

USER'S GUIDE

Innovation • Value • Discovery

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit



REF

FMV-2114P / FMV-2124P

IVD

Qualitative test kit
Foot-and-mouth disease virus RNA

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

사 용 설 명 서

FMV-2114P  100

FMV-2124P  1000

Version No.: 2.0 (2019-04)

사용 전, 사용설명서에 있는 모든 내용을 정독하시길 바랍니다.



(주) 바이오니아
대전광역시 대덕구 문평서로 8-11
Tel: +82-1588-9788
Fax: +82-42-930-8600
Email: sales@bioneer.co.kr
www.bioneer.co.kr

의료기기법에 의한 표시 사항

● FMV-2114P

- 1) 품목명: **고위험성동물전염병유전검사용시약**
- 2) 형명: **AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (FMV-2114P)**
- 3) 품목분류번호 및 등급: LC0600500(3)
- 4) 품목허가번호: 제 090-006호
- 5) 사용목적: **사용안내서 1. 사용목적** 참고

● FMV-2124P

- 1) 품목명: **고위험성동물전염병유전검사용시약**
- 2) 형명: **AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (FMV-2124P)**
- 3) 품목분류번호 및 등급: LC0600500(3)
- 4) 품목허가번호: 제 090-006호
- 5) 사용목적: **사용안내서 1. 사용목적** 참고

안전경고 및 주의사항

- 1) 본 키트는 **동물용의료기기**로 가축 방역기관 중 **구제역정밀진단기관**에 한해서 사용할 수 있습니다.
- 2) 본 키트는 임상 검체의 사용과 분자생물학 실험에 자격이 있고 숙련된 검사자 만이 사용해야 합니다.
- 3) 본 키트를 사용하기에 앞서 반드시 정식 사용안내서를 숙지하고 제품에 포함된 구성품을 확인한 후 실험을 수행하시기 바랍니다.
- 4) 본 제품은 실시간유전자증폭장비(*Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative thermal block, CFX96, ABI7500FAST* 등)를 이용하여 Real-Time PCR 을 수행해야 합니다.
- 5) 다른 lot 의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 해야 합니다.
- 6) 제품은 **-20℃** 이하의 온도에서 냉동 보관해야 제품에 기재된 보증 기간 내에서 안정성을 보증합니다. 제품은 4 회 이상 냉/해동하지 않도록 합니다. 제품의 사용기한은 제품 박스에 표시된 내용을 참고하시기 바랍니다.
- 7) 본 제품의 물질안전보건자료 (MSDS) 정보가 필요할 경우 바이오니아 고객센터에 요청 바랍니다.
- 8) 실험에 사용한 일회용 실험 물품들 (검체와 접촉한 tip, tube 등)은 사용안내서에 따라 취급하고 법적으로 지정된 방법으로 폐기해야 합니다.
- 9) 모든 실험 과정은 각 검사실의 안전 규칙에 따라 진행해야 합니다.

보증 및 책임

- 1) 바이오니아는 보증 기간 (제품 외관 기재) 동안 제품의 품질을 보증합니다. 제품의 품질에 문제가 발생할 경우, 즉시 고객센터로 연락 주시기 바랍니다. (ds@bioneer.co.kr)
- 2) 바이오니아는 본 사용안내서에 제시된 사용법과 다른 방법을 사용하여 발생한 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다.

상표

AccuPower® 는 바이오니아의 등록상표입니다.
 Exicycler™ 96, ExiSpin™, ExiPrep™16 Dx는 바이오니아의 등록상표입니다.
 CFX96은 Bio-rad사의 등록상표입니다.
 ABI7500FAST는 Applied Biosystems의 등록상표입니다.
 FAM, TAMRA는 Applera사의 등록상표입니다.
 BHQ-1은 Biosearch Technologies사의 등록상표입니다.
 Excel은 Microsoft사의 등록상표입니다.

저작권

Copyright 2019. 바이오니아. 무단전재 및 복제 금지

법적 고지문

- 1) 본 키트로 수행되는 일부 응용 프로그램은 특정 국가에서의 기존 특허와 관련하여 사용이 제한될 수 있습니다.
- 2) 키트의 구매는 특허의 권한을 포함하거나 제공하지 않으며, 사용자는 국가 및 용도에 따라 권한을 취득하여야 합니다. 당사는 특허 권한의 무단 사용을 금합니다.
- 3) 성능 개선을 위해 제품 사양, 설명 등 제공된 모든 정보는 사전 예고 없이 변경될 수 있습니다.

문의 사항 및 A/S 접수

- 제품에 대한 문의 사항 및 A/S접수는 e-mail (ds@bioneer.co.kr)을 이용해 주시기 바랍니다.
- 제품 문의 시 아래 표에 기재된 정보를 보내주시면 정확한 상담과 신속한 처리가 가능합니다.

Category	Information
핵산 추출 정보	핵산 추출 장비 (제조사 / Serial No.) 핵산 추출 시약 (제조사 / Lot No.)
Real-Time PCR 정보	Real-Time PCR 장비 (제조사 / Serial No.) Real-Time PCR 키트 (Cat. No / Lot No.)
해당 ex3 파일 (.ex3)	C:\WExiData\WGuestW
해당 log 파일 (.txt)	C:\WExiData\WLogW

목차

1.	사용목적.....	1
2.	서론.....	1
3.	테스트의 특징과 원리.....	1
4.	키트 구성품 및 사용 장비.....	2
4.1.	키트 구성품.....	2
4.2.	사용 장비.....	3
5.	보관 및 사용 기한.....	3
6.	부가적으로 필요한 재료와 장비 (키트에 제공되지 않음).....	4
7.	일반적인 유의 사항.....	4
8.	안전 경고 및 주의 사항.....	4
9.	실험 과정.....	5
9.1.	실험 전 준비 사항.....	5
9.1.1.	생물안전작업대 사용.....	5
9.2.	검체.....	5
9.2.1.	검체 채취.....	5
9.2.2.	검체 운반.....	5
9.2.3.	검체 보관.....	5
9.2.4.	저해 물질.....	5
9.3.	Work Flow.....	6
9.4.	실험과정.....	6
9.4.1.	핵산 추출.....	6
9.4.2.	PCR의 준비.....	7
9.4.3.	결과분석.....	10
9.5.	실험 결과 예시.....	11
9.6.	결과 분석 방법.....	12
10.	Troubleshooting.....	12
11.	Specifications.....	14
11.1.	Limit of detection (LoD).....	14
11.2.	Measurement range.....	15
11.3.	Cross reactivity.....	16
11.4.	Precision.....	16

11.4.1.	Whole system failure rate	16
11.4.2.	Repeatability	16
11.4.3.	Reproducibility	17
11.5.	Stability	17
11.5.1.	Storage temperature stability	17
11.5.2.	Storage temperature stability	17
11.5.3.	Freezing and thawing stability	18
12.	장비 호환성 실험	18
12.1.	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (이하 CFX96, Bio-Rad)	19
12.1.1.	PCR protocol.....	19
12.1.2.	Data result.....	19
12.2.	7500FAST Real-Time PCR Instrument System (이하 ABI 7500FAST, ABI)	20
12.2.1.	PCR protocol.....	20
12.2.2.	Data result.....	21
13.	참고 문헌	22
14.	심볼 설명	23

1. 사용목적

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 는 구제역에 감염된 우제류 동물의 리보핵산을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (Real-time RT-PCR) 기법을 이용하여 한 번의 PCR 반응으로 구제역을 검출하는 정성검사용 고위험성동물전염병유전검사용시약입니다.

