京都大納言	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

品種名または整理番号	(区分)	ubc33 700bp	ubc72 1000bp	ubc327 2000bp	ubc468 950bp	ubc468 500bp	ubc468 700bp	ubc516 700bp	ubc569 700bp	ubc777 1600bp	ubc777 1400bp	ubc791 600bp
Acc2402 (山梨)	アズキ	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Acc259 (愛媛)	アズキ	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
円葉 (刈 63 号)	アズキ	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
赤豆 (韓国)	アズキ	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Acc727 (韓国)	アズキ	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Acc934 (韓国)	アズキ	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Acc2288 (ブータン)	アズキ	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Acc2312 (ブータン)	アズキ	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Acc2266 (ブータン)	アズキ	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Acc2114 (米国)	アズキ	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Acc2062 (米国)	アズキ	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Acc2113 (アルゼンチン)	アズキ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Acc2240 (ブラッドウッド)	アズキ	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Acc2515 (石川)	ヤブツルアズキ	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Acc2498 (タイ)	ツルアズキ	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Acc951 (韓国)	ヒメツルアズキ	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Acc2468 (沖縄)	ヒナアズキ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

10

20

30

40

【 0 0 7 5 】

ここで、ubc516 (700bp)、ubc777 (1400bp)、およびubc569 (700bp) の3種のマーカーを用いることでアズキ、特にエリモショウズ、きたのおとめ、およびしゅまりとその他の品種の判別ができることから、これらのマーカーによる多型の特異断片の配列をクローニングし、当業者に既知の方法により配列解析を行った。ubc516 (700bp)、ubc777 (1400bp)、およびubc569 (700bp) の特異断片の配列はそれぞれ配列番号32、配列番号33の649塩基から1902塩基、および配列番号34に示した。配列の解析の結果から、これらの特異断片の一部の配列を特異的に増幅するプライマーを設計した。

50

【0076】

きたのおとめで増幅されるu b c 5 1 6 (7 0 0 b p) の特異断片7 1 4 塩基のうち、1 1 塩基目からの2 2 塩基を上流プライマーS V 0 1 f (配列番号7)、5 8 0 塩基目までの2 1 塩基に相補的な配列を下流プライマーS V 0 1 r (配列番号8) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対S V 0 1 として利用した。

【0077】

エリモショウズおよびきたのおとめで増幅されるu b c 7 7 7 (1 4 0 0 b p) の特異断片1 2 5 4 塩基の内部では、その断片の一部を特異的に増幅するプライマーが得られなかったため、インバースP C R により外側の領域の塩基配列も解読し、2 0 4 0 塩基分の断片を得た(配列番号3 3)。この断片の、6 4 0 塩基目からの1 8 塩基を上流プライマーS V 0 2 f (配列番号9)、1 0 6 8 塩基目までの2 0 塩基に相補的な配列を下流プライマーS V P 0 2 r (配列番号1 0) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対S V 0 2 として利用した。

10

【0078】

きたのおとめおよびしゅまりで増幅されるu b c 5 6 9 (7 0 0 b p) の特異断片8 6 0 塩基のうち、7 塩基目からの2 0 塩基を上流プライマーS V 0 3 f (配列番号1 1)、3 4 9 塩基目までの2 0 塩基に相補的な配列を下流プライマーS V 0 3 r (配列番号1 2) として設計した。上記の二つのプライマーはプライマー対S V 0 3 として利用した。

【0079】

実施例9：P C R によるアズキの品種判別。

20

アズキ(日本産エリモショウズ、日本産きたのおとめ、日本産しゅまり、中国産A c c 2 5 6 5、中国産A c c 2 1 1 2 (宝清小豆)、中国産A c c 2 5 5 0、中国産天津小豆A、および中国産天津小豆B) の小葉0 . 3 g (生鮮重) または子実0 . 0 5 g から、実施例1 に示したように当業者に既知のC T A B 法によりD N A を抽出した。D N A は蒸留水に溶解し、3 0 n g / μ l の濃度にして続くP C R の鋳型D N A サンプルとした。それぞれのD N A サンプルについて、プライマーS V 0 1 f (配列番号7) およびプライマーS V 0 1 r (配列番号8) の対(S V 0 1)、プライマーS V 0 2 f (配列番号9) およびプライマーS V 0 2 r (配列番号1 0) の対(S V 0 2)、またはプライマーS V 0 3 f (配列番号1 1) およびプライマーS V 0 3 r (配列番号1 2) の対(S V 0 3)、をそれぞれ用いてP C R 増幅を行った。

