製品コード CY218

食品・環境分析用

TaKaRa

CycleavePCR™ 肉種判別キット（6 種）

説明書

v202506Da

目次

I. 内容 4

II. 保存 4

III. 本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの） 5

IV. 使用に際して 5

V. 操作上の注意 5

VI. 操作 6

VI-1. サンプルの調製 6

VI-2. リアルタイム PCR 装置の準備 6

VI-3. 反応液の調製 7

VI-4. リアルタイム PCR 装置による反応と結果判定 8

VI-5. 判定結果についての注意事項 15

VII. 補足：エリア分けについて 15

VIII. 参考文献 16

IX. 関連製品 16

X. 注意 16

食肉製品の原料肉の表示は、食品衛生法で規定されています。その確認のために正確な食肉種の鑑別法が不可欠となっており、その方法には正確性、簡便性、迅速性が求められています。
CycleavePCR 肉種判別キット（6 種）は、ミトコンドリア DNA 上にある cytochrome c oxidase subunit I（cox I）遺伝子領域の動物種間の多型をもとにして、原料肉のウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ウサギの 6 種の種判別を行うためのキットで、増幅・検出のために Thermal Cycler Dice® Real Time System IV などのリアルタイム PCR 専用の増幅装置を用いて判定を行います。
PCR 法は、ごく微量の DNA を鋳型として用いて、目的の遺伝子断片のみを増幅する技術であり、DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。リアルタイム PCR 装置を用いることで、この増幅課程をリアルタイムでモニタリングすることが可能です。本製品の増幅には、Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用していますので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。
本製品では、cox I 領域においてそれぞれの動物種を特異的に増幅するように設計したプライマーを使用し、さらに、それぞれの動物種の増幅産物に特異的にハイブリダイズするプローブを用いて検出を行います。この検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。サイクリングプローブは、RNA 部をはさんで一方が蛍光物質で、もう一方がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物をモニターすることができます。リアルタイム PCR 装置を用いたリアルタイム検出であるため、電気泳動が不要となり迅速に判定結果が得られます（約 80 分）。
また、本製品の反応液には、PCR による増幅反応が問題なく行われていることを確認するための反応コントロール用の鋳型、プライマーおよび検出用のプローブが含まれていますので、阻害物質の混入による PCR 反応の阻害の有無を確認することができます。

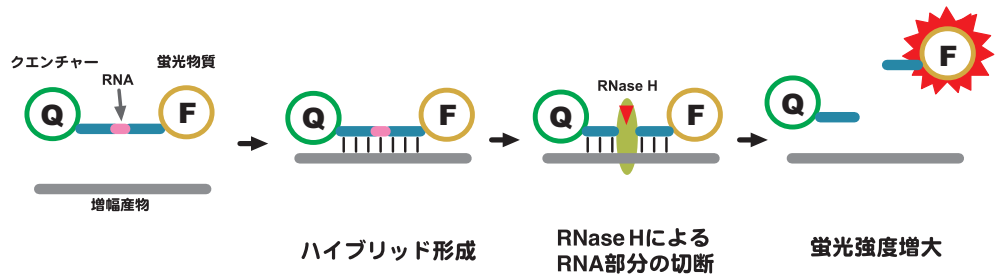


図 1．サイクリングプローブ法の原理

I. 内容（25 μl 反応× 120 回分、各 20 回× 6 種）

①	2 × CycleavePCR Reaction Mix	2 ×	750 μl × 2 （120 回分）
②	Primer/Probe Mix-1 (for beef) *	5 ×	100 μl （20 回分）
③	Primer/Probe Mix-2 (for pork) *	5 ×	100 μl （20 回分）
④	Primer/Probe Mix-3 (for chicken) *	5 ×	100 μl （20 回分）
⑤	Primer/Probe Mix-4 (for rabbit) *	5 ×	100 μl （20 回分）
⑥	Primer/Probe Mix-5 (for horse meat) *	5 ×	100 μl （20 回分）
⑦	Primer/Probe Mix-6 (for mutton) *	5 ×	100 μl （20 回分）
⑧	dH_2O		1 ml
⑨	Control DNA for beef		50 μl （10 回分）
⑩	Control DNA for pork		50 μl （10 回分）
⑪	Control DNA for chicken		50 μl （10 回分）
⑫	Control DNA for rabbit		50 μl （10 回分）
⑬	Control DNA for horse meat		50 μl （10 回分）
⑭	Control DNA for mutton		50 μl （10 回分）