2. 서론

구제역 (Foot and mouth disease) 감염은 주로 발굽이 2개로 갈라진 우제류 동물 (소, 돼지, 양, 흑염소, 사슴 등)에서 발생하고, 직·간접 접촉에 의해 전파속도와 전염성이 매우 높은 수포성 질환입니다. 질병 발생시 사육, 생산성이 감소, 질병방제, 살처분, 국제 교역제한 등으로 인한 막대한 경제적 피해가 발생합니다.

우리나라에서의 최초 발생보고는 1917년이며, 최근에는 2010년 11 월 말 경상북도 안동의 한 양돈장 에서 발생한 구제역이 전국으로 확산되어 많은 경제, 사회적인 문제를 유발하였습니다. 구제역은 다양한 방법으로 농장, 국가, 대륙사이에 전파되기 때문에 아시아, 아프리카, 남미 일부 국가에서 지속적으로 발생하고 있어 세계동물보건기구 (OIE)의 관리 질병이며, 국내 1종 전염병으로 분류되고 있습니다.

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 는 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (Real-time RT-PCR)을 이용하여 구제역 바이러스의 3D region을 신속하고, 간편하게 검출하도록 고안되어 있습니다.

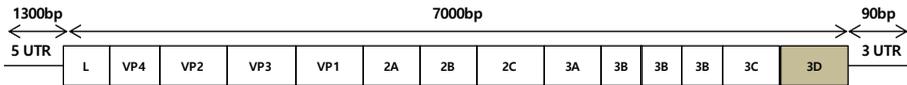


Fig 1. Schematic diagram of FMDV genome

3. 테스트의 특징과 원리

Real-time PCR은 특정 DNA sequence를 증폭 시키는 과정에서 발생하는 형광 강도를 PCR의 매 주기마다 측정하여 증폭 산물의 양을 실시간으로 모니터링 할 수 있는 기술입니다. 증폭되는 특정 sequence에 특이적인 primer와 형광물질로 표지된 probe를 이용하여 PCR 산물의 증폭량을 측정하기 때문에 높은 특이도를 나타냅니다. Real-time PCR에 주로 사용되는 TaqMan® Probe 는 5' 말단에 형광물질과 3' 말단에 quencher로 표지되어 있어 주형 DNA와 결합하여 있을 때는 빛을 주어도 형광물질의 에너지가 quencher로 전이되어 형광을 발하지 않습니다. 하지만 PCR 과정이 진행됨에 따라 DNA polymerase의 5' - 3' exonuclease가 활성화 되어 형광물질 probe로부터 분리됨으로써 형광을 발하게 됩니다. 발생된 형광은 실시간으로 측정하여 PCR의 각 주기마다 PCR 증폭곡선으로 나타낼 수 있고, 이를 이용하여 시료 내 특정 DNA의 정량 분석을 가능하게 합니다.

본 키트는 특정부분을 증폭하는 primer와 이 기법에 필요한 모든 요소들이 단일 tube에 제공되어 민감하고 빠른 시간 내에 검출하도록 고안되었으며 정교한 bioinformatics 알고리즘에 의해 설계된 primer 및 probe set를 통해 증폭 효율을 높였습니다.

4. 키트 구성품 및 사용 장비

4.1. 키트 구성품

1) FMV-2114P



Table1-1. Contents of *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (FMV-2114P)

	구성품	포장 단위	수량
①	FMDV MasterMix	890 μ l / tube	5 tubes
②	Internal Positive Control RNA	120 μ l / tube	2 tubes
③	DEPC-DW	1800 μ l / tube	1 tube
④	Quick manual	-	1 sheet
⑤	Product box	-	1 box

2) FMV-2124P



Table1-2. Contents of *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (FMV-2124P)

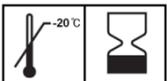
	구성품	포장 단위	수량
①	FMDV MasterMix	890 μ l / tube	50 tubes
②	Internal Positive Control RNA	120 μ l / tube	12 tubes
③	DEPC-DW	1800 μ l / tube	4 tubes
④	Quick manual	-	1 sheet
⑤	Product box	-	1 box

4.2. 사용 장비

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 는 실시간유전자증폭장비(Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative thermal block, CFX96, ABI7500FAST 등)에 사용가능합니다.

장비에 따른 실험 과정은 **사용안내서 (9. 실험 과정)**를 참고하시기 바랍니다.

5. 보관 및 사용 기한

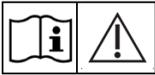


AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit는 자외선 또는 태양광을 피하여 -20°C 이하의 온도에서 냉동 보관해야 하며, 키트에 기재된 보증 기간 내에서 안정성을 보증합니다. 제품 내 포함된 IPC (Internal Positive Control) 또는 MasterMix의 냉동과 해동은 4회 이상 하지 않도록 합니다. 또한 PCR Mixture를 포함한 시약은 4°C에 보관하지 않도록 합니다.

