

2018년 8월

QIAamp[®] DSP Virus 키트 안내서



QIAamp DSP Virus 키트는 QIAamp 기술을 이용하여 시험관 진단 시 바이러스 핵산을 인체 혈장 또는 혈청 검체로부터 분리 및 정화하는 시스템입니다.

시험관 내 진단용

IVD

CE

REF

60704

i

1114514KO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

EC REP



R3 MAT

1024585

목차

| | |
|---------------------------------------|----|
| 키트 내용물..... | 4 |
| 기호 | 5 |
| 보관법 | 6 |
| 정도 관리..... | 6 |
| 용도 | 6 |
| 사용 제한..... | 7 |
| 경고 및 예방조치 | 7 |
| 소개 | 9 |
| 원리 및 절차 | 12 |
| 사용자가 준비해야 하는 장비 및 시약 | 15 |
| 중요 참고 사항 | 16 |
| 시작 전 중요 사항..... | 16 |
| RNA 준비 | 16 |
| 검체 보관..... | 17 |
| 시약 및 완충액 준비..... | 17 |
| 바이러스 핵산을 용리합니다..... | 19 |
| 바이러스 핵산의 수율 및 품질..... | 20 |
| QIAvac 24 Plus 진공 시스템 준비..... | 20 |
| 프로토콜: 혈장 및 혈청에서 바이러스 핵산 분리 및 정화 | 23 |
| 개정 이력..... | 27 |

키트 내용물

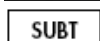
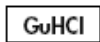
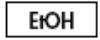
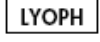
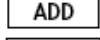
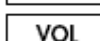
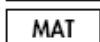
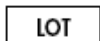
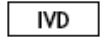
| QIAamp DSP Virus Kit | | | | 60704 | |
|----------------------|---|---|-------|----------|-------|
| 카탈로그 번호 | | | | 50 | |
| 준비 수 | | | | 50 | |
| QIAamp MinElute® | QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute 컬럼(세척 튜브 (WT, 2 ml) 포함)) | COL | | 50 | |
| EXT | Column Extenders (컬럼 확장기)(3 ml) | COL | EXT | 50 | |
| ET | Elution Tubes (용리 튜브)(1.5 ml) | ELU | TUBE | 50 | |
| VC | VacConnectors (백커넥터) | VAC | CON | 50 | |
| LT | Lysis Tubes (분리 튜브)(2 ml) | LYS | TUBE | 50 | |
| WT | Wash Tubes (세척 튜브)(2 ml) | WASH | TUBE | 50 | |
| AL | Lysis Buffer (분리 완충액)* | LYS | BUF | 33 ml | |
| AW1 | Wash Buffer 1 (concentrate) (세척 완충액 1(농축액))* | WASH | BUF 1 | CON | 19 ml |
| AW2 | Wash Buffer 2 (concentrate) (세척 완충액 2(농축액))† | WASH | BUF 2 | CON | 13 ml |
| AVE | Elution Buffer (purple caps) (용리 완충액 (보라색 캡))‡ | ELU | BUF | 4 x 2 ml | |
| PS | Protease Solvent (단백질분해효소 용액)‡ | QPROT | SOLV | 4.4 ml | |
| Carrier(운반체) | Carrier RNA (red caps) (운반체 RNA(빨간색 캡)) | CAR | RNA | 310 | |
| QP | QIAGEN® Protease (QIAGEN® 단백질분해효소) | QPROT | | 바이알 1 개 | |
| | CD |  | | 1 | |
| | 안내서 |  | | 1 | |

* 구아니딘염산이 함유되어 있습니다. 표백제를 포함하는 살균제와 같이 사용할 수 없습니다. 안전 정보는 7 페이지를 참조하십시오.

† 방부제 역할을 하는 아지드화나트륨을 함유하고 있습니다.

‡ 재부유량 4.4 ml.

기호



본 키트에는 50 개의 검체를 준비할 수 있는 시약이 있습니다.

본 안내서에 명시된 정보를 참고하십시오.

대상 사용자:

시험관 내 진단용 의료 기구

카탈로그 번호

로트 번호

재료 번호

구성품

용적

온도 제한

도착 즉시

법적인 제조업체

중요 참고 사항

이 표시가 있으면 프로토콜 단계를 수행한 후 장갑을 교체하십시오.

제품을 전달받는 즉시 개봉하여 QIAamp 미니 스피ن 컬럼을 2-8°C 에서 보관하십시오.

국제 거래 단위 번호

병에 에탄올을 첨가한 후 현재 일자를 기록하십시오.

추가

함유함

동결건조됨

재구성 요망

에탄올

구아니딘염산

말레산

서브틸리신

다음 단계

보관법

QIAamp MinElute 컬럼은 도착하자마자 2-8°C 에서 보관해야 합니다.

완충액은 모두 실온(15-25°C)에 보관할 수 있습니다.

동결건조된 운반체 RNA 는 유효기간 중에 실온에서 보관할 수 있습니다. 운반체 RNA 는 용리 완충액(AVE)으로만 용해할 수 있으며 용해된 후에는 즉시 17 페이지의 설명에 따라 분리 완충액(AL)에 첨가해야 합니다. 이 용액은 신선한 상태로 준비하고 2-8°C 에서 48 시간까지 안정성을 유지합니다. 용리 완충액(AVE)으로 용해시킨 운반체 RNA 중 사용 후 남은 것은 -20°C 에서 부분 동결시켜야 합니다.

동결건조된 QIAGEN 단백질분해효소(QP)는 유효기간 중에 실온에서 보관해도 기능을 그대로 유지합니다.

재구성된 QIAGEN 단백질분해효소(QP)는 2-8°C 에서 보관할 시 최대 1 년간 안정성을 유지하지만 유효기간을 준수해야 합니다.

재구성된 세척 완충액 1(AW1) 및 세척 완충액 2(AW2)는 실온에서 보관할 시 최대 1 년간 안정성을 유지하지만 유효기간을 준수해야 합니다.

정도 관리

QIAGEN 의 인증받은 전체 품질 관리 시스템에 따라, QIAamp DSP Virus 키트의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 대해 검사됩니다.

용도

QIAamp DSP Virus 키트는 QIAamp 기술을 이용하여 시험관 진단 시 바이러스 핵산을 인체 혈장 또는 혈청 검체로부터 분리 및 정화하는 시스템입니다. 검체 준비 절차 및 하향 진단 NAT 분석을 통해 얻은 진단 결과는 다른 임상 또는 연구 결과와 함께 해석해야 합니다.