30

【0080】

反応液量は1 5 μ l とし、鋳型D N A は3 0 n g (1 μ l) を、プライマー濃度は上流、下流各0 . 1 5 μ M とした。合成酵素はA m p l i T a q G o l d (アプライドバイオシステム社) を0 . 7 5 u n i t s を用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が1 0 m M T r i s - H C l (p H 9 . 0)、5 0 m M K C l、0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0、1 . 5 m M M g C l₂、0 . 2 m M 各d N T P s となるように調製した。温度制御にはG e n e A m p P C R S y s t e m 9 7 0 0 (アプライドバイオシステム社) のサーマルサイクラーを用い、9 4 ; 2 分の後、9 4 ; 3 0 秒、5 5 ; 3 0 秒、7 2 ; 1 分のサイクルを3 5 回繰り返し、最後に7 2 ; 5 分を付加した温度サイクルで反応を行った。

40

【0081】

P C R 産物は4 μ l をT A E (0 . 0 4 M T r i s - a c e t a t e、1 m M E D T A、p H 8 . 0) バッファー中で1 . 5 % アガロースゲルを用い、1 0 0 V で約2 0 分間電気泳動し、S Y B R G r e e n I (和光純薬) で染色後、U V 照射下で写真撮影し、増幅断片の有無および断片が存在した場合はその大きさを確認した。

【0082】

P C R 産物の電気泳動による解析の結果を表2 に示した。S V 0 1 のプライマー対を用いた場合にはきたのおとめ、A c c 2 5 6 5、A c c 2 1 1 2 (宝清小豆)、A c c 2 5 5 0、天津小豆A、および天津小豆B に5 6 0 b p のD N A 断片の増幅が確認でき、一方でエリモショウズおよびしゅまりには増幅断片は現れなかった。S V 0 2 のプライマー対を

50

用いた場合には、エリモショウズ、きたのおとめ、429bp DNA断片の増幅が確認でき、一方でしゅまり、Acc2565、Acc2112（宝清小豆）、Acc2550、天津小豆A、および天津小豆Bには増幅断片は現れなかった。SV03のプライマー対を用いた場合にはきたのおとめ、しゅまり、Acc2565、Acc2112（宝清小豆）、天津小豆A、および天津小豆Bに343bpのDNA断片の増幅が確認でき、一方でエリモショウズおよびAcc2550は増幅断片は現れなかった。

【0083】

したがって、SV01、SV02、およびSV03のプライマー対を併用することによりアズキの判別ができることが明らかとなった。

実施例10：マルチプレックスPCRによるアズキ品種判別。

10

【0084】

実施例8に示したプライマー対SV01（配列番号7および8）およびプライマー対SV02（配列番号9および10）を用いて、それぞれのプライマー対を混合して同時にPCR反応を行うマルチプレックスPCRにより一度の反応でアズキの品種判別を行った。

【0085】

判別に用いたアズキ品種は日本産エリモショウズ、日本産きたのおとめ、日本産しゅまり、中国産Acc2565、中国産Acc2112（宝清小豆）、中国産Acc2550、中国産天津小豆A、および中国産天津小豆Bであり、DNAの抽出法は上述の実施例5に記載したとおりである。

【0086】

20

PCRは、2種のプライマー対をPCR反応溶液中に混合させた他は実施例5に示したのと同様に行った。PCR産物は実施例3に記載したように1.5%アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分離し、増幅断片の有無、断片が存在する場合はその大きさおよび断片のバンドの発色の濃さ（相対比）を確認する。

