For Real Time PCR · · ·

Smart Cycler® System

Smart Cycler® System(기본시스템)

TaKaRa Code SC100 1 EA

Cepheid사의 제품입니다.

당사는 미국 Cepheid사와 제휴하여 Real Time으로 정량할 수 있는 Thermal Cycler "Smart Cycler System"의 국내공급을 시작하였다.

Real time PCR은 전기영동 필요 없이 반응사이클 도중에 증폭산물을 확인하여 신속하게 정량까지 가능한 차세대 PCR법이다. Smart Cycler® 는 thermal cycler와 분광형광광도계를 일체화하여 다양하게 발전하는 PCR 기술에 유연하게 대응할 수 있는 thermal cycler이다. 본 고에서는 제품의 개요와 이를 이용한 실험예를 소개한다.

■ 시스템구성

[본체]

- Smart Cycler® Unit(16개의 I-CORE™ Module 장착)
- 제어용 computer(Windows 대응)

[표준부속품]

- Smart Cycler® Accessory Pack
  - SC용 원심분리기
  - Tube rack(SC반응 tube용)
  - Smart Cycler® 냉각 block
  - Smart Cycler® software
  - User manual
- 25 μl Smart Cycler® 반응 tube(50개)
- 100 μl Smart Cycler® 반응 tube(50개)

그림 1 Smart Cycler® System

■ 사양(Smart Cycler® Unit)

본체	:	305(W)×305(D)×250(H) mm
중량	:	10 kg
전원	:	100~240 VAC, 50~60Hz, 350W
온도제어능력	:	가열시(최대) : 10℃/초(50~95℃)
		냉각시(최대) : 2.5℃/초(95~50℃)
온도제어정도	:	±0.5℃(60~95℃)
시료 수	:	16개 시료/Unit
		최대 96개 시료/6 Units

본 제품의 사양은 성능의 개량을 위해 변경될 수도 있다.

■ 장점

(1) I-CORE™ : Smart Cycler®의 핵심(그림 2)

Smart Cycler®는 real time PCR에 필수적인 가열, 냉각, 검출 기능이 모두 하나의 I-CORE™라 불리는 module에서 이루어진다. I-CORE™ module은 가동 부분이 매우 작고 견고한 구조로 되어 있다. 한 대의 Smart Cycler®에 16개의 I-CORE™ module이 장착되어 있으며 각각의 module을 따로 제어할 수 있어 동시에 16개의 독립적인 protocol로 real time PCR을 할 수 있다. 만약 하나의 I-CORE™ module이 정상적인 작동을 하지 않을 경우라도 다른 정상적인 I-CORE™ module로 실험을 계속할 수 있다.

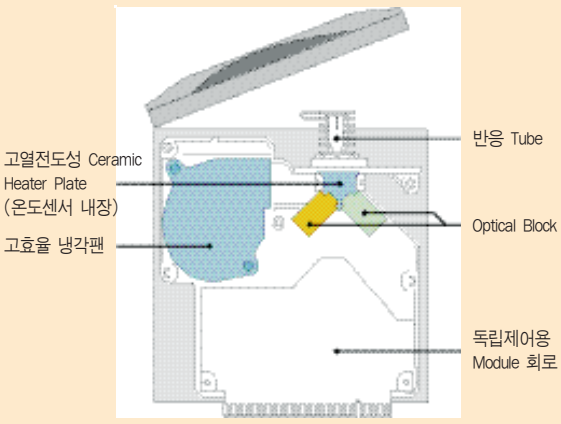

그림 2 I-CORE™ Module

A. 온도제어부

Ceramic heater로 가열하고 냉각팬에 의한 강제 공냉으로 온도를 제어한다. 반응 tube는 특수한 편평형으로 디자인하여 표면적이 넓어 온도 변화 곡선이 정확하며 반응시간을 단축할 수 있다.

B. 검출부(그림 3)

강력 발광 다이오드, 반도체 검출기 및 multi filter로 각기 다른 4종류의 형광 파장을 동시에 검출할 수 있어 multiplex PCR을 real time으로 검출 확인할 수 있다. 각 channel의 여기/형광파장은 일반적으로 사용되는 형광시약(형광 quenching 법과 Inter-chelating법) 파장으로 조정되어 있어 Molecular Beacon, TaqMan™ probe, SYBR® Green 등 시판하는 real time PCR용 시약 모두 사용할 수 있다.