본 제품은 분자생물학 기법 교육을 받은 전문 기술자 및 의사와 같은 전문가가 사용해야 합니다. 또한 효소 기반 확장이나 기타 효소 기반 DNA 또는 RNA 수정 후 신호 감지 또는 확장을 이용하는 하향 용도에서 사용하도록 설계되었습니다. 분리된 바이러스 핵산은 정성적(혈액 검사) 및 정성적(바이러스 부하 모니터링) 진단 NAT 분석항목에서 사용할 수 있습니다.

본 제품은 진단 결과의 불규칙성을 최소화하기 위해 사용하는 하향 분석항목에 따라 검체 준비 및 검체 확장 및 감지 과정 전체적으로 내부 대조군 뿐 아니라 양/음성 대조군과 함께 사용하도록 되어 있습니다.

또한 QIAvac 24 Plus 또는 그에 해당하는 진공 시스템과 함께 사용할 수 있습니다.

사용 제한

본 키트는 혈액, 조직, 골수 또는 배양된 세포와 사용할 수 없습니다. 또한 본 키트는 박테리아, 곰팡이, 기생충 핵산의 분리 및 정화에 사용할 수 없습니다. 소변 및 CSF 와 같은 다른 무세포 체액으로부터 바이러스 핵산을 분리하는 본 키트의 성능은 평가된 바가 없습니다.

경고 및 예방조치

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용합니다. 자세한 정보는 적절한 안전 보건 자료(safety data sheets, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.qiagen.com/safety 에서 편리하고 용량이 작은 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 구성품에 대한 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

주의: 검체 준비 과정의 폐기물에 표백제나 산성용액을 직접 가하지 마십시오.

분리 완충액(AL) 및 세척 완충액 1(AW1)에는 구아니딘염산이 함유되어 있으며 이는 표백제와 섞었을 때 매우 반응력이 강한 화합물을 형성할 수 있습니다. 이들 완충액을 포함하는 액체를 흘린 경우 적절한 실험실 세제 및 물로 닦아내십시오. 흘린 액체에 감염체가 포함될 가능성이 있으면 해당 부분을 우선 실험실 세제 및 물로 세척한 다음 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨으로 세척하십시오.

완충액 병이 손상되거나 내용물이 새는 경우 장갑과 보호용 고글을 착용하고 병을 처리하여 본인 또는 타인이 부상을 입지 않도록 주의하십시오.

QIAGEN 은 QIAamp DSP Virus 절차에 따라 생성된 액체 폐기물에 대해 잔여 오염성 물질의 존재 여부를 시험한 바가 없습니다. 이러한 액체 폐기물이 잔여 오염성 물질로 오염되었을 가능성은 매우 낮지만 완전히 배제할 수는 없습니다. 그러므로 이 액체 폐기물은 반드시 감염성으로 간주하고 현지 안전 규정에 따라 처리 및 폐기해 주십시오.

다음의 위험 및 예방조치 관련 진술은 QIAamp DSP Virus 키트의 구성요소에 적용됩니다.

완충액 AL



구아니딘염산 및 말레산이 함유되어 있습니다. 경고! 삼키거나 흡입하면 해로울 수 있습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 안구 자극을 일으킵니다. 알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있습니다. 안구 자극이 지속되는 경우: 의사의 진찰/치료를 받습니다. 오염된 의복을 벗고 재사용 전에 세탁합니다. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다.

완충액 AW1



구아니딘염산이 함유되어 있습니다. 경고! 삼키거나 흡입하면 해로울 수 있습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 안구 자극을 일으킵니다. 몸에 이상을 느낄 시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다. 오염된 의복을 벗고 재사용 전에 세탁합니다. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다.

QIAGEN 단백질분해효소



내용물: 서브틸리신 위험! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 안구 자극을 일으킵니다. 흡입 시 알러지 또는 천식 증상이나 호흡에 어려움을 초래할 수 있습니다. 먼지/분진/가스/박무/증기/스프레이를 흡입하지 않도록 주의하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다. 호흡기 이상을 느끼는 경우: POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다. 눈에 묻은 경우: 물로 몇분 동안 주의하여 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 흡입한 경우: 흡입한 자가 호흡에 어려움을 느끼는 경우 야외나 환기가 잘 되는 곳으로 이동시켜 편안한 자세로 휴식을 취하도록 합니다. 즉시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다. 호흡기 보호 장비를 착용하십시오.

소개

QIAamp DSP Virus 키트에는 바이러스 DNA 및 RNA의 동시 분리 및 정화가 가능한 것으로 입증된 우수한 기술이 적용되어 있습니다. QIAamp DSP Virus 절차는 실리카 기반 멤브레인의 선택적 구속 특성과 20 또는 60 µl의 용리 분량을 함께 이용합니다.

QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위는 여러 하향 진단 분석법에서 HIV RNA 및 HBV DNA에 대해 파악되었습니다(표 1, 그림 1 및 그림 2).

표 1.- QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위를 시험한 하향 진단 분석법

| 분석항목 | 키트 |
|---------------------|--|
| HIV RNA의 실시간 RT-PCR | TaqMan® 분석항목 및 cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® 시험 |
| HBV DNA의 실시간 PCR | TaqMan 분석항목 및 cobas AMPLICOR HBV MONITOR® 시험 |

