

# 사용 설명서

**[제품명]** Oncotag MARS1 ICF kit · 세포 및 조직염색시약II · M-CF01

**[허가번호]** 체외제인 21-4487호

**[제조자]** ㈜온코태그디아그노스틱,

경기도 수원시 영통구 창릉대로 256번길 91, 3층 308호

**[포장단위]** 25tests/박스

**[저장방법]** 냉장보관 (2~8°C)

**[구성 및 원재료]**

Catalog No.	Product name	volume	원재료
M-CF01-1	Permeabilized solution	15ml	0.2% Tween 20, NaN <sub>3</sub> , pH7.4
M-CF01-2	Blocking solution	15ml	2% 염소 혈청, NaN <sub>3</sub> , pH7.4
M-CF01-3	MARS1 antibody solution	15ml	MARS1 mouse monoclonal Antibody, NaN <sub>3</sub> , BSA, pH7.4
M-CF01-4	Detection antibody solution	15ml	Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (Alexa Fluor 488), NaN <sub>3</sub> , BSA, pH7.4
M-CF01-5	Mounting Fluid with DAPI	2ml	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)
M-CF01-6	20X washing solution	50ml * 4ea	20X TBST, 1% Tween 20, pH7.4

**[특이도]** 인간 메티오닐-tRNA 합성효소(methionyl-tRNA synthetase 1; MARS1) 단백질에 특이적이다.

**[사용목적]** 슬라이드에 도말된 고정된 사람 세포 검체에서 MARS1 (methionyl-tRNA synthetase 1)을 면역형광염색법 (Immunofluorescence, IF)으로 염색하여 정성하는 체외진단 의뢰기기

**[작용원리]** 본 제품은 슬라이드에 도말된 고정된 사람 세포를 검체로 하여 MARS1 (methionyl-tRNA synthetase 1)이 존재하는 세포를 면역형광염색법 (Immunofluorescence, IF)으로 염색하기 위한 정성검사 체외진단 의뢰기기이다. 면역형광염색법은 특정 단백질의 항원 결정기에 대한 1차 항체를 붙이고 이차적으로 1차 항체에 달라붙는 2차 항체를 붙이는 방법이다. 2차 항체의 끝에는 형광이 붙어 있기 때문에 현미경을 통해 관찰하면 특정 단백질이 세포 내에서 형광으로 염색되어 있는 것을 확인할 수 있다.

**[사용방법]**

## 1. 검체준비 및 저장 방법

- 1) 검체: 슬라이드에 도말된 고정된 사람 세포 (Thinprep 2000 또는 5000으로 준비)
- 2) 검체 고정 방법, 보관 및 해당 장비의 준비과정은 Thinprep (Hologic Inc.) 매뉴얼을 참고한다.
- 3) Thinprep 2000(표본가본장치, I02010.01(1), 서울 체외 수신 01-1360 호) 또는 Thinprep 5000(표본가본장치, I02010.01(1), 서울 체외 수신 10-522 호)에서 준비된 슬라이드 검체만 사용한다.

## 2. 검사 전 준비사항

- 1) 냉장 보관된 제품을 실온에 놓아둔다.
- 2) 20X washing solution (M-CF01-6)은 시약용 증류수를 이용하여 1X로 희석한다.
- 3) 항원복원시약 (Antigen retrieval buffer)은 Citrate-based buffer를 사용하고 제조사 매뉴얼을 참고한다.
- 4) 매뉴얼 염색 시 제공되지 않지만 검사에 필요한 시약 및 기구
  - 시약용 증류수
  - 항원복원시약 (Antigen retrieval buffer): Citrate-based buffer
  - Coplin jar 또는 염색용 jar, Carrier
  - 전자레인지 사용 가능 용기 (항원 복원 시 사용)
  - Stain tray (with black lid)
  - 커버슬라이드
  - 스톱워치/타이머
  - 전자레인지 (700W 또는 1000W)
  - 냉장고
  - 형광현미경: 염색결과를 확인하기 위한 100X~400X 배율의 정립 또는 도립 형광현미경 (Filter: FITC, DAPI)

## 3. 검사과정

본 제품에 대해 권장되는 염색 프로토콜은 다음과 같다.

- ① 검체 슬라이드를 끼운 Carrier를 시약용 증류수가 담긴 jar에 넣어 1회 세척 (dipping 20~30회)하여 고정액의 매탄올 성분을 제거한다.
- ② 검체 슬라이드를 Stain tray에 놓고 Permeabilized solution (M-CF01-1)을 검체 슬

라이드 위에 8~10 방울 도포한 후 뚜껑을 닫고 실온에서 30분간 반응시킨다.

