

2019 년 9 월

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit 사용 지침(안내서)

버전 1



50

IVD

CE

REF



R4 MAT

61504

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

1118364KO

목차

용도.....	4
요약 및 설명.....	4
절차의 원리.....	5
검체의 양.....	5
검체 용해.....	7
QIAamp Mini 컬럼 막에 흡착.....	7
잔류 오염물질 제거.....	7
순수 핵산의 용출.....	8
핵산의 수율 및 크기.....	8
프로토콜 설명.....	9
제공물.....	10
키트 내용물.....	10
필요하지만 제공되지 않는 재료.....	11
경고 및 주의사항.....	12
시약 보관 및 취급.....	15
시료의 보관 및 취급.....	16
절차.....	17
완충액 및 시약 준비.....	24
Breeze 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml 로부터 순환 핵산 정제.....	27
클래식 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml 로부터 순환 핵산 정제.....	32
정도 관리.....	37
제한 사항.....	37

기호.....	38
참고 문헌.....	40
연락처 정보.....	40
문제 해결 가이드.....	41
부록 A: 혈액 혈장 분리 및 보관에 대한 권장사항.....	44
부록 B: RNA 취급에 관한 일반적인 설명.....	46
주문 정보.....	47
안내서 개정 이력.....	48

용도

QIAamp DSP Circulating NA Kit 는 실리카 막 기술(QIAamp 기술)을 사용하여 인간 혈액 혈장 검체에서 순환, 무세포 DNA 및 RNA 를 분리 및 정제하는 시스템입니다.

이 제품은 분자생물학 기법을 교육을 받은 기술자 및 의사와 같은 전문 사용자가 사용해야 합니다.

QIAamp DSP Circulating NA Kit 는 체외 진단용입니다.

요약 및 설명

자유 순환 핵산은 인간 혈장에 <1000 bp(DNA) <1000 nt(RNA), 또는 작게는 20 nt(miRNAs)의 짧은 단편으로 존재합니다. 인간 혈액 혈장 내 자유 순환 핵산의 농도는 대개 낮으며, 인간 검체 내 1–100 ng/ml 의 범위로 개인 간에 상당한 차이가 있습니다(1–5).

QIAamp DSP Circulating NA Kit 으로 인간 혈장에서 순환 핵산을 효율적으로 정제할 수 있습니다. 검체는 신선한 상태이거나 또는 냉동된 상태일 수 있습니다. QIAvac 24 Plus 의 확장 튜브 및 진공 처리로 최대 5 ml 의 시작 검체량을 허용하며 20–150 μ l 사이의 유연한 용출량을 통해 낮은 농도로 존재하는 핵산 종을 농축할 수 있습니다.

용출된 자유 순환 유전체 DNA 또는 RNA 는 다운스트림 공정에 즉시 사용할 수 있으며, 보관에 적합합니다. QIAamp DSP Circulating NA Kit 는 단백질, 핵산분해효소, 기타 불순물을 효율적으로 제거할 수 있습니다.

절차의 원리

QIAamp DSP Circulating NA 절차는 4 단계(용해, 결합, 세척, 용출)로 구성되며, QIAamp Mini 컬럼을 사용하여 QIAvac 시스템에서 수행됩니다. 확고한 절차는 검체 간 교차 오염을 최소화하는 데 도움이 되고 잠재적 감염성 검체 취급 시 사용자 안전성을 향상시킵니다.

이 간단한 절차는 2 시간 미만에 최대 24 개의 검체를 동시에 처리하는 데 적합합니다.

검체의 양

QIAamp Mini 컬럼은 짧게는 20 nt 개 뉴클레오티드의 단편화된 핵산에 결합하지만, 수율은 검체량과 검체 내 순환 핵산 농도(일반적으로 혈장 내 1-100 ng/ml)에 따라 다릅니다. QIAamp DSP Circulating NA 절차는 최대 5 ml의 검체량에 최적화되어 있습니다.

QIAamp DSP
Circulating NA Kit 절차

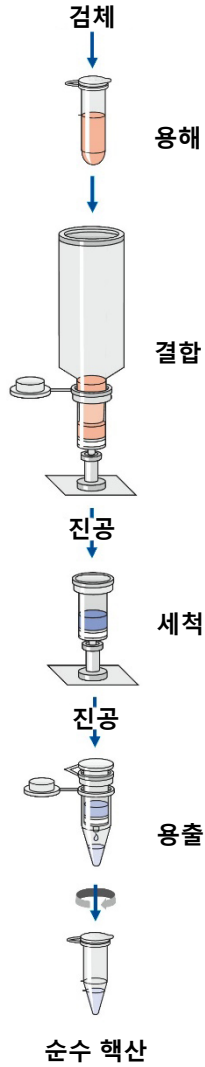


그림 1. QIAamp DSP Circulating NA Kit 절차의 개요

검체 용해

생물학적 체액 내 자유 순환 핵산은 보통 단백질과 결합하거나 소포에 둘러싸여 있으므로, QIAamp Mini 컬럼과의 선택적 결합을 위한 핵산을 방출하기 위해 효율적인 용해 단계가 필요합니다. 따라서, 검체는 단백분해효소 K 및 Buffer ACL 이 있는 상태에서 고온의 고도 변성 조건하에서 용해되고, 이는 DNase 및 Rnase 가 비활성화되도록 하여 결합 단백질, 지질, 소포로부터 핵산을 방출시킵니다.

QIAamp Mini 컬럼 막에 흡착

순환 핵산이 막에 최적으로 결합하도록 Buffer ACB 를 용해물에 첨가하여 결합 조건을 조절합니다. 용해물이 QIAamp Mini 컬럼으로 옮겨지고, 용해물이 진공 압력에 의해 유인되면서 순환 핵산이 대량으로 실리카 막에 흡착됩니다. 염 및 pH 조건은 PCR 및 기타 다운스트림 효소 반응을 억제할 수 있는 대부분의 단백질 및 기타 오염 물질이 QIAamp Mini 컬럼 막에 남아 있지 않도록 합니다.

진공 프로토콜에는 진공 매니폴드(예: QIAvac Connecting System 이 있는 QIAvac 24 Plus) 및 약 800–900 mbar 의 진공을 달성할 수 있는 진공 펌프(예: QIAGEN® Vacuum Pump)가 필요합니다. 진공 압력을 쉽게 모니터링하고 편리하게 진공 해제하기 위해 Vacuum Regulator 를 사용해야 합니다(QIAvac Connecting System 의 일부).

잔류 오염물질 제거

핵산은 막에 결합되어 있는 반면, 오염물질은 3 번의 세척 단계에서 효율적으로 씻겨 나갑니다.

순수 핵산의 용출

용출은 Buffer AVE 를 사용하여 수행됩니다. 한 단계에서 순도가 높은 순환 핵산이 실온 상태인 Buffer AVE 에서 용출됩니다. 50–150 μl 의 유연한 용출량을 적용할 수 있습니다. 더 높은 핵산 농도가 필요한 경우, 용출량을 20 μl 까지 낮게 줄일 수 있습니다. 용출량이 50 μl 미만이면 핵산 용출액 농도가 더 높아지지만 총 수율이 더 낮아질 수 있습니다.

회수된 용출액의 양은 컬럼에 적용된 용출 완충액의 양보다 최대 5 μl 적을 수 있습니다.

핵산의 수율 및 크기

생물학적 검체로부터 분리되는 자유 순환 핵산의 수율은 일반적으로 1 μg 미만이며, 따라서 분광 광도계로 판별하기 어렵습니다. QIAamp DSP Circulating NA Kit 를 사용하여 검체로부터 획득한 순환 DNA 및 RNA 의 절대 수율은 여러 개인으로부터 얻은 검체별로 다양하며 기타 요인(예: 특정 질병 상태)에 따라서도 달라집니다. 또한, 추출된 핵산에 존재하는 운반체 RNA 가 UV 흡광도 측정값의 대부분을 차지할 가능성이 높습니다(25 페이지 참조). 수율 결정을 위해 정량적 증폭 방법이 권장됩니다.

