

TaKaRa

MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus)

한글매뉴얼

본 매뉴얼은 R075A_j.pdf 일문매뉴얼을 번역한 한글 번역본입니다. 원문과 내용이 다를 경우 원문의 내용을 우선으로 합니다.

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: support@takara.co.kr

www.takara.co.kr



MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus)는 Intercalator법을 이용하는 Real Time PCR 시약입니다. 본 제품은 2x 농도의 premix 타입 시약으로, 실시간 모니터링에 적합한 농도의 intercalator TB Green®을 미리 포함하고 있어 반응액의 조제가 간단하며, PCR 효소의 높은 반응성을 위해 개발된 MightyAmp™ DNA Polymerase를 사용합니다. 따라서, 본 제품을 사용하면 Crude 샘플이나 GC함량이 70%을 넘는 샘플, end point PCR용 primer를 그대로 이용하여 300 bp 이상의 사이즈 (~2 kb)를 증폭하는 샘플 등, 지금까지 Real Time PCR로 적용이 어려웠던 샘플에 대한 정량분석이 가능합니다.

【주의】 본 제품은 특별한 용도로 개발된 제품입니다. 일반적 샘플을 대상으로 하는 Real Time PCR 분석에는 TB Green® Premix 시리즈 (Code RR820A / RR430A / RR420A / RR091A / RR071A)를 사용해 주십시오.

본 제품의 적용 기종

- Thermal Cycler Dice® Real Time System II (Code TP900 / TP960)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Code TP700 / TP760)
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler (Roche Diagnostics) 등

I. 원리

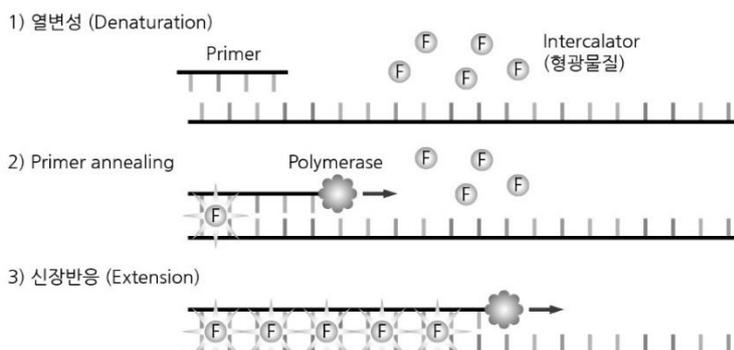
MightyAmp™ DNA Polymerase을 이용하여 PCR 증폭을 실시하며, PCR 증폭산물은 intercalator TB Green® 의해 실시간으로 모니터링 할 수 있습니다.

1. PCR

PCR은 소량의 DNA로부터 목적 유전자의 단편만을 증폭시키는 기술입니다. DNA의 열변성 (denaturation), primer annealing, DNA 중합 효소에 의한 신장 반응 (extension)의 3단계로 구성되며, 이것은 1 cycle로, 동일한 과정을 반복하여 단시간에 목적 유전자 단편을 100만배 이상까지 증폭시킬 수 있습니다. 본 제품에 사용된 MightyAmp™ DNA Polymerase는 98 °C까지 polymerase 활성을 억제하는 강력한 단일클론 항체를 이용하여 hot start PCR이 가능합니다.

2. 형광 검출법 - Intercalator법

이중 가닥 DNA에 결합하는 형광 시약 (Intercalator: TB Green® 등)을 반응액에 첨가하여 DNA 증폭에 따른 형광을 검출하는 방법입니다. 중합 효소 반응에 의해 합성된 이중 가닥 DNA에 intercalator가 결합되면 형광을 발합니다. 이 형광 신호를 검출하여, 정량 뿐만 아니라 증폭 DNA의 용해 온도를 측정할 수 있습니다.



II. 내용 (200 회, 50 µl 반응계)

| | |
|--|----------|
| MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2× conc.) * 1 | 1 ml × 5 |
| ROX Reference Dye (50× conc.) * 2 | 200 µl |
| ROX Reference Dye II (50× conc.) * 2 | 200 µl |

* 1 : MightyAmp™ DNA Polymerase, dNTP Mixture, Mg²⁺ 및 TB Green®을 포함합니다.

* 2 : Applied Biosystems의 Real Time PCR 기기와 같이 well간의 형광 신호의 보정이 필요한 기기에 사용됩니다. 아래의 기기에서 분석 시 사용될 수 있습니다.

