

제품번호: AGTC-PB02-100 (Ver. 2.0) (100 rxn)  
 제조날짜: 20XX. XX. XX  
 로트번호: XXXXXX-PB01-100  
 유효기일: 20XX. XX. XX

1. 설명

AquaAmp® Fish BOL Freshwater PCR Kit는 담수어류(경골어류)의 DNA 바코딩(barcoding) 영역인 미토콘드리아 cytochrome c oxidase 1 유전자(이하 'mt-co1') 영역의 PCR 증폭반응과 그 DNA 염기서열을 해독하는 데 필요한 PCR 프라이머 조합과 일체의 PCR 증폭반응액과 성분들을 포함한다. 그러나 이 분석키트는 일부 해수어류에서 사용에 제한이 있을 수 있다. 이 경우 AquaAmp® Fish BOL Marine PCR Kit (Cat. No. AGTC-PB01-100)의 사용을 권장한다.

2. 보관

이 분석키트를 냉동보관하면(-20°C) 1년 이상 활성이 안정적으로 유지된다. 구성성분들의 반복적인 녹임과 얼림은 그 활성을 떨어트리는 주요한 원인이 된다.

3. 활용

이 분석키트는 미등정 담수어류(경골어류)(성어 조직, 자치어, 어란 등)의 mt-co1 영역의 DNA 염기서열 해독과 분자동정에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 그들의 분자계통학적, 생태학적, 발생학적 연구들에 유용하다. 그러나 수산가공품(건어물, 젓갈, 통조림, 어묵 등), 식품첨가물 등 게놈 DNA 손상이 심한 시료에서는 사용에 일부 제약이 있을 수 있다.

4. 장점

1) 범용성

담수어류 mt-co1 영역의 PCR 증폭반응을 수행하는 데 필요한 순방향과 역방향 프라이머 조합(각각 3개)은 각각 미토콘드리아 유전체에서 보존성 높은 mt-co1의 상부와 하부 전령 RNA (transfer RNA) 유전자 사이트에 상보적으로 결합한다. 따라서 다양한 담수어류 시료들에서 PCR 증폭산물을 성공적으로 얻을 수 있다.

2) 편리성

순방향과 역방향 프라이머의 5' 말단에 각각 RYf2 (5'-AGTCATGCGCA TTCAGGT-3')와 YRr2 (5'-CTGACGATTACGGACTTGAC-3') 어댑터가 연결되어 있어 이들을 cycle sequencing을 위한 프라이머로 사용하면 DNA 염기서열을 편리하게 해독할 수 있다.

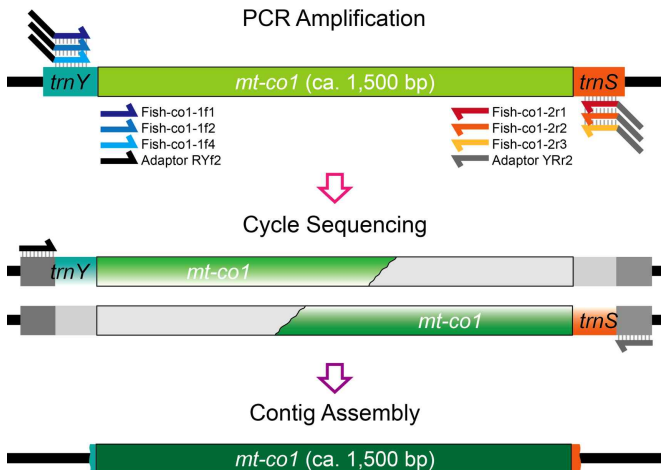


그림. AquaAmp™ Fish BOL Freshwater PCR Kit의 개념도.

3) 다독성

순방향 프라이머의 RYf2 어댑터와 역방향 프라이머의 YRr2 어댑터를 함께 사용하여 cycle sequencing을 수행하고 컨티그(contig)를 만들면 mt-co1 영역 중에서 약 1,500 bp의 DNA 염기서열을 해독할 수 있다.

