

Code RR260A

식품·환경 분석용

Takara

***Kudoa septempunctata* (18S rRNA)**

qPCR Detection Kit

사용설명서

v201302Da

본 제품은 후생노동성 통지 「*Kudoa septempunctata*의 검사법에 대해(잠정판)」(食案監發 0711 제 1호)에 기재되어 있는 primer, probe 서열을 채용한 *Kudoa septempunctata*를 검출하기 위한 Real Time PCR kit입니다. Kit에는 Real Time PCR 시약외에 정량을 위한 양성 컨트롤 plasmid가 포함되어 있습니다.

I. Kit의 내용 (20 µl 반응시, 50 회)

1.	<i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)(2×conc.)	500 µl
2.	Kudoa Primer/Probe Mix(10×conc.)*1	100 µl
3.	dH ₂ O	1 ml
4.	ROX Reference Dye (50×conc.)	20 µl
5.	ROX Reference Dye II (50×conc.)	20 µl
6.	Kudoa Positive Control (2.5×10 ⁷ copies/µl)*2	50 µl
7.	EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 2개

*1 형광표지 probe(FAM-TAMRA 표지)를 포함하고 있으므로, 차광에 유의해 주세요.

*2 Real Time PCR 반응액에(1~5)에 잘못해 혼입되면, 올바른 검출 반응을 실시할 수 없습니다. 오염에 특별히 주의해주세요.

II. 보존

- 20°C

Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)는 용해 후 4 °C로 보존하며, 반복적인 동결 용해를 피해 주세요. 4 °C에서 6개월간 안정합니다.

장기 보존이 필요한 경우에는 최초의 용해시 소량씩 분주하여 -20 °C에 보존해 주세요.

III. 본 제품 이외에 필요한 시약, 기기(주된 것)

* **Real Time PCR 용 기기 및 전용 tube**

Thermal Cycler Dice Real Time System *II* (Code TP900/TP960)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code TP700/TP760)

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System(Life Technologies) 등

* 탁상용 원심분리기

* 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l 각 micropipette

* Micropipette 용 tip(필터 장착 tip)

IV. 실험시 주의사항

1) Real Time PCR 기기는 각 기기의 사용설명서에 따라서 사용해 주세요.

2) Probe 혹은 primer에 nuclease가 오염되면, 정확한 검출을 할 수 없습니다. 실험자의 땀이나 타액에서도 nuclease가 혼입될 가능성이 있으므로, 실험시 세심한 주의를 기울여 주세요.

3) 양성으로 판정된 검사대상은 추가로 미생물학적인 방법을 이용하여 확인해 주세요.

4) 반응액 조제부터 검출까지 다음 3개의 Area로 분리하여, 물리적으로 구분할 것을 추천합니다. 각 Area에서는 증폭산물이 포함되어 있는 tube의 개폐는 삼가해 주세요.

○ Area 1 : 반응액 조제, 분주를 위한 구역

○ Area 2 : 검사대상(검체)의 조제를 위한 구역

○ Area 3 : 검사대상(검체)을 반응액에 첨가 및 반응, 검출을 위한 구역

본 제품에서는 증폭 반응과 검출을 동시에 실시간(real time)으로 진행하고 있으므로, 반응 종료 후에 증폭산물을 전기영동 등으로 확인 할 필요가 없습니다. 또, 오염 발생의 원인이 되기 때문에, 증폭산물을 tube로부터 꺼내는 것은 삼가해 주세요.

5) 본 제품은 Real Time PCR 기기를 통한 해석에 의해서 결과를 판정합니다. Real Time PCR 기기의 각종 Auto 기능이 적정하게 작동하지 않은 경우에는 오판정의 원인이 됩니다. 필요에 따라서 Real Time PCR 기기의 사용설명서에 따라 [Manual]로 설정해 주세요.

V. 조작

※ DNA 추출 등의 사전 처리 방법에 대해서는 후생노동성 통지「*Kudoa septempunctata*의 검사법에 대해(잠정판)」(食案監發 0711 제1호)을 참조하십시오.

1. 양성 컨트롤 (검량선 작성용 standard) 조제(Area 3 에서 실시)

Kudoa Positive Control을 EASY Dilution(for Real Time PCR)로 단계 희석하여, 2.5×10^7 (원액), 2.5×10^5 , 2.5×10^3 , 2.5×10^1 copies/ μ l의 용액을 조제한다(1 반응시 4 μ l를 사용하므로, 각 반응의 최종 카피 수는 각각 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 이 된다).

