

USER MANUAL

RealHelix™ Rice-22 FMMA Kit (for ABI7500 user)

◆ 설정 파일 버전 : FMMA품종판정-v.7.9.04

품종판정표 : 국립농산물품질관리원 2024.08.01일 개정

RealHelix™ Rice-22 FMMA Kit (for ABI7500 user)

Kit contents

RealHelix™ Rice-22 FMMA Kit	
Cat. No.	RFM-100 (100tests)
2x FMMA Premix	1ml x 2ea
A-set OM	0.12ml
B-set OM	0.12ml
FMMA 8-tube strip (ABI7500)	2packs
FMMA 8-cap strip (ABI7500)	2packs
96-well plate for FMMA (ABI7500)	-
RNase-free Water	1.5ml

Protocol

1. Template DNA 준비

- 검사하고자 하는 시료로부터 genomic DNA를 정제하여 Template로 사용한다.
- **PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit (Cat # GCTN100)**의 사용을 추천한다.

2. PCR Reaction Mixture 제조

- 각각의 시료는 2 세트의 PCR 반응 (A-set, B-set) 으로 분석된다. 따라서 각 실험에서 A-set reaction mix 와 B-set reaction mix 를 다음과 같이 준비한다.

A-set	Volumes	B-set	Volumes
Template	2 μ l (20~80ng)	Template	2 μ l (20~80ng)
2x FMMA Premix	7.5 μ l	2x FMMA Premix	7.5 μ l
A-set OM	1.0 μ l	B-set OM	1.0 μ l
RNase-free Water	4.5 μ l	RNase-free Water	4.5 μ l
15 μ l total		15 μ l total	

- n개의 시료를 동시 분석할 경우에 n+2개 분량의 Master Mix를 준비하여 분주해서 사용한다.

(예) 24립의 시료를 동시 분석할 경우 다음과 같이 Master Mix를 제조한다.

A-set Master Mix	Volume.	calculation
2x FMMA Premix	195.0 μ l	7.5 x 26
A-set OM	26.0 μ l	1.0 x 26
RNase-free Water	117.0 μ l	4.5 x 26
Final Volume	338.0 μ l	13 x 26

B-set Master Mix	Volume.	calculation
2x FMMA Premix	195.0 μ l	7.5 x 26
B-set OM	26.0 μ l	1.0 x 26
RNase-free Water	117.0 μ l	4.5 x 26
Final Volume	338.0 μ l	13 x 26

- 1) 각각의 8-strip PCR tube에 준비된 Master Mix를 13 μ l 씩 분주한다.
- 2) 분주된 각 8-strip PCR tube에 Rice gDNA 2 μ l 씩 넣어준 뒤 조심스럽게 혼합한 후 spin-down한다.

(중요) 키트에서 제공하는 [FMMA 전용 tube](#) 와 [cap strip](#) 을 사용하여야 합니다.
이외의 다른 tube 및 cap 사용시에는 정확한 결과를 얻을 수 없습니다.

3. Real-Time PCR Run

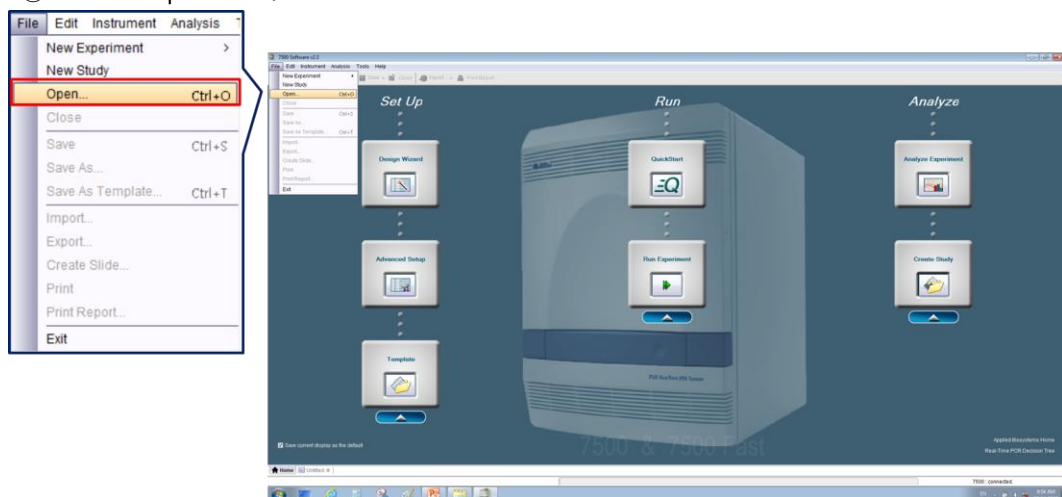
ABI7500

- 1) ABI7500 software를 실행한다.
- 2) 분주된 8-strip PCR tube를 아래 그림과 같은 배열로 장비 sample block에 장착한다.
예) A1 well과 A7 well은 동일 시료(S1)를 사용한 A-set PCR mixture와 B-set PCR mixture이다.