【0087】

アガロースゲル電気泳動の結果を図2および表8に示す。エリモショウズ（図2；レーン1）では、約430bpに一つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SV02による429bpの増幅断片によるもの）。きたのおとめ（図2；レーン2）では、約430bpおよび約550bpに二つの増幅断片のバンドを確認した（プライマー対SV02による429bpの増幅断片およびプライマー対SV01による560bpの増幅断片によるもの）。しゅまり（図2；レーン3）では、増幅断片のバンドは検出されなかった。Acc2565、Acc2112（宝清小豆）、Acc2550、天津小豆A、および天津小豆Bの中国産の小豆（図2；レーン4から8）では、約550bpに一つの増幅断片のバンドを確認した（SV01による560bpの増幅断片によるもの）。ネガティブコントロール（図2；レーン9）では増幅断片のバンドは確認されなかった。

30

【0088】

したがって、本発明のプライマー2種を用いたマルチプレックスPCRによってアズキの品種判別、特に日本産と中国産のアズキの判別、および日本産の品種の判別が一度のPCR反応で可能となった。

【0089】

40

【表8】

表8. マルチプレックス PCR によるアズキの判別 (SV01+SV02)

品種名	430bp	550bp
エリモショウズ	+	—
きたのおとめ	+	+
しゅまり	—	—
中国品種	—	+

10

【0090】

実施例11：PCRによる小豆餡原料の判定。

本発明のプライマー対SV01（配列番号7および8）、SV02（配列番号9および10）、またはSV03（配列番号11および12）の中から一組のプライマー対を用いたPCRによる小豆餡原料の判別を行った。

【0091】

小豆餡に含まれるDNAは、小豆餡0.3gを採取し、実施例5に示したようにSDS-フェノール法により抽出し、抽出したDNAはQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン社）を用いて添付のプロトコルに従って精製した。DNAは50 μ lの溶出液として得て、このうち1 μ lを用いてPCRを行った。

20

【0092】

反応液量は15 μ lとし、鋳型DNAはDNA溶出液1 μ lを、一組のプライマーを混合し、プライマー濃度は上流、下流各0.15 μ Mとした。合成酵素はAmpliTaq Gold（アプライドバイオシステム社）を0.75 unitsを用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が10mM Tris-HCl（pH9.0）、50mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTPsとなるように調製した。温度制御にはGene Amp PCR System 9700（アプライドバイオシステム社）のサーマルサイクラーを用い、95 $^{\circ}$ C；15分の後、94 $^{\circ}$ C；30秒、55 $^{\circ}$ C；30秒、72 $^{\circ}$ C；1分のサイクルを45回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C；5分を付加した温度サイクルで反応を行った。

30

【0093】

PCR産物の分子量の解析は実施例6に記載したようにアガロースゲル電気泳動により行った。

実施例12：マルチプレックスPCRによる小豆餡原料の判定。

【0094】

本発明のプライマー対SV01（配列番号7および8）、SV02（配列番号9および10）、またはSV03（配列番号11および12）の中から二組以上のプライマー対を用いた、マルチプレックスPCRによる小豆餡原料の判別を行った。鋳型DNAは実施例11に示したように小豆餡より抽出し、精製したDNA溶出液を用いた。

【0095】

反応液量は15 μ lとし、鋳型DNAはDNA溶出液1 μ lを、プライマー対はSV01（配列番号7および8）およびSV02（配列番号9および10）を用い、プライマー濃度は上流、下流各0.15 μ Mとした。合成酵素はQiagen HotStar Taq（キアゲン社）を0.75 unitsを用い、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が10mM Tris-HCl（pH9.0）、50mM KCl、0.1% Triton X-100、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTPsとなるように調製した。温度制御にはGene Amp PCR System 9700（アプライドバイオシステム社）のサーマルサイクラーを用い、95 $^{\circ}$ C；15分の後、94 $^{\circ}$ C；30秒、55 $^{\circ}$ C；30秒、72 $^{\circ}$ C；1分のサイクルを45回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C；5分を付加した温度サイクルで反応を行った。

40

50

【 0 0 9 6 】

P C R 産物の分子量の解析は実施例 5 に示したようにアガロースゲル電気泳動により行った。

ここでは、北海道産お菓子 D および E の 2 種の小豆餡について試験を行った。その結果、お菓子 D では約 4 3 0 b p に強い強度のバンド、および約 5 5 0 b p に弱い強度のバンドが現れた（図 2；レーン 1 0、表 9）。したがってお菓子 D はエリモショウズ主体であることが判定できた。また、お菓子 E では約 4 3 0 b p および約 5 5 0 b p にバンドが現れた。したがって、お菓子 E の原料はきたのおとめであると判定した。