- ③ 도포된 Permeabilized solution (M-CF01-1)을 티슈 위에 가볍게 털어 제거한다.
- ④ 검체 슬라이드는 끼운 Carrier를 Antigen retrieval buffer를 담은 용기에 넣고 전자레인지로 5분동안 끓인 다음 30초 식힘을 2회 반복한다.
- ⑤ 검체 슬라이드를 끼운 Carrier를 각기 다른 1X Washing solution (희석된 M-CF01-6)이 담긴 jar에 넣어 5분씩 3회 세척한다.
- ⑥ 검체 슬라이드를 Stain tray에 놓고 Blocking solution (M-CF01-2)을 8~10 방울 도포한 후 뚜껑을 닫고 실온에서 1시간 반응시킨다.
- ⑦ Blocking solution (M-CF01-2)이 도포된 슬라이드 위에 MARS1 antibody solution (M-CF01-3)을 8~10 방울 도포한 후 뚜껑을 닫고 1시간 반응시킨다.
- ⑧ 도포된 MARS1 antibody solution (M-CF01-3)을 티슈 위에 가볍게 털어 제거한다.
- ⑨ 검체 슬라이드를 끼운 Carrier를 각기 다른 1X Washing solution (희석된 M-CF01-6)이 담긴 jar에 넣어 5분씩 3회 세척한다.
- ⑩ 검체 슬라이드를 stain tray에 놓고 Detection antibody solution (M-CF01-4)을 8~10 방울 도포한 후 뚜껑을 닫고 1시간 반응시킨다.
- ⑪ 도포된 Detection antibody solution (M-CF01-4)을 티슈 위에 가볍게 털어 제거한다.
- ⑫ 검체 슬라이드를 끼운 Carrier를 1X Washing solution (희석된 M-CF01-6)이 담긴 jar에 넣어 5분 1회 세척한다.
- ⑬ 검체 슬라이드에서 잔여 Washing solution을 충분히 제거하고 슬라이드가 완전히 건조되지 않은 상태에서 Mounting Fluid with DAPI (M-CF01-5)를 검체슬라이드에 한 두 방울 떨어뜨려 커버슬라이드를 덮어 봉입한다.
- ⑭ 잔여 Mounting Fluid with DAPI (M-CF01-5)를 티슈로 제거하고 실온에서 24시간동안 빛을 차단하여 보관하여 봉입제를 건조시킨다.
- ⑮ 형광현미경으로 슬라이드를 검경한다.

## 4. 결과판정

본 제품은 MARS1의 항원부위에서 녹색의 형광 발현을 나타낸다. 이는 형광현미경 FITC filter를 통해서 확인할 수 있다. 결과를 해석하기 전에 경험과 자격을 갖춘 병리학자가 반드시 양성 및 음성 대조물질을 평가해야 한다. 음성의 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하지만, 분석한 세포 혹은 조직에 항원이 존재하지 않는 것을 의미하지는 않는다. 결과 해석은 자격을 갖춘 전문가에 의해 환자의 병력 및 다른 진단 검사 및 임상적 소견과 함께 판단되어야 한다.

### 1) 양성 Test 결과 (Positive Test Results)

녹색 세포질 면역 형광 염색이 하나 이상의 세포에서 존재하고, 같은 세포의 핵이 파란색으로 형광 염색된 경우 본 제품의 검사 결과는 양성으로 간주된다.

### 2) 음성 Test 결과 (Negative Test Results)

녹색 세포질 면역 형광 염색 없이 세포핵이 파란색으로 형광 염색된 경우 본 제품의 검사 결과는 음성으로 간주된다.

## 5. 정도관리절차 (Quality Control)

세포 검체의 고정 (fixation) 및 슬라이드 제작 과정 및 보관, 염색 후 슬라이드 검경 시기 등이 권고되는 절차와 차이가 있는 경우 결과에 상당한 변이를 초래할 수 있다. 처리 문제 또는 불안정 때문에 일어나는 제품의 오작동은 명확한 표시가 나타나지 않는다. 그러므로 적절한 양성 및 음성 대조물질을 환자의 검체와 동시에 실험해야 한다.

