

1. Plant Geno-DNA-Template™의 사용예

식물 Genome DNA 추출 Kit

TaKaRa Code GA013

100회용

Plant Geno-DNA-Template™

본 제품은 Geno Technology사의 제품입니다.

Plant Geno-DNA-Template™은 식물에서 신속하게 genome DNA를 추출·정제하기 위한 kit이다. Geno Technology사에서 개발된 pinkResin™으로 genome DNA를 특이적으로 흡착한 후 용출하여 고순도 DNA를 간편하게 조제할 수 있다. 에탄올 침전 과정 없이 spin column에서 spin down만으로 추출하므로 조작시간이 대폭 단축되었다. 쌍떡잎은 물론 외떡잎 식물에서도 간단하게 고순도의 DNA를 추출할 수 있다. 본 kit로 추출·정제된 DNA를 그대로 PCR과 제한효소반응 등에 사용할 수 있다.

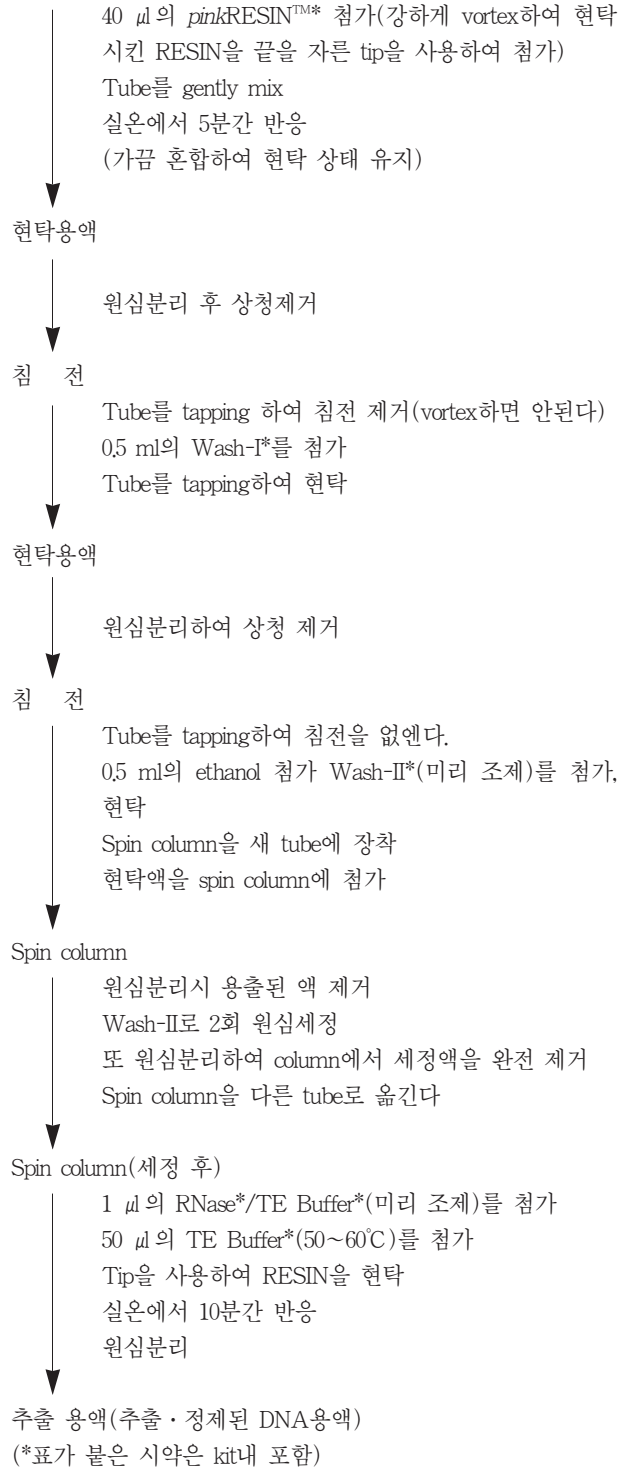
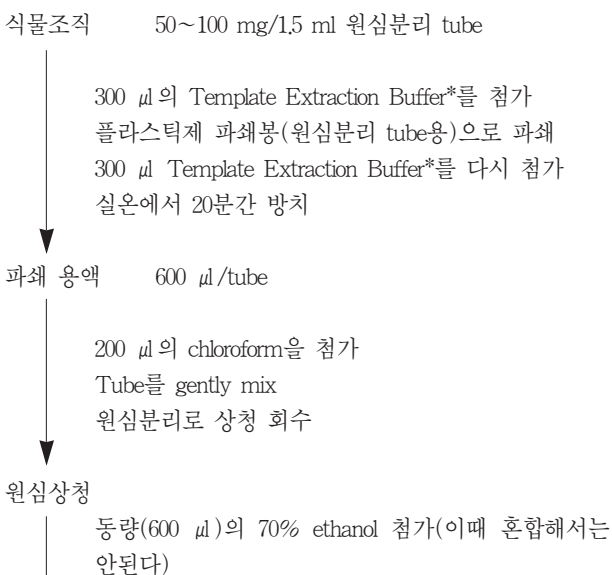
■ Kit의 내용