＊：蛍光標識プローブにつき、遮光に留意してください。

各 Control DNA は反応性確認用の陽性コントロールです。
濃度は約 2 ng/μl です。

【コンポーネントの説明】

2 × CycleavePCR Reaction Mix：
酵素、Buffer、dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。

各 Primer/Probe Mix：
各ターゲットを検出するためのプライマー・プローブの混合溶液です。インターナルコントロールを含みます。プライマーにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを増幅し、異なるレポーター色素が標識されたプローブにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを検出します。ターゲット遺伝子検出用プローブは FAM、インターナルコントロール検出用プローブは ROX という蛍光物質が標識されています。

ターゲット：
標的となる肉種です。本製品の場合、beef（ウシ）、pork（ブタ）、chicken（ニワトリ）、rabbit（ウサギ）、horse meat（ウマ）、mutton（ヒツジ）のことです。

インターナルコントロール：
ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが検出されない場合にインターナルコントロールの検出ができていれば、PCR 阻害が起こっていないと判断でき、サンプル中のターゲットが検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロールがともに検出されないなら、PCR が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロールのシグナルの立ち上がりが遅くなったり、シグナル強度が弱くなるあるいはシグナルが得られない、という場合があります。この場合、ターゲットは陽性であると判定できます。

dH_2O： 滅菌精製水です。

各 Control DNA：
各ターゲット用陽性コントロールです。

II. 保存

－ 20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、機器、器具（主なもの）

【試薬】

DNA 抽出試薬
NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10）
NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10）など

【機器】

1. リアルタイム PCR 装置および専用チューブ

Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960：終売）
Thermal Cycler Dice Real TIme System *Lite*（製品コード TP700/TP760：終売）
食品環境検査用ソフトウェア（日本語表示）
または Thermal Cycler Dice Real Time System Software
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
など

2. 卓上遠心機

【器具】

1. 200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
2. マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

IV. 使用に際して

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

設計した Primer/Probe の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。
（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）

V. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、装置の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼの混入する可能性がありますので、操作には細心の注意を払ってください。

3. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します（VII. 補足：エリア分けについてを参照）。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

○ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
○ エリア 2：検体の調製を行います。
○ エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本製品では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

VI. 操作

1. サンプルの調製
   DNA 調製キットを使用して検体から DNA を抽出する。
2. リアルタイム PCR 装置の準備
3. 反応液の調製
   反応液を調製する。
   ↓
   反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
   ↓
4. リアルタイム PCR 装置による反応と結果判定
   反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
   ↓
   結果表示
   ↓
   画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。
   ↓
   反応終了
   ↓
   判定

VI-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

【 DNA 調製キットを使用 】

NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10）などの DNA 調製キットを用い、プロトコールに従って調製する。

【 簡易法 】

1. 検体を細切し、約 25 mg を 1.5 ml チューブに入れる。
2. 25 mg 検体あたり 100 μl の滅菌精製水を加え、しっかりとふたをし、95℃で 5 分間熱処理する。
3. 遠心分離（12,000 rpm、5 min.、室温）し、上清を回収する。これを検体として使用する。ただし、この方法で調製した検体の場合、PCR 反応が阻害され、増幅シグナルが得られない場合がある。また、DNA 量が微量のため増幅シグナルが得られない場合もあり、注意が必要。

   （参考）缶詰肉、ウィンナー、ソーセージ、加熱加工済みハンバーグなどは、上記どちらの方法で調製した検体でも、6 種の種判定が可能でした。生の精肉の場合は、DNA 調製キットを用いることをお勧めします。生の精肉から簡易法で調製した検体では、PCR 反応の阻害が起こり、種判定が困難です。

調製した DNA サンプルは分光光度計で濃度測定を行う。本製品のリアルタイム PCR は 1 反応あたり 200 ng 以下の添加量で行うこと。

VI-2. リアルタイム PCR 装置の準備

ほとんどのリアルタイム PCR 装置では電源投入後ウォーミングアップの時間を要するので、反応液を調製する前にリアルタイム PCR 装置の電源を入れておいてください。装置の設定については VI-4.（8 ページ）を参照してください。

