제품번호: AGTC-PG01-100 (Ver. 1.0) (100 rxn)
제조날짜: 20XX. XX. XX
로트번호: XXXXXX-PG01-100
유효기일: 20XX. XX. XX

1. 제품 설명

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit는 굴(Pacific oyster, *Magallana gigas*)의 개체 식별, 친자 확인 및 배수체(ploidy) 검증을 위한 핵심 도구로 설계된 분석 키트이다. 이 키트는 집단구조분석, 분자육종 등의 유전 연구에 필수적인 다형성 높은 마이크로새틀라이트(Microsatellite, MS) 유전좌(loci) 또는 마커를 활용한다. MS 마커는 2-10 bp 길이의 짧은 반복 단위를 가진 DNA 서열로, 높은 돌연변이율과 다양성(polymorphism)으로 인해 유전 연구에 중요하다.

MS 대립유전자(allele)는 반복 단위의 수에 따라 달라지며, 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭된 후 전기영동을 사용하여 검출된다. 높은 다형성과 멘델 유전(Mendelian inheritance)으로 인해 MS 마커는 친자 확인 및 개체 식별을 위한 최적의 마커로 활용된다.

이 키트는 생물정보학적 분석을 통해 굴 유전체 정보에서 발굴된 MS 마커 14개를 기반으로 한다. 이들은 패널 2개로 구성된 다중 PCR (multiplex PCR) 증폭을 통해 유전체 전반에 걸쳐 각 개체의 유전형(genotype)을 효율적으로 식별하고 분석하는 데 활용된다. 이 키트는 환경 DNA (environmental DNA)에서도 그 유전형을 분석할 수 있어 비침습적 배수체 검증도 가능하다.

2. 키트 개요

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit는 MS 마커 14개를 독립된 2회의 다중 PCR 반응에서 동시 증폭할 수 있다. 각 마커는 순방향과 역방향 프라이머 조합으로 구성되어 있으며, 그중 순방향 프라이머는 형광염료, 즉 FAM, HEX, TAMRA 및 ATTO 중 하나로 표지되어 있다. PCR 증폭을 통해 생산된 DNA 단편들은 ABI 3730*xl* DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.)와 같은 자동화된 전기영동장치를 사용하여 검출된다. 이 키트는 MS 마커 14개의 PCR 증폭에 필요한 모든 시약을 제공한다.

3. 키트 성능 특성

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit는 고품질 게놈 DNA (genomic DNA) 1 µL (20 ng/µL)를 PCR 증폭에 사용할 때 최적의 결과를 제공한다.

선택된 MS 마커 14개는 높은 다형성 지수(PIC = 0.787–0.943), 높은 관찰 이형접합성(Ho = 0.635–0.979) 및 낮은 null allele 빈도(Fnull ≤ 0.02)를 보인다. 또한, 굴 유생부터 성패에 이르기까지 전생활사 단계에 걸쳐 삼배체(triploid) 또는 사배체(tetraploid) 굴에 대한 배수체 검증도 가능하다.

4. MS 마커 설명

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit에 포함된 MS 마커 14개는 다음과 같다. 각 마커의 반복서열 유형 및 예상 크기 범위는 이후의 유전형 분석(genotyping)에 중요한 정보를 제공한다.

MS marker	Repeat motif	Size range (bp)	Dye
Set A			
Mgi-MS-01 (Mgi28)	$(ATCT)_{11}$	186-298	FAM
Mgi-MS-02 (Mgi24)	$(TCA)_{13}$	342-426	FAM
Mgi-MS-03 (Mgi17)	$(ACA)_{10}$	208-235	HEX
Mgi-MS-04 (Mgi02)	$(TCA)_{10}$	135-183	TAMRA
Mgi-MS-05 (Mgi07)	$(GT)_{12}$	385-423	TAMRA
Mgi-MS-06 (Mgi03)	$(CAT)_{13}$	280-358	ATTO
Mgi-MS-07 (Mgi10)	$(AC)_{10}$	191-221	ATTO
Set B			
Mgi-MS-08 (Mgi26)	$(TAA)_{12}$	221-226	FAM
Mgi-MS-09 (Mgi27)	$(ATCT)_{13}$	327-427	FAM
Mgi-MS-10 (Mgi21)	$(ATG)_{16}$	159-219	HEX
Mgi-MS-11 (Mgi30)	$(ACAT)_{13}$	370-430	HEX
Mgi-MS-12 (Mgi22)	$(TGA)_{12}$	218-260	TAMRA
Mgi-MS-13 (Mgi23)	$(ATC)_{13}$	282-372	TAMRA
Mgi-MS-14 (Mgi04)	$(AC)_{16}$	82-156	ATTO

5. 키트 구성품 및 보관 조건

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit는 MS 마커 14개를 동시 증폭하는 데 필요한 모든 시약을 포함한다. 모든 키트 구성품은 -20°C에 보관해야 한다. 반복적인 동결 및 해동은 키트 성능에 영향을 미치므로 피해야 한다. 적절하게 보관하고 취급하면 키트는 포장일로부터 1년 동안 안정적이다.

