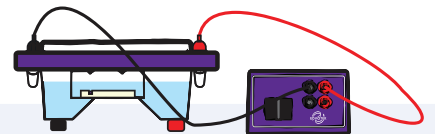

RT-PCR을 이용한 코로나 모의진단

Detecting COVID-19 Using Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)

ED363



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)은 검사의 민감성과 특이성으로 인해 SARS-Cov-2 검출을 위한 중요한 방법입니다. 이 모의의 RT-PCR 실험 키트에서 학생들은 COVID-19 확산을 모니터링 하기위해 전 세계적으로 사용되는 진단 테스트를 탐구하게 됩니다. 이 실험을 위해 PCR머신이 필요합니다.

제품 구성품

구성물품	보관시 온도
· PCR EdvoBeads Plus	실온
A. LyphoPrimer Mix	-20°C
B. EdvoQuick DNA Ladder	-20°C
C. 음성대조군	-20°C
D. 양성 대조군	-20°C
E. 환자 #1 샘플	-20°C
E. 환자 #1 샘플	-20°C
F. 환자 #2 샘플	-20°C
G. 환자 #3 샘플	-20°C
H. TE Buffer	-20°C

PCR EdvoBead Plus에는 dNTP Mixture, Taq DNA Polymerase Buffer, Taq DNA Polymerase, MgCl₂, Reaction Buffer가 들어있습니다.

주의: A와 C~G 제품은 동결건조된 상태로 제공됩니다.

제공되는 시약

- UltraSpec-Agarose
- 전기영동 버퍼(50X)
- SYBR Safe DNA stain
- FlashBlue Liuid Stain

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

- Microcentrifuge tube
- 0.2mL PCR Tubes

필요 장비 및 준비물

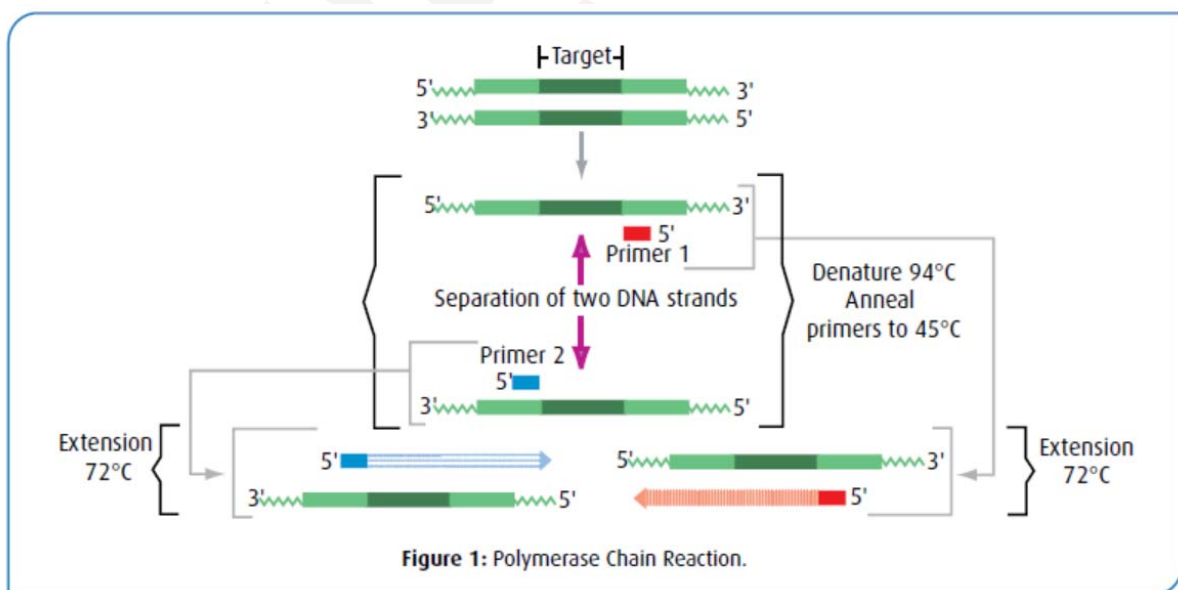
Thermal Cycler(PCR기기), 전기영동 장치, 전원공급장치, 원심분리기, UV Transilluminator, 피펫과 피펫팁, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, 테이프, 가위, 안전장갑, 일회용 실험장갑, 검은펜, 파란펜

배경지식

PCR(Polymerase Chain Reaction)은 의학에서 강력한 진단 도구입니다. 이 기술은 특정 DNA 부분을 신속하고 신뢰성 있게 증폭시켜 의사나 임상사들이 개인의 유전체 돌연변이를 관찰하고 유전적인 질환 또는 암을 확인할 수 있게 해줍니다. 또한 환자의 샘플에서 다른 생물체(세균 및 바이러스)를 감지하고 식별하여 감염을 진단할 수 있습니다. 그러나 감염을 일으키는 생물체에게 DNA 가 없는 경우는 어떻게 될까요? 병원성 세균, 균류, 원생동물 및 기생충은 모두 DNA 를 가지고 있지만 많은 바이러스는 그렇지 않습니다. 이러한 바이러스는 유전자 물질로 ribonucleic acid(RNA)을 사용합니다. Dengue virus, C 및 E 형 간염 바이러스, West Nile fever, 에볼라 바이러스 질병, 광견병, 소아마비, 홍역 및 COVID-19 등 인간 질병 중 일부는 RNA 바이러스로 인해 발생합니다. 다행히 역전사 PCR(Reverse transcription PCR)이라는 PCR 기술을 사용하면 의사들은 먼저 RNA 를 DNA 로 변환한 후 바이러스 유전체의 복사본을 증폭시킬 수 있습니다.