QIAamp DSP Circulating NA Kit 를 사용하여 정제된 순환 핵산의 크기 분포는 아가로스 겔 전기영동법 또는 표적 특이적 표지 프로브의 혼성화⁵ 또는 미세유체 전기영동 용액(예: Agilent Bioanalyzer)를 통해 확인할 수 있습니다.

프로토콜 설명

이 안내서에는 두 가지 프로토콜에 나와 있습니다.

“Breeze 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1–5 ml 로부터 순환 핵산 정제”(27 페이지)는 1 ml 단계에서 최대 5 ml 혈장을 처리하기 위한 것이며 직접 처리 및 소요 시간이 단축되도록 최적화되었습니다.

“클래식 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1–5 ml 로부터 순환 핵산 정제”(32 페이지)는 1 ml 단계에서 최대 5 ml 혈장을 처리하기 위한 것이며 QIAamp DSP Circulating NA Kit 안내서 개정본 3(R3)의 프로토콜을 구성합니다.

제공물

키트 내용물

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
카탈로그 번호			61504
준비 수			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes(WT) (세척 튜브가 있는 QIAamp Mini 스피ن 컬럼) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders(컬럼 확장기) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes(세척 튜브) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes(용출 튜브) (1.5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors(백커넥터)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer*(용해 완충액)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer*(결합 완충액)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (세척 완충액 1) (농축액)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2'	Wash Buffer 2' (세척 완충액 2) (농축액)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE'	Elution Buffer' (용출 완충액) (보라색 캡)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K(QIAGEN 단백질해효소 K)	PROTK	4 x 7 ml
운반체	Carrier RNA (운반체 RNA) (빨간색 캡)	CAR RNA	310 µg
	안내서	HB	1

* 카오트로픽 염을 함유하고 있습니다. 경고 및 주의사항은 12 페이지를 참조하십시오.

' 방부제 역할을 하는 아지드화나트륨을 함유하고 있습니다.

필요하지만 제공되지 않는 재료

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

제조업체의 권고사항에 따라 기기를 점검하고 교정했는지 확인하십시오.

모든 프로토콜의 경우

- 피펫(조절식)
- 멸균 피펫 팁(교차 오염을 방지하기 위해 에어로졸 막이 있는 피펫 팁을 권장)
- 56°C 또는 60°C 에서 50 ml 의 원심분리 튜브를 고정할 수 있는 수조 또는 가열 블록 *
- 2 ml 세척 튜브를 고정할 수 있는 56°C 의 가열 블록 또는 유사한 장치(클래식 프로토콜에만 해당)*
- 마이크로 원심 분리기(2 ml 튜브용 로터 포함)*
- 50 ml 원심분리 튜브
- QIAvac 24 Plus Vacuum manifold(카탈로그 번호 19413)
- QIAvac Connecting System(카탈로그 번호 19419) 또는 이와 동등한 것
- Vacuum Pump(카탈로그 번호 84010[미국 및 캐나다], 84000[일본], 또는 84020[기타 국가들]) 또는 -800 에서 -900 mbar 의 진공을 생성할 수 있는 동등한 펌프
- 에탄올(96-100%)[†]
- 이소프로판올(100%)
- 부서진 얼음("클래식 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml 로부터 순환 핵산 정제"에만 해당.)
- 일부 검체는 인산염 완충 식염수(Phosphate-Buffered Saline, PBS)로 희석해야 할 수도 있습니다.
- 선택사항: VacValve(카탈로그 번호 19408)


* 제조업체의 권고사항에 따라 기기를 점검하고 캘리브레이션했는지 확인하십시오.

[†] 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오.

경고 및 주의사항

체외 진단용

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.qiagen.com/safety 에서 편리하고 적은 용량의 PDF 형식으로 제공되며, 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 검색하고 인쇄할 수 있습니다.

경고	부상의 위험
	검체 준비 과정의 폐기물에 표백제나 산성용액을 직접 가하지 마십시오.

Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1 은 표백제와 결합할 때 반응성이 높은 화합물을 형성할 수 있는 구아니딘 염을 함유하고 있습니다.

이런 완충액이 들어 있는 액체를 흘린 경우, 적절한 실험실 세제 및 물로 청소하십시오. 흘린 액체에 감염체가 들어 있을 가능성이 있으면 해당 부분을 먼저 실험실 세제 및 물로 청소한 후 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨으로 청소하십시오.

QIAamp DSP Circulating NA Kit 의 구성품에는 다음과 같은 위험 및 예방 조치 안내문이 적용됩니다.

Buffer ACB



내용물: 염산 티오시아네이트. 위험! 삼키면 해롭습니다. 피부와 접촉하거나 흡입하면 해로울 수 있습니다. 심각한 피부 화상 및 눈 손상을 야기합니다. 수생 생물에게 장기적으로 해로운 영향을 미칠 수 있습니다. 산과 접촉 시 독성 가스를 방출합니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용합니다. 눈에 묻은 경우: 몇 분 동안 물로 조심스럽게 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락합니다.

Buffer ACL



내용물: 염산 티오시아네이트. 위험! 삼키면 해롭습니다. 피부와 접촉하거나 흡입하면 해로울 수 있습니다. 심각한 피부 화상 및 눈 손상을 야기합니다. 수생 생물에게 장기적으로 해로운 영향을 미칠 수 있습니다. 산과 접촉 시 독성 가스를 방출합니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용합니다. 눈에 묻은 경우: 몇 분 동안 물로 조심스럽게 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락합니다.

Buffer ACW1



염산 구아니딘이 함유되어 있습니다. 경고! 삼키거나 흡입하면 해롭습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 눈에 심한 자극을 일으킵니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용합니다.

Proteinase K



내용물: 단백분해효소 K. 위험! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 흡입하면 알레르거나 천식 증상, 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지/연기/가스/연무/증기/스프레이를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용합니다. 호흡 보호구를 착용합니다. 노출 또는 우려 시: 즉시 독성물질 센터 또는 의사에게 연락합니다. 신선한 공기가 있는 곳으로 사람을 옮기고 호흡하기 쉬운 자세로 안정을 취합니다.

시약 보관 및 취급

QIAamp Mini 컬럼은 2–8°C 에서 건조한 상태로 보관해야 합니다. 모든 완충액은 실온(15–25°C)에서 보관해야 합니다. QIAamp Mini 컬럼과 완충액은 이러한 조건에서 키트 상자에 표시된 유효 기한까지 성능 저하 없이 보관할 수 있습니다.

동결 건조된 운반체 RNA 는 구성품 라벨의 유효 기한까지 실온(15–25°C)에서 보관해야 합니다. 운반체 RNA 는 Buffer AVE 에 용해시켜야 합니다. 용해된 운반체 RNA 는 Breeze 프로토콜의 경우 28 페이지에, 클래식 프로토콜의 경우 33 페이지에 설명된 대로 즉시 Buffer ACL 에 첨가해야 합니다. 이 용액은 신선한 상태로 준비해야 하며 2–8°C 에서 최대 48 시간까지 안정성을 유지합니다. Buffer AVE 에 용해된 운반체 RNA 의 미사용 분량은 분주하여 -30–15°C 에 동결시켜야 합니다.

QIAamp DSP Circulating NA Kit 는 특수 제작된 저장 완충액으로 용해되는 즉시 사용 가능한 단백질해효소 K 용액을 함유합니다. 단백질해효소 K 는 실온(15–25°C)에서 보관 시 구성품 라벨의 유효 기한까지 안정적입니다.

시료의 보관 및 취급

혈액 보관 및 취급

무세포 핵산의 분해 및 세포 핵산의 방출을 방지하기 위해 전혈을 2-8°C 에서 최대 6 시간동안 보관할 것을 권장합니다(예: EDTA 검체). 안정화된 채혈 튜브를 사용하는 경우, 제조업체에서 제공한 보관 조건을 고려하십시오. 사용자의 특정 다운스트림 공정과 표적을 고려하여 이 보관 조건을 검증할 것을 권장합니다.