【 0 0 9 7 】

【表 9】

10

表 9. プライマー対 SV01 および SV02 による小豆餡の品種判別

品種・製品名	SV01 550bp	SV02 430bp	判定
エリモショウズ	—	+	エリモショウズ主体 きたのおとめ
きたのおとめ	+	+	
中国小豆	+	—	
お菓子 D	—	+	
お菓子 E	+	+	

20

【 0 0 9 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kamiya, Motokazu

<120> Discrimination between forms of beans

<130> K-470-1

10

<160> 34

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 1

ctcaacggat gcaaacactt g

21

30

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 2

ctccatttgg aagactagac

20

<210> 3

<211> 20

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 3

20

acgaggcacc acattttaatg

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 4

atgtagtggt gaaagacata c

21

40

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer 10

<400> 5
tgagtgtcta cgc tcg atg
19

<210> 6
<211> 19 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 6 30
accaaactgc agc tag ctg
19

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 7

ccatacattg atggcactag tg

22

10

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

20

<400> 8

ggcaaaggta tgcattcat g

21

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 9

aaatgagggg gag agg ag

40

18

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 10

tagccacgtc acatatggag

20

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

30

<400> 11

gctgctaagg aatcctggta

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 12

ccacacaatc tccaagtcca

10

20

<210> 13

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 13

ctcgggtggg

10

30

<210> 14

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

40

<400> 14

cgtagggcagg

10

<210> 15

<211> 10

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 15

ctcagcccag

10

20

<210> 16

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 16

cgcgtagccag

10

40

<210> 17

<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

10

<400> 17
aggatcaagc
10

<210> 18
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 18
atcaagctgc
10

30

<210> 19
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 19

gtatggggct

10

<210> 20

10

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

20

<400> 20

ccggacacga

10

<210> 21

<211> 1545

<212> DNA

30

<213> Phaseolus vulgaris L.

<400> 21

ctcagcccag ctccctttgg cttctcttag ccttctcttc aaacctctca gcaacacccg

60

attagctgac tctacttggc catttgctg agggigctca acggaigcaa acacttggtg 1

20

40

aattcccacc ccttcgcaca gcttcttcaa caggiggctt gcaaactgag tctcattgtc 1

80		
cgacaccagg cgcttgggca caccaaaccg gcacacaatg ttcttccaca agaaaccttc	2	
40		
gatcttgggt gcggtgatct gggccactgg ttctgatgga agagggccca agctcaccac	3	
00		
actatgaaag ccaaaagact aagactagct tcacaaagga gcgtctagcc tctcaaagga	3	
60		10
gcgtctagtc ttccaaatgg agcgtctagc ttacaaaggg agcgtctagc catggctaca	4	
20		
taaggagcat ctatgaagag tcttagaccg tctagcttca tacacacatg agccaagcta	4	
80		
cgatttggga aaagaaggct ttgttgcata aaggcccatl aggggtactl agtagatagg	5	
40		
atagtgtaga aagcactttg tgaaggaaac attctagaaa ctaggttagt gtggccggtc	6	20
00		
attgcacatg gcacatggct taggttttac atttaatttt tgttttcttt tcattagaaa	6	
60		
gtagcttacc ttttacgtcc aatatggcct ataaatagga aggtatctc attgtatttt	7	
20		
tcaagtttat ttgagtattg tatgtcgcca tttgtgcac tagcttactt ctctagaatc	7	
80		30
taggtataaa ctctatcttt cactttctcc ctgagctgcc aaaccttcca aaccatactc	8	
40		
atcatgcact tcaaagccat cacaactcct aggagggctt gttcactcac ccattgcttc	9	
00		
cgcatacttt tcactacttt gattcaagaa gaacacatga aaatgccatc atttggatc	9	
60		
atgagctttt ggtttctcaa gatgagttagc ttggcttttt aatttcagtt ctcttttatt	10	40
20		

