

CycleavePCR® Meat Species Identification Kit

TaKaRa Code CY204 20 시료분

토끼를 포함한 6종의 식육제품 중 판별 가능!!

정확, 간편, 신속하게 식육제품의 종 판별을 할 수 있는 CycleavePCR® Meat Species Identification Kit에 한 종이 추가되어 총 6종의 육종 판별이 가능해졌다.

식육제품의 원료육 표시를 확인하기 위해서는 정확한 식육종 감별법이 필요하다. 그 방법은 정확성, 간편성, 신속성이 요구되고 있으며, CycleavePCR® Meat Species Identification Kit는 이것을 실현하기 위한 방법으로서 개발되었다.

미토콘드리아 DNA에 있는 cytochrome oxidase subunit I (cox I) 유전자 영역의 동물종간 다형을 토대로 원료육의 종판정을 하는 Real Time PCR용 kit이다. 이번에 리뉴얼하여 지금까지의 소, 돼지, 닭, 말, 양의 5종에 토끼를 추가한 6종의 종판별이 가능하다. 증폭, 검출장치로서는 Smart Cycler® System 또는 Smart Cycler® II System을 사용한다. 검출방법으로는 cycling probe법을 이용하고 있다.

Cycling probe법은 RNA와 DNA로 이루어진 chimera probe와 RNase H를 조합한 고감도 검출방법으로, 증폭 중이나 증폭 후의 특정 서열을 높은 특이성을 이용하여 효율적으로 검출할 수 있다.

본 kit에서는 1시료에 대해 3회 반응으로 수행하여 6종의 육종을 판정한다. 각 반응액에는 반응 control용 주형, primer 및 검출 probe (TET 표식)가 포함되어 있으며, PCR 반응 저해 유무를 확인할 수 있다.

Kit의 내용 (25 µl 반응×60 회분, 20 시료분)

TaKaRa Ex Taq® HS (5 U/µl)	15 µl (60 회분)
Tli RNase H II (200 U/µl)	30 µl (60 회분)
5× Reaction Mixture	300 µl (60 회분)
Primer Mix-1 (for beef and pork)	20 µl (20 회분)
Probe Mix-1 (for beef and pork)	20 µl (20 회분)
Primer Mix-2 (for chicken and rabbit)	20 µl (20 회분)
Probe Mix-2 (for chicken and rabbit)	20 µl (20 회분)
Primer Mix-3 (for horse meat and mutton)	20 µl (20 회분)
Probe Mix-3 (for horse meat and mutton)	20 µl (20 회분)
멸균수	1.3 ml
Control DNA for beef (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)
Control DNA for pork (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)
Control DNA for chicken (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)
Control DNA for rabbit (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)
Control DNA for horse meat (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)
Control DNA for mutton (10 ng/µl)	10 µl (10 회분)

반응 tube와 검출 형광 표식의 관계

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
FAM	소	닭	말
ROX	돼지	토끼	양
TET	반응 control	반응 control	반응 control

실험 예 1: 6종의 동물종 (control DNA)의 특이적 검출

Kit에 첨부된 control DNA를 이용하여 Smart Cycler® System으로 Real Time PCR 하여 각 동물종 DNA를 특이적 검출하였다.

Cycle 조건

Stage 1				Stage 2			
Hold				Repeat 40 times.			
Temp	Secs	Optics		3-Temperature Cycle			
95	10	Off		Temp	Secs	Optics	
				95	5	Off	
				55	10	On	
				72	15	Off	

【결과】

각 동물종의 control DNA에 대응하는 형광 signal의 증폭만 각 tube에서 확인되었다 (그림 1).