혈장 보관 및 취급

EDTA 를 항응고제로 사용하는 경우(특히 RNA 에 대해) 혈혈 직후 혈장 분리 및 핵산 분리를 실행할 것을 권장합니다. 단기 보관의 경우, 혈장은 2-8°C 에서 최대 24 시간까지 보관할 수 있습니다.

보다 오래 보관하기 위해서는 안정화 및 비안정화 채혈 튜브의 혈장 분주액을 -20°C 에서(DNA 만 표적인 경우) 또는 -80°C(DNA 및 RNA 표적)에서 최소한 4 주간 보관할 수 있습니다.

용출된 핵산 보관

용출된 핵산은 1.5 ml 용출 튜브(제공됨)에 수집됩니다. 정제된 순환 핵산은 2-8°C 에서 최대 24 시간까지 보관할 수 있습니다. 24 시간 이상 보관할 경우, DNA 다운스트림 공정의 경우에는 -30 에서 -15°C 에서, RNA 다운스트림 공정의 경우에는 -90 에서 -60°C 에 보관할 것을 권장합니다.

절차

시작 전 중요 사항

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus 는 최대 24 개의 QIAGEN 스피ن 컬럼을 병렬로 빠르고 효율적으로 진공 처리할 수 있도록 제작되었습니다. 검체 및 세척 용액은 원심 분리 대신 진공에 의해 컬럼 막을 통과하므로 정제 절차에서 보다 높은 속도와 수작업 시간 단축을 제공합니다.

QIAvac Connecting System 과 조합하여 QIAvac 24 Plus 를 통과액 시스템으로 사용할 수 있습니다. 검체 통과액은 별도의 폐기물 병에 수집됩니다.

QIAvac 24 Plus 의 유지관리에 관해서는 *QIAvac 24 Plus 안내서*의 취급 지침을 참조하십시오.

QIAvac 24 Plus 에서 QIAamp Mini 컬럼 처리

QIAamp Mini 컬럼은 일회용 VacConnector 및 재사용 VacValve 를 사용하여 QIAvac 24 Plus 에서 처리됩니다. VacValve(선택사항)는 QIAvac 24 Plus 매니폴드의 루어 슬롯에 직접 삽입되어 일정한 유속을 보장하여 다양한 검체량을 병렬 처리하는 것이 용이합니다. VacValve 는 일관된 진공을 보장하기 위해 검체 유속이 크게 다른 경우에 사용해야 합니다. VacConnector 는 QIAamp Mini 컬럼과 VacValve 사이 또는 QIAamp Mini 컬럼과 QIAvac 24 Plus 의 루어 슬롯 사이에 장착되는 일회용 커넥터입니다. VacConnector 는 정제 중에 스피ن 컬럼과 VacValve 의 직접적인 접촉을 막고, 이에 따라 모든 검체간 교차 오염을 방지합니다. VacConnector 는 1 회 사용 후 폐기합니다. 대량의 용액이 사용되므로, QIAvac Connecting System(또는 폐기물 병을 이용한 비슷한 설정)이 필요합니다(그림 2 참조).

QIAvac 24 Plus 취급 지침

- QIAvac 24 Plus 는 항상 안전한 작업대 위나 작업 구역에 두십시오. 떨어지면 QIAvac 24 Plus 매니폴드가 파손될 수 있습니다.
- QIAvac 24 Plus 는 항상 깨끗하고 건조하게 보관하십시오. 세척 과정은 QIAvac 24 Plus 안내서를 참고하십시오.
- QIAvac 24 Plus 의 구성품은 일부 용제에 내성이 없습니다(표 1). 용제가 장치 위에 흘렀을 경우에는 물로 철저히 닦아내십시오.
- 일관된 성능을 위해서는 QIAvac 24 Plus 매니폴드의 어느 부분에도 실리콘이나 진공 그리스를 사용하지 않아야 합니다.
- 압력이 가해진 진공 매니폴더 근처에서 작업할 때는 항상 주의하고 보안경을 착용하십시오.
- 예비 또는 교체용 부품에 관한 사항은 QIAGEN 기술 서비스 부서나 현지 유통업체로 문의하십시오.
- 진공 압력은 진공 매니폴드 내부와 대기 간의 차압이며(표준 대기압 1013 millibar 또는 760 mm Hg), QIAvac Connecting System 을 사용하여 측정할 수 있습니다(그림 2 참조). 이 프로토콜은 -800 에서 -900 mbar 의 진공을 달성할 수 있는 진공 펌프가 필요합니다(예: QIAGEN Vacuum Pump). 더 높은 진공 압력은 반드시 피해야 합니다. 권장 수치보다 낮은 진공 압력을 사용하면 핵산 수율 및 순도가 감소하고 막이 막힐 위험이 높아질 수 있습니다.

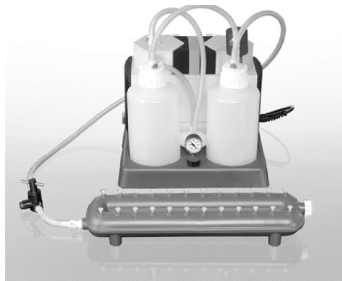


그림 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System 및 Vacuum Pump

표 1. QIAvac 24 Plus 의 화학물질 내성

내성이 있는 화학물질		내성이 없는 화학물질
아세트산	카오토픽 염	벤젠
크롬산	농축 알코올	페놀
SDS	염화나트륨	클로로포름
Tween® 20	우레아	톨루엔
염소 표백제	염산	에테르
수산화나트륨		

QIAvac 24 Plus Vacuum manifold 의 설정

1. QIAvac 24 Plus 를 진공 소스에 연결합니다. QIAvac Connecting System 을 사용하는 경우 QIAvac 24 Plus 안내서의 부록 A 에 설명된 대로 시스템을 매니폴드 및 진공 소스에 연결합니다.
2. 사용할 QIAvac 24 Plus 의 각 루어 슬롯에 VacValve(선택사항)를 삽입합니다(그림 3 참조). 사용하지 않는 루어 슬롯을 루어 플러그로 닫거나 삽입된 VacValve 를 닫습니다. 검체의 유속이 크게 다를 경우 일관된 진공을 위해서는 VacValve 를 사용해야 합니다.
3. VacConnector 를 각 VacValve 에 삽입합니다(그림 3 참조).
VacConnector 가 공기 중 잠재적 오염 물질에 노출되지 않도록 정제를 시작하기 전에 이 단계를 직접 수행합니다.
4. QIAamp Mini 컬럼을 매니폴드의 VacConnector 에 배치합니다(그림 3 참조).
참고: 정제 프로토콜에서 사용할 수 있도록 블리스터 팩에서 세척 튜브를 보관합니다.
5. 컬럼 확장기(20 ml)를 각 QIAamp Mini 컬럼에 삽입합니다(그림 3 참조).
참고: 검체의 누출을 방지하기 위해 컬럼 확장기가 QIAamp Mini 컬럼에 단단히 삽입되어 있는지 확인해야 합니다.
6. 핵산 정제에 대해서는 프로토콜의 지침을 따르십시오. 사용 후 VacConnector 를 적절하게 폐기합니다.

진공을 가하는 동안 QIAamp Mini 컬럼 뚜껑을 열어 둡니다.

처리 중에 일관되고 균일한 진공이 가해지도록 단계 사이에 진공을 끕니다. 빠른 진공 해제를 위해, Vacuum Regulator 를 사용해야 합니다(QIAvac Connecting System 의 일부).

참고: 각 VacValve 는 검체가 스핀 컬럼을 완전히 통과하면 개별적으로 닫을 수 있으므로 다양한 용량 또는 점도의 검체를 병렬로 처리할 수 있습니다.

7. 검체를 처리한 후 QIAvac 24 Plus 를 청소하십시오(QIAvac 24 Plus 안내서의 "QIAvac 24 Plus 청소 및 오염 제거" 참고).

참고: Buffers ACL, ACB, ACW1 은 표백제를 포함하는 소독제와 같이 사용할 수 없습니다. 경고 및 주의사항은 12 페이지를 참조하십시오.

