

2021년 1월

QIAamp[®] DSP Viral RNA Mini Kit 사용 설명서(안내서)



버전 1

IVD

체외 진단용

REF

61904



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
전화: +49-2103-29-0

R6 **MAT**

1122786KR



목차

용도.....	5
설명 및 원리.....	6
QIAamp 막에 흡착.....	8
잔류 오염물질 제거.....	8
Buffer AVE를 이용한 용출.....	8
세포 DNA 오염.....	8
검체의 양.....	9
용해.....	9
운반체 RNA.....	9
내부 대조군의 추가.....	10
스핀 및 진공 절차.....	10
QIAcube/QIAcube Connect MDx에서의 바이러스 RNA 자동 정제.....	11
요약 및 설명.....	13
제공되는 재료.....	14
키트 내용물.....	14
필요하지만 제공되지 않는 재료.....	15
경고 및 예방 조치.....	17
안전성 정보.....	17
시약 보관 및 취급.....	20
시료 보관 및 취급.....	20
절차.....	21
시작 전 중요 사항.....	21

시약 및 완충액 준비.....	22
QIAamp Mini 스피ن 컬럼 취급.....	26
QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드의 설정.....	29
원심 분리.....	30
프로토콜: 검체 농축.....	31
프로토콜: 마이크로 원심분리기 또는 QIAcube/QIAcube Connect MDx를 사용하여 바이러스 RNA 정제.....	32
프로토콜: 바이러스 RNA 정제(진공 프로토콜).....	35
품질 관리.....	38
제한 사항.....	38
기호.....	39
연락처 정보.....	41
부록.....	42
주문 정보.....	45
문서 개정 이력.....	47

용도

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit는 실리카 막 기술(QIAamp 기술)을 사용하여 생물학적 표본에서 바이러스 RNA를 분리 및 정제하는 시스템입니다.

이 제품은 분자생물학 기법에 대한 교육을 받은 기술자 및 의사와 같은 전문 사용자가 사용해야 합니다.

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit는 체외 진단용입니다.

설명 및 원리

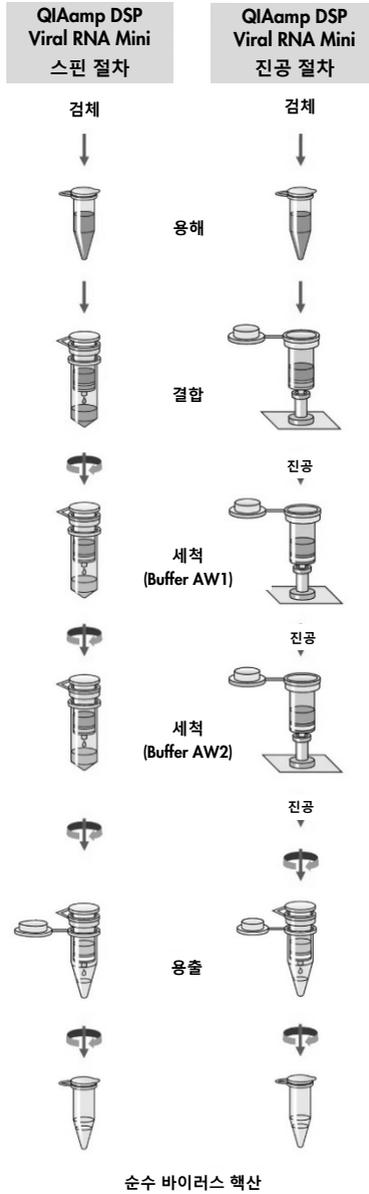
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit는 바이러스 RNA 준비를 위한 잘 정립된 기술을 대표합니다. 이 키트는 실리카 겔 기반 막의 선택적 결합 특성과 스핀 또는 진공 기술의 속도를 결합했으며, 여러 검체의 동시 처리에 적합합니다. QIAamp DSP Viral RNA 스핀 프로토콜은 QIAcube® 및 QIAcube Connect MDx에서 자동화할 수 있습니다.

RNase를 비활성화하고 손상되지 않은 바이러스 RNA의 분리를 위해 검체를 먼저 고도로 변성된 조건 하에서 용해시킵니다. 그런 다음, 완충 조건을 조정하여 RNA와 QIAamp 막의 최적 결합을 제공하고, 검체를 QIAamp Mini 스핀 컬럼에 로드합니다. RNA는 막에 결합하고, 오염 물질은 2개의 다른 세척 완충액을 사용하여 2개 단계에서 효율적으로 씻겨 나갑니다. 고품질 RNA는 직접 사용 또는 안전한 보관이 준비되었으며, RNase가 없는 특수 완충액으로 용출됩니다.

특수 QIAamp 막은 페놀/클로로포름 추출 또는 알코올 침전을 사용하지 않고 불과 20분 만에 순수하고 손상되지 않은 RNA의 높은 회수를 제공합니다.

모든 완충액과 시약은 RNase가 없음을 보장합니다.

QIAcube/QIAcube Connect MDx에 서 자동화 가능



QIAamp 막에 흡착

바이러스 RNA를 위한 최적의 결합 조건을 제공하려면 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 검체를 로드하기 전에 용해액의 완충 조건 조정해야 합니다. 용해액이 많기 때문에 용해액을 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 여러 단계로 나누어 로드해야 합니다. 바이러스 RNA는 2번의 짧은 원심 분리 단계 중에 또는 진공에 의해 QIAamp 실리카 막에 흡착됩니다. 용해액의 염 및 pH 조건은 후속적 효소 반응을 억제할 수 있는 단백질 및 기타 오염 물질이 QIAamp 막에 유지되지 않도록 합니다.

잔류 오염물질 제거

QIAamp 막에 결합된 바이러스 RNA에서 2회의 짧은 원심 분리 또는 진공 단계로 오염 물질을 씻어냅니다. 2가지의 다른 세척 완충액인 AW1과 AW2를 사용하면 용출된 RNA의 순도가 크게 향상됩니다. 최적화된 세척 조건은 RNA 결합에 영향을 미치지 않고 잔류 오염 물질을 효율적으로 제거할 수 있습니다.

Buffer AVE를 이용한 용출

Buffer AVE는 미생물의 성장 및 후속적 RNase 오염을 방지하기 위해 0.04% 아지드화나트륨을 함유한 RNase가 없는 물입니다. 아지드화나트륨은 220~280 nm의 분광 광도계 흡광도 값에 영향을 미치지만 RT-PCR과 같은 후속 작업에는 영향을 미치지 않습니다. 용출된 RNA의 순도를 확인하려면 흡광도를 측정하기 전에 Buffer AVE로 분광 광도계를 보정하는 것이 좋습니다.

세포 DNA 오염

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit는 세포 DNA에서 바이러스 RNA를 분리하도록 설계되지 않았으며, 그것들이 검체에 존재할 경우 둘 다 병렬적으로 정제됩니다. 세포 DNA의 공동 정제를 피하려면 세포가 없는 체액을 사용하여 바이러스 RNA를 준비할 것을 권장합니다.

뇌척수액, 골수, 소변 및 대부분의 면봉과 같이 세포를 포함한 검체는 먼저 여과하거나 약 1500 x g에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 사용해야 합니다. RNA와 DNA가 함께 분리될 경우, 용출액은 RNase가 없는 DNase를 사용하여 DNase와 함께 분해될 수 있으며, 이어서 열처리(15분 ± 1분, 70°C ± 3°C)로 DNase를 비활성화합니다.

검체의 양

QIAamp DSP Viral RNA 절차는 140 µl의 검체와 함께 사용하기에 최적화되었습니다. 작은 검체는 로드하기 전에 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)를 사용하여 140 µl로 조정해야 하며, 바이러스 역가가 낮은 검체는 처리하기 전에 140 µl로 농축해야 합니다. "프로토콜: 검체 농축", 31 페이지를 참조하십시오.

용해

RNase를 비활성화하고 손상되지 않은 바이러스 RNA를 분리하기 위해 먼저 검체를 Buffer AVL이 제공하는 고도의 변성 조건하에서 용해시킵니다. Buffer AVL에 첨가된 운반체 RNA는 특히 역가가 낮은 검체에서 바이러스 RNA가 QIAamp 막에 결합되는 것을 향상시키고, 잔류 RNase 활성으로 인한 바이러스 RNA의 분해 가능성을 제한합니다.

운반체 RNA

운반체 RNA는 2가지 작용을 합니다. 첫째, 이것은 특히 검체에 표적 분자가 거의 없는 경우에 바이러스 핵산이 QIAamp Mini 스피ن 컬럼 막에 결합하는 것을 향상시킵니다. 둘째, RNase 분자가 Buffer AVL의 카오트로픽 염 및 세제에 의한 변성을 피하는 희귀한 경우, 다량의 운반체 RNA를 첨가하면 바이러스 RNA 분해의 가능성이 감소합니다. 운반체 RNA를 Buffer AVL에 첨가하지 않으면 바이러스 RNA 회수의 감소로 이어질 수 있습니다.