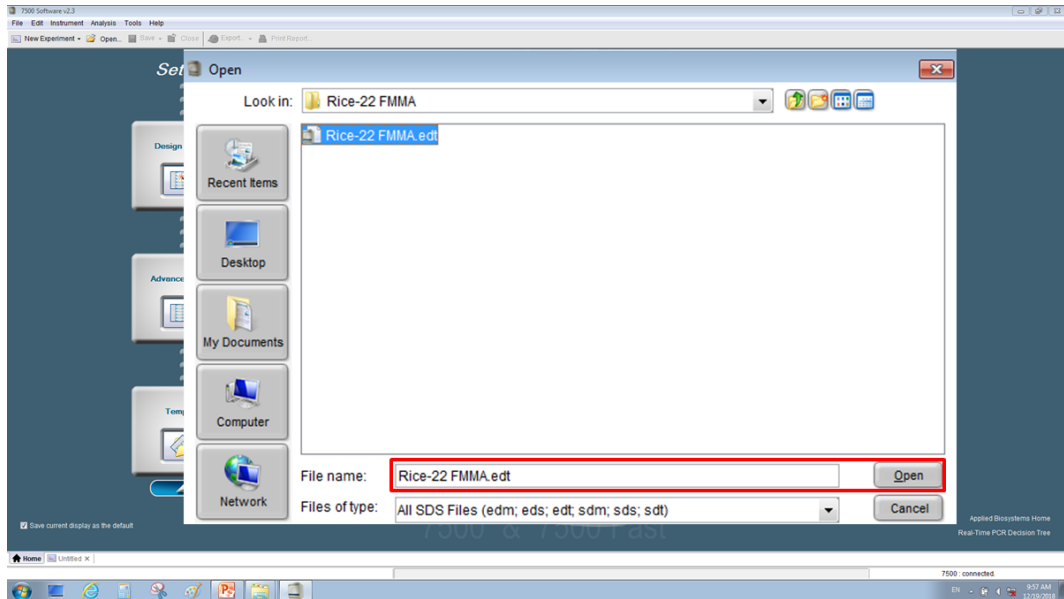
	A-Set						B-Set					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S1	S9	S17	S25	S33	S41
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S2	S10	S18	S26	S34	S42
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S3	S11	S19	S27	S35	S43
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S4	S12	S20	S28	S36	S44
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S5	S13	S21	S29	S37	S45
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S6	S14	S22	S30	S38	S46
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S7	S15	S23	S31	S39	S47
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S8	S16	S24	S32	S40	S48