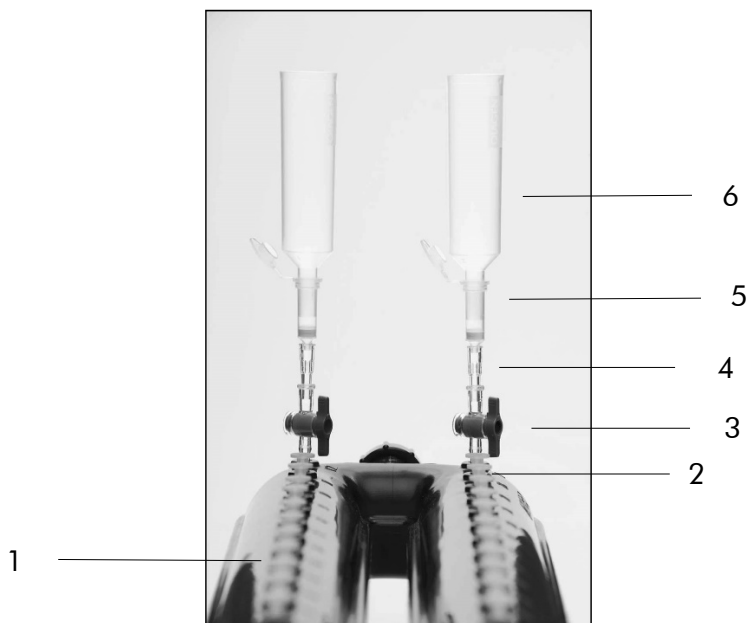
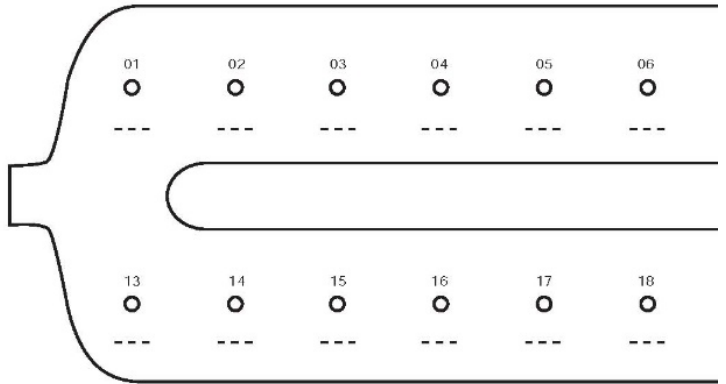


그림 3. VacValve, VacConnector, 컬럼 확장기를 사용하는 QIAamp Mini 컬럼이 있는 QIAvac 24 Plus 의 설정.

- | | |
|--|------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus Vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 QIAvac 24 Plus 의 루어 슬롯
(루어 플러그로 닫힘) | 5 QIAamp Mini 컬럼 |
| 3 VacValve** | 6 컬럼 확장기 |

검체가 섞이지 않도록 QIAvac 24 Plus 진공 시스템 사용 시 그림 4 의 방법에 따라 튜브와 QIAamp Mini 컬럼에 라벨을 부착할 것을 권장합니다. 이 그림을 복사하여 검체명과 함께 라벨로 부착할 수 있습니다.

* 별도로 구입해야 합니다.



날짜: _____

사용자: _____

실행 ID: _____

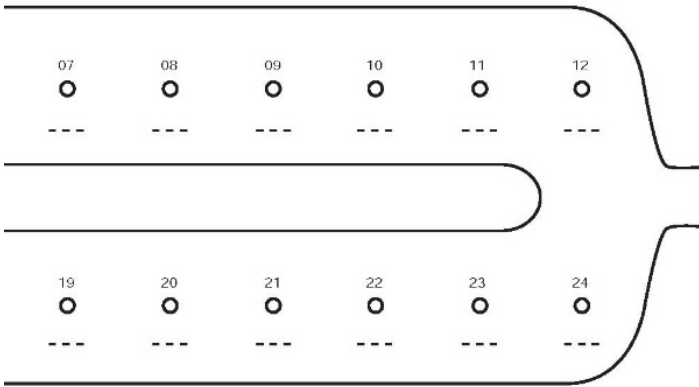


그림 4. QIAvac 24 Plus 진공 시스템 사용 시 튜브 및 QIAamp Mini 컬럼 라벨 부착 방법

완충액 및 시약 준비

Buffer ACB

사용 전, 200 ml 이소프로판올(100%)을 300 ml Buffer ACB 농축액에 첨가하여 500 ml Buffer ACB 를 만듭니다. 이소프로판올을 추가한 후에 잘 혼합합니다.

Buffer ACW1 *

사용 전, 25 ml 에탄올(96-100%)을 19 ml Buffer ACW1 농축액에 첨가하여 44 ml Buffer ACW1 을 만듭니다. 에탄올을 추가한 후에 잘 혼합합니다.

Buffer ACW2†

사용 전, 30 ml 에탄올(96-100%)을 13 ml Buffer ACW2 농축액에 첨가하여 43 ml Buffer ACW2 를 만듭니다. 에탄올을 추가한 후에 잘 혼합합니다.

운반체 RNA 를 Buffer ACL 에 첨가*

운반체 RNA 는 2 가지 작용을 합니다. 첫째, 핵산이 QIAamp Mini 막에 결합하는 것을 향상시킵니다(특히 검체에 표적 분자가 거의 없는 경우). 둘째, 드물기는 하지만 RNase 분자가 Buffer ACL 의 카오트로픽 염 및 세제에 의해 변성되지 않는 경우, 다량의 운반체 RNA 를 첨가하면 RNA 분해 가능성이 감소합니다.

제공되는 동결 건조 운반체 RNA 의 양은 키트와 함께 공급된 Buffer ACL 의 양에 충분합니다. 운반체 RNA 의 권장 농도는 QIAamp DSP Circulating NA 프로토콜이 다양한 증폭 시스템과 호환되는 일반 정제 시스템으로 사용될 수 있도록 조절되었으며, 광범위한 RNA 및 DNA 표적에 적합합니다.

* 카오트로픽 염을 함유하고 있습니다. 경고 및 예방 조치는 12 페이지를 참조하십시오.

† 방부제 역할을 하는 아지드화나트륨을 함유하고 있습니다.

각 증폭 시스템은 반응 내에 존재하는 핵산의 총량에 따라 효율이 다릅니다. 이 키트를 이용한 용출액에는 순환 핵산과 운반체 RNA 가 모두 들어 있으며, 대부분의 경우 운반체 RNA 의 양이 순환 핵산의 양을 크게 초과합니다. 따라서, UV 흡광도 측정값에 따른 분리된 순환 핵산의 정량은 이러한 측정의 결과가 운반체 RNA 의 존재에 의해 결정되기 때문에 적절하지 않을 것입니다.

증폭 반응에서 최고 수준의 민감도를 얻으려면 Buffer ACL 에 첨가되는 운반체 RNA 의 양을 조절해야 할 수 있습니다.

올리고 dT 프라이머를 포함하는 증폭 시스템의 경우, 자유 순환 핵산의 분리 시 운반체 RNA 를 첨가하지 않습니다.

1550 µl 의 Buffer AVE*를 310 µg 의 동결 건조된 운반체 RNA 가 들어 있는 튜브에 추가하여 0.2 µg/µl 농도의 용액을 만듭니다. 운반체 RNA 를 완전히 용해시키고 편리한 크기로 소분하여 -30°C–15°C 에서 보관합니다. 소분한 운반체 RNA 를 3 회 이상 동결 해동하지 마십시오.

운반체 RNA 는 Buffer ACL 에 용해되지 않는 점에 유의하십시오. 먼저 Buffer AVE 에 용해시킨 후 Buffer ACL 에 첨가해야 합니다.

프로토콜의 표에 따라 검체 배치당 필요한 Buffer ACL-운반체 RNA 혼합물의 용량을 계산합니다. 동시 처리할 검체 수를 선택합니다.

튜브 또는 병을 10 회 거꾸로 하여 부드럽게 혼합합니다. 거품이 형성되지 않도록, 볼텍싱하지 마십시오.

*방부제 역할을 하는 아지드화나트륨을 함유하고 있습니다.