6. 부가적으로 필요한 재료와 장비 (키트에 제공되지 않음)

- 분자실험에 적합한 일회용 장갑
- 적절한 용량의 micropipette set
- 멸균된 filtered pipette tip
- 1.5 ml micro tube 또는 15 ml conical tube
- 핵산 추출을 위한 프로토콜 및 시약 (9.4.1. 핵산 추출, 9.5.1 핵산 추출 참고)
 - AccuPrep® Viral RNA Extraction Kit (Cat. No. K-3033)
 - ExiPrep™ Dx Viral RNA Kit (Cat. No. K-4473)

7. 일반적인 유의 사항



- 본 제품은 실시간유전자증폭장비(Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative thermal block, CFX96, ABI7500FAST 등)를 이용하여 Real-Time PCR를 수행해야 합니다.
 - 생물학적으로 유해한 시약 및 임상 검체를 다룰 때는 반드시 장갑과 마스크를 착용합니다.
- 다른 lot의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 해야 합니다.
- 실험 과정을 생략하거나 원하는 결과를 얻기 위해 임의로 변경하지 않아야 합니다.
- 멸균된 filter pipette tip을 이용하여 실험을 수행합니다.
- 검체, PC(Not supplied), IPC는 다른 시약을 보관하는 냉동고와 분리하여 냉동 저장할 것을 권장합니다.
- 모든 키트의 구성물은 최소 실험 10분 전에 실온에 꺼내어 천천히 녹여 준비해 놓아야 합니다.
- 녹인 키트 구성물은 사용하기 전에 vortexing과 spin-down을 하여 최상의 결과를 얻을 수 있도록 준비합니다.
- 검체 및 PC는 MasterMix 혼합공간과 별도로 분리된 공간에서 반응액을 첨가해야 합니다.

8. 안전 경고 및 주의 사항

- 본 키트는 **동물용의료기기**로 가축 방역기관 중 **구제역정밀진단기관**에 한해서 사용할 수 있습니다.
- 본 키트는 임상 검체의 사용과 분자생물학 실험에 자격이 있고 숙련된 검사자 만이 사용해야 합니다.
- 본 키트를 사용하기에 앞서 반드시 정식 사용안내서를 숙지하고 제품에 포함된 구성품을 확인한 후 실험을 수행하시기 바랍니다.
- 본 제품은 실시간유전자증폭장비(Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative thermal block, CFX96, ABI7500FAST 등)를 이용하여 Real-Time PCR을 수행해야 합니다.
- 다른 lot의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 해야 합니다.
- 제품은 **-20℃** 이하의 온도에서 냉동 보관해야 제품에 기재된 보증 기간 내에서 안정성을 보증합니다. 제품은 4 회 이상 냉/해동하지 않도록 합니다. 제품의 사용기한은 제품 박스에 표시된 내용을 참고하시기 바랍니다.
- 본 제품의 물질안전보건자료 (MSDS) 정보가 필요할 경우 바이오니아 고객센터에 요청 바랍니다.
- 실험에 사용한 일회용 실험 물품들 (검체와 접촉한 tip, tube 등)은 사용안내서에 따라 취급하고 법적으로 지정된 방법으로 폐기해야 합니다.
- 모든 실험 과정은 각 검사실의 안전 규칙에 따라 진행해야 합니다.

9. 실험 과정

9.1. 실험 전 준비 사항

본 준비 사항의 속지로 검사자와 검사실의 안전에 유의하며 내부 환경 오염에 주의하시기 바랍니다.

9.1.1. 생물안전작업대 사용

시료 전처리 및 준비는 생물안전 3등급 실험실 (BL3, Biosafety Level3)내의 음압 생물안전작업대(class II 이상)에서 수행해야 합니다. 음압생물안전작업대는 필터를 통과한 외부 공기가 작업 공간 내로 들어가고, 작업 공간 내 오염 된 공기는 다시 필터를 통과하여 외부로 배출되기 때문에 검사실 내 감염과 오염을 방지할 수 있습니다.

9.2. 검체



모든 임상 검체는 감염성 물질로 취급해야 합니다. AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 용 추천 시료는 우제류 동물의 수포액, 병변조직, 타액, 비즙, 혈액시료 등입니다.

9.2.1. 검체 채취

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 는 우제류 동물의 수포액, 병변조직, 타액, 비즙 등으로부터 추출된 RNA의 진단에 최적화 되었습니다. 검체 채취시 차폐연구시설에서 실시하며, 교차오염 등을 방지하기 위해 가급적 핵산추출 장비의 사용을 권장합니다.

9.2.2. 검체 운반

모든 임상 검체는 누출로 인한 감염 가능성을 없애기 위해 완전히 밀봉하고 쉽게 부서지지 않는 운반 용기에 의해 운반해야 합니다. 또한, 4°C를 유지하여 운반하고 48시간 내 운송이 불가능한 경우는 -70°C에 보관하는 것이 좋습니다. 타 지역으로의 운반 시에는 해당 지역/국가의 생물학적 위험물 운송 지침에 따라야 합니다.

9.2.3. 검체 보관

검체는 2~8°C 조건에서 최대 7일까지 보관이 가능합니다. 장기간 보관을 위해서는 임상 검체를 1회 실험분량으로 분주하여 -20~-80°C에서 보관해야 합니다.

9.2.4. 저해 물질

임상 검체는 여러 가지 PCR 저해 물질을 포함하고 있습니다. 따라서 효율적인 PCR반응을 위해서는 RNA 추출과정에서 PCR 저해 물질을 반드시 제거해야 합니다.

9.3. Work Flow

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 의 간략한 실험 과정은 아래와 같습니다.

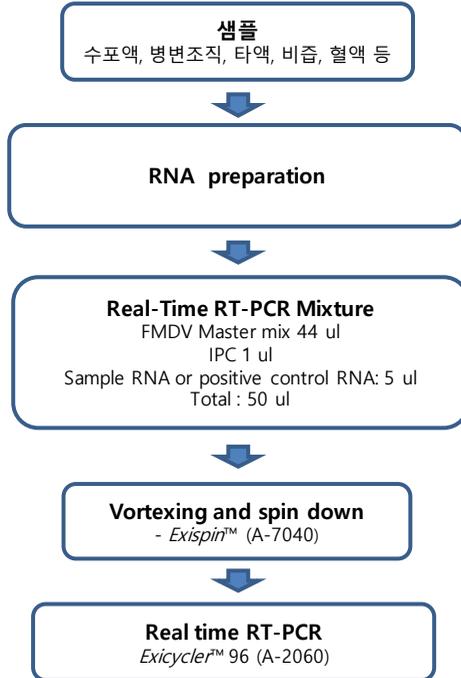


Fig 2. Work flow

9.4. 실험과정

9.4.1. 핵산 추출

임상 검체로부터 RNA를 분리하기 위해서는 RNA extraction kit를 사용하여야 합니다. 제조사의 지시사항에 따라 RNA를 추출하시기 바랍니다.

Note: 핵산 추출 방법과 kit의 품질에 따라 PCR 결과에 영향을 미칠 수 있습니다.

Note: 검체 내 포함되어 있는 저해 물질로 인하여 PCR 반응이 영향을 받을 수 있습니다. 저해 물질을 제거 할 수 있는 핵산 추출 방법 사용을 권장합니다.

