

제품번호: AGTC-PB06-100 (Ver. 1.0) (100 rxn)

제조날짜: 20XX. XX. XX

로트번호: XXXXX-PB06-100

유효기일: 20XX XX. XX

1. 설명

AquaAmp® Microalgae BOL PCR Kit I는 수생태계에서 광합성을 수행하며 일차생산을 담당하는 미세조류 중 녹조식물문(Chlorophyta) 또는 녹조류(green algae)과 돌말식물문(Bacillariophyta) 또는 돌말류(diatoms)의 DNA 바코딩(barcoding) 영역인 엽록체 ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) 유전자 영역의 PCR 증폭반응과 그 DNA 염기서열을 해독하는 데 필요한 PCR 프라이머 조합과 일체의 PCR 증폭반응액 성분을 포함하는 분석키트이다.

2. 보관

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

3. 활용

이 분석키트는 미동정 미세조류 중 녹조류와 돌말류의 엽록체 *rbcL* 유전자 영역의 DNA 염기서열을 해독하여 분자적 종식별에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 그들의 분자계통학적, 생태학적, 발생학적 연구에 유용하다.

4. 장점

가. 범용성

녹조류와 돌말류의 엽록체 *rbcL* 유전자 영역의 PCR 증폭반응을 수행하는 데 필요한 프라이머 조합은 모두 *rbcL* 유전자 영역 내부의 보존성이 높은 염기서열 부위에 상보적으로 결합한다. 따라서 다양한 분류군에 속하는 어류에서 PCR 증폭산물을 성공적으로 얻을 수 있다.

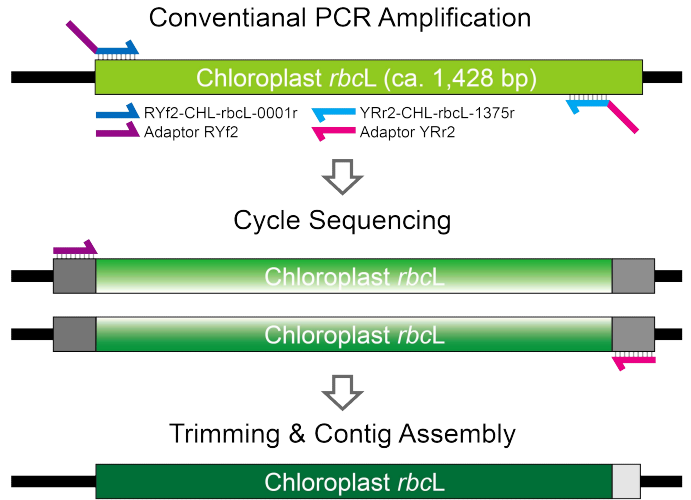
나. 편리성

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

다. 활용성

미세조류의 배양액뿐만 아니라 한천배지에서 자라난 집락, 모세관피펫을 사용하여 현미경 하에서 분리된 단세포 등의 분자동정에 편리하게 활용될 수 있다.

A) Chlorophyta



B) Bacillariophyta

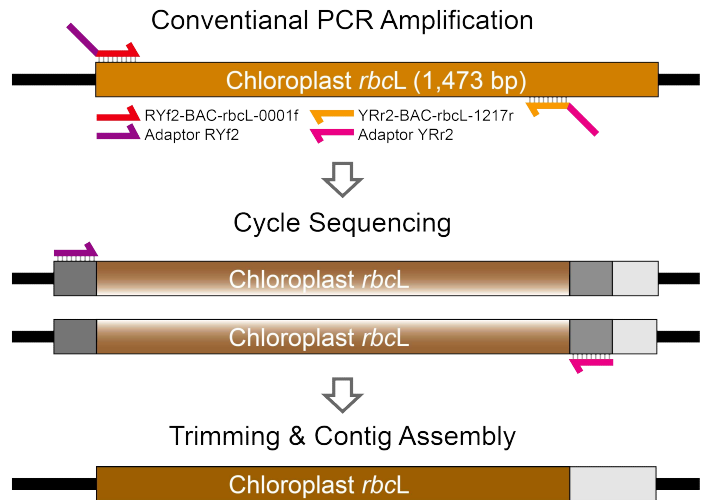


그림. AquaAmp® Microalgae BOL PCR Kit I의 녹조식물문(Chlorophyta) (A)과 돌말식물문(Bacillariophyta) (B)의 개념도.