표 Smart Cycler® System으로 사용 가능한 형광시약

Channel	1	2	3	4
Excitation(nm)	450~495	495~527	527~555	555~593
Emission(nm)	505~537	537~565	565~605	605~650
Simplex Dyes	FAM, SYBR® Green	TET, JOE	TAMRA, Cy3™, EtBr, Alexa	ROX, Texas Red
Multiplex Dyes	FAM	TET	TAMRA	ROX

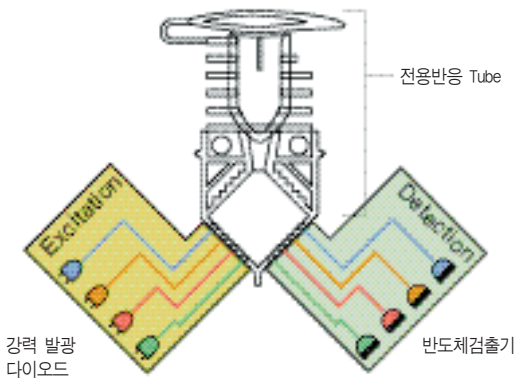

그림 3 I-CORE™ module내의 Optical Block(검출부)

(2) 콤팩트한 본체와 우수한 확장성

Smart Cycler® 본체는 가로 30.5 ㎝, 세로 30.5 ㎝, 높이 25 ㎝, 무게 10 ㎏으로 다른 real time thermal cycler에 비해 매우 작아 설치나 이동이 용이하다.

또 Smart Cycler®는 뛰어난 확장성을 가지고 있다. USB cable로 연결하여 한 대의 computer로 최대 6 unit까지 제어할 수 있어 최대 96 시료의 real time PCR이 가능하다.

실험예 1 : TaqMan™ probe를 사용한 real time PCR

Smart Cycler® System으로 TaqMan™법을 이용한 real time PCR을 실시하여 시료중의 미지농도 β-actin 유전자를 정량하였다. β-actin primer및 TaqMan™ probe로 TaqMan™ β-actin Control Reagents(Applied Biosystems사)를 사용하고 농도를 알고 있는 serial dilution한 human genome DNA를 표준으로 사용하였다.

그림 4, 5와 같이 PCR 증폭산물을 real time으로 모니터하여 증폭곡선을 얻었다(그림 4: Y축-linear scale로 표시, 그림 5: Y축-log scale로 표시). 표준 증폭이 기하급수적으로 일어나는 영역에서 일정한 증폭 산물량이 되는 cycle수(threshold Cycle)를 가로축에, 초기 표준량(log치)을 세로축에 plot하여 검량선(그림 6)을 작성하였다. 이 검량선을 토대로 미지농도 시료의 β-actin 유전자량을 산출하였다(그림 7).

[PCR 반응액]

10× *Ex Taq* Buffer(Mg^{2+} plus)	2.5 μl
50 mM $MgCl_2$	0.75 μl
β-actin Forward Primer	2.5 μl
β-actin Reverse Primer	2.5 μl
β-actin probe	2.5 μl
2.5 mM dNTP mix	2 μl
TaKaRa Ex Taq™(5 U/μl)	0.25 μl
Human Genomic DNA	2 μl
dH_2O	10 μl
Total volume	25 μl

[Cycling Conditions]

95℃ 120 sec
95℃ 15 sec
68℃ 30 sec
] 40 cycles

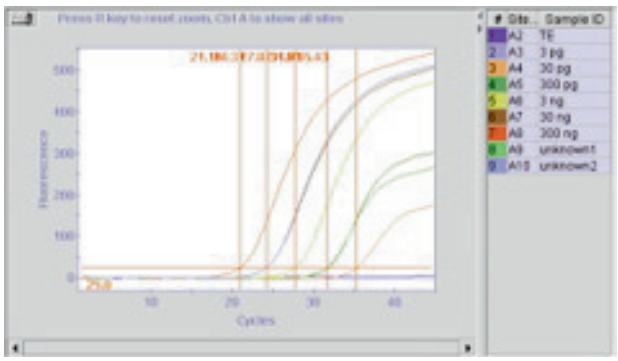

그림 4 증폭곡선(Y축을 linear scale로 표시)

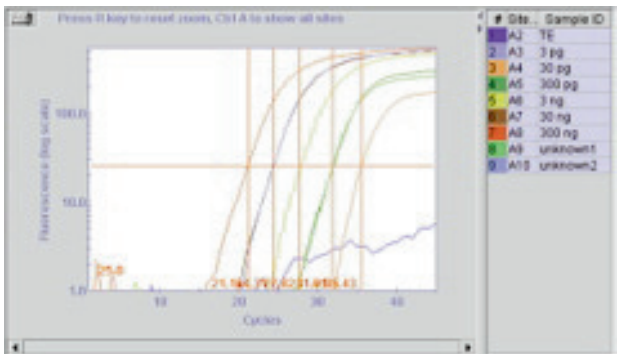

그림 5 증폭곡선(Y축을 log scale로 표시)