◆ ROX Reference Dye를 첨가하는 기종

· StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ ROX Reference Dye II를 첨가하는 기종

· Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 첨가할 필요가 없는 기종

· Thermal Cycler Dice® Real Time System 시리즈 (Code TP900 / TP700) 등

· LightCycler (Roche Diagnostics)

본 제품 외에 필요한 시약, 기기 (주요한 것만 표기)

1. Real Time PCR 기기 (Authorized instruments)
2. 전용 Tube 혹은 plate
3. PCR용 primer
4. 멸균증류수
5. Micropipette 및 tip (멸균처리한 것)

III. 보존

4 °C 보존 시, 6개월간 안정

(반드시 차광하십시오. 또한, 오염에 주의하십시오.)

※ 장기 보관시에는 -80 °C에서 보관하십시오. (-20 °C에서 보관하지 마십시오.)

일단 용해 후에는 4 °C에서 보존하고, 6 개월 안에 사용할 것을 권장합니다.

IV. 특징

1. Real Time PCR로 유전자 검출 및 정량을 신속하고 정확하게 할 수 있습니다.
2. 2× conc. 로 TB Green®이 혼합되어 있는 premix 시약입니다. Primer와 template, 멸균증류수를 추가하여 intercalator 방법을 이용한 Real Time PCR을 수행할 수 있습니다.
3. MightyAmp™ DNA Polymerase를 PCR 효소로 사용하기 때문에 기존에 PCR을 수행하기 어려웠던 아래와 같은 경우에도 높은 반응 효율을 기대할 수 있습니다.
 - Cell lysate 등 crude 샘플
 - GC 함량이 70%을 넘는 샘플
 - End point PCR 용 primer를 그대로 이용하여 300 bp 이상의 사이즈 (~ 2 kb)를 증폭하는 경우

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: support@takara.co.kr

www.takara.co.kr



V. 주의사항

본 제품의 사용 시 주의사항입니다. 사용 전에 반드시 숙지하십시오.

1. 사용 시에는 거품이 생기지 않도록 천천히 균일하게 섞어주십시오. 시약 조성에 편차가 있을 경우, 충분한 반응성을 얻을 수 없습니다. Vortexing 하지 마십시오.

MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2× conc)를 -80 °C에서 보관한 경우, 백색 또는 황백색의 침전물이 발생할 수 있습니다. 손으로 쥐어 따뜻하게 하거나 차광하여 실온에 잠시 둔 후에, 위 아래로 섞어 완전히 용해합니다. 침전물이 생긴 상태에서는 시약 조성에 편차가 있을 수 있으므로, 반드시 균일하게 혼합하여 사용하십시오.

2. 반응액 조제시에는 시약을 얼음 위에 보관하십시오.
3. 본 제품은 Intercalator로 TB Green®을 포함하고 있습니다. 반응액 조제 시에 강한 빛에 노출되지 않도록 주의하십시오.
4. 반응액을 조제, 분주 할 때는 반드시 새로운 일회용 tip을 이용하여 샘플 간의 오염을 최대한 방지하십시오.

VI. 실험방법

[Thermal Cycler Dice® Real Time System series를 사용할 경우]

* 각 장치의 사용 설명서에 따라 조작하십시오.

1. 아래의 PCR 반응액을 얼음 위에서 조제한다.

<1회 반응 분량>

| 시약 | 사용량 | 최종농도 |
|--|---------------------|----------------------|
| MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2x) | 12.5 μl | 1 x |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM *1 |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM *1 |
| Template (<100 ng) | 2 μl | *2 |
| 멸균증류수 | 9.5 μl | |
| Total | 25 μl *3 | |

* 1 : Primer 최종 농도가 0.2 μM 일 때, 좋은 결과를 얻을 수 있는 경우가 많지만, 반응성에 문제가 있을 때는 0.1 ~ 1.0 μM 의 범위에서 최적의 농도를 검토하십시오.

* 2 : 타겟의 카피 수는 Template 용액에 따라 다를 수 있습니다. 단계적으로 희석하여 적절한 첨가량을 검토하십시오. DNA template는 100 ng 혹은 그 이하로 이용하는 것이 바람직합니다. RT-PCR로 얻은 cDNA (RT 반응 용액)를 template로 첨가하는 경우에는, PCR 반응 양의 10 % 혹은 그 이하가 되도록 하십시오.

* 3 : 반응 양은 25 μl 로 권장합니다

2. PCR 반응을 시작한다.

PCR 반응은 아래의 표준 프로토콜로 실시하는 것을 권장합니다. 먼저 표준 프로토콜을 시도해본 후, 필요에 따라 PCR 조건을 최적화하십시오. PCR 조건을 최적화하는 경우에는 9페이지의 "PCR 조건"을 참조하십시오.



표준 프로토콜

Hold (Pre-denaturation)

Cycle: 1

98 °C, 2분

3 Step PCR

Cycle: 40

98 °C, 10초

60 °C, 15초

68 °C, 1분 / kb *4

Dissociation

*4 500 bp 또는 그 이하일 경우 30초

※ 사용상의 주의

본 제품에 사용하는 MightyAmp™ DNA Polymerase는 강력한 hot start antibody를 사용하고 있으므로, 반드시 98°C, 2분의 Pre-denaturation과정을 실시하여 항체를 열변성시켜야 한다.