The polymerase Chain Reaction

1984 년, Kary Mullis 박사가 PCR 기술을 발명했습니다. Mullis 는 핵내 DNA 복제와 유사한 방식으로 단일 규모의 DNA oligonucleotides (프라이머)와 DNA Polymerase I 을 사용하여 in vitro 에서 DNA 를 복제할 수 있다는 것을 인식했습니다. 더욱이, 연구자들은 프라이머를 사용하여 특정 유전자를 대상으로 맞춤형 할 수 있으므로, 이 방법은 선택된 DNA 서열을 신속하게 증폭할 수 있게 해주었습니다. 이 기술은 이후 *Thermus aquaticus* 세균에서 얻은 thermostable DNA polymerase 인 Taq 를 PCR 반응에서 사용하기 시작한 Randy Saiki 박사에 의해 개선되었습니다. 이 효소는 프로세스에서 발생하는 큰 온도 변화에 견딜 수 있어, PCR 을 자동화하고 더욱 접근 가능하고 저렴하게 만들 수 있게 했습니다.

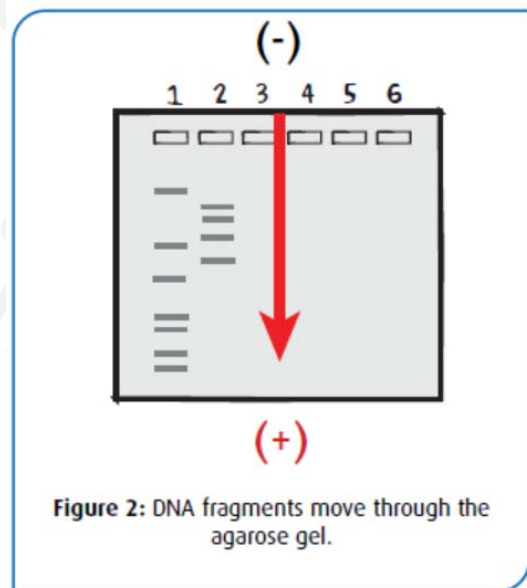


★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

PCR 를 수행하기 위해 정제된 이중나선 DNA 는 프라이머, Taq polymerase, 그리고 뉴클레오타이드와 혼합됩니다. 그 다음, 혼합물을 94°C 로 가열하여 DNA 이중나선 구조를 단일 가닥으로 "denaturation"합니다. 그런 다음, 샘플은 45°C-60°C 로 냉각되어 프라이머가 대상 DNA 서열과 결합하도록 허용됩니다 (이를 "annealing"이라고 함). 마지막으로, 오퍼튜니스틱 Taq polymerase 활성화 온도인 72°C 로 온도가 올라가면서 프라이머가 확장되어 새로운 DNA 서열이 합성됩니다. 각각의 "PCR 사이클" (denaturation, annealing, extension)은 5 분 이내에 대상 DNA 양을 2 배로 증폭시킵니다 (Figure 1). 분석을 위한 충분한 DNA 를 얻기 위해서는 20~40 사이클이 필요할 수 있습니다. 이 프로세스를 간소화하기 위해 "thermal cycler" 또는 "PCR 기기"라는 전문 장비가 개발되었습니다.

진단용 PCR 에서는 종종 여러 프라이머가 사용됩니다. 이러한 프라이머를 하나의 반응으로 결합하면 다중 반응(multiplex reaction)이라고 합니다. 생물체 유전체의 두 개 이상의 영역을 증폭함으로써, 다중 반응 검사는 병원체가 존재할 경우 검출 확률을 높입니다. 또한 내부 제어가 모든 반응에서 증폭되도록 합니다. 이 제어는 종종 "하우스키핑 유전자"라고 불리는 인간에서 발견되는 일반적인 DNA 서열로, 실험이 성공적인지 여부를 나타냅니다. 결과적으로, 다중 반응은 진단 검사의 민감도와 특이도를 높이는 데 도움이 됩니다. (Box 1)

증폭된 DNA 를 분석하기 위해서 과학자들은 전기영동 기술을 사용합니다. 전기영동법에서, 증폭된 DNA 분자의 혼합물은 well 안에 로딩되며, 그런 다음 전기적인 전류가 챔버를 통과합니다. 전류는 음이온이 있는 DNA 분자들을 양극으로 밀어냅니다. 작은 DNA 단편들은 이 채널을 통해 쉽게 이동할 수 있지만, 큰 DNA 단편들은 이동이 더 어렵습니다. 결과적으로, 크기가 다른 분자들은 분리되어 여러 "밴드(band)"를 형성합니다 (Figure 2). 예상되는 밴드들이 존재하면 양성, 없으면 음성입니다.



과학자들은 형광 염료를 사용하여 실시간으로 PCR 결과를 시각화할 수 있습니다. 이러한 염료는 DNA 가 증폭될 때 활성화됩니다. 결과적으로, PCR 반응은 각 사이클 동안 생성된 DNA 복사본 수에 비례하는 형광을 방출합니다. 이러한 검사는 빠르게 양성 또는 음성 결과를 제공할 수 있습니다. 이런 검사는 양적 PCR (또는 qPCR)라고 불리며 원래 얼마나 많은 유전자 물질이 있었는지 추정하는 데도 사용될 수 있습니다.

Reverse-Transcription Polymerase Chain Reactions

Reverse Transcription (RT) PCR 은 대상 유전 물질이 DNA 가 아닌 RNA 인 경우 사용됩니다. 이 기술은 위에서 설명한 PCR 과정과 동일하지만 RNA 를 먼저 DNA 로 전환하는 과정이 추가됩니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

이 단계는 Taq polymerase 가 DNA 에 대해서만 작동하기 때문에 필요합니다. 유전 정보는 일반적으로 DNA 에서 RNA 로 (그리고 결국 단백질로) 한방향으로 흐르지만, 이와는 반대로 역전사효소(reverse transcriptase)는 RNA 템플릿에서 DNA 를 만들 수 있습니다. RT-PCR 에서는 이 효소가 사용되어 먼저 합성된 DNA 가 일반적인 PCR 방법으로 증폭됩니다. 이렇게 합성된 DNA 는 complementary DNA 또는 간단히 cDNA 라고 합니다.

