사 용 설 명 서

[제 품 명] Oncotag MARS1 antibody (for IHC) · 세포 및 조직염색시약 II · M-HC01
[허가번호] 체외 제인 20-4343호
[제 조 자] ㈜온코태그디아그노스틱,
경기도 수원시 영통구 창룡대로 256번길 91 에이스광교타워 2차 308호
[포장단위] 1개/박스
[저장방법] 냉장보관 (2~8℃)
[원 재 료] 0.09 % NaN_3, 안정화 단백질 및 인산염 완충 생리 식염수 pH 7.4를 함유하는 단클론 마우스 항 인간 MARS1 항체, 클론 34-8F2
[특 이 도] 인간 메티오닐-tRNA 합성효소 (methionyl-tRNA synthetase 1; MARS1) 단백질에 특이적이다.
[Ig Class] IgG2a
[항체농도] 0.2mg/ml
[사용목적] 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 사람조직 절편에서 methionyl-tRNA synthetase 1 (MARS1)를 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)으로 염색하여 정성하는 체외진단의료기기
[작용원리] 본 제품은 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 사람조직절편을 검체로 하여 methionyl-tRNA synthetase 1 (MARS1)가 존재하는 조직을 면역조직화학염색법 (Immunohistochemistry)으로 염색하기 위한 1차 항체로 정성검사 체외진단 의료기기이다. 면역조직화학염색법 (IHC) 기술은 항원에 특정항체 (제 1차 항체)를 결합시키고, 제 1차 항체에 제 2차 항체를 결합한 후, 발색기질을 갖는 물질로 표시한 효소 복합체가 결합하는 연속적인 반응을 통해서 항원을 가시화 하는 방법이다. 이렇게 형성된 항원-항체 복합체는 광학현미경을 사용하여 해석될 수 있고, 특정 항원에 대한 연관이 있는지 없는지 병태 생리학적 과정의 감별진단에 도움이 된다.

[사용방법]