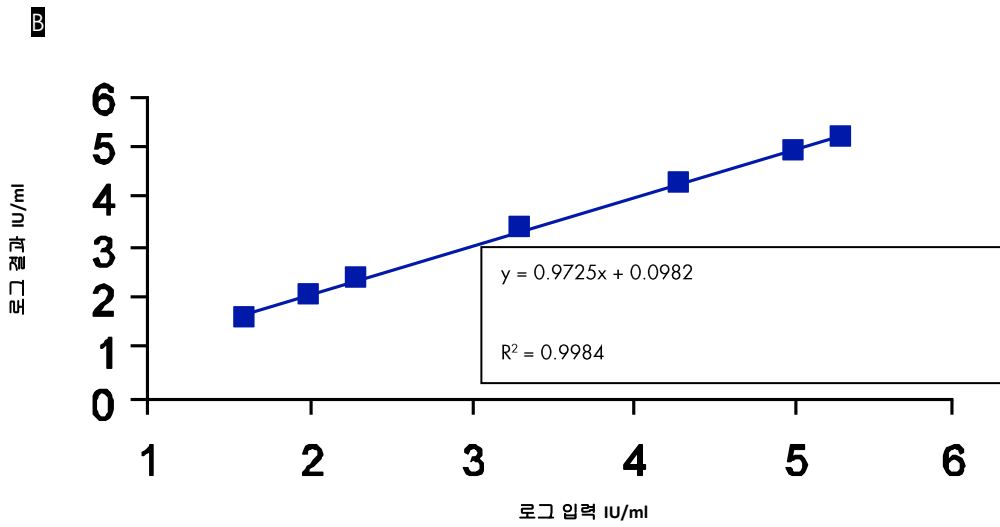
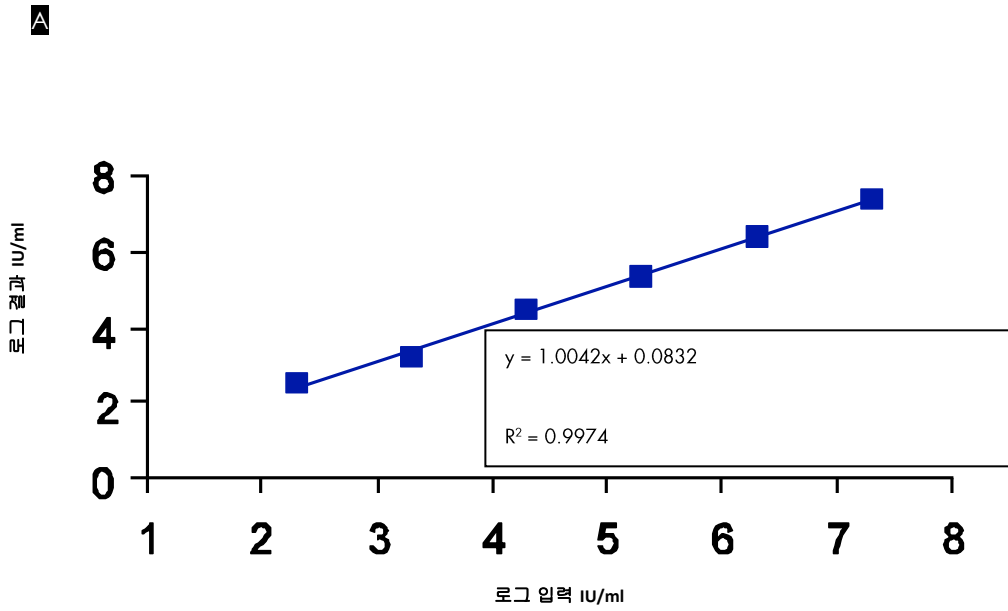


그림 1. TaqMan 분석을 이용한 QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위. 60 µl의 용리양에서 QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위는 **A** HIV RNA 및 **B** HBV DNA에 대해 TaqMan 분석을 이용하여 확인되었습니다.

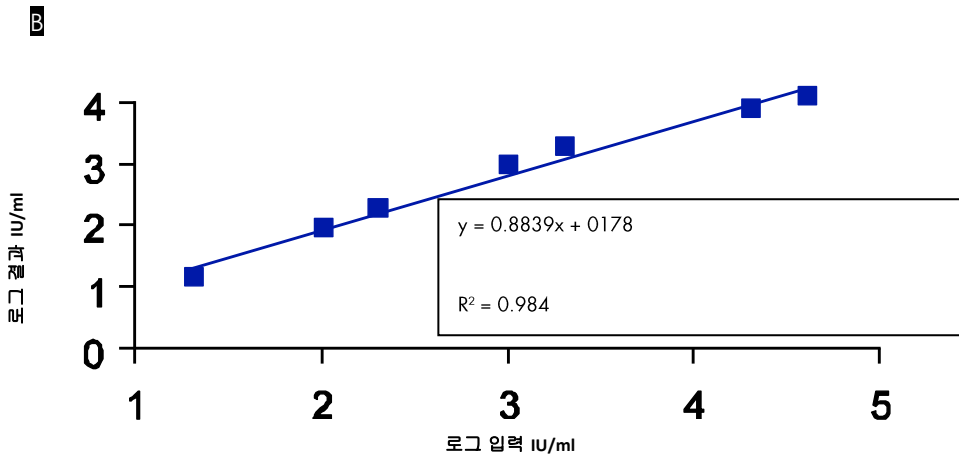
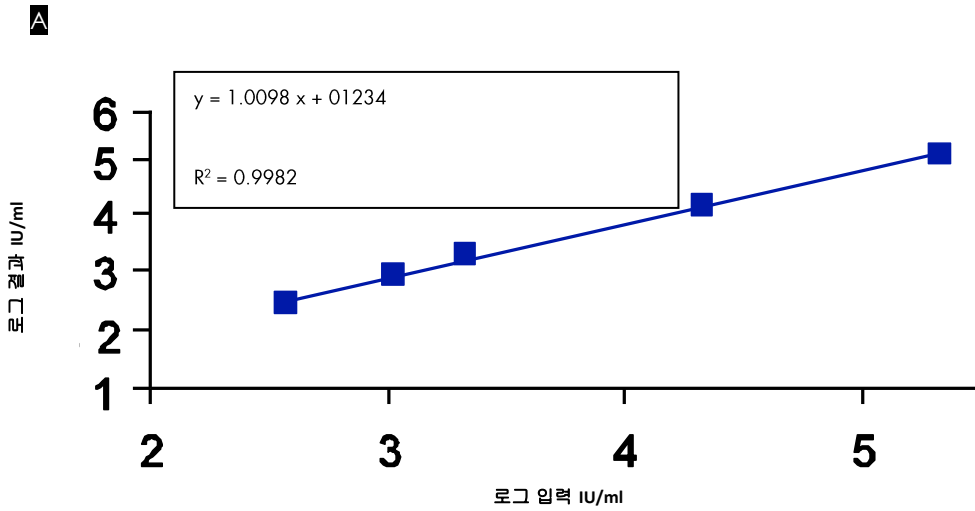


그림 2. cobas AMPLICOR MONITOR 시험을 이용한 QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위. 60 µl의 용리양에서 QIAamp DSP Virus 절차의 선형적 범위는 **A** HIV RNA 및 **B** HBV DNA에 대해 AMPLICOR MONITOR 시험을 이용하여 확인되었습니다.

이 절차는 구연산염 또는 EDTA를 함유한 혈청 또는 혈청과 함께 사용하는 데 적합합니다. 검체가 여러 번 동결-해동되지 않았다면 신선한 상태이거나 동결건조되거나 또는 냉동 상태일 수 있습니다. 본 절차를 통해 바이러스 RNA 및 DNA를 다양한 RNA 및 DNA 바이러스로부터 분리할 수 있습니다. 또한 이 절차로 검체 간 교차 오염을 방지하고 감염이 발생할 수 있는 검체를 안전하게 처리할 수 있습니다. 그 외에도 다중 검체를 동시에 처리하는 데 있어 매우

적합합니다. 바이러스 핵산을 확장 반응에서 바로 사용하거나 -20°C 에서 저장할 수 있도록 용리 완충액(AVE)으로 용리합니다.