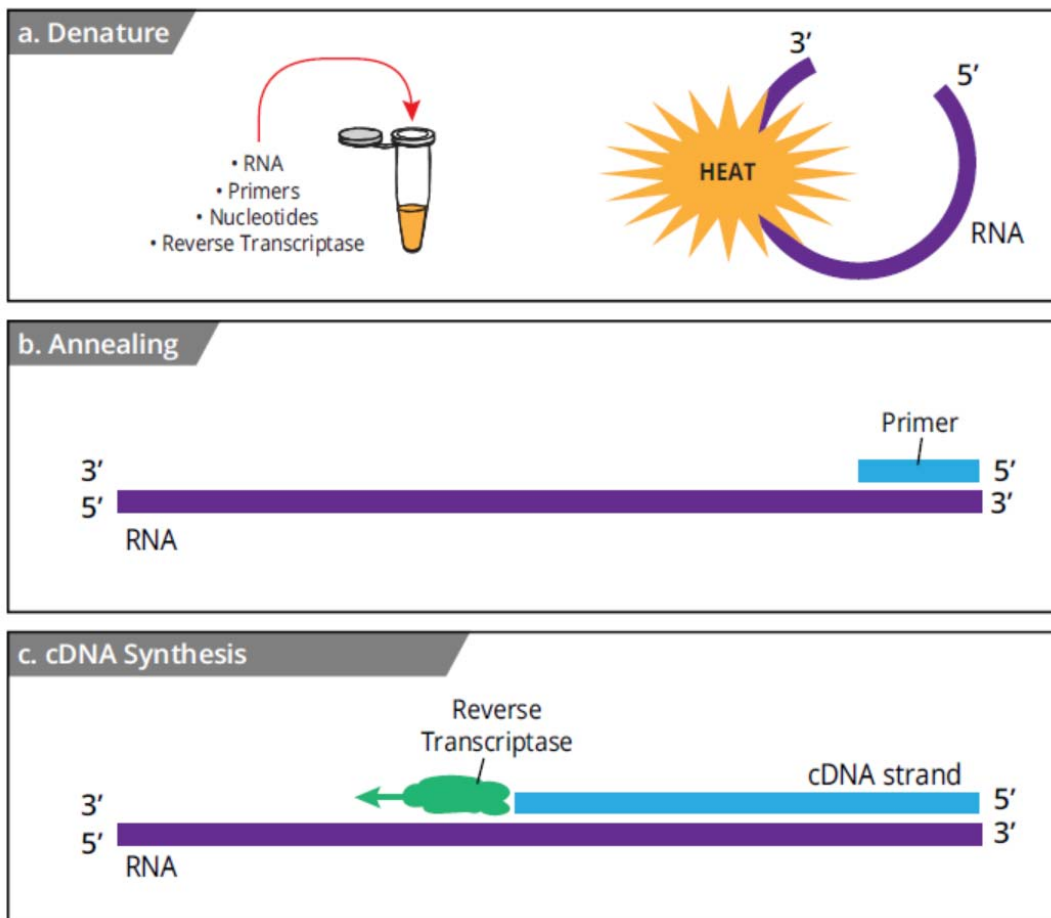
Box 1:

감도(Sensitivity): 질병이 있는 사람을 올바르게 양성으로 식별하는 능력. 높은 감도를 가진 검사는 거짓 음성의 비율이 낮을 것입니다. 이는 질병이 있는 경우를 놓치는 경우가 적을 것을 의미합니다.

특이도(Specificity): 질병이 없는 사람을 올바르게 음성으로 식별하는 능력. 높은 특이도를 가진 검사는 거짓 양성의 비율이 낮을 것입니다. 이는 질병이 없는 사람이 검사에서 양성으로 나오고 불필요한 치료를 받거나 불필요한 예방조치를 취하는 경우가 적을 것을 의미합니다.

RT-PCR 에서는 RNA, 프라이머, 뉴클레오티드 및 역전사효소를 포함하는 시료가 먼저 가열되어 RNA 의 이차 구조를 denature 합니다(Figure 3a). 그런 다음, 프라이머가 RNA 에 결합하도록 시료가 냉각됩니다(Figure 3b). 다음으로, 반응물이 약간 가열되어 역전사효소가 활성화되고 RNA 분자를 템플릿으로 사용하여 새로운 DNA 가 생성됩니다.

Figure 3: Overview of Reverse Transcriptase Reaction.



★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

RT-PCR 는 원-스텝 또는 투-스텝 반응으로 수행될 수 있습니다. 원-스텝은 역전사 효소와 Taq 효소가 미리 섞여 하나의 관에 반응이 전부 이루어지는 것이고, 이는 오염 위험을 줄이고 프로세스를 간소화하여 보다 구체적으로 만들지만, 테스트의 민감도가 낮아질 수 있습니다. 투-스텝은 더 높은 민감도를 가지며 보다 넓은 범위의 증폭이 가능하지만 오염 위험이 있으며 설정 및 수행에 더 많은 시간이 걸립니다.

RT-PCR 을 이용한 COVID-19 진단

SARS-CoV-2 는 전 세계적인 호흡기 질환 COVID-19 의 발생 원인이 된 신종 코로나바이러스입니다. 이 바이러스는 나선형 캡시드로 둘러싸인 일차원 RNA 유전체를 가지며, 호스트 세포에서 유래한 단백질로 뒤덮인 외피를 가지고 있습니다(Box 2). COVID-19 의 증상에는 열, 기침 및 호흡 곤란 등이 포함됩니다. 증상의 경우 폐렴, 호흡 곤란, 급성 신부전, 장기적인 신경 및 심혈관 손상 등이 발생할 수 있습니다(Figure 4). 안타깝게도, 이러한 감염은 치명적일 수 있습니다.

COVID-19 는 예방이 중요합니다. COVID-19 치료에는 가벼운 경우에는 휴식, 수분 섭취 및 일반 감기약이 사용되며 중증 증상의 경우 항바이러스 약물, 스테로이드 및 산소 공급이 필요합니다. 그러나 예방이 가장 좋은 치료입니다. 전 세계적으로 연구자 및 정부가 백신을 개발하고 배포하도록 노력하고 있습니다. 이 바이러스는 액체 방울을 통해 주로 사람과 사람 사이에 전파되므로 사회적 거리두기, 마스크 착용 및 자주 손 씻기는 감염 위험을 크게 줄일 수 있습니다.

