

# CycleavePCR™ Kit 시리즈

CycleavePCR™ Bovine Sexing Kit	TaKaRa Code CY201	50 검체용
CycleavePCR™ <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Detection Kit	TaKaRa Code CY202	50 검체용
CycleavePCR™ O157 (VT1/VT2) Detection Kit	TaKaRa Code CY203	50 검체용
CycleavePCR™ <i>Salmonella</i> Detection Kit	TaKaRa Code CY205	50 검체용
CycleavePCR™ Meat Species Identification Kit	TaKaRa Code CY204	20 검체용

본 시리즈의 kit은 Smart Cycler® System<sup>1</sup> (TaKaRa Code SC100) 등의 Real Time PCR 전용의 증폭 장치를 이용하여 검출한다. 증폭에는 hot start PCR용 효소, TaKaRa Ex Taq™ R-PCR을 사용하기 때문에 반응 전 반응액 조제 시 등에 mispriming이나 primer dimer에 유래하는 비특이적 증폭을 막을 수 있다. 또한 검출은 cycling probe법을 이용하고 있다. Cycling probe법은 RNA와 DNA로부터 만들어지는 chimera probe와 RNase H를 조합한 고감도 검출 방법으로 증폭 중 또는 증폭 후의 유전자 단편의 특정 서열을 효율적으로 검출할 수 있다. 이 방법으로 제작된 chimera probe는 RNA 부분을 사이에 두어 5' 측에는 형광 물질이, 3' 측에는 그 형광 물질을 소광하는 물질(quencher<sup>2</sup>)이 표식되어 있다. 이 probe는 intact 상태에서는 quencher의 작용보다 강하게 형광을 나타내지 않는다. 그러나 증폭산물 중에 상보적인 서열과 hybrid를 형성하는 RNA 부분이 RNase H로 절단되면, quencher가 분리되어 형광 물질이 강한 형광을 발색하게 된다 (그림 1 참조). 이 형광 강도를 측정하므로서 증폭산물량을 모니터링 하므로 전기영동이 필요없이 신속하게 결과를 얻을 수 있다.

## CycleavePCR™ Bovine Sexing Kit

Amelogenin 유전자는 X와 Y의 양쪽의 성 염색체에 위치하고 각각의 염기서열에 고유하게 자리잡고 있다. 따라서 Amelogenin X 염색체 특이적 서열만 검출되는 경우는 암컷, Amelogenin X, Y 특이적 서열 모두가 검출되는 경우 수컷으로 판정된다.

본 kit은 소의 X 염색체 특이적 서열 및 Y 염색체 특이적 서열을 검출하는 Real Time PCR용 kit이다. 본 kit에는 X 염색체 특이적 서열 검출용 ROX 표식 probe 및 Y 염색체 특이적 서열 검출용 FAM 표식 probe가 포함되어 있다 (반응 시간 약 40분).

### ●반응액 조성(1회분)

5 × Reaction Mixture	5 μl
XY Primer Mix (각 3 μM)	5 μl
XY Chimera Probe Mix (12.5 × conc. )	2 μl
TaKaRa Ex Taq™ R-PCR (5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II (200 U/μl)	0.5 μl
시료 (주형)	1 μl
멸균수	11.25 μl
Total	25 μl

## 실�험 예

Kit에 첨부된 positive control을 시료 (주형)로 하여 Smart Cycler® System으로 Real Time PCR을 수행하여 Amelogenin X · Y 특이적 서열을 검출했다.

시료 (주형) 이외의 반응 혼합액을 조제 (필요수량+1 회분)하여 Smart Cycler® 전용 tube에 24 μl씩 두 개 분주한 후, 시료를 1 μl 첨가하여 Real Time PCR을 수행했다. 시료는 kit에 첨부된 positive control과 negative control로서 멸균수를 사용했다.

