

2020 년 12 월

PAXgene[®] Blood RNA Kit 안내서

버전 2



50(카탈로그 번호: 762174)

R4 **MAT** 1122120KR

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
PreAnalytiX 를 위해 QIAGEN GmbH 가 생산함



A QIAGEN / BD Company

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 안내서*에 따라 그리고 키트에 포함된 구성품만 함께 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 허용하지 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 않는데 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 참조하십시오.

조건부 판매

이 제품을 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-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, all rights reserved.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

스위스

www.preanalytix.com

PreAnalytiX 유통업체

PreAnalytiX 제품은 PreAnalytiX 를 위해 QIAGEN 또는 BD 에서 제조하고 유통합니다. 제품은 PreAnalytiX GmbH 에서 주문할 수 없습니다.

현지 PreAnalytiX 유통업체는 마지막 페이지의 연락처 정보를 참조하십시오.

목차

키트 내용물.....	5
기호.....	6
보관 조건.....	7
용도.....	8
제품의 사용상의 제한.....	8
정도 관리.....	9
기술 지원.....	9
안전성 정보.....	9
소개.....	13
원리 및 절차.....	13
검체 수집 및 안정화.....	14
RNA 농도 및 정제.....	19
수동 RNA 정제.....	19
자동 RNA 정제.....	29
사용자가 준비해야 하는 장비 및 시약.....	38
중요 참고사항.....	40
QIAcube 기기 사용.....	40
QIAcube 기기에 프로토콜 설치.....	43
QIAcube 기기 로딩.....	44
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 사람 전혈의 총 RNA 수동 정제.....	55
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)로 수집한 사람 전혈로부터 총 RNA 자동 정제.....	62
문제 해결 가이드.....	69

부록 A: RNA 취급에 관한 일반적인 설명	71
부록 B: 총 RNA 의 정량화 및 품질 측정	72
부록 C: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 취급	74
주문 정보	75
안내서 개정 이력.....	77

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 불포함수(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(2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures(보조 BD Hemogard™ 마개)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes(1.5 ml)(마이크로 원심분리기 튜브(1.5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free(lyophilized)(DNase I, RNase 불포함(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 소독제와 함께 사용할 수 없습니다. 구아니딘염을 함유하고 있습니다. 안전성 정보는 10 페이지를 참조하십시오.

† 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 처음 사용하기 전에 병에 표시된 대로 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만드십시오.

기호



<N>회 검사에 충분한 시약 포함



사용 설명서 참조



사용 기한



체외 진단용 의료 기기



카탈로그 번호



로트 번호



물품 번호



구성품



수



조사를 사용한 멸균 방법



Kunitz 단위



추가



내용물



재구성됨



데옥시리보뉴클레아제 I

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

	에탄올
	구아니딘 이소티오시아네이트
	RNase 불포함 DNase 세트
	국제 거래 단위 번호
	재사용하지 말 것
	온도 제한
	온도 상한
	제조업체
	중요 참고 사항

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 온도에서 건조한 상태로 보관해야 합니다.

DNase I(RNFD)이 포함된 RNase 불포함 DNase 세트, DNA 소화 완충액(RDD) 및 DNase 재현탁액 완충액(DRB)은 상온 운송됩니다. RNase 불포함 DNase 세트의 모든 구성품은 수령하는 즉시 라벨에 표시된 온도에서 보관하십시오. 적절하게 보관하면 이 키트는 키트 상자에 표시된 유효기간까지 안정적입니다.

용도

PAXgene Blood RNA System 은 채집 튜브(PAXgene Blood RNA Tube, BRT)와 핵산 정제 키트(PAXgene Blood RNA Kit)로 구성되어 있습니다. 이 시스템은 분자 진단 검사에 사용하는 RT-PCR 을 위한 혈액의 수집, 보관 및 운송 그리고 폐쇄형 튜브 내 세포내 RNA 안정화 및 전혈로부터 숙주 RNA 의 차후 분리 및 정제에 사용합니다.

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

사용 목적

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 사용할 때, 시스템은 분자 진단 검사에 사용하는 RT-PCR 를 위해 전혈로부터 정제 세포내 RNA 를 제공합니다.

제품의 사용상의 제한

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

이 제품은 체외 진단 절차에 대한 교육을 받은 기술자 및 의사 등의 전문 사용자가 사용해야 합니다.

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 대한 정보는 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*를 참조하십시오.

정도 관리

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

기술 지원

QIAGEN은 기술 지원의 품질과 가용성에 자부심을 갖고 있습니다. 본사의 기술 서비스 부서는 분자 생물학과 PreAnalytiX 제품의 사용에 대해 방대한 실무적 이론적 전문기술을 갖춘 숙련된 과학자들로 구성되어 있습니다. PAXgene Blood RNA Kit에 대해 질문이 있으면 주저 없이 문의해 주십시오.

기술 지원 및 자세한 내용은 QIAGEN 기술 서비스에 전화해 주십시오.

안전성 정보

유럽연합 - 사용자는 장치와 관련된 일체의 중대한 사건을 제조업체 및 국가 관할 당국에 보고해야 합니다. 유럽 연합 이외 - 장치와 관련된 일체의 사건 또는 문의는 현지 QIAGEN 담당자에게 문의하십시오.

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오.

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 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오. 안전보건자료는 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 산성 용액을 직접 가지 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. 잠재적인 감염원을 함유하고 있는 액체를 흘린 경우, 해당 영역을 먼저 실험실 세제 및 물로 세척한 다음 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨(표백제)으로 세척하십시오.

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

RNA 정제 절차의 원심분리 단계에서 생성된 상층액과 같은 검체 준비 과정의 폐기물은 감염 가능성이 있는 것으로 간주해야 합니다. 폐기물은 폐기하기 전에 오토클레이브 처리하거나 소각하여 감염성 물질을 제거해야 합니다. 공식적인 규정에 따라 폐기해야 합니다.

PAXgene Blood RNA Kit 의 구성품에는 다음과 같은 위험 및 예방조치 관련 고지문이 적용됩니다. PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 대한 안전성 정보는 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*를 참조하십시오.

완충액 BR2



내용물: 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 삼키면 유해함. 피부와 접촉하거나 흡입하면 유해할 수 있음. 심각한 눈 손상을 유발함. 장기적인 영향으로 수생생물에게 유해함. 산과 접촉하면 매우 유독한 가스를 방출함. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 눈에 들어간 경우: 물로 몇 분 동안 주의하여 씻어내십시오. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼내고 계속 씻어 내십시오. 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오.

완충액 BR3



내용물: 에탄올, 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 가연성 액체 및 증기. 심각한 눈 손상을 유발함. 산과 접촉하면 매우 유독한 가스를 방출함. 열/스파크/노출 화염/뜨거운 표면에 가까이 두지 마십시오. 흡연 금지. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 눈에 들어간 경우: 물로 몇 분 동안 주의하여 씻어내십시오. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼내고 계속 씻어 내십시오. 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오.

DNase I



내용물: DNase. 위험! 알레르기 피부 반응을 유발할 수 있음. 흡입 시 알레르기 또는 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 분진/연기/가스/연무/증기/스프레이를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 호흡 보호구를 착용하십시오. 노출 또는 우려 시: 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 피해자를 신선한 공기의 장소로 옮기고 호흡하기 편안한 자세로 휴식을 취하게 하십시오.

단백분해효소 K



내용물: 단백질분해효소 K. 위험! 약간의 피부 자극을 일으킴. 흡입 시 알레르기 또는 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 분진/연기/가스/연무/증기/스프레이를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 호흡 보호구를 착용하십시오. 노출 또는 우려 시: 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 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 이러한 실험에는 체외에서 세포 RNA 프로파일의 불안정성이라는 중대한 문제가 제기됩니다. PreAnalytiX 의 여러 시험에서 전혈 내개별 mRNA 종의 복제 수가 실온의 보관 또는 운송 과정에서 1000 배 이상 변경될 수 있는 것으로 나타났습니다.* 이는 채혈 후에 진행되는 급격한 RNA 분해와 특정 유전자의 유도된 발현으로 인해 발생합니다. 이와 같은 RNA 발현 프로파일의 변화가 생기면 신뢰할 만한 유전자 발현 검사를 수행할 수 없습니다. 따라서 정맥 채혈 중이나 후에 RNA 발현 프로파일을 보존하는 방법은 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 시스템을 개발했습니다. 이 시스템에서는 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 미국 특허 6,602,718 및 6,617,170)를 사용하여 채혈 및 RNA 안정화를 수행한 후 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 수동 또는 자동으로 RNA 를 정제해야 합니다. 수동 및 자동 프로토콜은 모두 RNA 품질 및 수율에서 성능이 실질적으로 동일합니다. 수동 프로토콜(22~29 페이지) 및 자동 프로토콜(31~35 페이지)의 성능 데이터가 이 안내서에 게재되어 있습니다.



QIAGEN QIAcube Connect MDx 는 모든 국가에서 사용 가능하지는 않습니다. 추가적인 정보는 QIAGEN 기술 서비스에 문의하십시오.

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

검체 수집 및 안정화

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에는 특허 등록된 RNA 안정화 기술에 기반을 둔 독점적인 시약 조성물이 포함되어 있습니다. 이 시약 조성물은 RNA 분자가 RNase 에 의해 분해되지 않도록 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(그림 1 및 2, 15 및 16 페이지), 2~8°C 에서 최대 5 일 동안(그림 3 및 4, 17 및 18 페이지) 안정화하는데 사용합니다. 현재 나와 있는 데이터는 -20°C 또는 -70°C 에서 최소한 11 년간의 세포 RNA 안정화를 보여줍니다 *. 더 긴 기간의 안정성 평가를 위해 현재 진행 중인 시험에 대한 자세한 내용은 QIAGEN 기술 서비스에 문의하십시오.

RNA 안정화의 실제 기간은 세포 RNA 의 종과 사용되는 다운스트림 공정에 따라 다를 수 있습니다. 평균 사양에 검증된 전사체의 수가 많지 않아서(FOS 및 IL1B 유전자 전사체) 모든 전사체에 대한 성능 특징이 다 입증되지는 않았습니다. 사용자는 제조업체의 데이터와 자체 데이터를 검토하여 다른 전사체에 검증이 필요한지 결정해야 합니다.