- 3) Template file 지정 및 Run start

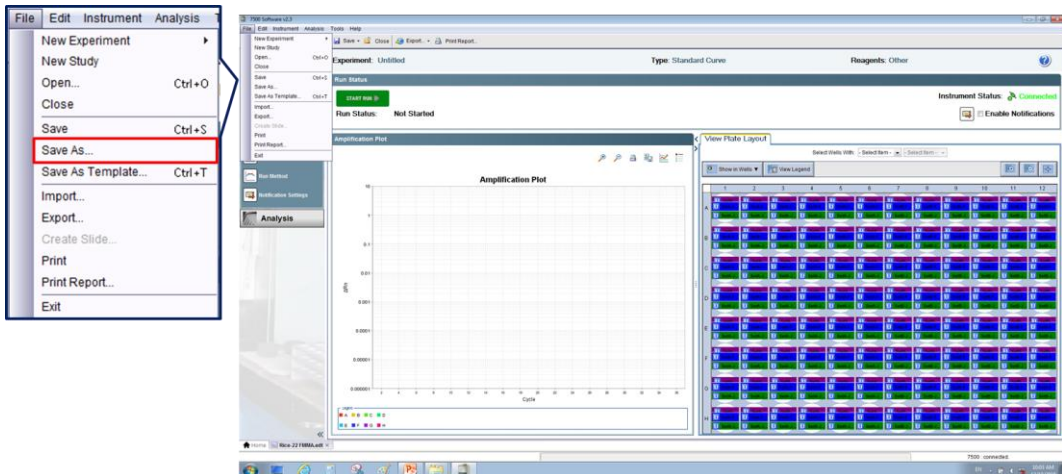
① File > Open 클릭



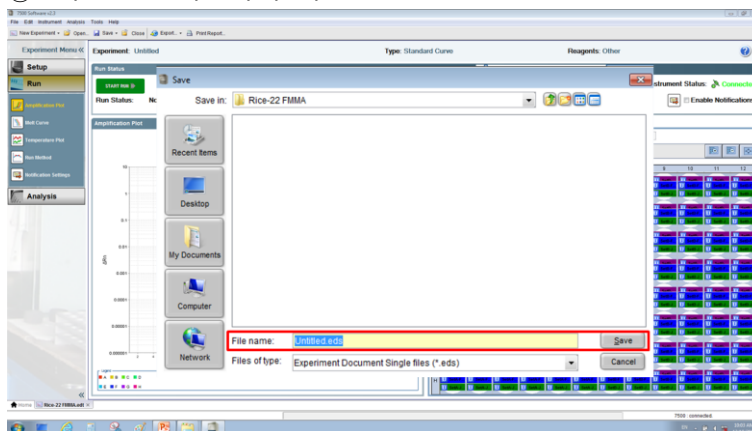
② 제공된 "Rice-22 FMMA.edt" 파일을 선택



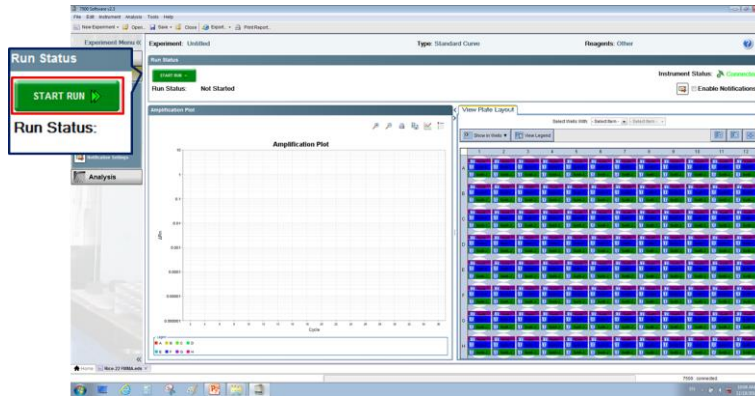
③ File > Save as 클릭



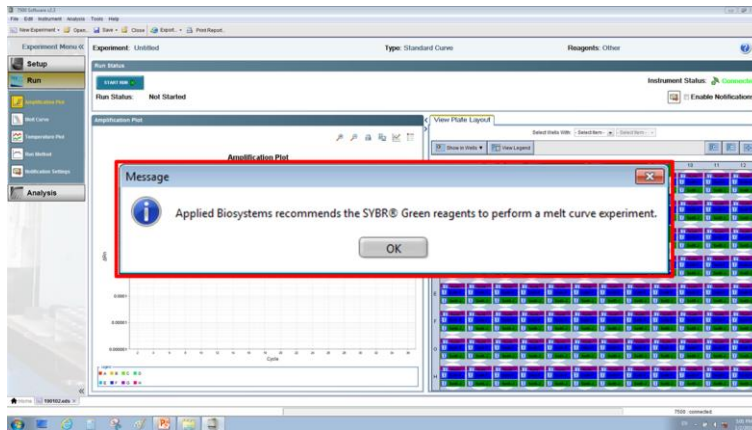
④ 파일명을 지정하여 저장



⑤ Start Run



⑥ Start Run을 하면 아래와 같은 뜨는 메시지는 확인(OK)을 체크



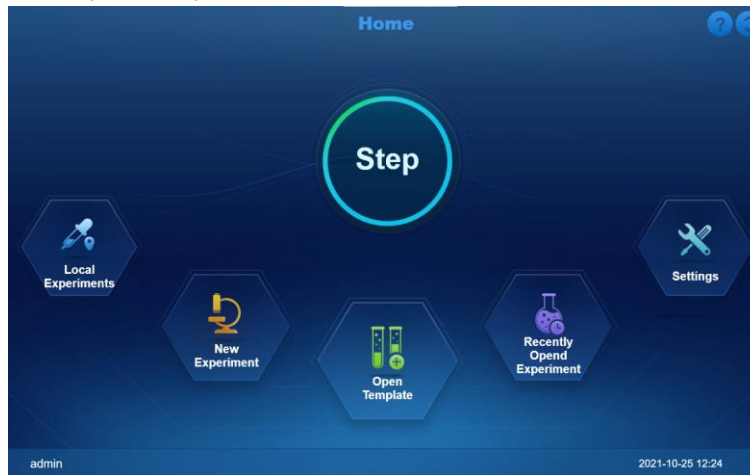
QuantGene 9600

- 1) Gene-9660 software를 실행한다.
- 2) 분주된 8-strip PCR tube를 아래 그림과 같은 배열로 장비 sample block에 장착한다.
예) A1 well과 A7 well은 동일 시료(S1)를 사용한 A-set PCR mixture와 B-set PCR mixture이다.

