

2020/01

PAXgene®

Blood RNA Kit 안내서

버전 2



50(카탈로그 번호: 762174)

R3 **MAT** 1120409KR

REF 762174

IVD



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
QIAGEN GmbH 가 PreAnalytiX 를 대행 생산

등록 상표: PAXgene®, PreAnalytiX™ (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (QIAGEN 그룹); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

PAXgene Blood RNA Kit 가 모든 국가에 제공되지는 않습니다. 문의해 주십시오.

한정 라이선스 계약

PAXgene Blood RNA Kit 의 구매자나 사용자가 이 제품을 사용하면 곧 다음 조건에 동의한다는 것을 의미합니다.

1. PAXgene Blood RNA Kit 는 오직 PAXgene Blood RNA Kit 사용 지침(안내서)에 따라 그리고 키트에 포함된 구성품과 함께만 사용해야 합니다. PreAnalytiX 는 이 PAXgene Blood RNA Kit 안내서 및 www.PreAnalytiX.com 에서 볼 수 있는 추가 프로토콜에 설명된 경우를 제외하고는 이 키트에 포함된 구성품을 이 키트에 포함되지 않은 구성품과 함께 사용하거나 통합할 수 있는 그의 지적재산권 하의 어떤 라이선스도 허여하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 PreAnalytiX 는 본 키트 및/또는 본 키트의 사용이 제 3 자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 본 키트 및 해당 구성품은 1 회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. PreAnalytiX 는 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 않는에 동의합니다.
6. PreAnalytiX 는 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.PreAnalytiX.com 을 참조합니다.

조건부 판매

이 제품은 제품을 사용하여 PAXgene Blood RNA Tube 의 검체 수집 과정에서 형성된 핵산 복합체를 처리할 수 있는, US-7,270,953 및 US-7,682,790, EP-1820793 B1 등의 청구항 그리고 상기 특허 청구항에 해당하는 외국의 제도에 따른 라이선스와 함께 제공됩니다.

HB-0101-006 BD-8945 1120409KO © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, all rights reserved.

PreAnalytiX Company
PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse
CH – 8634 Hombrechtikon
스위스
www.PreAnalytiX.com

PreAnalytiX 판매점

PreAnalytiX 제품은 QIAGEN 또는 BD 가 PreAnalytiX 를 대행하여 제조하고 PreAnalytiX 를 대행하여 판매합니다. 제품은 PreAnalytiX GmbH 에서 주문할 수 없습니다.


현지 PreAnalytiX 판매점을 보려면 마지막 페이지의 연락처 정보를 참조하십시오.

목차

키트 내용물	5
기호	6
보관 조건	7
용도	8
제품의 사용상의 제한	9
정도 관리	9
기술 지원	9
안전성 정보	10
소개	13
원리 및 절차	13
검체 수집 및 안정화	13
RNA 농도 및 정제	19
수동 RNA 정제	19
자동 RNA 정제	29
사용자가 준비해야 하는 장비 및 시약	35
중요 참고 사항	37
QIAcube 사용하기	37
QIAcube 시작하기	37
프로토콜을 QIAcube 에 설치하기	37
QIAcube 장착하기	39
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 사람 전혈의 총 RNA 를 수동 정제 ..	48
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)로 수집한 사람 전혈의 총 RNA 를 자동 정제 ..	55

문제 해결 가이드.....	62
부록 A: RNA 취급에 관한 일반적인 설명.....	65
부록 B: 총 RNA 의 정량화 및 품질 결정.....	66
부록 C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 작동하기.....	68
주문 정보	70
안내서 개정 이력.....	72

키트 내용물

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
카탈로그 번호			762174
준비 수			50
BR1	Resuspension Buffer(재현탁 완충액)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer(결합 완충액) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1(세척 완충액 1) *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2(concentrate)(세척 완충액 2(농축액)) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer(용출 완충액)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water(bottle)(RNase-free 물(병))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K(green lid)(단백분해효소(녹색 뚜껑))	PROTK	2 × 1.4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns(red)(PAXgene RNA 스피ن 컬럼(적색))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes(2 ml)(처리 튜브(2ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures(Secondary BD Hemogard™ 마개)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes(1.5ml)(마이크로 원심분리 튜브(1.5ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free(lyophilized)(동결 건조)	DNA REM	1,500 Kunitz 단위 ‡
RDD	DNA Digestion Buffer(white lid)(DNA 소화 완충액(흰색 뚜껑))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	Dnase Resuspension Buffer(tube, lilac lid)(DNase 재현탁 완충액(튜브, 연보라색 뚜껑))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns(lilac)(PAXgene Shredder 스피ن 컬럼(연보라색))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
안내서	PAXgene Blood RNA Kit 안내서(버전 2)		1

*표백제를 함유한 살균제와 같이 사용할 수 없습니다. 구아니딘염을 함유하고 있습니다. 안전 정보는 9 페이지를 참조하십시오.

†세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96–100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.

‡Kunitz 단위는 DNase I 를 측정할 때 흔히 사용하는 단위이며, 고중합 DNA 가 기질인 경우에 25°C, pH 5.0 에서 분당 밀리미터 당 0.001 의 A₂₆₀ 증가를 유발할 수 있는 DNase I 의 양으로 정의합니다(Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 and 363).

기호



<N>회 검사에 충분한 시약 포함



사용 지침 참조



사용 기한



시험관 내 진단용 의료 기구



카탈로그 번호



로트 번호



재료 번호



구성품



수



조사를 사용한 멸균 방법



Kunitz 단위



추가



내용물














재구성된



디옥시리보 뉴클레아제 I



에탄올

	구아니딘 이소티오시아네이트
	RNase-Free DNase 세트
	국제 거래 단위 번호
	재사용하지 말 것
	온도 제한
	온도 상한
	제조업체
	중요 참고 사항
	에탄올을 병에 추가한 후에 현재 날짜를 기재
	도착 시
	이동

보관 조건

PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC), PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC), 단백분해효소 K(PK) 및 완충액(BR1, BR2, BR3, BR4 및 BR5)은 키트 라벨에 표시된 온도로 건조하게 보관할 수 있습니다.

DNase I(RNFD)이 포함된 RNase-Free DNase 세트, DNA 소화 완충액(RDD) 및 DNase 재현탁액 완충액(DRB)은 주변 온도로 운송됩니다. RNase-Free DNase 세트의 모든

구성품은 수령하는 즉시 라벨에 표시된 온도로 보관하십시오. 키트는 적절하게 보관하면 키트 상자에 표시된 유효기간까지 안정적으로 사용할 수 있습니다.

용도

PAXgene Blood RNA Kit 는 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 전혈의 세포내 RNA 를 정제하는 제품입니다. 키트를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)와 함께 사용하는 경우에 시스템은 전혈에서 수집하고 분자 진단 검사에 사용되는 RT-PCR 용의 정제 세포내 RNA 를 제공할 수 있습니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 대한 정보는 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*를 참조하십시오.

PAXgene Blood RNA System 의 성능 특성은 **FOS** 및 **IL1B** 유전자 전사체에 대해서만 결정했습니다. 기타 표적 전사체에 대해 적절한 **PAXgene Blood RNA System** 성능 특성을 결정하는 일은 사용자의 책임입니다.

제품의 사용상의 제한

PAXgene Blood RNA Kit 는 시험관 내 진단에 사용하기 위해 전혈에서 수집한 세포내 RNA($4.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$ 백혈구/ml)를 정제하는 제품입니다. 사람의 전혈에서 수집한 게놈 DNA 또는 바이러스 핵산을 정제하는 용도가 아닙니다. 멸균 사양에 검증된 전사체의 수가 많지 않아서(FOS 및 IL1B 유전자 전사체) 모든 전사체에 대한 성능 특성을 다 결정하지는 못했습니다. 실험 요원은 제조업체의 데이터와 자체 데이터를 검토하여 다른 전사체에 검증이 필요한지 결정해야 합니다.

이 제품은 시험관 내 진단 절차에 대한 교육을 받은 기술자 및 의사 같은 전문 사용자가 사용해야 합니다.

정도 관리

QIAGEN ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라, PAXgene Blood RNA Kit 의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 따라 검사를 받습니다.

기술 지원

우리 QIAGEN 은 당사 기술 직원의 품질 및 가용성에 긍지를 느낍니다. 우리 기술 서비스 부서는 분자 생물학과 PreAnalytiX 제품의 사용에 대해 방대한 실무적 이론적 전문기술을 갖춘 숙련된 과학자들로 구성되어 있습니다. PAXgene Blood RNA Kit 에 대해 질문이 있으면 주저 없이 문의해 주십시오.

기술 지원 및 자세한 내용은 QIAGEN 기술 서비스에 전화해 주십시오.

안전성 정보

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

생물 및 화학 물질을 다룰 때 감염(예를 들어, HIV 또는 B 형 간염 바이러스) 또는 부상의 위험을 피하려면 항상 적절한 실험실용 가운, 1 회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전 보건 자료(safety data sheets, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.PreAnalytiX.com 에서 편리하고 용량이 작은 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 이 키트의 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

주의



검체 준비 과정의 폐기물에 표백제나 산성용액을 직접 가하지 마십시오.

결합 완충액(BR2) 및 세척 완충액 1(BR3)은 표백제와 결합하여 높은 반응성의 화합물을 형성할 수 있는 구아니딘 티오시아네이트를 함유하고 있습니다. 결합 완충액(BR2) 또는 세척 완충액 1(BR3)을 옅지르면 적절한 실험실 세제와 물로 세척하세요. 흘린 액체에 감염체가 포함될 가능성이 있으면 해당 부분을 우선 실험실 세제 및 물로 세척한 다음 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨으로 세척하십시오.

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)의 RNA 안정화 용액과 혈액 혼합물은 RNA 안정화 용액 및 혈액 혼합물의 9 용량 당 상용 표백제 용액(5%의 차아염소산 나트륨)의 1 용량을 사용하여 살균할 수 있습니다.

RNA 정제 절차의 원심분리 단계에서 생성된 상층액과 같은 검체 준비 과정의 폐기물은 감염 가능성이 있는 것으로 판단해야 합니다. 폐기물은 폐기하기 전에 오토클레이브

처리하거나 소각하여 감염 물질을 제거해야 합니다. 폐기는 공식적인 규정에 따라 수행해야 합니다.

PAXgene Blood RNA Kit의 구성요소에는 다음과 같은 위험 및 예방조치 관련 고지문이 적용되었습니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 대한 안전성 정보를 보려면 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*를 참조하십시오.

완충액 BR2



내용물: 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 삼키면 해롭습니다. 피부에 접촉하거나 흡입하면 해로울 수 있습니다. 심각한 눈 손상을 일으킵니다. 효과가 오래 가므로 수중생물에 해롭습니다. 산과 접촉하면 매우 유독한 가스를 발생시킵니다. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다. 눈에 묻은 경우: 물로 몇분 동안 주의하여 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 즉시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다.

완충액 BR3



내용물: 에탄올, 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 가연성 액체 및 증기. 심각한 눈 손상을 일으킵니다. 산과 접촉하면 매우 유독한 가스를 발생시킵니다. 열/SPA 크/나화/뜨거운 표면에서 멀리 떨어지십시오. 흡연 금지. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다. 눈에 묻은 경우: 물로 몇분 동안 주의하여 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 즉시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다.

DNase I



내용물: DNase. 위험! 알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있습니다. 흡입하면 알레르기 또는 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지/연기/가스/안개/증기/스프레이를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다. 호흡 보호구를 착용합니다. 노출 또는 우려 시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다. 피해자를 신선한 공기의 장소로 옮기고 호흡하기 편안한 자세로 휴식을 취하게 하십시오.

단백분해효소 K



내용물: 단백질분해효소 K. 위험! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 흡입하면 알레르기 또는 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지/연기/가스/안개/증기/스프레이를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/눈 보호/얼굴 보호대를 착용합니다. 호흡 보호구를 착용합니다. 노출 또는 우려 시 POISON CENTER 또는 의사에게 연락합니다. 피해자를 신선한 공기의 장소로 옮기고 호흡하기 편안한 자세로 휴식을 취하게 하십시오.

소개

전혈 수집은 세포 RNA 를 시험하는 데 사용되는 많은 분자 분석에서 첫 번째 단계입니다. 그러나 이 실험에서는 시험관 내 세포 RNA 프로파일의 불안정성이라는 중대한 문제가 제기됩니다. PreAnalytiX 의 여러 시험에서는 전혈의 개별 mRNA 종 카피 수가 실온의 보관 또는 운송 과정에서 1,000 배 이상 변경될 수 있다는 것을 보여주고 있습니다.* 이는 혈액을 채취한 후에 진행되는 급격한 RNA 분해와 특정 유전자의 발현 유도로 인해 발생합니다. 이와 같은 RNA 발현 프로파일의 변화로 인해 신뢰할 만한 유전자 발현 시험을 수행할 수 없습니다. 정맥 채혈 중이나 후에 RNA 발현 프로파일을 보존하는 방법은 따라서 사람 전혈의 유전자 발현을 정확하게 분석하는 데 필수적입니다.

원리 및 절차

PreAnalytiX 는 세포내 RNA 를 신속하고 효율적으로 정제하는 프로토콜과 함께 사람의 전혈 검체를 수집, 안정화, 보관 및 운송할 수 있는 새로운 시스템을 개발했습니다. 시스템에서는 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 미국 특허 6,602,718 및 6,617,170)를 사용하여 채혈 및 RNA 안정화를 수행하고 이어서 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 수동 또는 자동으로 RNA 를 정제할 것을 요구하고 있습니다. 수동 및 자동 프로토콜은 모두 RNA 품질 및 수율에서 성능이 거의 동일합니다. 수동 프로토콜(22-29 페이지) 및 자동 프로토콜(32-34 페이지)의 성능 데이터가 이 안내서에 게재되어 있습니다.

검체 수집 및 안정화

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에는 특허 등록한 RNA 안정화 기술에 기반을 둔 독점적인 시약 구성이 포함되어 있습니다. 이 시약 구성은 RNase 의 분해로부터 RNA 분자를 보호하며, 유전자 발현의 생체 외 변화를 최소화합니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)는 사람의 전혈을 수집하여 세포 RNA 를 18–25°C 에서 최대 3 일 동안(15 및 16 페이지, 그림 1 및 2), 2–8°C 에서 최대 5 일 동안(17 및 18 페이지, 그림 3 및 4) 안정화할 수 있는

* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

제품입니다. 현재 볼 수 있는 데이터들은 -20°C 또는 -70°C 에서 11 년 이상 세포 RNA 를 안정화할 수 있음을 보여주고 있습니다 *. 더 긴 기간의 안정성에 대해 현재 진행중인 시험에 대한 자세한 내용은 QIAGEN 기술 서비스에 문의해 주십시오.

RNA 안정화의 실제 기간은 세포 RNA 의 종과 사용되는 다운스트림 공정에 따라 다를 수 있습니다. 멸균 사양에 검증된 전사체의 수가 많지 않아서(FOS 및 IL1B 유전자 전사체) 모든 전사체에 대한 성능 특성을 다 결정하지는 못했습니다. 실험 요원은 제조업체의 데이터와 자체 데이터를 검토하여 다른 전사체에 검증이 필요한지 결정해야 합니다.

*장기간 PAXgene Blood RNA Tubes 에 혈액을 보관하는 시험은 현재 진행 중입니다.