9.4.2. PCR의 준비

- 1) 필요한 수량의 control RNA [PC (not supplied), IPC]를 검사 전 최소 10분전에 꺼내어 상온에서 녹입니다. 추출한 검체 DNA를 냉동 보관하였다면 검사 전 최소 10분전에 꺼내어 상온에서 녹입니다. FMDV MasterMix는 검사 전에 꺼내어 준비합니다. NTC (2 tubes)와 PC (2 tubes)에 4개의 tube가 사용되기 때문에 한 번의 실험에 필요한 tube 수는 다음과 같습니다.

4 (experimental controls) + number of samples

- 2) 정확한 실험 결과를 위해 사용에 앞서 모든 시약, control 및 sample들을 10초 이상 vortexing 하고 spin-down합니다.
- 3) 반응 당 44 μ l의 FMDV MasterMix에 1 μ l IPC를 첨가하여 spin-down합니다. 이때 손실되는 양을 고려하여 필요량보다 최소 1 tube 이상의 양으로 계산합니다. 다음은 반응 tube에 따라 필요한 시약의 양을 정리한 표입니다.

Table 3. Reaction mixture

검체 수량 (+여분)	1	8 (+2)	16 (+4)
IPC	1 μ l	10 μ l	20 μ l
FMDV MasterMix	44 μ l	440 μ l	880 μ l
Total volume	45 μ l	450 μ l	900 μ l
Volume per well	45 μ l	Each 45 μ l	Each 45 μ l

- 4) 모든 PCR tube에 앞서 준비한 mixture를 45 μ l씩 분주합니다.
- 5) NTC well에는 DEPC-DW (NTC) 5 μ l를 넣은 후 optical sealing film으로 well을 밀봉하여 다음 단계에서 발생할 수 있는 오염을 사전에 방지합니다.
- 6) 오염을 방지하기 위하여 tube를 분리된 공간으로 옮겨 well에 Sample 또는 PC를 각각 5 μ l씩 분주합니다.
Note : Positive control (PC)는 제공되지 않습니다.
- 7) 나머지 PCR tube에는 시료의 핵산을 각각 5 μ l씩 분주한 후 결과의 혼동을 막기 위해 해당 시료에 따라 각 well을 기록합니다.
- 8) Optical sealing film을 가위나 칼을 이용하여 크기에 맞게 자른 후, applicator를 이용하여 tube를 완전히 밀봉합니다.
Note : 시약이 완벽하게 down 되지 않으면 PCR 반응 및 결과에 영향을 미칠 수 있으니 반드시 확인하시기 바랍니다.
- 9) RNA와 잘 섞기 위해 *ExiSpin™*을 이용하여 [vortex 5초 (hard), spindown (2,500rpm) 1초]x25회 후에 spindown (2,500rpm) 3분으로 진행합니다.
Note : 시약이 완벽하게 down 되지 않은 상태에서 PCR을 수행하면 결과에 이상을 초래하게 되므로 반드시 시약이 완벽하게 down된 상태에서 PCR을 수행하시기 바랍니다.
- 10) *ExiSpin™*을 사용하는 동안 *Exicycler™* 96의 프로그램 설정을 완료합니다.
- 11) 혼합이 완료된 PCR MasterMix tube를 바로 *Exicycler™* 96에 장착하여 검사를 시작합니다.

- 12) *Exicycler*™ 96 기기 뒷면의 대기 전원 스위치를 켜면 전면의 LED 상태 표시등이 붉은 빛을 나타냅니다. (Fig 3-①)

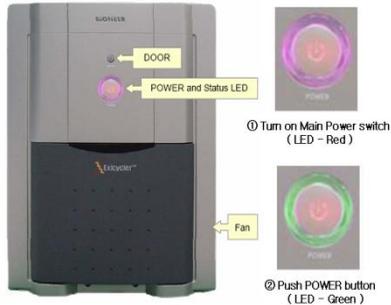


Fig 3. Operation button (door button, power button and status LED) of *Exicycler*™ 96

- 13) 붉은 LED 상태 표시등을 확인한 후, 기기 전면의 작동 전원 스위치를 2초간 누릅니다. 작동이 개시되어 일련의 self test가 끝나면 짧은 신호음과 함께 LED 상태 표시등이 초록빛을 내며 깜박거립니다. (Fig 3-②)

- 14) Door 버튼을 2초간 눌러 96-well thermal block이 나오면 반응 tube를 미리 정해 놓은 위치에 장착합니다. 이 때, 2개의 NTC tube의 위치가 A1과 B1에 그리고 2개의 PC tube의 위치가 C1과 D1에 위치하도록 놓습니다. PCR tube의 장착이 완료되면 door 버튼을 2초간 눌러 door를 닫습니다.

Note : 6 strip 이하로 PCR을 실행할 경우 PCR tube가 위치하는 반대편 (column 12) 에 balance strip을 추가적으로 위치시켜 *Exicycler*™ 96의 thermal block의 균형을 맞춰 주어야 합니다.



Fig 4. Door-open status of *Exicycler*™ 96 and 96-well thermal block

- 15) 'Run Exicycler3' 아이콘을 더블 클릭하여 프로그램을 실행 합니다. 이때 'Device is Not ready'라는 문구가 나타나면 프로그램을 끄고 장비 전원 상태를 확인하고 self-test가 끝난 다음 프로그램을 다시 실행합니다. 'System is ready'라는 문구가 뜨면 장비와 컴퓨터가 성공적으로 연결된 것입니다.



Fig 5. Run Exicycler3 icon

- 16) PCR 반응에 필요한 프로토콜을 설정하기 위해 상단의 메뉴 바에서 'File - Design Experiment' 를 클릭합니다.

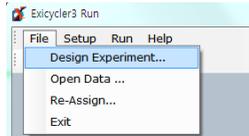


Fig 6. File - Design Experiment

- 17) 'Quick Start' 창이 나타나면 'Protocol' tab에서 PCR cycle을 다음과 같이 설정합니다.