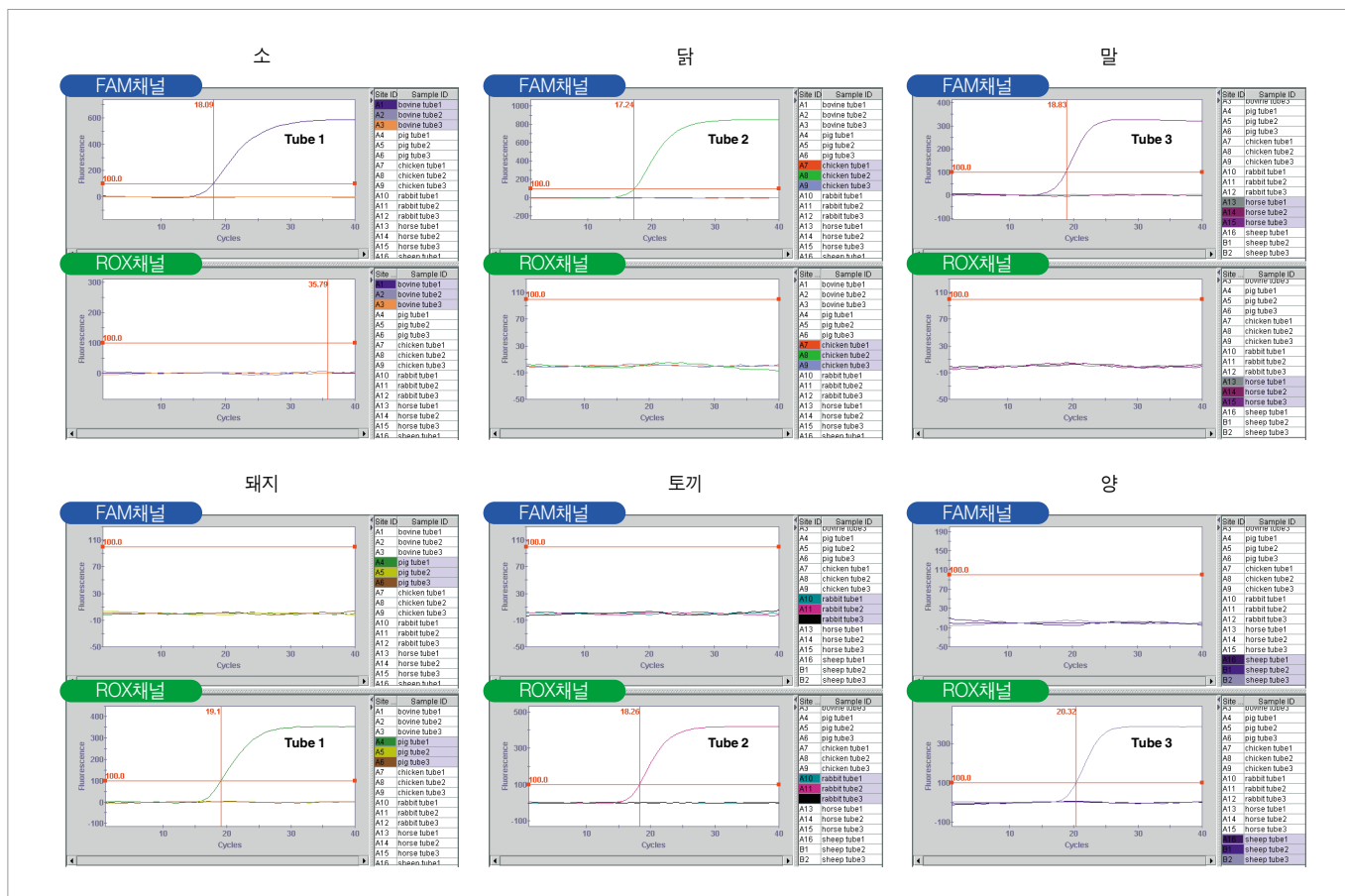


그림 1 각 동물종 control DNA의 특이적인 검출

실험 예 2: 가공식품에서 추출한 DNA를 이용한 검출

가공식품에서 시판하는 DNA 조제 kit 또는 열처리로 추출한 DNA를 시료로 이용하여 Smart Cycler® System에 의한 Real Time PCR로 원료육의 종 판별을 하였다.

【Cycle 조건】

실험 예 1과 동일.