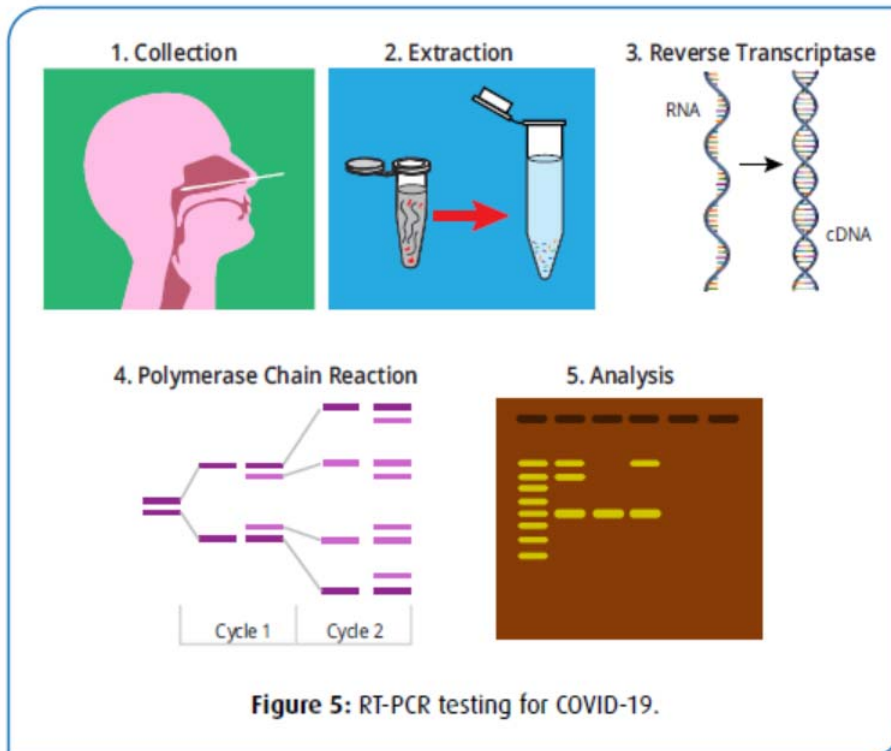
아마도 중요한 것은 COVID-19 양성으로 판정된 개인들을 격리시키는 것입니다. COVID-19 감염을 확인하기 위한 여러 진단 검사가 있습니다. 가장 일반적인 두 가지는 RT-PCR 과 효소 연결 면역 흡착검사(ELISA)입니다. 병원에서 이러한 검사는 의사가 환자를 가장 효과적으로 치료하고 자신과 다른 사람들을 감염에서 보호하기 위해 필요한 예방 조치를 취할 수 있도록 합니다. SARS-CoV-2 는 경증 또는 증상이 전혀 없는 감염자에 의해 전파될 수 있기 때문에 이러한 검사는 이상적으로 빠르고 광범위한 인구 검사 프로그램의 일부입니다. 이러한 프로그램을 통해 개인들은 자신을 반복적으로 검사한 후 바이러스 검출 시 자가격리 및 다른 사람들에게 알리는 것이 가능합니다. 또한 참여하는 개인들이 여행이나 수업 참여와 같은 더 높은 위험 활동을 더 자신 있게 할 수 있도록 합니다. 따라서 정기적인 검사는 연락 추적, 마스크 착용, 거리 유지 및 손 씻기와 결합하여 일상적인 생활의 일정 수준의 정상화를 회복하는 데 중요한 역할을 합니다.

RT-PCR 검사는 높은 감도와 특이성으로 인해 활성 감염을 식별하는데 있어서 standard 로 간주됩니다. 대부분의 COVID-19 RT-PCR 검사는 세 개의 프라이머 세트를 결합합니다. 첫 번째 두 세트는 SARS-CoV-2 N 단백질 내의 영역을 대상으로 하고, 세 번째 세트는 인간 유전자 RNase P(RP)를 증폭합니다. 또한 이 검사의 또 다른 강점은 대부분의 항체 기반 검사보다 더 이른

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

시점에서 감염을 식별할 수 있다는 것입니다. 그러나 SARS-CoV-2 계놈은 인간 계놈과 달리 HIV 및 다른 레트로바이러스와 같이 인간 계놈에 통합되지 않습니다. 이로 인해 SARS-CoV-2 의 RT-PCR 검사는 ELISA 항체 검사와 달리 과거 감염을 식별할 수 없습니다. RT-PCR 검사는 또한 더 오래 걸리고 (2-4 시간) 특수 장비가 필요합니다. 일반적인 RT-PCR 검사 과정은 다음과 같습니다 (Figure 5):

1. **채취:** 환자로 부터 검체를 채취합니다. 이상적으로는 바이러스 입자가 높은 농도로 존재하는 곳에서, 보통 상기도로부터 채취하지만 침샘 분비물 샘플도 사용될 수 있습니다.
2. **추출:** 용액 내의 세포가 파괴(림종)되고 RNA 가 추출됩니다. RNA 는 자주 존재하는 RNA 소화 효소인 RNase 의 존재로 인해 빠르게 분해될 수 있어 이 단계는 어렵습니다. 추출이 성공하면, 샘플은 바이러스와 인간 호스트 모두의 다양한 RNA 분자의 혼합물을 포함합니다.
3. **역전사:** RNA 분자가 상보적인 DNA 로 변환됩니다. 사용되는 프라이머에 따라 이 단계는 메신저 RNA 라는 하위 유형의 RNA, 특정 RNA 서열 또는 샘플에 존재하는 모든 RNA 를 대상으로 할 수 있습니다.
4. **PCR:** 특이적 프라이머와 Taq polymerase 를 사용하여 대상이 되는 cDNA 영역의 백만 개의 사본을 만듭니다. 이 단계는 a) an initial denaturation, b) multiple cycles of denaturation, annealing, elongation, c) a final elongation 사이클로 구성될 수 있습니다.
5. **분석:** 결과를 관찰하고 분석합니다. 환자는 양성, 음성 또는 결정적인 검사 결과를 받게 되며, 일부 경우에는 추정 바이러스 양도 제공됩니다.