원리 및 절차

QIAamp DSP Virus 절차는 다음과 같은 4 단계로 구성되어 있습니다:

- 검체 내 바이러스 입자를 용균시킵니다.
- 용해물 내 바이러스 핵산을 QIAamp MinElute 컬럼의 멤브레인에 고정시킵니다.
- 멤브레인을 세척합니다.
- 멤브레인에서 바이러스 핵산을 용리합니다.

이 절차는 진공 매니폴드에서 QIAamp MinElute 컬럼을 이용하여 실시합니다.

검체 분량

다양한 하향 진단 분석법(표 2 및 표 3)을 이용하여 QIAamp DSP Virus 절차에 대한 ICH 지침 2QA 및 2QB 에 따른 검출 한계(detection limit, DL)와 정량화 한계(quantification limit, QL)를 확인한 바 있습니다(500 µl 의 시작 검체량 및 20/60 µl 의 용리량).

표 2.- QIAamp DSP Virus 절차의 검출 한계

| 분석항목 | 용리량 | 95% 컷오프 |
|-------------------------|-------|---------------------|
| artus® RealArt™ HBV DNA | 20 µl | 2.31 IU/ml (n=240) |
| artus RealArt HCV RNA | 20 µl | 24.31 IU/ml (n=192) |
| AMPLICOR manual HIV RNA | 60 µl | 90.92 IU/ml (n=209) |
| TaqMan HBV DNA | 60 µl | 4.73 IU/ml (n=192) |

표 3.- QIAamp DSP Virus 절차의 정량화 한계

| 분석항목 | QL | CV |
|-------------------------|-----------|--------------|
| TaqMan HBV DNA | 5.7 IU/ml | < 70% (n=88) |
| TaqMan HIV RNA | 52 IU/ml | < 60% (n=88) |
| cobas AMPLICOR HIV RNA | 100 IU/ml | < 60% (n=88) |
| cobas AMPLICOR HBV DNA | 30 IU/ml | < 60% (n=88) |
| cobas AMPLICOR HCV RNA® | 700 IU/ml | < 60% (n=66) |

바이러스 입자의 분리

검체를 고온 및 변성 조건에서 분리합니다. 분리는 QIAGEN 단백질분해효소 (QP) 및 분리 완충액(AI)을 사용하여 실시하며 이 둘은 함께 RNase를 비활성화합니다.

핵산을 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 고정시킵니다.

QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 대한 바이러스 DNA 및 RNA의 고정을 최적화하기 위해 먼저 에탄올을 용해물에 첨가합니다. 그리고 각 용해물을 QIAamp MinElute 컬럼에 넣으면 용해물이 진공 압력에 의해 이동하면서 바이러스 핵산이 실리카겔 멤브레인에 흡수됩니다.

잔여 오염물질을 제거합니다.

바이러스 핵산이 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 고정된 상태에서도 세척 완충액 1(AW1), 세척 완충액 2(AW2) 및 에탄올 순서로 세척하여 오염물질을 제거할 수 있습니다.

순수 핵산을 용리합니다.

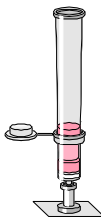
용리 완충액(AVE)을 이용하여 바이러스 핵산을 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인으로부터 용리합니다. QIAamp MinElute 컬럼은 20 또는 60 µl를 용리할 수 있습니다.

사용하는 하향 분석법에 따라 핵산 용출물은 억제 효과가 전혀 발생하지 않고 최대 50%의 반응량으로 구성될 수 있습니다.

검체

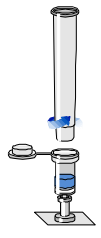


용균



고정

진공



세척
(AW1)

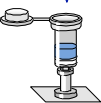
진공을 가하기
전에 EXT 를
분리하십시오.

진공



세척
(AW2)

진공



세척
(에탄올)

진공



회전 건조

용출



바이러스 핵산

시작하기 전에 프로토콜(23 페이지)의 내용을 숙지하십시오.

LT 에 75 µl 의 QP, 500 µl 의 검체, 500 µl 의 AL 을 넣습니다.

15 초간 교반합니다.

15 분간(±1 분) 56°C (±1°C)에서 배양합니다.

600 µl 의 에탄올을 넣습니다.

15 초간 교반합니다.

5 분간(±1 분) 실온(15-25°C)에서 배양합니다.

부착된 EXT 로 용해물을 QIAamp MinElute 컬럼으로 옮깁니다.

600 µl 의 재구성된 AW1 을 추가하십시오.

EXT 를 분리합니다.

700 µl 의 재구성된 AW2 를 추가하십시오.

750 µl 의 에탄올을 넣습니다.

QIAamp MinElute 컬럼을 WT 에 넣습니다.

14,000 rpm 에서 1 분간 원심분리합니다.

QIAamp MinElute 컬럼을 WT 에 넣습니다.

56°C 에서 3 분간 배양합니다.

QIAamp MinElute 컬럼을 ET 에 넣습니다.

20 µl 또는 60 µl 의 AVE 를 추가하십시오.

3 분간 실온에서 배양합니다.

14,000 rpm 에서 1 분간 원심분리합니다.

사용자가 준비해야 하는 장비 및 시약

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용합니다. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전 보건 자료(SDS)를 참조하십시오.

- 에탄올(96–100%)
- 피펫*과 피펫 팁(교차 오염을 방지하기 위해 분사막이 있는 피펫 팁을 사용할 것을 강력히 권장합니다)
- 일회용 장갑
- 56°C 에서 검체를 분리하기 위한 가열 블록*(당사는 2.0 ml 마이크로 시험 튜브용† 서모블록과 Eppendorf® 서모믹서 컴포트를 사용할 것을 권장합니다)
- 마이크로 원심분리기*
- 측정 실린더(50 ml)
- 교반기
- QIAvac 24 Plus 진공 시스템‡(QIAvac 24 Plus, 카탈로그 번호 19413, QIAvac 연결 시스템, 카탈로그 번호 19419, 진공 펌프, 카탈로그 번호 84020§) 또는 이에 준하는 일반 실험실용 진공 시스템

* QIAamp DSP Virus 절차를 이용하여 검체를 적절히 처리할 수 있도록 당사는 피펫 및 가열 블록과 같은 장비를 제조사의 권장사항에 따라 조절/보정할 것을 강력히 권장합니다.