3. 반응 종료 후, 증폭 곡선과 용해 곡선을 확인하고, 정량을 실시하는 경우에는 검량선을 작성한다 (분석 방법은 Thermal Cycler Dice® Real Time System 설명서를 참조).

[Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 및 StepOnePlus Real-Time PCR System을 사용할 경우]

* 각 장치의 사용 설명서에 따라 조작하십시오.

1. 아래의 PCR 반응액을 조제한다.

<1회 반응 분량>

| 시약 | 사용량 | 사용량 | 최종농도 |
|---|---------------------|---------------------|----------------------|
| MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2 ×) | 10 μl | 25 μl | 1 × |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.4 μl | 1 μl | 0.2 μM *1 |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.4 μl | 1 μl | 0.2 μM *1 |
| ROX Reference Dye (50x) or Dye II (50 ×) *3 | 0.4 μl | 1 μl | 1 x |
| Template (<100 ng) | 2 μl | 4 μl | *2 |
| 멸균증류수 | 6.8 μl | 18 μl | |
| Total | 20 μl *4 | 50 μl *4 | |

* 1 : Primer 최종 농도가 0.2 μM 일 때, 좋은 결과를 얻을 수 있는 경우가 많지만, 반응성에 문제가 있을 때는 0.1 ~ 1.0 μM 의 범위에서 최적의 농도를 검토하십시오.

* 2 : 타겟의 카피 수는 Template 용액에 따라 다를 수 있습니다. 단계적으로 희석하여 적절한 첨가량을 검토하십시오. DNA template는 Total 반응액이 20 μl 일 때를 기준으로, 100 ng 혹은 그 이하로 이용하는 것이 바람직합니다. RT-PCR로 얻은 cDNA (RT 반응 용액)를 template로 첨가하는 경우에는, PCR반응 양의 10 % 혹은 그 이하가 되도록 하십시오.

* 3 : ROX Reference Dye II (50 ×)는 ROX Reference Dye (50 ×)보다 농도가 낮습니다. 7500 및 7500 Fast Real-Time PCR System으로 분석하는 경우에는, ROX Reference Dye II (50 ×)의 사용을 권장합니다. StepOnePlus으로 분석하는 경우에는 ROX Reference Dye (50 ×)를 사용하십시오.

* 4 : 각 장치의 권장 용량에 따라 조제하십시오.

2. 반응을 시작한다.

PCR 반응은 아래의 표준 프로토콜로 실시하는 것을 권장합니다. 먼저, 표준 프로토콜을 시도해본 후, 필요에 따라 PCR 조건을 최적화하십시오. PCR 조건을 최적화하는 경우에는 9 page의 "PCR 조건"을 참조하십시오.

< Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, StepOnePlus >

표준 프로토콜

Stage 1 : Pre-denaturation

Reps : 1

98 ° C, 2분

Stage 2 : PCR

Reps : 40

98 ° C, 10초

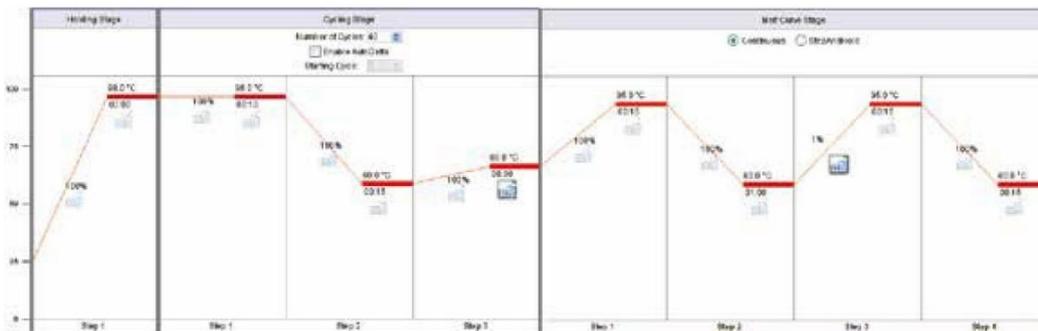
60 ° C, 15초

68 ° C, 1분 / kb

(500 bp 이하는 30 초)

Dissociation stage (Melt Curve stage)

< 7500 Fast Real-Time PCR System >



Stage 1 : Pre-denaturation

Cycle : 1

98 ° C, 2분

Stage 2 : PCR

Cycle : 40

98 ° C, 10초

60 ° C, 15초

68 ° C, 1분 / kb

(500 bp 이하는 30 초)

Melt Curve stage

※ 사용상의 주의

본 제품에 사용하는 MightyAmp™ DNA Polymerase는 강력한 hot start antibody를 사용하고 있으므로, 반드시 98°C, 2분의 Pre-denaturation과정을 실시하여 항체를 열변성시켜야 한다.

