

Code CY501

Takara

CycleavePCR[®] Core Kit

한글매뉴얼

본 매뉴얼은 CY501_j.v1608Da.pdf 일문매뉴얼을 토대로 한 한글 번역본입니다. 원문과 내용이 다를 경우 원문의 내용을 우선으로 합니다.

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: support@takara.co.kr

www.takara.co.kr



CycleavePCR Core Kit은 cycling probe를 검출에 이용하는 Real Time PCR 전용 제품입니다. 신속성과 정량성이 뛰어난 Real Time PCR법과 특이성이 매우 높은 cycling probe 법의 조합으로 타겟의 검출이나 정량, 1염기 다형성의 검출 등의 실험을 정확하고 간편하게 진행할 수 있습니다. 본 제품은 Thermal Cycler Dice® Real Time System II (Code TP900), Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Code SC200N 등)에서 사용할 수 있습니다.

I. 원리

CycleavePCR Core Kit는 *TaKaRa Ex Taq*® HS로 PCR 증폭을 하고, 증폭산물을 cycling probe법으로 실시간 모니터링 합니다.

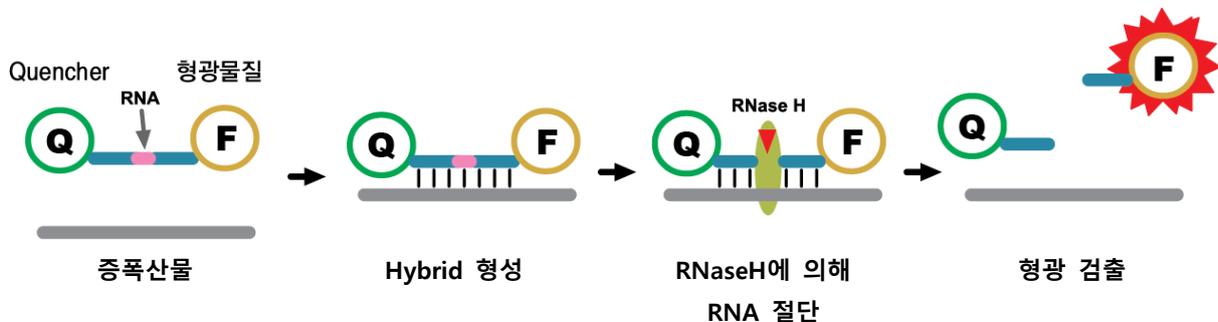
1. PCR

PCR은 미량 DNA에서 목적 유전자 단편만을 증폭시키는 기술로서 DNA의 열변성, primer annealing, DNA polymerase에 의한 신장반응의 3단계를 1 cycle로 이를 반복하여 짧은 시간 내에 목적 유전자 단편을 100만배 증폭시킬 수 있습니다.

본 제품에서는 증폭에 Hot start PCR용 효소 *TaKaRa Ex Taq* HS를 사용하여 반응액 조제 시 PCR cycle 전 비특이적인 반응, primer dimer에 의한 비특이적인 증폭을 막아 고감도의 검출이 가능합니다.

2. Cycling probe법

Cycling probe법은 RNA와 DNA로 구성된 chimera probe와 RNaseH를 이용하여 고감도로 검출하는 Real Time PCR법으로 증폭 중 또는 증폭 후의 유전자의 특정배열을 효율적으로 검출할 수 있습니다. 그 원리는 아래와 같습니다.



Cycling probe는 RNA와 DNA가 혼합되어 있는 chimera oligonucleotide로 한쪽 말단은 형광 물질로, 다른 한쪽 말단은 quencher로 수식되어 있습니다. 이 probe는 intact한 상태에서는 형광을 발하지 않지만, PCR 증폭산물과 hybrid를 형성하면 RNaseH에 의해 RNA 부분이 절단되어 형광을 발합니다. 이 형광 강도를 측정함으로써 증폭산물량을 모니터링 할 수 있습니다.