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

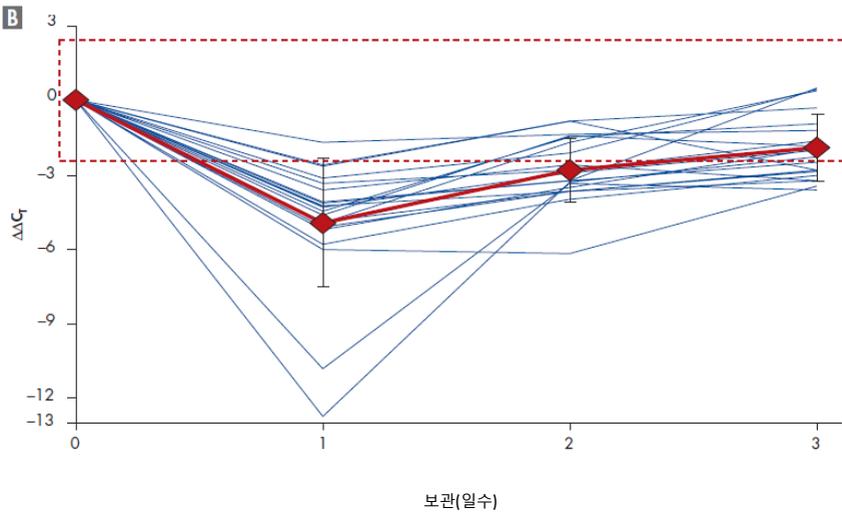
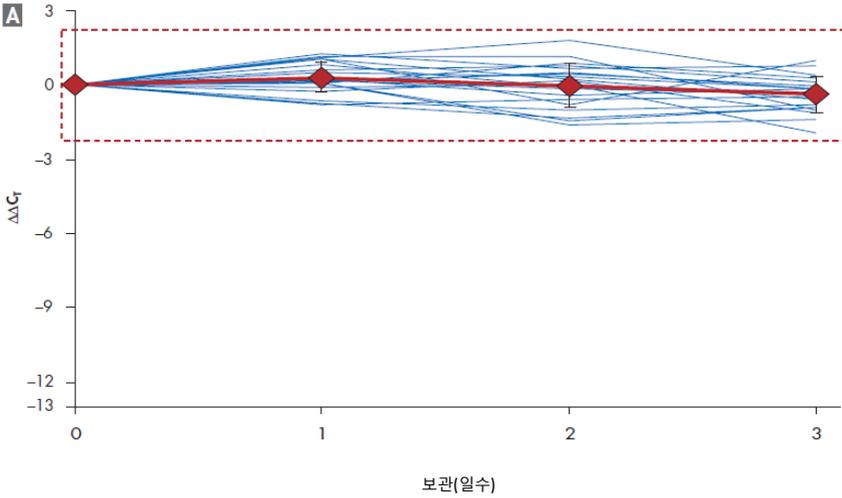


그림 1. 18~25°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: FOS. 혈액은 반복 검체와 함께 10 명의 헌혈자로부터 채취하여 18~25°C 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 정제 작업을 수행했습니다. **[A]** PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. **[B]** EDTA 를 항응고제로 추가한 표준 채집 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 정제 기술의 표준 유기 추출 방법을 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. FOS 의 상대적 전사 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).

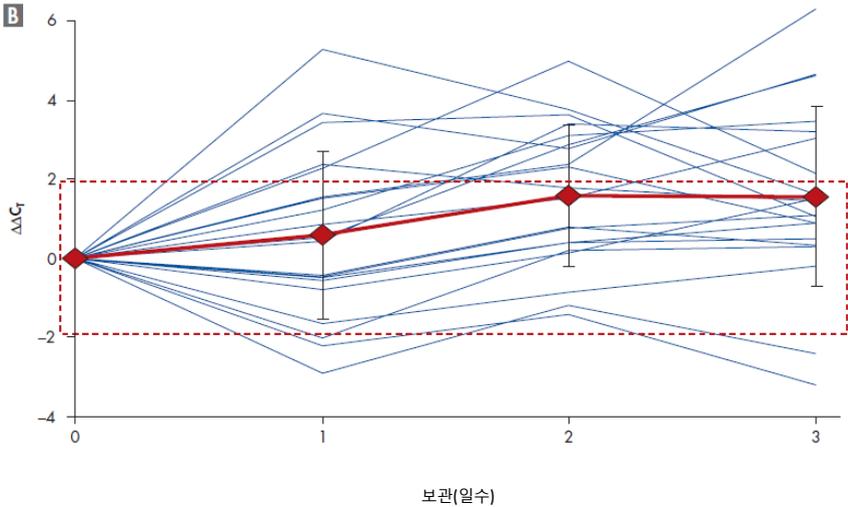
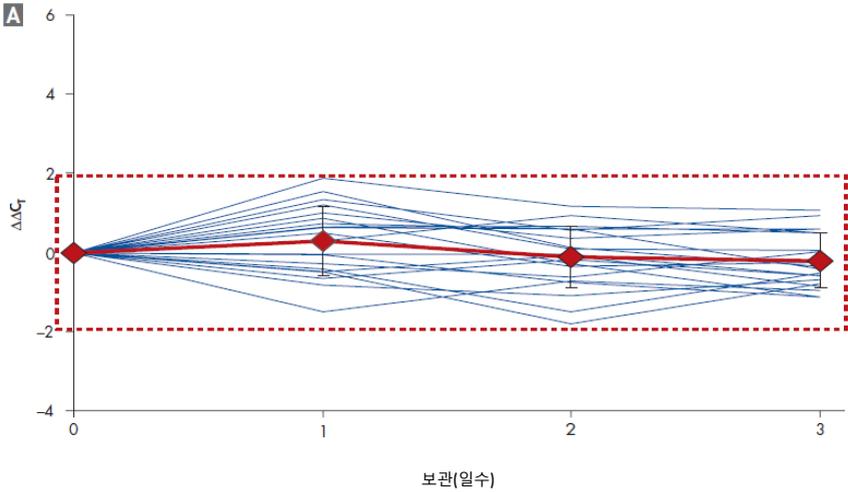


그림 2. 18~25°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 1 에서 설명한 대로 18~25°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(1.93 C_t).

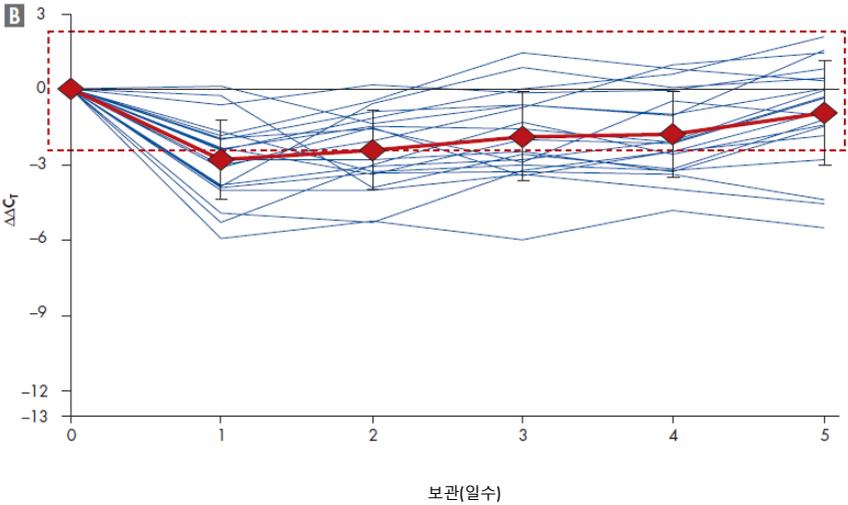
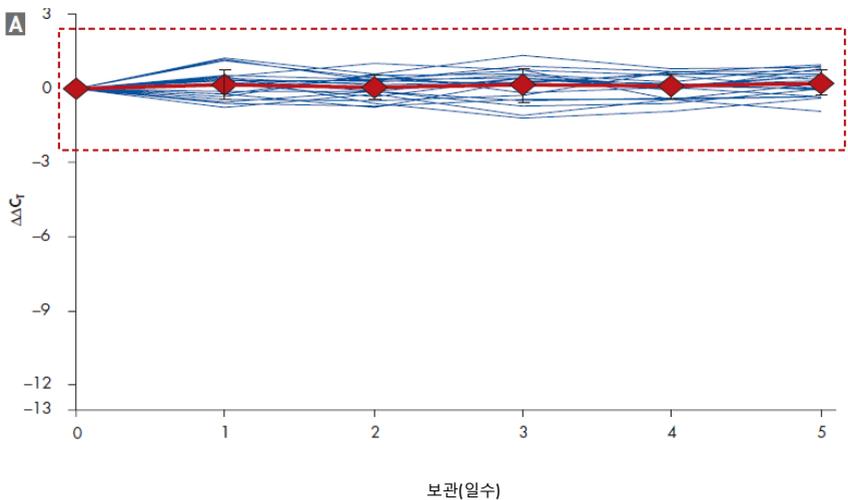


그림 3. 2~8°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: FOS. 10 명의 헌혈자로부터 중복 검체가 있도록 채혈하였으며, 2~8°C 에서 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 정제 작업을 수행했습니다. **[A]** PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. **[B]** EDTA 를 항응고제로 추가한 표준 채집 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 정제 기술의 표준 유기 추출 방법을 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. FOS 의 상대적 전사 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 ±3 x 분석의 총 정밀도를 의미합니다(2.34 C_T).