3. 반응 종료 후 증폭 곡선과 용해 곡선을 확인하고, 정량을 실시하는 경우에는 검량선을 작성한다. (분석 방법은 Thermal Cycler Dice® Real Time System 설명서를 참조)

[LightCycler를 사용할 경우]

* 각 장치의 사용 설명서에 따라 조작하십시오.

1. 아래의 PCR 반응액을 조제한다.

<1회 반응 분량>

| 시약 | 사용량 | 최종농도 |
|--|-------------------|----------------------|
| MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2×) | 10 μl | 1× |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.4 μl | 0.2 μM *1 |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.4 μl | 0.2 μM *1 |
| Template (<100 ng) | 2 μl | *2 |
| 멸균증류수 | 7.2 μl | |
| Total | 20 μl | |

* 1 : Primer 최종 농도가 0.2 μM 일 때, 좋은 결과를 얻을 수 있는 경우가 많지만, 반응성에 문제가 있을 때는 0.1 ~ 1.0 μM 의 범위에서 최적의 농도를 검토하십시오.

* 2 : 타겟의 카피 수는 Template 용액에 따라 다를 수 있습니다. 단계적으로 희석하여 적절한 첨가량을 검토하십시오. DNA template는 Total 반응액이 20 μl 일 때를 기준으로, 100 ng 혹은 그 이하로 이용하는 것이 바람직합니다. RT-PCR로 얻은 cDNA (RT 반응 용액)를 template로 첨가하는 경우에는, PCR반응 양의 10 % 혹은 그 이하가 되도록 하십시오.

2. PCR tube을 원심 분리기를 이용해 가볍게 spin-down 후, LightCycler에 넣고 반응을 시작한다. PCR 반응은 아래의 표준 프로토콜로 실시하는 것을 권장합니다. 먼저, 표준 프로토콜을 시도해본 후, 필요에 따라 PCR 조건을 최적화하십시오. PCR 조건을 최적화하는 경우에는 9 page의 "PCR 조건"을 참조하십시오.

표준 프로토콜

Stage 1: Pre-denaturation

Cycle: 1
98 ° C, 2분 20 °C/초

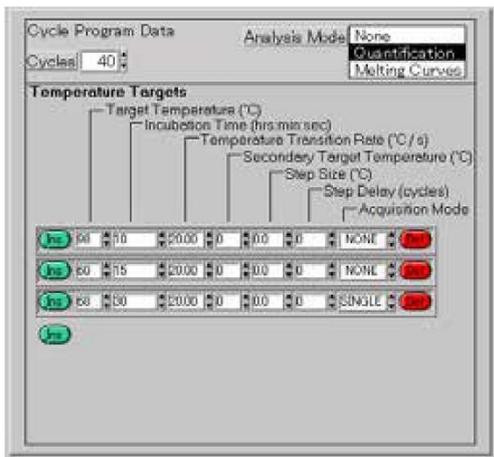
Stage 2: PCR 반응

Cycle: 40
98 ° C, 10초 20 °C/초
60 ° C, 15초 20 °C/초
68 ° C, 1분 / kb 20 °C/초

(500 bp 이하는 30 초)

Stage 3: 용해 곡선 분석

95 ° C, 0초 20 °C/초
65 ° C, 15초 20 °C/초
95 ° C, 0초 0.1 °C/초



Stage 2: PCR 반응

※ 사용상의 주의

본 제품에 사용하는 MightyAmp™ DNA Polymerases는 강력한 hot start antibody를 사용하고 있으므로, 반드시 98°C, 2분의 Pre-denaturation과정을 실시하여 항체를 열변성시켜야 한다.

3. 반응 종료 후, 증폭 곡선과 용해 곡선을 확인하고, 정량을 실시하는 경우는 검량선을 작성한다 (분석 방법은 Real Time PCR 기기의 취급 설명서를 참조).

VII. PCR 조건

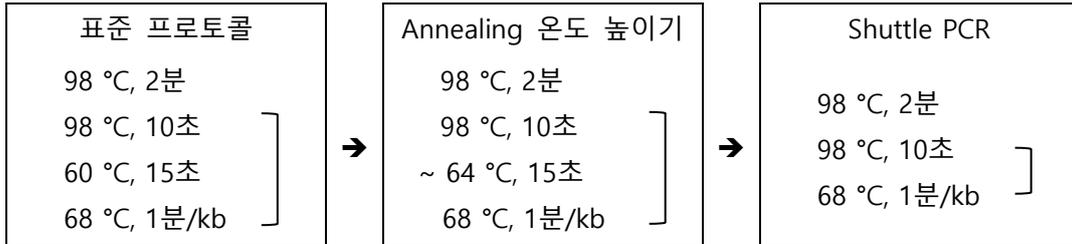
[Pre-denaturation]

본 제품에 사용하는 MightyAmp™ DNA Polymerase은 강력한 hot start antibody를 사용하고 있으므로, 반드시 98°C, 2분의 Pre-denaturation을 실시하여 항체를 열변성시켜야 합니다.