† 이는 공급업체의 모든 목록이 아니며, 생물학 물품을 공급하는 주요 판매사들도 다수 포함되지 않았습니다.

‡ 2004 년 중반에 출시되며 자세한 사항은 다음 사이트를 참고하십시오: www.qiagen.com/products/accessories.

§ 카탈로그 번호 84020 은 독일 등 유럽 국가에 적합한 펌프를 가리킵니다. 전압 또는 플러그 등 요건이 다른 국가의 경우 QIAGEN 기술 서비스 부서에 문의해 주십시오.

중요 참고 사항

시작 전 중요 사항

- 키트를 수령한 후 구성요소가 손상되었는지 확인하십시오. 블리스터팩 또는 완충액 병이 손상된 경우 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통사에 연락하십시오. 액체가 누출된 경우 “경고 및 예방조치”(7 페이지)를 참고하십시오.
- 손상된 키트 구성요소는 성능이 저하되므로 사용하지 마십시오.
- 항상 RNase 가 없는 장비를 사용하십시오.
- 절차 중에는 에탄올(96-100%)을 얼음으로 보관하십시오.
- 액체를 옮기고 다음 액체를 옮기기 전에 반드시 피펫 팁을 교체하십시오. 당사는 교차 오염을 방지하기 위해 분사막이 있는 피펫 팁을 사용할 것을 강력히 권장합니다.
- 원심분리기를 사용하는 단계는 모두 실온(15-25°C)에서 실시합니다.
- 항상 일회용 장갑을 사용하고 검체 물질이 묻지 않았는지 규칙적으로 확인하십시오.
- 장갑 기호  에 따른 장갑을 사용하고 오염되면 즉시 폐기하십시오.
- 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 1 개의 튜브만 개봉하십시오.
- 특히 로트 번호가 다를 경우 사용하는 키트가 아닌 다른 키트의 구성요소를 사용하지 마십시오.
- 키트 시약이 미생물로 오염되지 않도록 주의하십시오.
- 오염성 물질로부터 안전을 기할 수 있도록 당사는 검체를 용균할 시까지 환기가 잘 되는 곳에서 작업하실 것을 권장합니다.
- 본 키트는 바이러스 진단법을 교육받았을 시에만 사용할 수 있습니다.
- 본 절차는 단일 혈장 또는 혈청 검체를 처리하는 방법을 명시합니다. 다만 QIAvac 24 Plus 진공 시스템을 사용하면 동시에 최대 24 개의 검체를 처리할 수 있습니다.

RNA 준비

바이러스 RNA 를 준비할 시에는 신속하게 작업하십시오.

용리 완충액(AVE)에는 RNase 생산 유기체의 증식을 방지하는 항균제인 아지드화나트륨*이 함유되어 있습니다. 그러나, 이 완충액은 RNase 를 분해하는 어떠한 화학물질도 포함하지 않으므로, 부적절한 처리로 유입되는 RNase 를 적극적으로 억제하지는 않습니다. 용리 완충액(AVE)을 다룰 시에는 RNase 오염을 피하기 위해 매우 주의해야 합니다.

* 화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용합니다.

검체 보관

혈장 또는 혈청 검체는 채취 및 원심분리 후 2-8°C 에서 최대 6 시간 동안 보관할 수 있습니다. 더 오래 보관하려면 -20°C 또는 -80°C 에서 부분 동결하십시오. 동결된 혈장이나 혈청을 여러 번 해동해서는 안됩니다. 여러 번 동결-해동할 시 단백질의 변성 및 침전으로 이어질 수 있고 적정 농도의 감소를 야기하여 바이러스 핵산의 수율 감소로 이어집니다. 또한 동결-해동 중에 형성된 동결침전물로 인해 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인이 막히게 됩니다. 동결침전물이 육안으로 확인될 시에는 원심분리기로 3 분간 약 6800 x g 에서 입자화해야 합니다. 이렇게 깨끗해진 상청액은 입자를 움직이지 않도록 하고 즉시 흡입 및 처리해야 합니다.

시약 및 완충액 준비

QIAGEN 단백질분해효소 준비

4.4 ml 단백질분해효소 용액(PS)이 들어있는 바이알의 내용물을 동결된 QIAGEN 단백질분해효소(QP)의 바이알에 넣고 부드럽게 혼합하십시오. 거품이 생기지 않도록 바이알을 여러 번 뒤집어서 혼합하십시오. QIAGEN 단백질분해효소(QP)가 완전히 용해되어야 합니다.



QIAGEN 단백질분해효소(QP)를 분리 완충액(AL)에 직접 넣지 마십시오.

운반체 RNA 및 내부 대조군을 용균 완충액에 넣습니다.

운반체 RNA 는 다음과 같은 2 가지 작용을 합니다. 먼저 특히 검체에 목표 분자가 매우 적을 시 바이러스 핵산과 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인 간의 고정력을 강화시켜 줍니다. 두 번째로 대량의 운반체 RNA 를 넣으면 용균 완충액의 chaotropic salt 및 세척제에 의하여 RNase 가 변성되지 않는 매우 드문 경우에도 바이러스 RNA 가 열화될 가능성을 줄입니다. 운반체 RNA 를 용균 완충액에 넣지 않을 시 본 절차에서 얻게 되는 바이러스 RNA 및 DNA 의 양이 줄어들 수 있습니다.

또한 상용 하향 분석법의 내부 대조군 시약에도 운반체 RNA 가 들어있을 수 있습니다. 이러한 경우 해당 하향 분석법의 제조사가 제공하는 관련 사용법을 확인하십시오.

QIAamp DSP Virus 키트와 진단 확장 시스템을 함께 사용할 시에는 내부 대조군을 이용하는 것이 좋습니다. 내부 대조군 RNA 또는 DNA 및 재구성된 운반체 RNA 를 용균 완충액에 첨가하여 튜브를 10 번 뒤집어서 완전히 섞어야 합니다. 거품이 생기지 않게 하려면 교반하지 마십시오.

제조사의 지침을 참고하여 내부 대조군의 최적 농도를 결정하십시오. 농도가 권장값을 벗어날 시 결과가 부정확할 수 있습니다. 사용할 내부 대조군의 양을 정확히 계산하기 위해 검체의 시작

분량 및 용리량을 고려하십시오. QIAamp DSP Virus 키트의 시작 분량은 500 µl 임을 명심하십시오.