제공되는 동결 건조 운반체 RNA의 양은 키트로 공급된 Buffer AVL의 양에 충분합니다. 운반체 RNA의 농도는 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit가 다양한 증폭 시스템과 호환되는 일반 정제 시스템으로 사용될 수 있도록 조정되었으며, 광범위한 RNA 바이러스에 적합합니다.

각 증폭 시스템은 반응 내에 존재하는 핵산의 총량에 따라 효율이 다릅니다. 이 키트를 이용한 용출액에는 바이러스 핵산과 운반체 RNA가 모두 들어 있으며, 운반체 RNA의 양이 바이러스 핵산의 양을 크게 초과합니다. 따라서 후속 증폭에 추가할 용출액의 계산은 추가되는 운반체 RNA의 양에 기초하여 이루어져야 합니다. 증폭 반응에서 최고 수준의 민감도를 얻으려면 Buffer AVL에 첨가되는 운반체 RNA의 양을 조정해야 할 수 있습니다.

내부 대조군의 추가

QIAamp DSP Viral RNA Mini 프로토콜을 상업용 증폭 시스템과 함께 사용할 때 신뢰할 수 있는 테스트 결과를 얻으려면 정제 절차에 내부 대조군을 도입하는 것이 좋습니다. 내부 대조군 RNA 또는 DNA는 운반체 RNA와 함께 용해 완충액에 첨가되어야 합니다. 작은 분자는 효율적으로 회수되지 않으므로 최적의 정제 효율을 위해서는 내부 대조군 분자가 200개의 뉴클레오티드보다 길어야 합니다.

최적의 농도를 결정하려면 제조업체의 지침을 참고하십시오. 권장하는 것 이외의 농도를 사용하면 증폭 효율이 저하될 수 있습니다.

스핀 및 진공 절차

QIAamp DSP Viral RNA Mini 정제 절차는 표준 마이크로 원심 분리기, 진공 매니폴드 또는 QIAcube에서 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 사용하여 3단계로 수행됩니다. 이 절차는 검체 간 교차 오염이 없도록 설계되었으며, 잠재적 감염성 검체를 안전하게 취급할 수 있습니다.

QIAamp Mini 스피너 컬럼은 대부분의 표준 마이크로 원심 분리 튜브에 적합합니다. 스피너 프로토콜에서는 여과액의 용량으로 인해 로드 및 세척 단계에서 QIAamp Mini 스피너 컬럼을 지지하기 위해 2 ml 세척 튜브(WT)(제공됨)가 필요합니다. 진공 프로토콜에서는 진공 매니폴드(QIAvac 24 Plus 또는 이와 동등한 것; 15페이지 참고) 및 -800~-900mbar의 진공을 달성할 수 있는 진공 펌프(예: QIAGEN® Vacuum Pump)가 필요합니다.

용출된 RNA는 표준 1.5 ml 마이크로 원심 분리 튜브(제공됨)에 수집할 수 있습니다. 이 튜브는 RNase에 의한 바이러스 RNA의 분해를 피하기 위해 RNase가 없어야 합니다.

QIAcube/QIAcube Connect MDx에서의 바이러스 RNA 자동 정제

QIAcube 및 QIAcube Connect MDx는 핵산의 자동 분리 및 정제를 수행합니다. 단일 실행당 최대 12개의 검체를 처리할 수 있습니다.

QIAcube 또는 QIAcube Connect MDx에서 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit를 자동화하는 경우, 기기는 자동 피펫팅을 통한 불용 용량, 증발 및 추가적인 시약 소모로 인해 50개 미만의 검체를 처리할 수 있습니다. QIAGEN은 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit를 수동으로 사용했을 때 50개의 검체 준비만 보장합니다.



그림 1. QIAcube.



그림 2. QIAcube Connect MDx.

요약 및 설명

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit는 증폭 기술에서의 신뢰할 수 있는 사용을 위해 바이러스 RNA를 정제하는 방법을 제공합니다. 바이러스 RNA는 혈장(헤파린 이외의 항응고제로 처리), 혈청 및 기타 세포가 없는 체액에서 정제할 수 있습니다.

제공되는 재료

키트 내용물

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit			(50)
카탈로그 번호			61904
준비 수			50*
QIAamp Mini 스피ن	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes(세척 튜브가 있는 QIAamp Mini 스피ن 컬럼)		50
ET	Elution Tubes(용출 튜브)(1.5 ml)		50
LT	Lysis Tubes(용해 튜브)(2 ml)		50
WT	Wash Tubes(세척 튜브)(2 ml)		4 x 50
AVL	Buffer AVL*(완충액 AVL)		31 ml
AW1	Buffer AW1*(concentrate) (완충액 AW1(농축액))		19 ml
AW2	Buffer AW2*(concentrate) (완충액 AW2(농축액))		13 ml
AVE	Buffer AVE*(완충액 AVE)		3 x 2 ml
운반체	Carrier RNA(poly A)(운반체 RNA(폴리 A))		310 µg
-	사용 지침(안내서)		1

* 카오트르피염을 함유하고 있습니다. 표백제를 포함하는 소독제와 같이 사용할 수 없습니다. 경고 및 예방 조치는 17페이지를 참조하십시오.

† 방부제 역할을 하는 아지드화 나트륨을 함유하고 있습니다.

‡ QIAcube 또는 QIAcube Connect MDx 기기에서 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit를 자동화하는 경우, 기기는 자동 피펫팅으로 인한 무용 용량, 증발 및 추가적인 시약 소모로 인해 50개 미만의 검체를 처리할 수 있습니다.

QIAGEN은 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit를 수동으로 사용했을 때 50개의 검체 준비만 보장합니다.

필요하지만 제공되지 않는 재료

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오.

- 에탄올(96~100%) *
- 1.5 ml 마이크로 원심 분리 튜브
- RNase가 없는 멸균 피펫†
- RNase가 없는 멸균 피펫 팁(교차 오염 방지, 에어로졸 막이 있는 피펫 팁 권장)
- 마이크로 원심분리기*(1.5 ml 및 2 ml 튜브용 로터 포함)

진공 프로토콜용

- QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드(카탈로그 번호 19413) 또는 이와 동등한 것
- VacConnectors(카탈로그 번호 19407)
- 진공 압력의 용이한 모니터링 및 용이한 진공 해제를 위한 Vacuum Regulator(카탈로그 번호 19530)
- Vacuum Pump(카탈로그 번호 84010 또는 -800~-900 mbar의 진공을 달성할 수 있는 동등한 펌프)
- 선택사항: VacValves(카탈로그 번호 19408)
- 선택사항: QIAvac Connecting System(카탈로그 번호 19419)

* 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올을 사용하지 마십시오.

† 검체를 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit 절차로 적절히 처리하려면 기기(예: 마이크로 원심분리기)를 제조업체의 권장 사항에 따라 캘리브레이션할 것을 강력히 권장합니다.

자동 절차에만 해당

- Rotor Adapters, 카탈로그 번호 990394
- Rotor Adapter Holder, 카탈로그 번호 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), 카탈로그 번호 990382(검체 투입 튜브)
- Shaker Rack Plugs, 카탈로그 번호 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, 카탈로그 번호 990393
- Filter-Tips, 1000 μ l, 카탈로그 번호 990352

경고 및 예방 조치

사용자 및/또는 환자가 확인된 기기와 관련하여 발생한 중대한 사건을 제조업체 및 규제 당국에 보고해야 할 수 있다는 점에 유의하십시오.

안전성 정보

체외 진단용

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 관련 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.qiagen.com/safety에서 편리하고 용량이 작은 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

RNA는 RNase에 매우 민감하므로 항상 주의하여 준비해야 합니다. 손과 먼지 입자에는 박테리아와 곰팡이가 있을 수 있으며, RNase 오염의 가장 일반적인 원인입니다. 시작하기 전에 이 안내서의 부록(42페이지)에 있는 "RNA 취급"을 읽으시기 바랍니다.

PCR은 항상 우수 실험실 운영 기준을 사용하여 수행해야 합니다. 따라서 PCR 실험실은 항상 3개 영역, 즉 시약 준비 영역, 검체 준비 영역, 증폭 및 탐지 영역으로 나누어야 합니다. PCR의 높은 민감도로 인해 모든 시약은 순수하고 오염되지 않은 상태로 유지해야 하며, 신중하게 주기적으로 모니터링해야 합니다. 오염된 시약은 폐기해야 합니다.