[PCR 조건의 검토]

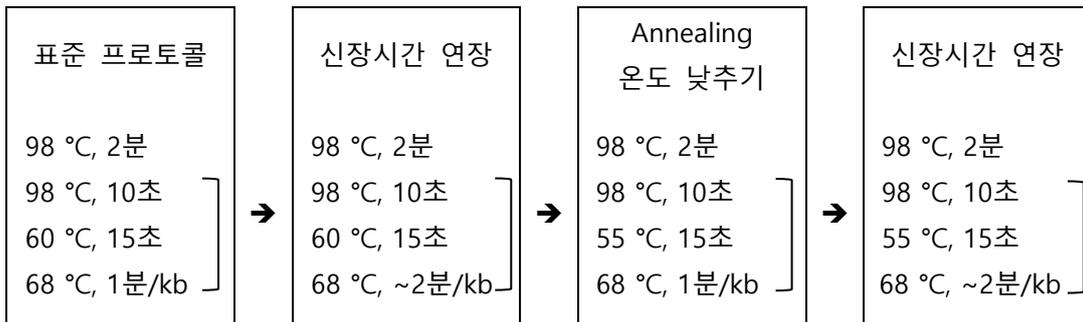
- 반응 특이성을 향상시키려면

Annealing 온도를 높이면 반응 특이성이 개선될 수 있습니다. 증폭 효율과 균형을 확인하면서, 검토를 실시합니다.



- 증폭 효율을 향상시키려면

신장 시간을 연장하거나, Annealing 온도를 낮추는 방법으로 증폭 효율이 개선될 수 있습니다. 다음 단계에서 검토를 실시합니다.



VIII. Appendix

(1) RT-PCR을 실시하는 경우

RT 반응에는 PrimeScript™ RT Kit 시리즈 (Code RR037A/B, RR036A/B, RR047A/B)의 사용을 권장합니다. 본 제품과 함께 사용함으로써 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있습니다. 다음은 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code RR037A)를 사용한 RT-PCR 예입니다.

1. 아래의 RT 반응액을 얼음 위에서 조제한다.

RNA 샘플 이외의 구성요소를 필요한 샘플 수+α 분으로 master mix를 준비하여 microtube로 분주 후에 RNA 샘플을 첨가한다.

<1회 반응 분량>

| 시약 | 사용량 | 최종농도 |
|--|----------------------|---------|
| 5 × PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2 μl | 1 × |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 0.5 μl | |
| Oligo dT Primer (50 μM)* 1 | 0.5 μl | 25 pmol |
| Random 6 mers (100 μM)* 1 | 0.5 μl | 50 pmol |
| Total RNA | | |
| 평균증류수 | | |
| Total | 10 μl * 2 | |

* 1 : Oligo dT Primer와 Random 6 mers를 모두 이용하면, total mRNA에 대한 cDNA를 효율적으로 합성할 수 있습니다. 또한, 각 primer를 단독으로 이용하는 경우, 또는 Gene Specific Primer를 사용하는 경우의 사용량은 다음과 같습니다.

| Primer | 사용량 | 첨가량 |
|---|-------------------|---------|
| Oligo dT Primer (50 μM) | 0.5 μl | 25 pmol |
| Random 6 mers (100 μM) | 0.5 μl | 50 pmol |
| Gene Specific Primer (2 μM) | 0.5 μl | 1 pmol |

* 2: 역전사 반응액은 필요에 따라 늘리십시오. 10 μl 의 반응액에서 가능한 Total RNA template의 양은 약 500 ng까지의 total RNA입니다.

2. 역전사 반응을 진행한다.

| | |
|---------------|--------------|
| 37 °C, 15분* 3 | (역전사반응) |
| 85 °C, 5초 | (역전사효소 불활성화) |
| 4 °C | |

* 3: Gene Specific Primer를 이용하는 경우, 역전사 반응을 42 °C, 15 분간 진행하십시오. PCR 과정에서 비특이적 증폭이 생겼을 경우, 역전사 온도를 50 °C로 변경하면 개선될 수 있습니다

3. PCR 반응액을 아래와 같이 조제한다 (Thermal Cycler Dice® Real Time System 사용의 경우). 다음 구성 요소를 필요한 샘플 수+ α 분으로 master mix를 준비하고, 22.5 ~ 24 $\mu\ell$ 씩 분주한다.