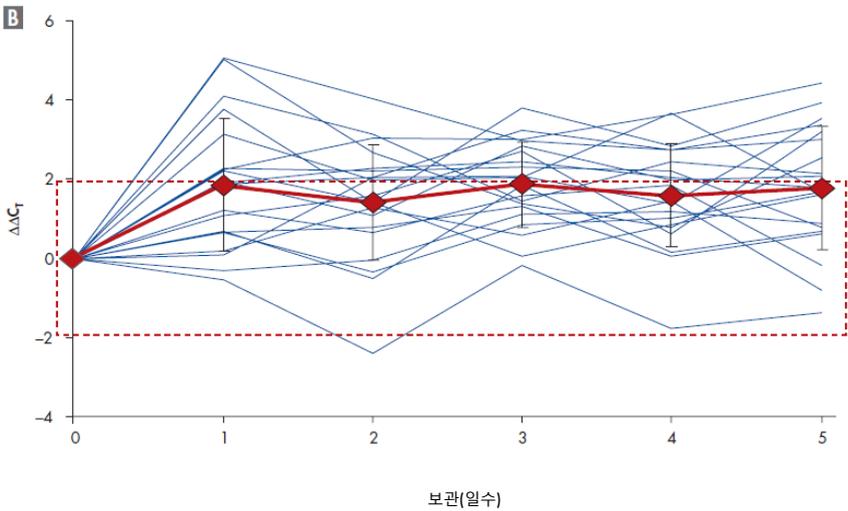
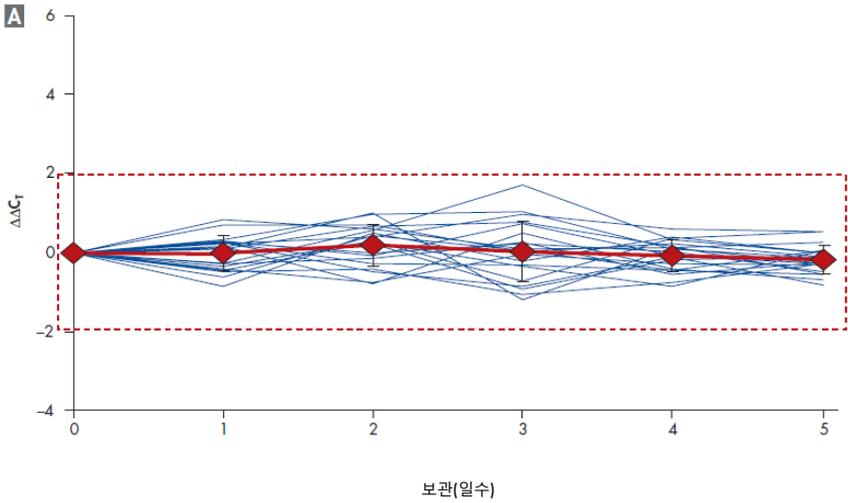


그림 4. 2~8°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 3 에서 설명한 대로 2~8°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3 \times$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(1.93 C_t).

RNA 농도 및 정제

PAXgene Blood RNA Kit 는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 2.5 ml 의 사람 전혈에서 총 RNA 를 정제하는 제품입니다. 절차는 간단하며, 수동이나 자동 절차로 수행할 수 있습니다(그림 5 및 10, 20 및 30 페이지 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 최적화된 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(flow-through) 분획의 상층액을 신선한 마이크로 원심분리기 튜브에 옮깁니다. 에탄올을 추가하여 결합 조건을 조절하고 용해물을 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC)에 가합니다. 짧은 원심분리 동안, 오염물질은 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 미량을 제거합니다. 세척 단계를 완료한 후에 RNA 를 용출 완충액(BR5)에 용출한 후에 열 변성을 유발합니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하여 분리한 총 RNA 는 순수합니다. 수동 프로토콜을 사용하는 경우, 베타 액틴 유전자 염기서열의 정량적 real-time PCR 로 측정할 때 A_{260}/A_{280} 값은 1.8~2.2 이며, 모든 검체의 $\geq 95\%$ 에서 $\leq 1\%$ (w/w)의 유전체 DNA 가 존재합니다. 최대 30%의 용출액을 사용할 때, 최소한 95%의 검체에서 RT-PCR 에서의 억제를 나타내지 않았습니다.

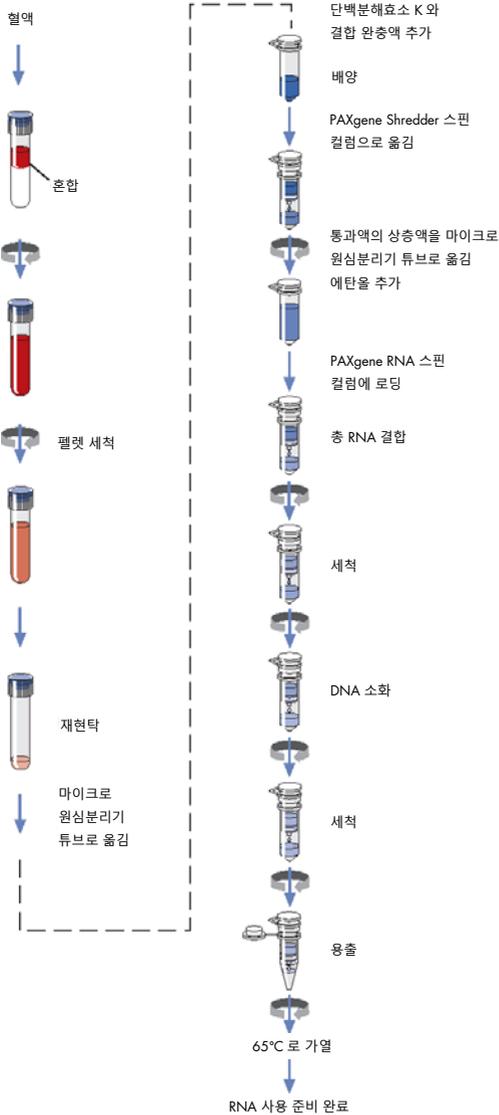


그림 5. 수동 PAXgene Blood RNA 절차.

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

Figure 6(22 페이지)은 PAXgene Blood RNA System 의 전반적인 반복성 및 재현성을 나타냅니다. PAXgene Blood RNA Kit 의 로트와 작업자가 달라지면 RNA 수율의 재현성 및 real time RT-PCR 성능에 어떤 영향을 미치는지 관찰하기 위한 추가 시험을 실시했습니다. 이들 시험에서는 개인의 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 대신에 취합 혈액 검체를 사용했기 때문에 결과는 개인의 채혈 사이의 변동을 포함한 시스템의 반복성이 아닌 검체 준비의 반복성만 반영합니다(그림 7, 23 페이지 참조).

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

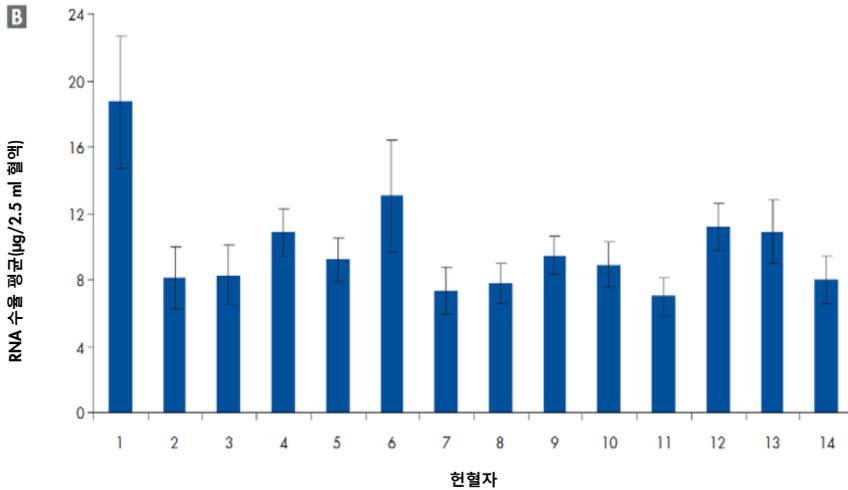
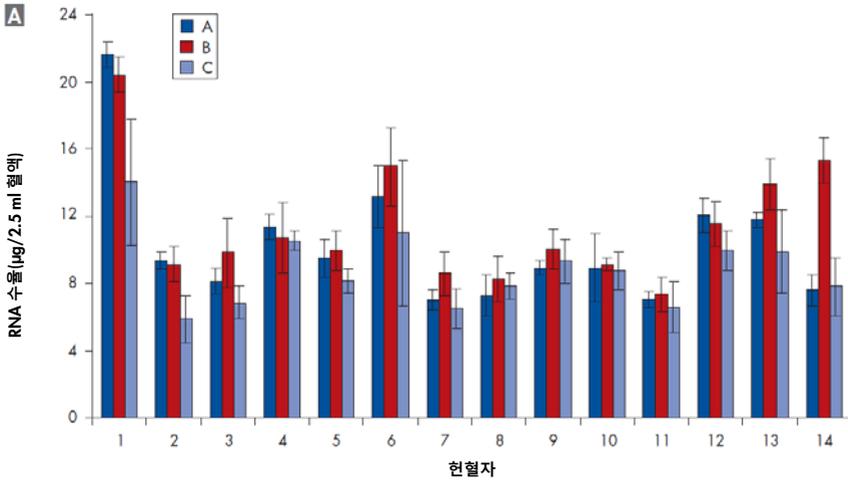


그림 6. 재현성 및 반복성 있는 RNA 정제. 14 명의 헌혈자로부터 4 회 반복 채취한 혈액 검체를 3 명의 기술자(A, B 및 C)가 각각 수동으로 처리했습니다. 세 대의 장비 세트를 사용했으며, 단일 기사가 준비한 모든 검체를 동일한 장비를 사용하여 처리했습니다. [A] 동일한 헌혈자로부터 다른 기사가 채취한 중복 검체당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 표시되어 있습니다. [B] 14 명의 헌혈자 중 각각으로부터 채취한 12 개 중복 혈액 검체를 3 명의 다른 기사가 처리했습니다. 동일한 헌혈자로부터 모든 기사가 채취한 검체당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 제시되어 있습니다. 모든 RNA 검체에서 A_{260}/A_{280} 비율의 범위는 1.8~2.2 였습니다.