6. 키트 구성품

- MS Genotyping Master Mix [DNA 중합효소(0.5 U), 1× PCR 완충액, $MgCl_2$ (4 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각각 0.6 µM), 멸균증류수] (-20°C 보관) (●)
- MS Genotyping Panel A Primer Mix (Mgi01-Mgi07) [형광 표지 순방향 프라이머 7개와 역방향 프라이머 7개(각각 0.5 µM)] (-20°C 보관, 빛 차단) (●)
- MS Genotyping Panel B Primer Mix (Mgi08-Mgi14) [형광 표지 순방향 프라이머 7개와 역방향 프라이머 7개(각각 0.5 µM)] (-20°C 보관, 빛 차단) (●)
- MS Genotyping Control DNA [굴 게놈 DNA (20 ng/µL)] (-20°C 보관) (●)

7. 제공되지 않는 재료

AquaAmp® Pacific Oyster MS Genotyping Kit 외에도, 굴 개체 식별, 친자 확인 및 배수체 검증을 위해서는 아래에 나열된 장비와 소모품이 필요하다.

1) 게놈 DNA 추출

- 게놈 DNA 추출 소모품: 다양한 방법으로 게놈 DNA 추출을

Research use only. All rights reserved.

수행할 수 있다. 특정 장비와 소모품은 이 사용설명서에 명시되어 있지 않지만, 사용하고자 하는 추출 키트의 지침을 따른다[예: APrep™ gDNA Tissue Kit (㈜에이피바이오, 남양주시, 대한민국), DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)].

- 멸균 증류수

2) PCR 증폭

- 1회용 장갑
- 피펫 및 멸균 팁
- 0.2 mL PCR 튜브 또는 PCR 플레이트
- 고속원심분리기 또는 플레이트 원심분리기
- PCR 증폭장치[예: ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)]

3) 전기영동 및 데이터 분석

- 표준 크기 마커[예: GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Thermo Fisher Scientific, Inc.)] 또는 유사한 크기 마커
- 자동전기영동장치[예: ABI 3730*xl* DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Inc.)]
- 유전형 분석 소프트웨어[예: GeneMapper™ v.4.0 소프트웨어 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)]

4) 참고

- 게놈 DNA 추출 및 정제를 위한 구체적인 실험법은 사용자의 실험실 환경 및 시료 유형에 따라 최적화되어야 한다.
- 최적의 결과를 위해서는 고품질 게놈 DNA를 사용하는 것이 중요하다.
- 이 사용설명서는 일반적인 지침을 제공하며, 각 실험실의 표준작업절차(SOP)와 함께 사용되어야 한다.

6. 키트 사용법

1) 다종 PCR 증폭액

이 키트에 포함된 MS Genotyping Master Mix (🔵), MS Genotyping Panel A Primer Mix (🟢), MS Genotyping Panel B Primer Mix (🟡) 및 Control Genomic DNA (🔴)를 얼음 위에서 완전히 녹이고 간단히 원심한다. 준비된 굴 게놈 DNA를 이용하여 아래와 같이 PCR 증폭액을 만든다.

Reagent	Amount
MS Genotyping Master Mix (🔵)	5 µl
MS Genotyping Panel A Primer Mix (🟢) 또는 MS Genotyping Panel B Primer Mix (🟡)	14 µl
Control Genomic DNA (🔴) 또는 Pacific Oyster Genomic DNA (2 ng)	1 µl
Total volume	**20 µl**

(1) 이 키트를 처음 사용할 때는 동봉된 양성대조물질, 즉 Control Genomic DNA (🔴)을 함께 분석한다. 양성대조물질이 첨가된 다종 PCR 증폭을 통한 유전형 분석에서 부록 1의 예상되는 크기의 DNA 단편들이 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($A_{260/280}$)이 1.8-2.0의 범위이고, 농도가 1-10 ng/µl일 때 통상 이상적인 PCR 증폭반응이 일어난다.