주의: 표백제나 산성 용액을 Buffer AVL 또는 Buffer AW1에 직접 첨가하지 마십시오.

Buffer AVL 및 Buffer AW1은 표백제와 결합하면 반응성이 높은 화합물을 형성할 수 있는 구아니딘 염을 함유하고 있습니다. 이런 완충액이 들어 있는 액체를 흘린 경우, 적절한 실험실 세제 및 물로 청소하십시오. 흘린 액체에 감염체가 들어 있을 가능성이 있으면 해당 부분을 먼저 실험실 세제 및 물로 청소한 후 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨으로 청소하십시오.

완충액 병이 손상되었거나 새면 사람의 부상을 피할 수 있도록 병을 폐기할 때 장갑과 보안경을 착용하십시오.

QIAGEN은 QIAamp DSP Viral RNA Mini 절차로 생성된 액체 폐기물의 잔류 감염성 물질에 대해 테스트하지 않았습니다. 잔류 감염성 물질에 의한 액체 폐기물의 오염은 가능성이 매우 낮지만 완전히 배제할 수는 없습니다. 따라서 액체 폐기물은 감염성으로 간주하고, 지역 안전 규정에 따라 취급 및 폐기해야 합니다.

다음의 위험 및 예방 조치 관련 안내문은 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit의 구성품에 적용됩니다.

Buffer AVL



내용물: 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 피부에 접촉하거나 흡입하면 해롭습니다. 삼키면 해로울 수 있습니다. 심각한 피부 화상 및 눈 손상을 야기합니다. 수생 생물에게 해로우며, 효과가 오래 지속됩니다. 산과 접촉하면 매우 독성이 강한 가스를 방출합니다. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기하십시오. 눈에 들어간 경우: 물로 몇 분 동안 주의하여 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 오염된 의복을 벗고 다시 사용하기 전에 세탁하십시오. 피부(또는 머리)에 묻은 경우: 오염된 의복을 모두 즉시 제거합니다/벗습니다. 피부를 물로 씻어내거나 샤워하십시오. 즉시 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 잠근 상태로 보관하십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

Buffer AW1



내용물: 염산 구아니딘. 경고! 삼키거나 흡입하면 해롭습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 눈 자극을 일으킵니다. 몸에 이상을 느낄 시 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기하십시오. 오염된 의복을 벗고 다시 사용하기 전에 세탁하십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

시약 보관 및 취급

QIAamp Mini 스피ن 컬럼은 2~8°C에서 건조한 상태로 보관해야 하며, 더 높은 온도에서의 보관은 피해야 합니다. 모든 용액은 별도로 지시하지 않는 한, 실온(15~25°C)에서 보관해야 합니다. QIAamp Mini 스피ن 컬럼과 모든 완충액 및 시약은 이런 조건에서 키트 상자에 표시된 유통 기한까지 성능 저하 없이 보관할 수 있습니다.

동결 건조된 운반체 RNA는 키트 박스에 명시된 유효 기간까지 실온에서 보관할 수 있습니다. 운반체 RNA는 Buffer AVE에 용해시켜야 합니다. 수동 절차의 경우 용해된 운반체 RNA는 22페이지에 설명된 대로 즉시 Buffer AVL에 첨가해야 합니다. 이 용액은 새로 준비해야 하며, 2~8°C에서 최대 48시간 동안 안정적입니다. Buffer AVL-운반체 RNA는 2~8°C에서 보관했을 때 침전물이 발생하므로 사용하기 전에 80°C ± 3°C로 데워서 다시 용해시켜야 합니다. Buffer AVE에 용해시켜 사용하지 않은 운반체 RNA는 소분하여 -30~-15°C에서 동결시켜야 합니다. 소분한 운반체 RNA를 3회를 초과하여 동결-해동시키지 마십시오.

Buffer AVL-운반체 RNA 용액을 6회를 초과하여 데우지 마십시오. 80°C에서 5분 이상 배양하지 마십시오. 빈번한 데우기 및 장시간 배양은 운반체 RNA의 분해를 일으켜 바이러스 RNA의 회수 감소로 이어지고, 결국 특히 역가가 낮은 검체를 사용할 때 위음성 RT-PCR 결과를 초래합니다.

시료 보관 및 취급

채취 및 원심 분리 후 혈장(처리되지 않았거나 헤파린 이외의 항응고제로 처리됨) 또는 혈청은 2~8°C에서 최대 6시간 동안 보관할 수 있습니다. 장기 보관하려면 소분하여 -80~-20°C에서 동결시키는 것이 권장됩니다. 동결된 혈장이나 혈청 검체는 한 번을 초과하여 해동해서는 안 됩니다. 반복적인 동결 및 해동은 단백질의 변성과 침전을 유도하여 바이러스 역가를 감소시키고, 이어서 분리되는 바이러스 RNA의 수율을 감소시킵니다. 또한 동결-해동으로 형성된 저온 침전물은 QIAamp 막의 막힘을 유발합니다.

저온 침전물이 보이면 약 6800 x g에서 3분 ±30초간 짧게 원심 분리하여 펠렛화할 수 있습니다. 투명해진 상청액은 제거하고, 펠렛을 파괴하지 않고 즉시 처리해야 합니다.

절차

시작 전 중요 사항

- 키트를 받은 후 키트 구성품들이 손상되지 않았는지 확인하십시오. 블리스터 팩이나 완충액 병이 손상된 경우에는 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 문의하십시오. 액체가 누출된 경우 "경고 및 예방 조치"(17페이지)를 참조하십시오. 손상된 키트 구성품은 키트 성능을 떨어뜨릴 수 있으므로 사용하지 마십시오.
- 항상 RNase가 없는 장비를 사용하십시오.
- 액체를 옮기는 중에는 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 교차 오염을 최소화하려면 에어로졸 막이 있는 피펫 팁을 사용하는 것이 좋습니다.
- 모든 원심 분리 단계는 실온(15~25°C)에서 수행됩니다.
- 항상 일회용 장갑을 사용하고 검체 물질이 묻지 않았는지 정기적으로 확인하십시오. 장갑이 오염되었으면 폐기하십시오.
- 교차 오염을 최소화하려면 한 번에 한 개의 튜브만 개봉하십시오.
- 로트 번호가 동일하지 않으면 다른 키트의 구성품을 현재 사용 중인 키트와 함께 사용하지 마십시오.
- 키트 시약의 미생물 오염을 피하십시오.
- 잠재적 감염성 물질로부터 안전을 보장하기 위해 당사는 검체가 용해될 때까지 층류 조건하에서 작업할 것을 권장합니다.
- 자동의 경우 프로토콜 시트(QIAcube)나 소프트웨어 화면(QIAcube Connect MDx)의 지침을 따르고 적절한 사용 설명서를 참조하십시오(QIAcube 및 QIAcube Connect MDx용).
- 이 키트는 체외 진단에 관한 실험실 운영 기준을 교육받은 사람만 사용해야 합니다.

중요 참고 사항

준비를 시작하기 전에 시간을 내서 이 안내서를 주의 깊게 읽으시기 바랍니다. 31페이지에서 시작하는 QIAamp DSP Viral RNA Mini 프로토콜 내 설명은 특히 중요합니다.

RNA를 처음 준비할 경우에는 이 안내서의 부록에 있는 "RNA 취급"(42페이지)을 읽어 보십시오. QIAamp DSP Viral RNA Mini 프로토콜의 모든 단계는 실온에서 신속하게 수행해야 합니다. QIAamp DSP Viral RNA Mini 프로토콜은 RNA를 DNA에서 분리하도록 설계되지 않았습니다. 세포 DNA 오염을 피하려면 이 안내서의 8페이지에 있는 "세포 DNA 오염"의 지침을 따르십시오. QIAamp DSP Viral RNA Mini 절차에서 200개의 뉴클레오티드보다 큰 모든 RNA 분자를 분리합니다. 이보다 작은 RNA 분자는 사용된 조건하에서 정량적으로 결합되지 않을 것입니다.

시약 및 완충액 준비

- Buffer AVL*에 운반체 RNA 첨가(수동 절차에 한함)

310 µl의 Buffer AVE를 310 µg의 동결 건조된 운반체 RNA가 들어 있는 튜브에 추가하여 1 µg/µl의 용액을 만듭니다. 운반체 RNA를 완전히 용해시키고 편리한 크기로 소분하여 -25°C~-15°C에서 보관합니다. 소분한 운반체 RNA를 3회 이상 동결-해동하지 마십시오.