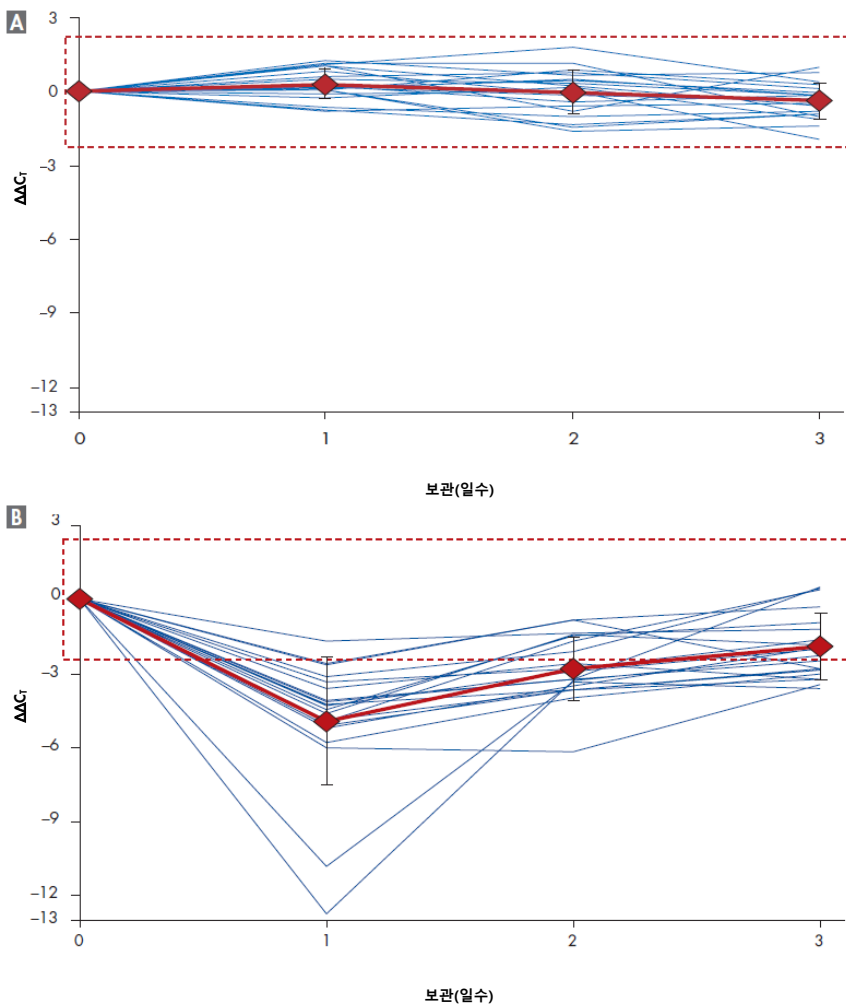


그림 1. 18–25°C 에서 혈액 검체의 RNA 안정성: FOS. 혈액은 반복 검체와 함께 10 명의 헌혈자로부터 채취하여 18–25°C 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 정제 작업을 수행했습니다. **[A]** PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit를 사용하여 총 RNA를 정제했습니다. **[B]** EDTA를 항응고제로 추가한 표준 채혈 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 청소 기술의 표준 유기 추출 방법을 사용하여 총 RNA를 정제했습니다. FOS의 상대 전사체 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다($2.34 C_t$).

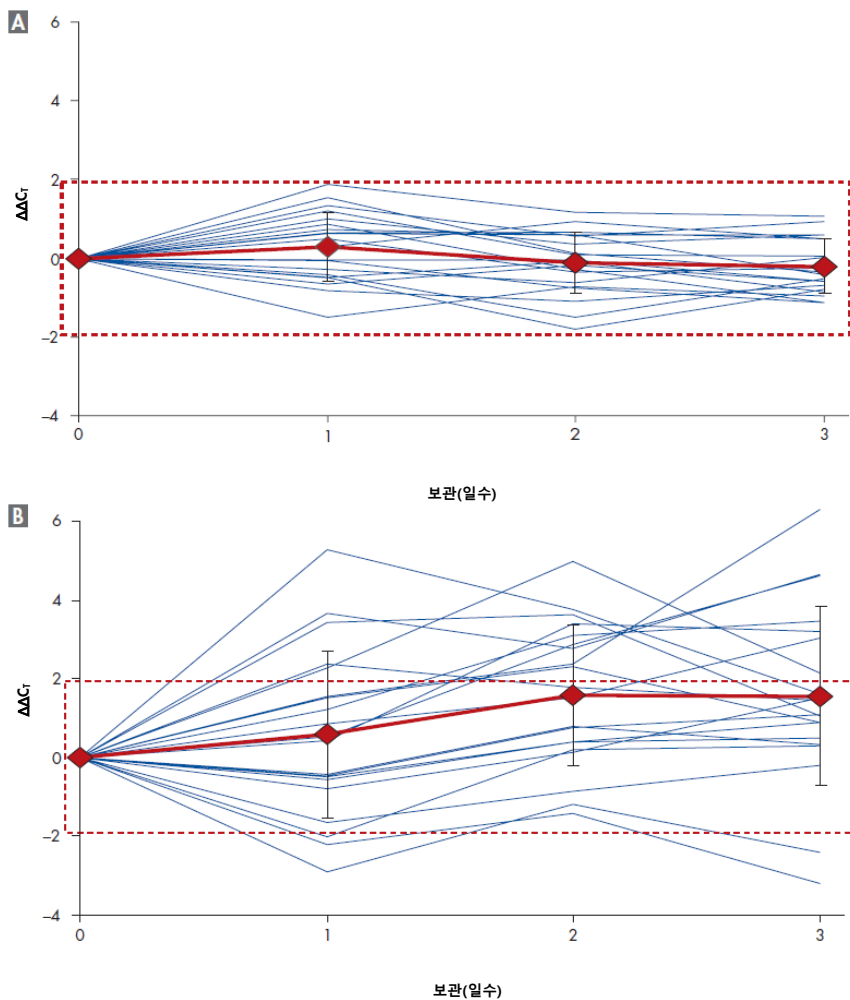


그림 2. 18-25°C 에서 혈액 검체의 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 1 에서 설명한 대로 18-25°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대 전사체 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다($1.93 C_t$).

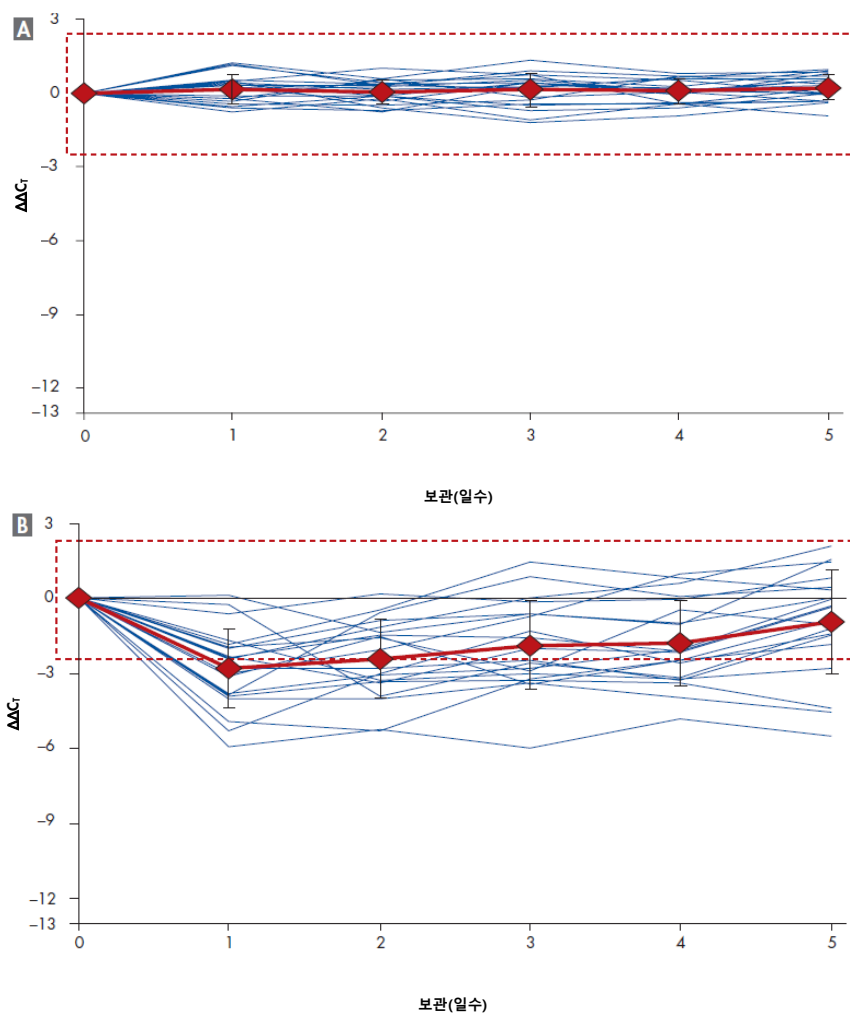


그림 3. 2-8°C 에서 혈액 검체의 RNA 안정성: FOS. 혈액은 반복 검체와 함께 10 명의 헌혈자로부터 채취하여 2-8°C 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 정제 작업을 수행했습니다. **[A]** PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. **[B]** EDTA 를 항응고제로 추가한 표준 채혈 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 청소 기술의 표준 유기 추출 방법을 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. FOS 의 상대 전사체 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다($2.34 C_t$).

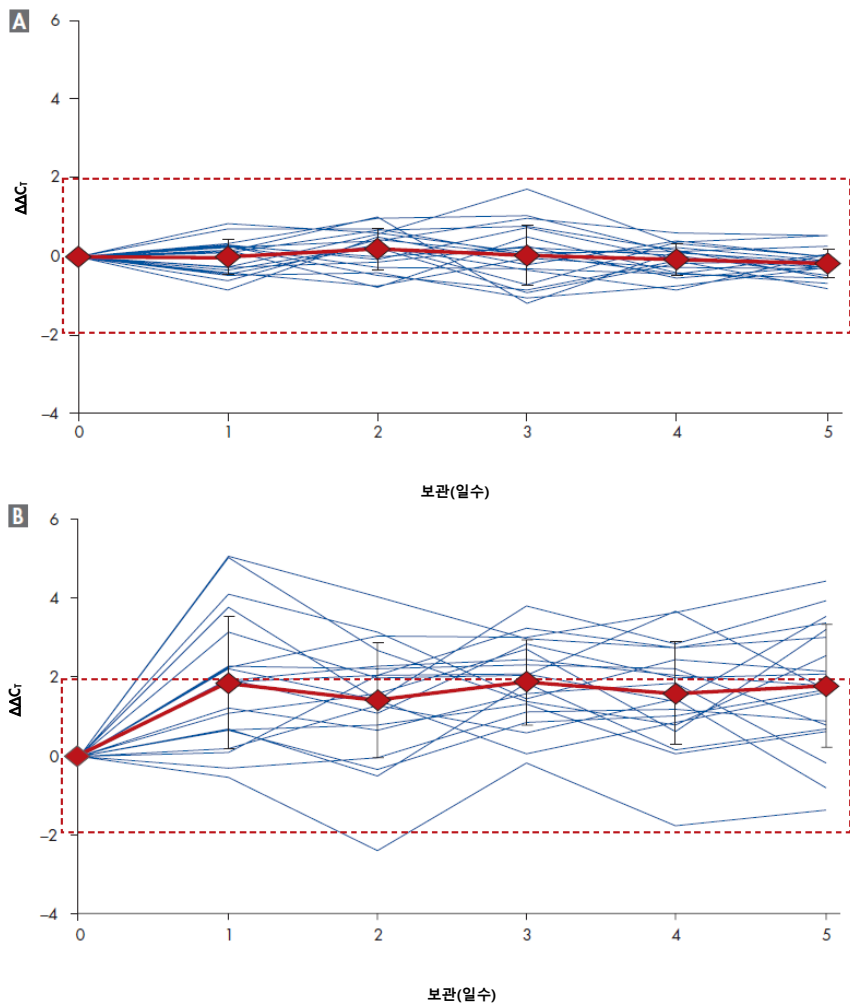


그림 4. 2-8°C 에서 혈액 검체의 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 3 에서 설명한 대로 2-8°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대 전사체 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다($1.93 C_t$).

RNA 농도 및 정제

PAXgene Blood RNA Kit 는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)로 수집한 2.5ml 의 사람 전혈에서 총 RNA 를 정제하는 제품입니다. 절차는 간단하며, 수동이나 자동 절차로 수행할 수 있습니다(20 및 30 페이지, 그림 5 및 10 참조). 두 프로토콜 모두 정제는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)의 핵산을 펠렛 상태로 만드는 원심분리 단계에서부터 시작합니다. 펠렛을 세척하고 재현탁한 후에 수동 또는 자동 RNA 정제 작업을 수행합니다. 원칙적으로 두 프로토콜 모두 동일한 키트 구성품으로 동일한 프로토콜 단계에 따라 수행합니다.

수동 RNA 정제

구체적으로 재현탁한 펠렛을 최적화한 완충액에서 단백분해효소 K(PK)와 함께 배양하여 단백질 소화를 유발합니다. PAXgene Shredder 스피ن 컬럼(PSC)을 통해 추가 원심분리를 수행하여 세포 용해물을 균질화하고 잔류하는 세포 찌꺼기를 제거한 후에 통과액 분획의 상층액을 신선한 마이크로 원심분리 튜브에 옮깁니다. 에탄올을 추가하여 결합 조건을 조정하고 용해물을 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC) 도포합니다. 짧은 원심분리 중에 오염물질이 통과하면서 RNA 가 PAXgene 실리카 막에 선택적으로 결합합니다. 남아 있는 오염물질을 몇 번의 효율적인 세척 단계를 통해 제거합니다. 첫 번째 및 두 번째 세척 단계 사이에 막을 DNase I(RNFD)로 처리하여 결합된 DNA 의 흔적량을 제거합니다. 세척 단계를 완료한 후에 RNA 를 용출 완충액(BR5)에 용출한 후에 열 변성을 유발합니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하여 정제한 총 RNA 는 순수합니다. 수동 프로토콜을 사용하는 경우에 배타 액틴 유전자 염기서열의 정량적 실시간 PCR 로 측정되는 것과 같이 A_{260}/A_{280} 값은 1.8 과 2.2 사이이며, 1%(w/w) 이하의 게놈 DNA 가 모든 검체의 95% 이상에 존재합니다. 최대 30%의 용출액을 사용하는 경우에 검체의 95% 이상이 RT-PCR 에서 억제 효과가 관찰되지 않았습니다.

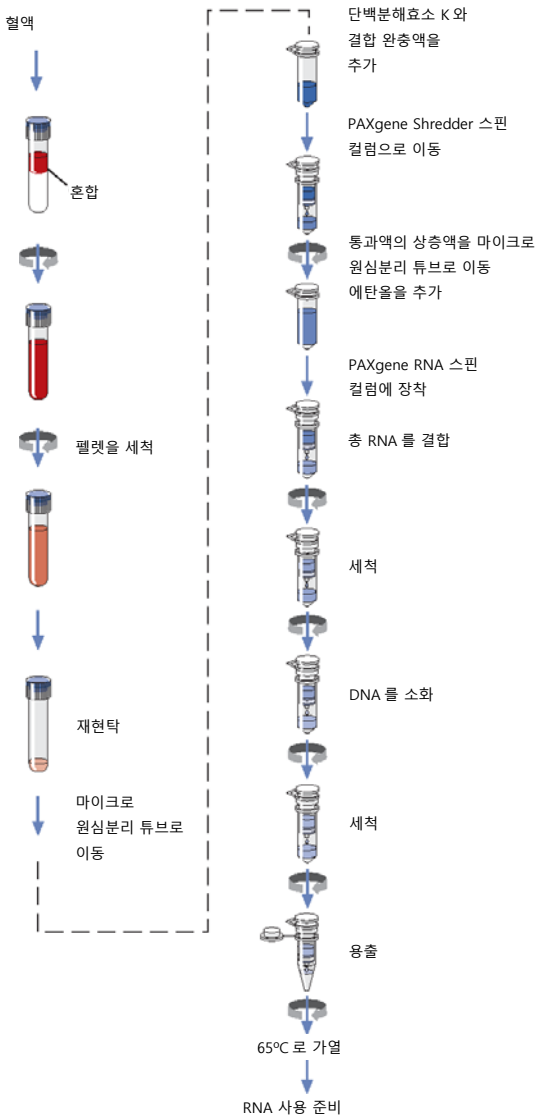


그림 5. 수동 PAXgene Blood RNA 절차.