Cycling probe의 RNA에 mismatch가 존재하면 RNase H에 의한 절단이 일어나지 않기 때문에, 단일 염기의 차이도 식별할 수 있는 매우 특이성이 높은 검출방법입니다.

II. 제품구성 (50 회)

1. 10 × CycleavePCR Buffer		125 $\mu\ell$
2. dNTP Mixture	2.5 mM each	150 $\mu\ell$
3. Mg solution	25 mM	250 $\mu\ell$
4. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	5 U/ $\mu\ell$	12.5 $\mu\ell$
5. Tli RNaseH II	200 U/ $\mu\ell$	25 $\mu\ell$
6. Positive Control	10^4 copies/ $\mu\ell^{*1}$	10 $\mu\ell$
7. Positive Control primer mix	10 μM each	10 $\mu\ell$
8. Positive Control probe (FAM) ^{*2}	25 ×	10 $\mu\ell$
9. dH ₂ O		700 $\mu\ell$

*1: Positive Control은 플라스미드이며 copy 수는 OD260에서 환산한 편의상의 지표이며 반드시 실제 분자수를 나타내는 것은 아닙니다.

*2: 형광 표지 probe는 차광하세요.

본 제품 외에 필요한 시약, 기기 (주요한 것만 표기)

1. Real Time PCR 기기 (Authorized instruments)
Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code TP900/TP960)
Smart Cycler II System (Code SC200N등)
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies)외
2. Thermal Cycler Dice Real Time용 plate (Code NJ400)
Smart Cycler tube (Code SC910A/C)외
3. PCR용 primer^{*3}
4. Cycling probe^{*3}
5. Micropipette 및 tip (멸균처리한 것)

*3: Primer 및 Cycling probe 디자인은 다카라코리아 고객센터 (02-2081-2510, support@takara.co.kr)로 문의바랍니다.

III. 보존 - 20°C

IV. 특징

1. Real Time PCR과 cycling probe법은 신속하고 정확하게 PCR 반응결과를 확인할 수 있습니다. 1염기의 차이를 식별하는 SNP 분석을 위한 검출 시스템 구축도 용이합니다.
2. Hot start용 PCR 효소인 *TaKaRa Ex Taq* HS를 Real Time PCR에 최적화하여 높은 증폭효율로 고감도의 검출을 진행할 수 있습니다.

V. 주의사항

본 제품 사용시 주의사항입니다. 사용 전에 반드시 숙지하십시오.

- (1) 반응액은 모두 master mix (dH₂O, buffer, 효소 등의 혼합액)를 조제하여 사용하면 편리합니다. Master mix를 만들어 사용하면 피펫팅에 의한 시약 손실이나 시약 분주, mix 횟수가 줄어들어 정확한 양으로 분주를 할 수 있으며, 그 결과 실험데이터의 편차도 줄일 수 있습니다.
- (2) *TaKaRa Ex Taq HS*, *Tli RNaseH II* 등 효소는 거품이 발생하지 않도록 천천히 섞어주고, 사용 전에 가볍게 spin down하여 사용하십시오. 효소는 50% glycerol이 포함되어 있어 점성이 높으므로 천천히 피펫팅 하십시오.
- (3) 효소류는 사용 전 -20°C 에서 보관하고, 사용 후에는 즉시 -20°C에 보관하세요.
- (4) 시약을 분주할 때는 반드시 새 disposable tip을 사용하여 샘플간 오염을 최대한 방지하세요.