운반체 RNA 용액을 준비하기 위해 310 µl의 완충액 AVE를 310 µg의 동결건조된 운반체 RNA를 포함하는 튜브에 추가하여 1 µg/µl의 용액을 만드십시오. 운반체 RNA를 완전히 용해시키고 알맞은 크기로 분리한 다음 -20°C에서 보관하되 이 분리한 운반체 RNA를 3번 이상 동결-해동하지 마십시오.

참고로 운반체 RNA는 분리 완충액(AL)에서 녹지 않습니다. 먼저 용리 완충액(AVE)으로 용해한 후 분리 완충액(AL)에 넣으십시오. 운반체 RNA를 분리 완충액(AL)에 넣기 전에 정확한 분량의 용리 완충액(AVE)으로 완전히 용해되었는지 확인하십시오.

i 항상 하향 분석법에 적합한 내부 대조군을 사용하십시오. 자세한 정보는 제조사의 설명서를 참고하십시오.

표 4 으로부터 동시에 처리할 검체의 수를 결정하여 배치별로 필요한 분리 완충액(AL)/운반체 RNA 혼합물의 양을 계산하십시오. 다음과 같은 검체 계산식으로 파악하십시오.

$$n \times 0.55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11.2 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

여기서, n = 동시 처리할 검체의 수

y = 계산한 분리 완충액(AL)

z = 분리 완충액(AL)에 넣을 용리 완충액(AVE)/운반체 RNA의 양

표 4.- QIAamp DSP Virus 절차에 필요한 분리 완충액(AL) 및 용리 완충액(AVE)/운반체 RNA의 양

| 검체 수 | AL의 양(ml) | 운반체 RNA/AVE의 양(µl) | 검체 수 | AL의 양(ml) | 운반체 RNA/AVE의 양(µl) |
|------|-----------|--------------------|------|-----------|--------------------|
| 1 | 0.55 | 6.2 | 13 | 7.15 | 80.0 |
| 2 | 1.10 | 12.3 | 14 | 7.70 | 86.0 |
| 3 | 1.65 | 18.5 | 15 | 8.25 | 92.4 |
| 4 | 2.20 | 24.6 | 16 | 8.80 | 98.6 |
| 5 | 2.75 | 30.8 | 17 | 9.35 | 104.7 |
| 6 | 3.30 | 37.0 | 18 | 9.90 | 110.9 |
| 7 | 3.85 | 43.1 | 19 | 10.45 | 117.0 |
| 8 | 4.40 | 49.3 | 20 | 11.00 | 123.2 |
| 9 | 4.95 | 55.0 | 21 | 11.55 | 129.4 |
| 10 | 5.50 | 61.6 | 22 | 12.10 | 135.5 |

| 검체 수 | AL의 양(ml) | 운반체 RNA/AVE의 양(μl) | 검체 수 | AL의 양(ml) | 운반체 RNA/AVE의 양(μl) |
|------|-----------|--------------------|------|-----------|--------------------|
| 11 | 6.05 | 67.8 | 23 | 12.65 | 141.7 |
| 12 | 6.60 | 73.9 | 24 | 13.20 | 147.8 |

세척 완충액 1 준비

측정 실린더를 사용하여 에탄올(96–100%) 25 ml를 19 ml의 세척 완충액 1(AW1) 농축액이 들어있는 병에 넣습니다. 재구성된 세척 완충액 1(AW1)을 실온(15–25°C)에서 보관하십시오.

i 항상 절차를 시작하기 전에 재구성된 세척 완충액 1(AW1)이 든 병을 여러 번 뒤집어서 섞으십시오.

세척 완충액 2 준비

측정 실린더를 사용하여 에탄올(96–100%) 30 ml를 13 ml의 세척 완충액 2(AW2) 농축액이 들어있는 병에 넣습니다. 재구성된 세척 완충액 2(AW2)를 실온(15–25°C)에서 보관하십시오.

i 항상 절차를 시작하기 전에 재구성된 세척 완충액 2(AW2)가 든 병을 여러 번 뒤집어서 섞으십시오.

용리 완충액 준비

본 키트에는 용리 완충액(AVE) 튜브 4 개가 제공됩니다. 완충액이 RNase로 오염되지 않도록 주의하십시오. 1 개의 키트로 4 회 이하의 정화 절차를 실시하는 경우 각 절차가 완료될 때마다 용리 완충액(AVE) 튜브를 폐기하는 것이 좋습니다.

바이러스 핵산을 용리합니다.

시작 분량이 적어야 하는 하향 애플리케이션의 경우(일부 PCR 및 RT-PCR 분석법 등) 20 μl의 용리 완충액(AVE)으로 용리한 바이러스 핵산을 사용하면 분석항목의 민감도가 높아질 수 있습니다.

QIAamp MinElute Column 에서 용리한 바이러스 핵산의 양은 컬럼에 적용된 용리 완충액(AVE)의 양보다 최대 5 μl가 적을 수 있습니다. 예를 들어 60 μl의 용리 완충액(AVE)으로 바이러스 핵산을 용리하면 약 55 μl의 용출액이 발생하며 20 μl로 용리할 시 약 15 μl의 용출액이 발생합니다.

용출액의 양은 검체의 성격에 따라 달라집니다. 용출액의 양이 하향 분석항목에 사용하기에 너무 적을 시에는 용리 완충액을 추가하여 양을 늘리십시오.

용리된 바이러스 핵산을 용리 튜브(ET)에 채취하십시오. 바이러스 핵산은 2-8°C 에서 최대 24 시간까지 보관할 수 있습니다.

바이러스 핵산의 수율 및 품질

분리된 바이러스 핵산의 수율 및 품질은 진단분자생물학의 모든 하향 검출 절차에서 사용할 수 있습니다. 진단 분석항목은 제조사의 설명에 따라 실시해야 합니다.

QIAvac 24 Plus 진공 시스템 준비

컬럼 확장기(EXT), QIAamp MinElute 컬럼, 백커넥터(VC) 및 백밸브를 정확히 설정해야 합니다(그림 3 참고).

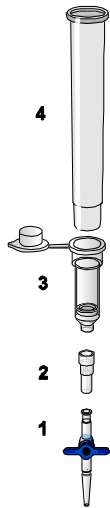


그림 3. 검체 진공 처리를 위한 QIAamp DSP Virus 키트 구성요소 조립:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1: 백밸브(진공 시스템과 함께 제공) | 3: QIAamp MinElute 컬럼 |
| 2: 백커넥터(VC) | 4: 컬럼 확장기(EXT) |

당사는 그림 4의 방식에 따라 QIAvac 24 Plus 진공 시스템에 사용 시 검체가 섞이지 않기 위해 분리 튜브(LT), 용리 튜브(ET), QIAamp MinElute 컬럼에 라벨을 부착할 것을 권장합니다. 이 그림을 복사하여 검체명과 함께 라벨에 부착할 수 있습니다.