수동 프로토콜을 사용하는 경우에 평균 검체 준비 시간(12 회 검체 준비 실행의 데이터에 근거)은 약 90 분 *이며, 실험 시간은 40 분뿐입니다. 2.5ml 의 건강한 사람 전혈의 RNA 수율은 처리한 검체의 95% 이상에서 $\geq 3\mu\text{g}$ 입니다. 수율은 헌혈자 의존성이 높기 때문에 개인의 수율이 다를 수 있습니다. 개인 헌혈자의 경우에 PAXgene Blood RNA System 은 재현성 및 반복성이 높은 수율(22 및 23 페이지, 그림 6 및 7 참조) 및 RT-PCR(27 및 28 페이지, 그림 8 및 9 참조)을 제공하므로 임상 진단 검사에 사용할 때 안정성이 높습니다.

그림 6(22 페이지)은 PAXgene Blood RNA System 의 전체적인 반복성 및 재현성을 보여주고 있습니다. PAXgene Blood RNA Kit 의 로트와 작업자가 달라지면 RNA 수율 및 실시간 RT-PCR 성능에 어떤 영향을 미치는지 관찰하기 위한 추가 시험을 실시했습니다. 이 시험에서는 개인의 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 대신에 대량수집 혈액 검체를 사용했기 때문에 결과는 개인의 채혈 사이의 변동을 포함한 시험 시스템의 반복성이 아닌 검체 준비의 반복성만 반영합니다(23 페이지, 그림 7 참조).

*PAXgene Blood RNA Tubes 의 □□ □□ □□ (□□□□, □□ □□ □□ □□□□)□ □□□ □ □□□□ □□□□□.

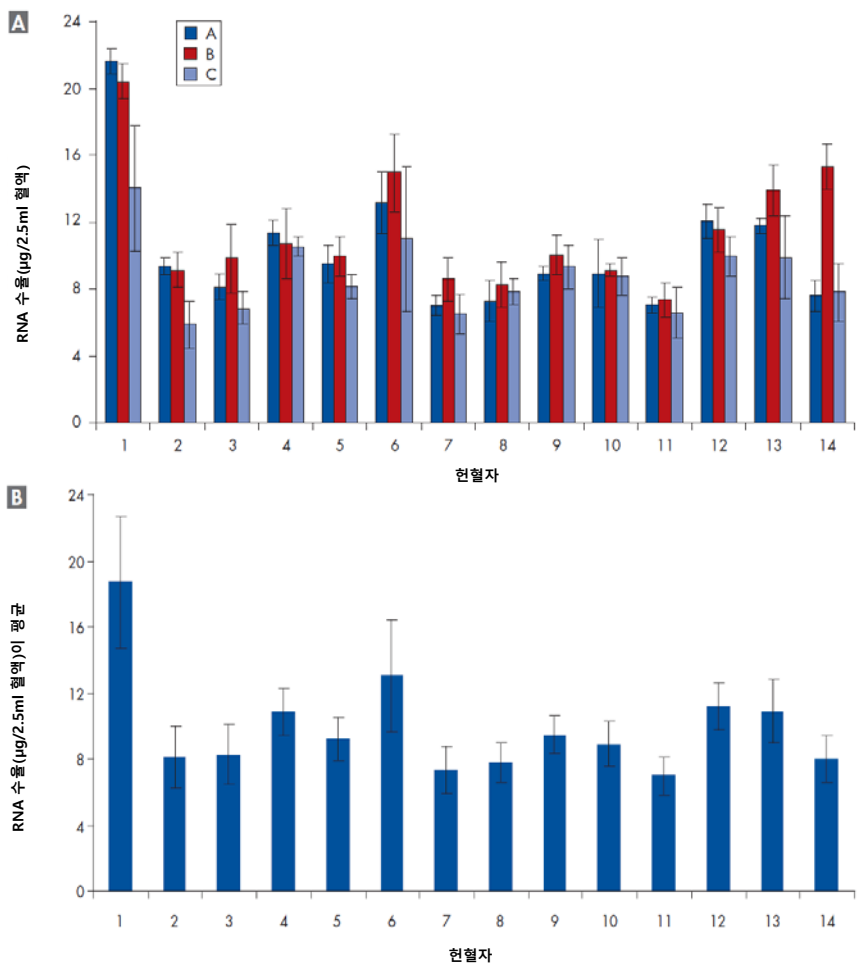


그림 6. 재현 가능하고 반복 가능한 RNA 정제. 14 명의 헌혈자로부터 4 회 반복 채취한 혈액 검체를 3 명의 기사(A, B 및 C)가 각각 수동으로 처리했습니다. 세 장비 세트를 사용했으며, 단일 기사가 준비한 모든 검체를 동일한 장비를 사용하여 처리했습니다. **[A]** 동일한 헌혈자로부터 다른 기사가 채취한 반복 검체 당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 표시되어 있습니다. **[B]** 14 명의 헌혈자 중 각 사람으로부터 채취한 12 개 반복 혈액 검체를 3 명의 다른 기사가 처리했습니다. 동일한 헌혈자로부터 모든 기사가 채취한 검체 당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 제시되어 있습니다. 모든 RNA 검체에서 A_{260}/A_{280} 비율의 범위는 1.8-2.2 였습니다.

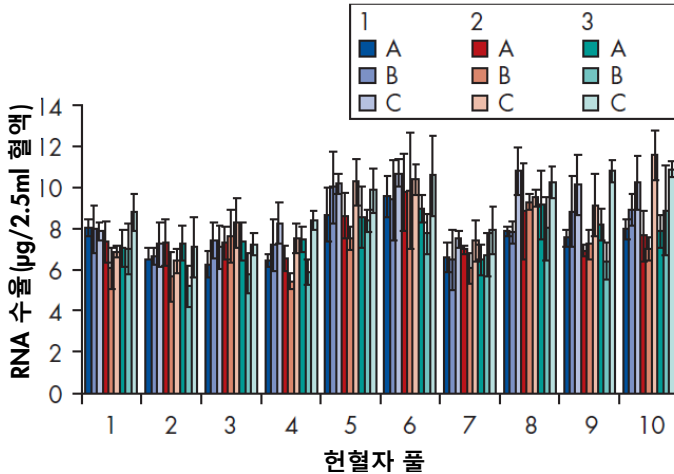
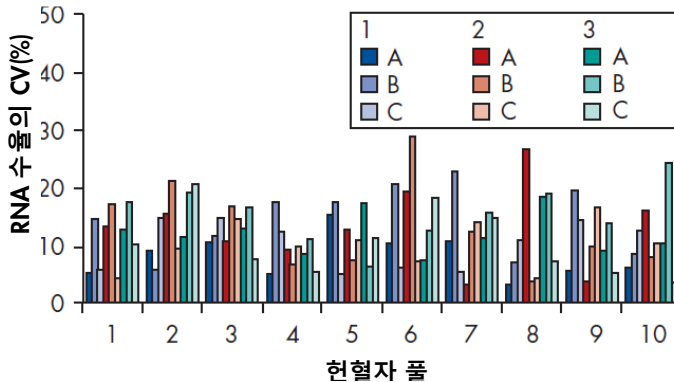
A**B**

그림 7. 혼합 혈액 검체를 사용한 다양한 작업자 및 PAXgene Blood RNA Kit 로트의 RNA 수율의 반복성 및 재현성
 30 명의 다른 헌혈자로부터 채취한 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 헌혈자 당 12 개 튜브, 총 360 개 튜브)에 수집했습니다. 3 명의 헌혈자로부터 수집한 튜브의 내용물을 혼합한 후에 36 개 검체로 재분주했습니다. 3 명 헌혈자 풀 당 36 개의 검체를 3 명의 다른 작업자가 수동으로 처리했습니다. 각 작업자는 3 개의 다른 PAXgene Blood RNA Kit 로트를 사용하여 추출했으며, 각 10 명 헌혈자 풀에서 4 회 반복 채취한 검체를 처리했습니다. [A] 모든 작업자-로트 조합에 대한 RNA 수율 및 표준편차. 10 명 헌혈자 풀에서 4 회 반복 채취한 혈액 검체를 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 각 3 개 키트 로트(1, 2 및 3)로 처리했습니다. 각 작업자마다 그리고 각 키트 로트마다 동일한 헌혈자로부터 4 회 반복 채취한 검체 당 평균 수율(컬럼) 및 표준편차(오류 막대)가 제시되어 있습니다. [B] 그림 7A 에 제시된 평균 수율 및 수율의 표준편차로부터 계산한, 모든 작업자-로트 조합(A, B, C; 1, 2, 3)의 헌혈자 풀 당 RNA 수율의 CV.

표 1A. 선택된 현혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 각 로트 및 각 사용자 내부의 재현성

데이터 조합	현혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 사용자 A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
로트 1, 사용자 B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
로트 1, 사용자 C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
로트 2, 사용자 A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
로트 2, 사용자 B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
로트 2, 사용자 C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
로트 3, 사용자 A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
로트 3, 사용자 B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
로트 3, 사용자 C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18

데이터 조합	현혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 사용자 A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
로트 1, 사용자 B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
로트 1, 사용자 C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
로트 2, 사용자 A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
로트 2, 사용자 B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
로트 2, 사용자 C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
로트 3, 사용자 A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
로트 3, 사용자 B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
로트 3, 사용자 C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

표 1B. 선택된 현혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 각 사용자 내부 및 모든 로트 간 재현성

데이터 조합	현혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
사용자 A, 모든 로트	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
사용자 B, 모든 로트	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
사용자 C, 모든 로트	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
데이터 조합	현혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
사용자 A, 모든 로트	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
사용자 B, 모든 로트	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
사용자 C, 모든 로트	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

표 1C. 선택된 현혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 각 로트 내부 및 모든 사용자 간 재현성

데이터 조합	현혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 모든 사용자	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
로트 2, 모든 사용자	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
로트 3, 모든 사용자	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
데이터 조합	현혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ 개 세포/ml			현혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 모든 사용자	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
로트 2, 모든 사용자	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
로트 3, 모든 사용자	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

표 1D. 선택된 헌혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 모든 로트 및 모든 사용자 간 재현성

데이터 조합	헌혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ 개 세포/ml			헌혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 모든 사용자	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
데이터 조합	헌혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ 개 세포/ml			헌혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ 개 세포/ml		
	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)	평균 수율(μg)	SD(μg)	CV(%)
로트 1, 모든 사용자	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

4 개의 대표적인 헌혈자 풀의 세부 분석. 풀은 백혈구 개수에 따라 선택했으며, 백혈구 개수($4.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$ 개 백혈구/ml) 정상 범위의 상한, 중간 및 하한 값을 반영합니다. 백혈구 개수는 헌혈자 풀 당 3 명의 헌혈자로부터 채취한 3 가지 백혈구 개수의 평균 값을 의미합니다.

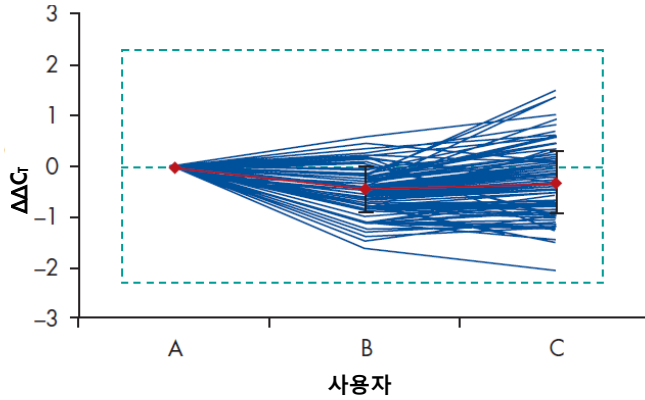
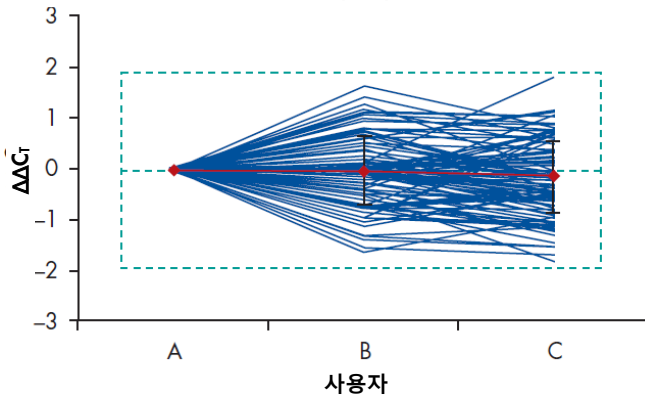
A**B**

그림 8. RT-PCR의 재현성 – 사용자 간. 그림 7에서 설명하는 실험에서 정제된 RNA를 실시간 RT-PCR에 사용했습니다. **[A]** FOS 및 **[B]** IL1B의 상대 전사체 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차를(검정색 막대)를 표시하면서 사용자 1의 값(10명 헌혈자 풀 x 3개 키트 로트 x 4회 반복 채취 = 유전자 당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3\sigma$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(FOS: 2.34 C_t ; IL1B: 1.93 C_t).

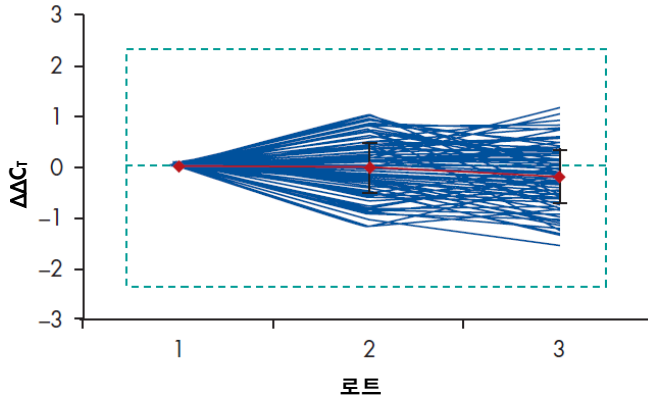
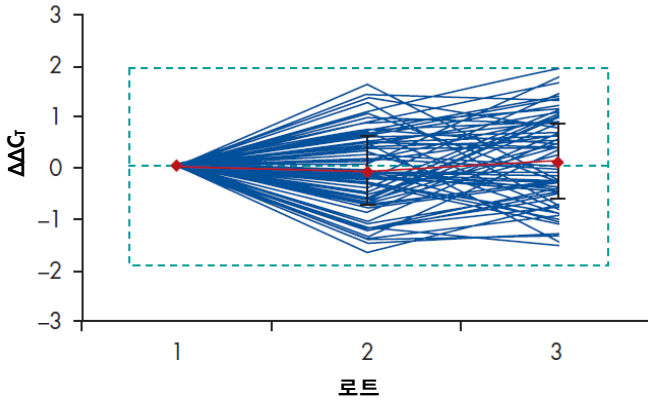
A**B**

그림 9. RT-PCR의 재현성 – 키트 로트 간. 그림 7에서 설명하는 실험에서 정제된 RNA를 실시간 RT-PCR에 사용했습니다. **[A]** FOS 및 **[B]** IL1B의 상대 전사체 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차를(검정색 막대)를 표시하면서 키트 로트 1의 값(10명 헌혈자 풀 x 3명 사용자 x 4회 반복 채취 = 유전자 당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3\sigma$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(FOS: 2.34 C_T ; IL1B: 1.93 C_T).

표 2. 그림 8 및 9 의 RT-PCR 데이터 요약

검사 시스템	FOS/18S rRNA 분석		IL1B/18S rRNA 분석	
	평균($\Delta\Delta C_T$)	$\pm SD(\Delta\Delta C_T)$	평균($\Delta\Delta C_T$)	$\pm SD(\Delta\Delta C_T)$
각 사용자 내부 및 모든 로트 간 재현성				
모든 사용자, 로트 1-로트 1	0.00	0.00	0.00	0.00
모든 사용자, 로트 1-로트 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
모든 사용자, 로트 1-로트 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
각 사용자 내부 및 모든 로트 간 재현성				
모든 로트, 사용자 A-사용자 A	0.00	0.00	0.00	0.00
모든 로트, 사용자 A-사용자 B	-0.46	0.44	-0.06	0.69
모든 로트, 사용자 A-사용자 C	-0.31	0.60	-0.15	0.71

사용자: 기사, 시험을 수행.