VI. 실험방법

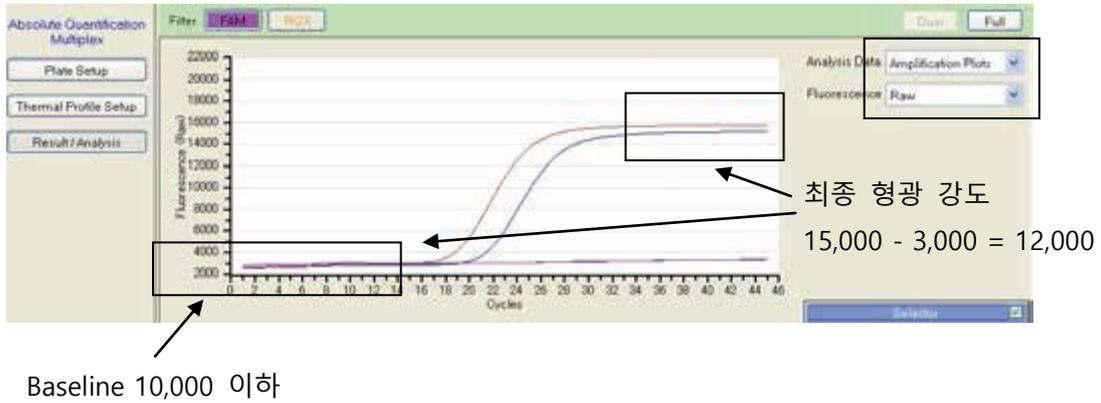
[Thermal Cycler Dice Real Time System //, Life Technologies 기기를 사용할 경우]

1. 아래의 PCR 반응액을 얼음 위에서 조제한다.
이하의 component를 필요한 반응수+ α 분을 조제하여 24 $\mu\ell$ 씩 반응튜브에 분주한다.

<1반응분량>

시약	사용량	최종농도
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 $\mu\ell$	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 $\mu\ell$	0.3 mM
Mg solution (25 mM)	5 $\mu\ell$	5 mM
PCR Forward Primer (20 μM)	0.25 $\mu\ell$	5 pmol
PCR Reverse Primer (20 μM)	0.25 $\mu\ell$	5 pmol
Cycling probe (5 μM)*	1 $\mu\ell$	
<i>Tli RNase H II</i> (200 U/ $\mu\ell$)	0.5 $\mu\ell$	100 U
<i>TaKaRa Ex Taq HS</i> (5 U/ $\mu\ell$)	0.25 $\mu\ell$	1.25 U
dH ₂ O	11.25 $\mu\ell$	
Total	24 $\mu\ell$	

*: Cycling probe는 일반적으로 1반응당 5 pmol을 사용하지만, 사용량은 signal 강도에 따라 조절할 것을 권장합니다. Thermal Cycler Dice Real Time System // 이용시 result/analysis data창의 amplification plots을 raw data로 했을 때 background (baseline의 발광 신호 강도)가 10,000 이하, 최종 형광 강도에서 base line을 제외한 값이 5,000이상 30,000이하가 되도록 조정하여 사용합니다



2. 반응액을 분주하고 template를 1 μl 첨가한다.
1 μl 이상의 template을 첨가하는 경우, 그 첨가 양에 따라 dH_2O 의 양을 조절.
3. 반응 튜브를 가볍게 원심하여 Real Time PCR 기기에 셋팅하고 반응을 시작한다.
반응조건은 다음의 표를 기준으로 설정한다.

Step	온도	시간	검출	비고
Predenature	95°C	10~30초	OFF	Template이 genomic DNA인 경우 30초. 경우에 따라 1분 정도의 열변성이 필요함 (1분 이상은 반응이 안정되지 않을 수 있다). 500 bp 이하의 증폭산물은 초기 변성이 필요없는 경우도 있다.
Denature	95°C	5초	OFF	Real Time PCR의 타겟 사이즈는 일반적으로 500 bp 이하이므로 95°C에서 3~10초 정도면 충분하다.
Annealing	55°C	10~20초	OFF	비특이적 산물이 생기거나 증폭 효율이 낮은 경우에는 annealing 온도를 최적화하는 것이 필요하며, annealing 시간이 길어지면 증폭 효율이 개선되는 경우도 있다.
Extension*	72°C	30초	ON	증폭 사이즈가 100 bp 전후의 경우 30초로 충분하다.
Cycle 수	30~50 cycles			