<1회 반응 분량>

| 시약 | 사용량 | 최종농도 |
|--|-------------------|-------------------|
| MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (2×) | 12.5 $\mu\ell$ | 1 × |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.5 $\mu\ell$ | 0.2 μM |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.5 $\mu\ell$ | 0.2 μM |
| 멸균증류수 | x $\mu\ell$ | |
| Total | 22.5~24 $\mu\ell$ | |

4. 3.에서 조제한 반응액을 분주한 튜브에 역전사 반응액을 1 ~ 2.5 $\mu\ell$ 첨가한다.
PCR 반응을 위한 역전사 반응액의 사용량은 2.5 $\mu\ell$ 이하로 한다

IX. 실험 예

실험 예 1: Crude 샘플을 이용한 Real Time PCR

[방법]

소 체장 13.4 mg 또는 마우스 체장 10.5 mg에 50 mM NaOH 180 μ l를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C, 10분 처리한 후, 1M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ l를 첨가하여 알칼리 열 추출액을 얻었다. 각 추출액의 원액, 4배 희석액, 16배 희석액 1.5 μ l을 주형으로, 본 제품과 TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™]™ (Perfect Real Time) (Code RR041A; 단종) *를 이용하여 *cox1* 유전자 (289 bp) 및 *Hbb-b1* 유전자 (165 bp)에 대한 Real Time PCR을 수행 후 반응성을 비교하였다.

* TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™]™ (Tli RNaseH Plus) (Code RR420A/B) 이전 버전입니다.

[결과]

본 제품을 이용한 경우, 두가지 crude sample에 대해서 주형량에 따른 양적 증폭이 나타났다. 한편, 기존 제품 (Code RR041A)에서는 샘플 중 저해 물질에 의한 반응 저해가 현저히 발생하였다 (그림 1). PCR 저해 물질이 많이 함유된 샘플의 Real Time PCR을 진행할 경우, 본 제품 (Code R075A)을 사용하여 고감도의 정량분석이 가능하다.

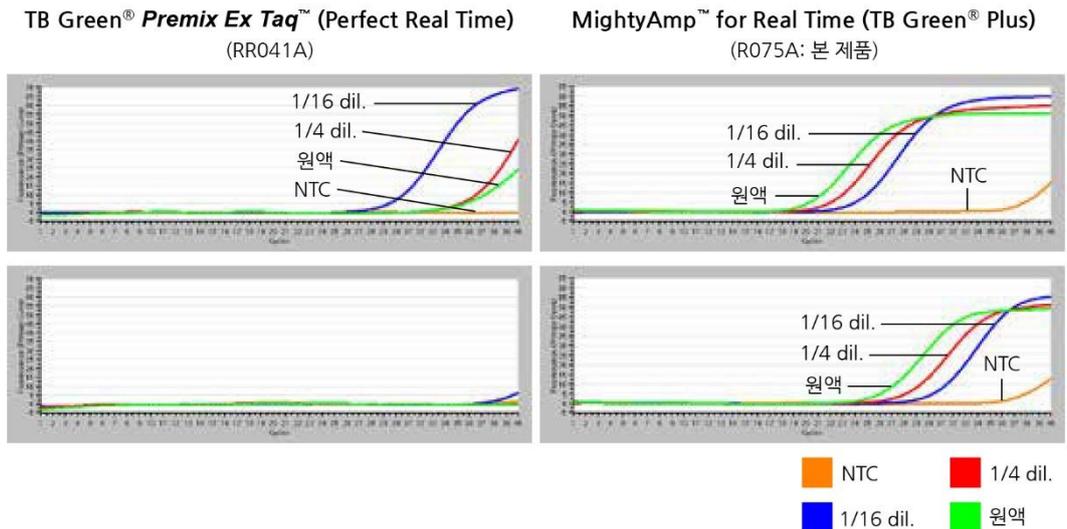


그림 1. Crude 샘플에서의 Real Time PCR

시약 : TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™]™ (Perfect Real Time) (Code RR041A)

: MightyAmp[™] for Real Time (TB Green[®] Plus) (Code R075A)

장치 : Thermal Cycler Dice[®] Real Time System

반응조건 : RR041A

95 $^{\circ}$ C, 30초 → 95 $^{\circ}$ C, 5초 / 60 $^{\circ}$ C, 30초; 40 Cycle

: R075A

98 $^{\circ}$ C, 2분 → 98 $^{\circ}$ C, 10초 / 60 $^{\circ}$ C, 15초 / 68 $^{\circ}$ C 30초; 40 Cycle

샘플 : (A) 소 체장 알칼리 열 추출액

: (B) 마우스 체장 알칼리 열 추출액

Target gene : *cox1*

: *Hbb-b1*

실험 예 2: GC 함량 70% 이상의 샘플을 이용한 Real Time PCR

[방법]

GC 함량이 70%가 넘는 cDNA 혹은 gDNA 4종을 주형으로, 본 제품과 TB Green® *Premix Ex Taq™* GC (Perfect Real Time) (Code RR071A) 및 TB Green® *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time) (Code RR041A; 단종) *를 이용하여 Real Time PCR을 수행하여 반응성을 비교하였다.