로트: 이 시험에 사용된 키트 수.

SD: 표준 편차.

그림 8 및 9 에 제시된 데이터에는 평균 $\Delta\Delta C_T$ 값(N = 120) 및 표준 편차가 표시되어 있습니다.

자동 RNA 정제

표준 QIAcube® 기구(카탈로그 번호 9001882[110V], 카탈로그 번호 9001293[230V]; QIAcube Connect 는 포함되지 않음)를 사용하여 검체 준비를 자동적으로 수행하며, 수동 절차와 동일한 단계에 따라 PAXgene Blood RNA Kit 를 계속 사용하여 고품질의 RNA 를 정제할 수 있습니다. QIAcube 에 대한 자세한 내용은 *QIAcube 사용자 설명서 (QIAcube User Manual)* 및 www.qiagen.com/MyQIAcube 를 참조하십시오.

자동 RNA 정제 프로토콜은 2 개 부(또는 프로토콜), 즉 “PAXgene Blood RNA Part A” 및 “PAXgene Blood RNA Part B” 그리고 2 개 부 사이의 간단한 수동 개입으로 구성되어 있습니다(30 페이지, 그림 10 참조).

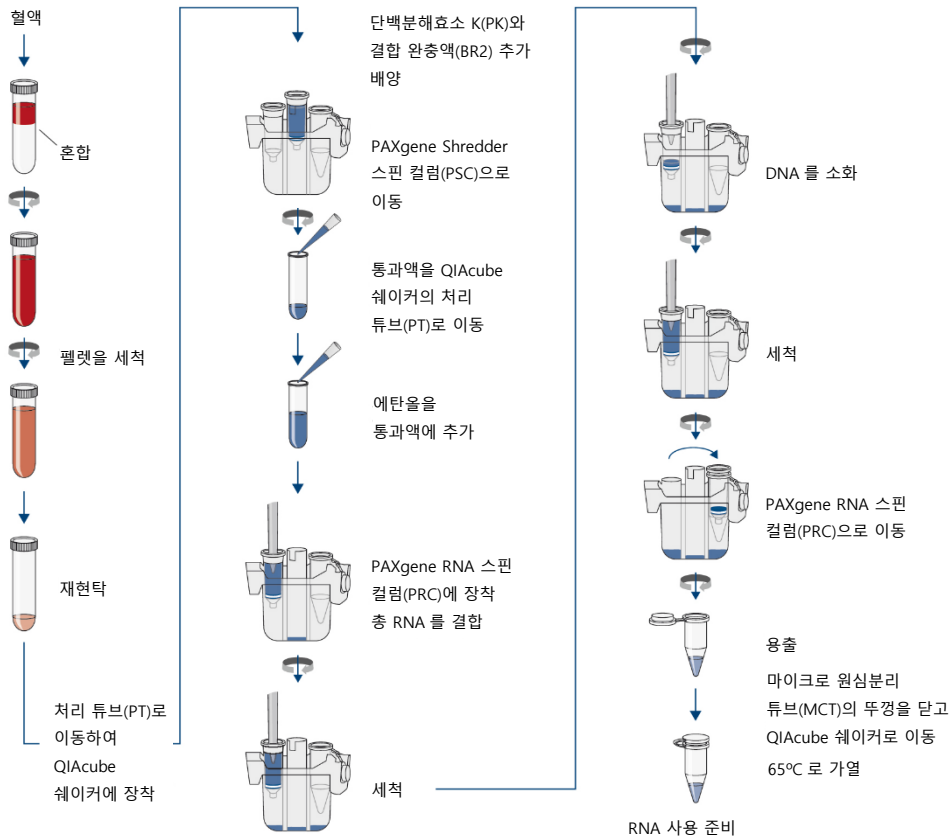


그림 10. 자동 PAXgene Blood RNA 절차.

원심분리, 세척하고 재현탁한 핵산 펠렛(19 페이지, “RNA 농도 및 정제” 참조)을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에서 처리 튜브(PT)로 옮긴 후에 튜브를 QIAcube 작업대의 열 웨이커에 넣습니다. 작업자는 메뉴에서 “PAXgene Blood RNA Part A” 프로토콜을 선택하고 시작합니다. QIAcube 가 용출 완충액(BR5)의 RNA 용출까지 프로토콜의 단계를 수행합니다. 작업자가 정제된 RNA 가 든 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 QIAcube 의 열 웨이커 장치로 옮깁니다. 작업자가 메뉴에서 “PAXgene Blood RNA Part B” 프로토콜을 선택하고 시작하면, QIAcube 가 열 변성을 수행합니다.

평균 검체 준비 시간(12 검체 준비 실행의 데이터에 근거)은 151 분 *이며, 실험 시간은 수동 프로토콜보다 상당히 적습니다.

2.5ml의 건강한 사람 전혈의 RNA 수율은 처리한 검체의 95% 이상에서 $\geq 3\mu\text{g}$ 입니다. 그림 11(32 페이지)은 3 명의 작업자가 3 개 키트 로트에 대해 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216 개 검체의 RNA 수율을 보여주고 있습니다. 이 시험에서는 개인의 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 대신에 대량수집 혈액 검체를 사용했기 때문에 결과는 개인에게서 채혈한 단일 검체에서 기대할 수 있는 RNA 수율을 반영하지 않습니다. 수율은 헌혈자 의존성이 높기 때문에 개인의 수율이 다를 수 있습니다(32 페이지, 그림 11).

최대 30%의 용출액을 사용하는 경우에 검체의 95% 이상이 RT-PCR 에서 억제 효과가 관찰되지 않았습니다. 자동 프로토콜을 사용하는 경우에 검체 간 교차 오염은 동일한 실행에서 RNA 양성 검체(사람의전혈)와 쌍을 이루는 RNA 음성 검체(물)에서 ABL1 및 FOS 전사체 염기서열의 정량적 실시간 RT-PCR 로 측정되는 것과 같이 검출할 수 없습니다.

PAXgene Blood RNA System 및 자동 프로토콜로 정제된 RNA 는 RT-PCR 억제의 부존재(32 페이지, 그림 11 참조) 및 1.8-2.2 의 A_{260}/A_{280} 값으로 알 수 있는 것처럼 순수합니다. 게놈 DNA 는 베타 액틴 유전자 염기서열의 정량적 실시간 PCR 로 측정되는 것과 같이 1%(w/w) 이하로 모든 검체의 95% 이상에 존재합니다. 그림 12 및 13(32 및 33 페이지)에서는 3 명의 작업자가 3 개 키트 로트로 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216 개 검체의 A_{260}/A_{280} 값 및 상대적 게놈 DNA 를 보여주고 있습니다.

*PAXgene Blood RNA Tubes 의 선행 처리 작업(원심분리, 펠렛 세척 및 펠렛 재현탁)을 포함한 총 프로토콜 실행시간.

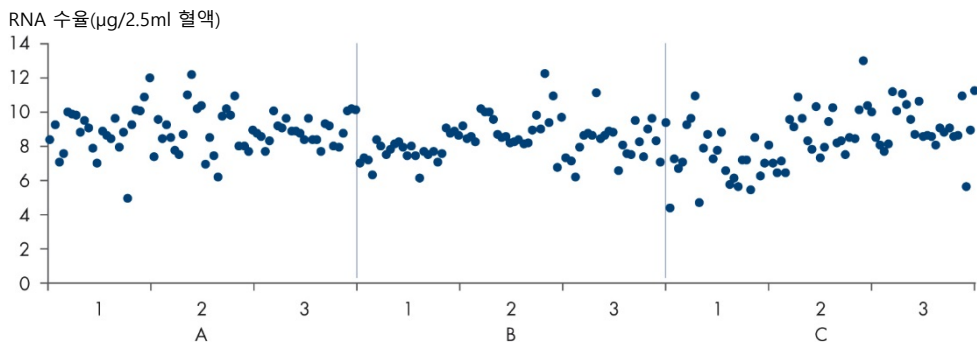


그림 11. RNA 수율 – 자동 처리. 36 명의 다른 헌혈자로부터 채취한 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 헌혈자 당 6 개 튜브, 총 216 개 튜브)에 수집했습니다. 6 명의 헌혈자로부터 수집한 튜브의 내용물을 혼합한 후에 36 개 검체로 재분주했습니다. 6 명 헌혈자 풀 당 36 개 검체를 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 처리했습니다. 각 작업자는 PAXgene Blood RNA Kit 의 3 개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 추출했으며, 각 6 명 헌혈자 풀로부터 4 회 반복 채취한 검체를 처리했습니다. 모든 개인 검체의 RNA 수율이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

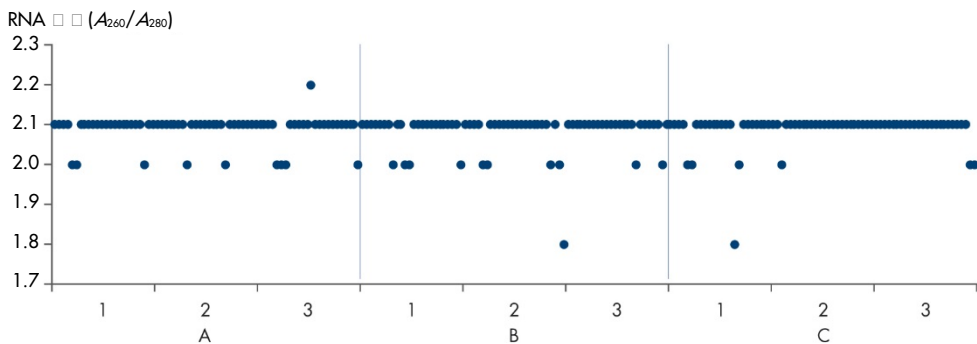


그림 12. RNA 순도(A_{260}/A_{280} 값) — 자동 처리. RNA 는 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 11 에서 설명한 실험에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 정제했습니다. 모든 개인 검체의 A_{260}/A_{280} 값이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

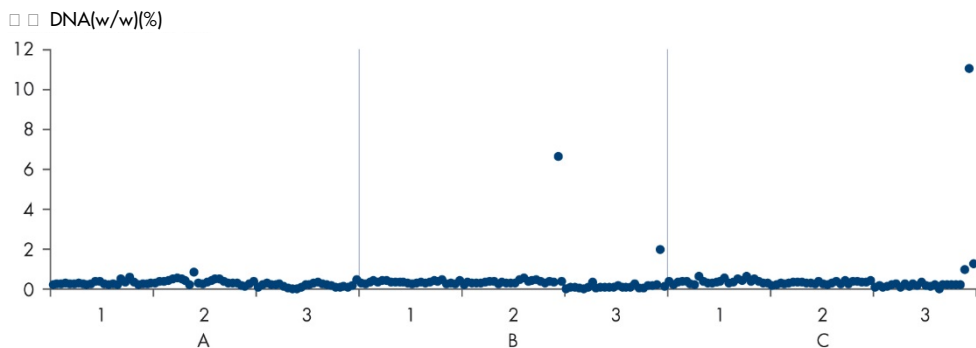


그림 13. RNA 순도(% 게놈 DNA 오염) - 자동 처리. RNA 는 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 11 에서 설명한 실험에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 정제했습니다. 모든 개인 검체의 게놈 DNA 양(w/w)이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하는 자동 RNA 정제 프로토콜은 그림 14(34 페이지)에 제시된 것처럼 재현성과 반복성이 높은 RT-PCR 결과를 제공하므로 임상 진단 검사에 아주 안정적으로 사용할 수 있습니다.

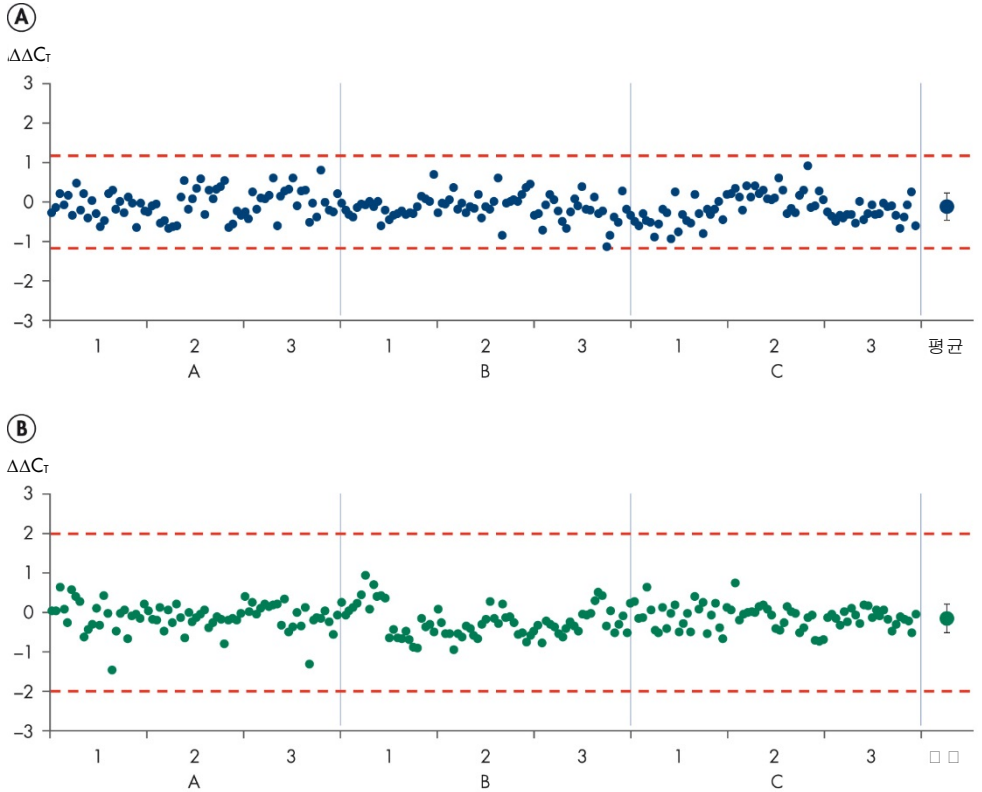


그림 14. RT-PCR의 재현성 – 자동 및 수동 프로토콜 간. RNA는 3명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 11에서 설명한 실험에서 PAXgene Blood RNA Kit의 다른 로트(1, 2, 3)와 자동 프로토콜을 사용하여 정제했습니다. 이와 동시에 해당 반복 튜브에서 수동 프로토콜을 사용하여 RNA를 정제했습니다. [A] FOS 및 [B] IL1B의 상대 전사체 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 결정했습니다. 두 추출 프로토콜(자동 및 수동 프로토콜)을 사용한 혈액 검체 쌍으로부터 준비한 RNA 간에 발생 가능한 전사체 수준의 차이는 $\Delta\Delta C_t$ 방법으로 산출했습니다. 모든 검체 쌍(4회 반복 검체 x 6명 헌혈자 풀 x 3개 키트 로트 x 3명 작업자 = 유전자 당 216개 쌍)의 개별 $\Delta\Delta C_t$ 값은 모든 검체의 평균(큰 점) 및 표준 편차(검정색 막대)를 표시하면서 단일 점으로 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3x$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(FOS: 1.16 C_t ; IL1B: 1.98 C_t ; 그림 1-4, 8 및 9와 비교할 때 분석 버전이 달라서 분석 정밀도가 다름).

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.

모든 프로토콜의 경우

- PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 카탈로그 번호 762165)
- 에탄올(96-100%, 순도 등급 p.a.)
- 피펫 *(10 μ l – 4ml)
- 멸균한 에어로졸 장벽 RNase-free 피펫 팁 †
- 메스실린더 ‡
- 속도 성능이 3,000–5,000 x g 이고 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 담을 수 있는 스윙 로터 및 버킷이 장착된 원심분리기*
- 보텍스 믹서*
- 쇄빙
- 라벨 작성 용 유성펜

수동 프로토콜의 경우

- 중력(g)의 하한 상한이 적용되지만 속도 성능이 1,000–8,000 x g 이상이고(자세한 내용은 프로토콜 단계 참조) 2ml 마이크로 원심분리 튜브 용의 로터가 장착된 가변 속도의 마이크로 원심분리기*

*제조업체 권고사항에 따라 기구를 정기적으로 점검, 유지보수, 교정합니다.