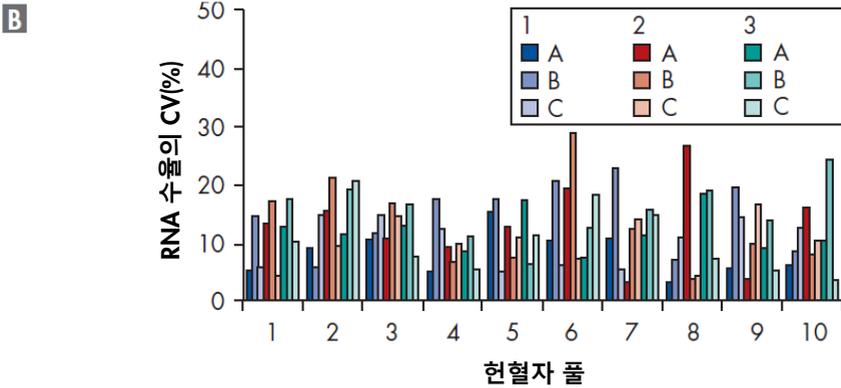
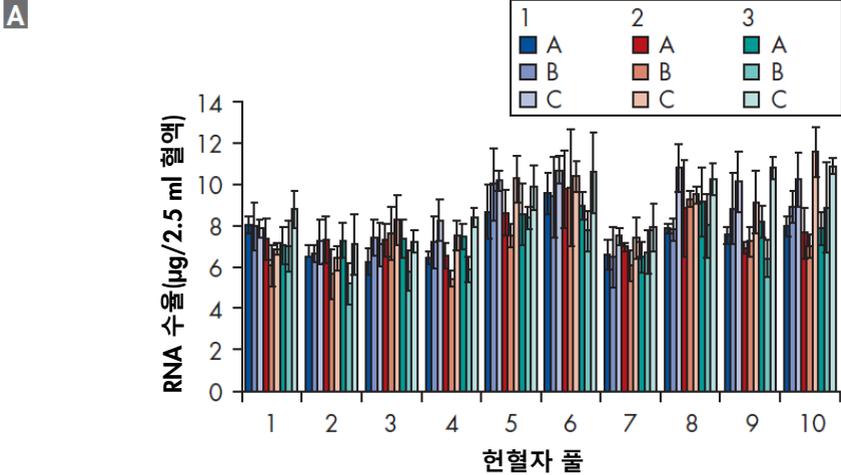


그림 7. 취합 혈액 검체를 사용한 여러 작업자 및 PAXgene Blood RNA Kit 로트의 RNA 수율의 반복성 및 재현성 30 명의 다른 헌혈자로부터 채취한 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 헌혈자당 12 개 튜브, 총 360 개 튜브)에 수집했습니다. 3 명의 헌혈자로부터 수집한 튜브의 내용물을 혼합한 후에 36 개 검체로 재분주했습니다. 3 명의 헌혈자 풀당 36 개의 검체를 3 명의 다른 작업자가 수동으로 처리했습니다. 각 작업자가 3 개의 다른 PAXgene Blood RNA Kit 로트를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

표 1A. 선택된 현혈자 풀(1, 6, 9, 10)에 대한 각 로트 및 각 사용자 내 재현성

데이터 조합	현혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ cells/ml			현혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ cells/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 cells/ml			현혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ cells/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 헌혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 각 사용자 내부 및 모든 로트 간 재현성

데이터 조합	헌혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ cells/ml			헌혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ cells/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	헌혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ cells/ml			헌혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ cells/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 헌혈자 풀(1, 6, 9, 10)의 각 로트 내부 및 모든 사용자 간 재현성

데이터 조합	헌혈자 풀 1 5.1 x 10 ⁶ cells/ml			헌혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ cells/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	헌혈자 풀 9 8.4 x 10 ⁶ cells/ml			헌혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ cells/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 cells/ml			헌혈자 풀 6 6.5 x 10 ⁶ cells/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 cells/ml			헌혈자 풀 10 10.2 x 10 ⁶ cells/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 수치에 따라 선택했으며, 백혈구 수치(4.8 x 10⁶ ~ 1.1 x 10⁷ 개 백혈구/ml) 정상 범위의 높은 수치, 중간 수치 및 하한 수치를 반영합니다. 백혈구 수치는 헌혈자 풀당 3 명의 헌혈자로부터 채취한 3 가지 백혈구 수치의 평균 값을 의미합니다.

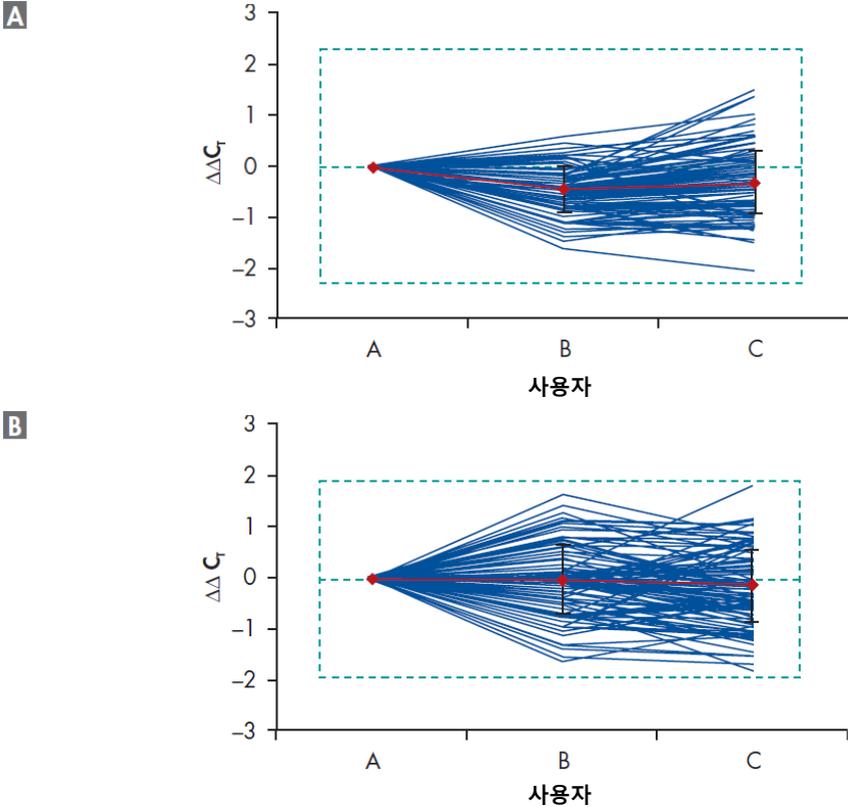


그림 8. RT-PCR의 재현성 - 사용자 간. 그림 7에서 설명한 실험에서 정제된 RNA를 real-time RT-PCR에 사용했습니다. [A] FOS 및 [B] IL1B의 상대적 전사 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 측정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시하면서 사용자 A의 값(10개 현혈자 풀 x 3개 키트 로트 x 4회 반복 채취 = 유전자당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 ±3x 분석의 총 정밀도를 의미합니다(FOS: 2.34 C_T, IL1B: 1.93 C_T).

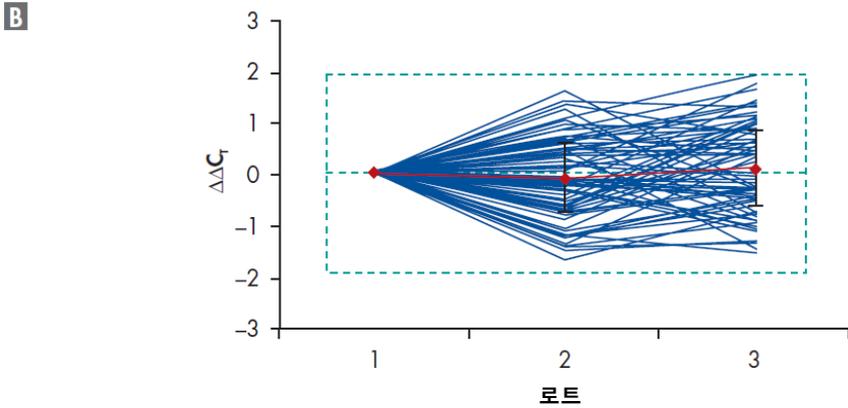
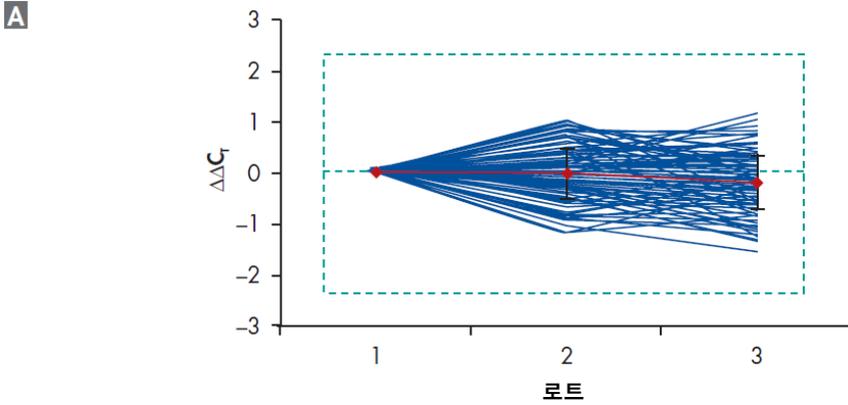


그림 9. RT-PCR의 재현성 - 키트 로트 간. 그림 7에서 설명한 실험에서 정제된 RNA를 real-time RT-PCR에 사용했습니다. **[A]** FOS 및 **[B]** IL1B의 상대적 전사 수준은 18S rRNA를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR로 측정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시하면서 키트 로트 1의 값(10개 헌혈자 풀 x 3명 사용자 x 4회 반복 채취 = 유전자 당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 $\pm 3\sigma$ 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($\Delta\Delta C_T$)	$\pm SD(\Delta\Delta C_T)$
데이터 비교				
각 사용자 내 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 내 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: 기술자, 시험 수행.

로트: 이 시험에 사용된 키트 로트 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

혈액 RNA 정제는 QIAGEN QIAcube Connect MDx 또는 클래식 QIAGEN QIAcube(이하 QIAcube)에서 자동화됩니다. 이 혁신적인 QIAcube 기기는 고급 기술을 사용하여 QIAGEN 스피ن 컬럼을 처리하므로 자동화된, 적은 처리량의 검체 준비를 실험실 작업 흐름에 매끄럽게 통합할 수 있습니다. QIAcube 를 사용하는 검체 준비는 수동 절차(즉, 용해, 결합, 세척 및 용출)와 동일한 단계를 따르므로 고품질 RNA 의 정제를 위해 PAXgene Blood RNA Kit 를 계속 사용할 수 있습니다.