Template Extraction Buffer	2×30 ml
pinkRESIN™	4×1 ml
Rapid Template/Wash-I	2×50 ml
Rapid Template/Wash-II	2×100 ml
TE Buffer	1×10 ml
RNase	1 vial
Spin Columns	100 개

■ 실험예

벼(니혼바레), 애기장대, 담배(SR1), 토마토(Ailsa Craig)의 싹에서 DNA를 추출한 후 회수율과 순도를 측정하였다. 또 추출한 DNA가 제한효소 반응 및 PCR 반응의 template로 사용 가능여부를 확인하였다.

【추출·정제 protocol】



■ 결과

(1) 추출 DNA의 회수량과 순도

간단한 조작으로 고수율, 고순도의 genome DNA를 조제할 수 있으며 추출 DNA용액의 순도는 A_{260}/A_{280} 의 측정으로 확인하였다(표 1).

표 1 추출 DNA의 회수량 및 순도

	회수량($\mu\text{g/g}$ 신선조직)	A_{260}/A_{280}
벼 (<i>Oryza sativa</i>)	184	2.0
애기장대 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	81	2.1
담배 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	289	2.0
토마토 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	179	2.1

(2) 추출 DNA의 제한효소 반응

추출·정제한 각종 DNA를 그대로 제한효소 반응에 사용하였다.

그림 1과 같이 조제된 DNA는 *EcoR* I 및 *Hind* III 로 절단했을 때 효율이 높음을 확인하였다.

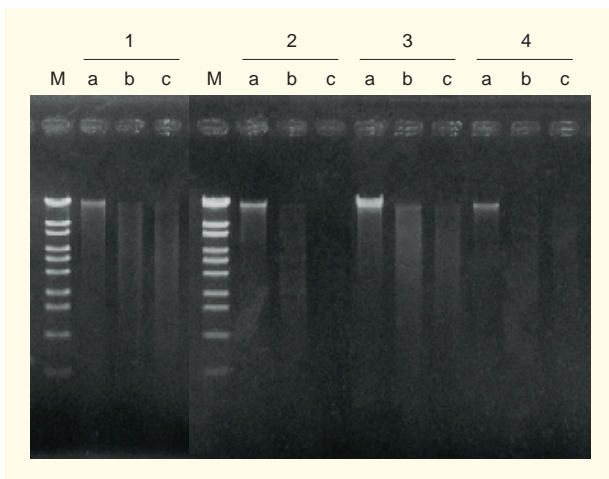


그림 1 추출·정제한 식물 genome DNA의 제한효소 반응

추출·정제 protocol에 따라 각종 식물조직 시료(약 100 mg)에서 DNA(50 μl)를 추출하였다. 그 중 일부(1 μg)를 12 U의 제한효소(*EcoR* I, *Hind* III)로 1.5시간 반응하였다. 제한효소 처리한 DNA와 미처리 DNA를 각각 500 ng씩 agarose gel로 전기영동 하였다.

전기영동조건

1% Agarose gel(Agarose L 03 「TAKARA」; TaKaRa Code 5003)

Lane

1 : 벼 2 : 애기장대 3 : 담배 4 : 토마토

a : 미처리 b : *EcoR* I 처리 c : *Hind* III 처리

M : Size marker(λ -*EcoT14* I digest ; TaKaRa Code 3401)

(3) PCR 반응

추출·정제한 각종 DNA를 그대로 PCR반응에 사용하였다.