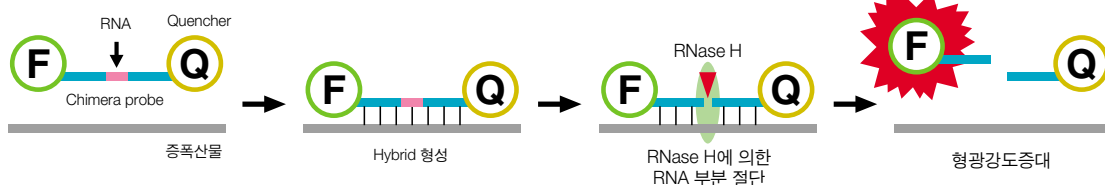


그림 1 Cycling probe법의 원리

●PCR 조건

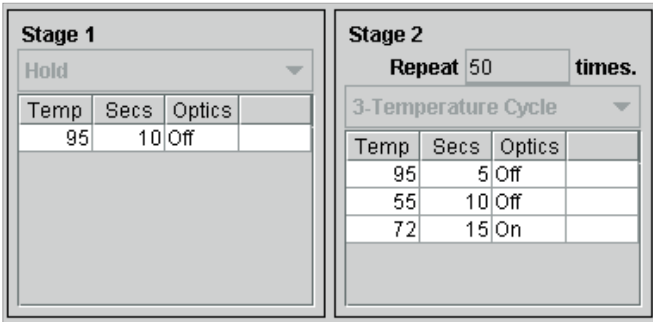


그림 2 PCR의 조건

●결과

1) X 염색체 positive control ( $1 \times 10^4$  copies)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

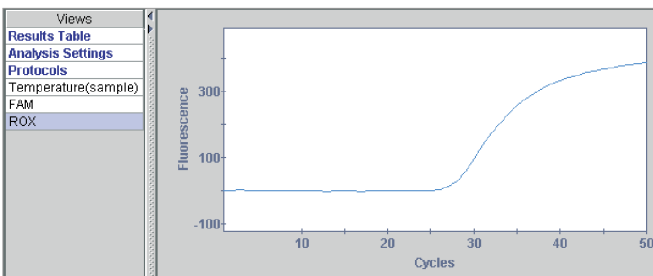


그림 3 ROX의 증폭 곡선 (X 염색체 유래 signal)

2) 멸균수 (negative control)를 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

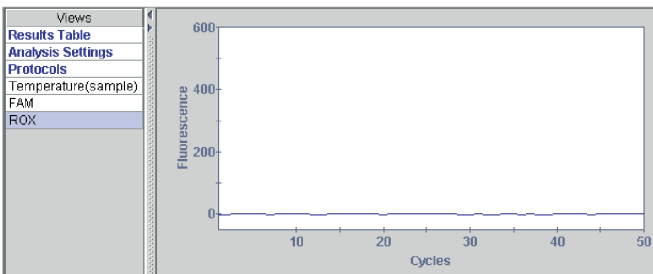


그림 4 ROX의 증폭 곡선 (X 염색체 유래 signal)

3) Y 염색체 positive control ( $1 \times 10^4$  copies)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

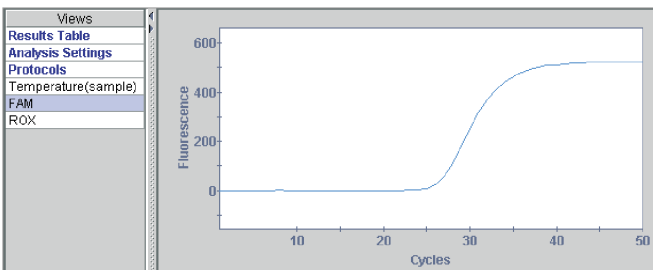


그림 5 FAM의 증폭 곡선 (Y 염색체 유래 signal)

4) 멸균수 (negative control)를 시료로 사용한 경우의 Y 염색체 유래의 증폭곡선

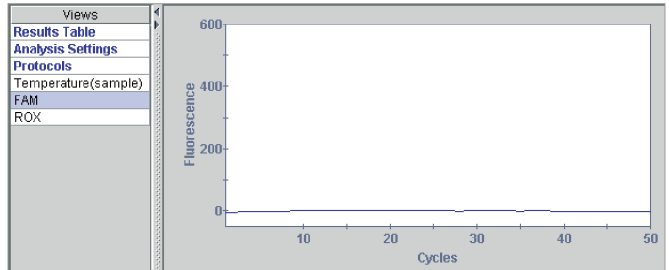


그림 6 FAM의 증폭곡선 (Y 염색체 유래 signal)

CycleavePCR™ *Mycoplasma pneumoniae* Detection Kit

*Mycoplasma pneumoniae*는 바이러스와 세균의 중간적 성질을 가지는 가장 작은 원핵생물로 호흡기계에 감염하여 폐렴이나 기관지염을 일으키는 병원균이다.