참고: 검체 준비 절차는 검체당 최대 1.0 µg 의 운반체 RNA 에 대해 최적화되었습니다. 사용자의 증폭 시스템에서 보다 적은 운반체 RNA 가 더 나은 것으로 확인되었으면 필요한 양의 용해된 운반체 RNA 만 Buffer ACL 이 들어 있는 튜브로 옮기십시오. 준비당 필요한 운반체 RNA 의 각 마이크로그램에 대해 5 µl 의 용해된 운반체 RNA 를 Buffer ACL 에 첨가하십시오. (검체당 1.0 µg 미만의 운반체 RNA 사용이 유리할 수 있으며 각 특정 검체 유형 및 다운스트림 분석항목에 대해 검증해야 합니다.)

Breeze 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml로부터 순환 핵산 정제

이 프로토콜은 1-5 ml의 인간 혈액 혈장에서 순환 DNA 및 RNA를 정제하기 위한 것이며 짧은 직접 처리 및 소요 시간에 대해 최적화되어 있습니다. QIAamp DSP Circulating Kit 버전 1/R3을 사용하는 기존의 사용자 검증 작업 흐름에 대해서는 "클래식 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml로부터 순환 핵산 정제"(32 페이지)를 참고하십시오.

시작 전 중요 사항

- 모든 원심 분리 단계는 실온(15-25°C)에서 수행됩니다.
- 프로토콜 단계 동안 일관되고 균일한 진공이 가해지도록 단계 사이에 진공을 끄십시오.
- **참고:** 진공 펌프 압력은 -800에서 -900 mbar 이어야 합니다.
- 검체를 실온이 되도록 합니다.
- 인산 완충 식염수를 사용하여 검체량이 가장 가까운 정확한 부피(1 ml에서 5 ml)가 되도록 합니다.
- QIAvac 24 Plus를 19 페이지에 설명된 대로 설정합니다.
- 3 단계에서 50 ml 원심분리 튜브와 함께 사용하기 위해 수조 또는 가열 블록을 56°C로 가열합니다.
- 사용하기 전에 최소한 1 시간 동안 QIAamp Mini 스피ن 컬럼이 실온이 되도록 합니다.
- Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2가 24 페이지의 지침에 따라 준비(이소프로판올 또는 에탄올 추가)되었는지 확인합니다.
- 표 2의 지침에 따라 Buffer AVE로 재구성된 운반체 RNA를 Buffer ACL에 첨가합니다.

표 2. 1~5 ml 인간 혈액 혈장 검체를 처리하기 위해 필요한 Buffer ACL 및 운반체 RNA(Buffer AVE 에 용해됨)의 용량

ml 혈장 설정	A	B	C	D	E	Buffer AVE 내 운반체 RNA(μ l)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
검체 수	Buffer ACL(ml)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

절차: Breeze 프로토콜

1. QIAGEN Proteinase K, 혈장, Buffer ACL 을 **이 순서로** 50 ml 원심분리 튜브(제공되지 않음)에 피펫팅합니다.

설정	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
혈장 (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. 캡을 닫고 펄스 볼텍싱으로 5 x 2 초 동안 혼합합니다.

튜브 안에 육안으로 보이는 볼텍스가 형성되도록 합니다. 효율적인 용해를 위해서는 검체와 Buffer ACL 을 철저히 혼합하여 균일한 용액을 만드는 것이 필수적입니다.

참고: 이 시점에서 절차를 중단하면 안 됩니다. 즉시 3 단계로 진행하여 용해 배양을 시작합니다.

3. 56°C(±1°C)에서 15(±1)분 동안 배양합니다.
4. 다시 튜브를 실험실 벤치에 놓고 캡을 풉니다.
5. Buffer ACB 를 튜브 내 용해물에 첨가합니다. 1 단계의 설정에 따라 용량을 선택합니다.

설정	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. 캡을 닫고 펄스 볼텍싱으로 5 x 2 초 동안 철저히 혼합합니다.

튜브 안에 육안으로 보이는 볼텍스가 형성되도록 합니다. 효율적인 용해를 위해서는 용해물과 Buffer ACB 를 철저히 혼합하여 균일한 용액을 만드는 것이 필수적입니다.

7. 튜브 내 용해물-Buffer ACB 혼합물을 5(±1)분 동안 실온에서 배양합니다.

8. QIAamp Mini 컬럼을 QIAvac 24 Plus 의 VacConnector 에 삽입합니다("QIAvac 24 Plus Vacuum manifold 의 설정", 19 페이지 참조). 20 ml 컬럼 확장기를 열려 있는 QIAamp Mini 컬럼에 삽입합니다.

검체 누출을 방지하기 위해 컬럼 확장기가 QIAamp Mini 컬럼에 단단히 삽입되어 있는지 확인해야 합니다.

참고: 13 단계에서 회전 건조를 위해 세척 튜브를 보관하십시오.

9. 7 단계에서 얻은 용해물을 QIAamp Mini 컬럼의 컬럼 확장기에 조심스럽게 넣습니다. 진공 펌프를 켭니다. 모든 용해물이 완전히 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다. 컬럼 확장기를 조심스럽게 제거하여 폐기합니다.

검체 용해물 용량(5 ml 검체로 시작하는 경우 약 18 ml)이 대량이면 진공력으로 QIAamp Mini 막을 통과하는 데 최대 20 분이 필요할 수 있다는 점에 유의하십시오.

진공 압력의 빠르고 편리한 해제를 위해 Vacuum Regulator 를 사용해야 합니다(QIAvac Connecting System 의 일부).

참고: 교차 오염을 방지하기 위해 컬럼 확장기를 제거하는 동안 인접한 QIAamp Mini 컬럼을 지나가지 않도록 주의하십시오.

10. 600 µl 의 Buffer ACW1 을 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 Buffer ACW1 이 완전히 QIAamp Mini 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.

11. 750 µl 의 Buffer ACW2 를 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 Buffer ACW2 가 완전히 QIAamp Mini 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.

12. 750 µl 에탄올(96–100%)을 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 에탄올이 완전히 스피ن 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.

13. QIAamp Mini 컬럼의 뚜껑을 닫습니다. VacConnector 를 진공 매니폴드에서 제거하고 폐기합니다. QIAamp Mini 컬럼을 깨끗한 (8 단계의) 2 ml 세척 튜브에 넣고, 최대 속도(20,000 x g 14,000 rpm)로 3(±0.5)분 동안 원심분리합니다.

14. QIAamp Mini 컬럼을 새 2 ml 세척 튜브에 넣습니다. 뚜껑을 열고, 조립체를 실온에서 3 분 동안 배양하여 막을 완전히 건조시킵니다.

15. QIAamp Mini 컬럼을 깨끗한 1.5 ml 용출 튜브(제공됨)에 넣고 14 단계의 2 ml 세척 튜브를 폐기합니다. 20–150 μ l 의 Buffer AVE 를 QIAamp Mini 컬럼 막의 중앙에 조심스럽게 가합니다. 뚜껑을 닫고 실온에서 3(\pm 0.5)분 동안 배양합니다.

중요: 용출 Buffer AVE 가 실온(15–25°C)이 되었는지 확인합니다. 소량(<50 μ l)으로 용출을 실시하는 경우, 결합된 핵산의 완전한 용출을 위해 용출 완충액을 막의 중심에 분배해야 합니다.

용출량은 유연하며 다운스트림 공정의 요구 사항에 따라 조절할 수 있습니다.

적은 용량의 Buffer AVE 로 용출을 실시하면 핵산 농도가 더 높아지지만 총 수율은 낮아질 수 있습니다.

회수되는 용출액 양은 QIAamp Mini 컬럼 막에 적용된 용출량보다 최대 5 μ l 적을 수 있습니다.

참고: 낮은 핵산 수율이 예상되는 경우, 용출을 위해 Low-bind(저결합) 튜브(제공되지 않음)를 사용하는 것을 권장합니다.

16. 마이크로 원심분리기에서 최대 속도(20,000 \times g, 14,000 rpm)로 1 분 동안 원심분리하여 핵산을 용출합니다.