VI-3. 反応液の調製

本製品では、1 本の反応チューブ内で各ターゲットとインターナルコントロールの増幅産物を同時に検出します。（6 種のターゲットは各々別チューブで反応します。）正しい検出結果を得るために、各ターゲットにつき陽性コントロール反応、および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに、20 μl ずつ分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH_2O を 5 μl 加え、しっかりとふたをする。
必要本数は、サンプル数＋ 2 本（陰性コントロール反応として dH_2O を加えたもの、陽性コントロール反応）と設定する。

	試薬	液量（1 反応）	最終濃度
①	2 × CycleavePCR Reaction Mix	12.5 μl	1 ×
○	各 Primer/Probe Mix（5 × conc.）	5 μl	1 ×
	検体サンプル or 陽性コントロール or dH_2O	（5 μl）＊	
⑧	dH_2O	2.5 μl	
	Total	25 μl	

＊：検体サンプルまたは陽性コントロール DNA は、ステップ (2) で加えるため、ここでは加えない。

注：蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

（エリア 3 へ移動）

(2) サンプル（鋳型）を添加する。（エリア 3 で実施）

陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたは陽性コントロールを添加し、しっかりとふたをする。
反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

注：反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

VI-4. リアルタイム PCR 装置による反応と結果判定

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、各装置の取扱説明書をご確認ください。
ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）を使用した場合の簡単な操作方法と、結果の判定について示します。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 】
（食品環境検査用ソフトウェア）

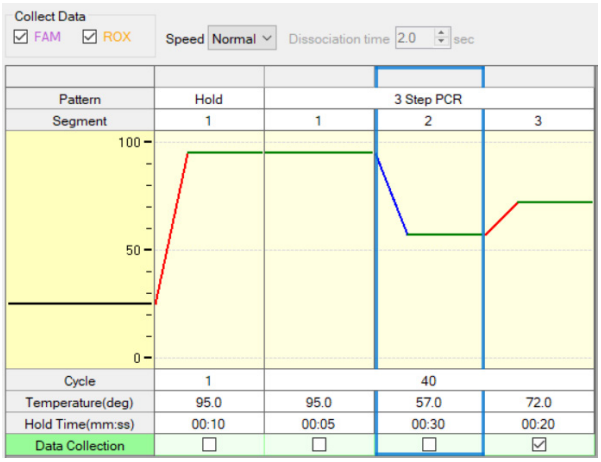
(1) ランファイルを新規作成し、"新規測定" 画面において解析タイプ＜＋／－判定（CycleavePCR Kit）＞を選択する。

※ ＋／－判定（CycleavePCR Kit）は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、＜ PM (M) Plus/Minus Assay 解析＞を使用します。

(2) “反応条件設定” 画面で PCR 条件を以下の条件に設定する。

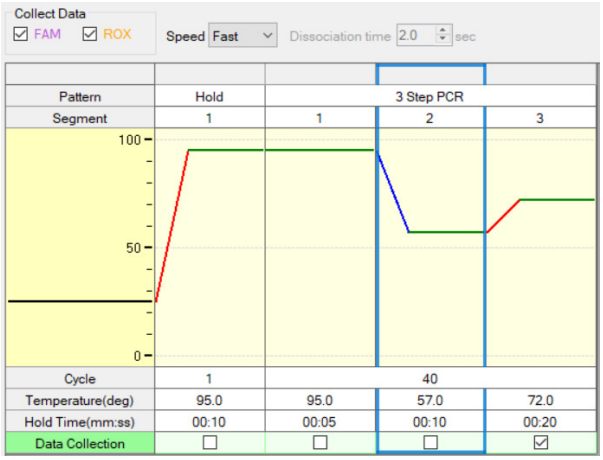
◆ Thermal Cycler Dice Real Time System IV の場合

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：40
　95℃　 5 秒
　57℃　30 秒
　72℃　20 秒（検出）



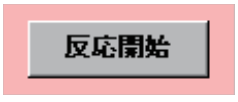
◆ Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* の場合

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：40
　95℃　 5 秒
　57℃　10 秒
　72℃　20 秒（検出）