날짜: _____

사용자: _____

실행 ID: _____

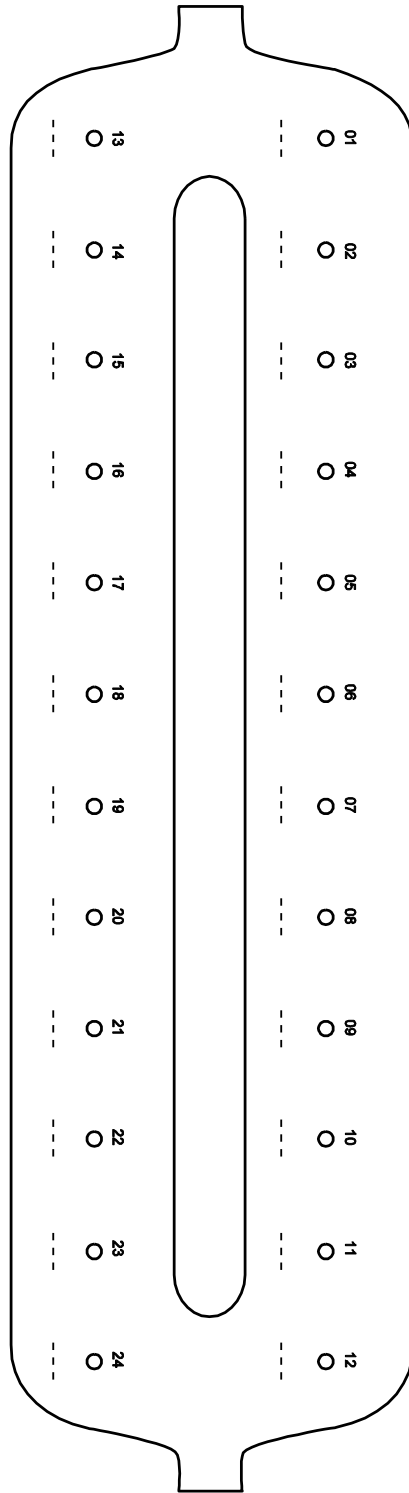


그림 4. QIAvac 24 Plus 진공 시스템에 사용 시 검체가 섞이지 않도록 분리 튜브(LT), 용리 튜브(ET), QIAamp MinElute 컬럼의 라벨 부착 방법

프로토콜: 혈장 및 혈청에서 바이러스 핵산 분리 및 정화

500 µl의 EDTA 또는 구연산 처리 혈장 및 혈청에서 바이러스 핵산을 분리 및 정화해야 합니다.

시작하기 전 해야 할 일

- 15–25°C의 실온에서 검체의 평형을 맞추고 잘 섞였는지 확인합니다.
- 17 페이지의 설명에 따라 용리 완충액(AVE) 또는 내부 대조군에서 재구성된 운반체 RNA를 분리 완충액(AL)에 넣습니다.
- 16 페이지의 “중요 참고 사항”에 따라 세척 완충액 1 과 2 및 QIAGEN 단백질분해효소(QP)가 준비되었는지 확인하십시오.
- 18 단계에서 사용하기 위해 15–25°C의 실온에서 용리 완충액(AVE)의 평형을 맞춥니다. 가능하면 각 절차마다 신선한 용리 완충액(AVE)을 사용하십시오(튜브 4 개 제공).
- 4 단계 및 17 단계에서 사용할 수 있도록 가열 블록을 56°C로 맞춥니다.
- 교차 오염을 방지하기 위해 진공 시스템의 각 루어 어댑터에 백커넥터(VC)를 삽입하십시오.
- 진공 시스템의 폐기물 용기는 비어 있어야 하며 각 커플링은 정확히 연결되어야 합니다.
- 진공 시스템의 자세한 사용 설명 및 특히 유지보수 방법은 함께 제공된 안내서를 참고하십시오.

절차

1. 75 µl의 QIAGEN 단백질분해효소(QP)를 피펫으로 분리 튜브(LT)에 넣으십시오.



재구성된 단백질분해효소를 사용하기 전에 유효기간을 확인하십시오.

2. 500 µl의 혈장 또는 혈청을 분리 튜브(LT)에 넣으십시오.

3. 11.2 µg/ml의 운반체 RNA가 함유된 500 µl의 분리 완충액(AL)을 분리 튜브(LT)에 넣고 뚜껑을 닫은 후 15 초간 펄스 교반하여 섞어줍니다.

효율적으로 분리하기 위해서는 반드시 검체와 분리 완충액(AL)을 완전히 섞어서 균질한 용액을 만들어야 합니다.



분리 완충액(AL)에는 내부 대조군이 들어있습니다. 분리 완충액(AL)은 점성이 높으므로 Eppendorf 멀티스텝 피펫 또는 그에 준하는 피펫 등을 사용하여 반드시 정확한 양의 분리 완충액을 첨가해야 합니다.



QIAGEN 단백질분해효소(QP)를 분리 완충액(AL)에 직접 넣지 마십시오.

4. 15 분(±1 분)간 56°C(±1°C)에서 배양합니다.
5. 분리 튜브(LT)를 ≥5 초간 최고 속도에서 원심분리하고 뚜껑 안쪽에서 액의 방울을 제거합니다.



6. 장갑을 교체하고 분리 튜브(LT)를 주의하여 열어주십시오.
7. 600 µl의 에탄올(96-100%)을 분리 튜브(LT)에 넣고 뚜껑을 닫은 후 ≥15 초간 펄스 교반하여 완전히 섞어줍니다. 15-25°C의 실온에서 5 분(±1 분) 동안 배양합니다.
8. 분리 튜브(LT)를 ≥5 초간 최고 속도에서 원심분리하고 뚜껑 안쪽에서 액의 방울을 제거합니다.
9. QIAamp MinElute 컬럼을 진공 시스템의 백커벡터(VC)에 삽입합니다(참고: 그림 3(20 페이지)). 컬럼 확장기(EXT)를 열린 QIAamp MinElute 컬럼에 넣으십시오.



세척 튜브(WT)는 16 단계에서 회전 건조하십시오.