†RNA 취급 지침(64 페이지, 부록 A)을 숙지합니다.

‡에탄올을 완충액 BR4 농축액에 추가하는 용도.

- 55°C 및 65°C 에서 배양할 수 있고 400rpm 이상, 1,400rpm 이하로 교반할 수 있는 шей커-배양기 *(예를 들어, Eppendorf® Thermomixer Compact 또는 이와 동등한 장치)

자동 프로토콜의 경우

- QIAcube*(QIAGEN, 카탈로그 번호 9001882[110V], 카탈로그 번호 9001293[230V])
- 가위

QIAcube 소모품

- Filter-Tips, 1,000µl(1024)(QIAGEN 카탈로그 번호 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml(6)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990393)[†]
- Rotor Adapters(10 x 24)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990394)[†]

QIAcube 부속품

- Reagent Bottle Rack(QIAGEN, 카탈로그 번호 990390)[†]
- Rotor Adapter Holder(QIAGEN, 카탈로그 번호 990392)[†]

*제조업체 권고사항에 따라 기구를 정기적으로 점검, 유지보수, 교정합니다.

[†]Starter Pack, QIAcube(QIAGEN, 카탈로그 번호 990395)에도 들어 있습니다.

중요 참고 사항

QIAcube 사용하기

QIAcube 작동을 숙지해야 합니다. 자동 PAXgene Blood RNA 프로토콜을 시작하기 전에 QIAcube 와 함께 제공되는 *QIAcube 사용자 설명서* 및 추가 정보를 안전성 정보에 세심한 주의를 기울이면서 읽어 보십시오.

QIAcube 시작하기

QIAcube 도어를 닫고 전원 스위치로 QIAcube 를 켭니다(38 페이지, 그림 15 참조).

비퍼 음이 울리면서 시작 화면이 표시됩니다. 기구가 자동으로 초기화 검사를 수행합니다.

프로토콜을 QIAcube 에 설치하기

QIAcube 에서 최초의 RNA 준비 실행을 수행하려면 먼저 초기 프로토콜 설치가 필요합니다. "PAXgene Blood RNA Part A" 및 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 모두 설치합니다.

프로토콜은 www.qiagen.com/MyQIAcube 에서 제공되며, QIAcube 와 함께 제공되는 USB 에 다운로드하여 USB 포트를 통해 QIAcube 에 전송해야 합니다.

보호용 패널 뒤에 장착된 USB 포트(38 페이지, 그림 15 참조)를 통해 QIAcube 를 (QIAcube 와 함께 제공되는) USB 에 연결할 수 있습니다. 로그 파일 또는 보고서 파일과 같은 데이터 파일 또한 USB 포트를 통해 QIAcube 에서 USB 로 전송할 수 있습니다.



USB 포트는 QIAGEN 이 제공하는 USB 전용입니다. 기타 장치를 이 포트에 연결하지 마십시오.



프로토콜을 다운로드할 때나 데이터 파일을 이전하는 동안 또는 프로토콜을 실행하는 동안에는 USB 를 제거하지 마십시오.



그림 15. QIAcube 의 정면도.



터치 스크린



도어



보호용 패널 뒤의 RS232 직렬 포트(QIAGEN
기구 서비스 기사 전용)



보호용 패널 뒤의 USB 포트



전원 스위치



폐기물 서랍

QIAcube 장착하기

시간 절약을 위해 장착은 55 페이지의 “프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 사람 전혈의 총 RNA 를 자동 정제”에서 10 분 원심분리 단계(제 3 및 5 단계)의 하나 또는 두 단계 중에 수행할 수 있습니다.

시약 병

QIAcube 에서 모든 실행을 실시하기 전에 표 3 에 명시된 시약을 4 개 시약 병에 최대 지시계 레벨까지 또는 이것이 가능하지 않으면 PAXgene Blood RNA Kit 에 제공된 완충액 용량이 허용하는 레벨까지 세심하게 채웁니다. 병과 뚜껑에 완충액 이름을 기재한 라벨 표시를 한 후에 채운 시약 병을 시약 병 랙의 해당 위치에 둡니다. (40 및 41 페이지, 그림 16 및 17)에 표시된 것처럼 랙을 QIAcube 작업대 위에 장착합니다.



제공된 완충액 BR2 용량은 시약 병을 지시계 레벨까지 채우지 못합니다. BR3 및 BR4 완충액은 이전 실행에서 다수의 검체를 처리한 후에 병을 지시계 레벨까지 채우지 못할 수도 있습니다.



작업대 위에 장착하기 전에 뚜껑을 병에서 제거하십시오.



PAXgene Blood RNA Kit(50)에 제공되는 완충액 용량은 QIAcube 의 RNA 준비 실행 당 2-12 개 검체인 경우에 최대 7 회의 실행에 충분히 사용할 수 있는 양입니다. 일반적으로 최대 7 회의 RNA 준비 실행으로 키트 당 총 50 개 검체를 처리하려면 검체 개수가 이보다 작은 실행을 피해야 합니다. 7 회보다 많은 RNA 준비 실행을 수행하면 마지막 검체를 처리하는 데 완충액 용량이 부족할 수 있습니다.

표 3. 시약 병 랙의 위치

위치	시약
1	결합 완충액(BR2)
2	에탄올(96-100%)
3	세척 완충액 1(BR3)
4	세척 완충액 2(BR4)*
5	-(공란으로 둬)
6	-(공란으로 둬)

* 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96-100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.

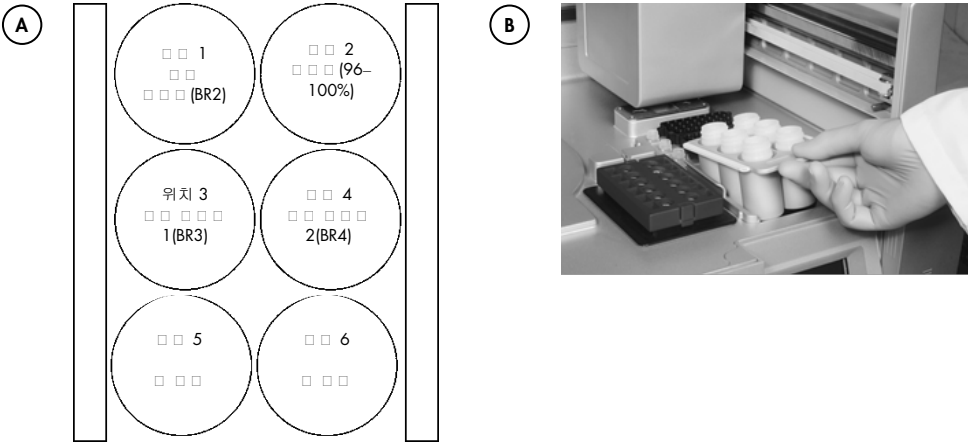


그림 16. 시약 병 랙 장착하기. [A] 시약 병 랙 내 병의 위치 및 내용물의 도해. [B] 랙을 QIAcube 위에 장착하기.

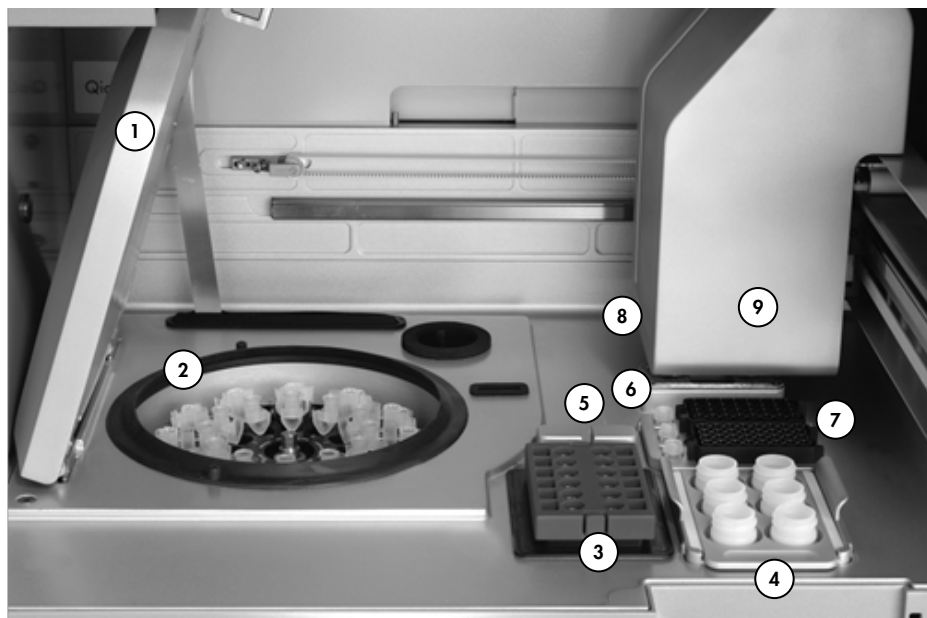


그림 17. QIAcube 의 내부 뷰.

- | | |
|------------|-------------------|
| ① 원심분리기 뚜껑 | ⑥ 마이크로 원심분리 튜브 슬롯 |
| ② 원심분리기 | ⑦ 팁 랙 |
| ③ 셰이커 | ⑧ 팁 및 컬럼 용 폐기 슬롯 |
| ④ 시약 병 랙 | ⑨ 로봇 암 |
| ⑤ 팁 센서 | |

스핀 컬럼(PRC, PSC), 마이크로 원심분리 튜브(MCT) 및 QIAcube 플라스틱 용기 필터 팁 1,000 μ l 을 채운 2 개 팁 랙을 QIAcube 위에 장착합니다(41 페이지, 그림 17 참조). 필요한 경우에 팁을 랙에 리필합니다.



QIAcube 에 사용할 수 있도록 제작된 1,000 μ l 필터 팁만 사용합니다.

유성펜을 사용하여 각 검체의 로터 어댑터 및 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 라벨 표시합니다. 사용할 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 열고 가위를 사용하여 뚜껑을 완전히 잘라 냅니다(43 페이지, 그림 18 참조).



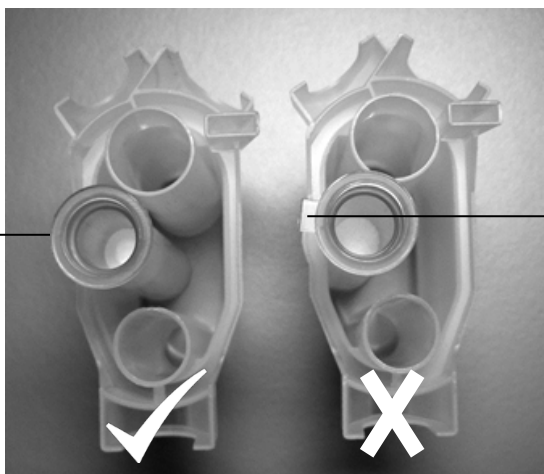
QIAcube 로봇 그리퍼가 제대로 작동하려면 뚜껑과 뚜껑을 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC; 그림 16 참조)에 연결한 모든 플라스틱 부품들을 완전히 제거(절단)해야 합니다. 그렇지 않으면 로봇 그리퍼가 스핀 컬럼(PSC, PRC)를 제대로 집을 수 없습니다.

표 4 및 그림 19(43 페이지)에 표시된 것과 같이 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC), PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC, 뚜껑 없음), 라벨 표시한 마이크로 원심분리 튜브(MCT) 등을 라벨 표시한 각 로터 어댑터의 적절한 위치에 장착하십시오.



스핀 컬럼(PRC)과 마이크로 원심분리 튜브(MCT) 뚜껑은 로터 어댑터 가장자리의 슬롯 바닥까지 꼭 밀어야 합니다. 그렇지 않으면 뚜껑이 원심분리 중에 파손됩니다.

적절히
제거된
컬럼 뚜껑



적절하게
제거되지
못한 컬럼
뚜껑, 뚜껑의
일부가

그림 18. PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC) 장착하기. PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 로터 어댑터의 중앙 위치에 장착합니다. 컬럼(PSC)을 장착하기 전에 뚜껑을 잘라 냅니다.

표 4. 로터 어댑터의 실험 기구

위치	시약	뚜껑 위치
1	PAXgene RNA 스핀 컬럼(적색, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder 스핀 컬럼(연보라색, PSC)(로터 어댑터에 장착하기 전에 뚜껑을 잘라냅니다)	-
3	마이크로 원심분리 튜브(MCT)*	L3

* PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 마이크로 원심분리 튜브(1.5ml)를 사용하십시오.

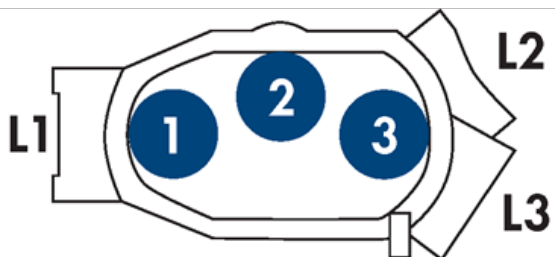


그림 19. 로터 어댑터 내 위치. 로터 어댑터는 튜브 위치가 3 개(1-3), 뚜껑 위치가 3 개(L1-L3) 있습니다.

원심분리기 장착하기

아래 그림 20 에 표시된 것과 같이 조립한 로터 어댑터를 원심분리기 버킷에 장착하십시오.



12 개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 원심분리기 로터를 방사상으로 균형을 이루도록 장착해야 합니다(45 페이지, 그림 21 참조). 12 개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 프로토콜 실행을 시작하기 전에 모든 원심분리기 버킷을 장착해야 합니다. 단일 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다.

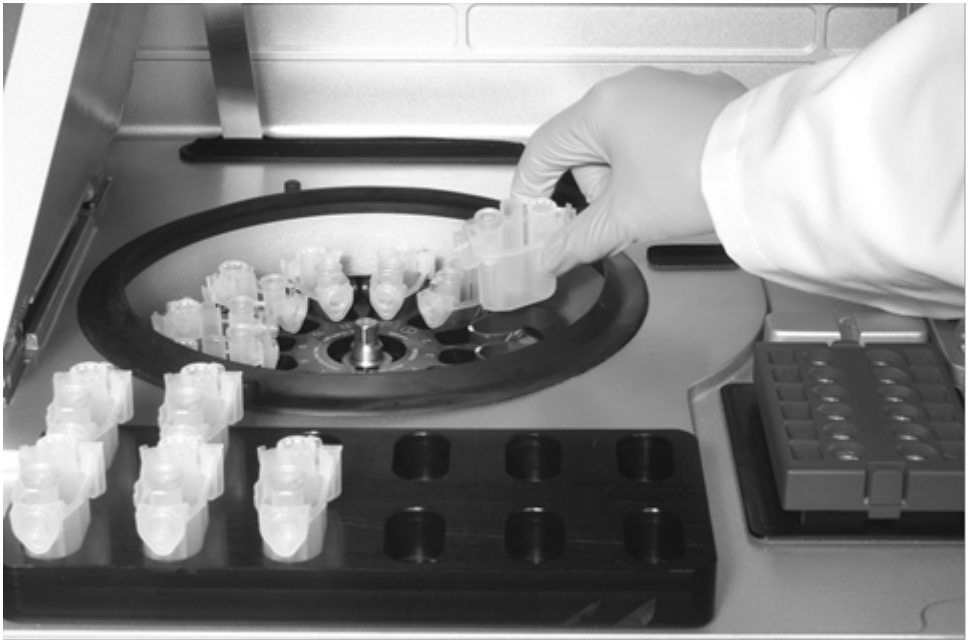


그림 20. 원심분리기 장착하기. 조립된 로터 어댑터를 원심분리기 버킷에 장착합니다.

