

Code RR180A

-연구용-

Takara

Bacterial 16S rDNA PCR Kit

사용설명서

v201011Da

미생물 분류는 형태적 특징, 생리·생화학적 성질과 상태, 화학 분류학적 성질과 상태 등을 이용하여 구분하는 것이 일반적이지만, 이와 같은 방법을 이용하면 많은 시간을 필요로 한다. 또한 분류가 힘든 경우나, 정확하지 못한 결과를 얻는 경우도 있다.

최근 미생물 분류에도 분자생물학적인 방법을 이용하여, 미생물이 가지고 있는 DNA를 분석하는 방법이 이용되고 있다. 그 타겟의 하나로 유전자의 길이가 비교적 길고, 기능 변화에 따른 유전자 변이의 가능성이 낮은 rDNA영역이 이용되고 있다.

이 제품에는 세균의 16S rDNA영역내의 특정 부분(약 1.5 kb)을 증폭하기 위한 시약 및 PCR에 의해 얻은 증폭산물의 서열을 분석하기 위한 primer(sequencing용)가 포함되어 있다. 16S rDNA 영역을 증폭하기 위한 PCR 효소로는 *TaKaRa Ex Taq* HS를 사용하고 있으므로, mispriming이나 primer dimer등의 비특이적 증폭을 막을 수 있다. 이 제품을 사용해 얻은 증폭 산물을 이용하여, kit내에 포함되어 있는 sequencing용 primer로 염기서열분석을 실시하여 데이터 베이스상의 배열과의 상동 검색을 하여 세균을 분류한다.

주의 : 본 제품은 세균의 종류에 따라서 적합하지 않는 경우가 있습니다.

진균류 분석에는 Fungal rDNA(D1/D2) PCR Kit(Code RR181A)를 이용하십시오.

I. 제품 구성품(25 μl PCR 반응시 50 회)

1) <i>Premix Ex Taq</i> HS (2 × conc.) ^{*1}	2×	625 μl
2) 16S rDNA Primer Mix (bacterial) ^{*2}	10×	125 μl
3) dH ₂ O		650 μl
4) Positive Control (<i>E. coli</i> DNA)	1 ng/ μl	25 μl
5) Sequencing Primer F1 (bacterial) ^{*2}	7.5 pmol/ μl	50 μl
6) Sequencing Primer F2 (bacterial)	7.5 pmol/ μl	50 μl
7) Sequencing Primer R1 (bacterial) ^{*2}	7.5 pmol/ μl	50 μl
8) Sequencing Primer R2 (bacterial)	7.5 pmol/ μl	50 μl

*1 : *TaKaRa Ex Taq* HS, reaction Buffer, dNTP mixture를 포함

*2 : 16S rDNA Primer Mix (bacteria)에 포함되어있는 primer는 Sequencing Primer F1 (bacterial) 및 Sequencing Primer R1 (bacterial)과 같다.

※ Sequencing primer의 위치는 아래 그림을 참조.

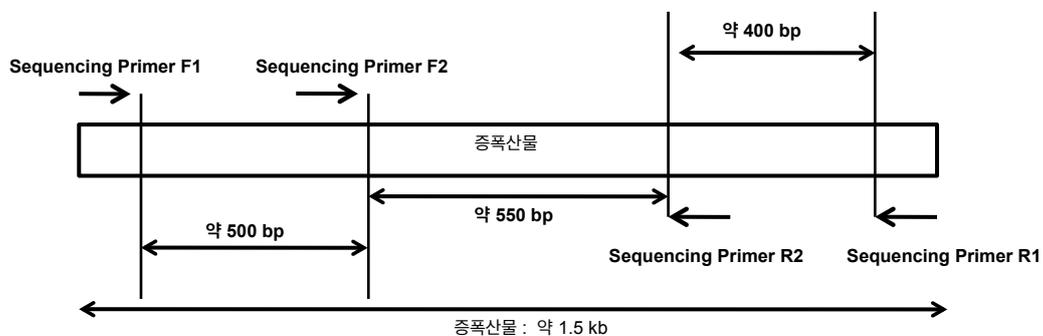


그림. 증폭산물과 Sequencing primer의 위치

II. 보존

-20°C

Premix Ex Taq HS는 동결과 용해를 반복하면 활성이 저하되므로 주의해 주세요.

녹일 때는 심하게 vortexing하지 않도록 권장하며, 녹인 후에는 inverting하여 골고루 섞어주세요.