* TB Green® *Premix Ex Taq™* (Tli RNaseH Plus) (Code RR420A/B) 이전 버전입니다.

[결과]

TB Green® *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time)와 TB Green® *Premix Ex Taq™* GC (Perfect Real Time)로 증폭이 어려운 70 % 이상의 GC 함량 대상에 대해서도 R075A를 사용한 경우, 양적 증폭을 나타내었다 (그림 2).

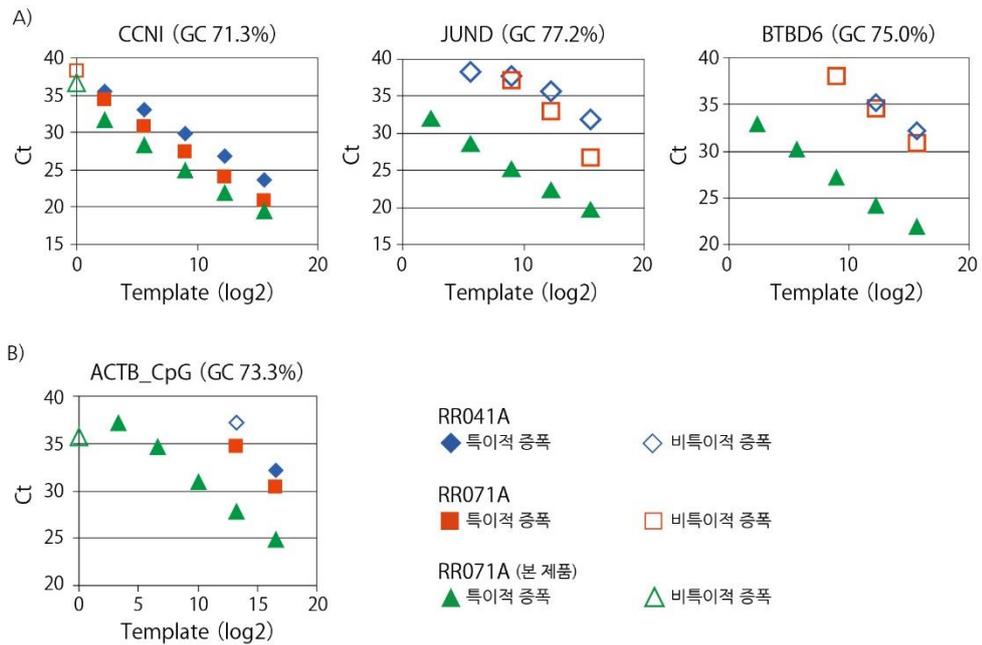


그림 2. GC 함량이 70%를 초과하는 샘플에서의 Real Time PCR

- 시약 : TB Green® *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time) (Code R041A)
 : TB Green® *Premix Ex Taq™* GC (Perfect Real Time) (Code R071A)
 : MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (Code R075A)
- 장치 : Thermal Cycler Dice® Real Time System
- 반응조건 : RR041A
 95 °C, 30초 → 95 °C, 5초 / 60 °C, 30초; 40 Cycle
 : RR071A
 95 °C, 30초 → 95 °C, 5초 / 60 °C, 30초; 40 Cycle
 : R075A
 98 °C, 2분 → 98 °C, 10초 / 60 °C, 15초 / 68 °C 30초; 40 Cycle
- 주형 : (A) cDNA (Human testis total RNA 5 pg ~ 50 ng 상당량)
 : (B) Human genomic DNA 10 pg ~ 100 ng
- Target gene : (A) CCNI (115 bp), JUND (167 bp), BTBD6 (168 bp)
 : (B) ACTB_CpG (131 bp)

실험 예 3: End point PCR용 primer를 그대로 이용하는 Real Time PCR

[방법]

Human genomic DNA를 주형으로 증폭 길이가 각각 550 bp, 985 bp, 1,954 bp인 end point PCR용 primer를 이용해 Real Time PCR을 수행한 후, 반응성을 비교하였다.

[결과]

기존 제품에서는 Real Time PCR 증폭이 어려운 300 bp 이상의 주형에 대해서도 본 제품을 이용할 경우 end point PCR 반응 조건 (extension 시간을 1 분 / kb로 설정)을 이용하여 정량적인 증폭을 나타내었다 (그림 3).