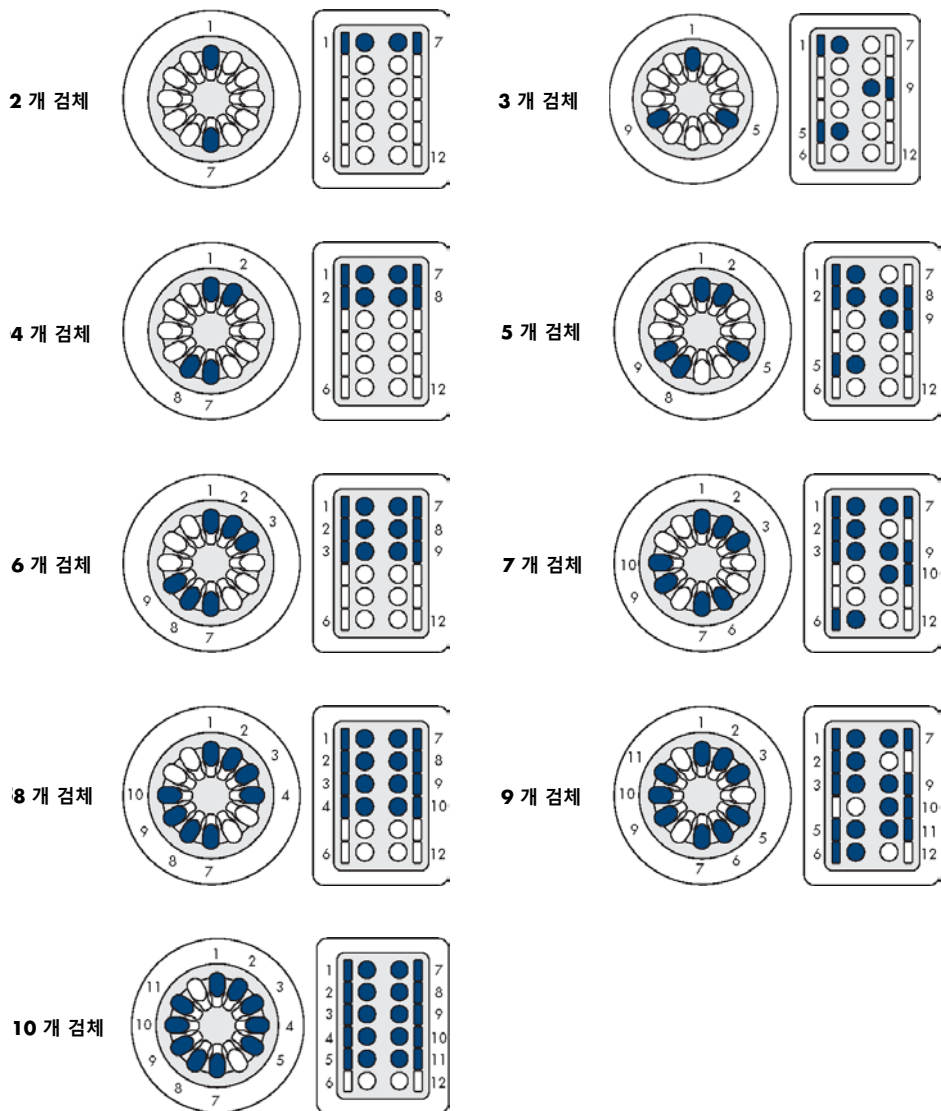


그림 21. 원심분리기 및 셰이커 장착하기. 2 개 검체에서 10 개 검체까지 처리하는 원심분리기 및 셰이커 위치가 표시되어 있습니다. 1 개 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다.

처리 튜브(PT)

이전 실행에 사용했다가 아직 마이크로 원심분리 튜브 슬롯에 남아 있는 처리 튜브(PT)를 제거하십시오(41 페이지, 그림 17 참조). 3 개의 처리 튜브(PT)에 실행에서 처리할 검체 개수에 따라 표 5 에 명시된 시약의 양을 채웁니다.

DNase I 배양 믹스의 경우, DNA 소화 완충액(RDD)의 지정된 용량을 피펫으로 처리 튜브(PT)에 넣은 후에 DNase I(RNFD) 저장 용액의 지정된 용량을 추가합니다. 1,000 μ l 피펫 팁으로 완전한 혼합물을 상하로 3 회 부드럽게 피펫팅하여 혼합해 줍니다.

PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2ml 의 처리 튜브(PT)를 사용하십시오. 튜브(PT)에 시약 이름을 분명하게 기재한 라벨 표시를 한 후에 그림 6(47 페이지)에 표시된 마이크로 원심분리 튜브 슬롯 내 해당 위치에 놓으십시오.



DNase I(RNFD)은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 쉬어링(Shearing)을 줄이려면 내경이 넓은 피펫 팁만 사용하여 혼합합니다. 보텍싱하지 마십시오.



표 5 에 명시된 필요한 용량만 피펫팅하십시오.

표 5. 마이크로 원심분리 튜브 슬롯 용의 튜브를 처리하는 데 필요한 시약의 용량

검체 개수	지정된 검체 개수에 대한 시약 용량(μl)		
	단백분해효소 K(PK)	DNase I 배양 믹스	용출 완충액(BR5)
2	126	187(23 DNase I + 164 완충액 RDD)	313
3	170	261(33 DNase I + 228 완충액 RDD)	399
4	213	334(42 DNase I + 292 완충액 RDD)	486
5	256	407(51 DNase I + 356 완충액 RDD)	572
6	299	481(60 DNase I + 421 완충액 RDD)	658
7	342	554(69 DNase I + 485 완충액 RDD)	745
8	386	627(78 DNase I + 549 완충액 RDD)	831
9	429	701(88 DNase I + 613 완충액 RDD)	918
10	472	775(97 DNase I + 678 완충액 RDD)	1004
12	558	921(115 DNase I + 806 완충액 RDD)	1177

표 6. 마이크로 원심분리 튜브 슬롯

	위치		
	A	B	C
내용물	단백분해효소 K(PK)	DNase I 배양 믹스	용출 완충액(BR5)
용기	처리 튜브(PT)*	처리 튜브(PT)*	처리 튜브(PT)*

* PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2ml 의 처리 튜브(PT)를 사용하십시오.

프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 사람 전혈의 총 RNA 를 수동 정제

시작 전 중요 사항

- 키트 박스가 손상되지 않게, 완충액이 누출되지 않게 하십시오. 손상된 키트는 사용하지 마십시오.
- 피펫을 사용할 때는 정확한 용량으로 설정되어 있고 액체가 정확하고 완전하게 흡인되고 분배되는지 확인합니다.
- 검체를 다른 튜브 또는 스핀 컬럼에 옮기는 일을 피하려면 유성펜을 사용하여 모든 튜브 및 스핀 컬럼에 적절하게 라벨 표시해야 합니다. 각 튜브(PT, MCT)의 뚜껑 및 몸체에 라벨 표시하십시오. 스핀 컬럼의 경우에 그 처리 튜브(PT)의 몸체에 라벨 표시하십시오. 액체를 각 튜브 또는 스핀 컬럼에 옮긴 후에는 튜브나 스핀 컬럼을 닫으십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엮지르면 RNA 의 수율 및 순도가 떨어질 수 있습니다.
- 원심분리 단계를 포함한 이 프로토콜의 모든 단계는 달리 지시된 경우를 제외하고는 실온(15–25°C)에서 수행해야 합니다.

핵산 증폭 기술의 민감도로 인해 검체를 다룰 때는 다음과 같은 예방조치를 취해야 교차 감염을 피할 수 있습니다.

- 피펫으로 검체를 스핀 컬럼(PRC, PSC)에 옮길 때는 컬럼의 가장자리를 적시지 말고 신중하게 수행합니다.
- 액체를 옮길 때마다 항상 피펫 팁을 교체합니다. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용합니다.
- 피펫 팁으로 스핀 컬럼(PRC, PSC) 막을 건드리는 것을 피합니다.
- 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 보텍싱하거나 가열한 후에는 잠시 원심분리하여 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거합니다.

- 전체 절차 내내 장갑을 착용합니다. 장갑과 검체가 접촉한 경우에는 즉시 장갑을 교체합니다.
- 스피ن 컬럼(PRC, PSC)을 마이크로 원심분리기에 넣기 전에 닫습니다. 절차에서 설명한 대로 원심분리합니다.
- 한 번에 스피ن 컬럼(PRC, PSC) 하나만 열고 에어로졸 발생을 피하기 위해 주의합니다.
- 다수의 검체를 효율적으로 동시에 처리하려면 원심분리 후에 스피ن 컬럼(PRC, PSC)을 옮길 수 있는 처리 튜브(PT)로 랙을 채우십시오. 통과액이 든 사용한 처리 튜브(PT)을 버리고, 스피ن 컬럼(PRC, PSC)이 든 새 처리 튜브(PT)를 바로 마이크로 원심분리기에 넣으십시오.

시작하기 전 해야 할 일

- 혈액을 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다루는 방법에 대한 권고사항을 보려면 부록 C(68 페이지)를 참조하십시오.
- 혈액 세포를 완전히 용해시키려면 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 2 시간 이상 배양해야 합니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 밤새 배양하면 수율이 향상될 수 있습니다. 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 2-8°C, -20°C 또는 -70°C 에서 보관한 경우에는 먼저 온도를 실온으로 변경하고 실온에서 2 시간 동안 보관한 후에 절차를 시작합니다.
- 10 페이지의 안전성 정보를 읽어 보십시오.
- RNA 를 취급하는 방법에 관한 지침을 읽어 보십시오(65 페이지, 부록 A).
- 제조업체 권고사항에 따라 피펫 및 셰이커-배양기와 같은 기구를 정기적으로 점검, 유지보수, 교정합니다.
- 셰이커-배양기는 제 5 및 20 단계에서 필요합니다. 셰이커-배양기의 온도를 55°C 로 설정합니다.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 중에 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 덩혀서 용해시킵니다.

- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96–100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.
- RNase-Free DNase Set 를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 저장 용액을 준비합니다. 고형 DNase I(RNFD; 1,500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase 재현탁 완충액(DRB) 550 μ l 에 용해시킵니다. 물약병을 개봉할 때 DNase I(RNFD)이 유실되지 않도록 주의하십시오. 동결건조 상태에서 용해된 DNase I(RNFD)을 보텍싱하지 마십시오. DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 혼합할 때는 튜브를 부드럽게 뒤집는 방식으로만 수행합니다.
- 현재 볼 수 있는 데이터들은 동결건조 상태에서 용해된 DNase I(RNFD)은 2–8°C 에서 최대 6 주 동안 보관할 수 있다고 밝히고 있습니다. DNase I(RNFD)을 장기간 보관하기 위해 유리병에서 저장 용액을 제거하여 1 회용 분주로 나누고 (키트와 함께 공급되는 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브[MCT]를 사용하세요. 5 개 분주를 나눌 수 있는 충분한 수량이 있습니다) –20°C 에서 최대 9 개월 동안 보관하십시오. 해동한 분주는 최대 6 주간 2–8°C 에서 보관할 수 있습니다. 분주를 해동한 후에는 재동결하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)를 동결건조 상태에서 용해하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(65 페이지, 부록 A)에 따라 수행하십시오.

*Kunitz 단위는 DNase I 를 측정할 때 흔히 사용하는 단위이며, 고중합 DNA 가 기질인 경우에 25°C, pH 5.0 에서 분당 밀리미터 당 0.001 의 A_{260} 증가를 유발할 수 있는 DNase I 의 양으로 정의합니다(Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

절차

1. 스윙 로터를 사용하여 3,000-5,000 x g 의 속도로 10 분 동안 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 원심분리합니다.



혈액 세포를 완전히 용해시키려면 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 실온(15–25°C)으로 2 시간 이상 배양해야 합니다.



로터는 둥근 바닥 튜브 용 튜브 어댑터가 있어야 합니다. 다른 유형의 튜브 어댑터를 사용하는 경우에는 튜브가 원심분리 중에 파손될 수 있습니다.

2. 디캔팅 또는 피펫팅으로 상층액을 제거합니다. 4ml 의 RNase-free 물(RNFW)을 펠렛에 추가하고 (키트와 함께 공급된) 신선한 보조 BD Hemogard 마개를 사용하여 튜브를 닫습니다.

상층액을 디캔팅할 때는 펠렛을 흔들지 말고 깨끗한 종이 타월로 튜브의 가장자리를 닦아 내십시오.

3. 펠렛이 육안으로 용해될 때까지 보텍싱하고 스윙 로터를 사용하여 3,000–5,000 x g 로 10 분 동안 원심분리하십시오. 상층액 전체를 제거하여 버리십시오.

보텍싱 후이지만 원심분리 전에 상층액에 남아 있는 작은 찌꺼기는 절차에 영향을 없습니다.



상층액을 완전하게 제거하지 않으면 용해를 억제하고 용해물을 희석시키며, 따라서 RNA 가 PAXgene 막에 결합하는 조건에 영향을 미칩니다.

4. 펠렛이 육안으로 용해될 때까지 350µl 재현탁 완충액(BR1)을 추가하고 보텍싱합니다.

5. 피펫으로 검체를 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT)에 넣습니다. 300µl 결합 완충액(BR2)과 40µl 단백질분해효소 K(PK)를 추가합니다. 셰이커-배양기를 400–1,400rpm 으로 사용하여 5 초 동안 보텍싱으로 혼합하고 55°C 로 10 분 동안 배양합니다. 배양 후에 셰이커-배양기의 온도를 65°C 로 설정합니다(제 20 단계).



결합 완충액(BR2)과 단백질분해효소 K(PK)를 검체에 추가하기 전에 함께 혼합하지 않습니다.

6. 용해물을 2ml 처리 튜브(PT)에 있는 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC; 연보라색)에 바로 넣고 최대 속도(그러나 20,000 x g 가 넘지 않는 범위 내에서)로 3 분 동안 원심분리합니다.



피펫으로 용해물을 세심하게 스핀 컬럼(PSC)에 넣고 용해물이 스핀 컬럼(PSC)에 완전히 이전되었는지 육안으로 확인합니다.

컬럼(PSC)과 튜브(PT)가 손상되지 않도록 20,000 x g 를 초과하지 않습니다.



검체 중에는 원심분리를 하지 않더라도 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 통과할 수 있는 것도 있습니다. 이는 검체의 점도가 낮아서 발생하는 현상이며, 제품 불량률의 표시로 이해하면 안 됩니다.

7. 처리 튜브 내의 펠렛을 흔들지 말고 통과액 분획의 상층액 전체를 신선한 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT)로 세심하게 옮기십시오.
8. 350µl 에탄올(96-100%, 순도 등급 p.a.)을 추가하십시오. 보텍싱으로 혼합하고 잠시(1-2 초 동안 500-1,000 x g 로) 원심분리하여 튜브 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거합니다.



원심분리의 시간은 핵산의 펠렛화와 총 RNA 의 수율 감소를 초래할 수 있기 때문에 1-2 초를 초과하면 안 됩니다.

9. 피펫으로 2ml 처리 튜브(PT)에 있는 700µl 검체를 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC; 적색)에 넣고 8,000–20,000 x g 로 1 분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 버립니다.
10. 피펫으로 남은 검체를 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 넣고 8,000–20,000 x g 로 1 분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 버립니다.



피펫으로 검체를 세심하게 스핀 컬럼(PRC)에 넣고 검체가 스핀 컬럼(PRC)에 완전히 이전되었는지 육안으로 확인합니다.

11. 피펫으로 350µl 세척 완충액 1(BR3)을 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 넣습니다. 1 분 동안 8,000–20,000 x g 로 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 버립니다.

12. 10 μ l DNase I(RNFD) 저장 용액을 1.5ml 의 마이크로 원심분리 튜브(MCT)의 70 μ l DNA 소화 완충액(RDD)에 추가합니다. 튜브를 부드럽게 털어서 혼합한 후에 잠시 원심분리하여 튜브 측면의 잔류 액체를 수집합니다.