- Buffer AVL에 침전물이 있는지 점검하고, 필요하면 침전물이 용해될 때까지 80°C ± 3°C에서 배양합니다. 동시에 처리할 검체 수를 표 1(24페이지)에서 선택하여 검체 배치당 필요한 Buffer AVL-운반체 RNA 혼합물의 용량을 계산합니다.

검체 수가 더 많을 경우, 다음의 검체 계산법을 사용하여 용량을 계산할 수 있습니다.

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} = z$$

* 카오트로픽염을 함유하고 있습니다. 취급 시 적절한 실험실 안전 조치를 취하고 장갑을 착용하십시오. 표백제를 포함하는 살균제와 같이 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 17페이지를 참조하십시오.

여기에서: n = 동시에 처리할 검체의 수
 y = 계산된 Buffer AVL의 용량
 z = Buffer AVL에 첨가할 운반체 RNA-Buffer AVE의 용량

튜브를 10회 뒤집어서 조심스럽게 혼합합니다. 거품이 형성되지 않도록 볼텍싱하지 마십시오.

참고: 검체 준비 절차는 검체당 5.6 µg의 운반체 RNA에 최적화되었습니다. 사용자의 증폭 시스템에서 보다 적은 운반체 RNA가 더 나은 것으로 확인되었다면 필요한 양의 용해된 운반체 RNA만 Buffer AVL이 들어 있는 튜브로 옮기십시오. (검체당 5.6 µg 미만의 운반체 RNA를 사용하려면 각 특정 검체 유형 및 후속 분석에 대해 검증해야 합니다.)

Buffer AVL-운반체 RNA는 새로 준비해야 하며, 2~8°C에서 최대 48시간 동안 안정적입니다. 이 용액은 2~8°C에서 보관했을 때 침전물이 발생하므로 사용하기 전에 80°C ±3°C로 데워서 다시 용해시켜야 합니다. Buffer AVL-운반체 RNA 용액을 6회를 초과하여 데우지 마십시오. 80°C ±3°C에서 5분 이상 배양하지 마십시오. 빈번한 데우기 및 장시간 배양은 운반체 RNA의 분해를 일으켜 바이러스 RNA의 회수 감소로 이어지고, 결국 위음성 RT-PCR 결과를 초래합니다. 이것은 특히 역가가 낮은 검체에서 그렇습니다.

자동 절차의 경우 QIAcube/QIAcube connect MDx가 Buffer AVL-운반체 RNA 혼합물의 설정을 수행합니다.

표 1. QIAamp DSP Viral RNA Mini 절차를 위한 특정한 수(No.)의 검체에 필요한 Buffer AVL 및 운반체 RNA-Buffer AVE 혼합물의 용량(Vol.)

검체 수	Buffer AVL 용량(ml)	운반체 RNA AVE 용량(μl)	검체 수	Buffer AVL 용량(ml)	운반체 RNA AVE 용량(μl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

Buffer AW1 *

Buffer AW1은 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표기되고, 표 2에 나와 있는 바와 같이 적절한 양의 에탄올(96~100%)을 첨가하십시오. Buffer AW1은 닫은 상태로 실온에서 보관하면 6개월간(단, 키트 유효 기한까지만) 안정적입니다.

표 2. Buffer AW1의 준비

키트 카탈로그 번호	준비 수	AW1 농축액	에탄올	최종 용량
61904	50	19 ml	25 ml	44 ml

* 카오트로픽 염을 함유하고 있습니다. 취급 시 적절한 실험실 안전 조치를 취하고 장갑을 착용하십시오. 표백제를 포함하는 살균제와 같이 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 17페이지를 참조하십시오.

Buffer AW2*

Buffer AW2는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표기되고, 표 3에 나와 있는 바와 같이 적절한 양의 에탄올(96~100%)을 Buffer AW2 농축액에 첨가하십시오.

Buffer AW2은 닫은 상태로 실온에서 보관하면 6개월간(단, 키트 유효 기한까지만) 안정적입니다.

표 3. Buffer AW2의 준비

키트 카탈로그 번호	준비 수	AW2 농축액	에탄올	최종 용량
61904	50	13 ml	30 ml	43 ml

* 방부제 역할을 하는 아지드화 나트륨을 함유하고 있습니다.

QIAamp Mini 스피ن 컬럼 취급

핵산 증폭 기술의 민감성 때문에 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 취급할 때는 검체 준비 간 교차 오염을 피하기 위해 다음과 같은 예방 조치가 필요합니다.

- 검체 또는 용액을 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 조심스럽게 넣습니다. 컬럼의 테두리에 묻지 않도록 주의하면서 검체를 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 피펫팅합니다.
- 액체를 옮기는 중에는 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용하는 것이 좋습니다.
- 피펫 팁으로 QIAamp Mini 스피ن 컬럼 막을 건드리지 마십시오.
- 모든 펄스 볼텍싱 단계가 끝나면 마이크로 원심분리기 튜브를 잠깐 원심 분리하여 뚜껑 안쪽의 액체 방울을 제거합니다.
- 한 번에 한 개의 QIAamp Mini 스피ن 컬럼만 개봉하고, 에어로졸이 생성되지 않도록 주의하십시오.
- 전체 절차 중에 장갑을 끼십시오. 장갑과 검체가 접촉할 경우, 즉시 장갑을 교체하십시오.

QIAvac에서의 진공 프로토콜

QIAvac 24 Plus는 최대 24개의 QIAGEN 스피ن 컬럼을 병렬로 빠르고 효율적으로 진공 처리할 수 있도록 제작되었습니다. 검체 및 세척 용액은 원심 분리 대신 진공에 의해 컬럼 막을 통과하므로 정제 절차에서 보다 높은 속도와 수작업 시간 단축을 제공합니다.

QIAvac Connecting System(선택사항)과 조합하면 QIAvac 24 Plus를 관류 시스템으로 사용할 수 있습니다. 검체 통과액은 별도의 폐기물 병에 수집됩니다.

QIAvac 24 Plus의 유지보수에 관해서는 *QIAvac 24 Plus 안내서*의 취급 지침을 참고하십시오.

QIAvac 24 Plus 지침

- QIAvac 24 Plus는 항상 안전한 작업대 위나 작업 구역에 두십시오. 떨어지면 QIAvac 24 Plus 매니폴드가 파손될 수 있습니다.
- QIAvac 24 Plus는 항상 깨끗하고 건조하게 보관하십시오. 청소 절차는 *QIAvac 24 Plus 안내서*를 참고하십시오.
- QIAvac 24 Plus의 구성품은 일부 용제에 내성이 없습니다(표 4). 용제가 장치 위에 흘렀을 경우에는 물로 완전히 닦아내십시오.
- 일관된 성능을 위해서는 QIAvac 24 Plus 매니폴드의 어느 부분에도 실리콘이나 진공 그리스를 사용하지 않아야 합니다.
- 압력이 가해진 진공 매니폴더 근처에서 작업할 때는 항상 주의하고 보안경을 착용하십시오.
- 예비 또는 교체용 부품에 관한 사항은 QIAGEN 기술 서비스 부서나 현지 유통업체로 문의하십시오.
- 진공 압력은 진공 매니폴드 내부와 대기 간의 차압이며(표준 대기압 1,013 millibar 또는 760 mm Hg), QIAvac Connecting System 또는 Vacuum Regulator를 사용하여 측정할 수 있습니다(그림 3, 28페이지). 진공 프로토콜은 -800~-900 mbar의 진공을 달성할 수 있는 Vacuum Pump가 필요합니다(예: QIAGEN Vacuum Pump). 더 높은 진공 압력은 반드시 피해야 합니다. 권장하는 것보다 낮은 진공 압력을 사용하면 DNA 수율 및 순도가 감소하고 막이 막히는 빈도가 높아질 수 있습니다.

