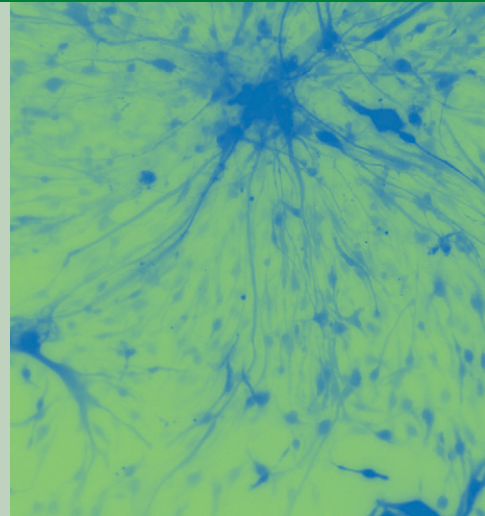


Multicolor SYBR Green 대체품 QZyme MPX Real-Time Quantitative PCR Kits

QZyme MPX FAM
QZyme MPX JOE

TaKaRa Code 638309/638310
TaKaRa Code 638311/638312



빠르고 쉽게 Real time PCR 분석을 설계

- * FAM과 JOE 형광 dye로 duplex 분석을 최적화
- * SYBR 방식과 같은 simplicity에 duplex 기능까지 가능

Clontech의 새로운 QZyme MPX qPCR Kit는 보다 발전된 QZyme Real Time PCR 기술로 분자생물학 연구에서 강력하고 다목적인 tool 이다. QZyme MPX Kit는 일반적인 형광 검출 시스템에 QZyme 기술을 혼합한 것으로, real time PCR 분석을 위해 직접 설계한 primer 또는 그와 통용되는 것을 사용할 수 있다. 이 kit는 FAM과 JOE가 표식된 형광물질을 사용하여 두 가지 색을 검출할 수 있으며, 동시에 duplex assay에 사용할 수 있도록 최적화 되었다.

최적화된 QZyme MPX 기질

QZyme MPX Assay의 핵심은 특허 받은 기술인 DNAzyme으로 이는 핵산 기질 중 특이 phosphodiester bonds만을 분해하는 활성 oligonucleotide이다. Multiplex 분석을 가능하게 하기 위해 QZyme MPX Kit는 FAM-표식 또는 JOE-표식 기질을 사용할 수 있고, 이들은 각각 다른 DNAzyme 인식 서열을 갖고 있다(그림 1).

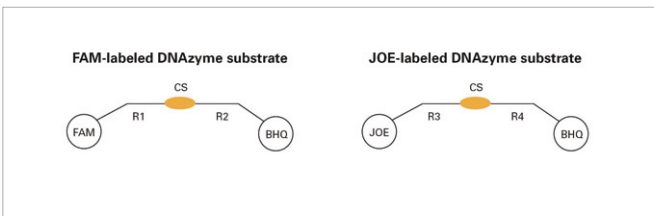


그림 1 QZyme 기질

FAM-표식 BHQ-quenched QZyme 기질은 2개의 기질 인식 도메인(R1, R2) 및 절단 부위(cleavage site, CS)를 포함하고 있으며, 이는 R1/R2-상보적 DNAzyme에 의해 작용한다. JOE-표식 기질은 FAM-표식 기질과 같은 구조이나, FAM과는 다른 R3, R4 인식 서열을 갖고 있고 R3/R4-상보적 DNAzyme에 의해 분해된다.

다양하게 적용가능한 PCR 검출 시스템

기본적으로 DNAzyme과 gene-specific forward primer가 결합된 2

primer 시스템을 사용하는 QZyme Kit와는 달리, QZyme MPX Kit에서는 3 primer 형광검출 시스템을 사용하기 위해 DNAzyme과 gene-specific forward primer가 물리적으로 분리되어 있다. QZyme MPX Assay의 개략적인 원리는 그림 2와 같다. QZyme MPX Assay는 세가지 primer가 필요하며[detection primer(kit내 포함), linker를 포함하는 gene-specific forward primer(customer-supplied), reverse primer(customer-supplied), 각각의 최적 농도는 20 nM, 60 nM, 200 nM이다. 3 primer 시스템을 사용하면 PCR 효율은 최고 수준(90%)에서 유지하면서, primer 농도를 더 많이 줄여서 사용할 수 있다. 필요한 경우, 이 primer 농도는 assay에 적합하도록 조절될 수 있고, 특히 많은 양의 타겟과 적은 양의 타겟을 multiplex로 분석할 때 유용하다. QZyme MPX Kit는 최소한의 노력으로 두 가지 타겟을 multiplex 분석이 용이하게 설계되었다.