### 1) 양성 대조물질 (Positive Control)

환자 검체와 동일한 방식으로 처리된 검체를 양성 대조물질로 사용한다. 양성 대조물질의 예시로 담도암 (cholangiocarcinoma) 세포가 있다. 양성 대조물질은 테스트 검체의 특정 진단을 결정하기 위한 도움이 아닌 시약의 성능을 모니터링하기 위해서만 사용되어야 한다. 만약 양성 대조물질이 양성 염색이 나타나지 않으면, 검사 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 한다.

### 2) 음성 대조물질 (Negative Control)

정상적인 담도 세포는 MARS1 염색을 나타내지 않기 때문에 음성 조직 대조물질로 사용할 수 있다.

## 6. 검사의 한계 (Limitations)

- 1) 전문가 전용으로 사용한다. 면역형광염색 검사과정의 대한 전문적인 교육을 받아야 한다.
- 2) 본 제품을 사용하여 염색된 슬라이드는 반드시 자격을 갖춘 병리학자가 환자의 병력 및 다른 진단 검사 및 임상적 소견과 함께 해석해야 한다.
- 3) 검체의 채취는 전문가에 의해서 행해져야 한다.
- 4) 본 제품으로 염색된 슬라이드는 반드시 빛이 차단된 상태에서 보관되어야 하며, 시간이 지날수록 형광이 감소하므로 염색 후 빠른 시간 내에 검경해야 한다.
- 5) 염색 전 검체의 전처리 및 슬라이드 제작 오류에 따른 위양성 및 위음성 결과를 초래할 수 있다.
- 6) 형광현미경의 광원 및 렌즈의 관리 상태에 의해 결과 해석이 달라질 수 있다.

므로 정도관리된 형광현미경으로 검경해야 한다.

- 7) 형광현미경 FITC, DAPI 필터가 반드시 필요하다.
- 8) 권장되는 염색 프로토콜 외의 과정을 따른 사용자는 결과 해석에 책임을 져야 한다.

**[사용시 주의사항]**

- 1) 체외진단용으로만 사용해야 한다.
- 2) 전문가 (의료인 포함)만이 사용할 수 있다.
- 3) 사용기간이 지난 시약은 사용하지 않는다.
- 4) 실험실 안전 및 생물학적 위험물질 취급 시 안전 등의 주의사항
  - 시약을 취급할 때 규정된 예방책을 따른다. 발암물질로 의심되거나 유독성 물질을 취급할 때에는 보호복이나 장갑을 착용한다.
  - 환자의 검체 (patient specimens)와 그것과 접촉된 모든 물질들은 생물학적 유해물질로 간주하며, 관련 규정에 따라 적절하게 취급되어야 한다.
  - 생물로부터 유래된 (biological source) 모든 물질은 잠재적인 생물학적 유해물질로 간주하며, 관련된 규정에 따라 적절하게 취급되어야 한다.
- 5) 일반적 주의
  - 눈과 점막에 시약의 접촉을 피한다. 만약 민감한 부위에 시약이 닿으면 물로 충분히 세척한다.
  - 시약의 미생물 오염을 피해야 한다. 이는 부정확한 결과를 초래할 수 있다.
  - 보존제로 함유되어 있는  $\text{NaN}_3$ 는 피부 및 눈에 과도하게 노출되는 경우 상부호흡기와 점막에 자극을 줄 수 있지만, 본 시약에 함유된  $\text{NaN}_3$ 의 농도는 0.1% 이하이다.
  - 개인적인 민감도에 따라 전신성 알러지 반응이 발생할 수 있다.
- 6) 적용상의 주의사항
  - 시약을 사용하기 전에 사용설명서를 읽고 사용한다.
  - 본 시약의 사용방법은 Thinprep 2000 또는 Thinprep 5000으로 제작된 검체를 기준으로 설정되었다. 다른 장비 또는 도말방법으로 제작된 검체를 사용할 때에는 검증이 필요하다.
- 7) 검체를 고정, 도말하는 장비인 Thinprep 2000 또는 Thinprep 5000과 판독을 위한 형광현미경의 사용설명서를 읽고 사용한다.

**[성능]**

**1. 민감도**

본 제품의 민감도는 세포 배양 후 고정되어 슬라이드 제작기기에 의해 제작된 세포 슬라이드의 염색 상태를 관찰하여 평가하였다. 사람 암에서 유래된 다양한 세포주 18종에 대한 민감도는 다음 표와 같다.

