

# Cycleave RT-PCR Pestivirus Detection Kit

TaKaRa Code CY212 50검체분

Pestivirus에는 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV) 및 돼지 콜레라 바이러스 (CSFV) 등이 있다. BVDV는 소의 혈청을 통해 동물 배양체 포에서 가장 빈번하게 감염되는 바이러스로, contamination을 방지하기 위하여 신속한 검출방법이 요구되고 있다.

당사에서는 cycling probe법을 이용한 RealTime RT-PCR (Cycleave RT-PCR)로 신속하고 정확하게 Pestivirus를 검출하는 kit를 출시하였다.

## 특징

RNA 바이러스인 pestivirus의 5' -untranslated region (5' -UTR)을 Real Time PCR 장치인 Smart Cycler<sup>®</sup> System 또는 Smart Cycler<sup>®</sup> II System (TaKaRa Code SC200N)을 이용하여 검출하는 Real Time RT-PCR kit이다.

- 증폭은 Hot Start용 효소인 TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> HS를 사용하므로 반응액 조제시 등 cycle 전의 mispriming이나 primer dimer에 의한 비특이적 증폭을 막을 수 있어 고감도 검출이 가능하다.
- 형광검출에는 cycling probe법을 사용한다. Cycling probe법은 RNA와 DNA로 이루어진 chimera probe와 RNase H 조합에 의한 고감도 검출 방법으로 증폭 중이나 증폭 후의 유전자 단편의 특정 서열을 효율적으로 검출할 수 있다. (LifeScience & Biotechnology 27호 참조). Probe는 5' 말단은 형광물질로, 3' 말단은 형광을 소광하는 물질 (quencher)로 표식되어 있으며, 기본상태 (intact)에서는 quencher의 영향으로 강한 형광을 발하지 않지만, 증폭 산물 중의 상보적인 서열과 hybrid를 형성한 다음 RNase H에 의해 RNA 부분이 절단되어 강한 형광을 발하게 된다. 그 형광 강도를 측정함으로써 증폭산물을 모니터링 할 수 있다.
- 본 kit에는 Pestivirus 검출용 FAM 표식 probe, internal control과 internal control 검출용 ROX 표식 probe가 포함되어 있다. Smart Cycler<sup>®</sup> System 또는 Smart Cycler<sup>®</sup> II System에서 2과장 동시에 모니터링하면 전기영동이 불필요하며 신속하게 결과를 얻을 수 있다. 이 밖에 internal control에 의한 pulse negative 판정도 가능하다. 또한 첨부되어 있는 Positive control RNA를 이용해 검량선을 작성하면 바이러스 양도 정량 가능하다.

## Kit의 내용 (25 µl 반응 × 50 회분)

AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/µl)	50 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	15 µl
10 × RT Buffer (10× conc.)	50 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	100 µl

dNTP Mixture (각 10 mM)	50 µl
PV Reverse Primer (1.5 uM)	50 µl
PV Positive control RNA (10 <sup>5</sup> copies/µl) <sup>1</sup>	50 µl
RNA Dilution Buffer	1 ml
TaKaRa Ex Taq <sup>®</sup> HS (5 U/µl)	15 µl
Tli RNase H II <sup>2</sup> (200 U/µl)	25 µl
5 × PCR Buffer (5× conc.)	250 µl
PV Primer Mix (각 7.5 uM)	50 µl
PV Probe Mix <sup>3</sup> (25× conc.)	50 µl
PV Internal control DNA (10 <sup>5</sup> copies/µl)	50 µl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml

\*1: Copy수는 A<sub>260</sub>의 흡광도에서 산출.

\*2: *Thermococcus litoralis* 유래의 내열성 RNase H.

\*3: 형광 표식 probe도 차광 보존.

## 실험 예

소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV) RNA, 돼지 콜레라 바이러스 (CSFV) RNA를 시료 (주형)로 하여 본 kit를 이용하여 검출하였다.

## 【방법】

소 바이러스성 설사 (BVD) 생백신 (live attenuated vaccine)에서 추출 정제한 RNA (400 fg, 4 pg, 40 pg, 400 pg, 4 ng, 40 ng), 돼지콜레라 (CSF) 생백신에서 추출 정제한 RNA (300 fg, 3 pg, 30 pg, 300 pg, 3 ng, 30 ng)를 주형으로 하여 본 kit을 이용하여 역전사 반응 및 Smart Cycler<sup>®</sup> System을 이용한 Real Time PCR을 수행하여 Pestivirus의 5' -UTR을 각각 검출하였다.

\* 사용한 BVD 생백신은 3종 바이러스의 혼합 백신이다.