Step	Protocol	Time
1	Incubate at 45.00°C	0:30:0
2	Incubate at 95.00°C	0:5:0
3	Incubate at 95.00°C	0:0:5
4	Incubate at 55.00°C	0:0:5
5	Scan	
6	Go to Step 3, Cycle: 45	
7 (Optional)	Incubate at 72.00°C	0:5:0

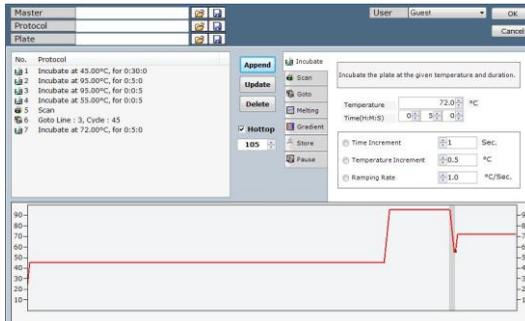


Fig 7. Protocol tab

- 18) 'Plate' tab을 클릭하여 probe를 선택하고 사용하려는 well을 지정합니다. 먼저, 'Add Probe'를 클릭하고, 'FAM'과 'TAMRA'를 선택합니다. 다음으로 PCR을 위해 준비된 strip의 위치를 지정합니다. 앞서 준비한 PC, Sample, NTC를 포함한 시료 수만큼 well을 클릭하고 아래의 'FAM'과 'TAMRA'를 체크 한 후, 'Assign'을 클릭합니다. 추가적인 시료의 정보 (PC, Sample, NTC)를 기입하려면 해당 well을 클릭하고 'Sample Name' 옆 빈 칸에 정보를 기록한 후 'Sample Name'을 클릭하면 됩니다. 또한 probe 정보에서 'Type' well을 클릭하면 'Sample, IPC, NTC' 등의 정보가 나타나며 이들 중 해당하는 type을 선택할 수 있습니다.

Target	Filter
Sample	FAM
IPC	TAMRA

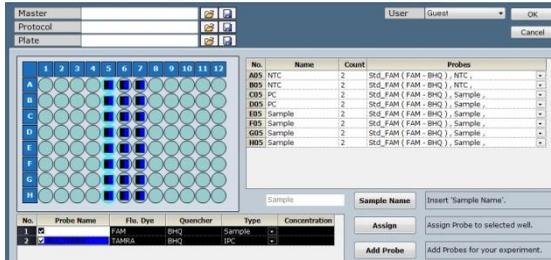


Fig 8. Plate tab

- 19) 작성이 올바른 경우 'OK' 버튼을 클릭합니다. 모든 정보가 기입되면 오른쪽 상단의 'OK'를 클릭합니다. PCR을 실행하기 위해 상단의 톨바에 위치한 ▶버튼을 클릭합니다.

Note : 해당 시험의 결과 파일명은 Real-Time PCR 사용일 (컴퓨터 날짜 기준)로 자동 저장(.ex3)됩니다.



Fig 9. Run button (▶)

9.4.3. 결과분석

- 1) 실험 결과로 얻은 데이터는 'Analysis Exicycler3' 프로그램을 통해 파일을 열어 분석 가능합니다. 해당 프로그램을 이용한 데이터 분석에 대한 자세한 사항은 기기의 사용안내서를 참고하시기 바랍니다.



Fig 10. Analysis Exicycler3 icon

- 2) 'File - Open'을 선택하여 분석할 데이터 파일 (.ex3)을 실행합니다. 데이터 파일은 'C:\WExiData\WGUEST' 폴더에 저장되어 있습니다.



Fig 11. File - Open

- 3) 'Flu. Graph' 창에서는 실험의 증폭 형상 곡선을 확인할 수 있습니다. 'Well vs Ct' 창에서는 시료들의 Ct값 분포를 확인할 수 있습니다. 'Plate Info' 창에서는 시험이 진행된 well의 정보를 알 수 있으며, 'Report Form' 창에서는 해당 시료의 정보와 Ct값, Ct Threshold 등을 확인할 수 있습니다.



Fig 12. Analysis Exicycler3 Result tab

Flu. Graph 창에서는 화면을 *.jpg 파일로 저장할 수 있습니다. 툴바의 이미지 저장 아이콘 ()을 클릭하면 저장할 수 있고, 툴바의 시트 저장 아이콘 ()을 클릭하면 *.xls 파일 형식으로 저장할 수 있습니다.

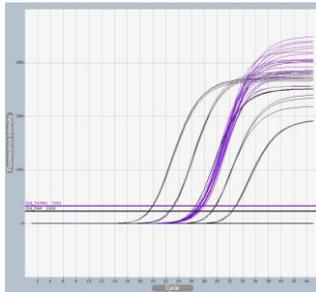
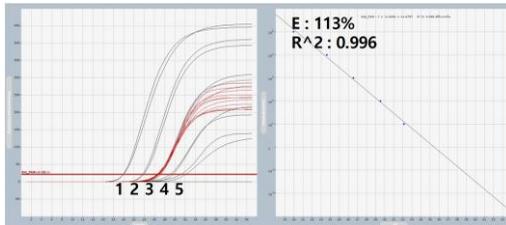


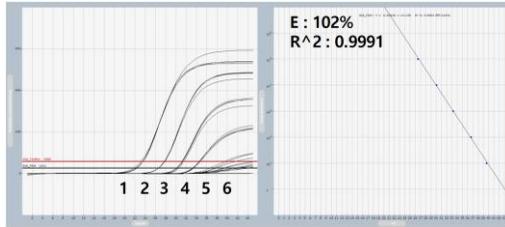
Fig 13. Flu. Graph tab

9.5. 실험 결과 예시



Lane 1~Lane 5 : $10^7 \sim 10^3$ copies/rxn, Black : PC (3D), Red : IPC

Fig 14. Result examples using PC



Lane 1~Lane 6 : 1ng~10fg, Black : vaccine RNA

Fig 15. Result examples using vaccine RNA

9.6. 결과 분석 방법

NTC 및 PC를 각각 2 well 이상씩 사용하는 것을 권장하며, 시료 각각의 PCR 반응 여부를 확인하기 위하여 NTC, PC를 포함한 모든 시료 well에 IPC를 사용합니다.

NTC: 시료 전처리, 핵산 추출, PCR 준비 과정에서 발생 할 수 있는 오염 여부를 판단.

PC: FMDV RNA가 PCR 과정에서 올바르게 증폭되었는지 판단

IPC: PCR 반응에 따른 각 well의 핵산 증폭 여부 판단 및 시료에 의한 PCR 반응 저해 여부 확인 (고농도 시료의 경우 PCR 경쟁반응에 의하여 IPC signal이 감소 될 수 있음).

기타 자세한 내용은 **사용안내서 10. Troubleshooting**에 따라 적절한 조치를 취하시기 바랍니다.