2. 아래와 같이 얼음에서 반응액을 조제한다 (Area 1 에서 실시)

검사대상(검체) 샘플 등의 주형 이외에 component를 필요 반응수 + α 분으로 조제하여, 각 반응 tube에 16 μ l씩 분주하여 뚜껑을 가볍게 닫는다. 그 중 1 개의 tube에 negative control로 멸균수 4 μ l를 첨가하여 반응 튜브의 뚜껑을 확실히 닫는다.

[Thermal Cycler Dice Real Time System 시리즈 사용시]

1 반응시

Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)	10 μ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 μ l
dH ₂ O	4 μ l
검체 샘플 혹은 Positive Control 혹은 D.W.	(4 μ l) ^{*1}
	20 μ l

[Life Technologies Real Time PCR 시리즈 사용시]

1 반응시

Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)	10 μ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 μ l
ROX Reference Dye or Dye II ^{*2}	0.4 μ l
dH ₂ O	3.6 μ l
검체 샘플 혹은 Positive Control 혹은 D.W.	(4 μ l) ^{*1}
	20 μ l

^{*1} 검체 샘플의 주형은 이 단계에서는 첨가하지 않는다.

^{*2} StepOnePlus에는 ROX Reference Dye를, 7500 Fast Real-Time PCR System에는 ROX Reference Dye II 를 사용한다.

3. 주형(DNA 용액) 첨가(Area 3 에서 실시)

2. 에서 분주한 반응액에 검체 DNA나 검량선 작성용 standard등을 주형으로 4 μ l씩 첨가하여, 튜브의 뚜껑을 확실히 닫는다.

형광량 측정을 통해 검출하므로, 튜브가 더러워지지 않도록 주의해야 하므로, 특히 뚜껑을 닫을 때는 장갑을 착용한다. 0.2 ml 튜브용 탁상원심분리기로 가볍게 원심하여, Real Time PCR 기기에 세팅한다.

4. Real Time PCR 반응 개시

이하의 PCR 조건으로 Real Time PCR을 실시한다.

[※ Real Time PCR 기기의 사용법은 각 기종의 사용설명서를 참조하십시오.]

초기 변성(Pre-denaturation)

95°C 30 초

2 Step PCR

45 cycles

95°C 5 초

60°C 30 초 (형광 검출 : FAM/SYBR)

5. 반응 종료 후, 해석을 실시한다.

※ 해석법은 후생노동성 통지「*Kudoa septempunctata*의 검사법에 대해(잠정판)」(食案監發 0711 제1호)을 참조하십시오.

VI. 관련제품

Thermal Cycler Dice Real Time System *II* (Code TP900/TP960)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code TP700/TP760)

Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Code TP850/TP870)

Premix Ex Taq (Probe qPCR)(Code RR390A/B)

EASY Dilution (for Real Time PCR)(Code 9160)

NucleoSpin Tissue(Code 740952.10/.50/.250)

VII. 주의

* 본 제품은 식품분석 및 환경분석용 시약입니다. 사람, 동물에 대한 의료, 임상 진단에는 사용할 수 없습니다. 또, 식품, 화장품, 가정용품 등으로도 사용할 수 없습니다. 검사 결과 판정에 의해 발생하는 문제에 대해서 본 제품의 제조사인 다카라바이오 주식회사는 책임 질 수 없음을 공지합니다.

* 다카라바이오의 승인을 얻지 않고 본 제품을 재판매, 양도, 재판매·양도를 위한 변형, 상용제품의 제조에 사용할 수 없습니다.

* 라이선스에 관한 최신 정보는 당사의 홈페이지에서 확인해 주세요.

* 본 설명서에 기재되어 있는 회사명 및 상품명 등은 각 사의 상호 또는 등록이 끝난 상태 혹은 미등록의 상표이며, 이것들은 각 소유자에게 귀속되어 있습니다.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[A6] PCR Notice

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the us: 5,804,375,5,538,848,5,723,591,5,876,930,6,030,787 and 6,258,569. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Environmental Testing, Food Testing, Industrial Microbiology, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[L15] Hot Start PCR

Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L53a] Rox Reference Dye (Application Field)

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Environmental Testing, Industrial Microbiology, including reporting results of purchaser ' s activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M40] Thermostable RNaseH

This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M57] LA Technology

This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

[M82] Tli RNaseH Plus

This product is the subject of the pending JP patent application.