★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

IMAGE CREDITS:

BOX2 image by <https://www.scientificanimations.com/wiki-images/>,CCBY-SA4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=86436446>

Figure4:

https://en.wikipedia.org/wiki/Coronavirus_disease_2019#/media/File:Symptoms_of_coronavirus_disease_2019_3.0.svg

양성 결과는 SARS-CoV-2 RNA 의 존재를 나타냅니다. 그러나 이는 환자가 심각하게 병을 앓게 될 것이라는 것을 의미하지는 않습니다. 또한 다른 동시 감염 가능성을 제외하지는 않습니다. 그러나 이는 사람이 자가 격리하고, 접촉한 사람들에게 알리며, 증상이 악화될 경우 의료 도움을 받아야 한다는 것을 의미합니다. 음성 결과는 SARS-CoV-2 RNA 의 부재를 나타내지만 조심스럽게 해석해야 합니다. RT-PCR 결과는 시작 샘플만큼 정확합니다. 환자 샘플이 올바르게 수집되지 않았거나 잘못 보관되었거나 개인의 감염 수준이 일정 수준에 도달하기 전에 수집된 경우 모두 잘못된 부정적인 결과를 초래할 수 있습니다. 이것은 왜 검사의 시기와 반복 검사가 중요한지를 설명합니다. 불확실하거나 의심스러운 검사 결과는 두 가지 SARS-CoV-2 대상 중 하나만 증폭될 때 발생합니다. 이는 종종 반복 검사로 확인할 수 있는 추정 양성 검사로 간주됩니다.

이 실험에서는 먼저 모듈 I에서 RNA에서 cDNA 합성을 시뮬레이션합니다. 그런 다음 모듈 II에서 COVID-19 치료를 받고 있는 친구와 접촉한 환자 3 명과 두 개의 대조군으로부터 5 개의 cDNA 샘플에서 PCR 을 수행합니다. 마지막으로, 전기 영동법을 사용하여 PCR 제품을 분리하고 생성된 밴드 패턴을 분석하여 각 환자를 진단합니다.

실험 전 준비

모듈 I 준비

16 페이지(RNA EXTRACTION), 17 페이지(PRIMER STRIPS, PEN TAGS)를 출력하여 학생들에게 나눠줍니다.

모듈 II 준비

이 키트는 EDVOTEK® LyphoPrimer™ Mix 와 LyphoTemplate™가 특징입니다. 시약을 올바르게 혼합하였다면 PCR 반응은 주황색으로 보입니다. 이러한 기술혁신은 성공인 실험을 보장합니다.

제공되는 cDNA 샘플은 다섯 가지가 있습니다.

DNA 템플릿(template) 준비

1. 각 LyphoTemplate™ (튜브 C-G)에 75 µL TE Buffer (튜브 H)를 넣고, 용해되도록 혼합합니다.
2. 다음과 같이 원심분리기 튜브 25 개에 표기합니다.
 - 5 개 음성 대조군
 - 5 개 양성 대조군
 - 5 개 환자 #1 샘플
 - 5 개 환자 #2 샘플
 - 5 개 환자 #3 샘플
3. 각각의 라벨에 맞는 튜브에 10µL의 cDNA 템플릿을 넣습니다.

FOR MODULE II
Each group should receive:

- 5 PCR tubes
- 5 PCR EdvoBeads™ PLUS
- 10 µL Negative Control
- 10 µL Positive Control
- 10 µL Patient #1 Sample
- 10 µL Patient #2 Sample
- 10 µL Patient #3 Sample
- 150 µL Diluted Primer Mix

Primer Mix 준비

1. LyphoPrimer™ Mix (튜브 A)에 1 mL의 TE Buffer (튜브 H)를 넣고, 뚜껑을 닫고 혼합한다. 용액은 연한 노란색이 되며 고체 조각이 남아 있지 않아야 합니다.
2. 희석된 프라이머 믹스를 150 µL 씩 라벨된 원심분리기 튜브 5 개에 피펫으로 넣는다.
3. 희석된 프라이머 믹스를 각 학생 그룹에 하나씩 나눠줍니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 III 준비

전기영동을 이용한 PCR 생성물 분리

TE 전기영동 버퍼 준비:

실험을 위해 1X 버퍼를 대량으로 준비하는 것이 좋습니다. 사용하지 않은 남은 버퍼는 나중에 사용이 가능합니다.

1. 증류수를 2,940mL 측정하여 큰 용기에 넣습니다.
2. 50X 버퍼 60mL 를 용기에 첨가하고 잘 섞습니다.

50x Conc. Buffer	+	Distilled Water	Total Volume 1X Buffer
60 ml		2,940 ml	3000 ml (3 L)

SYBR® Safe 염료 제조:

SYBR® Safe 를 희석하려면, SYBR® Safe 튜브에 250µL 의 1X TE 버퍼를 추가하고 몇 번 흔들어 혼합합니다. 희석된 SYBR® Safe 는 아가로스 젤 제조 중에 사용됩니다.

아가로스젤 준비

이 실험은 한 그룹당 1.0% 아가로스 젤 하나가 필요합니다. 7 x 7 cm 크기의 젤이 권장됩니다. 젤을 미리 준비할 것인지 학생들이 직접 준비할 것인지 선택할 수 있습니다. 이 과정은 30-40분 정도 필요합니다. 아래 3가지 방법 중 하나를 택하도록 합니다.

- 개별 준비

각 학생 그룹은 실험을 실험 중에 만들 수 있습니다 (모듈 III 참조). 학생들은 50X 전기영동 완충액, 증류수, 아가로스 분말 및 희석된 SYBR® Safe 염료가 필요합니다 (용량비에 대한 Table A 는 모듈 III 쪽을 참조하십시오)

- 일괄적으로 젤을 만들기

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

시간을 절약하기 위해, 수업 전체가 공유할 수 있는 더 큰 양의 아가로스 용액을 제조할 수 있습니다. 지침은 부록 B를 참조하십시오.