*Life Technologies 기기의 경우

- 본 제품에는 ROX Reference Dye 가 포함되어 있지 않습니다.
<<Passive Reference>>을 none으로 설정하세요.
- Eclipse와 같은 quencher를 이용하는 경우, probe 검출설정에서 quencher를 none으로 설정하세요.
- Extension 단계에서 형광을 검출하지만 Life Technologies 기기는 기종에 따라 형광 검출에 필요한 시간이 다릅니다.
ABI 7700에서는 30초, 7000와 7300는 31초, 7500는 34초로 설정하세요.
기기 설정에 대해서는 각 기기의 설명서에 따르십시오.

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510 Fax. 02-2081-2500
E-mail: support@takara.co.kr www.takara.co.kr



[Smart Cycler II System을 사용할 경우]

1. 아래의 PCR 반응액을 얼음 위에서 조제한다.
이하의 component를 필요한 반응수+α 분을 조제하여 24 μℓ씩 반응튜브에 분주한다.

<1반응분량>

시약	사용량	최종농도
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 μℓ	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 μℓ	0.3 mM
Mg solution (25 mM)	5 μℓ	5 mM
PCR Forward Primer (20 μM)	0.25 μℓ	5 pmol
PCR Reverse Primer (20 μM)	0.25 μℓ	5 pmol
Cycling probe (5 μM)*	1 μℓ	
Tli RNase H II (200 U/μℓ)	0.5 μℓ	100 U
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μℓ)	0.25 μℓ	1.25 U
dH ₂ O	11.25 μℓ	
Total	24 μℓ	

*: Cycling probe는 일반적으로 1반응당 5 pmol을 사용하지만, 사용량은 signal 강도에 따라 조절할 것을 추천합니다. Smart Cycler에서는 형광 강도가 300~500 정도가 되도록 조정하여 사용합니다

2. 반응액을 분주하고 template를 1 μℓ 첨가한다.
1 μℓ이상의 template을 첨가하는 경우, 그 첨가 양에 따라 dH₂O의 양을 조절하세요.
3. 반응 튜브를 가볍게 원심하여 Smart Cycler 기기에 셋팅하고 반응을 시작한다.
반응조건은 다음의 표를 기준으로 설정한다.

Step	온도	시간	검출	비고
Predenature	95°C	10~30초	OFF	Template이 genomic DNA인 경우 30초. 경우에 따라 1분 정도의 열변성이 필요함 (1분 이상은 반응이 안정되지 않을 수 있다). 500 bp 이하의 증폭산물은 초기 변성이 필요없는 경우도 있다.
Denature	95°C	5초	OFF	Real Time PCR의 타겟 사이즈는 일반적으로 500 bp 이하이므로 95°C에서 3~10초 정도면 충분하다.
Annealing	55°C	10~20초	OFF	비특이적 산물이 생기거나 증폭 효율이 낮은 경우에는 annealing 온도를 최적화하는 것이 필요하며, annealing 시간이 길어지면 증폭 효율이 개선되는 경우도 있다.
Extension*	72°C	10~15초	ON	증폭 사이즈가 100 bp 전후의 경우 10~15초로 충분하다. 그보다 긴 경우에는 100 bp 당 5초를 추가한다.
Cycle 수	30~50 cycles			Smart Cycler는 증폭 산물을 검출한 시점에서 반응을 종료하는 기능이 있다. 이 기능을 이용하면 보다 신속한 해석이 가능하다*

*: Smart Cyclor Software Version 2.0에서 사용할 수 있는 기능입니다. Smart Cyclor Software Version 1.2에서는 사용 불가능하지만, Smart Cyclor Software Version 2.0 Upgrade Kit (Code SC220)을 이용하여 소프트웨어 업그레이드 시 사용 가능합니다.

4. 반응 종료 후, 증폭 곡선을 확인하고 해석한다.