5. 구성성분

- Fish BOL Freshwater PCR Premix [DNA 중합효소(0.5 U), 1× PCR 완충액, MgCl<sub>2</sub> (4 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각각 0.6 μM), 순방향 프라이머 3개와 역방향 프라이머 3개(각각 0.5 μM), 멸균증류수, loading dye (0.025% bromophenol blue)] (●)
- 양성대조물질(잉어 게놈 DNA 20 ng/μl, 10 μl) (●)
- 어댑터 2개(RYf2, YRr2, 각각 0.5 μM) (●)
- 멸균증류수(●)

6. 사용법

1) PCR 증폭반응액

이 분석키트에 포함된 Fish BOL Freshwater PCR Premix (●)와 멸균증류수(●)를 얼음 위에서 완전히 녹이고 간단히 원심한다. 준비된 게놈 DNA를 이용하여 아래와 같이 PCR 증폭반응액을 만든다.

| Reagent                            | Amount       |
|------------------------------------|--------------|
| Fish BOL Freshwater PCR Premix (●) | 20 μl        |
| Genomic DNA (2-50 ng)              | 1-5 μl       |
| Sterile water (●)                  | up to 25 μl  |
| <b>Total volume</b>                | <b>25 μl</b> |

- (1) 이 분석키트를 처음 사용할 때는 동봉된 양성대조물질(잉어 게놈 DNA)(●)을 함께 분석하여 제품의 PCR 증폭반응성을 확인한다. 양성대조물질이 첨가된 PCR 증폭반응에서 예상되는 크기의 단일 PCR 증폭산물(약 1,600 bp)이 확인되지 않는 경우 제품의 유효기일과 PCR 증폭장치의 이상 여부를 확인한다. 아무런 이상이 발견되지 않으면 아래의 주소로 연락하여 제품을 교환하거나 환불받는다.
- (2) 준비된 게놈 DNA의 흡광도값(A<sub>260/280</sub>)이 1.8-2.0의 범위이고, 농도가 2-50 ng/μl일 때 통상 이상적인 PCR 증폭반응이 일어난다.

2) PCR 증폭반응 조건

아래와 같은 조건으로 PCR 증폭반응을 수행한다.

| Step                 | Temp. | Time  | No. cycle |
|----------------------|-------|-------|-----------|
| Initial denaturation | 98°C  | 2 min | 1         |
| Denaturation         | 98°C  | 10 s  | 25-35     |
| Annealing            | 55°C  | 15 s  |           |
| Elongation           | 68°C  | 2 min |           |
| Final elongation     | 68°C  | 5 min | 1         |
| Storage              | 4-8°C | ∞     | 1         |

- (1) PCR 증폭반응의 성공 여부를 확인할 때 PCR 증폭산물에 별도의 loading dye를 혼합하지 않고 곧바로 전기영동을 수행할 수 있다.
- (2) PCR 증폭반응이 성공적으로 수행되면 약 1,600 bp 크기의 단일 PCR 증폭산물이 관찰된다. 때로 약 100 bp 이하의 저분자 smearing 밴드가 관찰되지만, 이는 프라이머 이합체들(dimers)로 PCR 증폭산물을 정제하여 사용하는 경우 cycle sequencing에 영향을 미치지 않는다.

3) DNA 염기서열 해독

전기영동을 통해 단일 PCR 증폭산물이 확인되면 순방향과 역방향 프라이머들의 5' 말단에 연결된 어댑터(각각 RYf2와 YRr2)(●)를 사용하여 cycle sequencing을 수행하고 DNA 염기서열을 해독한다.

7. 기타

- 1) AquaAmp®는 아쿠아진텍(주)의 대한민국 특허청 등록상표이다.
- 2) AquaAmp® Fish BOL Freshwater PCR Kit는 대한민국 특허청에 등록된 특허기술(제10-1955124호와 제10-2367357호)을 사용하여 제작되었다. 특허권자의 사전허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 분석키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.
- 3) AquaAmp® Fish BOL Freshwater PCR Kit는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동식물 등의 진단용으로 사용될 수 없다.