III. 본 제품이외에 필요한 주요한 시약 및 기기

1) 유전자증폭 시스템(authorized instruments)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient/Standard(Code TP600/TP650)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini(Code TP100)

2) PCR tube

0.2 ml Hi-Tube Dome Cap(Code NJ200) 등

3) 전기영동장치

Mupid-2 plus(Code AD110)

Mupid-exU(Code AD140)

Mupid-One(Code AD160)

4) Agarose gel

Agarose L03 「TAKARA」(Code 5003)

NuSieve 3:1 Agarose(Code 50091) 등

5) DNA staining

GelStar Nucleic Acid Stain(Code 50535), SYBR Green I(Code 50512/50513), Ethidium Bromide

주) GelStar, SYBR Green I 를 사용할 경우 전용필터가 필요할 수도 있습니다.

6) Microcentrifuge

7) Micropipette, tip (autoclave 처리한 것)

IV. 실험과정

IV-1. DNA 샘플 조제

분류를 위한 균체 샘플은 colony 혹은 colony를 배양한 배양액을 사용한다. 균체 혼합물을 사용할 경우 PCR 증폭시 복수의 증폭산물이 생성될 수 있기 때문에, 염기서열분석을 통해 정확한 정보를 얻을 수 없다. 복수의 균체 혼합물의 경우, cloning을 하여 복수의 클론으로 염기서열분석을 해야 한다.

세균의 경우, 아래 조제 방법을 추천한다. IV-1-1. 「열추출에 의한 조제」로 PCR에 사용할 수 있는 DNA 샘플을 얻을 수 없는 경우에는 IV-1-2 방법을 사용한다.

IV-1-1. 열추출에 의한 조제

1. Colony에서 DNA를 조제할 경우, 멸균증류수 100 μl 를 microtube에 넣어 colony에서 채취한 균체를 현탁한다. 배양액의 경우에는 배양액 50 μl 를 microtube에 넣어, 원심분리하여 상청액을 제거한 후, 균체에 멸균 증류수 100 μl 를 첨가해 균체현탁액을 만든다.
2. 1.의 현탁액을 95°C에서 15분간 열처리한다.
3. 가볍게 원심분리하여, 상청을 샘플 DNA용액으로 사용한다.

IV-1-2. 알칼리 열추출에 의한 조제

1. Colony에서 DNA를 조제할 경우, 멸균증류수 50 μl 를 microtube에 넣어 colony에서 채취한 균체를 현탁한다. 배양액의 경우에는 배양액 50 μl 를 microtube에 넣어, 원심분리하여 상청액을 제거한 후, 균체에 멸균증류수 50 μl 를 첨가해 균체현탁액을 만든다.
2. 1.의 현탁액에 100 mM NaOH 를 50 μl 넣어 혼합 후, 95°C에서 15분간 열처리 한다.
3. 1 M Tris-HCl(pH7.0)을 11 μl 를 첨가하여 혼합한다.
4. 가볍게 원심분리하여, 상청을 샘플 DNA용액으로 사용한다.

IV-2. 16s rDNA영역 증폭

- (1) 아래 반응액을 준비한다.

약 1회 반응

Premix Ex Taq HS (2×)	12.5 μl
16S rDNA Primer Mix (bacterial)(10x)	2.5 μl
샘플 DNA 용액	1~2.5 μl^{*1}
dH ₂ O	X μl^{*2}
<hr/>	
	25 μl

*¹: 샘플 DNA용액 이외의 component로 먼저 premix로 반응액을 만들어, 0.2 ml tube에 분주한 후 넣는다. 샘플 DNA용액의 조제법에 따라서 PCR을 저해할 가능성이 있다. 그 경우, 사용한 샘플의 DNA용액량을 줄이기 위해 멸균수로 희석하여 사용하는 등, 검토가

필요한 경우도 있다.

*² : 사용하는 샘플 DNA용액의 양에 따라 최종 반응 용량이 25 μ l가 되도록 함.

반응 후 전기영동 및 정제 후 얻은 증폭산물양이 염기서열 분석에 부족하다고 판단할 경우, 반응액을 늘려서 반응한다.

(2) 조제한 반응액을 0.2 ml 튜브에 분주한다.

(3) 샘플 DNA용액을 첨가해 Thermal Cycler에 세팅한다.

필요에 따라서, Negative Control로 샘플 DNA용액 대신 멸균수를 첨가한 반응과 Positive Control로 Positive Control(*E. coli* DNA)를 1 μ l 첨가한 것을 별도로 준비한다..

(4) 이하의 조건으로 PCR 를 실시한다.