(1) 소시지의 원료육 종판별

소세지 (원재료 돼지고기, 양고기, 닭고기로 기재)를 검체로 하고, 시판되는 DNA 조제 kit를 이용하여 조제한 DNA 20 ng (검체 약 50 µg에 상당) 또는 검체 25 mg를 100 µl의 멸균수에 넣고 95°C에서 5분간 반응한 후, 원심분리하여 상층 1 µl를 시료로 하여 검출하였다.

그림 2A, B와 같이 어떠한 방법으로 조제한 시료라도 돼지고기, 양고기, 닭고기가 소세지 재료로 사용되었음이 확인되었다. 열처리 시료에서는 DNA 추출량이 적었기 때문에 증폭이 지연되었지만, 종판별은 충분히 가능했다 (그림 2B).

(2) 어육 소시지의 검출

어육은 본 kit에 의한 육종 판별 대상외이기 때문에 어육은 검출되지 않는다. 이것을 확인하기 위해 어육 소시지에서 시판하는 DNA 조제 kit로 조

제한 DNA 시료 100 ng (검체 약 0.9 mg에 상당)를 이용해 검출해 보았다.

그림 2C와 같이 어육 소시지에서 추출한 DNA 시료에서는 예상대로 어떠한 signal도 얻을 수 없었다. 또한 그림 2D처럼 반응 control TET 채널에서는 증폭이 보여 어육 소시지에서 추출한 시료에서 signal을 얻을 수 없었던 것은 PCR 반응 저해에 의한 것이 아님이 확인되었다.

실험 예 3: 닭고기의 특이적 검출

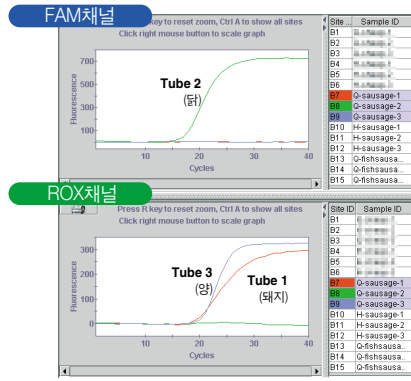
닭고기는 본 kit를 이용할 수 있는 육종판별 대상이지만, 다른 닭고기 검출에 대해서도 검토하였다. 각종 닭, 칠면조, 청둥오리에서, 시판되는 DNA 조제 kit로 조제한 각 DNA를 이용하여 Smart Cycler® System에 의한 Real Time PCR을 수행하여 검출해보았다.

【Cycle 조건】

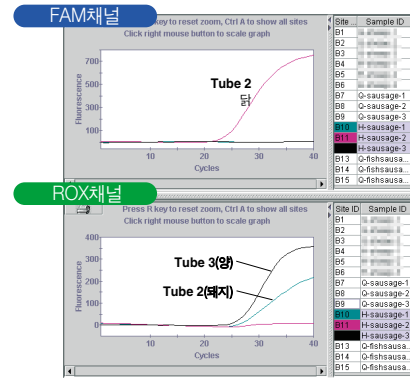
실험 예 1과 동일

결과는 그림 3과 같다. 백색 레그혼, 나고야 코친, 오크게 3종은 모두 닭 검출 signal을 얻을 수 있었다. 그러나 칠면조, 청둥오리에서는 signal을 얻을 수 없었다. 또한 칠면조, 청둥오리의 반응 control TET 채널에서는 증폭이 보여, 이 두 종의 추출 시료에서 signal을 얻지 못한 것은 PCR 반응 저해에 의한 것이 아님이 확인되었다.