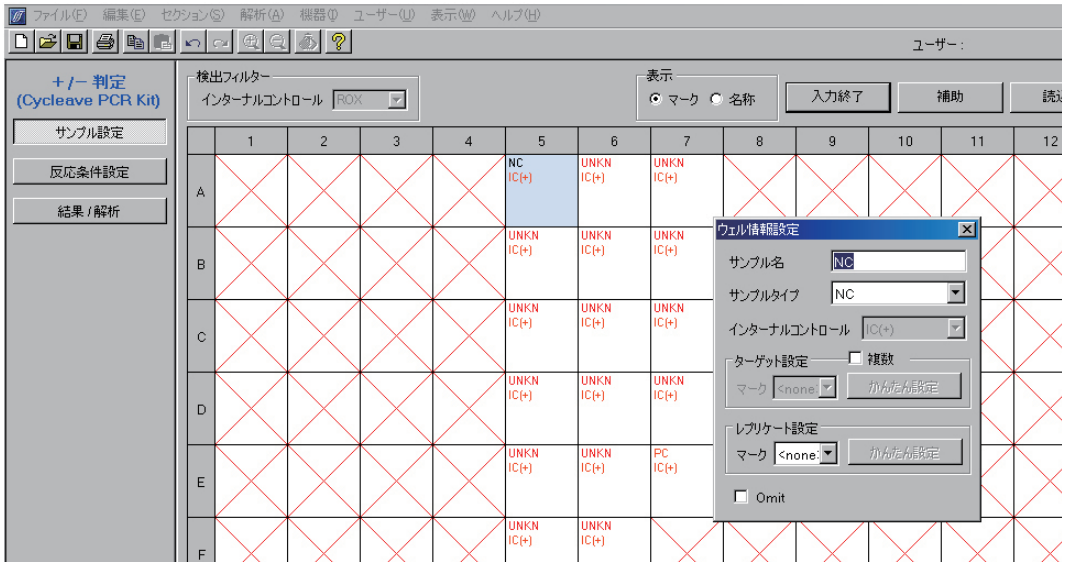


注：“Speed” は、Thermal Cycler Dice Real Time System IV（製品コード TP1010）の場合は Normal に、Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900：終売）や *Lite*（製品コード TP700：終売）では Fast に設定します。
食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合、Speed の設定は初期設定のまま、ご使用いただけます。

(3) 画面右下の “反応開始” ボタンをクリックして反応を開始する。



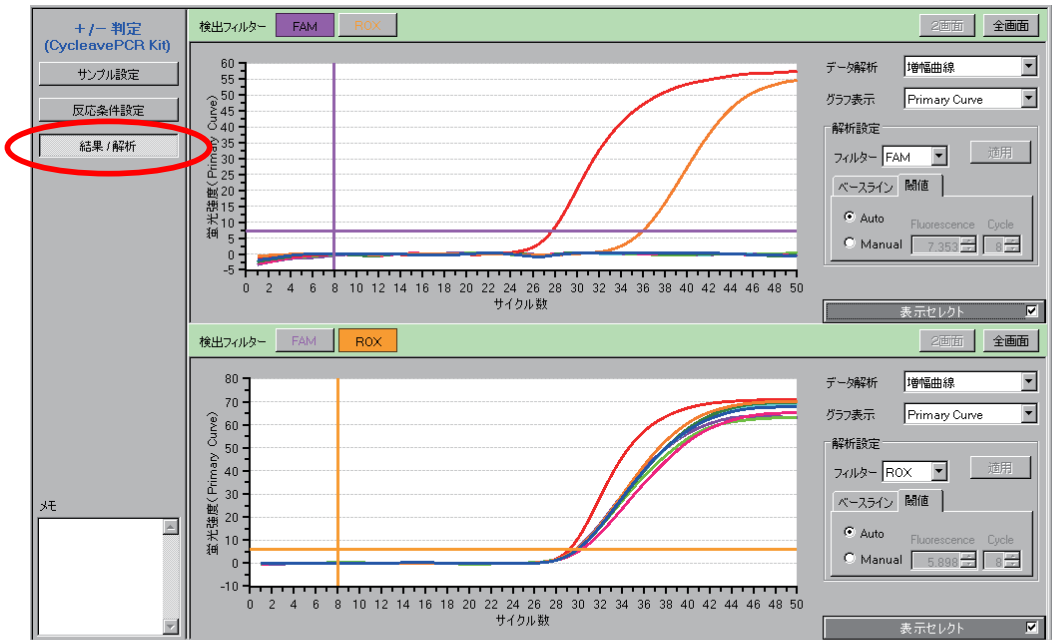
(4) “サンプル設定” 画面で “入力” ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



インターナルコントロールは、デフォルトで ROX に設定されている（変更できません）。判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨する。