## 【역전사 반응액 조성】(1 검체분)

10×RT Buffer	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl

dNTP Mixture (각 10 mM)	1 $\mu$ l
PV Reverse Primer (1.5 uM)	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
시료 RNA(주형)	1 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	2.75 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

우선 주형 이외에 위의 반응액을 조제하고 (필요수 + 1 검체분), 0.2 ml microtube에 9  $\mu$ l씩 분주한 후, 주형을 1  $\mu$ l 첨가하여 혼합하고 (negative control은 RNase Free dH<sub>2</sub>O를 사용), thermal cycler에 세팅하여 50℃에서 10분, 98℃에서 2분의 조건에서 반응시킨다 (Water bath나 heat block에서도 가능).

**[PCR 반응액 조성](1 검체분)**

5×PCR Buffer	5 $\mu$ l
PV Primer Mix (각 7.5 uM)	1 $\mu$ l
PV Probe Mix (×25 conc.)	1 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq <sup>®</sup> HS (5 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Tli RNase H II (200 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
PV Internal control DNA	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	6.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>

위의 반응액을 조제 (필요수 + 1 검체분)하여, Smart Cycler<sup>®</sup> System 전용 반응 tube에 15  $\mu$ l씩 나눠서 넣은 후, 역전사 반응을 하여 cDNA 용액을 전량 (10  $\mu$ l) 첨가하여 Real Time PCR을 하였다.

**【Cycle 조건】**

Stage 1				Stage 2			
Hold				Repeat 45 times.			
3-Temperature Cycle							
Temp	Secs	Optics		Temp	Secs	Optics	
95	10	Off		95	3	Off	
				55	10	Off	
				72	20	On	

**【결과】**

(1) 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV) RNA에서 검출 (그림 1) BVDV를 포함한 혼합성 백신으로 조제한 RNA를 주형으로 한 반응에서는 target (FAM 채널)과 internal control (ROX 채널)의 형광 signal 증가를 보이며, 주형에 Pestivirus의 5'-UTR 영역이 포함됨이 확인되었다. 감도 면에서는 정제 RNA 시료 4 pg에서 검출이 가능했다.

Negative control 반응에서는 target (FAM 채널)의 형광 signal 증가는 보이지 않으며, internal control (ROX 채널)의 형광 signal 증가만 보였다. 여기에서 반응액에 대한 contamination은 없는 것으로 확인되었으며, 또한 반응액 조제시 실수에 의한 pulse negative가 아닌 것도 확인하였다.

(2) 돼지콜레라 바이러스 (CSFV) RNA에서 검출 (그림 2)

돼지콜레라 생백신에서 조제한 RNA를 주형으로 한 반응에서도 마찬가지로 target (FAM 채널)과 internal control (ROX 채널)의 형광 signal 증가가 보이며, 주형에 Pestivirus의 5'-UTR 영역이 포함됨이 확인되었다. 또한 감도 면에서는 정제 RNA 시료 3 pg에서 검출 할 수 있었다.