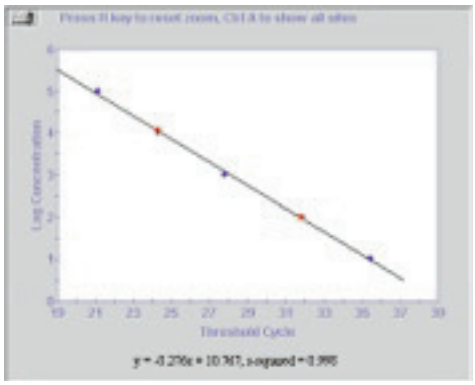

그림 6 검량선(상관계수 0.998)

#	Site ID	Protocol	Sample ID	Cnt (StdRes)	Cnt Ct	Sample Type	Status
1	A2	TaqMan B-actin	TE	0.0	0.0	STD	OK
2	A3	TaqMan B-actin	3 pg	1.0	0.0	STD	OK
3	A4	TaqMan B-actin	30 pg	10.0	35.43	STD	OK
4	A5	TaqMan B-actin	300 pg	100.0	31.91	STD	OK
5	A6	TaqMan B-actin	3 ng	1000.0	27.82	STD	OK
6	A7	TaqMan B-actin	30 ng	10000.0	24.31	STD	OK
7	A8	TaqMan B-actin	300 ng	100000.0	21.16	STD	OK
8	A9	TaqMan B-actin	unknown1	94.95	31.83	UNKN	OK
9	A10	TaqMan B-actin	unknown2	11314.35	24.31	UNKN	OK

그림 7 미지농도 시료의 정량결과
검량선에서 산출된 미지농도 시료 중 β-actin 유전자량은 unknown 1에서 약 95 copy, unknown 2 에서 약 1.1×10^4 copy였다.(3 pg=1 copy로 환산)

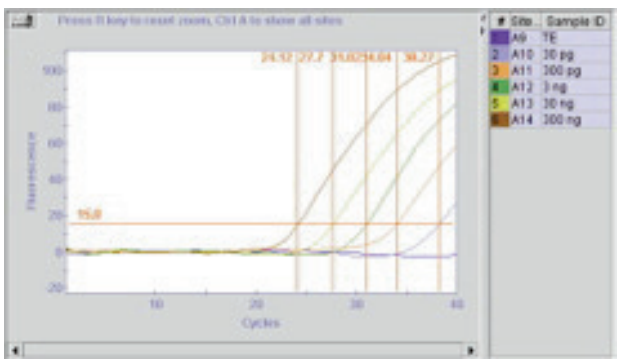

그림 8 Sentinel™ Molecular Beacon을 이용한 경우 증폭곡선

실험예 2 : Sentinel™ Molecular Beacon을 형광 probe로 이용한 real time PCR(검량선 작성)

Smart Cycler® System을 이용하여 Molecular Beacon법으로 real time PCR을 하여 GAPDH 유전자의 검량선을 작성하였다. GAPDH primer 및 GAPDH probe로 Sentinel™ Molecular Beacon GAPDH Detection Kit(STRATAGENE사)을 사용하고 이미 농도를 알고 있는 serial dilution한 human genome DNA를 표준으로 사용하였다. TaqMan™ probe 경우와 같이 Sentinel™ Molecular Beacon을 사용한 경우에도 PCR에 의한 증폭을 real time으로 모니터하여 증폭곡선을 작성한 후(그림 8) 이를 토대로 검량선(그림 9)을 작성하였다.

[PCR반응액]

10× *Ex Taq* buffer(Mg^{2+} plus)	2.5 μl
50 mM $MgCl_2$	1 μl
GAPDH Primer mix	1 μl
GAPDH Molecular Beacon	0.5 μl
2.5 mM dNTP mix	2 μl
TaKaRa Ex Taq™(5 U/μl)	0.25 μl
Human Genomic DNA	1 μl
dH_2O	16.75 μl
Total volume	25 μl

[Cycling Conditions]

95℃ 30 sec
95℃ 10 sec
58℃ 50 sec
] 40 cycles

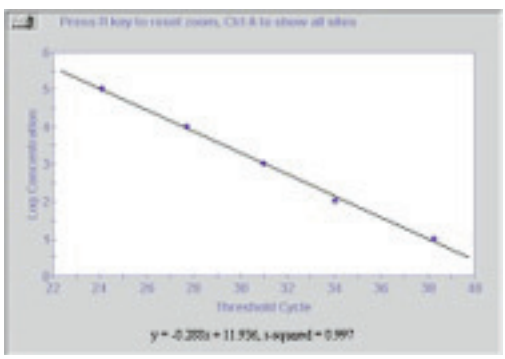

그림 9 Sentinel™ Molecular Beacon을 이용한 경우 검량선(상관계수 0.997)

실험예 3 : SYBR® Green I을 염색시약으로 이용한 real time PCR

Smart Cycler® System을 이용하여 SYBR® Green 법으로 real time PCR을 실시하였다. SYBR® Green I(TaKaRa Code F50512, F50513)을 핵산염색 시약으로 사용하여, 농도를 알고 있는 serial dilution한 human genome DNA를 주형으로 β-globin 유전자의 증폭을 real time으로 모니터하였다.

