

# Thermal Cycler Dice® Real Time Systemを用いて、ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジの6肉種を高感度に判別！！

## CycleavePCR® 肉種判別キット(6種)

製品コード CY218 20サンプル分

- 特異性の高いサイクリングプローブを用いるリアルタイムPCRで6肉種を正確に検出・判別
- 96ウェルプレート対応のThermal Cycler Dice® Real Time Systemに最適化

本製品は、ミトコンドリアDNA上にある cytochrome 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、ウサギ、ウマ、ヒツジの6種の判別をリアルタイムPCRで行うためのキットです。検出には非常に検出特異性が高いサイクリングプローブ法を採用しており、6肉種の正確な判別が可能です。1サンプルについて6種類の反応を行い、ターゲット検出用のFAM™標識プローブで6肉種をそれぞれ検出します。各反応液には、反応コントロールとしてインターナルコントロールDNA、インターナルコントロール増幅用プライマー、検出用プローブ(ROX™標識)が含まれており、PCR阻害の有無も各肉種検出と同時に確認できます。リアルタイムPCR装置Thermal Cycler Dice® Real Time Systemを用いることで、Plus/Minus Assay(ソフトウェアver.2以上で採用)により、サンプル中の6肉種DNAの有無を迅速に判定できます。

\* CycleavePCR® Meat Species Identification Kit Version 2.0は同様の目的のためのキットですが、Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System専用の試薬です。

### ■ 内容(6種×各20回\*1)

2 × CycleavePCR® Reaction Mix *2	750 µl × 2 (120 回分)
Primer・Probe Mix-1(for beef) *3	100 µl (20 回分)
Primer・Probe Mix-2(for pork) *3	100 µl (20 回分)
Primer・Probe Mix-3(for chicken) *3	100 µl (20 回分)
Primer・Probe Mix-4(for rabbit) *3	100 µl (20 回分)
Primer・Probe Mix-5(for horse meat) *3	100 µl (20 回分)
Primer・Probe Mix-6(for mutton) *3	100 µl (20 回分)
dH <sub>2</sub> O(滅菌蒸留水)	1 ml
Control DNA for beef	50 µl (10 回分)
Control DNA for pork	50 µl (10 回分)
Control DNA for chicken	50 µl (10 回分)
Control DNA for rabbit	50 µl (10 回分)
Control DNA for horse meat	50 µl (10 回分)
Control DNA for mutton	50 µl (10 回分)

\* 1 : 25 µl 反応系

\* 2 : 酵素、バッファー、dNTP mixtureを含む。

\* 3 : プライマー、プローブ、インターナルコントロールを含む。

### ■ 実験例

以下の実験には、それぞれの肉試料から市販のDNA調製キットを用いて調製したDNAを使用しました。使用量は、調製したDNA溶液の吸光度から算出した値をもとにしています。今回のDNA調製では、生肉各25mgを試料として、ウシ9µg、ブタ8.6µg、ニワトリ14.7µg、ウサギ2.5µg、ウマ15.9µg、ヒツジ4µgのDNAを調製することができました(RNase A処理なし)。ただし、DNAの回収量は抽出方法、試料の状態により大きく変化します。また、試料の状態によっては、DNAの損傷、阻害物質の存在などにより、反応性に変化が見られることがあります。

#### 実験例1：各反応液での特異的検出の確認

##### 【方法】

製品説明書に従って調製した6種類の反応液を用い、ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジのDNAを鋳型としてそれぞれ反応を行った。

##### 【結果】

各DNAを鋳型とした場合、対応する反応液でのみFAM™のシグナルが得られ、特異的な検出が行えることが確認されました(次ページ図1)。ROX™のシグナルはインターナルコントロールの増幅を示すもので、PCR阻害の有無が確認できます。ターゲットの増幅を示すFAM™シグナルと、インターナルコントロールの増幅を示すROX™シグナルのどちらも得られない場合はPCR阻害が示唆され、鋳型溶液中にPCRを阻害する物質が含まれていると考えられます。また、ターゲットの量が多く、FAM™シグナルの立ち上がりが早い場合には、ROX™シグナルの立ち上がりが遅れたり、強度が低くなることがありますが、ターゲットのFAM™シグナルが確認されているためPCR反応に問題はありません。