본 kit은 *Mycoplasma pneumoniae*의 ATPase Operon 유전자 영역의 특이적 서열을 Real Time PCR로 검출한다. 본 kit에는 *Mycoplasma pneumoniae* 검출용 FAM 표식 probe, internal control 및 internal control 검출용 ROX 표식 probe가 포함되어 있어 internal control에 의한 위음성의 (false negative) 판별도 가능하다(반응시간 약 30분).

본 kit의 제품화에 있어서 동경대학의 Harazawa 선생님의 협력을 받았다.

실험 예: 특이성 검사

각종 세균 (12 종류)을 시료 (주형)로 하여 Smart Cycler® System으로 Real Time PCR을 수행한 후 *Mycoplasma pneumoniae*의 ATPase Operon 유전자 영역 중의 특이적 서열을 검출했다.

●반응액 조성(1 회분)

5 × Reaction Mixture	5 μl
MP Primer Mix (각 3 μM)	2.5 μl
MP Chimera Probe Mix (12.5 × conc. )	2 μl
TaKaRa Ex Taq™ R-PCR (5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II (200 U/μl)	0.5 μl
시료 (주형)	1 μl
멸균수	13.75 μl
Total	25 μl

●PCR 조건

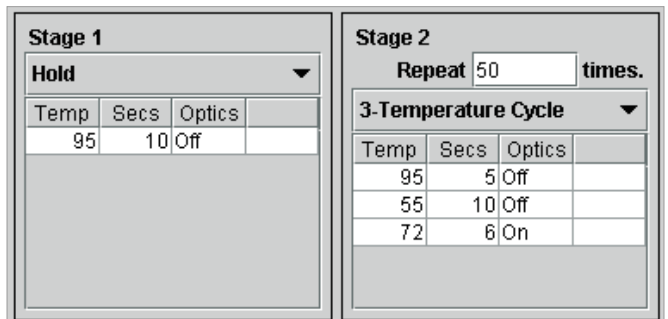


그림 7 PCR의 조건

●결과

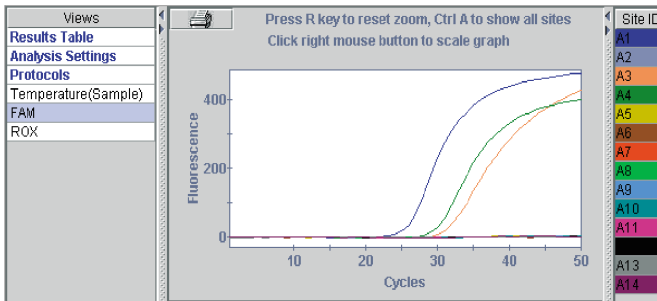


그림 8 FAM의 증폭 곡선 (target 유래 signal)

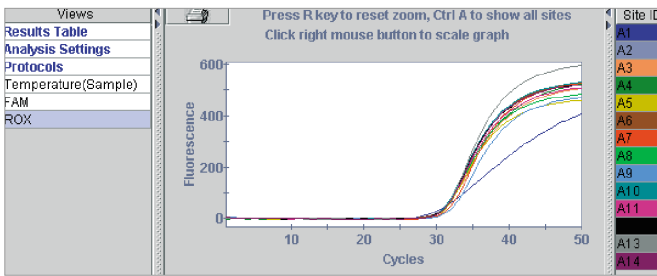


그림 9 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

- : Positive Control ( $1 \times 10^4$  copies)
- : Negative Control (멸균수)
- : Mycoplasma pneumoniae strain Mac
- : Mycoplasma pneumoniae strain FH
- : Mycoplasma genitalium strain G37
- : Mycoplasma hominis strain PG21
- : Mycoplasma orale strain CH19299
- : Mycoplasma salivarium strain PG20
- : Mycoplasma fermentans ATCC 19989
- : Mycoplasma primatum HRC292
- : Mycoplasma buccale CH20247
- : Mycoplasma penetrans strain GTU54
- : Ureaplasma urealyticum strain T960
- : Ureaplasma parvum strain 27

*Mycoplasma pneumoniae*주와 kit에 첨부된 positive control을 보면 FAM의 증폭 signal이 보이므로 특이성이 높은 것으로 나타났다(data는 동경대학의 Harazawa 선생님께서 제공하였다).