10. Troubleshooting

문제 상황에 따른 해결 방안의 제안

IPC가 검출되지 않은 경우	
모든 well (control 포함)에서 TAMRA (IPC) signal이 검출되지 않은 경우	<ul style="list-style-type: none"> • 추출 또는 PCR Protocol 상의 오류 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 실험에 사용되는 Kit의 종류에 알맞은 추출 및 PCR protocol이 program상에 설정되었는지 확인한다. 또한 사용자에게 의한 준비 과정이 정확한 protocol에 따라 수행되었는지도 확인한다. 필요에 따라 재시험을 수행한다. • 잘못된 추출 또는 PCR 시약을 사용한 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 실험 목적에 맞는 시약을 사용하였는지 확인한다. • 유효기간이 지났거나 잘못된 보관으로 kit가 훼손된 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 보관 조건이나 유효기간을 확인한 후 새로운 시약으로 재검사하여 결과를 비교한다. <p>사용안내서 9. 실험 과정 참고</p> <p>사용안내서 5. 보관 및 사용 기한 참고</p>

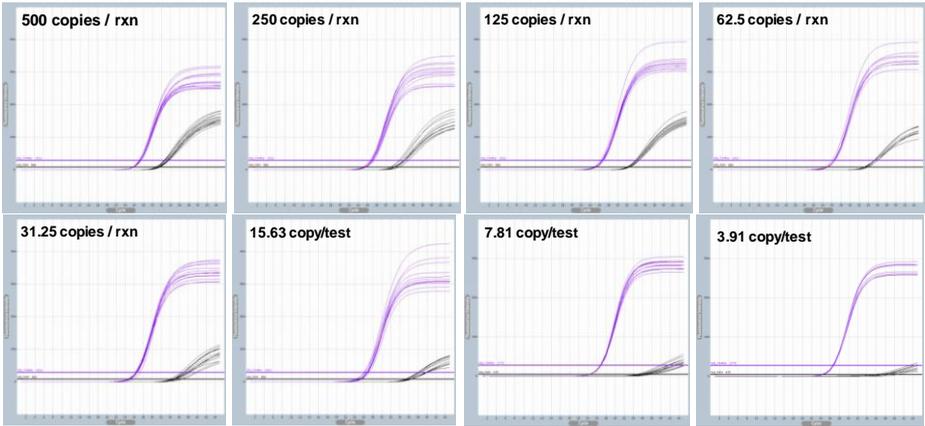
<p>특정 well에서만 TAMRA (IPC) signal이 검출되지 않은 경우</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PCROI inhibition된 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 시료는 PCR 결과에 영향을 미치는 다양한 inhibitor를 포함하고 있기 때문에 시료의 inhibitor를 최대한 배제시킬 수 있도록 처리하여 재검사를 수행한다. ☞ 시료를 종류에 따라 검증된 방법으로 전처리 하였는지 확인한다.
<p>PC가 검출되지 않은 경우</p>	
<p>PC well에서 FAM signal이 검출되지 않은 경우</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 유효기간이 지났거나 잘못된 보관으로 kit가 훼손된 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 보관 조건이나 유효기간을 확인한 후 새로운 시약으로 재시험하여 결과를 비교한다. 사용안내서 5. 보관 및 사용 기한 참고 • 시약의 재사용으로 kit가 훼손된 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 시약을 절대 재사용하지 않는다. 재사용 혹은 반복된 냉동/해동은 시약의 성능을 저하시키며 결과적으로 실험 결과에까지 영향을 미칠 수 있으므로 필요한 경우 새로운 시약으로 재검사를 수행한다. 사용안내서 5. 보관 및 사용 기한, 7. 일반적인 유의 사항 참고 • PCR Protocol 오류 <ul style="list-style-type: none"> ☞ PCR 준비 과정을 정확한 protocol에 따라 수행하였는지 확인한다. 특히 PC로 설정된 well에 정확한 양의 해당 시약이 분주되었는지 확인한다. 사용안내서 9.4.2 PCR의 준비 참고 • Pipetting 오류 <ul style="list-style-type: none"> ☞ Pipette를 점검하고 정확한 사용 요령을 숙지한다.
<p>NTC가 검출된 경우</p>	
<p>NTC well에서 FAM signal이 검출된 경우</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 오염이 발생한 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 실험 장소나 도구 등의 오염원을 찾아 제거한 후 재검사한다. • 유효기간이 지났거나 잘못된 보관으로 kit가 훼손된 경우 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 보관 조건이나 유효기간을 확인한 후 새로운 시약으로 재시험하여 결과를 비교한다. 사용안내서 5. 보관 및 사용 기한 참고 • PCR Protocol 오류 <ul style="list-style-type: none"> ☞ PCR 준비 과정을 정확한 protocol에 따라 수행하였는지 확인한다. 특히 S/W상에 지정된 well에 정확한 양의 control (특히 NTC) 및 시료가 분주 되었는지 확인한다. 사용안내서 5. 보관 및 사용 기한, 7. 일반적인 유의 사항 참고 • Pipetting 오류 <ul style="list-style-type: none"> ☞ Pipette를 점검하고 정확한 사용 요령을 숙지한다.

11. Specifications

11.1. Limit of detection (LoD)

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 최소검출한계 (limit of detection, LoD)를 측정하기 위하여 FMDV Positive RNA와 불활화 정제 구제역 백신에서 추출한 RNA를 이용하였습니다. 적용농도는 PC를 이용하여 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 copies/rxn로 8개 농도, 그리고 백신 RNA를 이용하여 100,000, 10,000, 1,000, 100, 10 fg/rxn 농도로 준비하여 AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 를 이용해 각 농도 별로 반복 측정하였습니다.

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 LoD는 14.1 copies/test, 10 fg/rxn 입니다.



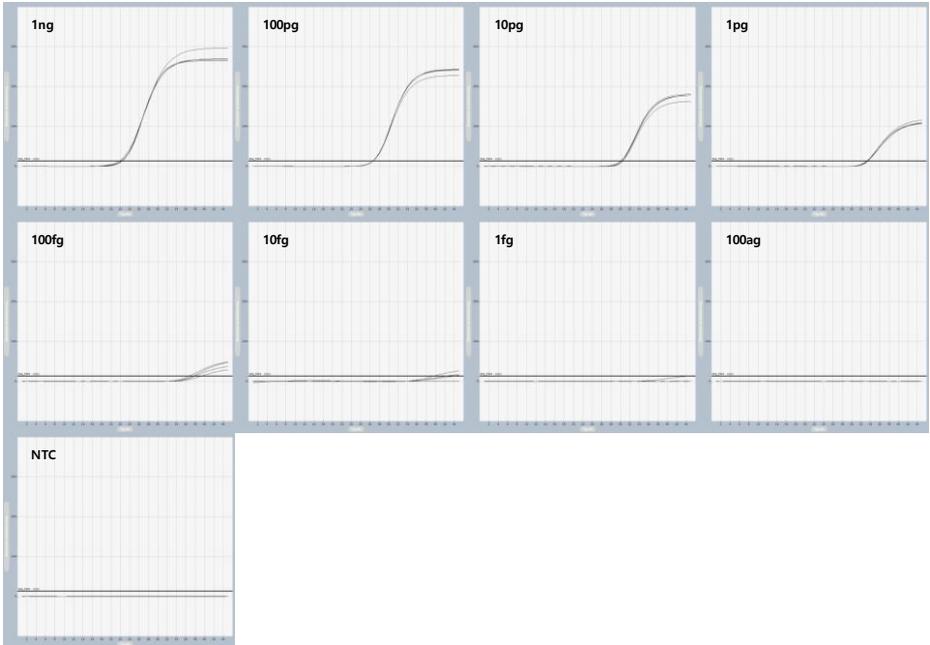


Fig 16. Probit analysis of *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