#### 実験例2：検出感度

##### 【方法】

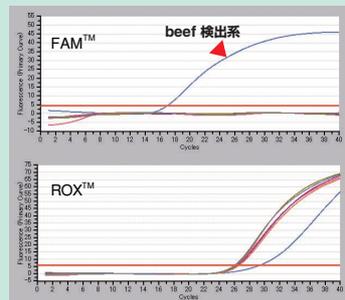
実験例1で特異的検出を確認した各DNAを10倍希釈で段階希釈し、それぞれ検出感度を調べた。ネガティブコントロール(NC)として滅菌蒸留水も鋳型とした。

##### 【結果】

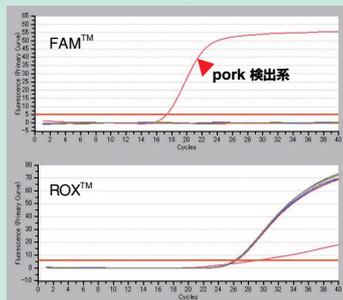
いずれの種のDNAでも、少なくとも1pg/反応(25µl系)まで検出できることが確認されました(次ページ図2)。

各肉種検出用 Primer・Probe mix で反応

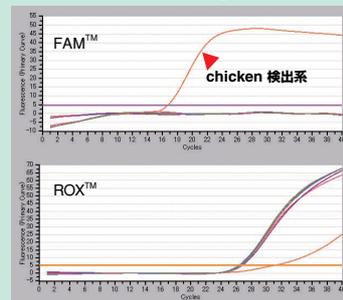
鋳型：ウシ DNA 200 ng



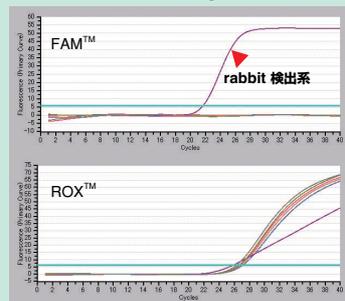
鋳型：ブタ DNA 150 ng



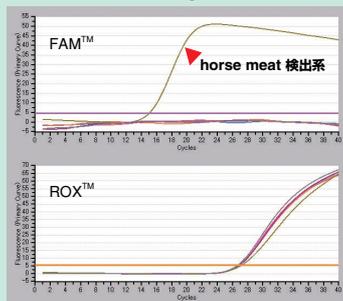
鋳型：ニワトリ DNA 200 ng



鋳型：ウサギ DNA 108 ng



鋳型：ウマ DNA 200 ng



鋳型：ヒツジ DNA 200 ng

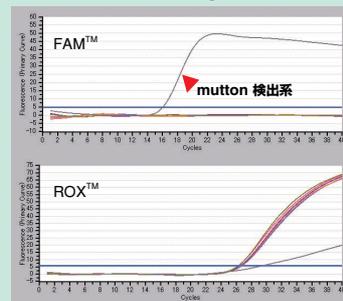
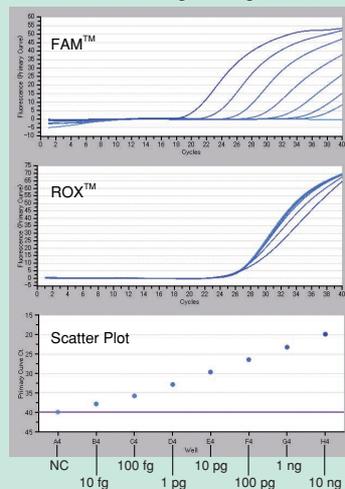