예를 들어 10 개 검체를 처리할 때는 100 μ l DNase I(RNFD) 저장 용액을 700 μ l DNA 소화 완충액(RDD)에 추가합니다. 키트와 함께 공급되는 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 사용하십시오.



DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 혼합할 때는 튜브를 부드럽게 털는 방식으로만 수행하십시오. 보텍싱하지 마십시오.

13. 피펫으로 DNase I(RNFD) 배양 믹스(80 μ l)를 바로 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC) 막에 옮긴 후에 벤치 탑(20–30°C)에 15 분 동안 올려 놓습니다.



DNase I(RNFD) 배양 믹스를 바로 막 위로 옮깁니다. 믹스의 일부가 스핀 컬럼(PRC)의 벽 또는 O 링에 도포되어 남아 있는 경우에는 DNase 소화가 불완전하게 진행됩니다.

14. 피펫으로 350 μ l 세척 완충액 1(BR3)을 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 넣고 1 분 동안 8,000–20,000 $\times g$ 로 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 버립니다.

15. 피펫으로 500 μ l 세척 완충액 2(BR4)를 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 넣고 1 분 동안 8,000–20,000 $\times g$ 로 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 버립니다.



세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 사용하기 전에 에탄올을 세척 완충액 2(BR4)에 추가하십시오(49 페이지, “시작하기 전 해야 할 일” 참조).

16. 다른 500 μ l 세척 완충액 2(BR4)를 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 재차 추가하십시오. 8,000–20,000 $\times g$ 로 3 분 동안 원심분리하십시오.

17. 통과액이 들어 있는 처리 튜브(PT)를 버리고 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)을 새 2ml 처리 튜브(PT)에 넣으십시오. 8,000–20,000 $\times g$ 로 1 분 동안 원심분리하십시오.

18. 통과액이 들어 있는 처리 튜브(PT)를 버리십시오. PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)을 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT)에 넣고 피펫으로 40 μ l 용출 완충액(BR5)을 바로 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC) 막 위에 옮깁니다. 8,000–20,000 x g 로 1 분 동안 원심분리하여 RNA 를 용출합니다.

최대 용출 효율을 달성하려면 용출 완충액(BR5)으로 막 전체를 젖게 해야 합니다.

19. 용출 단계(제 18 단계)를 설명된 대로 40 μ l 용출 완충액(BR5) 및 동일한 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 사용하여 반복 실시합니다.

20. 웨이커-배양기(제 5 단계)에서 용출액을 교반하지 않고 65°C 로 5 분 동안 배양합니다. 배양 후에 즉시 얼음 위에서 냉각시킵니다.

이렇게 65°C 에서 배양하면 RNA 를 다운스트림 공정에 적합하게 변성시킵니다. 배양 시간이나 온도를 초과하지 마십시오.

21. RNA 검체를 즉시 사용하지 않으면 –20°C 또는 –70°C 에서 보관하십시오.

RNA 가 동결 및 해동의 반복 후에도 변성 상태를 유지하고 있으면 65°C 의 배양을 반복할 필요가 없습니다. RNA 검체를 진단 분석에서 사용하는 경우에는 제조업체가 공급하는 지침을 준수하십시오.

RNA 를 260nm 의 흡광도로 정확하게 정량화하려면 검체를 10mM Tris-HCl, pH 7.5 로 희석할 것을 권장합니다.* 검체를 RNase-free 물로 희석하면 값이 부정확하게 작아질 수 있습니다.

측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 대조액을 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 높은 백그라운드 흡광도 수준을 생성할 수 있습니다.

참고: Tris-HCl 완충액에서 정량화할 때는 다음 관계식을 사용하십시오.

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\mu\text{g/ml}$. 66 페이지, 부록 B 를 참조하십시오.

*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.

프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)로 수집한 사람 전혈의 총 RNA 를 자동 정제

시작 전 중요 사항

- 키트 박스가 손상되지 않게, 완충액이 누출되지 않게 하십시오. 손상된 키트는 사용하지 마십시오.
- 피펫을 사용할 때는 정확한 용량으로 설정되어 있고 액체가 정확하고 완전하게 흡인되고 분배되는지 확인합니다.
- 검체를 잘못된 튜브나 플라스틱 소모품으로 옮기는 것을 피하려면 모든 처리 튜브(PT), 마이크로 원심분리 튜브(MCT) 및 로터 어댑터를 유성펜을 사용하여 적절하게 라벨 표시하십시오. 각 마이크로 원심분리 튜브(MCT)의 뚜껑 및 몸체, 각 처리 튜브(PT)의 몸체, 각 로터 어댑터의 외벽 등에 라벨 표시를 하십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엮지르면 RNA 의 수율 및 순도가 떨어질 수 있습니다.
- 원심분리 단계를 포함한 이 프로토콜의 모든 단계는 달리 지시된 경우를 제외하고는 실온(15–25°C)에서 수행해야 합니다.

핵산 증폭 기술의 민감도로 인해 검체를 다룰 때는 다음과 같은 예방조치를 취해야 교차 감염을 피할 수 있습니다.

- 피펫으로 검체를 처리 튜브(PT)에 옮길 때는 튜브의 가장자리를 적시지 말고 바닥으로 세심하게 수행합니다.
- 액체를 옮길 때마다 항상 피펫 팁을 교체합니다. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용합니다.
- 피펫 팁으로 스피ن 컬럼(PRC, PSC) 막을 건드리는 것을 피합니다.
- 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 보텍싱하거나 가열한 후에는 잠시 원심분리하여 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거합니다.

- 전체 절차 내내 장갑을 착용합니다. 장갑과 검체가 접촉한 경우에는 즉시 장갑을 교체합니다.




시작하기 전 해야 할 일

- 혈액을 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다루는 방법에 대한 권고사항을 보려면 부록 C(68 페이지)를 참조하십시오.
- 혈액 세포를 완전히 용해시키려면 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 2 시간 이상 배양해야 합니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 밤새 배양하면 수율이 향상될 수 있습니다. 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 2-8°C, -20°C 또는 -70°C 에서 보관한 경우에는 먼저 온도를 실온으로 변경하고 실온에서 2 시간 동안 보관한 후에 절차를 시작합니다.
- 10 페이지의 안전성 정보를 읽어 보십시오.
- 37 페이지, "중요 참고 사항"을 읽어 보십시오.
- RNA 를 취급하는 방법에 관한 지침을 읽어 보십시오(65 페이지, 부록 A).
- QIAcube 와 함께 제공되는 *QIAcube 사용자 설명서* 및 추가 정보를 안전성 정보에 세심한 주의를 기울이면서 읽어 보십시오.
- 제조업체 권고사항에 따라 피펫 및 QIAcube 와 같은 기구를 정기적으로 점검, 교정합니다.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 중에 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 덥혀서 용해시킵니다.
- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96-100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.

- RNase-Free DNase Set 를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 저장 용액을 준비합니다. 고형 DNase I(RNFD; 1,500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase 재현탁 완충액(DRB) 550 μ l 에 용해시킵니다. 물약병을 개봉할 때 DNase I(RNFD)이 유실되지 않도록 주의하십시오. 동결건조 상태에서 용해된 DNase I(RNFD)을 보텍싱하지 마십시오. DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 혼합할 때는 튜브를 부드럽게 뒤집는 방식으로만 수행합니다.
- 현재 볼 수 있는 데이터들은 동결건조 상태에서 용해된 DNase I(RNFD)은 2-8°C 에서 최대 6 주 동안 보관할 수 있다고 밝히고 있습니다. DNase I(RNFD)을 장기간 보관하기 위해 유리병에서 저장 용액을 제거하여 1 회용 분주로 나누고 (키트와 함께 공급되는 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브[MCT]를 사용하세요. 5 개 분주를 나눌 수 있는 충분한 수량이 있습니다) -20°C 에서 최대 9 개월 동안 보관하십시오. 해동한 분주는 최대 6 주간 2-8°C 에서 보관할 수 있습니다. 분주를 해동한 후에는 재동결하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)를 동결건조 상태에서 용해하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(65 페이지, 부록 A)에 따라 수행하십시오.
- 올바른 웨이커 어댑터(QIAcube 에 포함; "2"로 표시된, 2ml 용 안전 잠금식 튜브용 어댑터를 사용하세요)를 설치하고 웨이커 랙을 어댑터 위에 놓으십시오.
- 폐기물 서랍을 확인하고 필요한 경우에 비우십시오.
- 프로토콜을 이전 실행에서 이미 수행한 경우가 아니면 프로토콜을 설치하십시오. "PAXgene Blood RNA Part A" 및 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 모두 설치합니다. 37 페이지, "QIAcube 에 프로토콜 설치하기"를 참조하십시오.

*Kunitz 단위는 DNase I 를 측정할 때 흔히 사용하는 단위이며, 고중합 DNA 가 기질인 경우에 25°C, pH 5.0 에서 분당 밀리미터 당 0.001 의 A_{260} 증가를 유발할 수 있는 DNase I 의 양으로 정의합니다(Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

절차

1. QIAcube 도어를 닫고 전원 스위치로 QIAcube 를 켭니다(38 페이지, 그림 15 참조).
비퍼 음이 울리면서 시작 화면이 표시됩니다. 기구가 자동으로 초기화 검사를 수행합니다.
2. QIAcube 도어를 열고 필요한 시약 및 플라스틱 용기를 QIAcube 에 장착하십시오.
39 페이지, "QIAcube 장착하기"를 참조하십시오.
시간 절약을 위해 장착은 다음과 같은 10 분 원심분리 단계(제 3 및 5 단계)의 하나 또는 두 단계 중에 수행할 수 있습니다.
3. 스윙 로터를 사용하여 3,000-5,000 x g 의 속도로 10 분 동안 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 원심분리합니다.
 혈액 세포를 완전히 용해시키려면 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 실온(15–25°C)으로 2 시간 이상 배양해야 합니다.
 로터는 둥근 바닥 튜브 용 튜브 어댑터가 있어야 합니다. 다른 유형의 튜브 어댑터를 사용하는 경우에는 튜브가 원심분리 중에 파손될 수 있습니다.
4. 디캔팅 또는 피펫팅으로 상층액을 제거합니다. 4ml 의 RNase-free 물(RNFW)을 펠렛에 추가하고 (키트와 함께 공급된) 신선한 보조 BD Hemogard 마개를 사용하여 튜브를 닫습니다.
상층액을 디캔팅할 때는 펠렛을 흔들지 말고 깨끗한 종이 타월로 튜브의 가장자리를 닦아 내십시오.
5. 펠렛이 육안으로 용해될 때까지 보텍싱하고 스윙 로터를 사용하여 3,000–5,000 x g 로 10 분 동안 원심분리하십시오. 상층액 전체를 제거하여 버리십시오.
보텍싱 후이지만 원심분리 전에 상층액에 남아 있는 작은 찌꺼기는 절차에 영향을 없습니다.
 상층액을 완전하게 제거하지 않으면 용해를 억제하고 용해물을 희석시키며, 따라서 RNA 가 PAXgene 막에 결합하는 조건에 영향을 미칩니다.
6. 펠렛이 육안으로 용해될 때까지 350µl 재현탁 완충액(BR1)을 추가하고 보텍싱합니다.

7. 피펫으로 검체를 2ml 처리 튜브(PT)에 넣습니다.



PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2ml 의 처리 튜브(PT)를 사용하십시오.

8. 검체가 들어 있는 열린 처리 튜브(PT)를 QIAcube 셰이커에 장착하십시오(41 페이지, 그림 17 참조). 쉽게 장착할 수 있도록 검체 위치에 번호를 표시했습니다. (QIAcube 에 포함된) 셰이커 랙 플러그를 각 처리 튜브 옆, 셰이커 랙 가장자리에 있는 슬롯에 삽입하십시오. 이렇게 하면 장착 확인 중에 검체를 검출할 수 있습니다.



올바른 셰이커 어댑터(QIAcube 에 포함; "2"로 표시된, 2ml 용 안전 잠금식 튜브용 어댑터)를 설치하십시오.



12 개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 45 페이지, 그림 21 에 표시된 것처럼 셰이커 랙을 장착하십시오. 1 개 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다.

9. QIAcube 기구 도어를 닫으십시오(38 페이지, 그림 15 참조).

10. "PAXgene Blood RNA Part A" 프로토콜을 선택한 후에 프로토콜을 시작하십시오.

QIAcube 의 터치 스크린에 표시된 지침에 따라 수행하십시오.



두 프로그램 부분(제 A 부 및 B 부)를 모두 QIAcube 에 설치하십시오(37 페이지, "프로토콜을 QIAcube 에 설치하기"를 참조하십시오).



QIAcube 가 검체, 팁, 로터 어댑터 및 시약 병의 장착 확인을 수행합니다.

11. "PAXgene Blood RNA Part A" 프로토콜을 완료했으면 QIAcube 기구 도어를 엽니다(38 페이지, 그림 15 참조). 로터 어댑터에서 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)을, 셰이커에서 빈 처리 튜브(PT)를 제거하여 버립니다.



실행 중에 기구가 스핀 컬럼을 로터 어댑터 위치 1(뚜껑 위치 L1)에서 로터 어댑터 위치 3(뚜껑 위치 L2)으로 옮깁니다(43 페이지, 그림 19 참조).

12. 로터 어댑터의, 정제된 RNA 가 들어 있는 모든 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT) 뚜껑을 닫습니다(위치 3, 뚜껑 위치 L3, 43 페이지, 그림 19). 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 QIAcube 셰이커 어댑터 위로 옮깁니다(41 페이지, 그림 17 참조).

13. QIAcube 기구 도어를 닫으십시오(38 페이지, 그림 15 참조).

14. "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 선택하여 시작합니다.

QIAcube 의 터치 스크린에 표시된 지침에 따라 수행하십시오.



이 프로그램은 검체를 65°C 로 배양하고 다운스트림 공정에 맞게 RNA 를 변성시킵니다. 다운스트림 공정에 열 변성 단계가 있어도 이 단계를 생략하지 마십시오. 충분한 RNA 변성은 다운스트림 공정에서 최대의 효율을 달성하기 위해 필수적입니다.

15. "PAXgene Blood RNA Part B" 프로그램을 완료하면 QIAcube 기구 도어를 엽니다(38 페이지, 그림 15 참조). 정제된 RNA 가 들어 있는 마이크로 원심분리 튜브(MCT)를 즉시 얼음 위에 놓습니다.



경고: 표면이 뜨겁습니다. 쉐이커의 온도는 최대 70°C(158°F)까지 도달할 수 있습니다. 뜨거울 때 접촉하는 일을 피하십시오.



정제된 RNA 가 QIAcube 에 남아 있지 않도록 하십시오. 검체를 냉각시키지 않았기 때문에 정제된 RNA 가 분해될 수 있습니다. 따라서 관리자가 없는 상태의 철야 검체 준비 실행은 권장하지 않습니다.

16. RNA 검체를 즉시 사용하지 않으면 -20°C 또는 -70°C 에서 보관하십시오.

RNA 는 동결 및 해동을 반복한 후에도 변성 상태를 유지하기 때문에 열 배양 프로토콜("PAXgene Blood RNA Part B")을 반복할 필요가 없습니다. RNA 검체를 진단 분석에 사용하는 경우에는 제조업체가 제공하는 지침을 준수하십시오.

RNA 를 260nm 의 흡광도로 정확하게 정량화하려면 검체를 10mM Tris-HCl, pH 7.5*로 희석할 것을 권장합니다. 검체를 RNase-free 물로 희석하면 값이 부정확하게 작아질 수 있습니다.

측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 대조액을 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가

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

높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 높은 백그라운드 흡광도 수준을 생성할 수 있습니다.



Tris-HCl 완충액에서 정량화할 때는 다음 관계식을 사용하십시오.

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\mu\text{g/ml}$. 66 페이지, 부록 B 를 참조하십시오.