SYBR® Green I를 이용한 경우 PCR에 의한 증폭곡선(그림 10)을 그릴수 있지만 이 경우에는 target에 대한 특이성 없이 double strand DNA인 경우 모두 검출된다. 이 실험에서 주형을 첨가하지 않고 반응한 경우 비특이적 산물의 증폭으로 형광 signal이 검출되었다. 이런 경우는 PCR 반응 후 융해곡선을 조사하여 목적 단편의 증폭 여부를 확인할 수 있다. 융해곡선 분석에 의한 융해온도 산출(그림 11)은 SYBR® Green I으로 모니터한 경우에만 가능하다.

[PCR반응액]

10× *Ex Taq* buffer(Mg^{2+} plus)	2.5 μl
50 mM $MgCl_2$	0.75 μl
β-globin Forward Primer(20 μM)	0.38 μl
β-globin Reverse Primer(20 μM)	0.38 μl
SYBR® Green I(diluted)	2.5 μl
2.5 mM dNTP mix	2 μl
TaKaRa Ex Taq™(5 U/μl)	0.25 μl
Human Genomic DNA	2 μl
dH_2O	14.24 μl
Total volume	25 μl

[Cycling Conditions]

95℃ 30 sec
95℃ 10 sec ┐
68℃ 20 sec ┘ 40 cycles

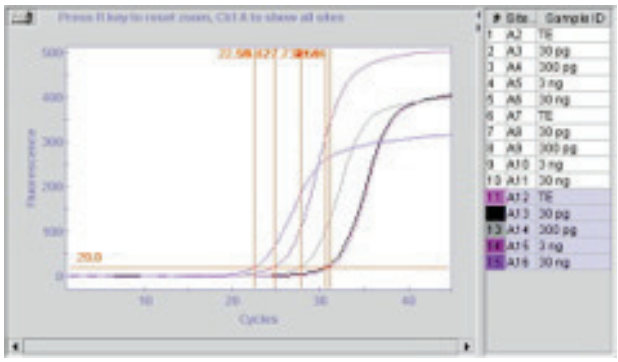

그림 10 SYBR® Green I 를 사용한 경우 증폭곡선

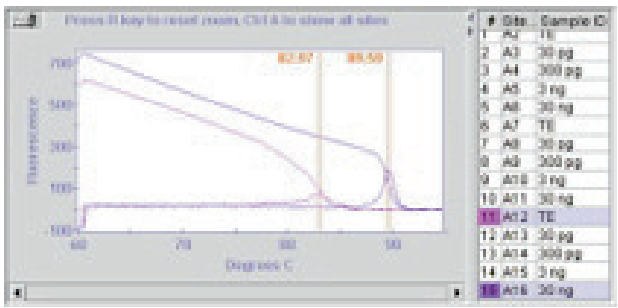

그림 11 SYBR® Green I 를 사용한 경우 융해온도의 산출
β-globin 증폭산물의 융해온도 = 89.59℃
비특이적 산물의 융해온도 = 82.97℃

■ Smart Cycler® System 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Smart Cycler® System(기본 시스템)	SC100	1대
Smart Cycler® System(2 Units model) (SC100+SC101)	SC110	1대
Smart Cycler® Unit	SC101	1대
SC용 원심분리기	SC900	1대
Tube rack(SC반응 Tube용)	SC901	4개
Smart Cycler® 냉각 Block	SC902	1개
25 μl Smart Cycler® 반응 Tube(100개)	SC910A	100개
25 μl Smart Cycler® 반응 Tube(1000개)	SC910C	1000개
100 μl Smart Cycler® 반응 Tube(100개)	SC911A	100개
100 μl Smart Cycler® 반응 Tube(1000개)	SC911C	1000개

We are actually required to include the authorization notice in its entirety which is:
"Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR)process requires a license. The Smart Cycler® System is an Authorized Thermal Cycler and may be used with PCR licenses available from PE Corporation. Its use with Authorized Reagents also provides a limited PCR license in accordance with label rights accompanying such reagents."