표 4. QIAvac 24 Plus의 화학물질 내성

내성이 있는 화학물질:		내성이 없는 화학물질:
아세트산	카오토로픽 염	벤젠
크롬산	농축 알코올	페놀
SDS	염화나트륨	클로로포름
Tween® 20	우레아	톨루엔
염소 표백제	염산	에테르
수산화나트륨		

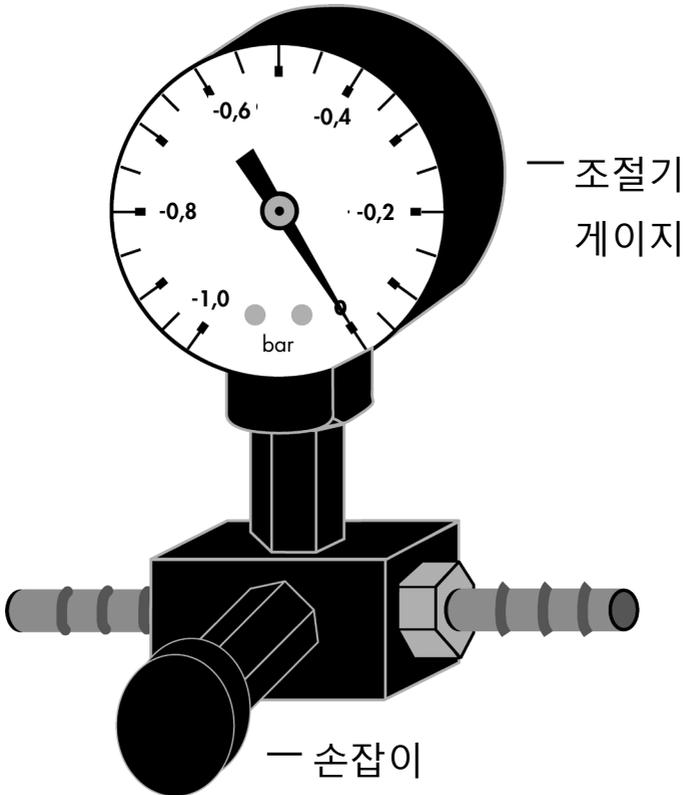


그림 3. Vacuum Regulator의 개념도.

QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드의 설정

1. QIAvac 24 Plus를 진공 소스에 연결합니다. QIAvac Connecting System을 사용하는 경우 QIAvac 24 Plus 안내서의 부록 A에 설명된 대로 시스템을 매니폴드 및 진공 소스에 연결하십시오.
2. 권장됨: 사용할 QIAvac 24 Plus의 각 루어 슬롯에 VacValve를 삽입합니다(그림 4, 30페이지 참고).
검체의 유속이 크게 다를 경우 일관된 진공을 위해서는 VacValves를 사용해야 합니다.
3. VacConnector를 각 VacValve(그림 4 참고)에 삽입하거나 사용할 QIAvac 24 Plus의 각 루어 슬롯에 직접 삽입합니다. 사용하지 않는 루어 슬롯을 루어 플러그로 닫거나 삽입된 VacValve를 닫습니다.
VacConnectors가 공기 중 잠재적 오염 물질에 노출되지 않도록 정제를 시작하기 직전에 이 단계를 수행합니다.
4. QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 매니폴드의 VacConnectors 안에 배치합니다(그림 4 참고).
5. 핵산 정제를 위해서는 진공 프로토콜의 지침을 따르십시오. 사용 후 VacConnector를 적절하게 폐기합니다.
진공을 가하는 동안 QIAamp Mini 스피ن 컬럼의 뚜껑을 열어 둡니다. 처리 중에 일관되고 균일한 진공이 가해지도록 단계 사이에 진공을 끕니다. 더 빠른 진공 해제를 위해서는 Vacuum Regulator를 사용해야 합니다(그림 3, 28페이지 참고).
참고: 각 VacValve는 검체가 스피ن 컬럼을 완전히 통과하면 개별적으로 닫을 수 있으므로 다양한 용량 또는 점도의 검체를 병렬로 처리할 수 있습니다.
6. 검체를 처리한 후 QIAvac 24 Plus를 청소하십시오(QIAvac 24 Plus 안내서의 "QIAvac 24 Plus 청소 및 오염 제거" 참고).
참고: QIAamp DSP Viral RNA Mini 절차에 사용되는 Buffers AVL 및 AW1은 표백제를 포함하는 살균제와 같이 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 17페이지를 참조하십시오.

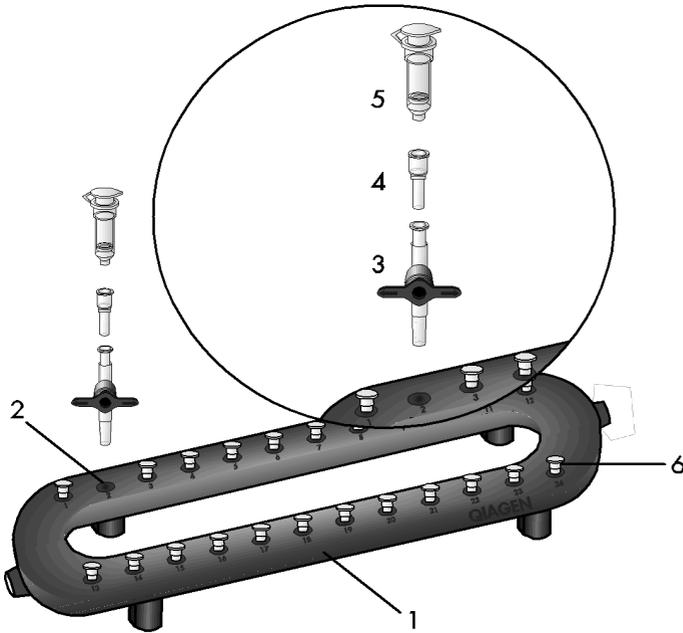


그림 4. VacValves 및 VacConnectors를 사용하는 QIAamp Mini 스피ن 컬럼이 있는 QIAvac 24 Plus의 설정.

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 1. QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드 | 4. VacConnector* |
| 2. QIAvac 24 Plus의 루어 슬롯 | 5. QIAamp Mini 스피ن 컬럼 |
| 3. VacValve(선택사항)* | 6. 루어 플러그로 닫힌 루어 슬롯 |
- * 별도로 구입해야 합니다.

원심 분리

원심 분리기 소음을 줄이기 위해 QIAamp Mini 스피ن 컬럼의 원심 분리는 약 6,000 x g에서 수행됩니다. 최대속 원심 분리는 RNA 수율을 높이지 않습니다. 모든 용액이 막을 통과한다면 용해액 로드 및 첫 번째 세척 단계에서 보다 저속의 원심 분리도 허용됩니다. 두 번째 세척 단계에서는 최대 속도의 원심 분리를 강력히 권장합니다.

모든 원심 분리 단계는 실온에서 수행해야 합니다.

프로토콜: 검체 농축

혈장, 혈청, 소변, 뇌척수액, 골수 및 기타 체액은 보통 바이러스 역가가 매우 낮습니다. 이런 경우, 최대 3.5 ml의 검체를 최종 용량 140 μ l로 농축하는 것이 권장됩니다.

시작 전 중요 사항

- Microsep 100(Filtron: 3.5 ml, 카탈로그 번호 OD100C40), Ultrafree[®]CL(Millipore: 2 ml, 카탈로그 번호 UFC4 THK 25) 같은 마이크로 농축기 또는 다른 공급업체의 이와 동등한 제품을 사용하십시오.

절차

1. 제조업체의 지침에 따라 마이크로 농축기에 최대 3.5 ml의 검체를 로드합니다.
2. 제조업체의 지침에 따라 최종 용량 140 μ l로 원심 분리합니다.
일부 검체, 특히 혈장은 높은 점도로 인해 140 μ l에 농축하기가 어려울 수 있습니다. 최대 6시간의 원심 분리가 필요할 수 있습니다.
3. 140 μ l의 농축 검체를 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브에 피펫팅하고, 32페이지의 QIAamp DSP Viral RNA 스피ن 프로토콜을 따릅니다.

프로토콜: 마이크로 원심분리기 또는 QIAcube/QIAcube Connect MDx를 사용하여 바이러스 RNA 정제

마이크로 원심분리기를 사용하거나 QIAcube 또는 QIAcube Connect MDx에서 자동화하여 140 µl의 혈장, 혈청, 소변, 세포 배양 배지 또는 세포가 없는 체액에서 바이러스 RNA를 정제하기 위한 것입니다. 최대 560 µl(140 µl의 배수)의 보다 큰 시작 용량은 프로토콜에서 아래에 설명된 대로 최초 용량을 비례적으로 늘리고 QIAamp Mini 스핀 컬럼을 여러 번 로드하여 처리할 수 있습니다. 바이러스 역가가 매우 낮은 일부 검체는 정제 절차 전에 농축해야 합니다. "프로토콜: 검체 농축"(31페이지)를 참조하십시오.

시작 전 중요 사항

- 프로토콜을 시작하기 전에 "절차"(21~28페이지)를 읽어 보십시오.
- 모든 원심 분리 단계는 실온(15~25°C)에서 수행됩니다.
- QIAcube/QIAcube Connect MDx에서는 2~10개 또는 12개 검체의 자동 처리를 수행할 수 있습니다.
- 자동의 경우 프로토콜 시트(QIAcube)나 소프트웨어 화면(QIAcube Connect MDx)의 지침을 따르고 적절한 사용 설명서를 참조하십시오(QIAcube 및 QIAcube Connect MDx용).