클래식 프로토콜: 인간 혈액 혈장 1-5 ml 로부터 순환 핵산 정제

이 프로토콜은 1-5 ml 인간 혈장에 대한 기존 사용자 검증 작업 흐름 등에 대해 사용하는 QIAamp DSP Circulating NA Kit 안내서 개정본 3(R3)의 프로토콜과 동일합니다.

시작 전 중요 사항

- 모든 원심 분리 단계는 실온(15-25°C)에서 수행됩니다.
- 프로토콜 단계 동안 일관되고 균일한 진공이 가해지도록 단계 사이에 진공을 끄십시오.
참고: 진공 펌프 압력은 -800 에서 -900 mbar 이어야 합니다.
- 검체를 실온이 되도록 합니다.
- 인산 완충 식염수를 사용하여 검체량이 가장 가까운 정확한 부피(1 ml 에서 5 ml)가 되도록 합니다.
- QIAvac 24 Plus 를 19 페이지에 설명된 대로 설정합니다.
- 3 단계에서 50 ml 원심분리 튜브와 함께 사용하기 위해 수조 또는 가열 블록을 60°C 로 가열합니다.
- 14 단계에서 2 ml 세척 튜브와 함께 사용하기 위해 가열 블록을 56°C 로 가열합니다.
- 사용하기 전에 최소한 1 시간 동안 QIAamp Mini 스피ن 컬럼이 실온이 되도록 합니다.
- Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 가 24 페이지의 지침에 따라 준비(이소프로판올 또는 에탄올 추가)되었는지 확인합니다.
- 표 3 의 지침에 따라 Buffer AVE 로 재구성된 운반체 RNA 를 Buffer ACL 에 첨가합니다.

표 3. 1~5 ml 인간 혈액 혈장 검체를 처리하기 위해 필요한 Buffer ACL 및 운반체 RNA(Buffer AVE 에 용해됨)의 용량

ml 혈장 설정	A	B	C	D	E	Buffer AVE 내 운반체 RNA(μ)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
검체 수	Buffer ACL(ml)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

절차: 클래식 프로토콜

1. QIAGEN Proteinase K, 혈장, Buffer ACL 을 이 순서로 50 ml 원심분리 튜브(제공되지 않음)에 피펫팅합니다.

설정	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
혈장 (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. 캡을 닫고 펄스 볼텍싱으로 30 초 동안 혼합합니다.

튜브 안에 육안으로 보이는 볼텍스가 형성되도록 합니다. 효율적인 용해를 위해서는 검체와 Buffer ACL 을 철저히 혼합하여 균일한 용액을 만드는 것이 필수적입니다.

참고: 이 시점에서 절차를 중단하면 안 됩니다. 즉시 3 단계로 진행하여 용해 배양을 시작합니다.

3. 60°C(±1°C)에서 30(±2)분 동안 배양합니다.
4. 다시 튜브를 실험실 벤치에 놓고 캡을 풉니다.
5. Buffer ACB 를 튜브 내 용해물에 첨가합니다. 1 단계의 설정에 따라 용량을 선택합니다.

설정	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. 캡을 닫고 펄스 볼텍싱으로 30 초 동안 철저히 혼합합니다.

튜브 안에 육안으로 보이는 볼텍스가 형성되도록 합니다. 효율적인 용해를 위해서는 용해물과 Buffer ACB 를 철저히 혼합하여 균일한 용액을 만드는 것이 필수적입니다.

7. 튜브 내 용해물-Buffer ACB 혼합물을 5(±1)분 동안 얼음 위에서 배양합니다.

8. QIAamp Mini 컬럼을 QIAvac 24 Plus 의 VacConnector 에 삽입합니다("QIAvac 24 Plus Vacuum manifold 의 설정", 19 페이지 참조). 20 ml 컬럼 확장기를 열려 있는 QIAamp Mini 컬럼에 삽입합니다.

검체 누출을 방지하기 위해 컬럼 확장기가 QIAamp Mini 컬럼에 단단히 삽입되어 있는지 확인해야 합니다.

참고: 13 단계에서 회전 건조를 위해 세척 튜브를 보관하십시오.

9. 7 단계에서 얻은 용해물을 QIAamp Mini 컬럼의 컬럼 확장기에 조심스럽게 넣습니다. 진공 펌프 스위치를 켜서 -800 에서 -900 mbar 의 압력이 적용되도록 합니다. 모든 용해물이 완전히 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다. 컬럼 확장기를 조심스럽게 제거하여 폐기합니다.

검체 용해물 용량(5 ml 검체로 시작하는 경우 약 18 ml)이 대량이면 진공력으로 QIAamp Mini 막을 통과하는 데 최대 20 분이 필요할 수 있다는 점에 유의하십시오.

진공 압력의 빠르고 편리한 해제를 위해 Vacuum Regulator 를 사용해야 합니다(QIAvac Connecting System 의 일부).

참고: 교차 오염을 방지하기 위해 컬럼 확장기를 제거하는 동안 인접한 QIAamp Mini 컬럼을 지나가지 않도록 주의하십시오.

10. 600 µl 의 Buffer ACW1 을 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 Buffer ACW1 이 완전히 QIAamp Mini 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.

11. 750 µl 의 Buffer ACW2 를 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 Buffer ACW2 가 완전히 QIAamp Mini 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.

12. 750 μ l 에탄올(96–100%)을 QIAamp Mini 컬럼에 넣습니다. 컬럼 뚜껑을 열어 둔 상태에서 진공 펌프를 켭니다. 모든 에탄올이 완전히 스핀 컬럼을 통과한 후, 진공 펌프를 끄고 압력을 0 mbar 로 해제합니다.
13. QIAamp Mini 컬럼의 뚜껑을 닫습니다. VacConnector 를 진공 매니폴드에서 제거하고 폐기합니다. QIAamp Mini 컬럼을 깨끗한 (8 단계의) 2 ml 세척 튜브에 넣고, 최대 속도(20,000 x g 14,000 rpm)로 3(\pm 0.5)분 동안 원심분리합니다.
14. QIAamp Mini 컬럼을 새 2 ml 세척 튜브에 넣습니다. 뚜껑을 열고, 조립체를 56°C(\pm 1°C)에서 10(\pm 1)분 동안 배양하여 막을 완전히 건조시킵니다.
15. QIAamp Mini 컬럼을 깨끗한 1.5 ml 용출 튜브(제공됨)에 넣고 13 단계의 2 ml 세척 튜브를 폐기합니다. 20–150 μ l 의 Buffer AVE 를 QIAamp Mini 컬럼 막의 중앙에 조심스럽게 가합니다. 뚜껑을 닫고 실온에서 3(\pm 0.5)분 동안 배양합니다.

중요: 용출 Buffer AVE 가 실온(15–25°C)이 되었는지 확인합니다. 소량(<50 μ l)으로 용출을 실시하는 경우, 결합된 핵산의 완전한 용출을 위해 용출 완충액을 막의 중심에 분배해야 합니다.

용출량은 유연하며 다운스트림 공정의 요구 사항에 따라 조절할 수 있습니다.

적은 용량의 Buffer AVE 로 용출을 실시하면 핵산 농도가 더 높아지지만 총 수율은 낮아질 수 있습니다.

회수되는 용출액 양은 QIAamp Mini 컬럼에 적용된 용출량보다 최대 5 μ l 적을 수 있습니다.

참고: 낮은 핵산 수율이 예상되는 경우, 용출을 위해 Low-bind(저결합) 튜브(제공되지 않음)를 사용하는 것을 권장합니다.

16. 마이크로 원심분리기에서 최대 속도(20,000 x g, 14,000 rpm)로 1 분 동안 원심분리하여 핵산을 용출합니다.

정도 관리

QIAGEN의 ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라 QIAamp DSP Circulating NA Kit의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 대해 테스트됩니다.

제한 사항

순환, 무세포 핵산 분리에 대한 시스템 성능은 다음 채혈 튜브에서 생성된 인간 혈장 검체를 사용하여 검증되었습니다.














- K2-EDTA (Beckton Dickinson, 카탈로그 번호 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, 카탈로그 번호 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, 카탈로그 번호 218962)

QIAGEN 성능 연구에서 다루어지지 않았으나 실험실에서 사용되는 모든 절차에 대해 시스템 성능을 검증하는 것은 사용자의 책임입니다.