**CycleavePCR™ O157 (VT1/VT2) Detection Kit**

O157 : H7을 비롯한 장관출혈성 대장균 (EHEC)은 혈변과 격렬한 복통을 수반하는 출혈성 대장염의 원인균으로 병원성 대장균의 일종이다. 이 질병의 원인은 EHEC가 생성하는 세포독소, Verocytotoxin이다.

본 kit은 EHEC에 의한 식중독의 원인 유전자인 Verocytotoxin 유전자 (VT1, VT2 유전자)를 Real Time PCR로 검출한다. 본 kit에는 VT1 검출용 FAM 표식 probe, VT2 검출용 TET 표식 probe, internal control 및 internal control 검출용 ROX 표식 probe가 포함되어 있다. Smart Cycler® System으로 3가지 과정을 동시에 모니터링 하기 때문에 1 개의 tube로 VT1과 VT2의 식별할 수 있고, 한층 더 internal control에 의해 위음성 (false negative)을 모니터링 할 수 있다 (반응 시간 약 30분).

실험 예

Kit에 첨부된 positive control을 시료 (주형)로 하여 Smart Cycler®System로 Real Time PCR를 수행한 후 Verocytotoxin 유전자 (VT1, VT2 유전자)를 검출했다.

●반응액 조성(1 회분)

5 × Reaction Mixture	5 μl
VT Primer Mix (각 5 μM)	2 μl
VT Chimera Probe Mix (5 × conc. )	5 μl
TaKaRa Ex Taq™ R-PCR (5 U / μl)	0.25 μl
Tli RNase H II (200 U/μl)	0.5 μl
시료 (주형)	1 μl
멸균수	11.25 μl
Total	25 μl

●PCR조건

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	6	Off	

그림 10 PCR 조건

●결과

1) VT1 positive control ( $1 \times 10^4$  copies)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

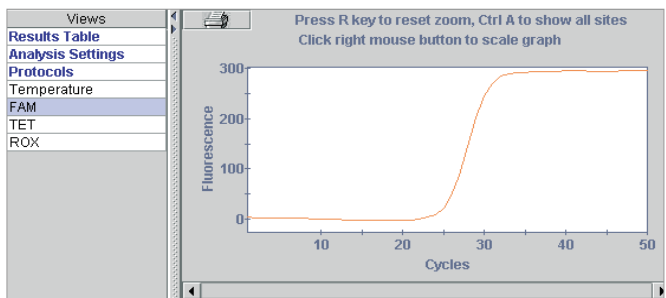


그림 11 FAM의 증폭 곡선 (VT1 유래 signal)

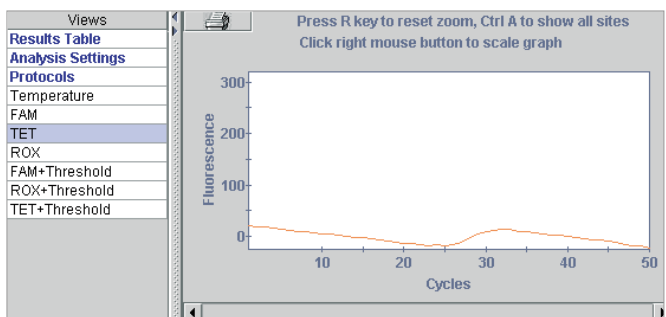


그림 12 TET의 증폭 곡선 (VT2 유래 signal)