- 미리 젤을 만드는 경우

젤은 미리 만들어 나중에 사용할 수 있습니다. 고체화된 젤은 밀봉 봉지에 작은 양의 버퍼를 첨가하여 냉장고에 최대 1주일 동안 저장할 수 있습니다. 우리는 봉지에 2mL의 버퍼를 추가하는 것을 권장합니다. 과도한 버퍼는 SYBR® Safe가 젤에서 확산되는 것을 방지합니다. SYBR® Safe가 들어간 젤은 빛에 노출되는 것을 피해 어둡고 서늘한 곳에서 보관해야 합니다.

-20°C에 젤을 보관하지 마세요. 열리면 파괴될 수 있습니다. 보관용기에서 뺀 젤은 트레이(접시)에 아가로스 몇 방울을 떨어뜨려 접촉 고정시킵니다. 이 방법은 트레이와 챔버에서 미끄러지는 것을 방지할 수 있습니다.

추가 재료:

각 1.0%젤에는 EdvoQuick DNA Ladder와 학생이 가진 PCR 반응이 로딩되어야 합니다.

- EdvoQuick DNA ladder (튜브 B)를 라벨링된 원심분리기 튜브에 30µL 씩 나누어 담아 하나씩 나눠줍니다.

모듈 III을 위해

각 조별로 50X TE Buffer, UltraSpec-Agarose™ Powder, 희석된 SYBR® Safe 튜브(30 µL), EdvoQuick™ DNA Ladder (30 µL), 모듈 I에 사용할 PCR 샘플들이 주어져야 합니다.

모듈 1: Reverse Transcription 시뮬레이션

이 실험은 SARS-CoV-2 N 단백질에 대한 특이적 시퀀스 프라이머 (N1 프라이머 또는 N2 프라이머)와 인간 housekeeping 유전자 RNase P (RP 프라이머)를 사용하여 역전사를 시뮬레이션합니다. 시뮬레이션은 환자 샘플을 채취하고 RNA 추출 후 Denatured 된 직후부터 시작됩니다.

1. 프라이머 중 하나를 선택합니다. : N1 N2 RP
2. 17 페이지의 "PRIMER STRIPS"그림 중 선택한 프라이머와 두 개의 효소 태그 스트립을 가위로 자릅니다.



3. 프라이머 스트립을 점선으로 표시된 검은 선을 따라 한번 접어 상자와 프라이머 시퀀스가 바깥쪽으로 나오도록 준비합니다.

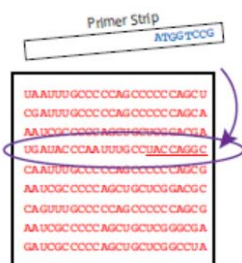


4. "reverse transcriptase" 플래그를 파란색 펜에 부착하고 "DNA polymerase" 플래그를 검은색 펜에 부착하여 효소로서 준비합니다.

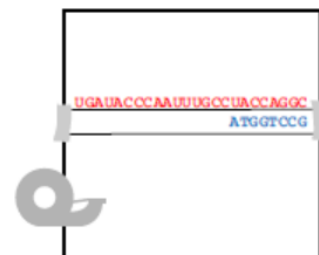


ANNEAL PRIMER

5. 15 페이지 Table 1a 을 참고해 DNA 와 RNA 간의 염기 결합을 가이드로 삼아, 당신의 프라이머 염기서열과 맞는 상보적인 RNA 서열을 16 페이지 (RNA EXTRACTION)에서 찾습니다.



6. 이러한 짝이 맞는 염기들을 사용하여 프라이머 스트립을 이 RNA 분자와 올바르게 정렬하십시오. 스트립이 고정되게 약간의 테이프를 붙입니다.



★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

TABLE 1		
a. DNA to RNA	b. RNA to DNA	c. DNA to DNA
C→G	G→C	C→G
G→C	C→G	G→C
T→A	A→T	T→A
A→U	U→A	A→T

TABLE 2	
Name	Forward Primer
N1	5' GACCCCAAATCAGCGAAA 3'
N2	5' CAAACATTGGCCGCAA 3'
RP	5' TGCGAGCGGGTTCTGACC 3'

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

RNA EXTRACTION

5' GAGCAGAGCGGCACUCUUCUGGUCCUCUUCU 3'

5' UGGACCCCAAAUACAGCGAAUUGCACC CGCAUACGUUUGGUGGACCCUCAGAUUCAACUGGCAGUAACCAGA 3'

5' ACAUUGCUCCAAUUUUUCUUAUGACAAAAGUGCCAAACACAGCAGAAGUCUGCU 3'

5' GAGGAAGUUCAAGAACUUUACUCUCCAAUUUUUCUU 3'

5' GGACCUGCGAGCGGGUUCUGACCUGAAGGCUCUGCGCGGACUUGUGGAGACAGCCGCUCACCUUGGCUAUUUCAGU 3'

5' AGGACAAACAUUGGCCGCAAAUUGCACAAUUUGCCCCCAGCGCUUCAGCGUUUCGGAAUGUCGCGCAU 3'

5' CUAUUCAGUUGUUCUAUCACUCUUCUCGA 3'

PRIMER STRIPS

Prepare each primer strip by **CUTTING** along the outer solid line and then **FOLDING** along the dotted line.