図1 各反応液での特異的検出の確認

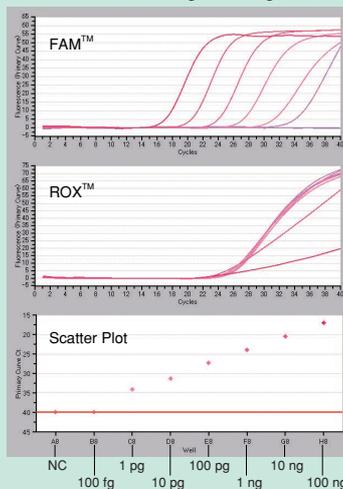
beef 検出系

鋳型：ウシ DNA 10 ng → 10 fg、滅菌水



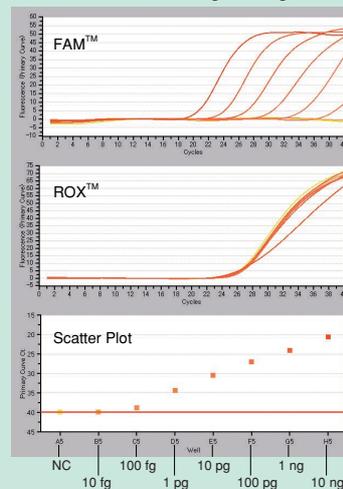
pork 検出系

鋳型：ブタ DNA 100 ng → 100 fg、滅菌水



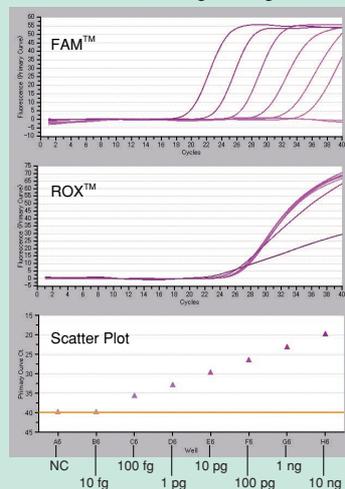
chicken 検出系

鋳型：ニワトリ DNA 10 ng → 10 fg、滅菌水



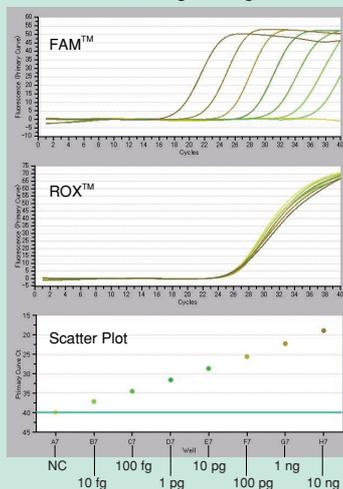
rabbit 検出系

鋳型：ウサギ DNA 10 ng → 10 fg、滅菌水



horse meat 検出系

鋳型：ウマ DNA 10 ng → 10 fg、滅菌水



mutton 検出系

鋳型：ヒツジ DNA 10 ng → 10 fg、滅菌水

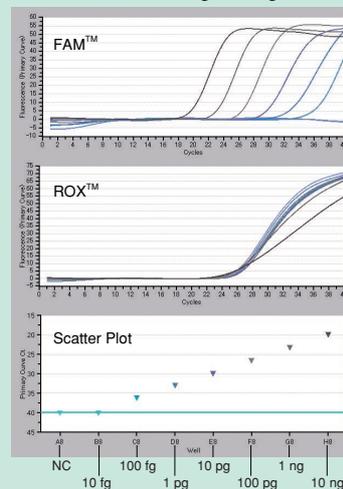


図2 検出感度

**実験例3: ウシ DNA 存在下での他種 DNA の検出**

**【方法】**

他肉種混入のモデルとして、ウシ DNA 100 ng にブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジの DNA 各量を混合したものを鋳型として反応を行い、混合系での検出感度を検討した。

**【結果】**

ウシ DNA 100 ng が共存している場合でも、他肉種のゲノムを少なくとも 1 pg/反応 (25 μl 系) まで検出できることが確認されました (図3)。

**■ まとめ**

このように、本キットを用いることで、ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジの6種の DNA の存在を、特異的かつ高感度に検出することが可能となります。また、リアルタイム PCR での検出であるため、短時間で多くのサンプルを簡便に処理することができます。さらに PCR 後にチューブの蓋を開けて反応液を電気泳動する必要がないため、増幅産物のキャリアーオーバーコンタミネーションリスクも回避されます。