(5) 結果解析

1. 反応終了後、“結果 / 解析” ボタンをクリックする。



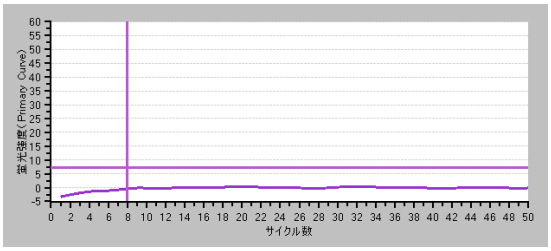
2 画面の上部にターゲット遺伝子検出の FAM フィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール（IC）検出の ROX フィルターでの増幅曲線が、表示される。（閾値は Auto で表示）

2. NC（陰性コントロール）、PC（陽性コントロール）での増幅曲線を確認する。

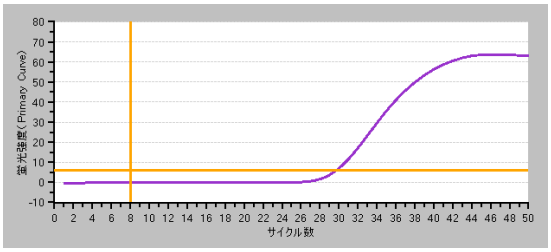
NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ N ＞を選択

FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）



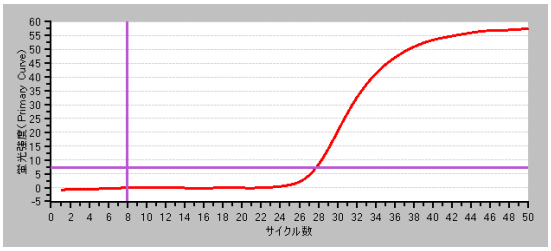
ROX フィルター
（IC 検出）



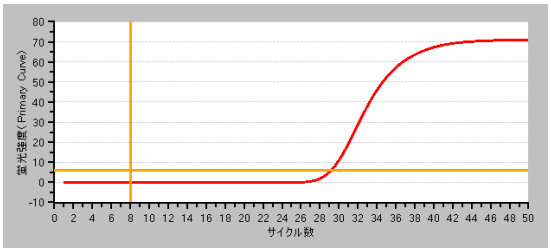
PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ P ＞を選択

FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）



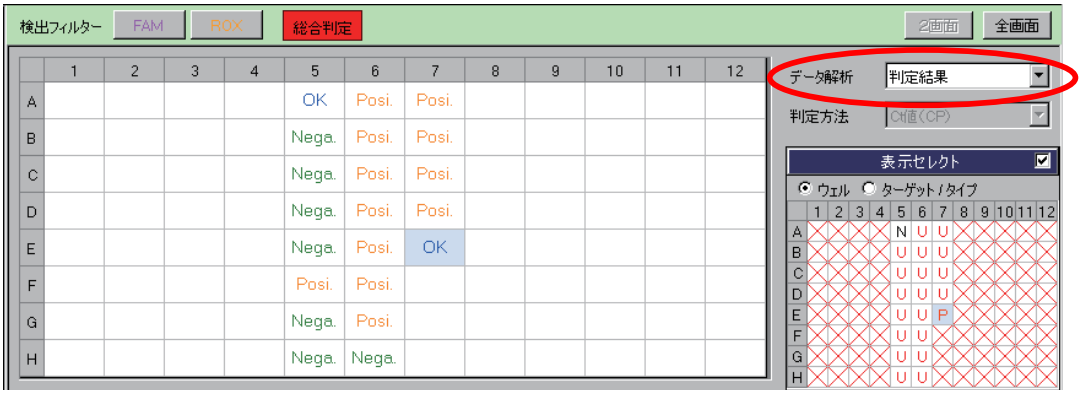
ROX フィルター
（IC 検出）



3. サンプルの結果を、表示セレクトで＜ U ＞を選択し増幅曲線を確認する。

注：結果を解析する際は、正規化補正を OFF にしてください。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください（https://catalog.takara-bio.co.jp）。

(6) 結果の表示
データ解析＜判定結果＞を選択する。



総合判定結果の表示について

陰性コントロール＜ N ＞、陽性コントロール＜ P ＞の表示
OK　：コントロール反応が正常（反応系が正しく進んでいる）
OUT　：コントロール反応が異常（反応系が正しく進んでいない）

検体サンプル＜ U ＞の表示
Posi.　：ターゲット遺伝子の検出が陽性
Nega.：ターゲット遺伝子が検出限界以下
ND　：判定不能（PCR 反応が正しく進まなかった）
インターナルコントロール、ターゲット遺伝子とも検出せず、判定不能。
Error　：同一レプリケート番号の判定が異なる