17. 시약 병 랙을 QIAcube 작업대에서 제거하고(41 페이지, 그림 17 참조), 모든 병을 라벨 표시된 해당 뚜껑으로 닫으십시오. 병 속의 완충액은 최대 3 개월 간 실온(15–25°C)에서 보관할 수 있습니다. QIAcube 마이크로 원심분리 튜브 슬롯 내, 처리 튜브(PT)에 남아 있는 시약을 제거하여 버리십시오(41 페이지, 그림 17 참조). 원심분리기에서 로터 어댑터를 제거하여 버리십시오(41 페이지, 그림 17 참조). QIAcube 폐기물 서랍을 비우십시오(38 페이지, 그림 15 참조). QIAcube 기구 도어를 닫고 전원 스위치로 기구를 끄십시오(38 페이지, 그림 15 참조).

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는데 도움을 줄 수 있습니다. 더 자세한 정보는 다음 당사 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문 페이지를 참조하십시오. www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx QIAGEN 기술 서비스 소속 과학자들은 본 안내서의 정보 및 프로토콜 또는 검체 및 분석 기술에 대해 가질 수 있는 어떠한 질문이든 기꺼이 답변해드립니다(연락처 정보는 마지막 페이지를 참고하거나 www.qiagen.com 을 방문하십시오).

의견 및 제안

RNA 분해

RNase 오염



절차 중에 또는 나중에 취급할 때 RNase 가 시약에 유입되지 않도록 주의하십시오(65 페이지, 부록 A 참조).

낮은 RNA 수율

a) PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 혈액이 2.5ml 미만



PAXgene Blood RNA Tube(BRT; *PAXgene Blood RNA Tube 안내서* 참조)에 2.5ml 혈액을 수집하십시오.

b) RNA 농도를 물 속에서 측정



정확한 정량화를 위해 RNA 를 10mM Tris-HCl, pH 7.5*로 희석해야 합니다(66 페이지, 부록 B 참조).

c) 수동 프로토콜 제 9 및 10 단계에서 세로 찌꺼기를 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC)으로 옮김



수동 프로토콜의 제 7 단계에서 피펫으로 상층액을 옮길 때 큰 입자를 옮기지 마십시오(작은 찌꺼기를 옮기는 것은 절차에 영향이 없습니다).

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

의견 및 제안

- d) 제 3 단계에서
상층액을 완전히
제거하지 않음



모든 상층액을 제거하십시오. 상층액을 디캔팅할 때는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT) 가장자리를 종이 타월 위에 대서 액체 방울을 제거하십시오. 교차 오염을 방지하기 위한 적절한 예방 조치를 취하십시오.

- e) 혈액을 PAXgene Blood
RNA Tube(BRT)에
수집한 후에 배양한
시간이 2 시간 미만



혈액을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 후에 2 시간 이상 동안 배양하십시오.

낮은 A_{260}/A_{280} 값

- a) A_{260}/A_{280} 측정을 위해
RNA 를 희석할 때 물을
사용



순도를 측정하기 전에 RNA 를 희석할 때는 10mM Tris-HCl, pH 7.5 를 사용하십시오 *(66 페이지, 부록 B 참조).

- b) 분광 광도계를 제대로
영점 조정하지 않음



측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 pH 7.5 의 10mM Tris-HCl 완충액으로 구성된 대조액을 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 높은 백그라운드 흡광도 수준을 생성할 수 있습니다.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

의견 및 제안


기구 고장

QIAcube 가 제대로
작동하지 않음


*QIAcube 사용자 설명서*를 문제해결 절에 세심한
주의를 기울이면서 읽어 보십시오. QIAcube 를
*QIAcube 사용자 설명서*에서 설명한 내용에 따라
올바르게 유지 보수하십시오.

부록 A: RNA 취급에 관한 일반적인 설명

RNA 처리

 리보뉴클레아제(RNase)는 기능 시 일반적으로 공동 인자를 요구하지 않는 매우 안정적이고 활발한 효소입니다. RN 아제는 불활성화하기 어려우며, 아주 적은 양으로도 RNA 를 분해할 수 있으므로 플라스틱용기나 유리 용기를 사용하기 전에 반드시 RN 아제 오염을 제거해야 합니다. 정제 절차 중에 또는 그 이후에 RNA 검체에 우발적으로 RN 아제를 개입시키지 않도록 세심하게 주의하십시오. RNase-free 환경을 조성하고 유지하려면 RNA 작업을 수행할 때 1 회용 및 비 1 회용 용기를 전처리하고 사용하는 중에 예방 조치를 취해야 합니다.

일반 취급

 RNA 작업을 수행할 때는 항상 적절한 미생물학적 무균화 기법을 활용해야 합니다. 손과 먼지 입자는 세균과 곰팡이를 매개하며, 가장 흔한 RNase 오염원입니다. 시약 및 RNA 검체를 다룰 때는 피부 표면이나 먼지 발생 실험 장비로 인해 RNase 오염이 발생하지 않도록 항상 라텍스 또는 비닐 장갑을 착용해야 합니다. 자주 장갑을 교체하고 가능한 한 항상 튜브를 닫아 두십시오. 다운스트림 공정을 위해 분주를 피펫팅할 때는 정제된 RNA 를 얼음 위에 유지하십시오.

유리 용기 및 용액에서 RNase 오염을 제거하는 프로토콜은 Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 와 같은 일반적인 분자 생물학 안내서에서 볼 수 있습니다.

부록 B: 총 RNA 의 정량화 및 품질 결정

RNA 의 정량화

RNA 의 농도는 분광 광도계에서 260nm(A_{260})을 기준으로 흡광도를 측정하여 결정해야 합니다. 유의미하려면 측정치가 분광 광도계의 선형 범위 내에 속해야 합니다. 260nm 에서 1 단위의 흡광도는 ml 당 RNA 44 μ g 에 해당합니다($A_{260} = 1 \Rightarrow 44\mu\text{g/ml}$). 이 관계는 10mM Tris-HCl, * pH 7.5 의 측정치에만 타당합니다. 따라서 RNA 검체를 희석해야 하며, 희석 작업은 10mM Tris-HCl 에서 수행해야 합니다. 아래에서 논의하는 것처럼(67 페이지, "RNA 의 순도" 참조) 260nm 및 280nm 의 흡광도 값 비율은 RNA 순도의 추정치입니다. RNA 검체를 측정할 때는 큐벳이 RNase-free 여야 합니다. 측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 대조액을 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 높은 백그라운드 흡광도 수준을 생성할 수 있습니다. RNA 정제화에 관련된 계산 사례가 아래에 나와 있습니다.

$$\begin{aligned}\text{RNA 검체 용량} &= 80\mu\text{l} \\ \text{희석(1/15)} &= \text{RNA 검체 } 10\mu\text{l} + 140\mu\text{l } 10\text{mM Tris-HCl, pH 7.5} \\ \text{큐벳에 있는 희석 검체의 흡광도를 측정하십시오(RNase-free).} \\ A_{260} &= 0.3 \\ \text{검체 농도} &= 44 \times A_{260} \times \text{희석 배율} \\ &= 44 \times 0.3 \times 15 \\ &= 198\mu\text{g/ml} \\ \text{총 수율} &= \text{농도} \times \text{검체 용량(밀리리터)} \\ &= 198\mu\text{g/ml} \times 0.08\text{ml} \\ &= 15.8\mu\text{g RNA}\end{aligned}$$

*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.

RNA 의 순도

260nm 및 280nm(A_{260}/A_{280})의 측정치 비율은 단백질과 같이 UV 에 흡수되는 오염 물질에 대한 RNA 순도의 추정치입니다. 그러나 A_{260}/A_{280} 비율은 pH 의 영향을 많이 받습니다. pH 가 낮으면 A_{260}/A_{280} 비율이 낮아지고 단백질 오염에 대한 민감도가 떨어집니다.* 정확한 값을 위해 당사는 10mM Tris-HCl, pH 7.5 에서 흡광도를 측정할 것을 권장합니다. 순수한 RNA 는 A_{260}/A_{280} 비율이 10mM Tris-HCl, pH 7.5 에서 1.8–2.2 입니다. 측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 대조액을 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 높은 백그라운드 흡광도 수준을 생성할 수 있습니다.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

부록 C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 작동하기



아래의 BD 권고사항은 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다룰 때 도움이 될 수 있습니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 대한 자세한 내용은 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*를 참조하십시오.

BD Hemogard 마개의 제거에 관한 지침

1. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 한 손으로 잡고 엄지를 BD Hemogard 마개에 아래에 둡니다. (팔을 견고한 표면 위에 두면 안정성을 높일 수 있습니다.) 다른 손으로는 BD Hemogard 마개를 비틀면서 튜브 스톱퍼가 풀릴 때까지 다른 손의 엄지로 밀어 올립니다.
2. 마개를 들어 올리기 전에 엄지를 다른 곳으로 치웁니다. 엄지로 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)의 마개를 밀어서 제거하지 마십시오. 주의: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액이 들어 있으면 노출 위험이 존재합니다. 마개 제거 중에 부상 발생을 방지하려면 마개를 위로 미는 데 사용한 엄지를 BD Hemogard 마개가 풀리자마자 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 떼야 합니다.
3. 마개를 올려서 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 제거하십시오. 드물지만 플라스틱 차폐물이 고무 스톱퍼로부터 분리되는 경우에도 마개를 재조립하지 마세요. 고무 스톱퍼를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 세심하게 제거하세요.

보조 BD Hemogard 마개의 삽입에 관한 지침

1. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 덮고 있는 마개를 교체하십시오.

2. 스톱퍼가 다시 완전히 자리를 잡을 때까지 비틀면서 강하게 아래로 누르십시오. 마개가 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다룰 때 튜브에 안정적으로 자리를 잡으려면 스톱퍼를 완전히 재삽입해야 합니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene 스핀 컬럼, 50 Shredder 스핀 컬럼, 처리 튜브, RNase-Free DNase I, RNase-Free 시약 및 완충액. PAXgene Blood RNA Tubes 와 함께 사용	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 개 채혈 튜브	762165
QIAGEN 에서 주문할 수 있는 관련 제품		
Starter Pack, QIAcube	팩 구성품: 시약 병 랙(3); 랙 라벨 표시용 스트립(8); 200 μ l 필터 팁(1,024); 1,000 μ l 필터 팁(1,024); 1,000 μ l 필터 팁, 넓은 내경(1,024); 30ml 시약 병(18); 로터 어댑터(240); 로터 어댑터 홀더	990395
Filter-Tips, 1000 μ l (1024)	평균 1 회용 필터 팁, 랙	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	뚜껑이 있는 시약 병(30ml); 6 개 들어 팩; QIAcube 시약 병 랙과 함께 사용	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 회분: 240 개 1 회용 로터 어댑터; QIAcube 와 함께 사용	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube 작업대에서 6 x 30ml 시약	990390

	병을 수용하는 랙	
Rotor Adapter Holder	12 개 1 회용 로터 어댑터의 홀더; QIAcube 와 함께 사용	990392
BD 에서 주문할 수 있는 관련 제품*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0.75 인치 바늘, 루어 어댑터의 12 인치 튜빙; 상자 당 50 개, 케이스 당 200 개	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	13mm 및 16mm 직경 전용 케이스; 1,000/케이스	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Red BD Hemogard 마개 및 종이 라벨의 13 x 75mm 4.0ml 서랍; 100 개/상자, 1,000 개/케이스	368975

* 이 채혈 부속품은 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)와 함께 사용할 수 있는 전형적인 제품입니다. 주문 방법 등, 이 부속품에 대한 자세한 내용은 www.PreAnalytiX.com 을 방문해 주십시오.

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 PreAnalytiX 또는 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용자 설명서를 참조하십시오. PreAnalytiX 및 QIAGEN 키트 안내서 및 사용자 설명서는 www.PreAnalytiX.com 및 www.qiagen.com 에서 구하거나, PreAnalytiX 기술 서비스 팀에 요청할 수 있습니다.

안내서 개정 이력

문서 및 개정	개정	날짜
HB-0101-004, R2	문서 전체에서 GHS 규정을 준수하기 위한 개정	2015/06
HB-0101-005, R3	새 양식: 자동화 프로토콜 및 성능 데이터 개정; GHS 규정을 준수하기 위한 안전성 정보의 개정; 기구 세부사항 및 제품 사용 제한 고지문에 대한 개정.	2019/02
HB-0101-006, R3	5 페이지의 키트 내용물 표에서 키트 이름 정정.	2020/01

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX 제품은 QIAGEN 및 BD 회사가 판매합니다.

Australia • Orders 03 9840 9800 • Fax 03 9840 9888 • Technical 1 800 243 066
Austria • Orders 0800 28 10 10 • Fax 0800 28 10 19 • Technical 0800 28 10 11
Belgium • Orders 0800 79612 • Fax 0800 79611 • Technical 0800 79556
Brazil • Orders 0800 557779 • Fax 55 11 5079 4001 • Technical 0800 557779
Canada • Orders 800 572 9613 • Fax 800 713 5951 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)
China • Orders 0086 21 3865 3865 • Fax 0086 21 3865 3965 • Technical 800 988 0325, 800 988 0327
Denmark • Orders 80 885945 • Fax 80 885944 • Technical 80 885942
Finland • Orders 0800 914416 • Fax 0800 914415 • Technical 0800 914413
France • Orders 01 60 920 926 • Fax 01 60 920 925 • Technical 01 60 920 930 • Offers 01 60 920 928
Germany • Orders 02103 29 12000 • Fax 02103 29 22000 • Technical 02103 29 12400
Hong Kong • Orders 800 933 965 • Fax 800 930 439 • Technical 800 930 425
Ireland • Orders 1800 555 049 • Fax 1800 555 048 • Technical 1800 555 061
Italy • Orders 02 33430411 • Fax 02 33430426 • Technical 800 787980
Japan • Telephone 03 5547 0811 • Fax 03 5547 0818 • Technical 03 5547 0811
Korea (South) • Orders 1544 7145 • Fax 1544 7146 • Technical 1544 7145
Luxembourg • Orders 8002 2076 • Fax 8002 2073 • Technical 8002 2067
Mexico • Orders 01 800 7742 639 • Fax 01 800 1122 330 • Technical 01 800 7742 639
The Netherlands • Orders 0800 0229592 • Fax 0800 0229593 • Technical 0800 0229602
Norway • Orders 800 18859 • Fax 800 18817 • Technical 800 18712
Singapore • Orders 65 67775366 • Fax 65 67785177 • Technical 65 67775366
Spain • Orders 91 630 7050 • Fax 91 630 5145 • Technical 91 630 7050
Sweden • Orders 020 790282 • Fax 020 790582 • Technical 020 798328
Switzerland • Orders 055 254 22 11 • Fax 055 254 22 13 • Technical 055 254 22 12
UK • Orders 01293 422 911 • Fax 01293 422 922 • Technical 01293 422 999
USA • Orders 800 426 8157 • Fax 800 718 2056 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

Argentina, Uruguay and Paraguay • Orders 0800 444 5523
Australia • Orders 1 800 656 100 • Fax 1 800 656 110
Austria • Orders 43 1 7063660 • Fax 43 1 706366011
Belgium • Orders 32 53720556 • Fax 32 53720549
Brazil • Orders 0800 55 5654
Canada • Orders 800 268 5430 • Fax 800 565 0897
Denmark • Orders 45 43 43 45 66 • Fax 45 43 96 56 76
East Europe, Middle East & Africa (EMA) • Orders 971 4 3379525 • Fax: 971 4 03379551
Finland • Orders 358 9 88 70 780 • Fax 358 9 88 70 7816
France • Orders 33 4 76 68 36 36
Germany • Orders 49 6221 3050 • Fax 49 6221 305216
Italy • Orders 39 2 48240 500 • Fax 39 2 48240 344
The Netherlands • Orders 31 20 582 9420 • Fax 31 20 582 9421
New Zealand • Orders 0800 572 468 • Fax 0800 572 469
Spain • Orders 34 91 848 8104 • Fax 34 91 848 8115
Sweden • Orders 46 8 775 51 00 • Fax 46 8 645 08 08
Switzerland • Orders 41 61 4852224 • Fax 41 61 4852200
UK • Orders 0800 917 8776
USA • Orders 888 237 2762 • Fax 800 847 2220 • Technical 800 631 0174

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