그림 10. QIAcube Connect MDx.

자동 RNA 정제 프로토콜은 두 파트(또는 프로토콜), 즉 "PAXgene Blood RNA Part A" 및 "PAXgene Blood RNA Part B" 그리고 두 파트 사이의 간단한 수동 개입으로 구성되어 있습니다(그림 11, 31 페이지 참조).

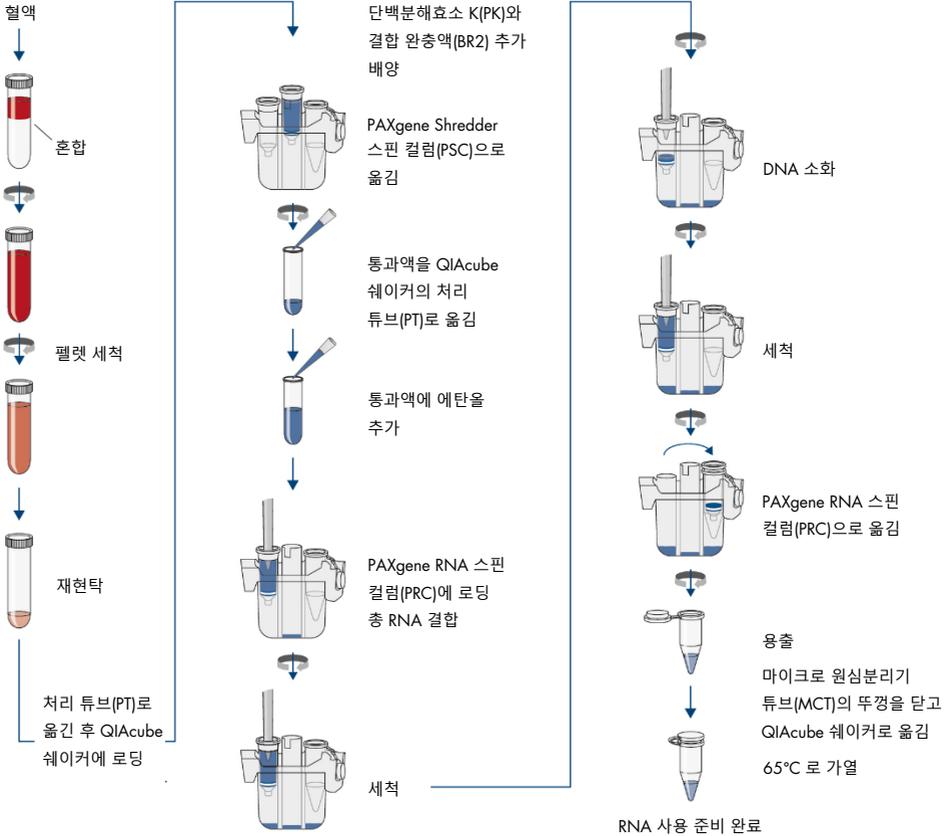


그림 11. 자동화된 PAXgene Blood RNA 절차.

원심분리하고, 세척하고 재현탁한 핵산 펠렛("RNA 농도 및 정제", 19 페이지 참조)을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에서 처리 튜브(PT)로 옮긴 후 튜브를 QIAcube 기기 작업대의 열 셰이커에 넣습니다. 작업자가 메뉴에서 "PAXgene Blood RNA Part A" 프로토콜을 선택하고 시작합니다. QIAcube 기기가 용출 완충액(BR5)의 RNA 용출까지 프로토콜의 단계를 수행합니다. 작업자가 정제된 RNA 가 든 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 QIAcube 기기의 열 셰이커 장치로 옮깁니다. 작업자가 메뉴에서 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 선택하고 시작하면, QIAcube 기기가 열 변성을 수행합니다.

평균 검체 준비 시간(12 회 검체 준비 실행의 데이터 기준)은 151 분 *이며, 수동 프로토콜에 비해 직접 실행 시간은 상당히 적습니다.

2.5 ml 의 건강한 사람 전혈의 RNA 수율은 처리한 검체의 $\geq 95\%$ 에서 $\geq 3 \mu\text{g}$ 입니다. 그림 12(33 페이지)는 3 명의 작업자가 3 개 키트 로트에 대해 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216 개 검체의 RNA 수율을 나타냅니다. 이 시험에서는 개별 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 대신에 취합 혈액 검체를 사용했기 때문에 결과는 개인에게서 채혈한 단일 검체에서 예상할 수 있는 RNA 수율을 반영하지 않습니다. 수율은 헌혈자 의존성이 높기 때문에 개별적 수율이 다를 수 있습니다(그림 12, 33 페이지).

최대 30%의 용출액을 사용할 때, 최소한 95%의 검체에서 RT-PCR 에서의 억제를 나타내지 않았습니다. 자동 프로토콜을 사용하는 경우 동일한 실행에서 RNA 양성 검체(사람의 전혈)와 쌍을 이루는 RNA 음성 검체(물)에서 ABL1 및 FOS 전사체 염기서열의 정량적 실시간 RT-PCR 로 측정할 때, 검체 간 교차 오염은 검출할 수 없습니다.

PAXgene Blood RNA System 및 자동 프로토콜로 분리된 RNA 는 순수하며, 이는 RT-PCR 억제의 결여 및 A_{260}/A_{280} 값 1.8~2.2 로 나타냅니다. 유전체 DNA 는 베타 액틴 유전자 염기서열의 정량적 real-time PCR 로 측정할 때 모든 검체의 $\geq 95\%$ 에서 $\leq 1\%(w/w)$ 로 존재합니다. 그림 13 및 14(34 및 35 페이지)에서는 3 명의 작업자가 3 개 키트 로트로 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216 개 검체의 A_{260}/A_{280} 값 및 상대적 유전체 DNA 를 나타냅니다.

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

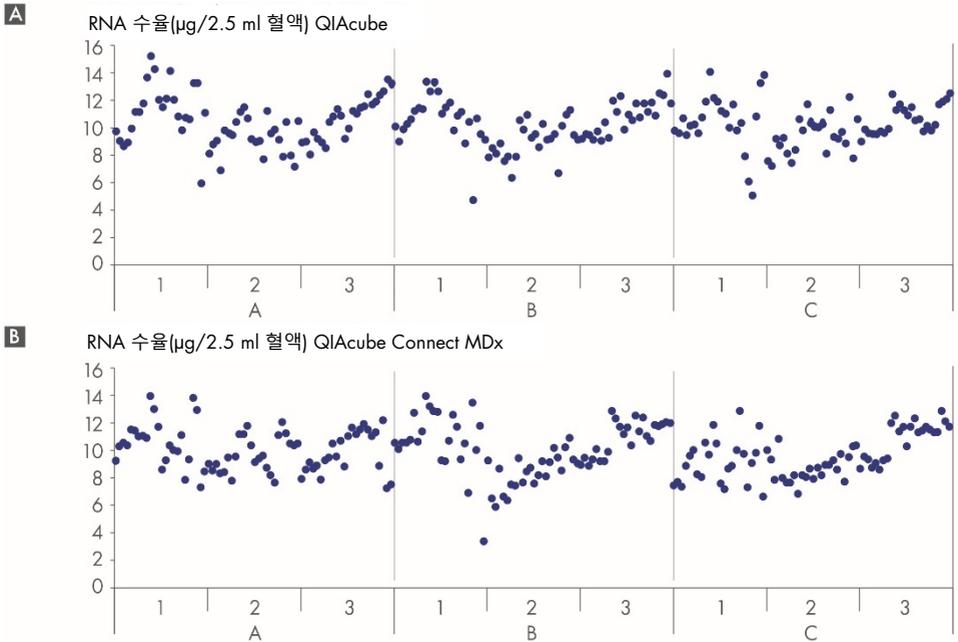


그림 12. RNA 수율 — 자동 처리 A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. 개별 헌혈자의 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 채취했습니다. 튜브 내용물을 6 개의 헌혈자 풀로 취합한 다음 재분주하였습니다. 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 총 216 개 튜브(즉, 풀당 36 개)를 처리했습니다. 각 작업자가 여러 QIAcube and QIAcube Connect MDx 기기를 사용하여 자동 추출 목적으로 PAXgene Blood RNA Kit의 3 개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용했으며, 각 6 개의 헌혈자 풀로부터 4 회 반복 채취한 검체를 처리했습니다. 모든 개별 검체의 RNA 수율이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

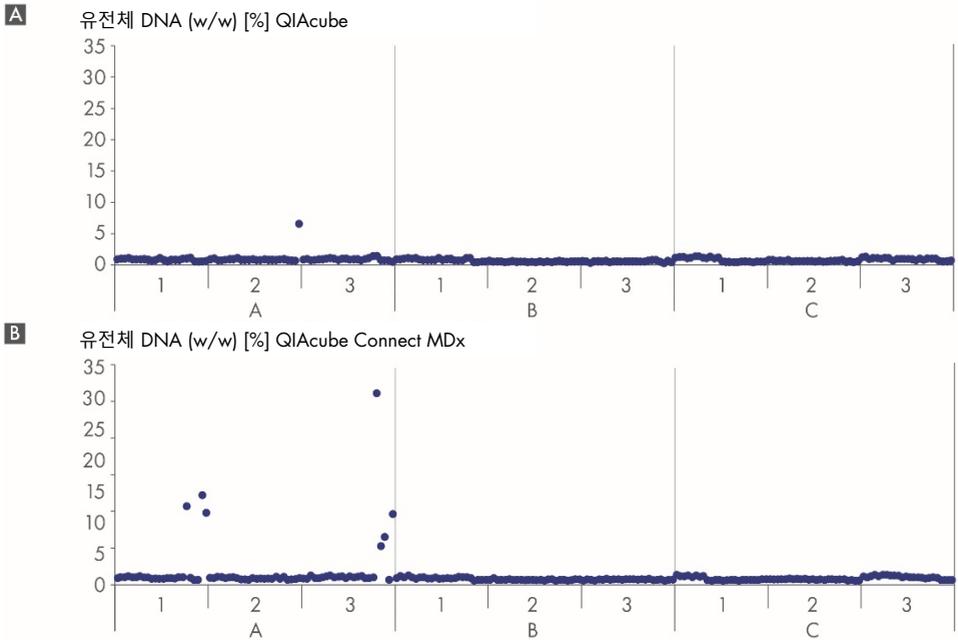


그림 14. RNA 순도(% 유전체 DNA 오염) - 자동 처리, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 12 에서 설명한 실험에서 여러 QIAcube 및 QIAcube Connect MDx 에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 RNA 를 정제했습니다. 모든 개별 검체의 유전체 DNA 양(w/w)이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하는 자동 RNA 정제 프로토콜은 그림 15 및 그림 16(36 및 37 페이지)에 제시된 것처럼 재현성과 반복성이 높은 RT-PCR 결과를 제공하므로 임상 진단 검사에 아주 안정적으로 사용할 수 있습니다.