※判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

増幅反応は以下の手順で行う。

(1) Advanced Setup で New Experiment を作成する。

(2) Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。（Other を選択した場合は Include Melt Curve の☑は外しておく）

(3) Plate Setup の Define Target にて Target Name を beef（または pork、chicken、rabbit、hourse meat、mutton）、Reporter を FAM、Quencher を（none）にしたものを作成する。

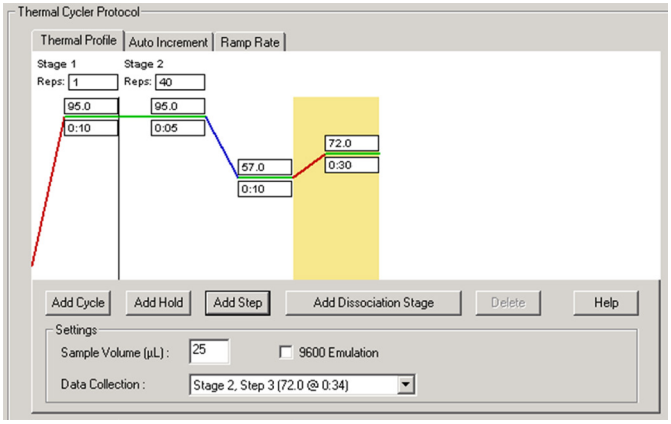
(4) Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を（none）にしたものを作成する。

(5) Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。

(6) (3)、(4)、(5) で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は（none）にする。

(7) Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

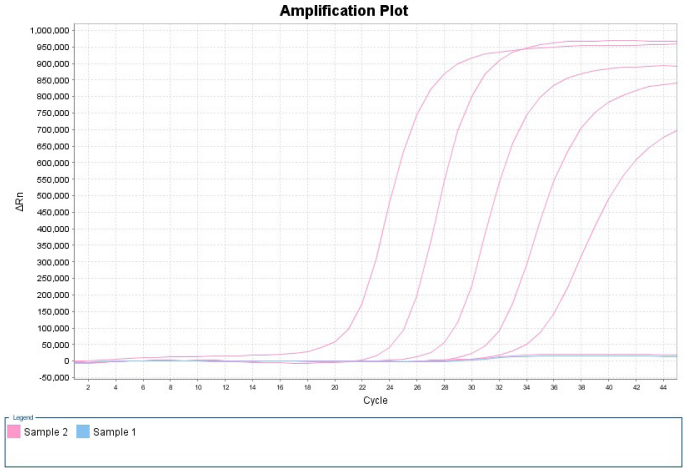
Stage 1：初期変性
　Reps：1
　95℃　10 秒
Stage 2：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　 5 秒
　57℃　10 秒
　72℃　30 秒（検出）



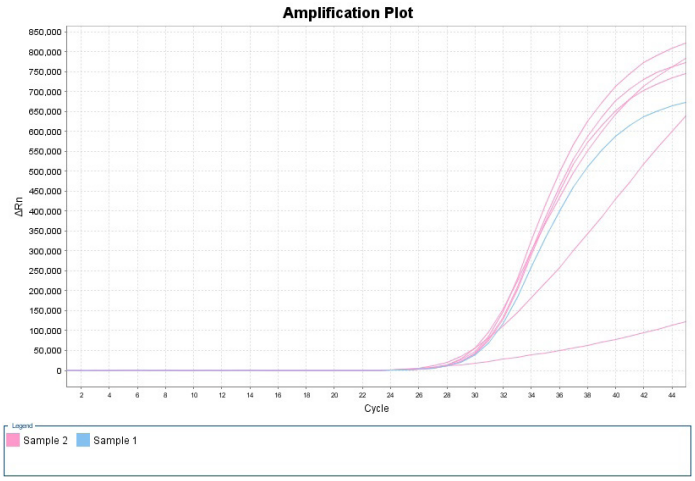
(8) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

(9) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
（Target のプルダウンメニューから各々のターゲットを選択）