N1

N2

RP

PEN TAGS

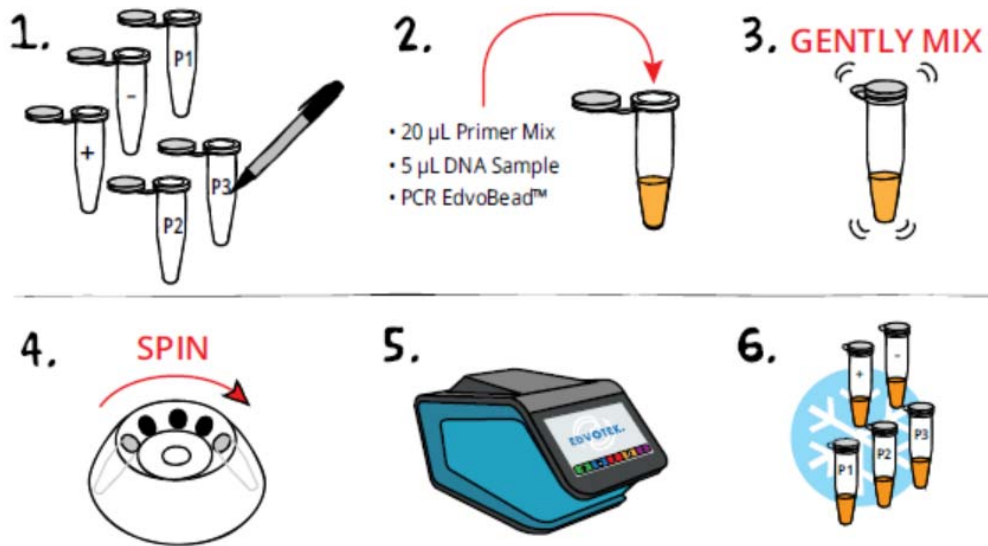
Reverse Transcriptase

DNA Polymerase

1. **CUT OUT** pen tags along the solid lines.
2. **WRAP** tags around corresponding colored pens and **TAPE** to secure.

Blue pen - Reverse Transcriptase
Black pen - DNA Polymerase

모듈 II: PCR 증폭



1. PCR 튜브에 -, +, P1, P2, P3와 같이 5개의 표기를 합니다. 각 관에 본인의 이니셜이나 그룹 번호를 적습니다.
2. 모든 PCR 반응은 다음과 같이 준비됩니다. : 20µL의 프라이머 혼합액(노랑), 5µL의 cDNA 샘플 (-, +, P1, P2, 또는 P3) (빨강), 그리고 PCR EdvoBead™ PLUS 한 개를 적절히 0.2mL PCR 튜브에 첨가합니다.
3. 모든 PCR 샘플을 혼합합니다. PCR EdvoBeads™ PLUS가 완전히 용해되었는지 확인합니다. 참고: 프라이머 혼합액과 cDNA가 함께 섞였는지 확인하기 위해 PCR 튜브 내 혼합물의 색상을 확인합니다. 혼합물은 프라이머와 cDNA가 섞인 주황색이어야 합니다.
4. 샘플을 몇 초간 원심분리하여 튜브의 하단에 샘플이 모이게 합니다.
5. PCR을 사용하여 DNA를 증폭합니다.

Initial denaturation 94°C 3분

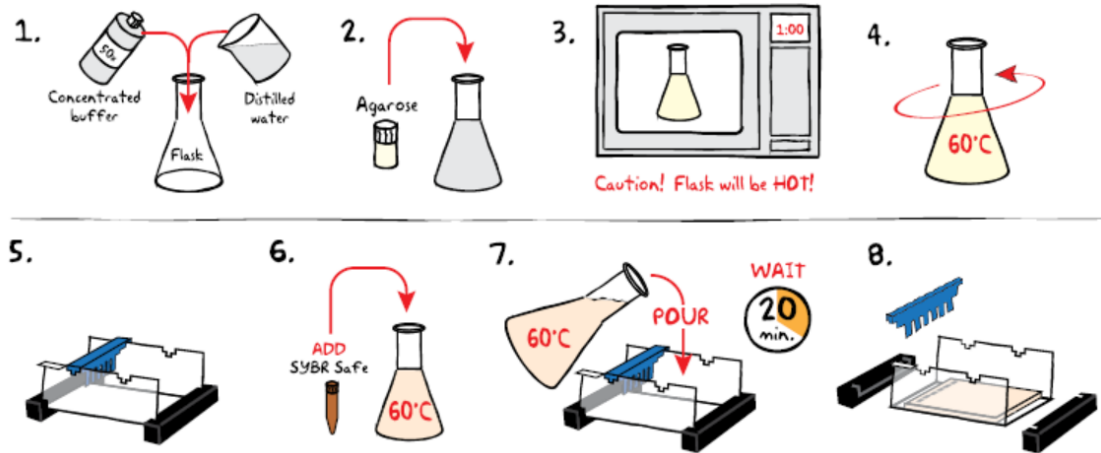
94°C에서 30초	} 30 cycles
55°C에서 30초	
72°C에서 65초	