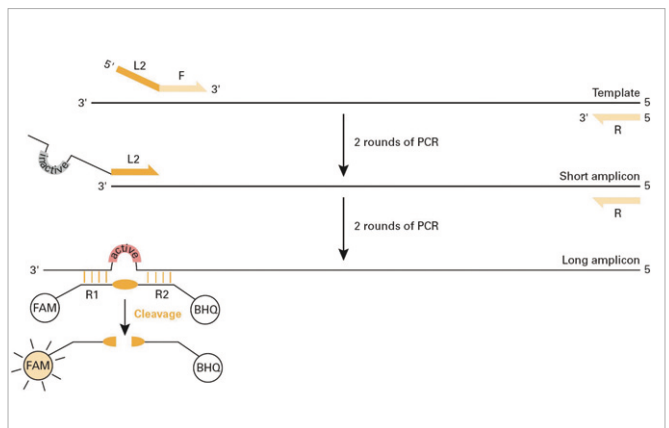


그림 2 QZyme MPX Assay

QZyme MPX Assay는 3개의 primer를 포함하는 single PCR 반응이다. 사용자는 목적 유전자에 따라 Gene-specific primer L2F와 R을 직접 설계한다. Forward primer F 앞쪽에는 L2 서열이 gene-specific 부분의 5' 말단 끝에 있고, L2F와 R primer에 의해 합성이 된다. 이러한 gene-specific primers FAM 또는 JOE detection reagent primer[inactive-L2(FAM); inactive-L3(JOE)], FAM 또는 JOE universal substrate[FAM 또는 JOE-BHQ], Qtaq DNA polymerase, buffer(nucleotide 포함)와 결합하여 single PCR 반응을 한다. 첫번째 amplicon(short amplicon)은 L2F와 R primer로 얻어지며, 이 첫번째 amplicon이 template로 작용하여 FAM 또는 JOE detection reagent와 R primer에 의해 long amplicon이 합성되고, 이것은 DNAzyme 활성을 갖게 된다. 활성을 가지는 DNAzyme은 기질을 분해하여 형광물질과 Black Hole Quencher를 분리하고, 이 반응에서 target 양과 비례하는 형광강도를 증가시키는 결과를 얻는다.

QZyme MPX Primer 손쉬운 설계

현재 사용하는 PCR primer를 QZyme MPX primer pair로 변경하기 위해서는 forward primer의 5' 말단에 specific linker 서열을 추가하여 합성해야 한다. 그러나 reverse primer는 별도의 modification이 필요없다. 2가지 linker 서열은 L2: TACGCGACGCGATACGCGAA와 L3: GCGAAACCAGCACCTATAAC이고 이것은 각각의 kit 내에 제공되는 dye-specific detection reagent의 MPX detection primer에 맞추어 설계되어 있다(L2: FAM, L3: JOE). 또한, 이들 서열은 human, mouse, rat genome과는 전혀 유사성이 없다. 기존 assay 방법에서 QZyme MPX assay로 변환하는데 있어 주의해야 할 점은 primer Tm 값이 56~62°C 범위 내에 있어야 하며 amplicon 크기도 반드시 250 nt 이하여야 한다는 것이다.

높은 품질의 Multiplex Assay Data

그림 3은 human ribosomal protein S21과 S9를 QZyme MPX real-time duplex PCR assay로 수행한 data를 보여주며, 같은 primer로 single-plex 반응의 증폭 plot의 결과를 비교하였다. 그 결과 S21/S9 duplex assay로부터 얻은 data는 single-plex PCR 반응에서 얻은 data와 사실상 동일하다는 것을 보여주었다.