tcaccttctg catttcaatt ccttacttct ctgctgttt ttatatatta aattgttctt	10	
80		
gggtgtccta tggagatcc aaccaaagca caatgttca attgatctg aacaaattct	11	
40		
gtgcagcttg tgataggatt ccttacacca ttgtgtggct gtttttcttt taggaatttg	12	
00		
agtccttatt gctttcttat aattgttca ttttatgctt tgagtcttta tttctgaat	12	10
60		
ctataaaagt tgtgtcaagt catgtgaatc cataattgtc atcaattctt agtagtcta	13	
20		
ttattggctt gatgtttct tgcctttggg tctctttata ttgctttatt ctgctgttat	13	
80		
tttgatcctt tgggtcttct ttttttttag ttgagtcca taattgtgtc ttagtctta	14	20
40		
cacaatttcc attctcacat ttccattgtg ttaattttgg ttatcttgct gttttcttcc	15	
00		
agttttccag atttccctg tatcatctct ctgttctggg ctgag	15	
45		
<210> 22		
<211> 1068		30
<212> DNA		
<213> Phaseolus vulgaris L.		
<400> 22		
ccggacacga cattggaiga gtgtgtccaa agagccacta aatacatgca gctggaggaa		
60		
ttgaaagaat tctgaaacaa ggctcgggca cctaataaac ccgagaggac ggggagttcc	1	40
20		

caagacgigg aacgccatic attigaaaat gtatitttagc tgataatgtat taagggtgta	1	
80		
ctttttcccta cctticaatct tttttttcaa gggtttttta ttgaaaatgt ttttaacgagg	2	
40		
caccacattt aatgaaattt gacttaccag ctacgtatga attcctttga aataaaacct	3	
00		
ctcggccaag gaagaattca cccaagttaa tcccagccga gagtacgaaa ggaaaaccctc	3	10
60		
ttggtaaga gagttcaca gaaaacctct cggccaagga agaattcacc caagtgaatc	4	
20		
cttgccgaga gtacgaaaga aaacccccctc ggccctctcgg ccaagagagt tgaaagaaaa	4	
80		
ccctctgacc aaggaagaat tcaccaagt gagtcctctg cgagagttaca aaagaaaaac	5	20
40		
ctctcggcct ctgaccaag agagtctgaa agaaaaccctc tcggccaaag attacatcta	6	
00		
gcgtatgict ttaccactia catgtacacg cgccctcagat acaagttaacc acactcgaca	6	
60		
tccagcaaca aagcaatcac gaacacactc ggcatgcgaa tactcacggc aattcgactc	7	
20		
tacgttacgt ttaaaccaac tcactcgagc ctggggggcat atgtactacc ggaatggccga	7	30
80		
aaggccgacc agacgacaaa gccaaactaga cgacaagatg caaagctaaa cactgaattt	8	
40		
ggatataaca agtcaactta ggigataagc acggttaaga cacaattggg cctttgtttg	9	
00		
gaccttaaag caggcccata acaaccatag cccaactaga gcagtataaa tagcagaaga	9	40
60		
ggatatacat ccaaggtaac tattcactct ctactctctt ggtacctagc tctcggactg	10	

20

acttgatcgt cggagtgtct tcaaaggtag tccccccatc gtgtccgg 10
68

<210> 23

<211> 1844

<212> DNA

10

<213> Phaseolus vulgaris L.

<220>

<221> unsure

<222> (881)(1180)

<223> Description of n: unknown base.

20

<400> 23

atcaagctgc caacttcaag gtgtctgagg agaagctggc cgaggaggct gccgctgggt
60
tcgtgatgg gttcgaggag gctctagtc aagcgccctg tgccaacct ggcatcgaca 1
20
tctccgggtg cagccctctg aaggaggtag ttgatggcaa gatcgtgcca tttagggcct 1
80
ctaaggaata gcttctcgtt gtaatcaca caaaccttta ttatataga ctgtaatct 2
40
caacttttaa cttagacctg ctaaagtta tgtgactttt gtctttacct ccttatctgc 3
00
tctaatttcc cttaacctt ttatctgttt ccactttctt ttgggcacaa ctgggtactta 3
60
cctttggcac gtctcttcat cgttctgctt ctaacctttt aggtagcacg tgaccttctc 4
20