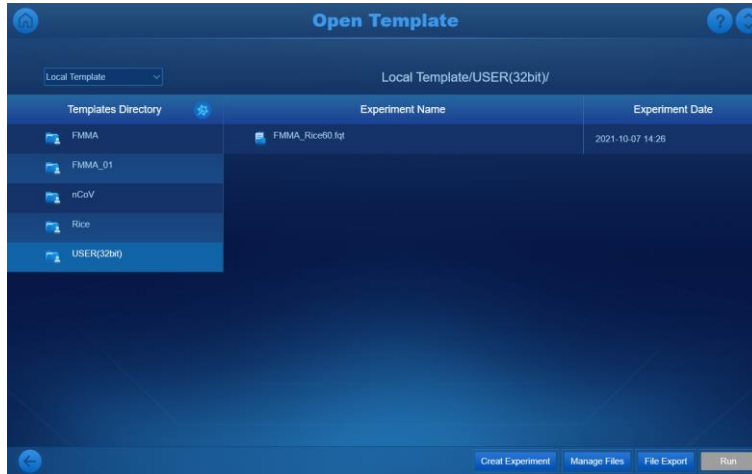
	A-Set						B-Set					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S1	S9	S17	S25	S33	S41
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S2	S10	S18	S26	S34	S42
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S3	S11	S19	S27	S35	S43
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S4	S12	S20	S28	S36	S44
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S5	S13	S21	S29	S37	S45
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S6	S14	S22	S30	S38	S46
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S7	S15	S23	S31	S39	S47
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S8	S16	S24	S32	S40	S48