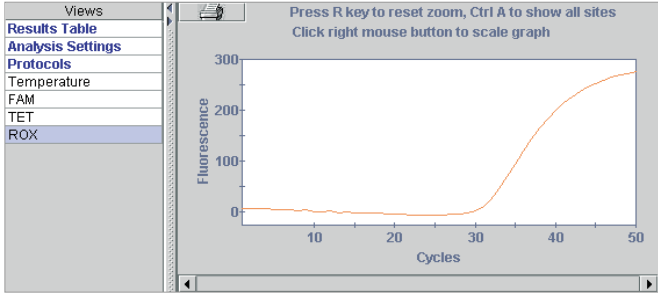


그림 13 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

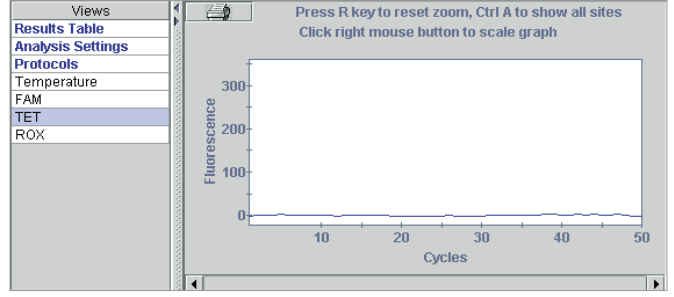


그림 18 TET의 증폭 곡선 (VT2 유래 signal)

2) VT2 positive control ( $1 \times 10^4$  copies)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

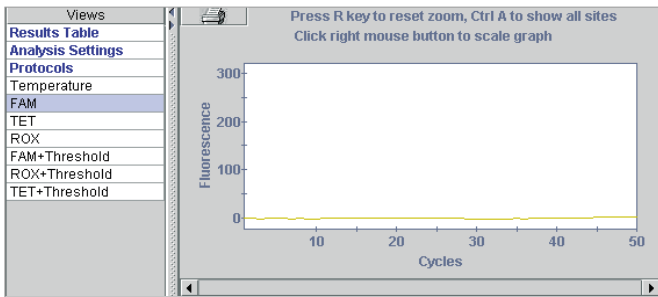


그림 14 FAM의 증폭 곡선 (VT1 유래 signal)

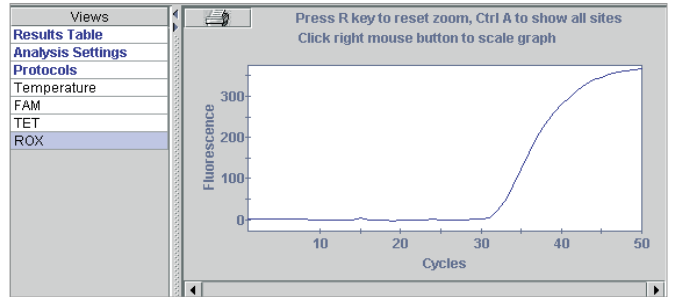


그림 19 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

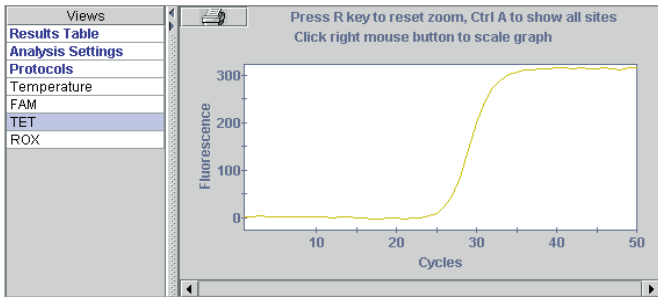


그림 15 TET의 증폭 곡선 VT2 유래 signal)

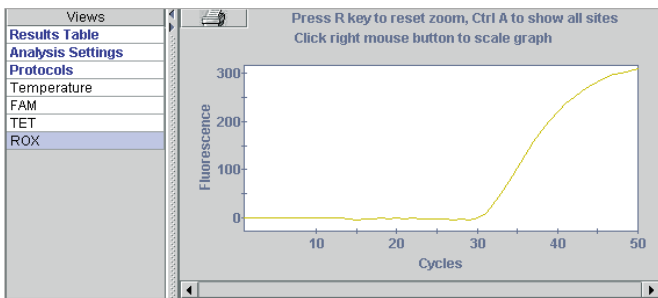


그림 16 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

3) 멸균수(negative control)를 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

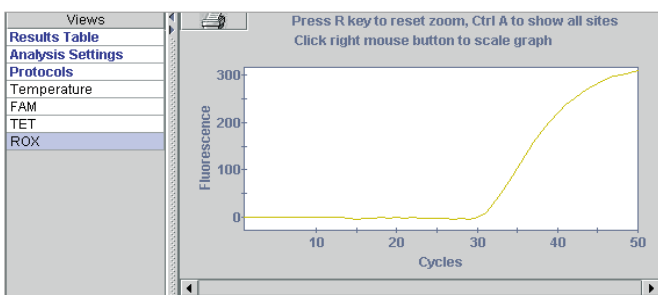


그림 17 FAM의 증폭 곡선(VT1 유래 signal)