Smart Cyclor에서 해석방법은 Smart Cyclor 사용설명서와 이하의 실험 예를 참조하십시오.

VII. 실험 예

Positive Control에 의한 CycleavePCR 반응의 확인 (Smart Cyclor II 사용)

본 제품에 첨부된 Positive Control에서 실험과정을 확인을 할 수 있습니다.

1. PCR 반응

Positive Control primer mix와 Positive Control probe를 각각 1 μl 을 사용하여 "VI. 실험방법"에 따라 반응액을 조제하였다.

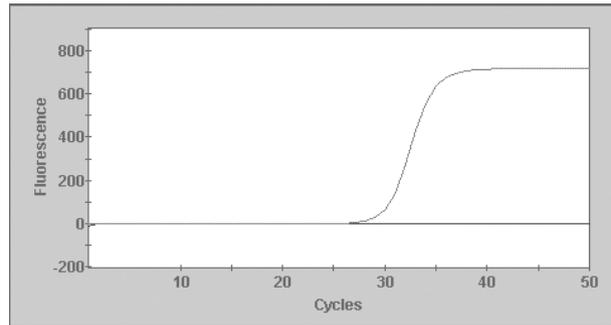
시약	사용량
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 μl
Mg solution (25 mM)	5 μl
Positive Control primer mix	1 μl
Positive Control probe	1 μl
Tli RNase H II (200 U/ μl)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μl)	0.25 μl
Positive Control	1 μl
dH ₂ O	10.75 μl
Total	25 μl

2. 반응 조건은 아래와 같이 설정한다.

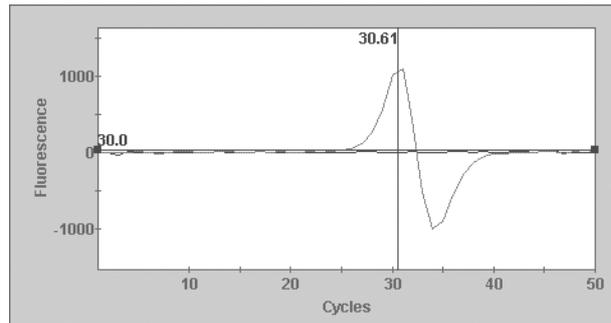
Stage 1				Stage 2	
Repeat 50 times.				Unused	
3-Temperature Cycle				Deg/Sec	Temp
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics		
NA	95.0	5	Off		
NA	55.0	10	Off		
NA	72.0	10	On		
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage					

3. Positive Control 반응 예

Positive Control을 이용한 반응에서는 아래와 같은 결과를 얻을 수 있다.



증폭곡선



2nd derivative

VIII. 발현 해석용 Primer, Cycling probe 디자인에 대해서

다카라코리아 고객센터 (02-2081-2510, support@takara.co.kr)로 문의바랍니다.

IX. 관련제품 - 원문 참조

X. 참고문헌 - 원문 참조

XI. 주의

- 본 제품은 연구용입니다. 사람, 동물의 의료/임상 진단용으로는 사용불가 합니다. 또 식품, 화장품, 가정용품 등으로 사용하지 마십시오.
- Takara Bio의 승인 없이 제품의 재판매·양도, 재판매·양도를 위한 수정, 상용 제품 제조에 사용하는 것은 금지되어 있습니다.
- 라이선스에 관한 최신 정보는 다카라코리아 고객센터 (Tel. 02-2081-2510, support@takara.co.kr) 로 문의바랍니다. .
- CycleavePCR, Thermal Cycler Dice, *TaKaRa Ex Taq*는 Takara Bio Inc.의 등록 상표입니다. *Premix Ex Taq*는 Takara Bio Inc.의 상표입니다.
기타 본 매뉴얼에 기재되어 있는 회사 이름 및 상품명 등은, 각 사의 상호 또는 등록 후 또는 미등록의 상표이며 이들은 각 소유자에게 귀속합니다.

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: support@takara.co.kr

www.takara.co.kr