시작하기 전 해야 할 일

- 검체를 실온이 되도록 합니다.
- 단계 11의 용출을 위해 Buffer AVE가 실온이 되도록 합니다.
- Buffer AW1 및 Buffer AW2가 24페이지의 지침에 따라 준비되었는지 점검합니다.
- 수동 절차에 한함: 22페이지의 지침에 따라 Buffer AVE로 재구성된 운반체 RNA를 Buffer AVL에 첨가합니다.

절차

- 마이크로 원심분리기를 이용한 수동 절차의 경우 단계 1~11를 따릅니다.
- 이 절차는 두 가지 다른 버전으로 자동화할 수 있습니다.
 - 표준: 140 μ L의 검체를 사용하는 완전 자동화(단계 1부터)
 - 수동 용해: 오프 보드 수동 용해를 이용한 부분 자동화(단계 4부터 시작)
- 1. 운반체 RNA가 들어 있는 560 μ L의 준비된 Buffer AVL을 용해 튜브(LT)로 피펫팅합니다. 검체 용량이 140 μ L 이상이면 Buffer AVL-운반체 RNA의 양을 그에 비례하여 증가시키고(예: 280 μ L의 검체는 1120 μ L의 Buffer AVL-운반체 RNA가 필요) 더 큰 튜브를 사용합니다.
- 2. 140 μ L의 혈장, 혈청, 소변, 세포 배양 상청액 또는 세포가 없는 체액을 용해 튜브(LT)의 Buffer AVL-운반체 RNA에 첨가합니다. 15초 동안 펄스-볼텍싱하여 혼합합니다. 효율적인 용해를 위해서는 검체를 Buffer AVL과 철저히 혼합하여 균질한 용액을 얻는 것이 필수적입니다. 한 번만 해동했던 동결된 검체도 사용할 수 있습니다.
- 3. 실온에서 10분 \pm 1분 동안 배양합니다. 바이러스 입자 용해는 실온에서 10분간 용해가 이루어진 뒤 완료됩니다.
- 4. 용해 튜브(LT)를 짧게 원심 분리하여 뚜껑 안쪽에서 물방울을 제거합니다. 참고: 수동 용해(단계 1~4)가 오프보드로 수행되는 경우, 수동 용해 프로토콜(화면 상)에 대한 지침에 따라 QIAcube 또는 QIAcube Connect MDx에서 다음 단계(단계 5~11)를 자동화할 수 있습니다.
- 5. 검체에 560 μ L의 에탄올(96~100%)을 첨가하고, \geq 15초 동안 펄스-볼텍싱하여 혼합합니다. 혼합한 후 튜브를 짧게 원심 분리하여 뚜껑 안쪽에서 물방울을 제거합니다. 다른 알코올은 RNA 수율과 순도를 감소시킬 수 있기 때문에 에탄올만 사용해야 합니다. 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오. 검체 용량이 140 μ L 이상이면 그에 비례하여 에탄올의 양을 증가시킵니다(예: 280 μ L의 검체는 1,120 μ L의 에탄올이 필요함). 효율적인 결합을 위해서는 검체를 에탄올과 철저히 혼합하여 균질한 용액을 얻는 것이 필수적입니다.

6. 테두리에 묻지 않도록 주의하면서 5단계의 용액 630 μ l를 QIAamp Mini 스핀 컬럼(세척 튜브(WT))에 로드합니다. 캡을 닫고 약 6,000 x g로 \geq 1분 동안 원심 분리합니다. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 깨끗한 2 ml 세척 튜브(WT)에 넣고 여과액이 들어 있는 세척 튜브는 폐기합니다.

원심 분리 중에 교차 오염을 피하려면 각 스핀 컬럼을 닫습니다.

마이크로 원심 분리기 소음을 줄이기 위해 원심 분리는 약 6000 x g로 수행됩니다.

최고 속도의 원심 분리는 바이러스 RNA의 수율이나 순도에 영향을 주지 않습니다.

용액이 막을 완전히 통과하지 않았으면 모든 용액이 통과할 때까지 더 빠른 속도로 원심 분리하십시오.

7. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 조심스럽게 열고 6단계를 반복합니다.

모든 용해물이 스핀 컬럼에 로드될 때까지 이 단계를 반복합니다.

8. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 조심스럽게 열고 500 μ l의 Buffer AW1을 추가합니다. 캡을 닫고 약 6,000 x g로 \geq 1분 동안 원심 분리합니다. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 깨끗한 2 ml 세척 튜브(WT)에 넣고 여과액이 들어 있는 세척 튜브는 폐기합니다.

원래의 검체 용량이 140 μ l 이상이라도 Buffer AW1의 용량을 증가시킬 필요는 없습니다.

9. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 조심스럽게 열고 500 μ l의 Buffer AW2를 추가합니다. 캡을 닫고 최고 속도(약 20,000 x g)에서 3분 \pm 30초간 원심 분리합니다.

10. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 새로운 2 ml 세척 튜브(WT)에 넣고 여과액이 들어 있는 세척 튜브는 폐기합니다. 최고 속도로 1분간 원심 분리합니다.

11. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 깨끗한 용출 튜브(ET)에 넣습니다. 여과액이 들어 있는 세척 튜브를 폐기합니다. QIAamp Mini 스핀 컬럼을 조심스럽게 열고 실온에 평형된 60 μ l의 Buffer AVE를 추가합니다. 캡을 닫고 실온에서 \geq 1분간 배양합니다.

약 6,000 x g로 \geq 1분간 원심 분리합니다.

중요 참고 사항: 모든 자동 절차의 경우, 실행을 완료한 후 바로 기기에서 용출액을 꺼내 적절히 보관합니다.

프로토콜: 바이러스 RNA 정제(진공 프로토콜)

이 프로토콜은 QIAvac 24 Plus 또는 이와 동등한 진공 매니폴드를 사용하여 140 μ l의 혈장, 혈청, 소변, 세포 배양 배지 또는 세포가 없는 체액에서 바이러스 RNA를 정제하기 위한 것입니다. 최대 560 μ l(140 μ l의 배수)의 보다 큰 시작 용량은 프로토콜에서 아래에 설명된 대로 최초 용량을 비례적으로 늘리고 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 여러 번 로드하여 처리할 수 있습니다. 바이러스 역가가 매우 낮은 일부 검체는 정제 절차 전에 농축해야 합니다. "프로토콜: 검체 농축", 31페이지를 참조하십시오.

시작 전 중요 사항

- 프로토콜을 시작하기 전에 "절차"(21~28페이지)를 읽어 보십시오.
- 모든 원심 분리 단계는 실온(15~25°C)에서 수행됩니다.

시작하기 전 해야 할 일

- 검체를 실온이 되도록 합니다.
- 단계 14의 용출을 위해 Buffer AVE가 실온이 되도록 합니다.
- Buffer AW1 및 Buffer AW2가 24페이지의 지침에 따라 준비되었는지 점검합니다.
- 22페이지의 지침에 따라 Buffer AVE로 재구성된 운반체 RNA를 Buffer AVL에 첨가합니다.
- VacConnector 및 VacValve를 사용하여 처리할 경우, QIAvac 24 Plus를 29페이지에 기술된 바와 같이 설정하십시오.

절차

1. 운반체 RNA가 들어 있는 560 μ l의 준비된 Buffer AVL을 용해 튜브(LT)로 피펫팅합니다. 검체 용량이 140 μ l 이상이면 Buffer AVL-운반체 RNA의 양을 그에 비례하여 증가시키고(예: 280 μ l의 검체는 1120 μ l의 Buffer AVL-운반체 RNA가 필요) 더 큰 튜브를 사용합니다.

