



Qualitative test kit
Foot-and-mouth disease virus RNA



FMV-2114P



Σ 100



FMV-2124P



Σ 1000

1. 의료기기법에 의한 표시 사항

- 1) **품목명:** 고위험성동물전염병유전검사용시약
- 2) **형명:** AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (FMV-2114P, FMV-2124P)
- 3) **품목분류번호 및 등급:** LC0600500(3)
- 4) **품목 허가 번호:** 제 090-006호
- 5) **사용 목적:** AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit는 구제역에 감염된 우제류 동물의 리보핵산을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (Real-Time RT-PCR) 기법을 이용하여 한 번의 PCR 반응으로 구제역을 검출하는 정성검사용 고위험성동물전염병유전검사용시약입니다.
- 6) **사용 방법:** 자세한 사항은 사용 안내서 참조.
- 7) **보관 방법:** 제품은 -20 °C의 온도에서 냉동 보관해야 하며, 제품에 기재된 보증 기간 내에서 안정성을 보증합니다.

2. 제품구성

AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit는 MasterMix 형태의 제품으로 primers, dual-labeled fluorogenic (TaqMan®) probe, DNA polymerase, Reverse transcriptase, dNTPs & stabilizer 등이 tube에 제공됩니다.

100 tests/kit

구 성 품 (FMV-2114P)	수 량
FMDV MasterMix (FMV-2114P)	890 μ l/ tube X 5 tube (Amber)
Internal Positive Control (IPC) RNA	120 μ l/ tube X 2 tube (Natural)
DEPC-DW (No Template Control, NTC)	1800 μ l/ tube X 1 tube (Natural)

* Positive control : Not supplied

1,000 tests/kit

구 성 품 (FMV-2124P)	수 량
FMDV MasterMix (FMV-2124P)	890 μ l/ tube X 50 tube (Amber)
Internal Positive Control (IPC) RNA	120 μ l/ tube X 12 tube (Natural)
DEPC-DW (No Template Control, NTC)	1800 μ l/ tube X 4 tube (Natural)

* Positive control : Not supplied

3. 유의사항

- 본 키트는 고위험성동물전염병유전검사용시약으로 진단 외의 목적으로 사용할 수 없습니다.
- 본 키트를 사용하기에 앞서 정식 사용 안내서를 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 PCR 을 수행해야 합니다.
- 다른 lot 의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 해야 합니다.

- 제품은 -20°C 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.

4. 사용방법

Note: 본 프로토콜은 AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit의 Exicycler™ 96에 대한 실험 내용입니다. 자세한 실험 내용은 정식 사용자 안내서를 참고 바랍니다.

1) Preparation of kit materials and specimens

- ① 모든 키트의 구성물은 최소 실험 10분 전에 실온에 꺼내어 준비해 놓습니다.
- ② 임상 검체로부터 RNA를 분리하기 위해서는 RNA extraction kit를 사용하여야 합니다. 제조사의 지시사항에 따라 RNA를 추출하시기 바랍니다.

2) Assay protocol

- ① 채취한 검체에서 적절한 방법으로 핵산을 추출해야 합니다. 검체내 저해물질로 인하여 PCR 반응이 저해 받을 수 있으니, ExiPrep™ 16 Dx를 사용한 핵산 추출과정을 권장합니다.
- ② 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

- ③ 정확한 실험결과를 위해 사용에 앞서 모든 시약, control 및 sample들을 10초 이상 vortexing 하고 spin-down합니다.
- ④ 반응 당 44 μ l의 FMDV MasterMix에 1 μ l IPC를 첨가하여 spin-down합니다. 이 때, 손실되는 양을 고려하여 필요량보다 최소 1 tube 이상의 양으로 계산합니다. 다음은 반응 tube에 따라 필요한 시약의 양을 정리한 표입니다.

단위: μ l

검체 수량 (control 포함)	1		8 (+2)		16 (+4)	
	A, B	C	A, B	C	A, B	C
IPC	1	0.5	10	5	20	10
FMDV MasterMix	44	22	440	220	880	440
Total volume	45	22.5	450	225	900	450
Volume per well	45	22.5	Each 45	Each 22.5	Each 45	Each 22.5

A: Exicycler™ 96, B: CFX96, C: ABI 7500FAST

Note: ABI 7500FAST는 장비 특성상 최대 30 μ l 반응하는 것을 권장합니다. 자세한 내용은 장비 Manual을 참조하시기 바랍니다.

- ⑤ 모든 PCR premix tube에 앞서 준비한 mixture를 45 μ l씩 분주합니다.
- ⑥ NTC well에는 DEPC-DW (NTC) 5 μ l를 넣은 후 optical sealing film으로 well을 밀봉하여 다음 단계에서 발생할 수 있는 오염을 사전에 방지합니다.
- ⑦ 오염을 방지하기 위하여 tube를 분리된 공간으로 옮겨 well에 Sample 또는 PC를 각각 5 μ l씩 분주합니다.
- ⑧ 나머지 PCR tube에는 시료의 핵산을 각각 5 μ l씩 분주한 후 결과의 혼동을 막기 위해 해당 시료에 따라 각 well을 기록합니다.
- ⑨ Optical sealing film을 가위나 칼을 이용하여 크기에 맞게 자른 후, applicator를 이용하여 tube를 완전히 밀봉합니다.
- Note:** tube 밀봉이 완벽하게 되지 않으면 PCR 반응 및 결과에 영향을 미칠 수 있으니 반드시 확인하시기 바랍니다.
- ⑩ RNA와 잘 섞기 위해 ExiSpin™을 이용하여 [vortex 5초 (hard), spin-down (2,500rpm) 1초]*25회 후에 spin down (2,500rpm) 3분으로 진행합니다.
- Note:** 시약이 완벽하게 down 되지 않은 상태에서 PCR을 수행하면 결과에 이상을

조래하게 되므로 반드시 시약이 완벽하게 down된 상태에서 PCR을 수행하시기 바랍니다.