94°C 1 min

↓

94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 1 min

} 30 cycles*³

↓

72°C 3 min

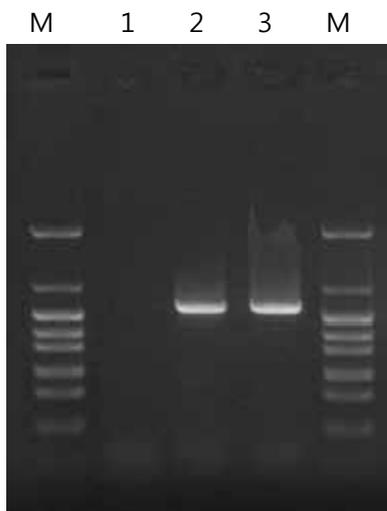
*³ : PCR 증폭 산물을 늘리기 위해서 cycle 수를 늘리는 것도 가능하지만, negative Control의 background가 나타날 확률이 있다.

반응 종료후, 분석하기 전까지 보관할 경우 -20°C에 보존한다.

IV-3. 증폭산물 확인

반응 종료 후, 반응액 일부를 agarose gel에 전기영동한다(1% agarose gel 등).

Positive Control 및 샘플 DNA용액을 이용했을 경우, 약 1.5 kb(~약 1.7 kb)의 증폭산물을 얻을 수 있고, negative Control에서는 증폭 산물이 없는 것을 확인한다.



1 : Negative Control

2 : 샘플 DNA 용액

3 : Positive Control

4 : pHY Marker

1 % agarose

IV-4. DNA 증폭산물 정제

증폭 산물을 전기 영동으로 확인한 후, 염기서열분석을 위해 PCR 반응액을 정제해야 한다. 약 1.5 kb(~약 1.7 kb)의 단일 밴드를 얻을 수 있었을 경우, PCR Purification Kit를 사용하여 정제한다. 약 1.5 kb(~약 1.7 kb)이외의 비특이적 밴드가 합성되었을 경우에는 전기 영동 후, agarose gel에서 목적단편을 회수해 정제한다(Gel Extraction Kit사용). 정제 후, A260의 흡광도를 측정하여 정제한 증폭산물을 정량한다.

IV-5. DNA 증폭 산물의 염기서열 분석

정제한 증폭 산물의 염기서열을 분석한다.

Sequencing용 primer는 4 종류가 있으며, 「제품 구성품」에 있는 각 primer의 위치를 확인하고 적합한 primer를 선택하여 사용한다.

< Sequencing Primer의 선택 >

◎ 단일해석

- Sequencing Primer F1과 Sequencing Primer R1, 2종류의 primer로 증폭산물 전체의 염기서열을 분석하는 것은 가능하지만, 가운데 부분의 정확도가 약간 떨어질 수도 있다.
- 위 2 종류와 Sequencing Primer F2 혹은 Sequencing Primer R2 둘 중의 하나를 더하여 3 종류의 primer를 사용하면, 보다 정확도가 높은 결과를 얻을 수 있다.

◎ 중복해석

Sequencing Primer F1, Sequencing Primer F2, Sequencing Primer R1, Sequencing Primer R2, 4 종류의 primer를 사용한다. 정확도가 높은 염기서열을 얻을 수 있다.

IV-6. 염기서열 정보분석

분석하여 얻은 염기서열 정보를 데이터 베이스상의 배열과 상동성 검색하여, 세균의 종류를 유추한다.

< 참고 정보 >

BLAST 검색은 BLAST 알고리즘을 실행하는 프로그램을 다운로드하여 이용한다.

NCBI BLAST : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

또, NCBI 나 DDBJ의 인터넷상에서도 사용할 수 있다.

NCBI : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

DDBJ : <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>

V. Troubleshooting

PCR 산물이 확인되지 않는다.

- Protocol에 따라서 증폭을 실시했으나, 충분한 증폭량을 얻지 못했다
 - DNA 조제에 사용하는 균체량을 늘려 주세요.
 - 다른 DNA 샘플 조제 방법을 시험해 보세요.
- PCR 반응이 저해되었다.
 - 조제한 DNA 샘플을 희석해 사용해 주세요.

- 대상 미생물이 진균류이다.
- 진균류 증폭전용 제품(Fungal rDNA (D1/D2) PCR Kit)를 사용해 주세요.

VI. 관련 제품

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient/Standard(Code TP600/TP650)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini(Code TP100)

0.2 ml Hi-Tube Dome Cap(Code NJ200)

Fungal rDNA (D1/D2) PCR Kit(Code RR181A)

VII. 주의

- 본 제품은 연구용 시약입니다. 사람,동물등에 대한 의료, 임상진단에는 사용할 수 없습니다. 식품, 화장품, 가정용품등으로도 사용하지 말아 주세요.
- 다카라바이오의 승인없이 제품의 재판매, 양도 및 재판매, 양도 등을 위한 제품변형 및 상용물품제조에 사용할 수 없습니다.