

## 1. 명칭

iDetect™ Edwardsiella ictaluri Detection kit

## 2. 사용목적

본 제품은 해수 또는 수산물 등에서 채취된 검체에서 추출된 DNA를 이용하여 *Edwardsiella ictaluri*(E.ictaluri)의 유전자(16s rRNA)를 실시간등온반응법(Real-time LAMP)으로 증폭하여 감염여부를 정성적으로 검출하는 연구용 시약입니다.

## 3. 포장단위 80 tests / kit

## 4. 제품구성

구성물 명칭	구성물	용량 / 포장단위
2X Rxn buffer	반응용 버퍼	800 $\mu$ l / 1개 튜브
16s rRNA primer	E. ictaluri 증폭용 프라이머	400 $\mu$ l / 1개 튜브
Bst polymerase	증폭반응효소	80 $\mu$ l / 1개 튜브
Positive control	양성대조균	60 $\mu$ l / 1개 튜브
Negative control	음성대조균	60 $\mu$ l / 1개 튜브
Cover mix	Mineral oil	800 $\mu$ l / 1개 튜브

## 5. 검출방법

### 1) 시험 및 저장방법

- ① 채취된 검체는 즉시 DNA 추출을 권장합니다.
- ② 채취된 검체는 냉장보관(2-8°C)시 24시간 이내에 시험해야 하며, 장기 보관 시에는 -20°C에 보관합니다.
- ③ 반복되는 검체의 냉동/해동은 핵산을 분해시켜 민감도를 감소시키므로 삼간다.

### 2) 시험 전 준비 과정

- ① 검체와 시약은 얼음에서 완전히 녹인 후에 사용한다.
- ② DNA의 추출은 상용화된 DNA extraction kit를 준비한다.
- ③ 적용 가능 유전자증폭장치  
장비) AnyDetect (ConnectGen Inc., Korea)

### 3) DNA 추출방법

- DNA의 추출방법은 제조사의 사용법을 따른다.

### 4) RT-LAMP반응과정

- ① 1.5ml tube에 아래와 같은 비율로 혼합하여 master mix를 준비한다.

**중요:** 본 제품에는 1.5ml tube가 포함되지 않기에 별도로 준비하여야 합니다.

16s rRNA 증폭용 master mix의 구성물	반응당 용량 ( $\mu$ l)	8 튜브 제조 시 용량 ( $\mu$ l, 8.5배 넣기)
2X Rxn buffer	10	85.0
16s rRNA primer	4	34.0
Bst polymerase	1	8.5

- ② Vortex mixer로 혼합하여 원심분리(spin-down) 한다.

- ③ 1개의 8 strip PCR 튜브를 준비한다.

- ④ 준비된 증폭용 master mix를 PCR 튜브에 15 $\mu$ l씩 분주한다.

- ⑤ 검체, positive control 및 negative control의 핵산을 분주된 tube에 5 $\mu$ l씩 넣는다.

- ⑥ 10 $\mu$ l의 Cover mix를 각 tube에 넣고 뚜껑을 닫는다.

[ 예시 ] 8 tube 반응 시 16s rRNA 증폭을 위한 8-strip 의 분주

구성물	PCR 튜브 No. 및 용량 ( $\mu$ l)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M.M.	15	15	15	15	15	15	15	15
NC	5	-	-	-	-	-	-	-
PC	-	5	-	-	-	-	-	-
Sample	-	-	5	5	5	5	5	5
Cover mix	10	10	10	10	10	10	10	10

M.M. : 증폭용 master mix  
NC : Negative control  
PC : Positive control  
Sample : 검체 DNA

- ⑦ 0.2ml strip tube용 원심분리기로 spin-down 한다.

- ⑧ PCR튜브를 AnyDetect에 장착하여 아래 조건으로 반응한다.

[장비의 반응 조건]

Step	Temperature	Times
1	60°C	3 min
2**	60°C	40 min

\*\*:탁도 검출 단계 (Scan step)

## 6. 결과 판정 및 해석

- 1) 유전자에 대한 threshold 및 cut-off는 아래와 같이 설정한다.