10. 장갑을 교체하고 한 번에 1 개의 튜브만 개봉하십시오.
11. 7 단계에서 얻은 용해물 전체를 가장자리에 묻지 않도록 주의하여 QIAamp MinElute 컬럼의 컬럼 확장기(ET)에 넣으십시오. 피펫 팁이 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 닿지 않도록 주의하십시오.

12. 진공 펌프를 켜십시오. QIAamp MinElute 컬럼 통해 용해물이 옮겨지면 진공 시스템의 밸브를 열고 진공 압력을 배출하십시오.

동시에 여러 개의 QIAamp MinElute 컬럼을 처리하는 경우에는 이 진공 단계의 시간을 단축하기 위해 용해물이 통과한 후 각 열의 백밸브를 닫는 것이 좋습니다.



15 분이 지나도 용해물이 멤브레인을 완전히 통과하지 못할 시에는 QIAamp MinElute 컬럼을 버리고 새 검체로 절차를 반복하십시오.



진공 압력을 빠르게 배출하기 위해 진공 시스템 밸브를 사용해야 합니다.

13. 600 µl의 세척 완충액 1(AW1)을 QIAamp MinElute 컬럼에 넣습니다. 컬럼 확장기(EXT)를 조심스럽게 분리하여 버리고 진공 시스템의 밸브를 닫으십시오. QIAamp MinElute 컬럼을 통해 세척 완충액 1(AW1)이 옮겨지면 밸브를 열고 진공 압력을 배출하십시오.



교차 오염을 방지하기 위해 분리된 컬럼 확장기(EXT)가 인접한 QIAamp MinElute 컬럼 위를 지나가지 않도록 주의하십시오.

14. 가장자리에 묻지 않도록 주의하여 750 µl의 세척 완충액 2(AW2)를 QIAamp MinElute 컬럼에 넣습니다. 피펫 팁이 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 닿지 않도록 주의하십시오. 열의 뚜껑은 열어두고 진공 시스템의 밸브를 잠그십시오. QIAamp MinElute 컬럼을 통해 세척 완충액 2(AW2)이 옮겨지면 밸브를 열고 진공 압력을 배출하십시오.

15. 가장자리에 묻지 않도록 주의하여 750 µl의 에탄올(96-100%)을 QIAamp MinElute 컬럼에 넣습니다. 피펫 팁이 QIAamp MinElute 컬럼 멤브레인에 닿지 않도록 주의하십시오. 열의 뚜껑은 열어두고 진공 시스템의 밸브를 잠그십시오. QIAamp MinElute 컬럼을 통해 에탄올이 옮겨지면 밸브를 열고 진공 압력을 배출하십시오.



분사막이 있는 피펫 팁을 사용하여 에탄올을 QIAamp MinElute 컬럼에 넣으십시오.

16. QIAamp MinElute 컬럼의 뚜껑을 닫고 진공 시스템에서 분리한 후 백커넥터(VC)를 폐기하십시오. QIAamp MinElute 컬럼을 9 단계에서 얻은 세척 튜브(WT)에 넣고 약 20,000 x g 또는 14,000 rpm의 최고 속도에서 1 분간 원심분리하여 멤브레인을 완전히 건조시킵니다. 여과액이 들어있는 세척 튜브(WT)는 폐기하십시오.



원심분리를 이용한 건조 과정을 누락할 시 하향 분석항목이 억제될 수 있습니다.

17. QIAamp MinElute 컬럼을 새 세척 튜브(WT)에 넣고 56°C에서 3 분간 뚜껑을 열어둔 상태로 배양하여 남은 액체를 증발시킵니다.

18. QIAamp MinElute 컬럼을 깨끗한 용리 튜브(ET)에 넣고 세척 튜브(WT)는 폐기합니다. QIAamp MinElute 컬럼의 뚜껑을 주의하여 열고 하향 분석항목에 따라 멤브레인의 중심부에 20 또는 60 µl의 용리 완충액(AVE)을 넣습니다. 뚜껑을 닫고 15-25°C의 실온에서 ≥3 분간 배양합니다. 약 20,000 x g 또는 14,000 rpm의 최고 속도에서 1 분간 원심분리하여 바이러스 핵산을 용리합니다.



본 프로토콜을 실시한 후에는 진공 시스템과 함께 제공된 안내서를 참고하여 유지보수 절차를 실시하십시오.

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용자 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용자 설명서는 www.qiagen.com 에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 배포자가 요청할 수 있습니다.

개정 이력

| 문서 개정 이력 | |
|------------|---|
| R4 08/2018 | 진공 펌프 카탈로그 번호와 관련된 설명을 주석으로 추가. 다음 페이지 참고: 15 안내서 포맷 업데이트. |

XXXX[제품명 삽입]에 대한 제한 라이선스 협약

본 제품을 사용함으로써 다음 품목에 대한 모든 제품 구입자 또는 제품 사용자의 협약을 준수합니다.

1. 이 제품은 오로지 제품과 함께 제공된 프로토콜과 안내서에 따라 사용될 수 있으며 키트에 포함되어 있는 구성품과만 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 제품과 함께 제공된 프로토콜 및 본 안내서, www.qiagen.com에 제공되어 있는 추가 프로토콜에서 설명한 경우를 제외하고 지적 재산권 하에서 본 키트에 동봉된 구성요소를 본 키트에 포함되지 않은 구성요소와 통합하거나 사용하도록 라이선스를 부여하지 않습니다. QIAGEN 사용자를 위해 QIAGEN 사용자가 이 추가 프로토콜의 일부를 제공하였습니다. QIAGEN에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN은 이를 보장하지 않으며 제 3 자의 권한을 침해하지 않는다는 것도 보증하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN은 본 키트 및/또는 그 사용이 제 3 자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 본 키트 및 해당 구성품은 일회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
5. 키트 구입자 및 사용자는 위에서 금한 행위를 유도하거나 촉진할 수 있는 단계를 취하거나 이를 허용하지 않는데 동의합니다. QIAGEN은 모든 법정에서 이와 같은 제한된 라이선스 협약의 금지를 시행할 수 있으며, 키트 및/또는 해당 구성요소에 관련하여 본 제한된 라이선스 협약 또는 지적 재산권을 시행하기 위한 어떤 행동에서든 변호사 비용을 포함하여 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트에 대해서는 www.qiagen.com을 참조합니다.

등록 상표: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealAri™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

PCR 프로세스는 Hoffmann-La Roche AG이 보유한 미국 특허 4,683,195 및 4,683,202을 비롯한 기타 해외 특허의 보호를 받습니다.

1114514 08/2018 HB0109-003 © 2018 QIAGEN, 모든 권한 보유.

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