1. 검체준비 및 저장 방법
   1) 검체: 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직절편 (Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue Samples)
   2) 조직 검체는 10% 중성 포르말린 완충제(neutral-pH, phosphate-buffered formalin)로 8시간 이상 고정할 것을 권장한다.[1)]
   3) 잘라낸 조직 부위의 항원성은 시간이 지나면 사라질 수 있으므로, 슬라이드는 즉시 염색해야 한다.
   4) 양성 및 음성 control은 담도암 (cholangiocarcinoma) 및 정상적인 담도 조직을 사용하고 검사 절편과 동시에 시험할 것을 권장한다.
   5) Enzyme/HIER (heat-induced epitope retrieval): 탈파라핀 및 포르말린 고정된 조직 절편의 최적의 염색결과는 항체와 반응시키기 전에 단백질 분해 효소 또는 적절한 버퍼에 담군 후 열처리가 필요하다. 전처리 및 뒤따르는 면역화학염색을 진행하는 동안 조직 절편이 건조되지 않도록 한다
2. 검사 전 준비사항
   1) 희석: 이 항체는 1:100에서 1:400의 희석 비율로 희석되어 사용될 수 있다. 적절한 희석 비율은 표본과 준비 방법에 따라 다를 수 있으므로 각 기관에서 결정한다.
   2) 본 제품은 자동화장비 또는 매뉴얼로 사용할 수 있다, 해당 장비의 준비과정은 장비매뉴얼을 참고한다.
   3) 자동화염색장비: 본제품은 Benchmark ULTRA (표본가공기, A33030.01, 서울 수신 08-517호)에 대하여 사용방법이 설정되었다. 사용자는 타 자동화염색장비에 대해서 반드시 본 시약으로 얻은 결과의 유효성을 확인해야 한다.
   4) 매뉴얼 염색 시 제공되지 않지만 검사에 필요한 시약 및 기구
      • PBS (Phosphate buffered saline)
      • PBST (Phosphate buffered saline-Tween20)
      • 증류수, Xylene, Ethanol
      • Antigen retrieval buffer
      • anti-Mouse IgG(H+L) secondary antibody-HRP
      • Bovine serum albumin (BSA)
      • Coplin jar 나 조직학 염색용 jar, stain box
      • Mayer's hematoxylin
      • Histomount Mounting Solution
      • DAB substrate
      • 흄 후드
      • 60 ℃ 건조기
      • Micro cover glass
      • 현미경: 염색결과를 확인하기 위한 40X~400X 배율의 정립 또는 도립광학현미경
   5) 자동화기기 염색시 제공되지 않지만 검사에 필요한 시약 및 기구
      • EZ Prep (VENTANA #950-102)
      • Cell Conditioning-CC1 (VENTANA #950-124)
      • Optiview DAB IHC detection kit (VENTANA #760-700)
      • Hematoxylin II (VENTANA #790-2208)
      • Bluing Reagent (VENTANA #760-2037)
      • Ethanol, Xylene
      • Histomount Mounting Solution (Thermo Fisher #008030)
      • 현미경: 염색결과를 확인하기 위한 40X~400X 배율의 정립 또는 도립광학현미경
3. 검사과정
   1) 본 항체는 특정 배양시간에 최적화되었다. 그러나 사용자는 반드시 본 시약으로 얻은 결과의 유효성을 확인해야 한다.
   2) 자동화기기의 염색: 염색기의 프로토콜에 대한 설정 값은 기기의 화면에 표시 및 인쇄되고 장비의 사용설명서에 있는 절차에 따라서 편집될 수 있다. BenchMark ULTRA IHC/ISH 슬라이드 자동 염색기에서 Optiview DAB IHC Detection Kit 를 사용하는 본 제품에 대해 권장되는 염색 프로토콜은 다음과 같다. 관련된 IHC 염색 절차에 관한 자세한 설명은 Optiview DAB IHC Detection Kit의 사용설명서를 참조해야 한다.
      ① 포르말린에 고정한 파라핀 포매 조직 block 검체를 3-4μm 두께로 slice하여 절편을 양전하슬라이드위에 붙이고 53-65℃의 오븐에서 20분 동안 가열하여 슬라이드에 붙인다. 절편을 붙인 슬라이드는 냉장보관한다.
      ② Slide Name과 Protocol에 따른 바코드를 부착한다.
      ③ 장비 (BenchMark ULTRA; ROCHE/VENTANA MEDICAL SYSTEM, INC)를 작동시킨다.
      ④ EZ Prep 시약으로 75℃에서 탈 파라핀을 수행한다. (약 40분~1시간 소요)
      ⑤ Cell Conditioning-CC1시약을 95℃에서 32분동안 반응시켜 항체의 결합력을 향상시키는 항원복원 과정을 수행한다.
      ⑥ Optiview Peroxidase Inhibitor시약을 37℃에서 4분동안 반응시켜 내재된 peroxidase를 blocking한다.
      ⑦ Oncotag MARS1 antibody (for IHC) [M-HC01]을 PBS로 1:400 희석하여 37℃에서 32분동안 반응 시킨다.
      ⑧ Optiview HQ universal linker시약을 37℃에서 8분동안 반응 시킨다.
      ⑨ Optiview HRP Multimer시약을 37℃에서 8분동안 반응 시킨다.
      ⑩ Optiview H_2O_2 + DAB시약을 37℃에서 8분동안 반응시켜 DAB 발색 시킨다.
      ⑪ Optiview Copper시약을 37℃에서 4분동안 반응시켜 DAB 색을 Reddish-Brown으로 만든다.
      ⑫ Hematoxylin II시약으로 37℃에서 4분동안 대조염색을 진행한다.
      ⑬ Bluing Reagent시약으로 37℃에서 4분동안 대조염색을 청색화 시킨다.
      ⑭ 슬라이드를 흐르는 물에 수세한다.
      ⑮ 탈수와 투명 (EtOH (80%) → EtOH (90%) → EtOH (100%) → Xylene) 후 Histomount Mounting Solution으로 봉입 한다.
      ⑯ 현미경으로 검경한다.
   3) 매뉴얼 염색 시 사용하는 본 제품에 대해 권장되는 염색 프로토콜은 다음과 같다.
      ① Deparaffin
      · 준비된 slide를 slide carrier 에 꽂고 60 ℃ 건조기에서 40 분간 paraffin을 1차 제거한다.
      · Slide carrier를 각각의 염색 jar에 담긴 3개의 Xylene 에 7 분씩, 2개의 100% EtOH, 2개의 95% EtOH, 1개의 80% EtOH, 1개의 70% EtOH은 각각 3분씩 넣고 paraffin을 2차 제거한다.
      · Paraffin 제거가 완료된 slide carrier를 3차 증류수로 수세한다.
      ② Endogenous Peroxidase Blocking
      · 0.3% H_2O_2/D.W를 냉장고에서 염색 15분 전 실온에 꺼내어 염색 jar에 담아 놓는다.
      · Slide Carrier를 0.3% H_2O_2/D.W에 넣고 실온에서 15분간 반응시킨다.
      · 3차 증류수로 수세한다.
      ③ Antigen Retrieval
      · Slide를 끼운 Carrier를 antigen retrieval buffer에 넣고 전자레인지를 5분간 3회 가열한다.
      · Antigen retrieval buffer가 식은 후 Slide carrier를 3차 증류수가 담긴 염색 jar에 옮겨서 수세한다.
      ④ Nonspecific binding 단계: slide를 stain box 위에 올려놓고 4% BSA/PBST를 한 slide당 300㎕씩 분주한 뒤 뚜껑을 닫고 상온에서 30분 반응시킨다.
      ⑤ 1X PBST에 1분 동안 수세한다.
      ⑥ PBS에 Oncotag MARS1 antibody (for IHC) [M-HC01]을 1:400 희석하여 각 slide 당 300㎕를 분주한 뒤 60분 반응시킨다.
      ⑦ Slide를 carrier에 넣은 다음 각기 다른 1X PBST에 5분씩 3회 수세한다.
      ⑧ anti-Mouse IgG (H+L) secondary antibody-HRP를 각 slide 당 300㎕를 분주한 뒤 30분 반응시킨다.
      ⑨ Slide를 carrier에 넣은 다음 각기 다른 1X PBST에 5분씩 3회 수세한다.
      ⑩ Development 단계: DAB 용액에 1분 반응시킨다.
      ⑪ Tap water에 10분 동안 수세한다.
      ⑫ Counter stain 단계: Mayer's hematoxylin에 3분 반응시킨다.
      ⑬ Tap water에 10분 동안 수세한다.
      ⑭ 탈수 후 봉입 한다.
      ⑮ 현미경으로 검경한다.
4. 결과판정