전기영동 분석을 위해 설계한 primer와 PCR 조건을 그대로 이용하여 다소 큰 크기 (증폭 크기; ~ 2 kb)를 Real Time PCR로 검출하고자 하는 경우, 본 제품을 사용하는 것으로 좋은 결과를 기대할 수 있다.

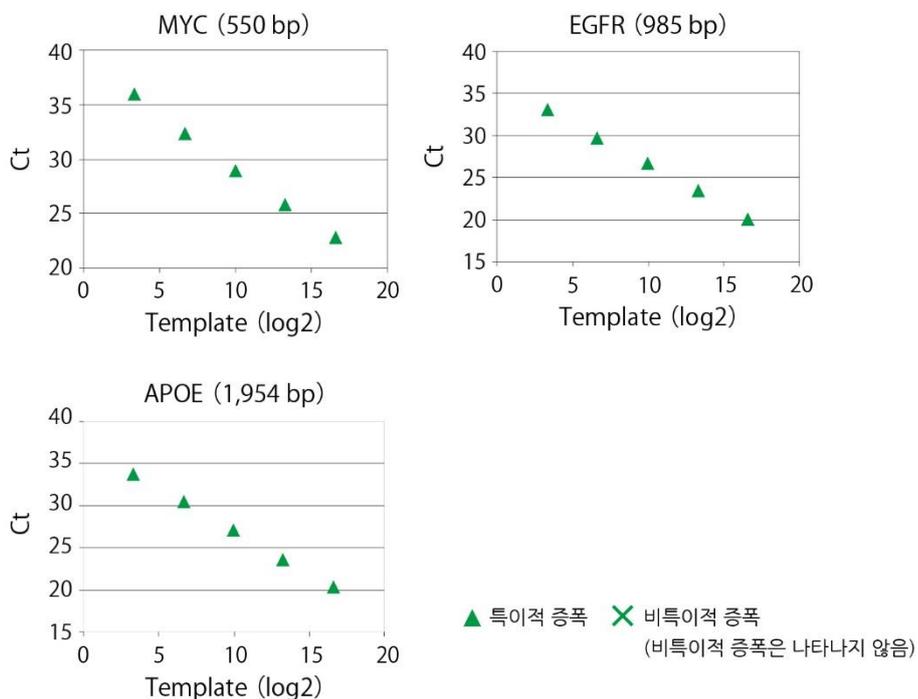


그림 3. End point PCR 용 primer를 이용한 Real Time PCR (증폭 사이즈: 500 bp ~ 2 kb)

시약 : MightyAmp™ for Real Time (TB Green® Plus) (Code R075A)

장치 : Thermal Cycler Dice® Real Time System

반응조건 : MYC / 550 bp

98 °C, 2분 → 98 °C, 10초 / 60 °C, 15초 / 68 °C, 30초; 40 Cycle

: EGFR / 985 bp

98 °C, 2분 → 98 °C, 10초 / 60 °C, 15초 / 68 °C, 60초; 40 Cycle

: APOE / 1,954 bp

98 °C, 2분 → 98 °C, 10초 / 60 °C, 15초 / 68 °C, 120 초; 40 Cycle

주형 : Human genomic DNA 10 pg ~ 100 ng

X. 참고문헌 – 원문 참조

XI. 관련 제품

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code RR820A/B)
TB Green® Fast qPCR Mix (Code RR430A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code RR420A/B)
TB Green® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (Code RR091A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (Code RR071A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code RR037A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code RR036A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code RR047A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code RR096A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code RR086A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code RR066A/B)
Probe qPCR Mix (Code RR391A/B)
Thermal Cycler Dice® Real Time System II (Code TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Code TP700/TP760)

XII. 주의

- 본 제품은 연구용입니다. 사람, 동물의 의료/임상 진단용으로는 사용불가 합니다. 또한, 식품, 화장품, 가정용품 등으로 사용하지 마십시오.
- Takara Bio의 승인 없이 제품의 재판매·양도 및 재판매·양도를 위한 수정, 상용 제품 제조에 사용하는 것은 금지되어 있습니다.
- 라이선스에 관한 최신 정보는 다카라코리아 고객지원센터 (Tel. 02-2081-2510, support@takara.co.kr) 로 문의바랍니다. .
- TB Green®, Thermal Cycler Dice®, MightyAmp™, PrimeScript™, *Premix Ex Taq*™, DimerEraser™는 Takara Bio Inc.의 상표입니다. 기타 본 매뉴얼에 기재되어 있는 회사 이름 및 상품명 등은, 각 사의 상호 또는 등록 후 또는 미등록의 상표이며, 이들은 각 소유자에게 귀속합니다.