그림 2와 같이 single copy 유전자(0.35 kbp, 2.5 kbp)의 증폭을 확인하였다.

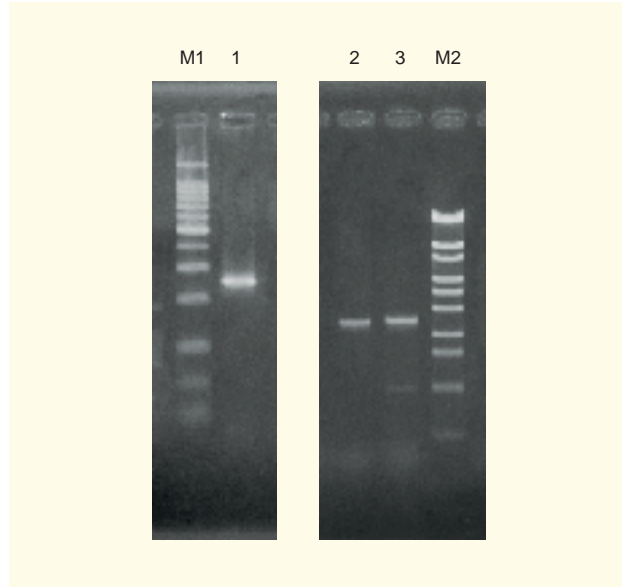


그림 2 추출·정제한 식물 genome DNA에서 single copy 유전자의 PCR 증폭

각 식물에 특이적인 Endo type Xyloglucan transferase primer를 사용하여 PCR 반응 후 agarose gel 전기영동 하였다.

전기영동조건

좌 : 3% agarose gel(NuSieve GTG® Agarose ; TaKaRa Code F50080)

우 : 1% agarose gel(Agarose L 03 「TaKaRa」; TaKaRa Code 5003)

Lane

1 : 벼 2 : 담배 3 : 토마토

M1 : Size marker(100 bp DNA Ladder ; TaKaRa Code 3407A)

M2 : Size marker(λ -*EcoT14* I digest ; TaKaRa Code 3401)

2. Real Time PCR System

Smart Cycler[®] 를 사용한 특수세균의 신속 검출

Smart Cycler[®] System (기본시스템)

TaKaRa Code SC100
본 제품은 Cepheid사의 제품입니다.

TaKaRa는 미국 Cepheid사와 제휴하여 Real time으로 정량할 수 있는 Thermal Cycler "Smart Cycler[®] System"의 판매를 시작하였다.

본 고에서는 본 시스템과 TaKaRa 특수세균검출용 Primer Set를 사용하여 장관출혈성 대장균 VT1 유전자, VT2 유전자 및 Salmonella균 *invA* 유전자를 interchelating법으로 검출한 실험예를 소개한다.

Thermal Cycler로 PCR한 후 agarose gel 전기영동으로 검출하는 보통 경우는 결과를 얻기까지 2시간 이상이 걸리지만 Smart Cycler[®]를 사용할 경우 실험 시간을 기존의 약 1/3로 단축할 수 있다.

■ 실험예

[방법]

배양용액에서 조제한 균체열 추출액(95°C, 10분 처리) 1 µl를 25 µl의 반응액에 첨가하여 real time PCR을 하였다.

[사용 primer]

- VT1 검출용 : EVT-1, 2 (TaKaRa Code S006)
- VT2 검출용 : EVS-1, 2 (TaKaRa Code S007)
- *invA* 검출용 : SIN-1, 2 (TaKaRa Code S018)

[Interchelating 시약]

- SYBR[®] Green I(TaKaRa Code F0513)

[PCR 반응액]

· 10× Z-Taq Buffer	25 µl
· SYBR [®] Green I*	1 µl
· dNTP Mixture(각 2.5 mM)	2 µl
· Primer-1(19 µM)	0.39 µl
· Primer-2(19 µM)	0.39 µl
· TaKaRa Z-Taq [™] (2.5 U/µl)	0.25 µl
· 균체열 추출액	1 µl
· dH ₂ O	17.47 µl
Total	25 µl

* : SYBR[®] Green I는 TE Buffer로 희석하여 최종농도가 20,000~30,000배 희석 되도록 반응액에 첨가

[PCR 조건] (그림1)