30

40

tcttattctt tctttctaag tcttgacgca catcttttc ttggtctttt ccttcaaaaa	4	
80		
ttttcttagc ctctgtatct gtgaggaatc ttcttcatga aggcgtcacc tgccacgccca	5	
40		
ttgccccaaag gcaaagtaga cttaactttg ccaatcttta actatctctt tatitgcttg	6	
00		
ttctcgaacc ctcgagcctt gactgtcaag gactccgctg gcttcatcat cgcctaagat	6	10
60		
gcataggggc ctgctcttct ttctagcctc gacatcgctc aaggacgagg aggacttatc	7	
20		
tgttactctg tggcctcgac atcgctcgag ggcgtggagg acttatctta cctgtactga	7	
80		
gtgtctacgc tcgatgggag acctgctctg ggttgtctta cgcctgggtt ttgtgttgta	8	20
40		
ccttggttaaa tctgaagcag ttcttcgaga aaatagcatt nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	9	
00		
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	9	
60		
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	10	
20		
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	10	30
80		
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	11	
40		
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ttggtaatg gttttgtgaa	12	
00		
gatgtcagct agctgcagtt tgggtgccac aaacttcact tcacagtctc catittgcac	12	40
60		
atgatctctg atgaaatgat gtcttatctc aatagttttg gtcccttgagt gctgaatctg	13	

20

atTTTTGGTA agattgattg cacttTgttt atcacacatc aagggaacct tgcTgatttg 13

80

taaaccAAAA tctgcaagtt gtTgctTgag ccatagaatt tTgTcacaac aactaccagc 14

40

agctatatat tcagcttcag cagtagaaag agcaacacat gctTgctTct tgcTatgcca 15

00

10

agaaattagg ctTgagccaa gaaggTgaca agTatcactt gtgctTtttc tatctagctt 15

60

gcaacctgca aagTcagaat ctgaataacc aattaaatgt attggagagt gagaaggata 16

20

ccatagTcct acagatgatg ttctTtTgag atattTcaga attctTttTg cagctTtgaa 16

80

gtTgTactct ttaggatttg ctTgatatct tgcacataaa cacaccgcaa acatgatgtc 17

20

40

cgacctacta gatgttagat aaatcaaaga tccaatcaaa cctctgtatt ttgtttgatc 18

00

tatactcttt ctagcagcat ccgcatccat gtagcagctt gat 18

43

<210> 24

30

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

40

<400> 24

ccggctggaa

10

⟨210⟩ 25

⟨211⟩ 10

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

10

⟨220⟩

⟨223⟩ Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

⟨400⟩ 25

gagcacggga

10

20

⟨210⟩ 26

⟨211⟩ 10

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

30

⟨400⟩ 26

atacggcgtc

10

⟨210⟩ 27

⟨211⟩ 10

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 27

10

acggaagcgc

10

<210> 28

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 28

agcgccgacg

10

<210> 29

<211> 10

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 29

cgaattgctg

10

20

<210> 30

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

<400> 30

ggagaggaga

10

40

<210> 31

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Discription of Artificial Sequence: synthesized primer