   결과를 해석하기 전에 경험과 자격을 갖춘 병리학자가 반드시 양성 및 음성 대조물질을 평가해야 한다. 양성염색의 강도는 음성컨트롤의 비특이적인 배경염색 (background staining)의 조건에서 평가되어야 한다. 어떠한 면역조직화학적 검사와 마찬가지로, 음성의 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하지만, 분석한 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)
      갈색 세포질 면역 염색이 조직에서 존재할 경우, 본 제품의 검사 결과는 양성으로 간주된다.

2) 음성 Test 결과 (Negative Test Results)

갈색 세포질 면역 염색을 나타내는 조직이 없는 경우, 본 제품의 검사 결과는 음성으로 간주된다.

5. 정도관리절차 (Quality Control)

검체의 고정 (fixation) 및 추가적인 processing 과정에서 권고되는 절차와 차이가 있는 경우 결과에 상당한 변이를 초래할 수 있다. 처리 문제 또는 불안정 때문에 일어나는 제품의 오작동은 명확한 표시가 나타나지 않는다. 최적의 검사는 테스트 조직과 동일한 슬라이드에 양성 대조물질 절편을 포함하는 것이다. 이를 통해 슬라이드에 시약을 도포할 때 발생하는 모든 failures를 식별할 수 있다. 약양성 염색 조직이 정도 관리에 가장 적합하다. 대조물질 조직은 양성 및 음성 염색 요소 모두를 포함할 수 있으며 양성 및 음성 대조 물질로써 모두 사용할 수 있다. 대조물질 조직은 신선한 부검, 생검 또는 수술 표본이어야 하며, 검사 절편과 동일한 방식으로 가능한 빠르게 준비되거나 고정되어야 한다. 알려진 양성 조직 대조물질은 검사 검체의 특정 진단을 결정하기 위한 도움이 아닌 시약과 검사 기기의 성능을 모니터링 하기 위해서만 사용되어야 한다. 만약 양성 조직 대조물질이 양성 염색이 나타나지 않으면, 검사 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 한다. 양성 조직 대조물질의 예시로 담도암 (cholangiocarcinoma) 조직이 있다. 염색이 존재할 때, 종양 세포는 반점이 있거나 세포질이나 막에 분산된 MARS1 염색을 나타내며, 부분적이거나 주변을 둘러싼 형태일 수 있다. 정상적인 담도 조직은 MARS1 염색을 나타내지 않기 때문에 음성 조직 대조물질로 사용할 수 있다.