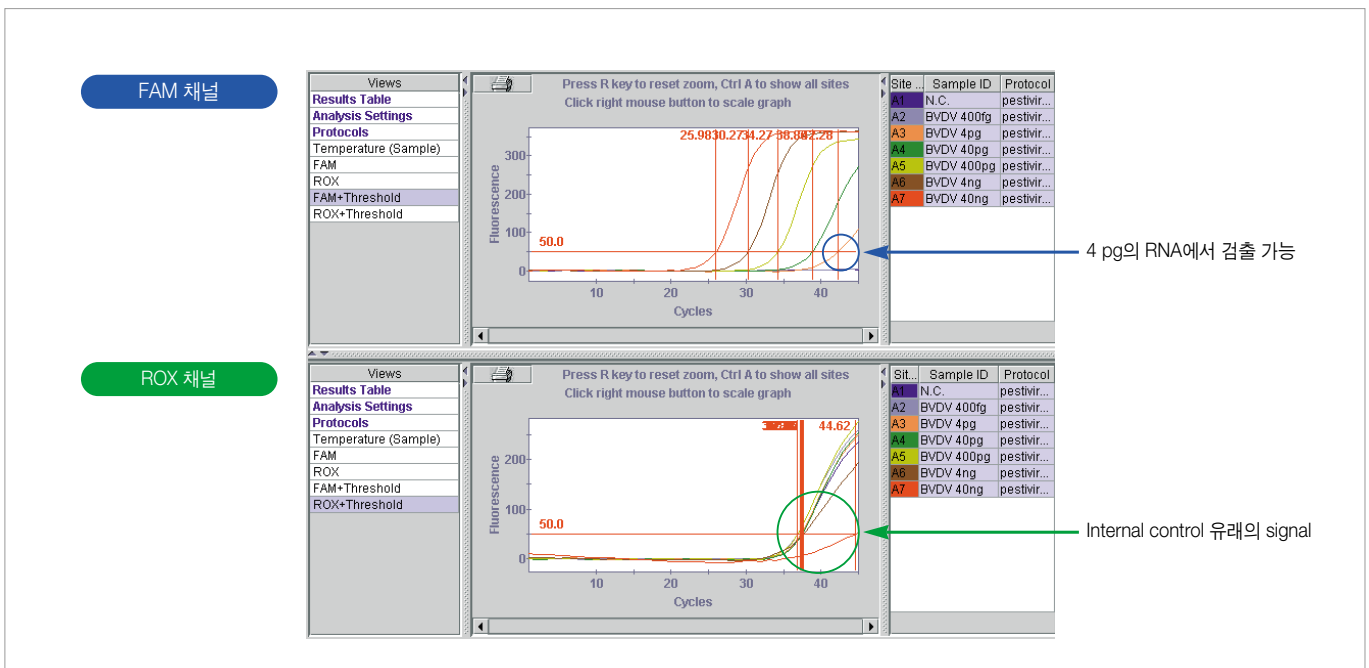


그림 1 BVDV RNA를 주형으로 실험한 Pestivirus target 영역의 증폭곡선 (위 그림)과 Internal control의 증폭곡선 (아래 그림)

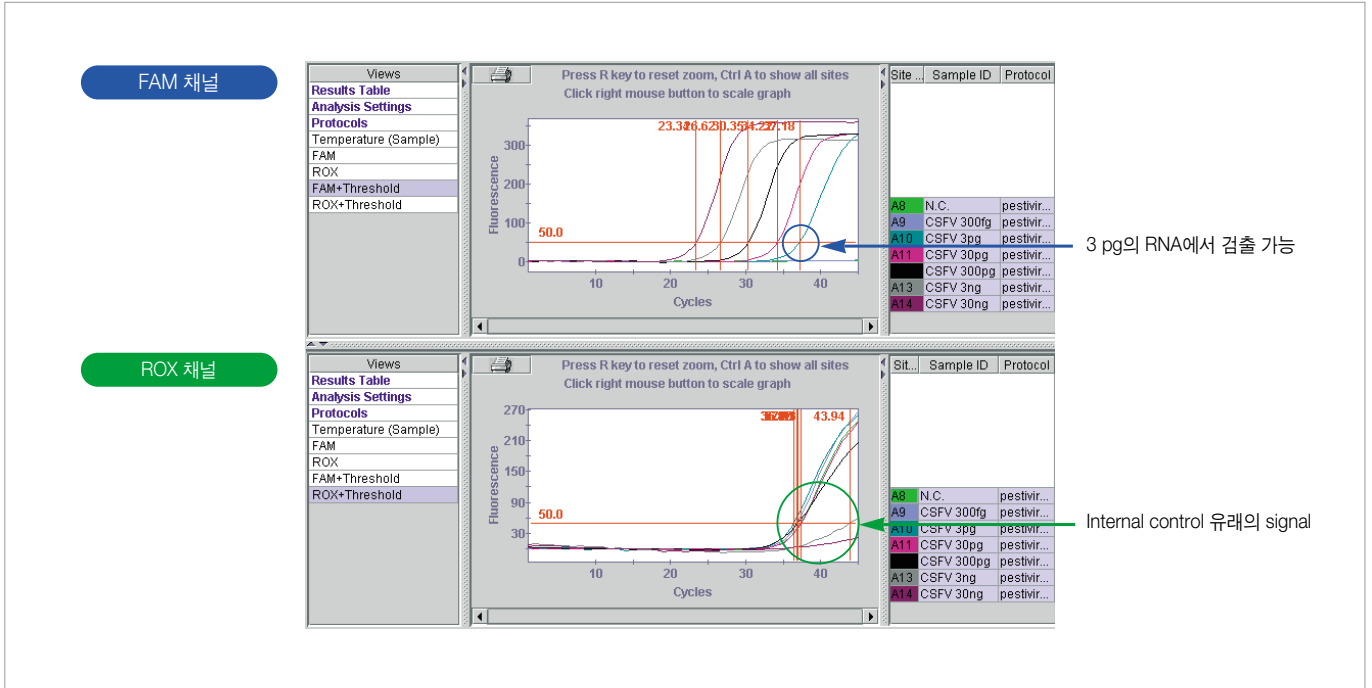


그림 2 CSFV RNA를 주형으로 실험한 Pestivirus target 영역의 증폭곡선 (위 그림)과 Internal control의 증폭곡선 (아래 그림)

Negative control 반응에서는 target (FAM 채널)의 형광 signal 증가는 보이지 않았으며, internal control (ROX 채널)의 형광 signal 증가만 보였다. 여기에서 반응액에 대한 contamination은 없는 것으로 확인되었으며, 또한 반응액 조제시 핸들링 에러에 의한 pulse negative가 아닌 것도 확인하였다.