11.2. Measurement range

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 검출범위 및 직선성을 측정하기 위하여 FMDV Positive RNA를 이용하였습니다. 적용농도는 1×10^7 copies/test부터 10-fold dilution 하여 1×10^2 copies/test까지 준비하고 *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit를 이용하여 각 농도 별로 측정하였습니다. 측정된 결과를 바탕으로 직선성을 평가하여 R^2 값이 0.99 이상 도출되는 구간을 검출범위 및 직선성 유지 구간으로 설정하였습니다. *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 검출범위 및 직선성 유지 구간은 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ copies/test 입니다.

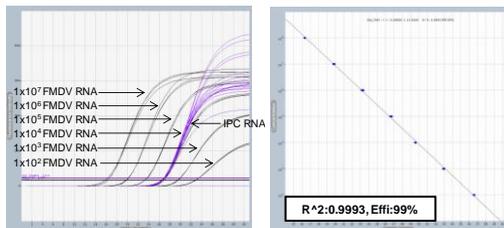


Fig 17. Measurement range and linearity of *AccuPower*® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

11.3. Cross reactivity

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 교차반응을 방지하기 위하여 FMDV에 특이적인 primer, probe를 제품에 적용하였습니다. Gene bank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록되어 있는 서열 정보를 확인하여 primer, probe간 교차반응이 없는 것을 확인하였습니다.

음성 돼지 혈청 10종에 대해 AccuPrep® Viral RNA Extraction Kit로 리보핵산을 추출하여 교차반응을 확인하였습니다.

교차반응 확인에 사용한 음성혈청 목록은 table 4에 표시하였으며, 시험에 사용한 리보핵산과의 교차반응은 없는 것으로 나타났습니다.

Table 4. List of sample for cross reactivity testing

No.	Sample	AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit	
		FMDV signal	IPC Signal
1	음성 돼지혈청 1	-	+
2	음성 돼지혈청 2	-	+
3	음성 돼지혈청 3	-	+
4	음성 돼지혈청 4	-	+
5	음성 돼지혈청 5	-	+
6	음성 돼지혈청 6	-	+
7	음성 돼지혈청 7	-	+
8	음성 돼지혈청 8	-	+
9	음성 돼지혈청 9	-	+
10	음성 돼지혈청 10	-	+

11.4. Precision

11.4.1. Whole system failure rate

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 시스템 안정성을 확인하기 위하여 저역가 샘플을 이용하여 96 반복 검사를 수행하였습니다. 모든 시험 결과에서 100% 양성 결과를 나타내어 시스템 안정성을 확인하였습니다.

11.4.2. Repeatability

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 반복성을 확인하기 위하여 검사 내 정밀도 (within-run assay), 검사 간 정밀도 (between-run assay), 날짜 간 정밀도 (between-day assay), 검사실 내 정밀도 (total precision)를 측정하였습니다. 3가지 농도 (1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵ copies/rxn)로 희석하여 10일간, 매일 2회, 매 검사마다 2회 반복하여 시험하였습니다. 통계 분석한 시험 결과는 table 5. 에 표시하였습니다.

Table 5. Total precision data of AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

Concentration (copies/rxn)	Average	SD	CV (%)
1.0 x 10 ³	32.28	0.33	1.03
1.0 x 10 ⁵	29.05	0.36	1.25
1.0 x 10 ⁷	26.18	0.43	1.63

11.4.3. Reproducibility

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 재현성을 확인하기 위하여 검사 장소 간, 장비 간, 검사자 간, Lot 간 정밀도를 측정하였습니다. 3가지 농도 (1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵ copies/rxn)로 희석하여 5일간, 매일 2회, 매 검사마다 2회 반복하여 시험하였습니다. 통계 분석한 시험 결과는 table 6. 에 표시하였습니다.

Table 6. Reproducibility data of AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

Assay	Category	Concentration (copies/rxn)		
		1x10 ³	1x10 ⁵	1x10 ⁷
검사자 간	Average	32.47	26.45	20.02
	SD	0.32	0.42	0.38
	CV (%)	1.00	1.58	1.91
장비 간	Average	32.37	26.46	19.91
	SD	0.30	0.42	0.32
	CV (%)	0.91	1.60	1.62
검사 장소 간	Average	32.57	26.43	20.13
	SD	0.32	0.42	0.41
	CV (%)	0.99	1.58	2.04
Lot 간	Average	32.50	26.58	19.88
	SD	0.40	0.43	0.29
	CV (%)	1.23	1.63	1.47

11.5. Stability

11.5.1. Storage temperature stability

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 안정성을 확인하기 위하여 실제보관온도시험 (Storage temperature stability)을 수행하였습니다. 완제품 3개 batch를 이용하여 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ copies로 실제보관온도 (-20°C 이하)에서 1개월 단위로 7개월까지 시험했습니다.

실제보관온도시험(Storage temperature stability) 결과를 바탕으로 AccuPower® Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 유효기한은 -20°C이하에서 보관 시 6개월로 설정 되었습니다.

11.5.2. Storage temperature stability

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 수송 안정성 (환경 및 운반조건 변화)을 확인하기 위하여 국내 1개 지역에 제품을 배송한 후 다시 반송 받아 제조사에서 안정성 확인 시험을 수행하였습니다. 완제품 제조공정과 동일하게 제조된 제품을 사용하여 완제품 (개봉 전) 1개 Lot를 제품 배송 절차에 따라 포장, 배송하였습니다. 배송 후 제조사에 다시 반송되는 시일은 2~3일이 소요되었으며, 각 지역에서 수령한 제품은 본사에서 보관 증인 제품 (-20°C 이하 보관)과 성능 비교하였습니다.

적용농도는 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ copies로 농도 별 3반복 시험하여 각 농도의 Ct값을 산출하였으며, 이를 바탕으로 SD, CV(%) 값을 계산하였습니다. 수송 안정성 검사 결과 국내 배송 시 제품의 안정성이 유지되는 것을 확인하였습니다.

11.5.3. Freezing and thawing stability

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 반복적인 냉/해동을 진행하여 안정성 확인 시험을 수행하였습니다.