2. 140 μ l의 혈장, 혈청, 소변, 세포 배양 상청액 또는 세포가 없는 체액을 용해 튜브(LT)의 Buffer AVL-운반체 RNA에 첨가합니다. ≥ 15 초 동안 펄스-볼텍싱하여 혼합합니다.
효율적인 용해를 위해서는 검체를 Buffer AVL과 철저히 혼합하여 균질한 용액을 얻는 것이 필수적입니다. 한 번만 해동했던 동결된 검체도 사용할 수 있습니다.
3. 실온에서 10분 \pm 1분 동안 배양합니다.
바이러스 입자 용해는 실온에서 10분 \pm 1분간 용해가 이루어진 뒤 완료됩니다.
4. 튜브를 짧게 원심 분리하여 뚜껑 안쪽에서 액체 방울을 제거합니다.
5. 검체에 560 μ l의 에탄올(96~100%)을 첨가하고, ≥ 15 초 동안 펄스-볼텍싱하여 혼합합니다. 혼합한 후 튜브를 짧게 원심 분리하여 뚜껑 안쪽에서 물방울을 제거합니다. QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드의 VacConnector에 삽입합니다.
다른 알코올은 RNA 수율과 순도를 감소시킬 수 있기 때문에 에탄올만 사용해야 합니다. 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오. 효율적인 결합을 위해서는 검체를 에탄올과 철저히 혼합하여 균질한 용액을 얻는 것이 필수적입니다. 블리스터 팩의 수거 튜브는 13단계의 원심 분리를 위해 보관할 수 있습니다.
6. 주 진공 밸브(진공 펌프와 진공 매니폴드 사이)와 스크류 캡 밸브(QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드 말단)를 닫습니다. 전원 스위치를 눌러 진공 펌프를 켭니다.
진공은 연결 시스템(사용하는 경우)에만 가해지며, 진공 매니폴드에는 가해지지 않습니다.
참고: 진공 압력의 빠르고 편리한 해제를 위해 QIAvac Connecting System 또는 Vacuum Regulator를 사용해야 합니다. "필요하지만 제공되지 않는 재료"(15페이지)를 참고하십시오.
7. 5단계의 용해물 630 μ l를 테두리에 묻지 않도록 주의하여 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 로드합니다. 피펫 팁으로 QIAamp Mini 스피ن 컬럼 막을 건드리지 마십시오.
8. 주 진공 밸브를 엽니다. 진공을 가하는 동안 QIAamp Mini 스피ن 컬럼의 뚜껑을 열어 둡니다. 모든 용해물이 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 통과한 후, 주 진공 밸브를 닫고 나사 캡 밸브를 열어서 매니폴드를 배출시킵니다. 진공이 매니폴드에서 해제된 후 스크류 캡 밸브를 닫습니다.

주 진공 밸브를 닫으면 진공은 연결 시스템(사용된 경우)에만 가해지며 진공 매니폴드에는 가해지지 않습니다. 다른 모든 QIAamp Mini 스피ن 컬럼의 VacValves가 닫혀 있음에도 불구하고 개별 검체의 용해물이 완전히 통과하지 않은 경우, QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 깨끗한 2ml 세척 튜브(WT)에 넣고 캡을 닫은 후 3분 동안 또는 용해물이 완전히 통과할 때까지 최대 속도로 원심 분리합니다. 34페이지의 스피ن 프로토콜의 단계 7~11로 계속하여 절차를 끝냅니다. 마이크로 원심 분리기 소음을 줄이기 위해 원심 분리는 약 6000 x g로 수행됩니다. 최고 속도의 원심 분리는 바이러스 RNA의 수율이나 순도에 영향을 주지 않습니다.

9. 750 µl의 Buffer AW1을 테두리에 묻지 않도록 주의하여 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 로드합니다. 피펫 팁으로 QIAamp Mini 스피ن 컬럼 막을 건드리지 마십시오.
10. 주 진공 밸브를 엽니다. 모든 Buffer AW1이 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 통과한 후, 주 진공 밸브를 닫고 나서 캡 밸브를 열어서 매니폴드를 배출시킵니다. 진공이 매니폴드에서 해제된 후 스크류 캡 밸브를 닫습니다.
11. 750 µl의 Buffer AW2를 테두리에 묻지 않도록 주의하여 QIAamp Mini 스피ن 컬럼에 로드합니다. 피펫 팁으로 QIAamp Mini 스피ن 컬럼 막을 건드리지 마십시오. 컬럼의 뚜껑을 열어 둡니다.
12. 주 진공 밸브를 엽니다. 모든 Buffer AW2가 QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 통과한 후, 주 진공 밸브를 닫고 나서 캡 밸브를 열어서 매니폴드를 배출시킵니다. 진공이 매니폴드에서 해제된 후 스크류 캡 밸브를 닫습니다.
13. QIAamp Mini 스피ن 컬럼의 뚜껑을 닫습니다. VacConnector를 진공 매니폴드에서 제거하고 폐기합니다. QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 단계 5에서 보관한 깨끗한 2 ml 세척 튜브(WT)에 넣고 1분간 최대 속도로 원심 분리하여 막을 완전히 건조시킵니다.
14. QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 깨끗한 용출 튜브(ET)에 넣습니다. 여과액이 들어 있는 수거 튜브를 폐기합니다. QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 조심스럽게 엽니다. 실온에 평형된 60 µl의 Buffer AVE를 첨가합니다. 캡을 닫고 실온에서 1분 동안 배양합니다. 약 6,000 x g로 ≥ 1분 동안 원심 분리합니다.

품질 관리

QIAGEN의 ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라 QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 대해 테스트됩니다.

제한 사항

시스템 성능은 혈장 및 혈청 검체, 세포가 없는 체액 및 세포 배양 상청액을 사용하여 바이러스 RNA의 분리에 대해 검증되었습니다.

QIAGEN 성능 연구에서 다루어지지 않았으나 실험실에서 사용되는 모든 절차에 대해 시스템 성능을 검증하는 것은 사용자의 책임입니다. 진단 결과에 부정적인 영향을 미칠 위험을 최소화하려면 다운스트림 공정에 대한 적절한 대조물질을 사용해야 합니다. 추가적인 검증을 위해서는 *ICH Q2(R1) 분석 절차 검증: 텍스트 및 방법론(ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology)*에 있는 의약품국제조화회의(International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH)의 지침이 권장됩니다.

생성된 모든 진단 결과는 다른 임상 또는 실험실 결과와 함께 해석해야 합니다.

기호

사용 설명서 또는 포장물 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다.

기호	기호 정의
	<N>회 반응에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	체외 진단용 의료 기기
	도착 시
	인도 시 개봉, QIAamp Mini 스피ن 컬럼을 2~8°C에서 보관
	카탈로그 번호
	로트 번호
	재료 번호(즉, 구성품 라벨)
	구성품
	용량
	첨가
	온도 제한
	제조업체

기호

기호 정의



사용 설명서 참조



에탄올을 병에 첨가한 후 날짜를 기록



에탄올



내용물



동결 건조됨



재구성 용액



이동



염산 구아니딘



구아니딘 티오시아네이트



국제 거래 단위 번호



수

Rn

R은 사용 설명서의 개정 버전을 나타내며,
n은 개정 번호입니다.



직사광선을 피할 것



경고/주의

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 www.qiagen.com/Support에서 기술 지원 센터를 참조하여 800-362-7737으로 전화하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체에 연락하십시오(뒷표지를 참조하거나 www.qiagen.com를 방문하시기 바랍니다).

부록

RNA 취급

리보핵산분해효소(RNase)는 매우 안정적이고 활성도 높은 효소로, 기능을 위해 일반적으로 보조 인자가 필요하지 않습니다. RNase는 비활성화하기 어려우며, 아주 적은 양으로도 RNA를 파괴할 수 있으므로 플라스틱 용기나 유리 용기를 사용하기 전에 반드시 RNase 오염을 제거해야 합니다. 정제 절차 도중 또는 이후에 RNase가 우발적으로 RNA 검체에 혼입되지 않도록 각별히 주의해야 합니다. RNase가 없는 환경을 만들고 유지하기 위해서는 RNA를 사용하여 작업하는 동안 전처리 그리고 일회용 및 비일회용 용기와 용액의 사용 중에 다음의 예방 조치를 취해야 합니다.

일반 취급

RNA를 사용하여 작업을 수행할 때는 항상 적절한 미생물학적 무균 기법을 활용해야 합니다. 손과 먼지 입자에는 박테리아와 곰팡이가 있을 수 있으며, RNase 오염의 가장 일반적인 원인입니다. 시약 및 RNA 검체를 취급할 때는 항상 라텍스나 비닐 장갑을 착용하여 피부 표면이나 먼지가 많은 실험실 장비로부터의 RNase 오염을 방지하십시오. 장갑을 자주 교체하고, 가능하면 튜브를 닫아 두십시오. 이 절차 중에 내인성 또는 잔류 RNase에 의한 RNA의 분해를 피하기 위해 신속하게 작업하십시오.

일회용 플라스틱 용기

절차 전반에 걸쳐 멸균된 일회용 폴리프로필렌 튜브를 사용하는 것이 좋습니다. 이 튜브는 일반적으로 RNase가 없으며, RNase를 비활성화하기 위해 전처리가 필요하지 않습니다.

비일회용 플라스틱 용기

비일회용 플라스틱 용기는 RNase가 없도록 사용하기 전에 처리해야 합니다. 플라스틱 용기는 0.1 M NaOH,* 1mM EDTA*에 이어서 RNase가 없는 물로 철저히 헹궈야 합니다("용액", 44페이지 참고). 또는 클로로포름 내성 플라스틱 용기는 클로로포름*으로 헹궈서 RNase를 비활성화할 수 있습니다.