95°C	30초	} 35 cycles
95°C	5초	
60°C	30초	
84°C	6초*	

PCR 단계 후 60~95°C까지 0.2°C/초의 속도로 온도를 상승시켜 용해곡선을 분석

[증폭 크기]

- VT1 검출용 : 349 bp
- VT2 검출용 : 404 bp
- *invA* 검출용 : 378 bp

* 검출 단계의 온도를 비특이적 증폭산물의 용해온도보다 고온으로 설정하여 비특이적 증폭산물유래의 형광 signal을 최소한으로 낮출 수 있다(비 특이적 증폭산물의 용해온도가 목적산물보다 낮을 경우에 한함).

Stage 1				Stage 2				Stage 3			
Hold				Repeat 35 times.				Melt Curve			
Temp	Secs	Optics	Offset	3-Temperature Cycle				Start	End	Optics	Degr...
95	30	Off		Temp	Secs	Optics	Offset	60	95	Ch1	0.2
				95	5	Off					
				80	30	Off					
				84	6	On					

그림 1 Cycle 조건의 설정화면

[결과]

장관출혈성 대장균 VT1 유전자 검출하기 위하여 균체열 추출액을 첨가한 경우는 약 20 cycle에서 형광 signal이 증가하여 VT1 유전자가 검출되었다(그림 2).

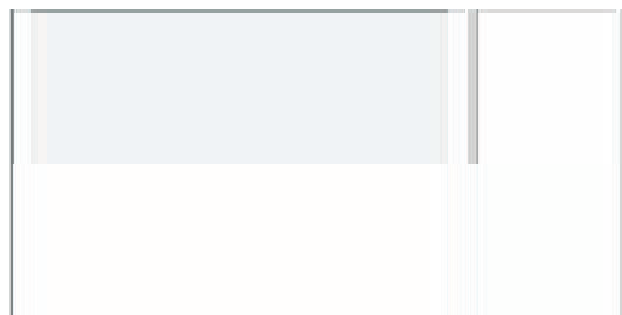


그림 2 장관출혈성 대장균 VT1 유전자 검출의 증폭곡선

#1 : Negative control
#2 : VT1(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우

또 negative control로 약간 증가한 형광 signal의 용해온도를 분석하여 비특이적 증폭산물 유래의 signal을 확인하였다(그림 3).

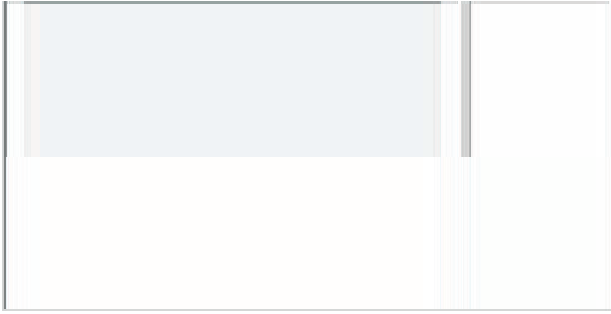


그림 3 장관출혈성 대장균 VT1 유전자 검출의 융해곡선
 #1 : Negative control(Melt Peak = 76.12°C)
 #2 : VT1(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우(Melt Peak = 87.15°C)

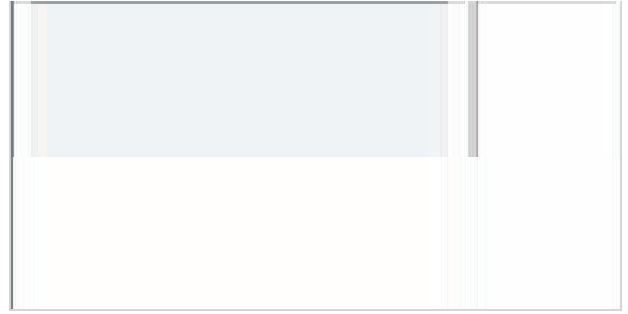


그림 6 Salmonella균 invA 유전자 검출의 증폭곡선
 #5 : Negative control
 #6 : invA(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우

위와 같이 장관출혈성 대장균 VT2 유전자 검출(그림 4, 그림 5) 및 Salmonella균 *invA* 유전자 검출(그림 6, 그림 7)에서도 목적 유전자의 검출과 비특이적 증폭산물과의 식별을 확인할 수 있었다.