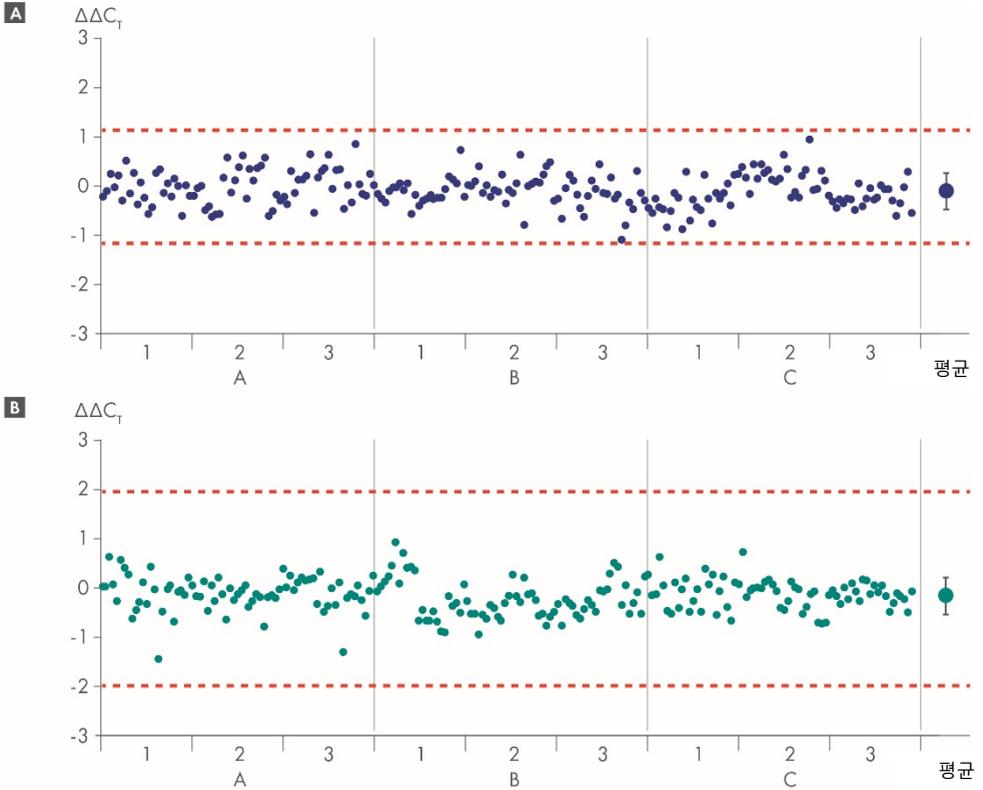


그림 15. RT-PCR의 재현성 - 자동(QIAcube) 및 수동 프로토콜 간. 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 12 에서 설명한 실험에서 자동 프로토콜을 사용하여 여러 QIAcube 및 QIAcube Connect MDx 에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 RNA 를 정제했습니다. 이와 동시에 해당 반복 튜브에서 수동 프로토콜을 사용하여 RNA 를 정제했습니다. [A] FOS 및 [B] IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 측정했습니다. 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(4 개 검체 복제본 x 6 개 현혈자 풀 x 3 개 키트 로트 x 3 명 작업자 = 유전자당 216 개 쌍)의 개별 $\Delta\Delta C_T$ 값을 단일 점으로 플로팅하였고 모든 검체에 대한 평균(큰 점) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시했습니다. 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).

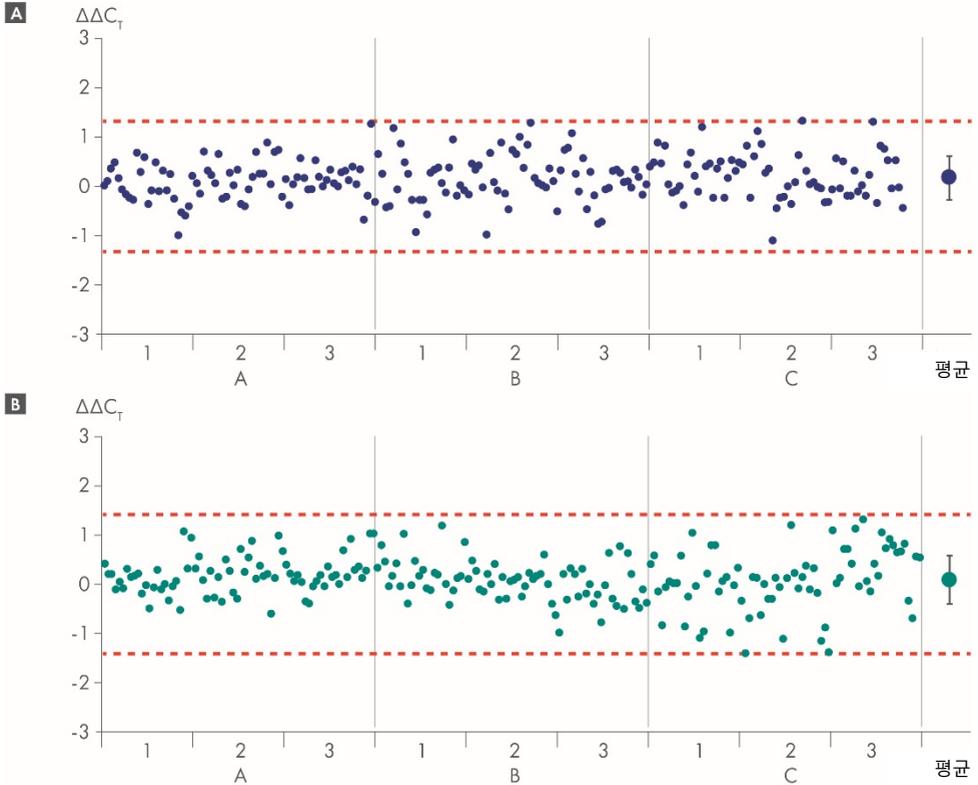


그림 16. RT-PCR의 재현성 — 자동 프로토콜을 사용한 QIAcube와 QIAcube Connect MDx 간. 3 명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 그림 12 에서 설명한 실험에서 여러 QIAcube 및 QIAcube Connect MDx 에서 자동 프로토콜을 사용하여 PAXgene Blood RNA Kit 의 3 개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 RNA 를 정제했습니다. **[A]** FOS 및 **[B]** IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 측정했습니다. 두 기기를 사용하여 혈액 검체 쌍으로부터 준비한 RNA 간에 생길 수 있는 전사 수준의 차이는 $\Delta\Delta C_T$ 방법으로 산출했습니다. 모든 검체 쌍(4 개 검체 복제본 x 6 개 헌혈자 풀 x 3 개 키트 로트 x 3 명 작업자 = 유전자당 216 개 쌍)의 개별 $\Delta\Delta C_T$ 값을 단일 점으로 플로팅하였고 모든 검체에 대한 평균(큰 점) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시했습니다. 대시 선은 $\pm 3x$ 분석의 총 정밀도를 의미합니다(FOS: 1.30 C_T , IL1B: 1.42 C_T ; 그림 1~4, 8, 9 및 15 와 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 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

모든 프로토콜의 경우

- PAXgene Blood RNA Tubes(BRT, PreAnalytiX; 카탈로그 번호 762165)
- 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.)
- 피펫 *(10 µl ~ 4 ml)
- 멸균 상태의 에어로졸 장벽 RNase 불포함 피펫 팁 †
- 메스실린더 †
- 속도 성능이 3,000~5,000 x g 이고 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)가 들어가는 스윙 로터 및 버킷이 장착된 원심분리기*
- 볼텍스 믹서*
- 부순 얼음
- 라벨 작성용 유성펜

수동 프로토콜

- 2 ml 마이크로 원심분리기 튜브용 로터가 장착되어 있고, 더 낮거나 높은 관성력(g forces)을 적용할 수는 있지만(자세한 내용은 프로토콜 단계 참조) 최소한 1000~8000 x g 범위에 도달할 수 있는 가변 속도의 마이크로 원심분리기*
- 55°C 및 65°C 에서 배양할 수 있고 ≥400 rpm, 1,400 rpm 이하로 교반할 수 있는 셰이커-배양기 §(예: Eppendorf® Thermomixer Compact 또는 이와 동등한 장치)

* 제조업체 권장 사항에 따라 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.

† RNA 취급에 관한 가이드라인(부록 A, 70 페이지)을 반드시 숙지하십시오.

‡ 완충액 BR4 농축액에 에탄올을 추가할 때 사용.

§ 제조업체 권장 사항에 따라 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.