⑪ *ExiSpin™*을 사용하는 동안 *Exicycler™* 96의 프로그램 설정을 완료합니다. Spin-down이 끝난 후에 PCR premix tube를 바로 *Exicycler™* 96에 장착하여 검사를 시작합니다.

⑫ 'Run Exicycler3' 아이콘을 더블 클릭하여 프로그램을 실행 합니다. 이때 'Device is Not ready'라는 문구가 나타나면 프로그램을 끄고 장비 전원상태를 확인하고 self-test가 끝난 다음 프로그램을 다시 실행합니다. 'System is ready'라는 문구가 뜨면 장비와 컴퓨터가 성공적으로 연결된 것입니다.

⑬ PCR 반응에 필요한 프로토콜을 설정하기 위해 상단의 메뉴 바에서 'File - Design Experiment'를 클릭합니다.

⑭ 'Quick Start' 창이 나타나면 'Protocol' tab에서 PCR cycle을 다음과 같이 설정합니다.

Step	Protocol	Time		
		A	B	C
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	0:0:15	0:0:25
4	Incubate at 55.00°C	0:0:5	0:0:50	0:0:50
5	Scan			
6	Go to Step 3, Cycle: 45			
7 (Optional)	Incubate at 72.00°C	0:5:0		

A: *Exicycler™* 96, B: CFX96, C: ABI 7500FAST

⑮ '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		
	A	B	C
Sample	FAM	FAM	FAM
IPC	TAMRA	HEX로 대체 이용	TAMRA

A: *Exicycler™* 96, B: CFX96, C: ABI 7500FAST

⑯ 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.

3) Data analysis

① 실험결과로 얻은 데이터는 'Analysis Exicycler3' 프로그램을 통해 파일을 열어 분석 가능합니다. 해당 프로그램을 이용한 데이터분석에 대한 자세한 사항은 기기의 사용안내서를 참고하시기 바랍니다.

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

③ 'Flu. Graph' 창에서는 실험의 증폭 형광 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.

Copyright 2019. Bioneer Corporation. All Rights Reserved.

④ 'Flu. Graph' 창에서는 화면을 *.jpg 파일로 저장할 수 있습니다. 톨바의 이미지 저장 아이콘 ()을 클릭하면 저장할 수 있고, 톨바의 시트 저장 아이콘 ()을 클릭하면 *.xls 파일 형식으로 저장할 수 있습니다

⑤ 본 키트는 실험 결과 전반의 유효성을 판단하기 위하여 NTC 및 PC를 각각 2well씩 사용하며, 검체 각각의 PCR 반응 여부를 확인하기 위하여 NTC, PC를 포함한 모든 검체 well에 IPC를 사용합니다.

NTC: 검체 전처리, 핵산 추출, PCR 준비 과정에서 발생 할 수 있는 오염 여부를 판단 (위양성 결과 방지).

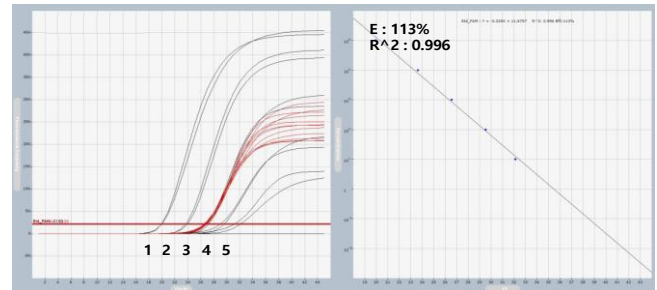
PC: FMDV RNA가 PCR 과정에서 올바르게 증폭되었는지 판단

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 감소될 수 있음).

기타 자세한 내용은 사용안내서 10. Troubleshooting에 따라 적절한 조치를 취하시기 바랍니다.

4) Data result

- *Exicycler™* 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer)



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

- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

- ABI 7500FAST Real-time PCR Instrument system (ABI)

Note: 위의 장비에 대한 자세한 내용은 장비 Manual을 참조하시기 바랍니다.

5. 주문정보 및 관련제품

Cat. No.	Description
FMV-2114P	AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (100 tests/Kit)
FMV-2124P	AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit (1,000 tests/Kit)
A-2060	Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block

6. 문의 사항 및 A/S 접수

제품 문의 및 A/S접수는 e-mail (ds@bioneer.co.kr)을 이용해 주시기 바랍니다.

7. 법적 고지문 및 등록상표

성능 개선을 위해 제품 사양, 설명 등 제공된 모든 정보는 사전 예고 없이 의료가기 허가 변경 절차에 따라 변경될 수 있습니다.

AccuPower® is a trademark of Bioneer Corporation.