- 3) Template file 지정 및 Run start

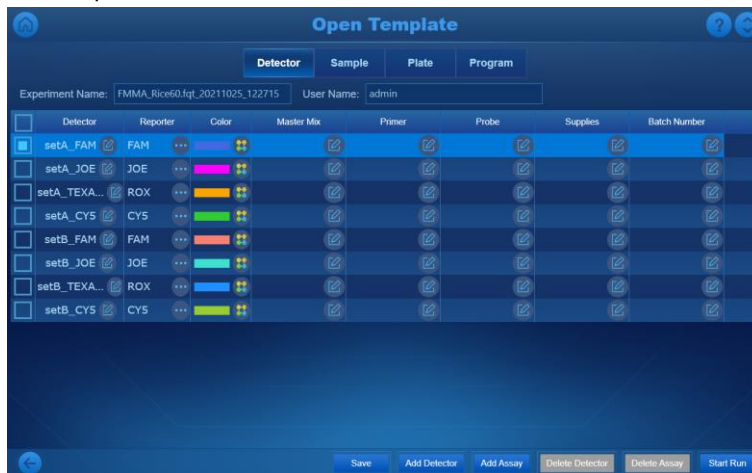
① Open Template 클릭



② 제공된 "Rice-22 FMMA.fqt" 파일 선택

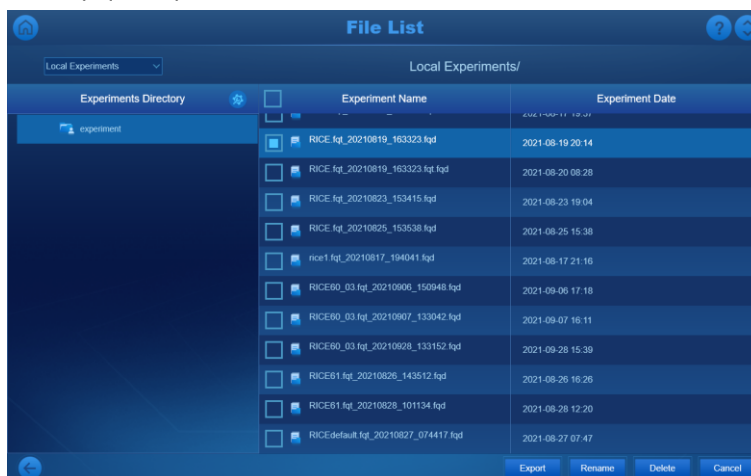


③ Strip 장착을 확인하고 Start Run 버튼 클릭



④ 파일명을 지정하여 저장

⑤ PCR 수행 완료 후 Home > Local Experiments > 결과 파일 선택 > Export > 저장 매체로 저장



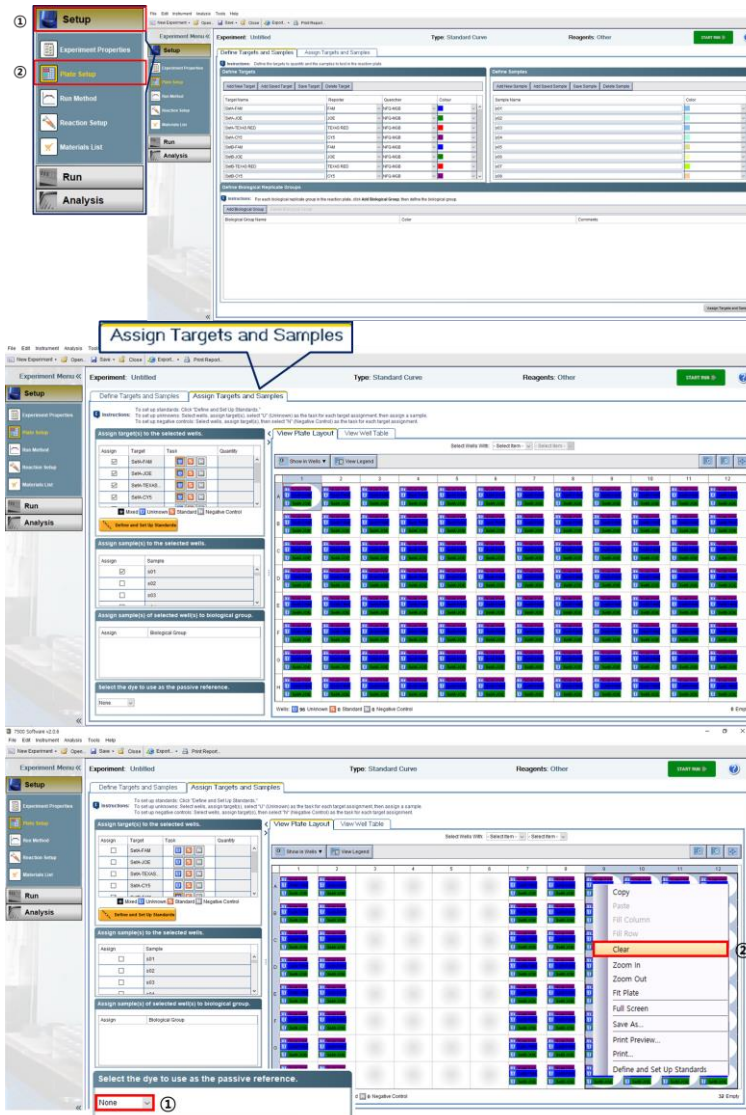
4. Data Analysis

ABI7500

1. ABI7500 Software Data Export

1) PCR 수행 후 Analysis 버튼을 클릭하여 분석한다.

- ① Setup > Plate Setup > Assign Targets and Samples > passive reference > None
- ② Setup > Plate Setup > Assign Targets and Samples > View Plate Layout > 사용하지 않은 빈 셀 드래그하여 선택 > 오른쪽 마우스 클릭 > Clear

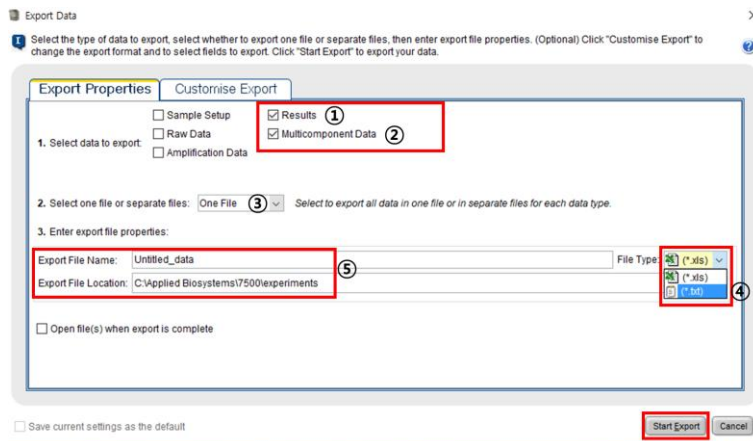


③ Analysis > Reanalyse

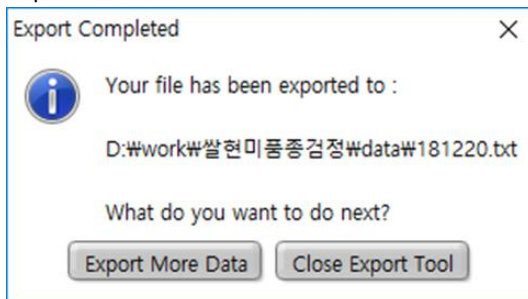


2) Export 버튼을 클릭한 후 Export Properties 탭을 설정한다.