2) 다종 PCR 증폭 조건

아래와 같은 조건으로 PCR 증폭장치에서 다종 PCR 증폭을 수행한다.

Step	Temp.	Time	No. cycle
Initial denaturation	94°C	5 min	1
Denaturation	95°C	20 s	35
Annealing	55°C	20 s	
Elongation	72°C	30 s	
Final elongation	72°C	5 min	1
Storage	4-8°C	∞	1

3) 유전형 분석

표준 크기 마커[예: GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Thermo Fisher Scientific, Inc.)]와 자동전기영동장치[예: ABI 3730*xl* DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Inc.)]를 사용하여 다종 PCR 증폭을 통해 생산된 DNA 단편들의 크기를 측정하여 유전형을 분석한다.

8. 기타

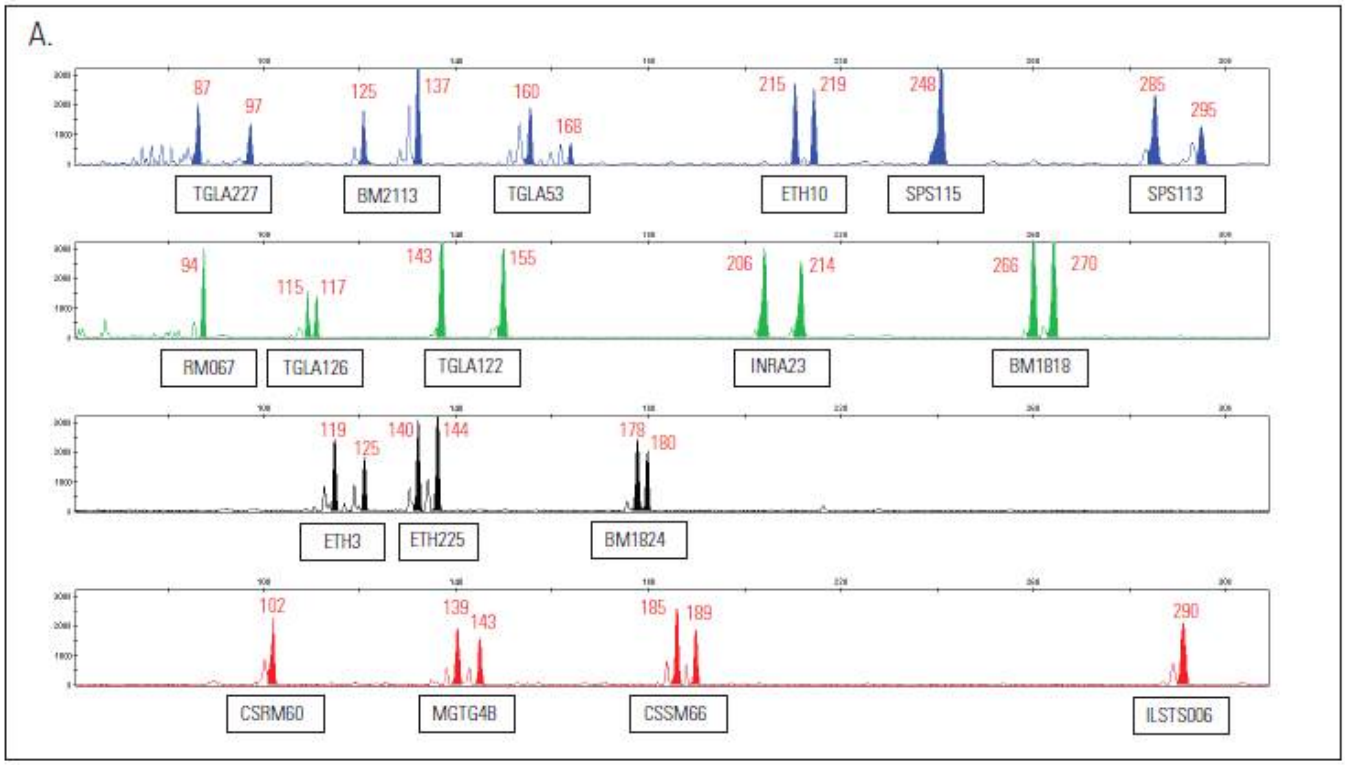
1) *AquaAmp*®는 아쿠아진텍㈜의 대한민국 특허청 등록상표이다.