### CycleavePCR™ Salmonella Detection Kit

살모넬라균은 대장균이나 적리균과 같은 그룹에 속하는 세균으로 자연계에 넓게 분포하며 2,500 종류 이상의 혈청형이 알려져 있다.

본 kit은 대부분의 살모넬라균이 보유하고 있는 유전자 중 하나인 침입성 인자 관련 유전자 *invA*를 검출하는 Real Time PCR 용 제품이다. 본 kit에는 *Salmonella* 검출용 FAM 표식 probe, internal control 및 internal control 검출용 ROX 표식 probe가 포함되어 internal control에 의한 위음성 (false negative)의 판별도 가능하다 (소요 시간 약 40분).

### 실험 예

Kit에 첨부된 positive control을 시료(주형)로 하여 Smart Cycler® System 으로 Real Time PCR을 수행한 후 침입성 인자 관련 유전자 *invA*를 검출했다.

●반응액 조성(1 회분)

5 × Reaction Mixture	5 μl
SIN Primer Mix (각 3 μM)	2.5 μl
SIN Chimera Probe Mix (12.5 × conc. )	2 μl
TaKaRa Ex Taq™ R-PCR (5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II (200 U/μl)	0.5 μl
시료 (주형)	1 μl
멸균수	13.75 μl
Total	25 μl

● PCR 조건

Stage 1			
Hold			
Temp	Secs	Optics	
95	10	Off	

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

그림 20 PCR의 조건

● 결과

1) Positive control ( $1 \times 10^4$  copies)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

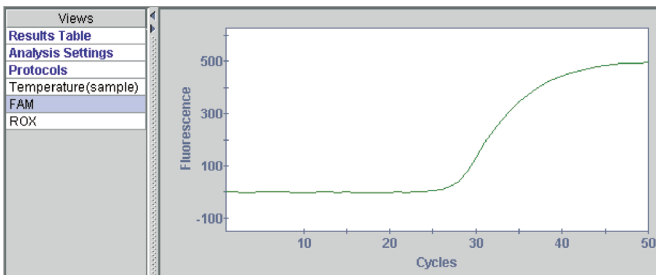


그림 21 FAM의 증폭 곡선(target 유래 signal)

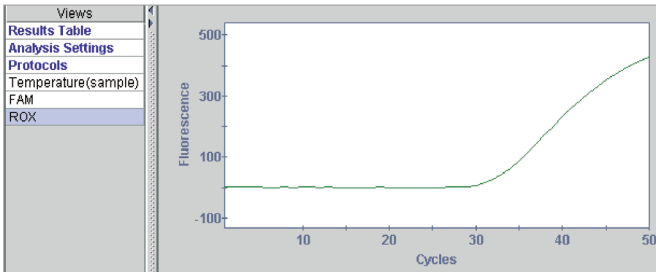


그림 22 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

2) Negative control (멸균수)을 시료로 사용한 경우의 증폭 곡선

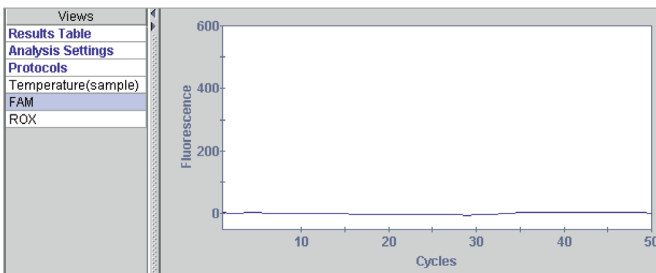


그림 23 FAM의 증폭 곡선 (target 유래 signal)