자동 프로토콜(QIAcube 또는 QIAcube Connect MDx 사용)

- 가위

QIAcube 기기 소모품:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, 카탈로그 번호 990352)*
- Reagent Bottles, 30 ml (6)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990394)†

QIAcube 기기 부속품:

- Rotor Adapter Holder(QIAGEN, 카탈로그 번호 990392)†

QIAcube Connect MDx 를 사용한 자동 프로토콜

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, 카탈로그 번호 9003070)

QIAcube Connect MDx 서비스 번들:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2(QIAGEN, 카탈로그 번호 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3(QIAGEN, 카탈로그 번호 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1(QIAGEN, 카탈로그 번호 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1(QIAGEN, 카탈로그 번호 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1(QIAGEN, 카탈로그 번호 9003075)

QIAcube 를 사용한 자동 프로토콜

- QIAcube† (QIAGEN, 카탈로그 번호 9001882 [110 V])

* 또한 Starter Pack, QIAcube 에도 포함되어 있음(QIAGEN, 카탈로그 번호 990395).

† 제조업체 권장 사항에 따라 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.

중요 참고사항

QIAcube 기기 사용

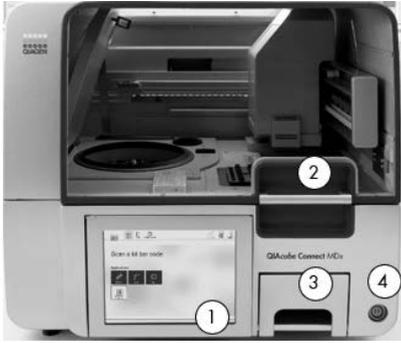
QIAcube 기기 작동을 숙지해야 합니다. 자동 PAXgene Blood RNA 프로토콜을 시작하기 전에, 안전성 정보에 세심한 주의를 기울이면서 QIAcube 기기와 함께 제공되는 해당 QIAcube 기기 사용자 설명서 및 추가 정보를 읽으십시오.

이 절의 지침은 별도로 명시되지 않은 경우에는 QIAcube Connect MDx 및 QIAcube 에 해당됩니다.

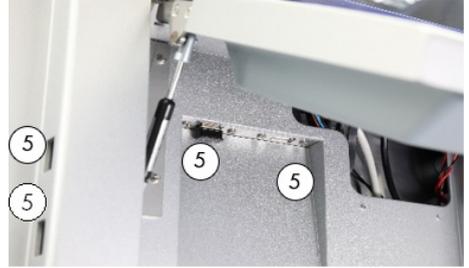
QIAcube 기기 시작

QIAcube 기기 후드를 닫고 전원 스위치로 QIAcube 기기를 켭니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41; QIAcube 의 경우: 그림 18, 42 페이지 참조).

삐 소리가 나면서 시작 화면이 표시됩니다. 기기가 자동으로 초기화 검사를 수행합니다.



QIAcube Connect MDx 정면도



꺼내진 터치스크린



QIAcube Connect MDx 후면도



QIAcube Connect MDx 후면도

그림 17. QIAcube Connect MDx 의 외부 구조.

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ① 터치스크린 ② 후드 ③ 폐기물 서랍 ④ 전원 스위치 | <ul style="list-style-type: none"> ⑤ 터치스크린의 좌측에 있는 USB 포트 2 개,
터치스크린 뒤에 있는 USB 포트 2 개(Wi-Fi
모듈이 USB 포트 1 개에 꽂혀 있음) ⑥ RJ-45 이더넷 포트 ⑦ 전원 코드 소켓 ⑧ 냉각 공기 배출구 |
|---|--|



그림 18. QIAcube 의 정면도.

- | | |
|---|--------------------|
| ① 터치스크린 | ④ 보호용 패널 뒤의 USB 포트 |
| ② 후드 | ⑤ 전원 스위치 |
| ③ 보호용 패널 뒤의 RS232 직렬 포트(QIAGEN 기기 서비스 전문가 사용에 한함) | ⑥ 폐기물 서랍 |

터치스크린

QIAcube 기기는 터치스크린을 사용하여 컨트롤합니다. 사용자가 터치스크린을 사용하여 기기를 작동하고 작업대를 설정할 수 있습니다. 검체 처리 동안, 터치스크린에 프로토콜 상태와 남은 시간이 표시됩니다.



그림 19. QIAcube Connect MDx 의 꺼내진 터치스크린

QIAcube 기기에 프로토콜 설치

QIAcube 기기에서 최초의 RNA 준비 실행을 수행하기 전에 먼저 초기 프로토콜 설치가 필요할 수 있습니다. "PAXgene Blood RNA Part A" 및 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 모두 설치하십시오.

QIAcube Connect MDx 에 사용하는 프로토콜은 www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (QIAcube 의 경우는 www.qiagen.com/MyQIAcube)에서 제공되며 QIAcube 기기와 함께 제공되는 USB 스틱에 다운로드해야 합니다. 이 프로토콜들은 USB 포트를 통해 기기로 전송됩니다.

USB 포트(QIAcube Connect MDx 의 경우 터치스크린 측면에 위치함, 그림 17, 41 페이지 참조; QIAcube 의 경우 보호용 패널 뒤에 위치함, 그림 18, 42 페이지 참조)를 사용하여 QIAcube 기기와 함께 제공된 USB 스틱에 QIAcube 기기를 연결할 수 있습니다. 로그 파일 또는 보고서 파일과 같은 데이터 파일 또한 USB 포트를 통해 QIAcube 기기에서 USB 로 전송할 수 있습니다.



USB 포트에는 QIAGEN 이 제공하는 USB 스틱만 사용해야 합니다. 기타 장치를 이 포트에 연결하지 마십시오.



프로토콜을 다운로드하거나 데이터 파일을 전송하는 동안 또는 프로토콜을 실행하는 동안에는 USB 스틱을 빼지 마십시오.

프로토콜을 QIAcube 기기에 업로드하는 과정에 대한 상세한 정보는 사용하는 기기에 대한 해당 안내서를 참조하십시오.

QIAcube 기기 로딩

시간을 절약하기 위해, "프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)로 수집한 사람 전혈로부터 총 RNA 자동 정제"(62 페이지)의 10 분 원심분리 단계(단계 3 및 5) 중 하나 또는 두 개가 진행되는 동안 로딩을 실행할 수 있습니다.

시약 병

QIAcube 기기에서 모든 실행을 실시하기 전에 표 3(45 페이지)에 명시된 시약을 시약 병 4 개에 최대 표시 수준까지 또는 이것이 가능하지 않은 경우 PAXgene Blood RNA Kit 에 제공된 완충액 용량이 허용하는 수준까지 조심스럽게 채우십시오. 병과 뚜껑에 완충액 이름을 기재한 라벨 표시를 한 후에 채운 시약 병을 시약 병 랙의 해당 위치에 둡니다. 표시된 것처럼(그림 20 ~ 22, 46 ~ 48 페이지) 랙을 QIAcube 기기에 로딩합니다.



제공된 완충액 BR2 양으로 표시 수준까지 시약 병을 채울 수 없습니다. BR3 및 BR4 완충액은 이전 실행에서 다수의 검체를 처리한 후에 병을 표시 수준까지 채우지 못할 수도 있습니다.



작업대 위에 배치하기 전에 뚜껑을 병에서 제거하십시오.



PAXgene Blood RNA Kit(50)에 제공되는 완충액 양은 QIAcube 기기에서 실행당 검체 수가 2~12 인 경우 최대 7 회의 RNA 준비 실행에 충분합니다. 일반적으로, 최대 7 회의 RNA 준비 실행으로 키트당 총 50 개 검체를 처리하려면 검체 개수가 이보다 작은 실행은 하지 않아야 합니다. 7 회보다 많은 RNA 준비 실행을 수행하면 마지막 검체를 처리하는 데 완충액 양이 부족할 수 있습니다.

표 3. 시약 병 랙의 위치

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

* 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 처음 사용하기 전에 병에 표시된 대로 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만드십시오.

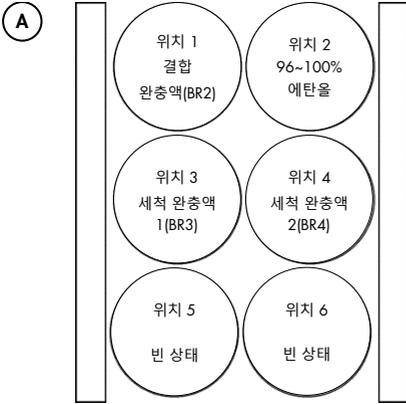


그림 20. 시약 병 랙 로딩. [A] 시약 병 랙 내 병의 위치 및 내용물의 도해. [B] QIAcube 기기에 랙 장착(QIAcube 가 예로 나와 있음).

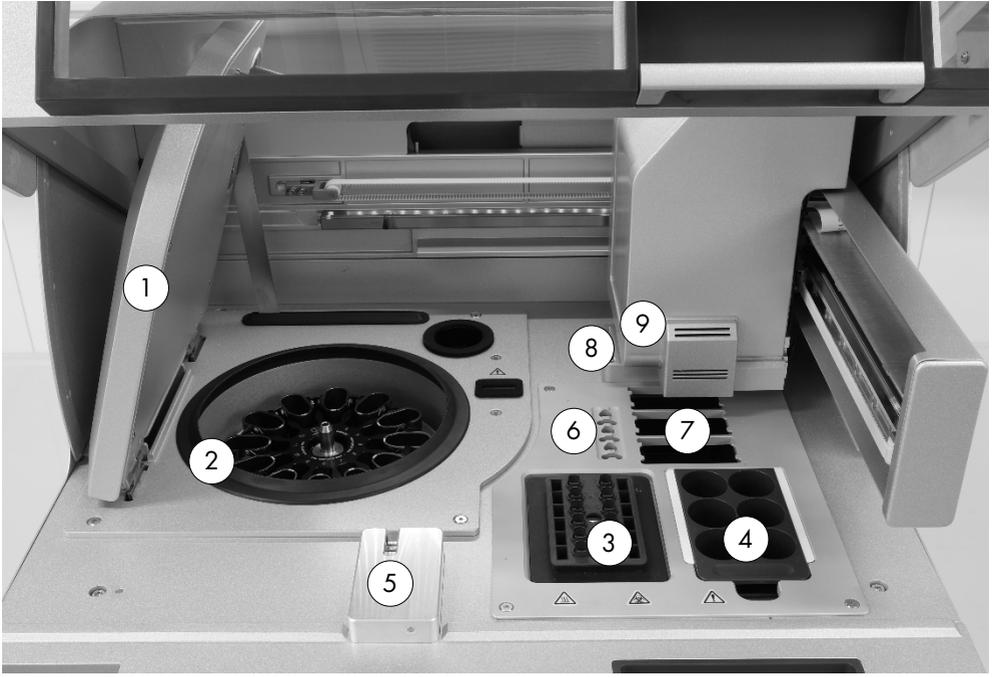


그림 21. QIAcube Connect MDx 의 내면도.