장비	유전자	Threshold	Cut-off
AnyDetect	16s rRNA	0.02	40:00

- 2) 아래와 같은 기준에 따라 양성/음성을 판정한다.

판정	시험결과
양성 (+)	$T_T \leq 40:00$
음성 (-)	N/D**

\* $T_T$  : Threshold time  
\*\*N/D : Not detected

- 3) 최종판정

사례	PC <sup>†</sup>	NC <sup>†</sup>	유전자	결과해석
			16s rRNA	
1	+	-	-	E. ictaluri 음성
2	+	-	+	E. ictaluri 양성
3	-	-	+/-	무효
4	+	+	+/-	무효
5	-	+	+/-	무효

<sup>†</sup>PC : positive control, NC : negative control

사례 1/2 : 정상적인 시험의 결과

사례 3 : 시험과정을 재확인한다.

→ 재시험/신규 제품 개봉/다른 Lot으로 시험한다.

사례 4 : 반응물의 오염으로 판단되어 시험환경을 청결하게 한다.

→ 재시험/신규 제품 개봉/다른 Lot으로 시험한다.

사례 5 : 시험과정 재확인 및 시험환경을 청결하게 한다.  
 → 재시험/신규 제품 개봉/다른 Lot으로 시험한다.  
 \*조치사항이 해결되지 않을 시에는 공급자에게 문의하세요.

## 7. 정도관리

- 1) Positive control 과 negative control 의 시험결과가 아래와 같이 산출되는지를 확인한다.
- 2) 부적합 시에는 동일 lot의 다른 제품으로 재시험하고, 재시험도 부적합하면 공급자에게 문의한다.

기준	정도관리물질	시험결과
적합	Positive control	$T_T * \leq 40:00$
	Negative control	N/D**
부적합	Positive control	N/D
	Negative control	$T_T \leq 40:00$

\* $T_T$  : Threshold time  
 \*\*N/D : Not detected

## 8. 저장방법 및 사용기간

- 1) 개봉 전의 모든 구성품은 -20°C 이하에서 12개월간 유효합니다.
- 2) 개봉 후의 모든 구성품은 4°C에서 12일간 유효합니다.

## 9. 사용시 주의사항

- 1) 본 제품은 연구용 제품입니다.
- 2) 본 제품 사용 시에는 반드시 매 시험마다 첨부된 양성대조물질 과 음성대조물질을 사용하여 양성과 음성 대조시험을 해야 합니다.
- 3) 본 제품은 정성시험을 기반으로 하기에 동일 검체를 반복 적용 시 통계적 유의성이 보증되지 않을 수 있습니다.
- 4) 본 제품설명서를 충분히 숙지한 후 사용해야 합니다.
- 5) 검체 및 시약을 취급할 때에는 일회용 장갑, 보호구, 보안경, 마스크 등의 적절한 보호장비를 착용하여 눈이나 피부를 보호해야 합니다. 접촉 시에는 흐르는 물로 행군 뒤 의학적 진단을 받아야 합니다.
- 6) 본 제품은 등온증폭기술기반으로 민감도가 높기에 증폭산물에 의한 교차오염이 발생하지 않도록 주의하세요.
- 7) 실험 장비 및 공간은 0.5% sodium hypochloride나 적절한 소독제를 사용하여 철저히 소독을 해야 합니다.
- 8) 반응이 완료된 증폭산물은 재사용을 금하며 지정된 장소에 폐기해야 합니다.
- 9) 모든 시료는 잠재적 감염성을 배제할 수 없기에 각 실험실의 안전 및 폐기지침을 준수해야 합니다.
- 10) 본 제품의 저장방법을 준수하지 않을 시에는 성능의 저하가 발생할 수 있습니다.
- 11) 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않으며, 서로 다른 lot 또는 동일 lot 다른 포장 간의 혼합을 금합니다.



### ConnectaGen Inc.

F-203, MisaCentumbiz, 45, Jojeong-daero, Hanam-si,  
 Gyeonggi-do, Republic of Korea  
 Tel. +82-31-5175-3330 Fax. +82-31-5175-3329