

HelixDtec™ 과수화상병/가지검은마름병 검출 키트

Kit contents

| HelixDtec™ 과수화상병/가지검은마름병 검출 키트 | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Cat. NO. | EAEP-T100 (100 tests) |
| 2x Direct qPCR Premix | 1.25ml |
| EAEP OM | 0.1ml |
| 10x Dilution Buffer | 1.5 ml x 2ea |
| EAEP PC | 0.05ml |
| RNase free Water | 1.5ml |
| Instructions for Use | 1ea |

Description

HelixDtec™ 과수화상병/가지검은마름병 검출 키트는 식물 조직에서 과수화상병의 주요 원인균인 *Erwinia amylovora* 와 가지검은마름병의 주요 원인균인 *Erwinia pyrifoliae* 를 ONETUBE반응으로 동시 검출하는 제품이다.

본 제품은 Taq polymerase, dNTP 및 MgCl₂와 식물 조직시료로부터 나오는 다양한 PCR 억제 물질(inhibitor)에 내성을 갖는 Buffer가 2x 농도로 혼합된 premix 제품이다. DNA추출 시약이 함께 포함되어 있어, DNA 추출부터 qPCR까지 한 키트로 모든 검사 과정을 수행할 수 있는 Probe 방식의 Fast Real-time PCR 제품이다.

검사 방법

1. 시료 전처리

아래의 방법 중 선택하여 시료 채취 및 전처리를 수행한다.

A. Direct sampling

- 1) 멸균된 증류수로 10x Dilution Buffer를 1x Dilution Buffer로 희석한다.
 ※ 예: 멸균 증류수 : 10x Dilution Buffer = 90 μL : 10 μL
 ※ Dilution Buffer는 사용하기 직전에 희석하여 사용한다.
- 2) 검사할 시료(식물)를 커터칼 등을 이용하여 직경 5mm 미만이 되도록 채취한다.

- 3) 채취한 시료에 1x Dilution Buffer을 50~100 μL 를 첨가한 후 tapping 또는 vortex하여 혼합한다.
- 4) 실온에서 3분간 정치시킨 후, 원심분리한다(12000rpm, 1분).
- 5) 상등액을 PCR template로 사용한다.

B. Sampling by HelixLab™ Plant Sampling Tool

- 1) 멸균된 증류수 10x Dilution Buffer를 1x Dilution Buffer로 희석한다.
 - ※ 예: 멸균 증류수 : 10x Dilution Buffer = 90 μL : 10 μL
 - ※ Dilution Buffer는 사용하기 직전에 희석하여 사용한다.
- 2) HelixLab™ Plant Sampling Tool (Cat. PST-T100)을 사용하여 식물 조직을 긁어 (2~3회) 시료를 채취한다.
 - ※ 여러 번 긁어 너무 많은 양의 조직을 채취하는 것은 삼가한다.
- 3) 조직을 채취한 HelixLab™ Plant Sampling Tool을 200 μL 의 1x Dilution Buffer에 풀어 주며 섞는다.
- 4) 실온에서 3분간 정치시킨 후, HelixLab™ Plant Sampling Tool을 제거한다.
- 5) 원심분리 (12000rpm, 1분)한 후 상등액을 PCR template로 사용한다.

2. PCR 시약 혼합

- * 실험 진행 시, 적어도 1개 이상의 Negative Control(RNase Free Water)와 Positive Control(EAEP PC)이 포함되어야 한다.
- * PCR master mix의 양은 Test와 control(Positive + Negative)의 수보다 최소 1~2개 반응수를 더 추가하여 준비한다.

| Component | Volume (1 test) |
|---------------------------|--------------------|
| Template | 1.0 μL |
| 2x Direct qPCR Premix | 12.5 μL |
| EAEP OM | 1.0 μL |
| RNase free Water | 10.5 μL |
| Total volume per reaction | 25 μL |

3. PCR 조건 및 형광채널 설정

1) Target별 fluorophores 설정

| Target | E. amylovora | E. pyrifoliae |
|--------------|--------------|---------------|
| Fluorescence | FAM | JOE/HEX |

2) PCR 조건

① Bio-Rad CFX96™ Real-time PCR detection system

| Step | Condition | Cycle(s) |
|-------------------|--|----------|
| Enzyme activation | 95°C for 2 min | 1 |
| PCR Amplification | 95°C for 10 sec | 5 |
| | 60°C for 20 sec | |
| | 95°C for 3 sec | 38 |
| | 60°C for 5 sec Collect the fluorescence data | |

② ABI 7500(Fast) PCR Instrument system 및 qSEEK BTS

| Step | Condition | Cycle(s) |
|-------------------|--------------------------------------|----------|
| Enzyme activation | 95°C for 5 min | 1 |
| PCR Amplification | 95°C for 10 sec | 40 |
| | 60°C for 30 sec | |
| | Collect the fluorescence data | |

4. 결과 분석 및 판정

1) Threshold and Base line setting

| 장비 | Threshold | Base start-end |
|----------|---------------------|----------------|
| CFX 96 | All target : Auto | - |
| ABI 7500 | All target : 10,000 | 3-15 |

2) 결과 분석

① Quality control 판정 기준

* Quality control인 Negative Control(NC)와 Positive Control(PC)의 결과는 검체 결과를 해석하기 전에 수행하여야 한다. Quality control의 시험 결과가 유효하지 않으면 검체 결과를 해석할 수 없으며, quality control 시험 결과 해석은 아래 표에 작성된 기준에 따른다.

| Control | Target (Fluorescence) and Ct Value | | Interpretation |
|---------|------------------------------------|-------------|----------------|
| | EA(FAM) | EP(HEX/JOE) | |
| EAEP PC | < 32 | < 32 | Valid |
| NC | N/A | N/A | Valid |

② 시료 결과 판정

| 장비 | Target | Fluorescence | Ct value | Result |
|------------------------|----------------------|--------------|-------------|--------------|
| CFX 96 | <i>E. amylovora</i> | FAM | ≤ 35 | Positive (+) |
| | | | > 35 or N/A | Negative (-) |
| | <i>E. pyrifoliae</i> | HEX/JOE | ≤ 35 | Positive (+) |
| | | | > 35 or N/A | Negative (-) |
| ABI 7500/ qSEEK BTS | <i>E. amylovora</i> | FAM | ≤ 38 | Positive (+) |
| | | | > 38 or N/A | Negative (-) |
| | <i>E. pyrifoliae</i> | HEX/JOE | ≤ 38 | Positive (+) |
| | | | > 38 or N/A | Negative (-) |

* 기준 Ct 인 35 (CFX96) 또는 38 (ABI 7500, qSEEK BTS) 이후에 증폭 signal이 관찰될 경우 재검을 권장한다

Products

| Cat. No. | Products | Size |
|-----------|--------------------------------|---------------|
| EAEP-T100 | HelixDtec™ 과수화상병/가지검은마름병 검출 키트 | 100 tests/kit |
| PST-T100 | HelixLab™ Plant Sampling Tool | 100 ea/pk |