

Dyne Direct PCR

◆ 제품구성

Dyne Direct PCR	
Cat. No.	BN430 (200 rxns/kit)
2X Direct PCR premix (with UDG/UTP)	1 ml x 5 ea
10X Dilution Buffer	1.5 ml x 2 ea
6X Loading Dye	1 ml x 1 ea
Certificate Analysis	1 ea

◆ 보관온도

· -20°C

◆ 응용분야

- Whole blood, 침, 쥐 조직(꼬리, 심장, 간, 대장, 소장, 신장, 위, 귀, 뇌, 비장), zebrafish 지느러미, 돼지, 소, 식물 조직(잎, 씨)과 같은 다양한 시료에서 DNA 정제과정 없이 target DNA 증폭이 가능하다.
- 특정 대립유전자 PCR
- genotyping
- genetically modified organisms (GMO) 선별

◆ 제품 특징

· Dyne Direct PCR은 동물조직, whole blood, 그리고 식물조직에서 DNA 정제과정 없이 PCR 증폭을 하기 위하여 고안되었다. 본 키트는 *Taq* DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, 그리고 조직 샘플의 다양한 PCR inhibitor를 중화시키기 위한 다양한 buffer가 포함된 2X reaction mix가 포함되어 있다. *Taq* polymerase의 뛰어난 중합반응 효율과 3' → 5' 핵산말단가수분해효소 불활성화 특성을 가진다. 따라서 다양한 genotyping을 위한 특정 대립유전자 PCR을 목적으로 사용된다. 당사 제품은 *Taq* polymerase를 기반으로 하여 오염 방지를 위한 dUTP 시스템을 이용한 Uracil-DNA glycosylase와 dUTP가 지원된 version을 제공한다.

◆ 표준반응조건

1. Sample Preparation

[Whole Blood or saliva]

1) 전처리 과정 없이 PCR reaction mix를 시료별로 1-3 μl 넣는다.

※ Heparin, EDTA or citrate-treated whole blood 모두 본 키트의 사용에 적합하다.

[Animal or Plant tissue]

1) 10X dilution buffer를 1X로 만들어 50 μl 씩 분주한다.
2) 동물이나 식물조직을 자른다(직경이 6 mm를 넘지 않도록 한다). 식물의 씨앗은 작은 망치, bead beater, 혹은 tissue lyser를 이용하여 직경이 1 mm 미만으로 되게 자른다.

※ 교차오염 방지를 위하여 일회용 cutting tool을 이용한다. 일회용 cutting tool이 아닌 경우 cutting tool을 2% sodium hypochloride로 세척하여 사용한다.

3) 시료 크기에 따라서 1X Dilution Buffer를 조직 시료에 첨가한다.

Sample size (diameter)	1~2 mm	3~4 mm	5~6 mm
Volume of Dilution Buffer	50 μl	100 μl	150 μl

4) 조직 시료를 tapping이나 vortexing을 이용하여 잘 섞어준다.

※ 시료가 dilution buffer에 충분히 잠기게 한다.

5) 조직이 충분히 용해되도록 한다.

※ Lysis 시간 3분을 정확하게 지켜야 한다.

6) 짧게 원심분리 후, 1-3 μl 상등액을 PCR reaction mixture에 넣는다.

※ 상등액은 조직으로부터 분리하여 -20°C에서 보관하고, 보관 시작부터 몇 주 동안 사용이 가능하다.

2. PCR preparation

Components	Volume
Sample prepared	1~3 μl
2X Direct PCR premix	25 μl
Forward Primer (10 pmole/ul)	2 μl
Reverse Primer (10 pmole/ul)	2 μl
D.W.	Up to 50 μl

3. PCR condition

Step	Temperature/time		Cycles
	50°C	5 min	1
Pre-denaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	20 sec	35 ~40
Primer annealing	X°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Post Extension	72°C	5 min	1

※ [Optional] UDG reaction

This step is only required for the UDG included product.

◆ 중요 사항

- 혈액의 경우, PCR 후에 blood debris나 단백질의 응집이 확인되면 600xg (about 3000 rpm) 에서 1 분 동안 spin-down 하여 blood debris나 단백질을 제거한다.

◆ 문제 해결

Product가 나오지 않거나 yield가 낮을 때

- 권장사항에 따라 pipetting을 수행하였는지, cycling protocol 대로 수행하였는지 확인한다.
- Template 양을 낮추거나, 상등액을 희석한다. (1:5 or 1:10)
- 최적화된 Annealing temperature를 적용한다.
- Temperature gradient PCR을 수행한다.
- PCR cycle 수를 늘린다.
- Primer를 확인하거나, 새로운 primer를 디자인한다.

비특이적인 product

- Extension time을 너무 길게 하지 않는다 (>1 min/kb)
- Template 양을 낮추거나, 상등액을 희석한다. (1:5 or 1:10)
- 최적화된 Annealing temperature를 적용한다.
- Temperature gradient PCR을 수행한다.
- Primer annealing 시간을 낮춘다.
- Primer 농도를 낮춘다.
- PCR cycle을 줄인다.
- Primer를 확인하거나, 새로운 primer를 디자인한다.

교차오염 (For prevention of PCR contamination)

- Hydrophobic filter가 있는 disposable pipet을 이용한다.
- PCR 전용 D.W를 사용한다.
- 실험공간이나 장비의 오염상태를 확인한다.