- ① 선택1. Results
- ② 선택2. Multicomponent Data
- ③ 선택3. One File
- ④ 선택4. File Type (*.txt)
- ⑤ 선택5. File Name, File Location 설정



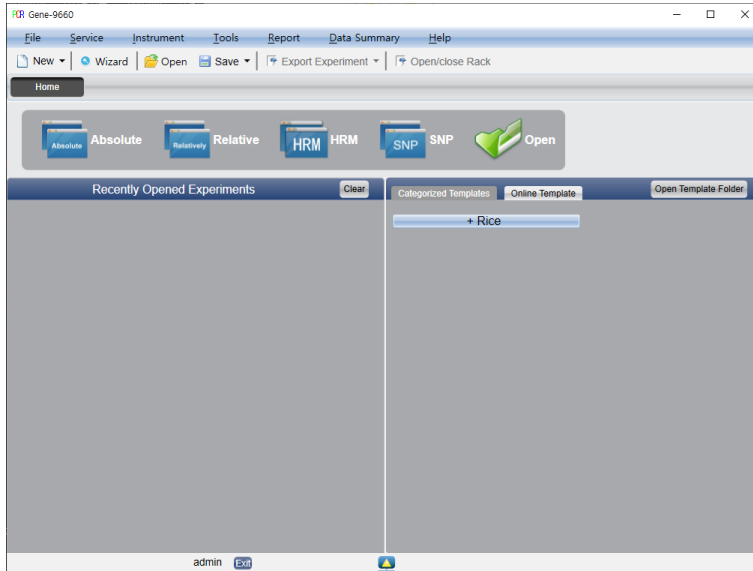
3) Start Export 버튼을 클릭하여 ABI7500 Data를 TXT파일로 Export 완료한다. "Close Export Tool" 버튼을 클릭하여 창을 닫는다.



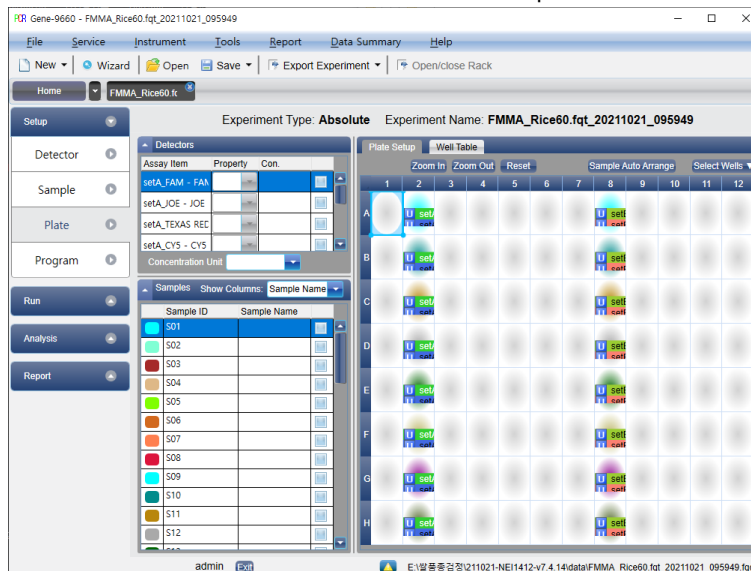
QuantGene 9600

2. QuantGene 9600 Software Data Export

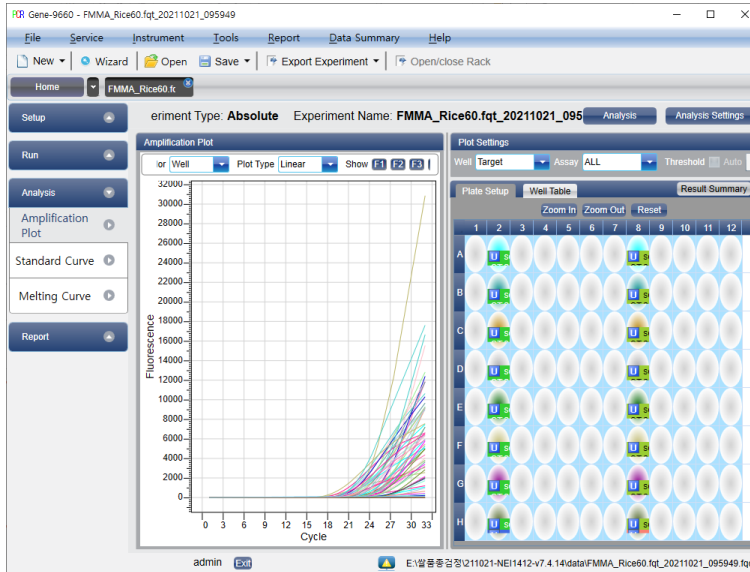
1) Open > 분석할 파일명 선택



2) Setup > Plate > Setup > Plate Setup > 사용하지 않은 빈 셀 드래그하여 선택 > 오른 쪽 마우스 클릭 > Clear Detectors And Samples