72°C에서 Final extension 4분

6. PCR완료 후 튜브는 얼음에 꽂아둡니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

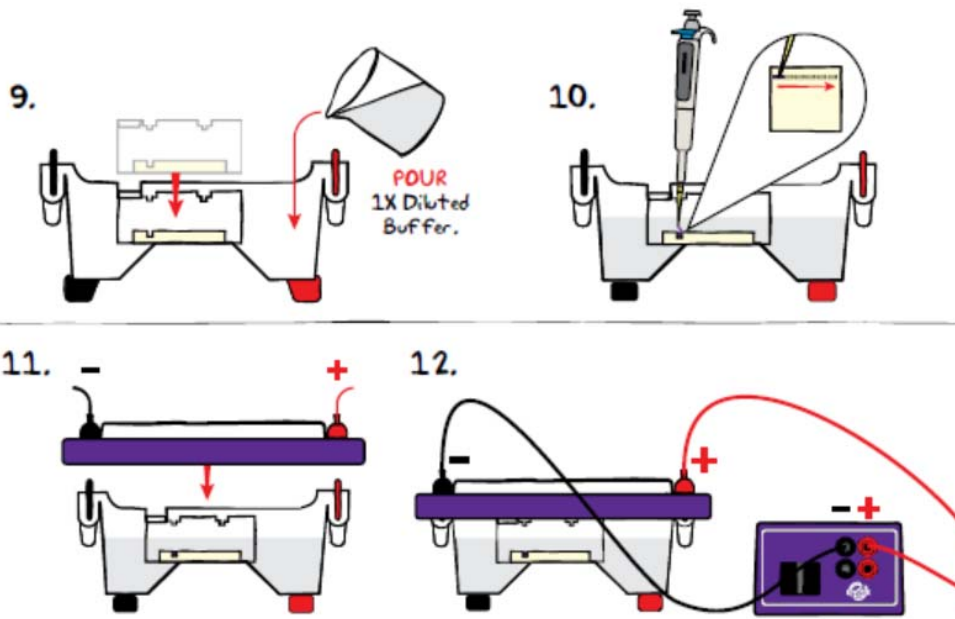
모듈 III: 전기영동을 이용한 PCR 결과물 분리



1. 50X 버퍼와 증류수를 Table A 참조하여 적정용량을 플라스크에 넣고 섞어 희석합니다.
2. 아가로스 분말 적정량을 1X 버퍼가 담긴 250 mL 플라스크에 넣습니다(Table A 참조).
3. 아가로스 분말을 용해시키기 위해 용액을 끓입니다. 1분 동안 전자레인지에서 강력하게 가열한 다음 조심스럽게 플라스크를 꺼내서 흔들어 섞습니다. 아가로스가 완전히 용해될 때까지 15초 간격으로 가열을 계속합니다(용액은 물과 같이 맑아집니다).
4. 플라스크를 주의해서 흔들어 열을 균일하게 퍼뜨린 후, 아가로스를 60°C까지 냉각시킵니다.
5. 아가로스가 냉각되는 동안, 젤 캐스팅트레이의 끝부분을 고무 캡으로 막습니다. 적절한 위치에 comb을 끼워 넣습니다.
6. 60도로 식힌 아가로스에 희석된 SYBR® Safe 염료를 넣고 섞습니다(Table A 참조). **중요:** SYBR® Safe를 아가로스 용액에 첨가하기 전에 반드시 본인 또는 선생님께서 희석하셨는지 확인하세요.
7. 냉각된 아가로스 용액을 젤 캐스팅트레이에 부어 균힙니다. 완전히 굳어지는 데 20분이상 소요됩니다. 젤은 굳어질수록 더 굳고 불투명해집니다.
8. 고무 캡과 comb을 분리합니다. well에 손상을 입히지 않도록 특히 comb 제거 시 주의합니다.

Table A Individual 1.0% UltraSpec-Agarose™ Gel with Diluted SYBR® Safe Stain					
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	Distilled Water	Ant of Agarose	TOTAL Volume	Add DILUTED SYBR® (Step 6)
7 x 7 cm	0.5 mL	24.5 mL	0.25g	25 mL	25 µL
7 x 14 cm	1.0 mL	49.0 mL	0.50 g	50 mL	50 µL

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



9. 젤을 전기영동 챔버에 넣고 1X 전기영동 버퍼(Table B 참조)를 넣어 완전히 잠기게 합니다.
10. Table 3: Gel Loading 참조, 각 샘플을 젤의 well에 마이크로 피펫으로 ~25 µL씩 로딩합니다.
11. 덮개를 덮고 +, - 극을 잘 연결했는지 확인합니다.
12. 전원공급장치에 연결하여 실험을 시작합니다. (전압과 시간은 Table C 참조). 전기영동을 마친 후 장치에서 젤을 꺼냅니다.

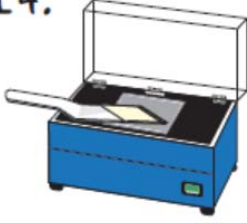
Lane	Sample
1	EdvoQuick™ DNA Ladder
2	Negative Control
3	Positive Control
4	Patient #1 Sample
5	Patient #2 Sample
6	Patient #3 Sample

EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution	
		50x Conc. Buffer	Distilled Water
M6+	300 mL	6 mL	294 mL
M12	400 mL	8 mL	392 mL
M36	1000 mL	20 mL	980 mL

Volts	Recommended Time	
	Minimum	Maximum
150	15 min.	20 min.
125	20 min.	35 min.
70	35 min.	1 hour

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

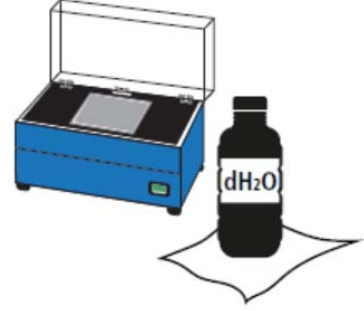
14.



15.



16.



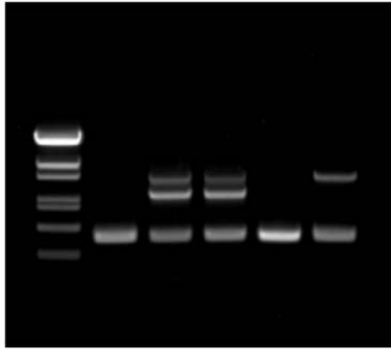
14. 젤을 조심스럽게 트랜스 일루미네이터에 올립니다.

15. 결과를 확인하고 사진을 찍습니다.

16. 사용 후에는 깨끗하게 트랜스일루미네이터를 닦습니다.

Experiment Results and Analysis

MODULE III: SEPARATION OF PCR PRODUCTS BY ELECTROPHORESIS



Includes EDVOTEK's All-NEW EdvoQuick™ DNA Ladder

- Better separation
- Easier band measurements
- No unused bands

EdvoQuick™ DNA ladder sizes:
2640, 1400, 1100, 700, 600, 400, 200

The EdvoQuick™ DNA Ladder in lane 1 makes it possible to measure the size of the amplicons produced by the PCR reactions in lanes 2-6.

Lane	Sample	Sizes	Results
1	EdvoQuick™ DNA Ladder	2640, 1400, 1100, 700, 600, 400, 200	---
2	Negative Control	290	Negative (human control only)
3	Positive Control	290, 715, 1000	Positive (human control and viral proteins)
4	Patient #1 Sample	290, 715, 1000	Positive for SARS-CoV-2
5	Patient #2 Sample	290	Negative for SARS CoV-2
6	Patient #3 Sample	290, 1000	Indeterminate