10

<400> 31

gtgggttggtg

10

<210> 32

<211> 714

<212> DNA

20

<213> *Vigna angularis*

<400> 32

agcgccgacg ccatacatig atggcactag tgcagttaaag gaaaatgata gcggttatit

60

tcgctatcc gcaacgattc cacaatcgag gtatatacag acgaggtaaa aatcttacca 1

20

30

ctttttgect cggtttgag ccgaggcata aaggatatg cttttgctc gattactggt 1

80

gaaccgagtc agtacagggg tcttatgect cggtttggag ttgaaccgag acagtagaaa 2

40

gggttttttt tatatatatt ttacaaaaca atacattctt gtgtagcggg atattagttt 3

00

gtattaatag atgcggttcc attacacaca tataaaactg tgactaggta tcaatcaata 3

40

60

tttttcaat ggccacaagt ctggaaatct ggaaagttaa cattcagttg tgagtaggta	4	
20		
tcaatccata ttaatagaig cggttccatt tticacattc aactgcaaga tcaataggig	4	
80		
agcctattac tgtgattctt tticctttga tcaatatagi agcagtcica ttatccagat	5	
40		
iggagagicc atgaagtigca taccittigcc ataaaaaatc aaaaaatcaa aaataccagc	6	10
00		
aacgtcttga aaataaaaata aaaagttacct ttttagcttt tctaagaatc aaaggttcca	6	
60		
gcattgcgga ggttgtcacc cccaaatata aatttcttcc ccaccgtcgg cgct	7	
14		
<210> 33		20
<211> 2040		
<212> DNA		
<213> <i>Vigna angularis</i>		
<400> 33		
aaatgggtggc aactagatca attacattct tccaatcaca tataacaaca attaaacact		30
60		
actctacccc ctaacccaac acgaattaac aaaccaagtg aacgttaatc tggttttcaa	1	
20		
aaaagcgaat taagcaatca catigcataa actcaatcaa atctgcactc atggttccaat	1	
80		
taactaagca aaaatcaaac accaattagg aaactigagca tataacctaat tgcaagcaca	2	
40		
aaccggaatt ggcatcatgc aagtaagaa caacaccatc aattacaatc caaaaatctc	3	40
00		

aggcaatcat tgcaatattc tcaattacca accacacaga tttacacitc cattaaacta 60	3	
gattgaagca actaaaatag aacttaatac attaaagaag tgctggaaac gaaatttaat 20	4	
ttcaatgcaa aaacaaaatt tgagacaaaa atgaaatggg gagacgaaat tgcaacattc 80	4	
aaaatgtaaa ttgaagcaag aatgtaaaac gaaaattaaa ttggaattaa aaatgggatt 40	5	10
caatacataa agaaggaatt gaaagcaaac cgaaatcccc taaagagggg agggggtaga 00	6	
aaacgcacca aaacctigag aatttaaggg aaaacgtigaa aatgaggggg agaggagagg 60	6	
tgacctaat atgatttggg tatttaaaaa ccccaaacga cgaaaatgcc ctctaaattc 20	7	20
gtttctcta aatgtigacc gaaaatgggt ccaaagtcac aaagtigac ccaattacat 80	7	
tataaacgaa ttcaaaacga aattaaacta taatgtigac gttggccagac tcttctgtc 40	8	
ccaaaatatg ttctctaaat ttcttgcga ttaataattg gaataattaa gaccaaataa 00	9	
ttcaaatiaa ttaaaataag aattattagt caaattaagc cgaaatagtg aaaatgagac 60	9	30
aataatgaag aattaaacac aatgcactaa tacaatatgg tgcaaaaagc ttagtgaata 20	10	
gtgcaaaata gtgattcatt atgttgtct ccatatgiga cgtggctact tatcttgtaa 80	10	
gataggtiga tgaatctggg tggatcacti gicatgtgtc tgaactattc atgttcaaa 40	11	40
taccacatag ctigtcttct tcttgttta gcacacattt cagctgtatt tgattttgcc 12	12	

