

제품코드: AGTC-PQ21-100 (Ver. 1.0) (100 rxn)
 제조날짜: 20XX. XX. XX.
 로트번호: XXXXX-PQ21-100
 유효기일: 20XX. XX. XX.

1. 개요

AquaAmp® *Microphysogobio rapidus* qPCR Kit는 형광 탐침자 (hydrolysis probe) 기반의 실시간 PCR (quantitative real-time PCR) (이하 'qPCR') 증폭반응을 통해 우리나라 낙동강 수계에만 서식하며 멸종위기 야생동물 1급으로 지정된 담수어류 여울마자(*Microphysogobio rapidus*)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 여울마자를 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 여울마자의 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 여울마자 미토콘드리아 *cob* 유전자 영역의 유전정보뿐만 아니라 자체적으로 확보한 여울마자 표본에서 확보된 유전정보에서 공동으로 발견되는 DNA 염기서열에 상보적으로 결합하므로 보존성이 높다.
- 3) 신속성
 이 검출키트는 형광 탐침자를 사용하는 qPCR 증폭반응에 기초하므로 여울마자를 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 증합효소, qPCR 완충액, dNTP mix, 여울마자의 PCR 프라이머 조합 등을 모두 포함하는 qPCR Mastermix, 형광 탐침자, ROX™ dye, 양성대조물질, 멸균증류수를 포함한다. 따라서 여울마자의 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.
Microphysogobio rapidus qPCR Mastermix [DNA 증합효소(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[여울마자의 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 *Microphysogobio rapidus* 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
<i>Microphysogobio rapidus</i> qPCR Mastermix (●)	15 μl
<i>Microphysogobio rapidus</i> 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 여울마자의 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 여울마자의 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, 여울마자의 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® *Microphysogobio rapidus* qPCR Kit는 대한민국 특허청에 등록된 특허기술(제10-2471933호)이 적용되어 제작되었다. 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.