

CycleavePCR™ 탄저균 Detection Kit

TaKaRa Code RR029 48회용 (96 검체)

탄저균은 아포를 형성하는 호기성 그람양성간균(1~2×5~10 μm)으로, 2종류의 독성 plasmid(pX01, pX02)에 의해 병원성을 나타낸다.

pX01 plasmid는 3종류의 독소성분(PA: protective antigen, LE: lethal factor, EF: edema factor)을 포함하며, pX02 plasmid는 험막 성분에 관계하는 유전자(*capA*, *capB*, *capC*)를 포함하고 있다.

탄저균의 병원성은 이들 2종의 독성 plasmid를 모두 포함할 경우에 나타나며, 2종의 plasmid 중 어느 한쪽만 포함하고 있는 경우에는 병원성을 나타내지 않는다.

Life Science & Biotechnology 22호에 전기영동이나 real time PCR(interchelator법)을 이용한 탄저균 검출 kit를 소개하였으며, 본 고에서는 chimera probe나 real time PCR법을 이용한 탄저균 검출용 kit에 대해 소개한다.

■ 특징

본 kit는 pX01 plasmid PA 유전자 및 pX02 plasmid *capA* 유전자를 real time PCR법으로 검출하는 kit이다. 증폭시 Hot Start PCR용 효소, TaKaRa Ex Taq™ R-PCR을 사용하고 있어 PCR 증폭 과정 전의 mispriming이나 primer dimer 발생을 억제시켜 비특이적 증폭을 방지하여 고감도 검출이 가능하다. 검출시 cycling probe법*(그림 1)을 사용한다. Cycling probe법은 RNA(RNA 또는 chimera DNA) probe와 RNase H를 조합한 고감도 검출방법으로 증폭하는 과정이나 증폭 후의 특정 유전자를 고효율로 검출할 수 있다. Probe의 5'은 형광물질(reporter)로 3'은 형광억제물질(quencher)로 표시 되어 있다. 이 probe는 평상시에는 quenching에 의해 형광을 나타내지 않지만 상보적인 서열이 증폭산물과 hybrid를 형성하여 RNase H에 의해 RNA 부분이 절단되면 강한 형광을 나타내어 증폭 산물량을 관찰할 수 있다.

본 kit를 Smart Cycler® System(TaKaRa Code SC100)과 함께 사용하면 실시간으로 PCR이 가능하여 전기영동 없이 신속하게 결과를 얻을 수 있다(약 45분). 또 하나의 tube내에 target과 internal control(IC)이 포함되어 있어, 표시가 다른 probe를 이용하여 동시에 false negative를 관찰할 수 있다.

* ID Biomedical사로부터 cycling probe법과 DNA-RNA-DNA chimera형 핵산기술의 특허를 취득 하였다.

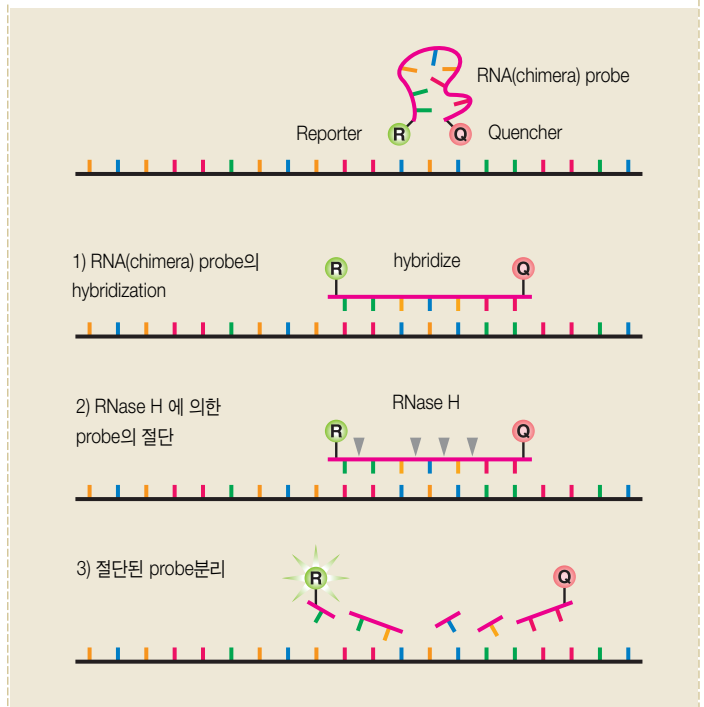


그림 1 Cycling probe법(PCR의 annealing step에서 검출)

■ 실험예

탄저균에서 추출 · 정제한 DNA 시료로 다음과 같은 실험을 하였다.

[방법]

탄저균에서 추출 · 정제한 DNA(1 ng)를 주형으로 TaKaRa CycleavePCR™ 탄저균 Detection Kit와 Smart Cycler® System으로 real time PCR법을 이용하여 탄저균의 PA 및 *capA* 유전자를 각각 검출하였다.