00

atcatactta ggtttgttcg ctatagacgt tggcttttac acagcttccg atcttcccttg 12

60

tgattattct cagtcttccct tttattcatt agaaattttg taaacttttc tgccatcagg 13

20

tttgattctt ccccttataa tttcataata ttgatgcttc tttcttcttc ttgagttgat 13

80

10

ttccgagatg ctctctgtctt aaataactca tacgaactgt taatgatagg actacacata 14

40

cccttacagg ttgcattcaa gaaataatca ttaaattcac tcttactcat gatcaatgag 15

00

atactagcca tcaagatcaa aacaatcaat tacacggaaa atcaaatcga ttagttttcg 15

60

agtgactttc aaaaaacttg ctctcgttcc aatigaagaa aagcataggc ctattttatc 16

20

20

aaccaagaag ggggggtgcat tggttcagta ttaaaatatt tgttctttta aaaacctttg 16

80

aaaatcttta acattttatt gaaacacaag aaaataaaga atgtactgta ataatagaga 17

40

taagggatag aaagaaaaac accaagtctt tatactgatt cggttccaat gccaacatcc 18

00

30

atatctcttt caatcaacct aagattgaaa gccacttcac tatatagatt gaggatataa 18

60

gcaagaatta cagagacctt ctctcatlge aatctctctt ccaactccaa atctaataa 19

20

gataacaaac aacacagaaa gaataatcct ctctctacaa aaacctattg agacacctct 19

80

cacagaaacc aaaacatcat gtctctctcc tggccactgg caacaaggaa cccacaatct 20

40

40

(210) 34
 (211) 2040
 (212) DNA
 (213) *Vigna angularis*

(400) 34		10
cgaattgctg ctaaggaatc ctggtatatt ttacatatca actaaaggga aaactctaac		
60		
taattttctt tgggaagcat atcacaaaaa gggtttgatt atcgaatcac gtcgatgagg	1	
20		
cacaaaagaa tatgttggat ctgtttccgt tagggtcag gaaaacciga aattttttgg	1	
80		
ttagtgatga ggctaaggaa gagagtaatg ttgtagcccg tgaagigaat gaggaaagtg	2	20
40		
aaagacaagg agatttagtt tgatggttgt ttagcttgt ttctattttg tatitgcaat	3	
00		
ggtttacctt gcccttagtt attataattt ggacttggag attgtgttgt ttgttaggct	3	
60		
gggtttattt tcatgtaggg tttttgttg ttgttattta gatcgtaigt ttacgttgat	4	30
20		
tcgaatgaac atacatataa ttctcttgga tgttacttta cttcaggacc atgttatttt	4	
80		
tttaatataa ttctcttggt acttttggat atatcttctt gggttccctc catgtcgact	5	
40		
ttaggttttt catgtttatg ttaccaatgat ttactttcgt gtgtgccctaa agtcgagcgc	6	
00		
ttccatcigt aggggtggca tggttatcca cgagataggg tattctatgt ggtgcactcc	6	40
60		

```

tittaagggtg cgtaggcaca aataaattca acaatgaaag agtttctcgg ttgttgtctt      7
20
gcttttggttt taacacttga agcgagagga ttigccctgc atcattacaa agttgttgca      7
80
aatttatgct caaaaggctt tctgtttttt atagctttaga tgttgagigt gaatggttat      8
40
tctaacaigt cagcaattcg                                     860

```

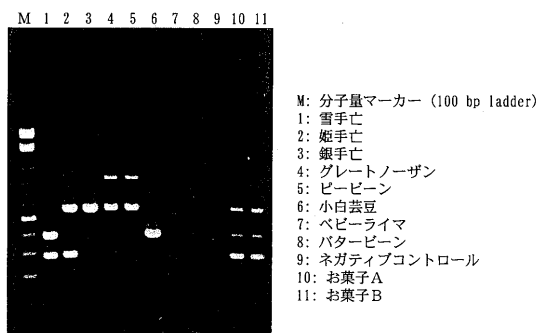
10

【図面の簡単な説明】

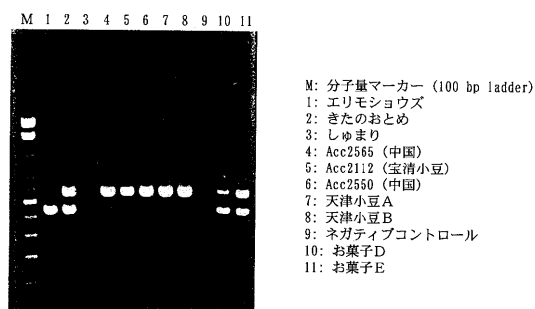
【図 1】 マルチプレックスPCRによる白インゲンマメの品種判別の際のアガロースゲル電気泳動図である。

【図 2】 マルチプレックスPCRによるアズキの品種判別の際のアガロースゲル電気泳動図である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

- (72)発明者 紙谷 元一
北海道夕張郡長沼町旭町北1丁目1-6
- (72)発明者 竹内 徹
北海道夕張郡栗山町中央4丁目87-1-101
- (72)発明者 楠目 俊三
北海道旭川市永山5条18丁目1-7
- (72)発明者 佐藤 毅
北海道北広島市白樺町2丁目17-5
- (72)発明者 佐々木 純
北海道夕張郡栗山町中央4丁目116-4-203
- (72)発明者 木口 忠彦
北海道常呂郡訓子府町若葉町99番地

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 食品と技術(2002-01), pp.18-20 (2002.01.25)
育種学雑誌, vol.46(別冊1), p.120 (1996)
和歌山県農林水産総合技術センター研究成果情報, vol.1998, pp.67-68 (2000.02)
Theor.Appl.Genet., vol.91, pp.1078-1085 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JMEDPlus(JDream2)
JST7580(JDream2)
JSTPlus(JDream2)