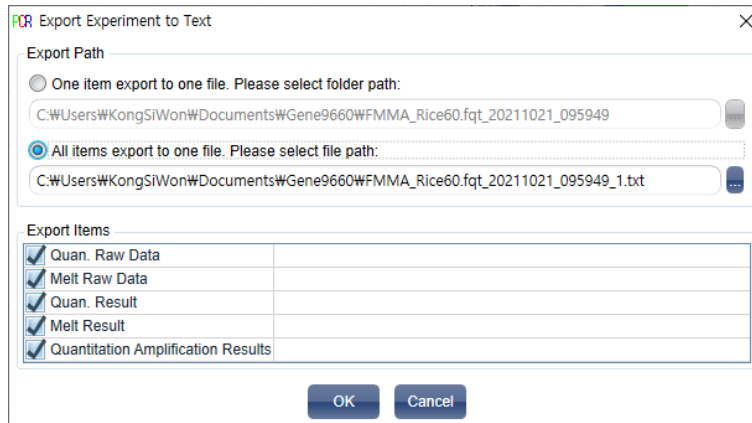


3) Analysis > Analysis 버튼 클릭



4) Export Experiment 버튼을 클릭한 후 Export to Text 선택

① All items export to one file. Please select file path :

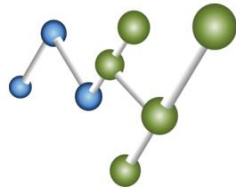


② 경로 설정 > OK

3. FMMA 품종판정 프로그램 실행

1) 프로그램 실행 및 설정파일 불러오기

- ① FMMAVIEWER.exe 파일 더블클릭 하여 실행



FMMAVIEWER.exe

- ② 설정변경 > 설정파일 불러오기 > 설정파일 선택 > 열기
- ABI7500 장비 분석 시 설정파일 : ABI7500-7.9.04.conf
 - QuantGene 9600 장비 분석 시 설정파일 : Bioer-7.10.04.conf

***[주의] 설정 파일의 버전을 꼭 확인하고 사용하세요!!**



2) 데이터 분석

- ① 신규분석

- 파일 > 신규분석 > 기기선택 > 파일선택
- ABI7500 장비 분석 시 : ABI7500
- QuantGene 9600 장비 분석 시 : Bioer



- ② 저장된 파일 불러오기

- 분석 파일 불러오기 > 저장된 파일 선택 (.data)

- ③ 결과 테이블 확인

- RM Number : 마커 번호로 확인 가능
- RM Score : RM score로 확인 가능

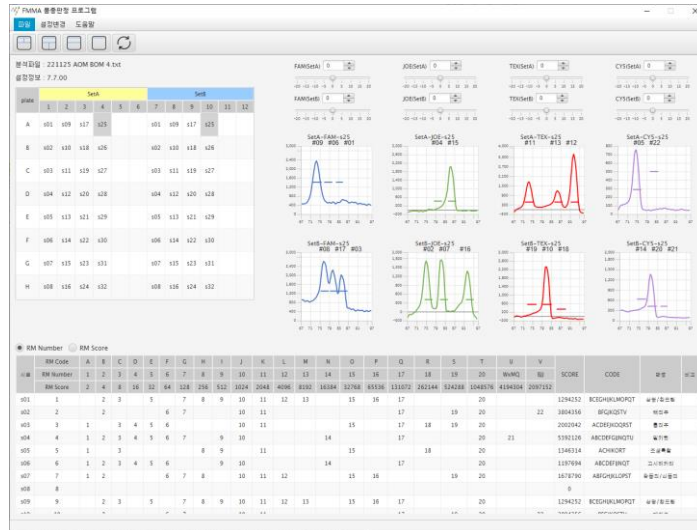
3) 결과 데이터 내보내기

- ① 분석파일 저장 : 수정된 결과를 포함하여 분석된 결과를 파일로 저장 (.data)
- ② 결과서 내보내기 : 48 립 분석에 대한 결과서를 엑셀 파일로 저장 (.xls)
- ③ Score 테이블 내보내기 : RM Number 또는 RM Score 테이블을 엑셀 파일로 저장 (.xls)
- ④ [참고] 결과 판정 관련
 - ① Marker 별 Melt Tm이 확인되면 Code가 생성되고, 타이핑 된 Code와 일치하는 품종을 품종판정표 (국립농산물품질관리원 벼(쌀) 품종 검정 매뉴얼에 따름)에서 찾아 출력한다.
 - ② Code가 중복되는 품종은 4 종류 존재하며 결과 판정 시 해당하는 품종 모두 []로 구분하여 표기 된다.

