

VDx[®] SIV NF MP RT-PCR

CAT.NO. NS-SIV-12



1. 제품의 개요

VDx[®] SIV NF MP RT-PCR은 감염의심시료에서 동시에 돼지 인플루엔자 바이러스(SIV)의 M 유전자 common 영역과 Newflu 특이영역을 역전사중합효소연쇄반응 (RT-PCR)으로 증폭하여 바이러스의 존재여부를 검사할 수 있는 유전자 검사 시약입니다.

M 유전자의 common 영역은 국내 돼지에서 발견되는 H1N1, H1N2, H3N2 뿐만 아니라 Influenza A형에 속하는 모든 Subtype 인플루엔자 바이러스의 Matrix 유전자를 증폭할 수 있도록 설계되었으며, 또한 Newflu Matrix 유전자에 특이적으로 반응할 수 있도록 설계되어 시료에서의 스크린 검사에 적합합니다.

2. 제품의 특징

- VDx[®] SIV NF MP RT-PCR은 유전자 증폭에 필요한 Primer, dNTP 및 Reverse transcriptase, Taq polymerase 등 RNA로부터 One-step으로 유전자를 증폭할 수 있는 구성요소가 적절하게 혼합된 Premix로 별도의 시약 준비 없이 바로 검사에 사용 가능합니다.
- 시료에서 추출한 유전자 5 μ l을 첨가하여 즉시 RT-PCR 검사를 할 수 있습니다.
- Control DNA가 제공되므로 유전자의 정상적인 증폭을 확인할 수 있습니다.
- PCR 결과물은 전기영동 시 loading dye가 필요 없이 바로 사용할 수 있습니다.

3. 제품의 구성

Reagents	
1) RT-PCR Premix(SIV NF)	50 tests
2) SIV NF primer mix	400 μ l X 2
3) Control DNA	100 μ l X 1
4) Instruction manual	1부

4. 검사시료

4.1 검사용 시료의 준비

- 검사에 사용할 수 있는 시료는 돼지의 **혈장, 혈청, 백혈구, 정액 및 조직시료, 세포배양액**을 사용할 수 있습니다.
- 시료는 가능한 신선한 것을 사용하고 보관 시에는 냉동 보관합니다.

4.2 Virus nucleotides의 추출

(Qiagen[®] RNeasy Mini Kit 기준)

- 10% 유제액 300 μ l로부터 **RNeasy Mini Kit**을 사용하여 50 μ l DEPC treated water로 추출합니다. 유전자 추출방법은 제조사의 사용설명서를 참고하십시오.
- 추출한 유전자 5 μ l를 RT-PCR 검사에 사용합니다.

주의 (Caution)

유전자 추출키트는 다른 제품의 사용이 가능하나 해당제조사의 사용설명서를 사전에 확인하십시오.

5. 검사방법

- 건조된 RT-PCR Premix(SIV_NF)에 SIV NF primer mix 15 μ l를 넣은 후, 추출한 유전자를 5 μ l 넣고, 아래의 PCR program 과 같이 RT-PCR을 실시합니다 (Total 20 μ l reaction).
- PCR검사의 유효성을 확인하기 위하여 Control DNA를 동일한 방법으로 첨가합니다. Control DNA는 교차오염의 원인이 될 수 있으므로 아래의 주의사항을 참조합니다.
- PCR cycle이 종료되면 PCR product 5 μ l를 EtBr이 첨가된 1.5% agarose gel에서 통상적인 방법으로 전기영동하고 특이유전자의 존재여부를 확인합니다 (loading dye premix 내 포함). 이때 특이유전자 분획이 너무 많은 경우 시료를 줄여서 전기영동하면 선명한 결과를 얻을 수 있습니다.

PCR Program

Step	RT-PCR Cycle		
	Temp.	Time	Cycle
cDNA synthesis	50 $^{\circ}$ C	30 min	1 cycle
Initial inactivation	95 $^{\circ}$ C	15 min	1 cycle
Denaturation	94 $^{\circ}$ C	20 sec	40 cycles
Annealing	55 $^{\circ}$ C	20 sec	
Extension	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
Final Extension	72 $^{\circ}$ C	10 min	1 cycle



주의(Caution): Control DNA의 사용

- 제품에 포함된 Control DNA는 575bp의 유전자가 증폭되도록 설계되어 있습니다.
- 시료에서 575bp의 유전자가 검출되면 Control DNA가 오염된 것으로 판정할 수 있습니다.
- Control DNA는 유전자 증폭이 이루어지는 여부를 확인하기 위한 대조시약으로, 시료와의 오염을 방지하기 위해 Filter tip을 이용하여 가장 마지막에 첨가해 사용합니다.
- 유전자 증폭 완료 후 전기영동 시에도 가장 마지막에 다루는 것이 좋습니다.



주의(Caution): H1N1 Newflu 판독 시 유의사항

본 kit의 newflu 감별 시스템은 일부 eurasia strain 에 대하여 양성으로 판정 될 수 있으므로, 확인을 하시고자 하면 subtype 감별검사 및 시퀀싱 결과가 추가적으로 요구됩니다.

참고로 현재 국내에서 eurasia strain은 H1N1 Newflu strain 이 외에 보고된 바 없는 것으로 알려져 있습니다.

6. 결과판정

- Control DNA는 575bp의 증폭산물을 확인할 수 있습니다.
- 시료에서 아래 크기의 분획이 확인되면 양성으로 판정합니다.