진단 결과에 부정적인 영향을 미칠 위험을 최소화하려면 다운스트림 공정에 대한 적절한 대조물질을 사용해야 합니다. 추가적인 검증을 위해서는 ICH Q2(R1) 분석 절차 검증: 텍스트 및 방법론(ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology)에 있는 의약품국제조화회의(International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH)의 지침이 권장됩니다.

생성된 모든 진단 결과는 다른 임상 또는 실험실 결과와 함께 해석해야 합니다.

기호

기호	기호 정의
	<N>회 검사에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	체외 진단용 의료 기기
	도착 시
	수령 시 개봉, QIAamp Mini 스피ن 컬럼은 2-8°C 에서 보관할 것
	카탈로그 번호
	수
	로트 번호
	재료 번호
	구성품
	용량
	첨가
	온도 제한



제조업체



사용 지침 참조



에탄올을 병에 첨가한 후 날짜를 기록



에탄올



이소프로판올을 병에 첨가한 후 날짜를 기록



이소프로판올



내용물



다음 단계



구아니딘 티오시아네이트



염산 구아니딘



BRU 58



국제 거래 단위 번호

참고 문헌

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. 56, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 기술 지원 센터(support.qiagen.com)에 문의하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체로 연락하십시오(뒷표지 참조 또는 www.qiagen.com 방문).

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는데 도움을 줄 수 있습니다. 연락처 정보는 뒷면을 확인하거나 www.qiagen.com 을 방문하십시오.

의견 및 제안

용출액 내 핵산이 매우 적거나 없음

- | | |
|--|---|
| a) 비안정화 혈장 사용 | 비안정화 혈장 검체는 DNA 분해를 가속화할 수 있습니다. CEN/TS 16835-3:2015 를 준수할 것을 권장합니다. 새 검체로 정제 절차를 반복합니다. |
| b) 혈액 채취부터 혈장 준비까지의 시간이 연장됨 | 유핵 혈액 세포가 분해되어 혈장 내로 유전체 DNA 를 방출시킬 수 있으며, 이에 의해 표적 핵산이 희석됩니다. |
| c) 검체가 1 회 넘게 동결 및 해동됨 | 반복적인 해동 및 동결은 DNA 분해를 초래할 수 있으므로 피해야 합니다. 항상 신선한 검체 또는 한 번만 해동된 검체를 사용하십시오. |
| d) 검체 내 표적 DNA 의 농도가 낮음 | 혈장 검체가 실온에 너무 오래 방치되었습니다. 새 검체로 정제 절차를 반복합니다.
참고: 일부 개인의 경우 혈장 내 무세포 핵산 농도가 낮을 수 있습니다. 그러한 경우, 증가된 검체량과 낮은 용출액 양을 선택해야 합니다. |
| e) Buffer ACL 에서 검체 용해가 비효율적임 | QIAGEN Proteinase K 는 장시간 고온에 노출되면, 활성을 소실할 수 있습니다. 새 검체와 신선한 QIAGEN Proteinase K 로 절차를 반복합니다. |
| f) Buffer ACL-운반체 RNA 혼합물이 충분히 혼합되지 않음 | Buffer ACL-운반체 RNA 의 튜브를 최소 10 회 거꾸로 하여 Buffer ACL 와 운반체 RNA 를 부드럽게 혼합합니다. |
| g) 96-100%가 아닌 낮은 비율의 에탄올이 사용됨 | 새 검체와 96-100% 에탄올로 정제 절차를 반복합니다. 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오. |
| h) Buffer ACB 가 잘못 준비됨 | Buffer ACB 농축액이 정확한 용량의 이소프로판올과 재구성되었는지 확인합니다(에탄올 아님, 24 페이지 참조). |
| i) Buffer ACW1 또는 Buffer ACW2 가 잘못 준비됨 | Buffer ACW1 및 Buffer ACW2 농축액이 정확한 용량의 에탄올로 희석되었는지 확인합니다(24 페이지 참조). 새 검체로 정제 절차를 반복합니다. |
| j) Buffer ACW1 또는 Buffer ACW2 가 70% 에탄올로 준비됨 | Buffer ACW1 및 Buffer ACW2 농축액이 96-100% 에탄올로 희석되었는지 확인합니다(24 페이지 참조). 새 검체로 정제 절차를 반복합니다. |

의견 및 제안

DNA 또는 RNA 가 다운스트림 효소 반응에서 제대로 작용하지 않음

- a) 용출액 내 DNA 가 매우 적거나 없음 가능한 이유에 대해서는 상기 “용출액 내 핵산이 매우 적거나 없음”을 참조하십시오. 가능하면 반응에 추가하는 용출액 양을 늘리십시오.
- b) 부적절한 용출량이 사용됨 다운스트림 공정에 적합한 용출액의 최대 용량을 결정하십시오. 다운스트림 공정에 더해지는 용출액 양을 그에 따라 줄이거나 늘리십시오. 용출량은 비례적으로 조절할 수 있습니다.
참고: 적은 용량의 Buffer AVE 로 용출을 실시하면 핵산 농도가 더 높아지지만 총 수율은 낮아질 수 있습니다.
- c) 완충액이 철저히 혼합되지 않음 세척 Buffer ACW2 의 염 및 에탄올 성분은 실행 간 오랜 시간 동안 대기 상태로 방치되면 분리되어 나올 수도 있습니다. 각 실행 전에 항상 완충액을 철저히 혼합합니다.
- d) 운반체 RNA 로 인한 간섭 용출액 내 운반체 RNA 존재가 다운스트림 효소 반응을 방해하는 경우, 운반체 RNA 의 양을 줄이거나 모두 제외해야 할 수 있습니다.

일반 취급

- a) QIAamp Mini 컬럼이 막힘 유속이 감소되는 경우, 진공 시간을 연장할 수 있습니다.
또는, (사용하는 경우) VacValve 를 닫고, 컬럼 확장기 내 용해물이 소실되지 않도록 조심스럽게 컬럼 확장기-VacConnector-VacValve 조립체를 QIAamp Mini 컬럼에서 제거합니다.
QIAamp Mini 컬럼을 진공 매니폴드에서 제거하고, 2 ml 세척 튜브에 넣은 후 최대 속도로 검체가 완전히 막을 통과할 때까지 회전시킵니다. 잔여 용해물이 들어 있는 컬럼 확장기-VacConnector-VacValve 조립체를 다시 배치합니다. 진공 펌프를 켜고, VacValve 를 연 후, 계속해서 잔여 용해물을 로드합니다.
QIAamp Mini 컬럼이 계속해서 막히는 경우, 상기 절차를 반복합니다.
반복 동결 및 해동으로 인해 혈장에서 동결 침전제제가 생성될 수 있습니다. 이로 인해 QIAamp Mini 컬럼이 막힐 수 있습니다. 한 번 이상 동결 및 해동된 혈장을 사용하지 마십시오.
동결 침전제제가 육안으로 보이는 경우, 5 분 동안 16,000 x g 로 원심분리하여 검체가 맑아지게 합니다.
- b) 용출량이 일정하지 않음 여러 다른 검체는 최종 용출액 양에 영향을 미칠 수 있습니다. 회수되는 용출액 양은 QIAamp Mini 컬럼에 적용된 용출량보다 최대 5 µl 적을 수 있습니다.

의견 및 제안

- c) -800 에서 -900 mbar 에 이르지 못한 진공 압력
- 진공 매니폴드가 단단히 닫혀 있지 않습니다. 진공을 켜 후 진공 매니폴드의 뚜껑을 아래로 누릅니다. 진공 압력에 도달했는지 확인합니다.
- QIAvac 뚜껑의 개스킷이 낡았습니다. 매니폴드의 밀봉부를 육안으로 확인하고 필요 시 교체합니다.
- VacValve 가 낡았습니다. 모든 VacValve 를 제거하고 VacConnector 를 바로 루어 연장부에 삽입합니다. QIAamp Mini 컬럼을 VacConnector 에 삽입하고, 컬럼의 뚜껑을 닫은 후 진공을 켭니다. 진공 압력에 도달했는지 확인합니다. 필요 시 VacValve 를 교체합니다.
- 진공 펌프 연결부에 누출이 있습니다. 루어 캡으로 모든 루어 연장을 닫고, 진공 펌프를 켭니다. 펌프가 켜진 후(그리고 Vacuum Regulator 밸브가 잠겨 있는 상태) 진공 압력이 안정적인지 확인합니다. 필요 시 펌프와 진공 매니폴드 간 연결부를 교체합니다.
- 여전히 진공 압력에 도달하지 못하면, 진공 펌프를 더 강력한 것으로 교체합니다.