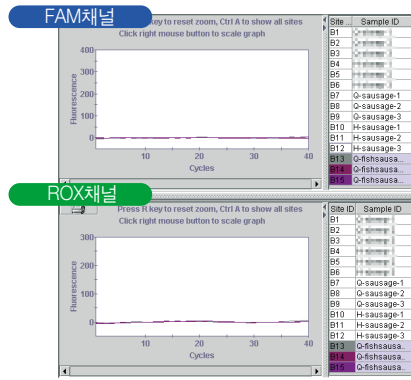
(A) 소시지/DNA 조제 kit



(A) 소시지/열처리로 추출



(C) 어육소시지/DNA 조제 kit



(C) 어육소시지/반응 control TET 채널

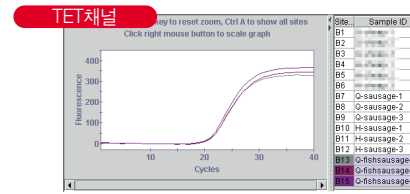
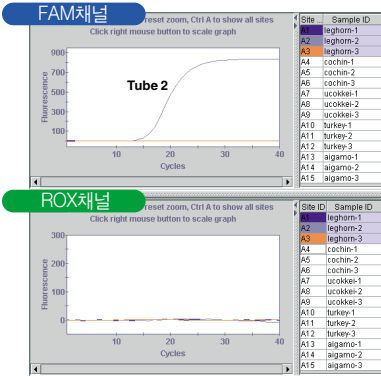
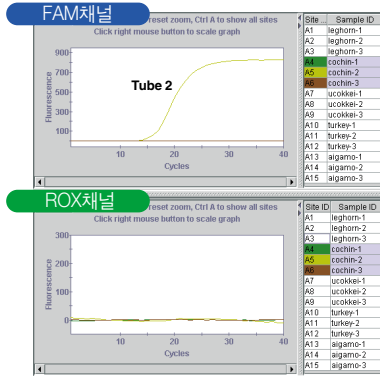


그림 2 가공식품에서 추출한 DNA를 이용한 검출

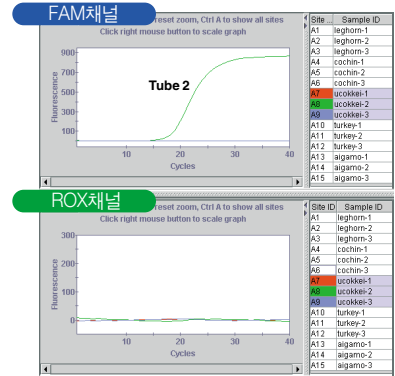
란계종
25 ng DNA (검체약 0.08 mg 상당)



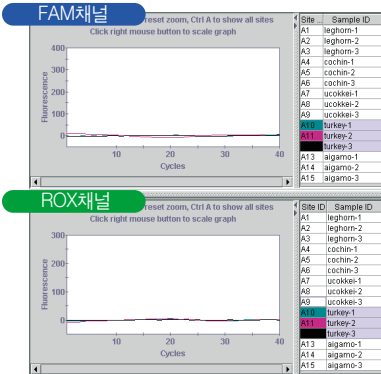
육계종
25 ng DNA (검체약 0.08 mg 상당)



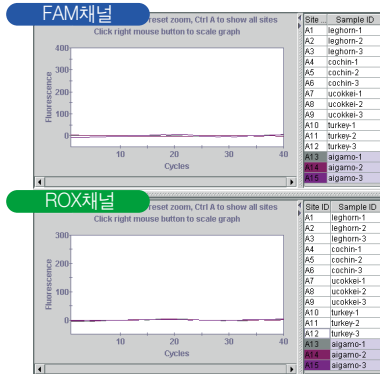
오골계
25 ng DNA (검체약 0.08 mg 상당)



칠면조
50 ng DNA (검체약 0.1 mg 상당)



청둥오리
50 ng DNA (검체약 0.1 mg 상당)



칠면조, 청둥오리
반응 control TET 채널

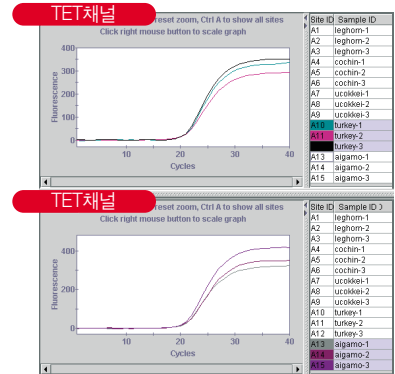


그림 3 각종 계육의 검출