[반응액 조성](1개분)

5× Reaction Mixture	5.0 μl
PA or CAP Primers(3 uM each)	5.0 μl
PA or CAP Chimera Probe(25× conc.)	1.0 μl
IC Chimera Probe(25× conc.)	1.0 μl

TaKaRa Ex Taq™ R-PCR(5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II(100 U/μl)	1.0 μl
DNA(탄저균 추출정제)	1.0 μl
멸균 증류수	10.75 μl
Total	25.0 μl

주형을 제외한 위 반응액을 PA 또는 capA 검출용으로 별도 조제하고(필요한 수+1개), Smart Cycler® 전용반응 tube에 24 μ씩 분주한 후 주형 DNA를 1 μ씩 첨가하여 real time PCR하였다. 탄저균에서 추출·정제한 DNA 1 ng를 주형으로 사용하였으며, 멸균 증류수를 negative control로 사용하였다.

【Cycle 조건】

Stage 1				Stage 2			
Hold				Repeat 50 times.			
Temp	Secs	Optics		3-Temperature Cycle			
95	10	Off		Temp	Secs	Optics	
				95	5	Off	
				55	10	On	
				72	15	Off	

【결과】

● PA의 검출 (PA primer 사용)

1) Negative control 반응에서는 목적 단편(FAM channel)의 형광 signal은 볼 수 없었으며, internal control(ROX channel)의 형광 signal 증가만을 확인하였다. 이 결과에서 반응액의 contamination이 없음을 확인하였으며, 반응액 조제실수에 의한 false negative가 아닌 것을 확인하였다(그림 2).

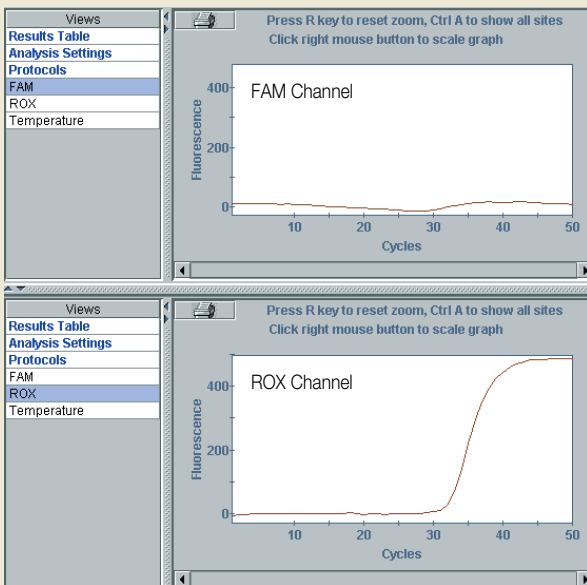


그림 2 PA negative control(멸균 증류수)의 반응증폭곡선

2) 탄저균에서 추출한 DNA를 주형으로 한 반응에서는 목적단편(FAM channel)과 internal control(ROX channel)의 형광 signal 증가를 확인하였으며, 주형에 PA 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다(그림 3).

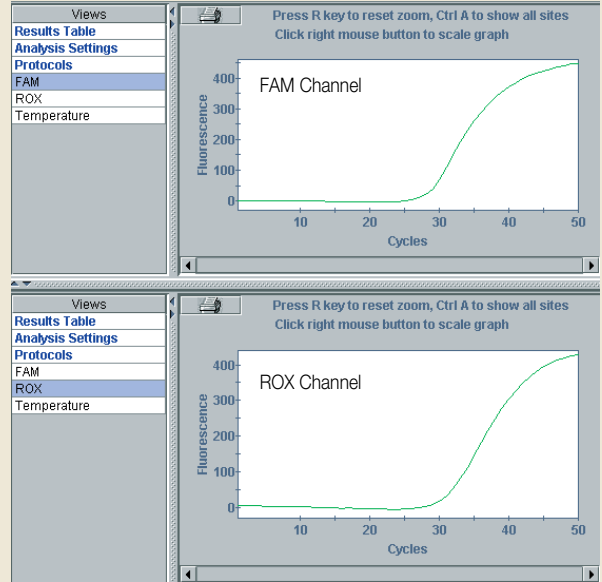


그림 3 탄저균에서 추출·정제한 DNA를 주형으로 한 경우 PA 유전자의 증폭곡선

● capA의 검출(CAP primer 사용)

1) Negative control 반응에서는 목적 단편(FAM channel)의 형광 signal은 볼 수 없었으며, internal control(ROX channel)의 형광 signal 증가만을 확인하였다. 이 결과에서 반응액의 contamination이 없음을 확인하였으며, 반응액 조제실수에 의한 false negative가 아닌 것을 확인하였다(그림 4).