부록 A: 혈액 혈장 분리 및 보관에 대한 권장사항

안정화 채혈 튜브(예: PAXgene ccfDNA 튜브 또는 Streck Cell-Free DNA 튜브)의 경우, 혈장 분리 및 보관에 대한 제조업체의 지침을 준수하십시오. 사용자의 특정 다운스트림 공정과 표적을 고려하여 이 보관 조건을 검증할 것을 권장합니다.

비안정화 BCT의 경우에는 CEN/TS 16835-3:2015를 준수할 것을 권장합니다.

혈액 검체로부터 순환 무세포 핵산을 분리하는 데 다음 프로토콜을 권장하며, 이 프로토콜에는 세포 파편을 제거하고 그렇게 함으로써 검체 내 세포 또는 유전체 DNA 및 RNA의 양을 줄이는 높은 중력(g)의 원심분리 단계가 포함됩니다.

1. BD Vacutainer® 튜브 내 전체 EDTA 혈액(또는 항응고제로서의 EDTA가 들어 있는 다른 일차 혈액 튜브)을 스윙 로터 및 적절한 버킷이 있는, 4°C로 식힌 원심분리기에 넣습니다.
2. 혈액 검체를 10분 동안 1900 x g(3000 rpm)로 4°C에서 원심분리합니다.
3. 혈장-세포 계면층을 건드리지 않으면서 혈장 상층액을 조심스럽게 흡인합니다. 10ml 일차 혈액 튜브로부터 약 4-5 ml 혈장을 획득할 수 있습니다.

참고: 이 단계에서 순환 핵산 추출을 위해 혈장을 사용할 수 있습니다. 단, 손상된 유핵 혈액 세포에서 유래한 유전체 DNA 및 RNA에 의한 순환 핵산의 추가 세포 파편 및 오염물질을 다음 고속 원심분리로 제거합니다.

4. 흡인된 혈장을 새 원심분리 튜브로 옮깁니다.
5. 혈장 검체를 10분 동안 16,000 x g(고정 각도 로터 내)로 4°C에서 원심분리합니다. 이는 세포 파편에 붙어 있는 추가 세포 핵산을 제거합니다.
6. 펠렛을 건드리지 않으면서 상층액을 조심스럽게 제거하여 새 튜브로 옮깁니다.

-
7. 같은 날 핵산 추출에 혈장을 사용하는 경우, 추가 처리 시까지 2-8°C 에서 보관합니다. 보다 장기간의 보관을 위해서는, 안정화 및 불안정화 채혈 튜브의 혈장 분주액을 -20°C(DNA 표적) 또는 -80°C(RNA 표적)에서 최소한 4 주간 보관할 수 있습니다. 순환 핵산 추출을 위해 혈장을 사용하기 전에 혈장 튜브를 실온에서 해동합니다.
8. **선택사항:** 동결 침전제제를 제거하기 위해, 혈장 검체를 5 분 동안 16,000 x g (고정 각도 로터 내)로 원심분리합니다.
- 선택사항:** 상층액을 제거하여 새 튜브로 옮긴 후 순환 핵산 추출 프로토콜을 시작합니다.

부록 B: RNA 취급에 관한 일반적인 설명

RNA 처리

리보핵산분해효소(RNase)는 매우 안정적이고 활성도 높은 효소로, 기능을 위해 일반적으로 보조 인자가 필요하지 않습니다. RNase 는 비활성화하기 어렵고 아주 적은 양으로도 RNA 를 파괴할 수 있으므로, 플라스틱 용기나 유리 용기를 사용하기 전에 반드시 RNase 오염을 제거해야 합니다. 정제 절차 중에 또는 이후에 RNase 가 우발적으로 RNA 검체에 혼입되지 않도록 각별히 주의해야 합니다. RNase 가 없는 환경을 만들고 유지하기 위해서는 RNA 를 갖고 작업할 때 전처리 그리고 일회용 및 비일회용 용기와 용액의 사용 중에 다음의 예방 조치를 취해야 합니다.

일반 취급

RNA 로 작업할 때는 항상 적절한 미생물학적 무균 기법을 사용해야 합니다. 손과 먼지 입자에는 박테리아와 곰팡이가 있을 수 있으며, RNase 오염의 가장 일반적인 원인입니다. 시약 및 RNA 검체를 취급할 때는 항상 라텍스나 비닐 장갑을 착용하여 피부 표면이나 먼지가 많은 실험실 장비로부터의 RNase 오염을 방지하십시오. 장갑을 자주 교체하고, 가능하면 튜브를 닫아 두십시오. 다운스트림 공정을 위해 분주액을 피펫팅할 때는 정제된 RNA 를 얼음 위에 두하십시오.

일회용 플라스틱 용기

절차 전반에 걸쳐 RNase 가 없는, 멸균된 일회용 폴리프로필렌 튜브 사용이 권장됩니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	50 회분: QIAamp Mini 컬럼, 컬럼 확장기, VacConnector, QIAGEN Proteinase K, 시약, 완충액, 수집 튜브	61504
부속품		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	1-24 개의 스피ن 컬럼 처리를 위한 진공 매니폴드: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, 루어 플러그, 쿼 커플링	19413
Vacuum Pump*	범용 진공 펌프	84010[미국 및 캐나다] 84000[일본] 84020[기타 국가]
QIAvac Connecting System*	진공 펌프로 진공 매니폴드에 연결할 시스템: 트레이, 폐기물 병, 튜브, 커플링, 밸브, 게이지, 24 개 VacValve	19419

* 진공 프로토콜에서 사용.

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용 설명서는 www.qiagen.com 에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

안내서 개정 이력

날짜	변경
R4 09/2019	인간 혈장에서만 무세포 핵산으로 용도 변경. "Breeze" 프로토콜 포함, 소변 및 miRNA 에 대한 프로토콜은 포함되지 않음. 안전성 정보 업데이트.

QIAamp DSP Circulating NA Kit 의 제한적 라이선스 계약

본 제품의 사용은 다음 품목에 대한 모든 제품 구매자 또는 제품 사용자의 협약에 동의함을 의미합니다.

1. 이 제품은 오로지 제품과 함께 제공된 프로토콜과 안내서에 따라 사용될 수 있으며 키트에 포함되어 있는 구성품과만 사용할 수 있습니다. QIAGEN 은 제품과 함께 제공된 프로토콜 및 본 안내서, www.qiagen.com 에 제공되어 있는 추가 프로토콜에서 설명한 경우를 제외하고 지적 재산권 하에서 본 키트의 동봉된 구성품을 본 키트에 포함되지 않은 구성품과 통합하거나 사용하도록 라이선스를 부여하지 않습니다. QIAGEN 사용자를 위해 QIAGEN 사용자가 이 추가 프로토콜의 일부를 제공하였습니다. QIAGEN 에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN 은 이를 보장하지 않으며 제 3 자의 권한을 침해하지 않는다는 것도 보증하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN 은 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. QIAGEN 은 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 않는데 동의합니다. QIAGEN 은 모든 법정에서 이와 같은 제한된 라이선스 협약의 금지를 시행할 수 있으며, 키트 및/또는 해당 구성요소와 관련하여 본 제한된 라이선스 협약 또는 지적 재산권을 시행하기 위한 어떤 행동에서도 변호사 비용을 포함하여 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트에 대해서는 www.qiagen.com 을 참조합니다.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN 그룹), BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company), Tween® (ICI Americas Inc.). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, 모든 권한 보유.