Code	품종명
BCEGHIJKLMOPQT	삼광/참드림
ABFGHJKLOPST	신동진/참동진
BGHIKMRST BFHIJKQST	진옥/태봉
FGJKOPT	호품/예찬

3) Melt peak 확인 방법

- ① 프로그램의 좌측 상단에 96 well plate 모식도가 존재한다.
- ② 확인하고자 하는 well을 선택하여 셀을 클릭한다.
- ③ 96 well plate 모식도 우측에 Melt peak chart가 작성된다.
Set A, Set B 각각에서 dye 별 melt peak 이미지가 생성되어 총 8개의 chart가 나열된다.
- ④ Algorithm에 의해 peak으로 판정되고 peak height가 최소한의 threshold line을 넘어야 real peak으로 판정된다.



5. 참고자료

- ABI7500 PCR 결과 판정표

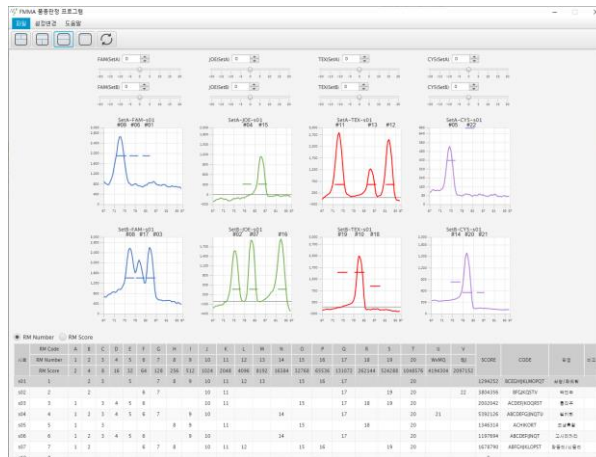
Step	Condition		Cycle(s)
Holding Stage		95°C for 15 min	1
PCR Amplification	Denaturation	95°C for 20 sec	5
	Annealing & Extension	65°C for 10 sec	
		61°C for 30 sec	
	Denaturation	95°C for 20 sec	32
Annealing & Extension	63°C for 40 sec Collect the fluorescence data		
Melting Curve stage	Step and Hold	65°C for 1 min 99°C for 30 sec (0.5°C/step) 10°C for 1 min	1

- ABI7500 PCR condition

ABI7500 PCR 결과 판정표 (Melt Tm °C)												
Set	A-set											
Dye	FAM			JOE		Texas Red			CY5			
Marker	RM09	RM06	RM01	RM04	RM15	RM11	RM13	RM12	RM05	RM22		
Melt Tm (°C)	72-75.5	77-80	82-84.5	78.5~81.5	84.5~87.5	72~75.5	84.5~87.5	91.5-94.5	73.5-76.5	80.5-83.5		
Set	B-set											
Dye	FAM			JOE			Texas Red			CY5		
Marker	RM08	RM17	RM03	RM02	RM07	RM16	RM19	RM10	RM18	RM14	RM20	RM21
Melt Tm (°C)	75.5-78.5	79.5-82.5	83.5-86.5	74.5-77.5	81-84	92-95	73-76.5	79.5-83	85.5-89	74.5-78	79-82.5	84.5-87

Rice-22 FMMA Kit

- ABI7500 결과 판정 예시 (삼광/참드림)



- QuantGene 9600 PCR condition

Step	Condition	Cycle(s)
Holding Stage	95°C for 15 min	1
PCR Amplification	Denaturation	95°C for 20 sec
	Annealing & Extension	65°C for 10 sec
		60°C for 30 sec
	Denaturation	95°C for 20 sec
Annealing & Extension	60°C for 40 sec Collect the fluorescence data	5 32
Melting Curve stage	Step and Hold 65°C for 1 min 99°C for 30 sec (0.3°C/step) 10°C for 1 min	1

- QuantGene 9600 PCR 결과 판정표

Bioer PCR 결과 판정표 (Melt Tm °C)												
Set	A-set											
Dye	FAM			JOE		Texas Red			CY5			
Marker	RM09	RM06	RM01	RM04	RM15	RM11	RM13	RM12	RM05	RM22		
Melt Tm (°C)	72.5-75.5	77-79.5	82.5-85.5	77~81	84~87	72~75	84.5~87	91-94.5	72.5-76	80-83		
Set	B-set											
Dye	FAM			JOE			Texas Red			CY5		
Marker	RM08	RM17	RM03	RM02	RM07	RM16	RM19	RM10	RM18	RM14	RM20	RM21
Melt Tm (°C)	76-78.5	80-82.5	84-86.5	74-77	80.5-83	92-95	73-76	80-83	85~88	74-77	79-82	83.5-86

Rice-22 FMMA Kit

- QuantGene 9600 결과 판정 예시 (삼광/참드림)