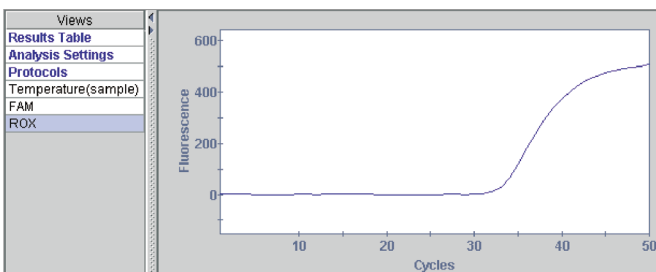


그림 24 ROX의 증폭 곡선 (internal control 유래 signal)

## CycleavePCR™ Meat Species Identification Kit

식육 제품의 원료 표시는 식품위생법으로 규정되어 있다. 그것을 확인하기 위해서는 정확한 식육종의 감별법이 필요하여 그 방법에는 정확성, 간편성, 신속성이 요구되고 있다.

본 kit은 미토콘드리아 DNA에 있는 cytochrome C oxidase subunit I (cox I) 유전자 영역이 동물종간의 다형을 나타내는 것을 이용하여 식육 제품의 원료인 소, 돼지, 새, 말, 양의 5종을 판별하기 위한 Real Time PCR 용 kit으로 증폭·검출에는 Smart Cycler®System을 사용한다. 하나의 시료에 대하여 3종류의 반응을 수행하여 5종을 판정하지만 각 반응액에는 반응 control용 주형, primer 및 검출용 probe가 포함되어 있어 PCR 반응의 저해의 유무가 확인된다 (소용 시간 약 40분).

\*1 : Smart Cycler®System은 Cepheid사 제품입니다.

\*2 : Eclipse™ Quencher

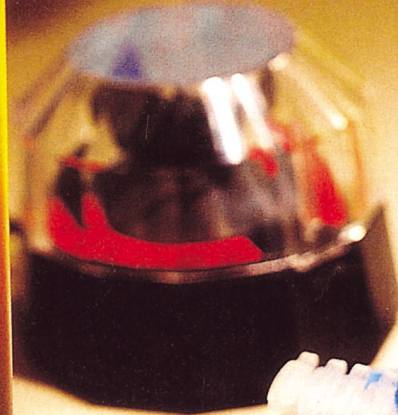
본 제품은 Epoch BioSciences사와 license 계약에 의해 제조하여 판매하고 있다. 본 제품을 상용 목적으로 사용되는 경우는 별도 상담이 필요하다.



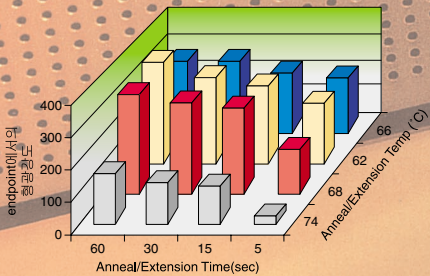


For Real Time PCR...

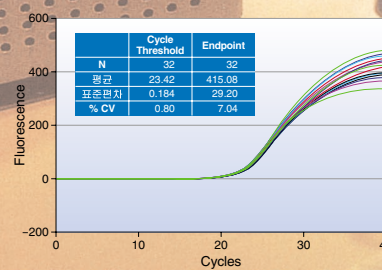
# Smart Cycler System



### ▶ 신속한 최적 조건의 결정(Assay Optimization)



### ▶ 재현성과 균일성이 우수한 실험결과 (Precision)



### ■ Specification

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

제조원  
**Cepheid**

수입 및 기술지원  
**Takara**  
다카라코리아바이오메디칼주식회사  
Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691  
E-mail support@takara.co.kr  
URL www.takara.co.kr

지역별 전문대리점  
코아바이오시스템(주)(서울, 경기, 강원, 대전, 충청) 02-841-7530/ 031-286-8592/ 042-472-3669 ·  
다인바이오(주)(서울, 경기, 강원) 02-571-1305 · (주)대한과학(부산, 경남) 051-245-6582 ·  
(주)라인바이오(대전, 충청) 042-635-6602 · (주)브니엘(대구, 경북) 053-959-3611 ·  
삼화교역(전주, 전북) 063-227-3700 · (주)진성에스엠알(광주, 전남) 062-672-7631 ·  
제일하이텍(제주) 064-742-7793~4