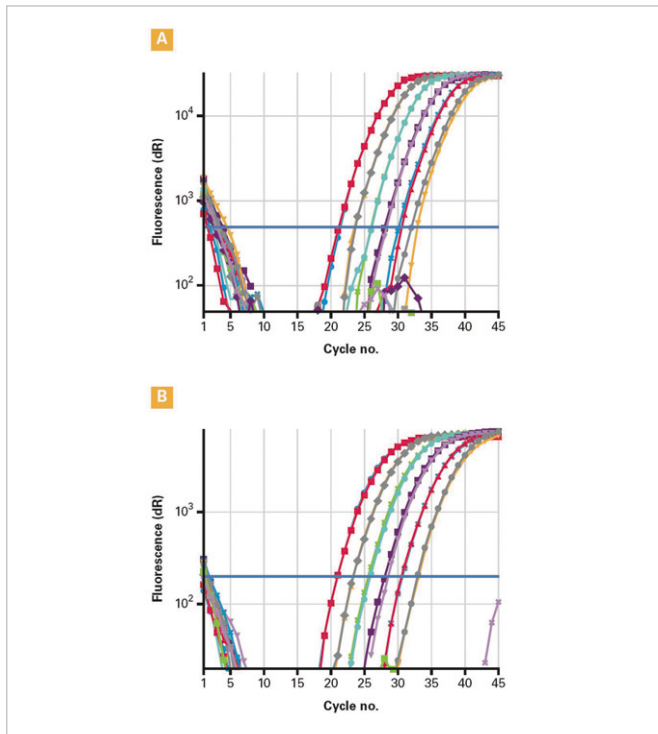


그림 3. Ribosomal protein S21과 S9에 대한 QZyme MPX single-plex와 duplex assay의 비교
Panel A는 S21-F/R primer pair, L2 detection tag, B-FAM substrate를 포함하는 single-plex PCR reaction과 S9-F/R primer pair, L3 detection tag, D-JOE substrate를 포함하는 같은 반응의 duplex reaction에 대한 FAM-channel amplification plot을 보여준다. S9에 대한 single-plex와 duplex JOE-channel amplification plot은 Panel B에 나타내었다. 이 data는 cDNA 샘플의 합성을 위해 Clontech's qPCR Human Reference Total RNA (TaKaRa Code 636690)를 template로, random 9 mer oligonucleotide를 primer로 사용하여 Stratagene Mx3000P thermocycler에서 얻어낸 결과이다.

저렴한 비용의 SYBR 대체 기술

QZyme MPX single-plex assay 비용은 SYBR 반응의 비용과 비슷하다. 그러나 assay가 duplex 형태로 수행될 때에는 효소를 두 배나 사용할 필요가 없다. 따라서 data point 당 assay 비용은 매우 낮아지게 된다. Duplex 분석은 RNA 샘플을 보다 적게 사용할 뿐만 아니라, housekeeping gene 또는 다른 internal synthetic control을 통해 보다 좋은 high quality의 data를 얻을 수 있다. 값비싼 gene-specific 형광 표식 probe를 합성할 필요가 없기 때문에 QZyme MPX duplex는 높은 효율, 비용 절감, 빠른 design-to-data 결과를 볼 수 있다.

다목적 QZyme MPX Kit는 일반적인 2-color 검출 시스템과 사용중인 PCR primer를 이용하여 qPCR duplex assay를 쉽게 설계하고 실험할 수 있게 한다.

참고문헌

1. QZyme™ Assays for Quantitative PCR(October 2003) *Clontechniques XVIII*(4): 2-3.
2. Santoro, S. W. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(9): 4262-4266.
3. Impey, H. L. et al. (2000) *Anal. Biochem.* **286**(2): 300-303.

관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
Qtaq DNA Polymerase Mix	200 rxns/2,000 rxns	639651/639652
Qtaq ROX-Free DNA Polymerase Kit	200 rxns/2,000 rxns	639666/639667
QZyme Custom Duplex Assay		639669/639670/639671
QZyme Custom Triplex Assay		639672/639673/639674
qPCR Human Reference cDNA, random-primed	25 rxns/100 rxns	639653/639654
qPCR Human Reference cDNA, oligo(dT)-primed	25 rxns/100rxns	636692/636693
qPCR Human Reference Total RNA	25 ug	636690
QTox Multiplex Assays		many
CAL Fluor Gold Calibration Dye	200 ul	639675
CAL Fluor Orange Calibration Dye	200 ul	639661