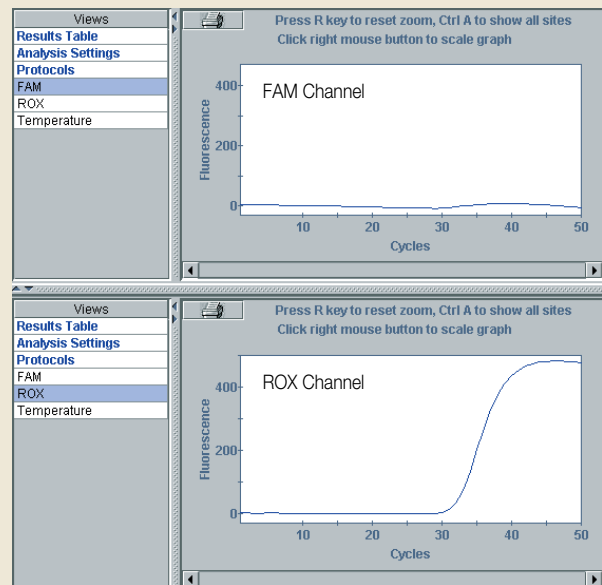


그림 4 CAP negative control(멸균 증류수)의 반응증폭곡선

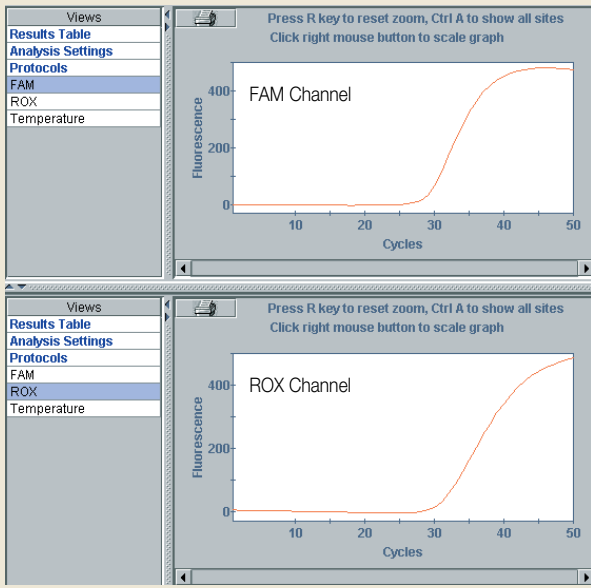


그림 5 탄저균에서 추출·정제한 DNA를 주형으로 한 경우 *capA* 유전자의 증폭곡선

2) 탄저균에서 추출한 DNA를 주형으로 한 반응에서는 목적단편(FAM channel)과 internal control(ROX channel)의 형광 signal 증가를 확인하였으며, 주형에 *capA* 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다(그림 5).

PA 또는 *capA* 유전자의 검출 결과는 Results Table(그림 6) FAM의 column에, internal control의 검출결과는 ROX의 column에 각각 NEG, POS로 표시된다. 그 결과를 판정결과표(표 1, 2)와 비교한 결과 실험에 사용한 탄저균에서 추출한 DNA는 PA 및 *capA* 유전자 양성임을 알 수 있었다.

Views	Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	ROX Std/Res	ROX Ct
Results Table	A1	Anth	NT	UNKN	CAP	OK	NEG	0.00	POS	33.46
Analysis Settings	A2	Anth	NT	UNKN	CAP	OK	NEG	0.00	POS	33.39
Protocols	A3	Anth	1 ng	UNKN	CAP	OK	POS	30.69	POS	33.36
FAM	A4	Anth	1 ng	UNKN	CAP	OK	POS	31.47	POS	33.30
ROX	A5	Anth	NT	UNKN	PA	OK	NEG	0.00	POS	33.36
Temperature	A6	Anth	NT	UNKN	PA	OK	NEG	0.00	POS	33.44
	A7	Anth	1 ng	UNKN	PA	OK	POS	30.77	POS	33.27
	A8	Anth	1 ng	UNKN	PA	OK	POS	30.76	POS	33.61

(A) (B)

그림 6 Result Table(n=2로 한 결과)

A : PA 또는 *capA* 유전자의 검출결과 B : Internal control의 검출결과

표 1 판정결과표(시료를 첨가한 반응)

		ROX Std/Res(Internal control)	
		POS	NEG
FAM Std/Res(Target)	POS	PA 또는 <i>capA</i> 양성*1	PA 또는 <i>capA</i> 양성*1
	NEG	PA 혹은 <i>capA</i> 검출한계 이하	판정불능*2

표 2 판정결과표(Negative control 반응)

		ROX Std/Res(Internal control)	
		POS	NEG
FAM Std/Res(Target)	POS	PA 또는 <i>capA</i> 의 contamination 의심*3	PA 혹은 <i>capA</i> 의 contamination 의심*3
	NEG	PA 혹은 <i>capA</i> 의 contamination은 없음	판정불능*2

*1 : Internal control의 POS/NEG에 관계없이, PA 또는 *capA* 유전자가 양성이다.

*2 : PCR 반응 또는 cycling probe 검출이 정상적으로 이뤄지지 않아 재반응 하거나 전기영동으로 판정한다.

*3 : Contamination의 의심이 있는 경우는 반응액의 조제 장소 및 사용기기의 오염여부를 확인한 후 재반응을 한다.