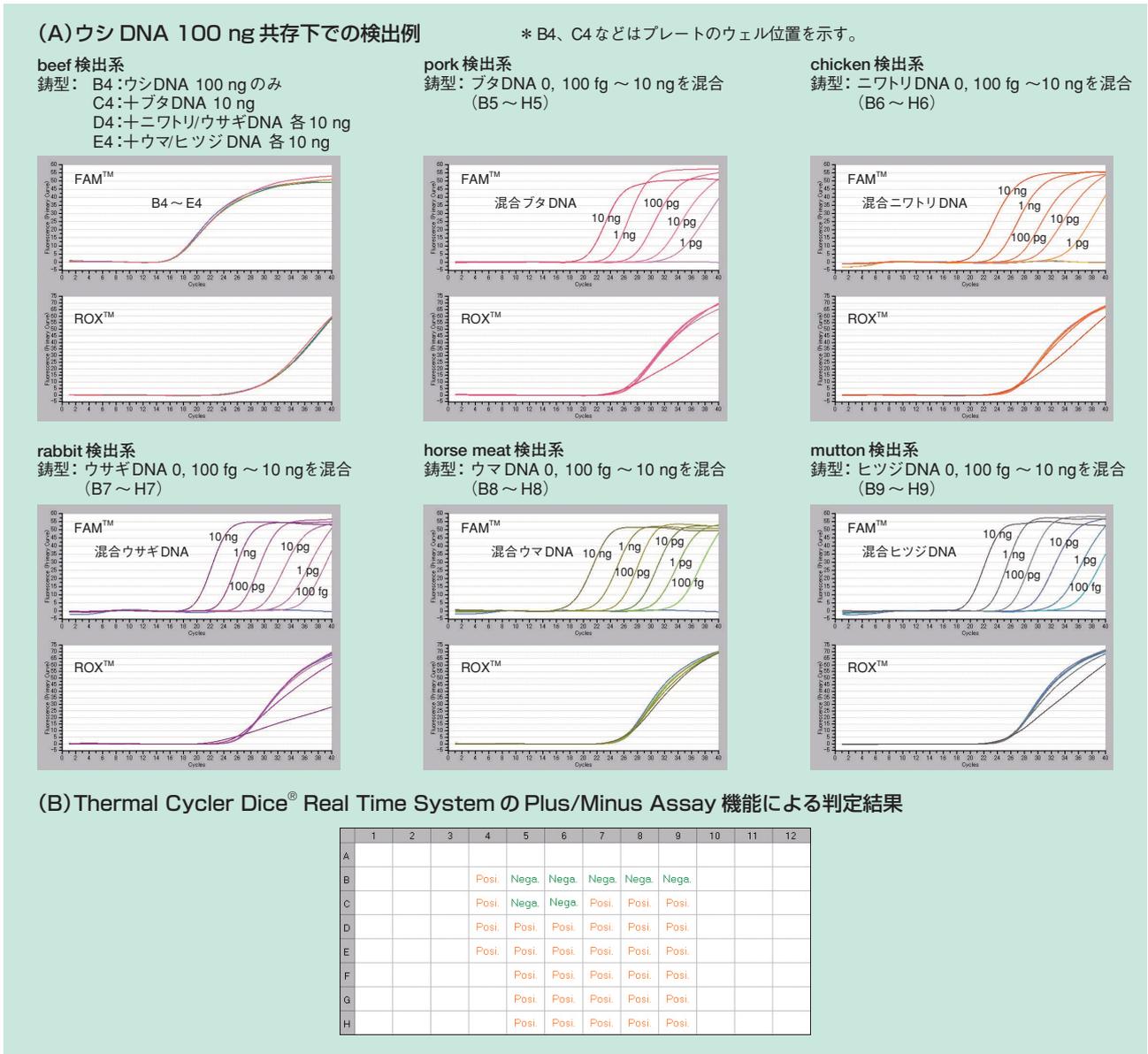


図3 ウシ DNA 存在下での他種 DNA の検出