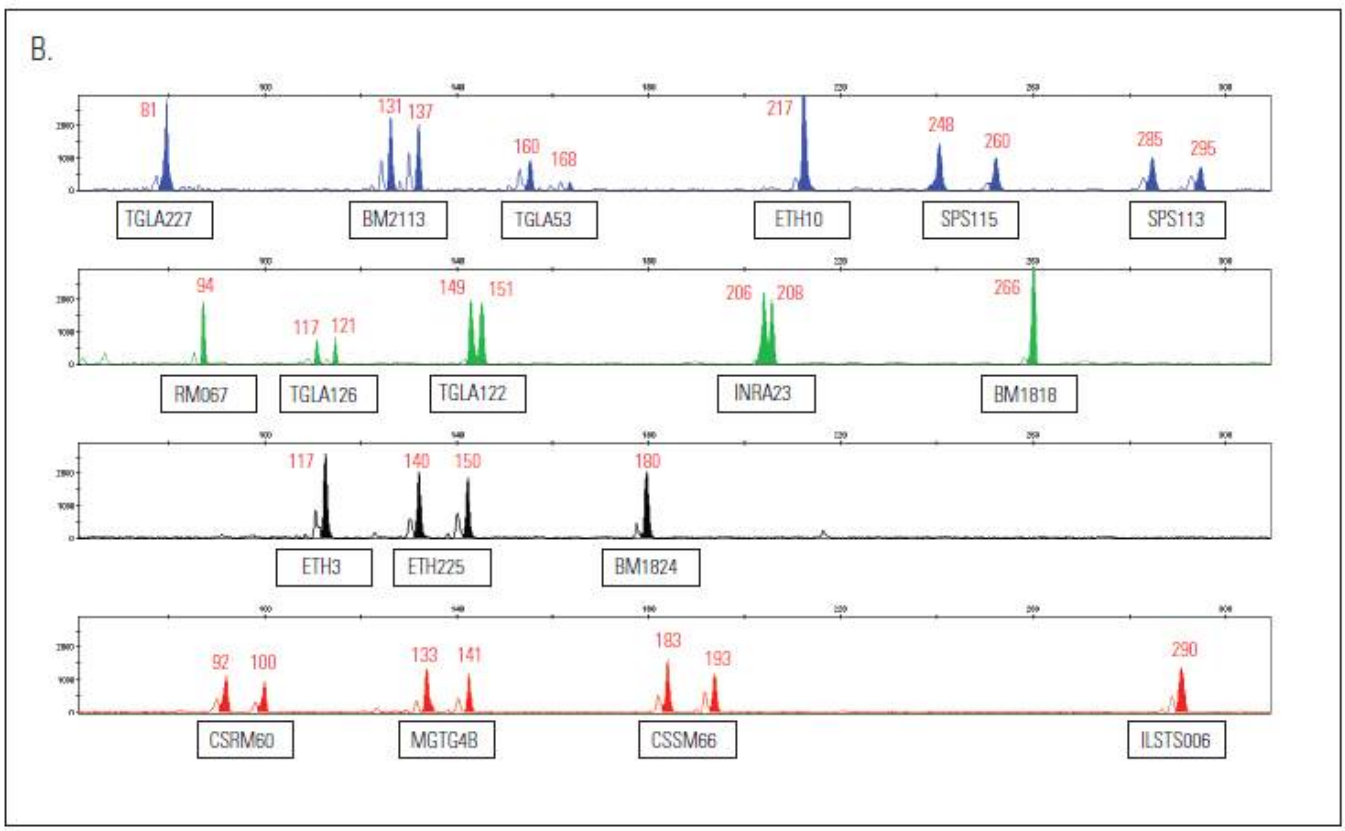
2) *AquaAmp*® Pacific Oyster msDNA Genotyping Kit는 국립해양생물자원관과 국유특허의 전용실시권 실시계약을 체결하고 이전받은 대한민국 특허청 출원기술(제10-2025-0020872호)을 사용하여 제작되었다. 특허권자의 사전허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 분석키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.

3) 이 분석키트는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동식물 등의 진단용으로 사용될 수 없다.

부록 1. 마이크로새틀라이트(Microsatellite) 마커 14개를 활용한 굴(*Magallana gigas*) 양성대조물질(Control Genomic DNA)의 다종 PCR 증폭과 자동전기영동을 통한 유전형 분석의 일례.

Research use only. All rights reserved.





Research use only. All rights reserved.