※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。

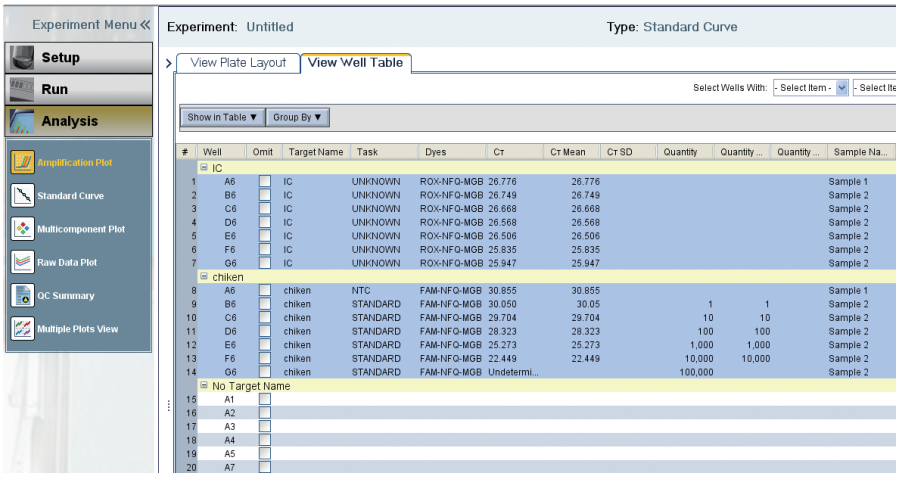


Target の検出（FAM）



IC（インターナルコントロール）の検出（ROX）

(10) View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。



※ StepOnePlus Real-Time PCR System も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX（IC）の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VI-5. 判定結果についての注意事項

・陰性コントロールの反応で、FAM フィルターにおいて Amplification Plots、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られた場合（Thermal Cycler Dice Real Time System の Plate Format では、OUT と表示される）：
→ コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

・陽性コントロール反応で、FAM フィルター、ROX フィルターの両者で、Amplification Plots、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合（PlateFormat では、OUT と表示される）：
→ 何らかの原因で PCR、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。

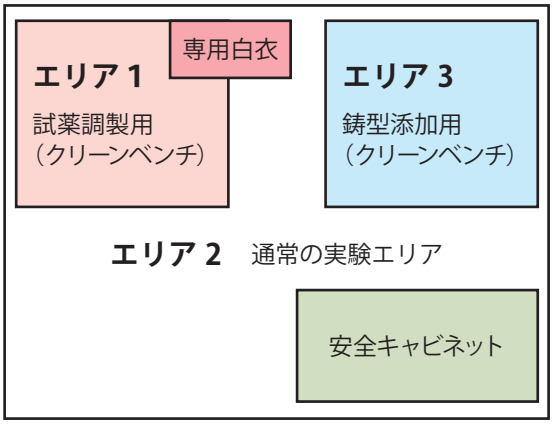
・陽性コントロール反応の ROX フィルターではシグナルが確認されるが、FAM フィルターでシグナルが確認されなかった場合（Plate Format では、OUT と表示になる）：
→ Primer・Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロールが分解している可能性がある。

・検体サンプルの反応で、FAM フィルター、ROX フィルターの両者で、Amplification Plots、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合（PlateFormat では、ND と表示される）：
→ 何らかの原因で PCR、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。
サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再反応を行う、または検体の再調製を行い、再反応を行う。

・検体サンプルの反応で、FAM フィルターで増幅曲線が確認されるが、ROX フィルターで確認されない場合：
→ ターゲットの DNA が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロールの増幅反応が競合抑制される場合がある。
この場合、ターゲットは陽性であると判定できる。
Plate Format では Posi と表示される。

・検出対象の個体によっては、増幅領域に変異が存在するため検出できない場合があります。

VII. 補足：エリア分けについて



● エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
（鋳型となる DNA は一切持ち込まない）

● エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。

● エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。

VIII. 参考文献

1) 松永孝光、柴田清弘、山田順一、新村裕、「マルチプレックス PCR 法による食肉製品の肉種鑑別」、日本食品科学工学会誌　第 46 巻　187-194 (1999)
2) B. Parodi, O. Aresu, *et. al.*, Species Identification and Confirmation of Human and Animal Cell Lines: A PCR-Based Method, *BioTechniques.* (2002) **32** : 432-440.

IX. 関連製品

96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
48 well snap plate（製品コード NJ700）
Flat cap for snap plate（製品コード NJ720）
NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
NucleoSpin Food（製品コード 740945.10/.50/.250）

X. 注意

・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ウェブサイト　https://www.takara-bio.co.jp
タカラバイオ株式会社

v202506Da