유리 용기

유리 용기는 RNase가 없도록 사용하기 전에 처리해야 합니다. RNA 작업에 사용되는 유리 용기는 사용하기 전에 세제†로 세척하고 철저히 헹궈 후 >240°C의 오븐에서 4시간 이상(보다 편리한 경우에는 밤새) 베이킹해야 합니다. 오토클레이브만으로는 많은 RNase를 완전히 비활성화하지 못합니다. 오븐 베이킹은 리보핵산 가수분해효소를 비활성화합니다. 또는 유리 용기를 DEPC*(디에틸피로카보네이트)로 처리할 수도 있습니다. 유리 용기를 37°C에서 0.1% DEPC(0.1% 수용액)으로 밤새(12시간) 헹궈 후, 100°C로 15분간 오토클레이브하거나 가열하여 잔류 DEPC를 제거합니다.

참고: Corex® 튜브는 베이킹이 아닌 DEPC로 처리하여 RNase가 없도록 만들어야 합니다. 이렇게 하면 원심 분리 중에 이런 유형의 튜브 실패율이 감소됩니다.

전기영동 탱크

전기영동 탱크는 세제(예: 0.5% SDS)로 세정하고,* 물로 헹궈 후 에탄올로 건조시키고,* † 3% H₂O₂ 용액을 채워야 합니다.* 실온에서 10분 후, 전기 영동 탱크를 RNase가 없는 물로 철저히 헹궈야 합니다.

* 화학물질로 작업할 때 항상 적절한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오.

† 화학물질로 작업할 때 항상 적절한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오.

‡ 일부 전기 영동 탱크에 사용되는 플라스틱은 에탄올에 내성이 없습니다. 적절한 주의를 기울이고 공급업체의 지침을 확인하십시오.

용액

용액(물 및 기타 용액)*은 0.1% DEPC로 처리해야 합니다. DEPC는 일차 아민과 반응하며, 트리스 완충액*을 처리하는 데 직접 사용해서는 안 됩니다. DEPC는 트리스 완충액이 있을 때 매우 불안정하며, 에탄올 및 CO₂로 빠르게 분해됩니다. 트리스 완충액을 준비할 때는 먼저 물을 DEPC로 처리한 다음, 트리스를 용해시켜 적절한 완충액을 만듭니다.

DEPC는 강력하지만 RNase의 절대적 억제제는 아닙니다. DEPC는 유리 또는 플라스틱 용기의 RNase를 비활성화하거나 RNase가 없는 용액과 물을 만들기 위해 0.1%의 농도로 일반적으로 사용됩니다. DEPC는 공유 변형을 통해 RNase를 비활성화합니다. 미량의 DEPC는 카르베톡실화에 의해 RNA의 퓨린 잔기를 변형시킵니다. 카르베톡실화 RNA는 무세포 시스템에서 매우 낮은 효율로 바뀝니다. 그러나 퓨린 잔기의 상당 부분이 변경되지 않는 한 DNA:RNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 형성하는 능력은 심각하게 영향 받지 않습니다. 잔류 DEPC는 항상 15분간 오토클레이브하거나 100°C로 가열하여 용액이나 용기에서 제거해야 합니다.

0.1 ml의 DEPC를 처리할 100 ml의 용액에 첨가합니다. 격렬하게 흔들어서 DEPC를 용액으로 만들거나, 37°C에서 12시간 동안 용액을 베이킹합니다. 15분간 오토클레이브하여 미량의 DEPC를 제거합니다. 많은 증류수 공급원이 RNase 활성이 없으므로 오염 RNase의 존재 여부를 테스트하는 것이 바람직합니다.

참고: QIAamp DSP Viral RNA 완충액은 DEPC 처리로써 RNase가 없는 상태로 만들어지지 않으므로 DEPC 오염의 가능성이 없습니다.

주문 정보

제품	목적	카탈로그 번호
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit (50)	RNA 준비 50회분: QIAamp Mini 스피ن 컬럼, 운반체 RNA, Collection Tubes (2 ml), RNase 제거 완충액	61904
관련 제품		
QIAcube Connect MDx*	기기와 부품 및 공임 1년 보장	9003070
부속품		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	1~24개 스피ن 컬럼 처리용 진공 매니폴드: QIAvac 24 Plus 진공 매니폴드, 루어 플러그, 킥 커플링	19413
VacConnectors	루어 커넥터에 QIAamp 스피ن 컬럼과 함께 사용하는 500개의 일회용 커넥터	19407
Vacuum Regulator	QIAvac 매니폴드와 함께 사용	19530
Vacuum Pump	범용 Vacuum Pump	84010
VacValves	24개 밸브, QIAvac 24 및 QIAvac 24 Plus와 함께 사용	19408
QIAvac Connecting System	Vacuum Pump로 진공 매니폴드에 연결할 시스템: 트레이, 폐기물 병, 튜브, 커플링, 밸브, 게이지, 24개 VacValves	19419

제품	목적	카탈로그 번호
Rotor Adapters	240회분: 240개 1회용 로터 어댑터 및 240개 용출 튜브(1.5 ml), QIAcube와 함께 사용	990394
Rotor Adapter Holder	12개 1회용 로터 어댑터의 홀더, QIAcube와 함께 사용	990392
Sample Tubes CB	QIAcube 및 QIAcube Connect와 함께 사용하는 스커트 베이스가 없는 1,000개 원뿔형 나사 캡 튜브(2 ml)	990382
Shaker Rack Plugs	QIAcube 셰이커 랙 로드용	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	뚜껑이 없는 시약병(30 ml), 6개 팩, QIAcube와 함께 사용	990393
Filter-Tips, 1000 µl	일회용 필터 팁, 랙형, (8 x 128). QIAcube와 함께 사용	990352

* QIAcube Connect MDx가 모든 국가에 제공되지는 않습니다. 추가적인 정보는 QIAGEN 기술 서비스에 문의하십시오.

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용 설명서는 www.qiagen.com에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

문서 개정 이력

개정판	설명
R6, 01/2021	<p>업데이트된 섹션: "QIAcube/QIAcube Connect MDx에서의 바이러스 RNA 자동 정제", "필요하지만 제공되지 않는 재료", "경고 및 예방 조치", "프로토콜: 마이크로 원심분리기 또는 QIAcube/QIAcube Connect MDx를 사용하여 바이러스 RNA 정제", "기호" 및 "주문 정보" 섹션.</p> <p>"참조" 섹션 삭제.</p> <p>새로운 그림 삽입(QIAcube Connect MDx 이미지)</p> <p>QIAcube Connect MDx 및 그 부속품에 대한 언급 추가.</p> <p>편집 및 레이아웃 변경.</p>

이 페이지는 빈 페이지입니다.

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit의 제한적 라이선스 계약

본 제품을 사용하는 것은 제품의 구매자 또는 사용자가 다음의 조건에 동의함을 나타냅니다.

1. 이 제품은 오직 제품과 함께 제공된 프로토콜과 이 안내서에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품만 함께 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 제품과 함께 제공된 프로토콜, 이 안내서 및 www.qiagen.com에서 제공하는 추가 프로토콜에 기술된 바와 같은 경우를 제외하고, 그의 지적 재산권 하에서 이 패널에 포함된 구성품을 이 패널에 포함되지 않은 구성품과 함께 사용하거나 통합할 수 있는 라이선스를 허여하지 않습니다. QIAGEN 사용자를 위해 QIAGEN 사용자가 이 추가 프로토콜의 일부를 제공하였습니다. QIAGEN에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN은 이를 보장하지 않으며 제3자의 권한을 침해하지 않는다는 것도 보증하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN은 이 패널 및/또는 이 패널의 사용이 제3자의 권리를 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 이 패널 및 구성품은 일회 사용에 대해 라이선스가 허여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
5. 패널의 구매자 및 사용자는 위에서 금지한 행위로 이어지거나 그러한 행위를 조장할 수 있는 조치를 취하거나 다른 사람이 그렇게 하도록 허용하지 않는다는 데 동의합니다. QIAGEN은 어떤 법정에서든 이 제한적 라이선스 계약의 금지를 주장할 수 있으며, 패널 및/또는 그것의 구성품과 관련된 이 제한적 라이선스 계약 또는 그것의 지적재산권을 주장하기 위한 어떤 소송에서 변호사 비용을 포함하여 그의 모든 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트에 대해서는 www.qiagen.com을 참조하십시오.

상표: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®(QIAGEN 그룹), Correx®(Corning, Inc.), Tween®(ICI Americas Inc.), UltraFree®(Millipore Corporation), Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

01/2021 HB-0418-008 1122786 © 2021 QIAGEN, 모든 권한 보유.

주문 www.qiagen.com/shop | 기술 지원 support.qiagen.com | 웹사이트 www.qiagen.com