Virus별 특이 유전자 Size

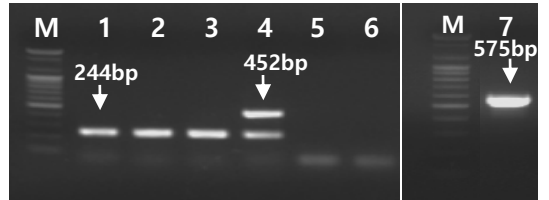
Virus	Target gene	Size
SIV common	M	244 bp
SIV Newflu	M	452 bp
Control DNA	-	575 bp

사용시 주의사항

- 제품은 동물용 체외진단용으로만 사용하여야 합니다.
- 제품은 동물 질병에 대한 병성감정에 필요한 시약으로 일반인 사용을 금하며, 동물병원 또는 병성감정기관 내 해당 분야 전문가만이 사용이 가능합니다.
- 검체는 돼지에서 유래된 부검조직, 혈액, 정액 및 세포배양액등을 사용합니다.
- 검체를 채취 및 수거 시에는 반드시 개인 보호장비(보호복, 마스크, 장갑, 보안경, 모자 및 신발등) 착용 후 수행합니다.
- 채취한 검체는 4°C를 유지하여 빠른 시간 내 (24시간 이내) 검사소로 송부합니다.
- 검사 후 남은 의심검체, 오염된 실험재료 및 기구등은 폐기하고자 하는 경우 고압증기멸균 처리등으로 불활성화하여 폐기하며, 작업 테이블등을 70% 에탄올을 이용하여 10~30분간 소독 처리하여 실험실 내외로 질병이 확산되지 않도록 합니다.
- 제품과 시약은 -20°C 이하의 냉암소에서 유효기간 내에만 사용합니다.
- 제조번호가 다른 제품의 시약은 섞거나 함께 사용하지 않습니다.
- 검사에 사용되는 용액, 가검물 등이 오염되지 않도록 주의합니다.
- 검사에 사용되는 모든 기구 즉, 피펫, PCR machine, UV transilluminator등의 기능이 정확인지 확인합니다.
- 샘플의 채취, 보관, 이동 중에 상호 혼합되지 않도록 주의하며 각 샘플마다 피펫팁을 교체하여 사용합니다.
- 시약의 사용 시 피부와 점막에 닿지 않도록 합니다. 사용된 모든 진단제품 재료들은 폐기물 처리하여 폐기하도록 합니다.
- 검사에 사용되는 모든 시약은 필요양만 꺼내어 해동하여 사용하고, 해동 후에는 ice batch 혹은 cool rack 에서 작업을 진행합니다. 사용하지 않는 premix는 -20°C 이하의 냉암소에 바로 넣어 보관합니다.
- Cross 오염을 방지하기 위해 primer mix, control DNA, 검체등을 사용 시에는 반드시 필터피펫팁을 사용하여 실험하며, 특히 control DNA 가 시료에 오염되는 것을 방지하기 위해 시료 주입 시에는 필터팁을 이용하여 가장 마지막에 첨가해 사용합니다.
- 본 제품은 사용 PCR 장비의 성능(ramp rate, block type)에 따라 반응 감도 차이를 보일 수 있습니다. 사용전에 PCR 장비의 규격을 확인해 주시기 바랍니다.
- 전기영동 결과는 육안적인 검사 결과로 판독자에 따라 결과 차이가 발생 할 수 있습니다.
- UV transilluminator의 조도나 image analyzer 경우 카메라의 성능에 따라 결과가 차이가 있을 수 있습니다.
- 본 제품의 검사결과는 다른 임상결과나 실험결과와 함께 전문수의사가 종합적으로 판단하여 최종 진단을 내려야 합니다.

Gel Electrophoresis

SIV Newflu(M) RT-PCR



M: Size Marker
 Lane1: SIV 검체 (H1N1, 244bp)
 Lane2: SIV 검체 (H1N2, 244bp)
 Lane3: SIV 검체 (H3N2, 244bp)
 Lane4: SIV 검체 (H1N1 Newflu, 244bp/452bp)
 Lane5: SIV 검체 (H1N1 Newflu, 244bp/452bp)
 Lane6: SIV 검체 (H1N1 Newflu, 244bp/452bp)
 Lane7: Control DNA (575bp)



주의(Caution): PCR machine 사용 시 유의사항

본 시약은 사용 기기의 성능(Ramp rate, Block 등)에 따라 조금씩 반응 감도 차이를 보일 수 있습니다. 이에 SIV RT-PCR은 다음 기기를 권장합니다.

	TaKaRa	Biometra	ABi
Model	TP600, TP650	T3000, T personal	GeneAmp 2700
Note	Mode 1		

이외에 아래 기기의 경우, step 별 반응 시간을 다음과 같이 변경하여 사용이 가능합니다.

	Biorad	Eppendorf	
Model	C1000	Mastercycler pro S, Mastercycler pro	
Note		Header : standard mode	

Step	변경 전		변경 후	
Denaturation	94°C	20 sec	94°C	40 sec
Annealing	55°C	20 sec	55°C	40 sec
Extension	72°C	30 sec	72°C	50 sec

*기타 기기를 사용 시에는 사용 전에 저희 기술지원팀으로 기술 문의하시기 바랍니다.

7. 사용기간

본 제품은 -20°C 냉암소에서 제조일로부터 12개월입니다. 개봉 시에는 개봉 후 6개월입니다.

기술지원 및 문의

유효기간 내 제품은 고객센터기준에 의하여 제품교환이나 기술지원을 요청하실 수 있습니다.

문의처: (주) 메디안디노스틱 품질보증본부
 24399 강원도 춘천시 동내면 순환대로 878

전화 033 244 0100, 팩스 033 244 4634

median@mediandx.com