

제품코드: AGTC-PQ22-100 (Ver. 1.0) (100 rxn)

제조날짜: 20XX. XX. XX.

로트번호: XXXXX-PQ22-100

유효기일: 20XX. XX. XX.

1. 개요

AquaAmp® Gobiobotia naktongensis qPCR Kit는 형광 탐침자 (hydrolysis probe) 기반의 실시간 PCR (quantitative real-time PCR) (이하 'qPCR') 증폭반응을 통해 우리나라 한강, 임진강, 금강, 낙동강 수계에 서식하며 멸종위기 야생동물 1급으로 지정된 담수어류 흰수마자 (Gobiobotia naktongensis)를 정성적이고 정량적으로 검출하는 데 필요한 모든 성분을 포함하는 qPCR 검출키트이다.

2. 보관

-20°C에 냉동보관하는 경우 1년 동안 검출키트의 활성이 안정적으로 유지된다.

3. 활용

이 검출키트는 qPCR 증폭반응을 통해 멸종위기 흰수마자를 정성적이고 정량적으로 검출할 수 있다. 이때 그 조직에서 추출된 게놈 DNA뿐만 아니라 이들이 생육하는 하천 환경수에서 추출된 환경 DNA (environmental DNA)도 주형 DNA로 사용할 수 있다.

4. 장점

1) 특이성
 이 검출키트에 사용되는 qPCR 프라이머 조합과 탐침자는 흰수마자의 미토콘드리아 cytochrome b (cob) 유전자 영역 중 높은 종특이성을 보이는 부위에 상보적으로 결합하므로 다른 모래무지과(Gobionidae) 종들뿐만 아니라 다른 담수어류와도 반응하지 않아 특이성이 높다.

2) 보존성
 이 검출키트에 사용되는 종특이적 실시간 PCR 프라이머 조합과 탐침자는 각각 NCBI의 GenBank 데이터베이스에 등록된 흰수마자 미토콘드리아 cob 유전자 영역의 유전정보뿐만 아니라 자체적으로 확보한 흰수마자 표본에서 확보된 유전정보에서 공동으로 발견되는 DNA 염기서열에 상보적으로 결합하므로 보존성이 높다.

3) 신속성
 이 검출키트는 형광 탐침자를 사용하는 qPCR 증폭반응에 기초하므로 흰수마자를 실시간으로 분석할 수 있고 그 출현량을 정량적으로 분석할 수 있다. 분석시간은 1시간 30분 이내로 그 결과를 신속하게 확인할 수 있다.

4) 편리성
 이 검출키트는 DNA 중합효소, qPCR 완충액, dNTP mix, 흰수마자의 PCR 프라이머 조합 등을 모두 포함하는 qPCR Mastermix, 형광 탐침자, ROX™ dye, 양성대조물질, 멸균증류수를 포함한다. 따라서 흰수마자의 qPCR 증폭반응을 동시에 수행하는 데 필요한 모든 성분이 포함되어 있으므로 게놈 DNA, 환경 DNA 등만 준비되면 즉시 분석할 수 있어 편리성이 우수하다.

5. 구성성분

이 검출키트는 다음과 같은 성분으로 구성되어있다.
 Gobiobotia naktongensis qPCR Mastermix [DNA 중합효소(0.5 U), 1× qPCR 완충액, MgCl₂ (4 mM), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각 600 mM), 순방향과 역방향 PCR 프라이머(각 0.5 μM), 멸균증류수(●), 형광 탐침자(0.25 μM, 총 100 μl) (●) ROX™ Dye (○), 양성대조물질[흰수마자의 프라이머 조합과 탐침자가 결합하는 영역을 포함하는 DNA 단편이 삽입된 plasmid DNA (100,000 copies/μl, 총 10 μl) (●), 멸균증류수.

6. 사용방법

1) qPCR 증폭반응
 이 검출키트에 포함된 Gobiobotia naktongensis qPCR Mastermix (●), 형광 탐침자(●), ROX™ dye (○), 멸균증류수를 얼음 위에서 완전히 녹이고, 준비된 주형 DNA와 함께 아래의 조성표에 따라 각 성분을 튜브에 순서대로 첨가한다.

Reagent	Amount
Gobiobotia naktongensis qPCR Mastermix (●)	15 μl
Gobiobotia naktongensis hydrolysis probe (●) (FAM-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-BHQ1)	1 μl
ROX™ dye (○)	1 μl
Template DNA	1-5 μl
Sterile water	up to 20 μl
Total volume	20 μl

(1) 이 검출키트를 처음 개봉하여 사용할 때 동봉된 흰수마자의 양성대조물질(●)을 주형 DNA로 사용하는 qPCR 증폭반응을 함께 수행하여 제품의 안정성을 검증한다. 이때 예상되는 C_q 값이 확인되지 않으면 제품의 유효기일과 PCR 증폭장치의 이상 여부를 확인한다. 그 결과 아무런 이상이 발견되지 않으면 아래의 주소로 연락하여 제품을 교환받거나 환불받는다.

(2) qPCR 증폭반응에 사용되는 반응액은 cooling block (-20°C) 위에서 만드는 것을 권장한다.

(3) 주형 DNA의 질을 평가할 수 있는 흡광도값(A_{260/280})이 1.8-2.0의 범위이고, 그 농도는 2-50 ng/μl일 때 이상적인 qPCR 증폭반응이 일어난다.

2) qPCR 증폭반응 조건
 아래와 같은 조건으로 qPCR 증폭반응을 수행한다.

Step	Temp.	Time	No. cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	15 s	40
Annealing and elongation	60°C	45 s	

3) qPCR 결과해석
 이 검출키트를 사용하여 qPCR 증폭반응을 수행하여 도출된 결과(C_q 값)를 흰수마자의 DNA 단편수(copy number)로 환산하기 위해 양성대조물질(plasmid DNA (100,000 copies/μl)) (●)을 멸균증류수로 10배씩 희석하고 qPCR 증폭반응을 수행한다. 이를 통해 얻은 C_q 값과 양성대조물질의 예상되는 단편수를 바탕으로 검량선을 작성한다. 이때 상관계수(r²)은 0.90 이상이어야 한다. 또한, 흰수마자의 C_q 값이 각각 33 이상에서 검출되면 그 단편수는 10개 이하에 해당하므로 정량적 해석이 불가능하다.

7. 기타

- 1) AquaAmp®는 아쿠아진텍(주)의 대한민국 특허청 등록상표이다.
- 2) AquaAmp® Gobiobotia naktongensis qPCR Kit는 대한민국 특허청에 등록된 특허기술(제10-2293200호)이 적용되었다. 아쿠아진텍(주)은 국립생태원과 국유특허권 통상실시권 실시계약을 체결하고 이를 바탕으로 이 검출키트를 제작하였다. 특허권자의 사전허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 검출키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.
- 3) 이 검출키트는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동식물 등의 진단용으로 사용될 수 없다.