6. 검사의 한계 (Specific Limitation)

1) 조직학적 검체는 수집 후 24시간 이내에 10% 중성 포르말린 완충제(neutral-pH, phosphate-buffered formalin)로 8시간 이상 고정한다.

2) 조직 두께는 약 3-4μm의 두께로 잘라 양전하를 띠는 슬라이드에 올려야 한다.

3) 면역조직화학염색은 적절한 시약선택, 조직 선택, 고정, 가공, 면역조직화학 슬라이드 준비 및 염색 결과의 판독의 전문적인 교육이 필요한 여러 단계의 진단과정이다.

4) 조직 염색은 염색 전의 조직의 처리와 가공에 따라 달라진다. 부적절한 고정, 냉동, 해동, 세척, 건조, 가열, 절단, 다른 조직이나 액체와의 오염은 불순물을 만들거나, antigen trapping, 위음성 결과를 나타낼 수 있다. 불일치결과는 고정 및 포매 방법의 변화 또는 조직 내 고유의 불규칙성으로 인해 발생할 수 있다.

[사용시 주의사항]

1. 체외진단용으로 사용해야 하며 전문가 (의료인 포함)가 사용해야 한다.
2. 시약을 취급할 때 규정된 예방책을 따른다. 발암물질로 의심되거나 유독성 물질을 취급할 때에는 보호복이나 장갑을 착용한다. (예: Xylene)
3. 눈과 점막에 시약의 접촉을 피한다. 만약 민감한 부위에 시약이 닿으면 물로 충분히 세척한다.
4. 환자의 검체 (patient specimens)와 그것과 접촉된 모든 물질들은 생물학적 유해물질로 간주하며, 관련 규정에 따라 적절하게 취급되어야 한다.
5. 시약의 미생물 오염을 피해야 한다. 이는 부정확한 결과를 초래할 수 있다.
6. 농축된 시약은 사용자에 의해 적절하게 희석되어야 한다. 본 제품의 희석조건은 1X PBS에서 입증되었다. 다른 희석액의 경우는 사용자에 의해 시약의 호환성이 입증되어야만 한다.
7. 보존제로 함유되어 있는 NaN_3는 피부 및 눈에 과도하게 노출되는 경우 상부호흡기와 점막에 자극을 줄 수 있지만, 본 시약에 함유된 NaN_3의 농도는 0.1% 이하이다. 개인적인 민감도에 따라 전신성 알러지 반응이 발생할 수 있다.
8. 생물로부터 유래된 (biological source) 모든 물질은 잠재적인 생물학적 유해물질로 간주하며, 관련된 규정에 따라 적절하게 취급되어야 한다.

[성 능]

1. 민감도

본 제품을 사용하여 담도암 파라핀 포매 조직슬라이드와 종양 Tissue array를 IHC 염색하여 확인한 민감도는 다음 표와 같다. (총 종양 조직 검체 수: 617개)

Tissue type	# Positive	#Total	Tissue type	# Positive	#Total
Bile duct	10	10	Nose	4	4
Abdominal cavity	2	2	Ovary	43	49
Bladder	6	7	Pancreas	47	47
Bone	9	9	Pancreatic gland	3	3
Breast	44	46	Peritoneum	1	1
Cartilage	0	1	Prostate	46	47
Cerebellum	1	3	Rectum	3	6
Cerebrum	14	16	Retroperitoneum	2	5
Cervix	2	2	Skeletal muscle	0	1
Cheek	1	1	Skin	7	8
Colon	47	48	Small intestine	2	2
Esophagus	11	11	Smooth muscle	0	1
Eye	2	3	Soft tissue	2	2
Gallbladder	5	5	Spleen	1	1
Gingiva	1	1	Stomach	45	45
Kidney	8	16	Testis	5	5
Larynx	28	28	Thyroid	5	7
Lip	2	2	Thyroid gland	4	4
Liver	43	46	Tongue	3	3
Lung	52	57	Upper jaw	2	2
Lymph node	12	12	Uterus	44	44
Nerve	0	1	Uterine cervix	3	3

2. 특이도

본 제품을 사용하여 담도 파라핀 포매 조직 슬라이드와 정상 Tissue array를 IHC 염색하여 확인한 특이도는 다음 표와 같다. (총 정상 조직 검체 수: 329개)