Cell line	# Positive	# Total	Cell line	# Positive	# Total
G-415	3	3	TFK-1	3	3
Huh-28	3	3	EG1-1	3	3
TKKK	3	3	SCK	0	3
YSCCC	2	3	SNU-245	3	3
TGBC1TKB	3	3	SNU-308	3	3
TGBC2TKB	3	3	SUU-478	3	3
TGBC14TKB	3	3	SNU-869	0	3
TGBC24TKB	3	3	SNU-1079	3	3
Hucc-T1	3	3	SNU-1196	3	3

**2. 특이도**

본 제품의 특이도는 세포 배양 후 고정되어 슬라이드 제작기기에 의해 제작된 세포 슬라이드의 염색 상태를 관찰하여 평가하였다. Mouse에서 유래된 세포주 2종에 대한 특이도는 다음 표와 같다.

Cell line	# Negative	# Total	Cell line	# Negative	# Total
NIH3T3	3	3	CT26	3	3

**3. 정밀도**

날짜 내 반복성 (Intra-Day Repeatability), 날짜 간 정밀도 (Inter-Day Precision), Lot간 정밀도 (Lot-to-Lot Precision), 검사실간 재현성 (Inter-Site Reproducibility) 판독자간 판독결과 일치성 (Inter-Reader agreement)을 시험한 결과 양성 일치율 100%, 음성 일치율 100%, 전체 일치율 100%의 결과를 보였다.

**[보관방법]**

M-CF01은 사용 후 2-8°C로 즉시 복귀 해야하며, 얼리지 않아야 한다. 바이알 레이블에 표시된 사용기한 이후에는 사용하지 않는다. 비특이적 염색을 방지하기 위해 시약의 미생물 오염을 최소화하여야 한다.

**[생물학적 제품에 대한 취급자 주의사항]**

이 시약은 세포 배양 상등액으로부터 준비된 생물학적 제품이므로 취급 시 적절한 주의가 필요하다. 이 시약에는  $\text{NaN}_3$ 가 포함되어 있다. 모든 폐기물의 폐기는 기관의 지침 및 규정에 따른다. 취급상의 문제 또는 불안정성으로 인한 제품의 오작동은 명백한 징후가 나타나지 않는다. 따라서 품질 관리 수단으로서 양성 및 음성 대조군 염색을 환자 표본과 동시에 수행해야 한다.

**[참고문헌]**

1. Sung Ill Jang et al, New staining method using methionyl-tRNA synthetase 1 antibody for brushing cytology of bile duct cancer. *Gastrointest. Endosc.* 2020; 92:310-9
2. Sunghoon Kim et al, Aminoacyl-tRNA synthetases and tumorigenesis: more than housekeeping. *Nat. Rev. Cancer.* 2011, 11:708-718.
3. Jie Hu et al., Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network. *Analysis. Nat. Biotechnol.* 2013, 31: 522-529.
4. Eun Young, Kim. et al., Methionyl-tRNA synthetase overexpression is associated with poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2017. 17: 467.
5. Davendra. P.S. Sohail et al., Molecular characteristics of biliary tract cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016, 107: 111-118.
6. Nam Hoon Kwon et al., Stabilization of cyclin-dependent kinase 4 by methionyl-tRNA synthetase in p16INK4a-negative cancer. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2018, 1: 21-31.
7. Nam Hoon Kwon et al., Aminoacyl-tRNA synthetases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2019, 18: 629-650.
8. Shirley M. Bluethmann et al., Anticipating the "Silver Tsunami": Prevalence trajectories and comorbidity burden among older cancer survivors in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2016, 25:1029-1036.
9. Grand View Research. *Histology and Cytology Market. Market, by Study (Cytology, Histology) and by Cytology (Cervical Cancer, Breast Cancer, Pancreatic Cancer, Bladder Cancer, Bile Duct Cancer), 2017.*
10. Ming-ming Xu, Amrita Sethi. *Diagnosing biliary malignancy. Gastrointest Endosc. Clin. N. Am.* 2015, 25: 677-90.
11. Zaree Babakhanian et al., *Clinics Review Articles. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America: Endoscopic approach to the patient with biliary tract disease. Editor: Jacques Van Dam, 2013. Vol 23.*
12. In Woong Han et al., Ceruloplasmin as a prognostic marker in patients with bile duct cancer. *Oncotarget.* 2017, 8: 29028-29037.
13. Udayakumar Navaneethan et al., Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest. Endosc.* 2015, 81: 168-176.

**[기호설명]**

	체외진단용 의료기기		제조번호
	카탈로그 번호		사용설명서 참조
	보관온도		유효기간
	테스트 회수		제조원

**[개정연월]** 2022.01