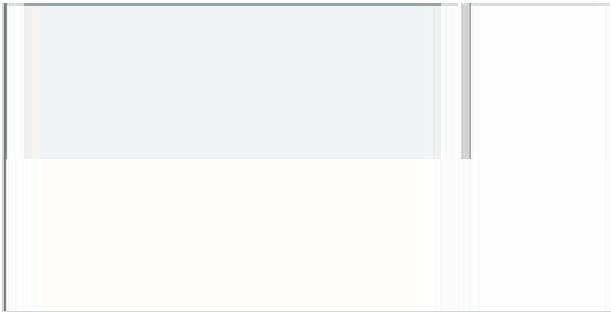


그림 4 장관출혈성 대장균 VT2 유전자 검출의 증폭곡선
 #3 : Negative control
 #4 : VT2(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우

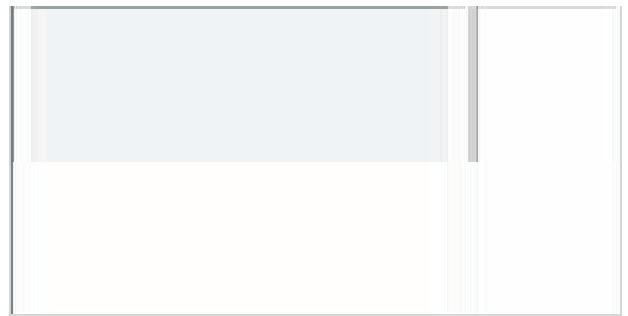


그림 7 Salmonella균 invA 유전자 검출의 융해곡선
 #5 : Negative control(Melt Peak = 76.77°C)
 #6 : invA(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우(Melt Peak = 89.29°C)

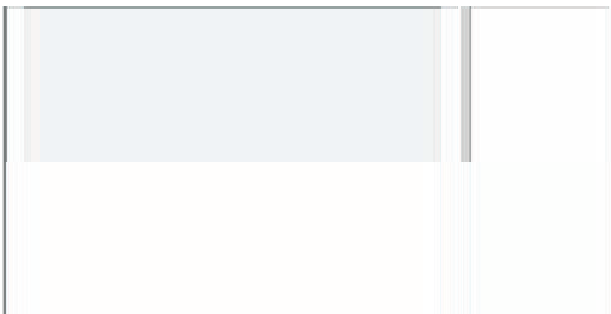


그림 5 장관출혈성 대장균 VT2 유전자 검출의 융해곡선
 #3 : Negative control(Melt Peak = 77.38°C)
 #4 : VT2(+)주의 균체열 추출액을 첨가한 경우(Melt Peak = 89.62°C)

Real Time 모니터링이 가능한 정량 PCR 시스템

Smart Cycler®

TaKaRa Code SC100

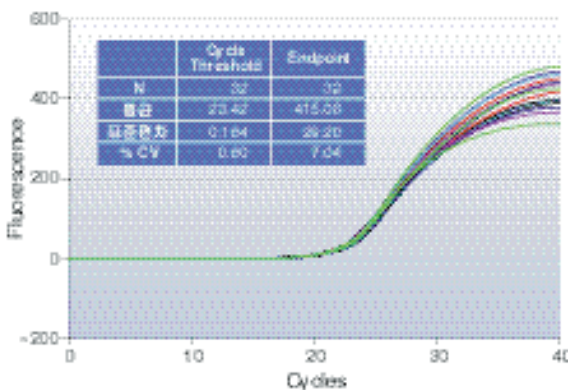
Smart Cycler®의 I-CORE™(인공지능 가열/냉각 광학 반응) 모듈로 다양한 PCR에 유연하게 대응



- ▶ 고속가열 및 냉각에 의한 증폭시간 단축
- ▶ 한대로 16개 프로그램 동시 실행
- ▶ Real time 모니터링
- ▶ 4가지 형광 detection
- ▶ 반응 블럭을 6대까지 증설 가능
- ▶ 표식 시약 및 hybridization probe 등 기존 검출 시스템 대응
- ▶ Heating : 10°C/sec, Cooling : 2.5°C/sec

재현성과 균일성의 실험 결과

각 모듈 사이의 정밀도 비교



Threshold-based Detection