Tissue type	# Negative	# Total	Tissue type	# Negative	# Total
Bile duct	3	3	Pancreas	0	14
Adrenal	0	3	Pericardium	2	2
Adrenal gland	0	6	Peripheral Nerve	3	3
Bone marrow	5	9	Pituitary	0	3
Breast	0	8	Placenta	2	3
Cardiac pericardium	2	2	Prostate	1	9
Cerebellum	0	9	Salivary gland	0	6
Cerebrum	3	17	Skeletal muscle	6	6
Cervix	3	6	Skin	7	10
Colon	2	11	Small intestine	1	9
Esophagus	5	13	Spleen	5	9
Eye	4	8	Stomach	0	9
Heart	11	14	Striated muscle	3	3
Hypophysis	0	6	Testis	0	14
Kidney	0	17	Thymus	1	3
Larynx	1	3	Thymus gland	5	6
Liver	14	14	Thyroid	0	2
Lung	10	13	Thyroid gland	5	6
Lymph node	1	9	Tongue	1	3
Mesothelial Cell	0	1	Tonsil	0	9
Nerve	5	5	Uterus	5	10
Ovary	12	13			

3. 정밀도

날짜 내 반복성 (Intra-Day Repeatability), 날짜 간 정밀도 (Inter-Day Precision), Lot간 정밀도 (Lot-to-Lot Precision), 검사실/장비간/사람간 재현성 (Inter-Site/Inter-Instrument /Inter-Tester Reproducibility)을 시험한 결과 양성 일치율 100%, 음성 일치율 100%, 전체 일치율 100%의 결과를 보였다.

[보관방법] 사용 후 2-8℃로 즉시 복귀하시오. 바이알 레이블에 표시된 사용기한 이후에는 사용하지 마시오. 비특이적 염색을 방지하기 위해 시약의 미생물 오염을 최소화 하시오.

[생물학적 제품에 대한 취급자 주의사항]

이 시약은 세포 배양 상등액으로부터 준비된 생물학적 제품이므로 취급 시 적절한 주의가 필요하다. 이 시약에는 NaN_3가 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. Fan Lin and Jianhui Shi, Handbook of Practical Immunohistochemistry 2nd ed. 2015 Chapter 2. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry; ISBN 978-1-4939-1577-4
2. Clive R. Taylor and Lars Rudbeck, Education Guide; Immunohistochemical Staining Methods, Sixth Edition, 2013, Dako Denmark A/S
3. David P. Bishop et al, A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging. Chem. Soc. Rev., 2018,47, 3770-3787
4. Kwon, N. H. et al., Stabilization of cylin-dependent kinase 4 by Methionyl-tRNA synthetase in 16INK4a-negative cancer. ACS Pharmacol & Transl. Sci. 2018. In press.
5. EY, K. et al., Methionyl-tRNA synthetase overexpression is associated with poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. BMC Cancer, 2017. 17(17): p. 467.
6. LI, L. et al., Integrated Omic analysis of lung cancer reveals metabolism proteome signatures with prognostic impact. Nat. Commun. 2014. 5: p. 5469
7. Forus, A. et al., The protooncogene CHOP/GADD153, involved in growth arrest and DNA damage response, is amplified in a subset of human sarcomas. Cancer Genet. Cytogenet., 1994. 78(2): p. 165- 71.
8. Nilbert, M. et al., Characterization of the 12q13-15 amplicon in soft tissue tumors. Cancer Genet. Cytogenet., 1995. 83(1): p. 32-6.
9. Palmer, J.L. et al., Cytogenetic and molecular genetic analysis of a pediatric pleomorphic sarcoma reveals similarities to adult malignant fibrous histiocytoma. Cancer Genet. Cytogenet., 1997. 95(2): p. 141-7.
10. Reifenberger, G. et al., Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. Cancer Res., 1996. 56(22): p. 5141-5.
11. Birch, J. et al., The initiator methionine tRNA drives cell migration and invasion leading to increased metastatic potential in melanoma. Biol Open, 2016. 5(10): p. 1371-1379.
12. Pavon-Eternod, M. et al., Overexpression of initiator methionine tRNA leads to global reprogramming of tRNA expression and increased proliferation in human epithelial cells. RNA, 2013. 19(4): p. 461-6.

[기호설명]

IVD	체외진단용 의료기기	LOT	제조번호
REF	카탈로그 번호		유효기간
	보관온도		

IVD

[개정년월] 2022.01.