다. 다독성

순방향 프라이머의 어댑터 RYf2와 역방향 프라이머의 어댑터 YRr2를 함께 사용하여 cycle sequencing을 수행하고 trimming 후 컨티그(contig)를 만들면 녹조류와 돌말류의 *rbcL* 유전자 영역 중에서 각각 약 1,400 bp와 1,240 bp의 DNA 염기서열을 해독할 수 있다.

5. 구성성분

- Chlorophyta BOL PCR Premix (50 rxn) [DNA 중합효소(0.5 U), 1× PCR 완충액, MgCl₂ (4 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각각 0.6 μM), 녹조류 순방향과 역방향 프라이머(CHL-rbcL-0001f와 CHL-rbcL-1375r) (각각 0.5 μM), loading dye (0.025% bromophenol blue), 멸균증류수] (●)

- Bacillariophyta BOL PCR Premix (50 rxn) [DNA 중합 효소(0.5 U), 1× PCR 완충액, MgCl₂ (4 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각각 0.6 μM), 녹조류 순방향과 역방향 프라이머(BAC-rbcL-0001f와 BAC-rbcL-1217f) (각각 0.5 μM), loading dye (0.025% bromophenol blue), 멸균증류수](●)
- 양성대조물질 2개(녹조류 *Tetraselmis chuii* 또는 돌말류 *Phaeodactylum tricornutum*의 게놈 DNA, 각각 20 ng/μl, 10 μl) (●)
- 어댑터 2개(RYf2 또는 YRr2, 각각 0.5 μM) (●)
- 멸균증류수(●)

6. 사용법

가. PCR 증폭반응액

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

Reagent	Amount
Chlorophyta BOL PCR Premix or Bacillariophyta BOL PCR Premix (●)	20 μl
Genomic DNA (2-50 ng)	1-5 μl
Sterile water (●)	up to 25 μl
Total volume	25 μl

- 1) 이 분석키트를 처음 사용할 때는 동봉된 양성대조물질(●)(녹조류 *Tetraselmis chuii* 또는 돌말류 *Phaeodactylum tricornutum*의 게놈 DNA)를 함께 분석하여 제품의 PCR 증폭반응성을 확인한다. 녹조류 또는 돌말류 양성대조물질이 첨가된 PCR 증폭반응에서 예상되는 크기의 단일 PCR 증폭산물(각각 약 1,400 bp와 1,280 bp)이 확인되지 않는 경우 제품의 유효기일과 PCR 증폭장치의 이상 여부를 확인한다. 아무런 이상이 발견되지 않으면 아래의 주소로 연락하여 제품을 교환하거나 환불받는다.
- 2) 추출된 게놈 DNA의 질을 평가할 수 있는 흡광도 값(A_{260/280})이 1.8-2.0의 범위이고, 그 농도가 2-50 ng/μl 일 때 이상적인 PCR 증폭반응이 가장 성공적으로 일어난다.

나. 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	35
Annealing	55°C	15 s	
Elongation	68°C	90 s	
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 수행된 경우 녹조류는 약 1,440 bp와 규조류는 1,280 bp 크기의 단일 PCR 증폭산물이 관찰된다. 때로 약 100 bp 이하의 저분자 smearing 밴드가 관찰되지만, 이는 프라이머 이합체(dimers)로 PCR 증폭산물을 정제하여 사용하는 경우 cycle sequencing에 영향을 미치지 않는다.

다. DNA 염기서열 해독

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

7. 기타

- 가. AquaAmp[®]는 아쿠아진텍(주)의 대한민국 특허청 등록상표이다.
- 나. AquaAmp[®] Microalgae BOL PCR Kit I는 국립해양생물자원관과 국유특허의 전용실시권 실시계약을 체결하고 이전받은 대한민국 특허청 특허기술(제 10-2022-0174506호)과 아쿠아진텍(주)의 특허기술(제 10-2367357호)을 적용하여 제작되었다. 특허권자의 사전허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 분석키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.
- 다. 이 분석키트는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동식물 등의 진단용으로 사용될 수 없다.