적용농도는 백신 RNA를 이용하여 10 pg, 1 pg, 100 fg으로 농도 별 2반복 시험으로 하여 각 농도의 Ct값을 산출하였으며, 이를 바탕으로 SD값을 계산하였습니다. 냉/해동 안정성 검사 결과 3번의 냉/해동 진행에 대한 안정성을 확인하였습니다.

Table 7. Transport simulation stability of AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

Concentration (copies/rxn)	Average	SD	CV (%)
NTC	-	-	-
1.0 x 10 ⁹	32.01	0.49	1.55
1.0 x 10 ⁴	28.65	0.30	1.03
1.0 x 10 ⁵	25.85	0.29	1.13
1.0 x 10 ⁶	22.92	0.30	1.29
1.0 x 10 ⁷	19.62	0.23	1.17

Table 8. Freezing and thawing stability of AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit

Concentration	1차 해동		2차 해동		3차 해동	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD
NTC	-	-	-	-	-	-
10pg	28.8	0.1	28.9	0.1	29.0	0.3
1pg	32.7	0.2	32.3	1.1	32.1	0.4
100fg	35.3	1.1	34.7	0.1	34.5	0.1

12. 장비 호환성 실험

AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 Exicycler[™] 96 Real-time Quantitative Thermal Block에 상응하는 장비에 대한 호환성을 측정하기 위하여 PC (3D region, positive control)와 불활화 정제 구제역 백신에서 추출한 RNA를 이용하였습니다. AccuPower[®] FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 타사 장비 호환성을 확인하였습니다.

12.1. CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (이하 CFX96, Bio-Rad)

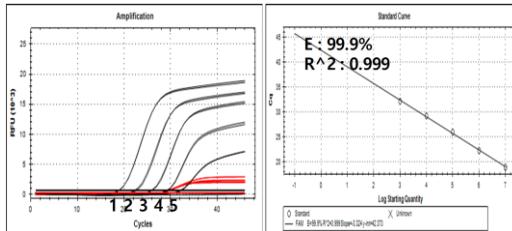
Note : 자세한 내용은 장비 Manual을 참조하시기 바랍니다.

12.1.1. PCR protocol

Step	Protocol	Time
1	Incubate at 45.00°C	0:30:0
2	Incubate at 95.00°C	0:5:0
3	Incubate at 95.00°C	0:0:15
4	Incubate at 55.00°C	0:0:50
5	Scan	
6	Go to Step 3, Cycle: 45	
7 (Optional)	Incubate at 72.00°C	0:5:0

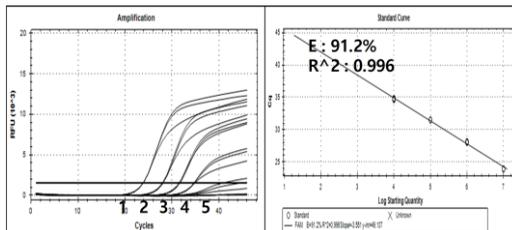
Target	Filter
PC	FAM
IPC	TAMRA filter가 없어 HEX로 대체 이용

12.1.2. Data result



Lane 1~Lane 5 : $10^7 \sim 10^3$ copies/rxn, Black : PC (3D), Red : IPC

Fig 18. Result examples using PC



Lane 1~Lane 5 : 1ng~100fg, Black : vaccine RNA

Fig 19. Result examples using vaccine RNA

12.2. 7500FAST Real-Time PCR Instrument System (이하 ABI 7500FAST, ABI)

Note : 자세한 내용은 장비 Manual을 참조하시기 바랍니다.

12.2.1. PCR protocol

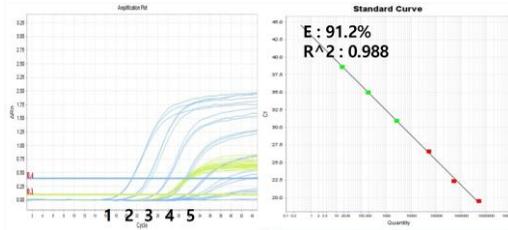
검체 수량 (control 포함)	1	8 (+2)	16 (+4)
IPC	0.5 μl	5 μl	10 μl
FMDV MasterMix	22 μl	220 μl	440 μl
Total volume	22.5 μl	225 μl	450 μl
Volume per well	22.5 μl	Each 22.5 μl	Each 22.5 μl

Note : ABI 7500FAST는 장비 특성상 최대 30 μl 로 반응하는 것을 권장합니다. 자세한 내용은 장비 manual을 참조하시기 바랍니다.

Step	Protocol	Time
1	Incubate at 45.00°C	0:30:0
2	Incubate at 95.00°C	0:5:0
3	Incubate at 95.00°C	0:0:25
4	Incubate at 55.00°C	0:0:50
5	Scan	
6	Go to Step 3, Cycle : 45	
7 (Optional)	Incubate at 72.00°C	0:5:0

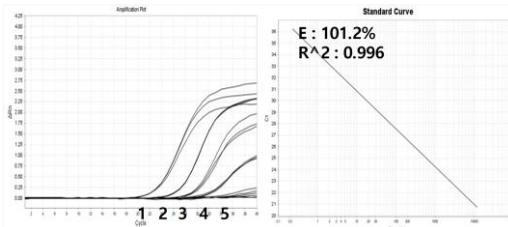
Target	Filter
PC	FAM
IPC	TAMRA

12.2.2. Data result



Lane 1~Lane 5 : 5X10⁶~5X10² copies/rxn, Blue : PC (3D), Green : IPC

Fig 20. Result examples using PC



Lane 1~Lane 5 : 500pg~50fg, Black : vaccine RNA

Fig 21. Result examples using vaccine RNA

13. 참고 문헌

동물질병표준검사법. 2013., 농림축산검역본부

Callahan JD *et al.*, Use of a portable real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J Am Vet Med Assoc.* 2002

14. 심볼 설명



Catalogue number



Upper limit of temperature



In vitro diagnostic medical device



Contains sufficient for tests



Manufacturer



Caution



Batch code



Expiration date



Consult instructions for use

• Bioneer Worldwide

Bioneer Corporation

Address 8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax +82-42-930-8688
E-mail sales@bioneer.com
Web www.bioneer.com

Bioneer Inc.

Address 155 Filbert St. Suite 216 Oakland, CA 94607, USA
Tel +1-877-264-4300 (Toll-free)
Fax +1-510-865-0350
E-mail orderusa@bioneer.com
Web us.bioneer.com

Bioneer R&D Center

Address Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel +82-31-628-0500
Fax +82-31-628-0555
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.co.kr