- | | |
|-------------------|--|
| ① 원심분리기 뚜껑 | ⑥ 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯 |
| ② 원심분리기 | ⑦ 팁 랙의 슬롯 3 개 |
| ③ 웨이커 | ⑧ 팁 및 컬럼 용 폐기 슬롯 |
| ④ 시약 병 랙 | ⑨ 로봇 암(1 채널 피펫터, 그리퍼, 초음파 센서, UV LED 포함) |
| ⑤ 팁 센서 및 후드 잠금 장치 | |

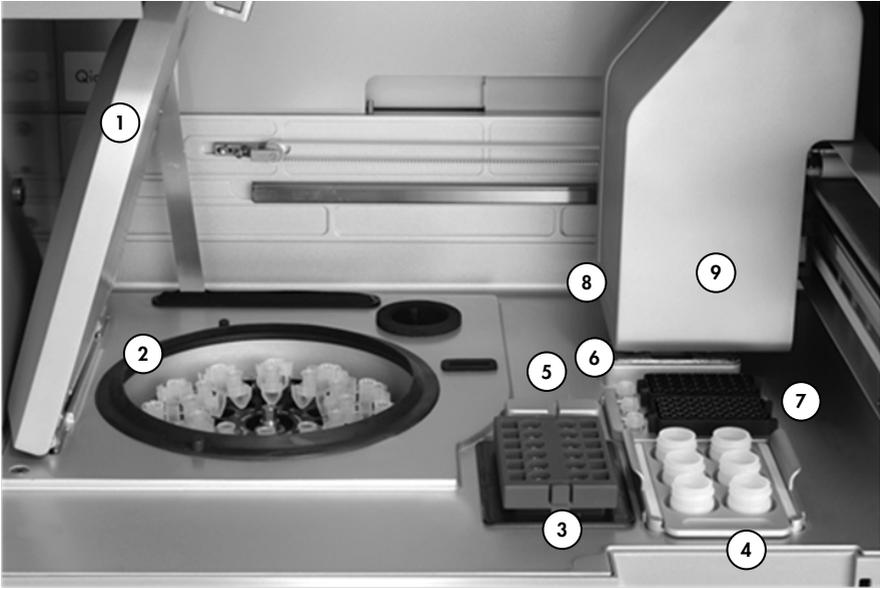


그림 22. QIAcube 의 내부 뷰.

- | | |
|------------|--------------------|
| ① 원심분리기 뚜껑 | ⑥ 마이크로 원심분리기 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 원심분리기 튜브(MCT) 및 QIAcube 기기 플라스틱 용기 Filter-Tips 1,000 μ l 를 채운 팁 랙 2 개를 QIAcube 기기에 장착합니다(그림 21 및 22, 47 및 48 페이지). 필요한 경우에 랙에 팁을 다시 채웁니다.

 QIAcube 기기에 사용할 수 있도록 제작된 1,000 μ l 필터 팁만 사용하십시오.

유성펜을 사용하여 각 검체에 대한 로터 어댑터 및 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 라벨 표시합니다. 사용할 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 열고 가위를 사용하여 뚜껑을 완전히 잘라냅니다(그림 23, 49 페이지 참조).

 QIAcube 기기 로봇 그리퍼가 제대로 작동하려면 뚜껑 그리고 PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC; 그림 23 참조)에 뚜껑을 연결하는 모든 플라스틱 부품들을 완전히 제거(절단)해야 합니다. 그렇지 않으면 로봇 그리퍼가 스핀 컬럼(PSC, PRC)을 제대로 집을 수 없습니다.

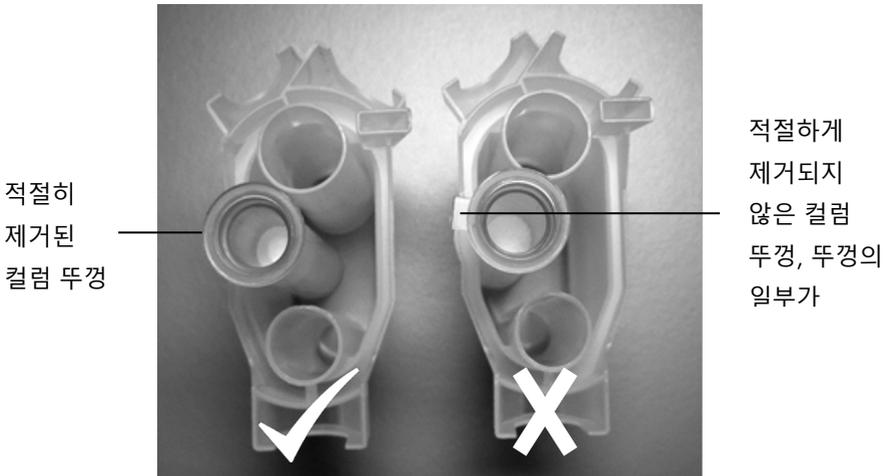


그림 23. PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC) 로딩. PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 로터 어댑터의 중앙 위치에 로딩합니다. 컬럼을 로딩하기 전에 뚜껑을 잘라냅니다.

표 4 및 그림 24 에 표시된 것과 같이 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC), PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC, 뚜껑 없음, 그림 23, 49 페이지 참조), 라벨 표시한 마이크로 원심분리기 튜브를 라벨 표시한 각 로터 어댑터의 적절한 위치에 로딩합니다.

 스핀 컬럼(PRC)과 마이크로 원심분리기 튜브(MCT) 뚜껑은 로터 어댑터 가장자리의 슬롯 바닥까지 완전히 미십시오. 그렇지 않으면 뚜껑이 원심분리 중에 파손됩니다.

표 4. 로터 어댑터의 랩웨어

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

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

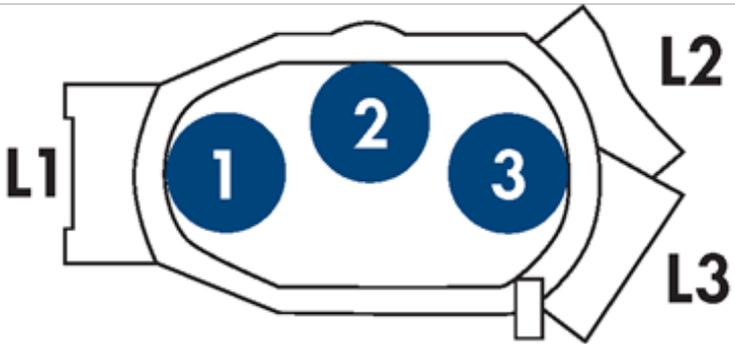


그림 24. 로터 어댑터 내 위치. 로터 어댑터에는 튜브 위치가 3 개(1-3), 뚜껑 위치가 3 개(L1-L3) 있습니다.

원심분리기 로딩

아래 그림 25 에 표시된 것과 같이 조립된 로터 어댑터를 원심분리기 버킷에 로딩하십시오.



12 개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 원심분리기 로터가 방사상으로 균형을 이루도록 로딩해야 합니다(그림 26, 52 페이지 참조). 12 개 미만의 검체를 처리해야 하는 경우에도 프로토콜 실행을 시작하기 전에 모든 원심분리기 버킷을 장착해야 합니다. 단일 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다.



그림 25. QIAcube 기기에 원심분리기 로딩. 조립된 로터 어댑터를 원심분리기 버킷에 로딩합니다(QIAcube Connect MDx 가 예로 나와 있음).

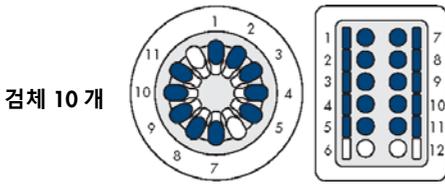
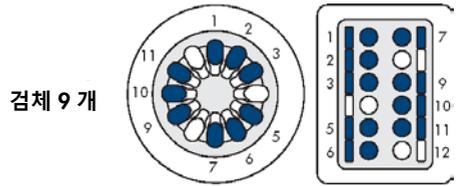
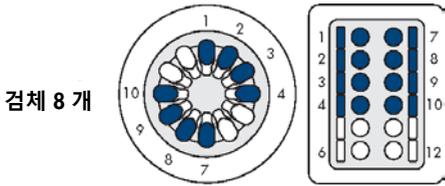
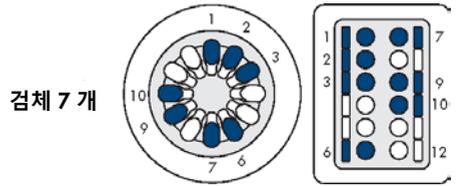
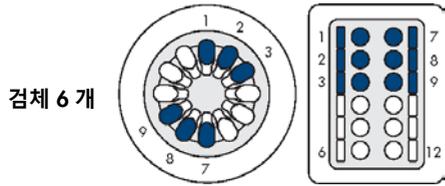
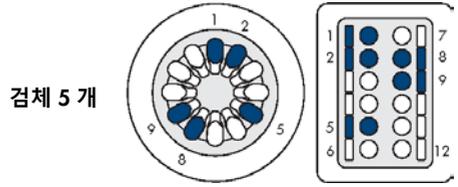
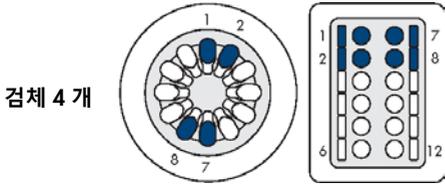
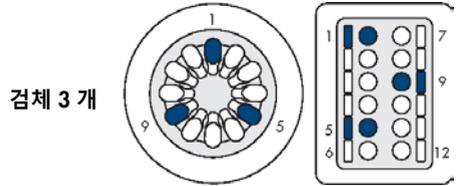
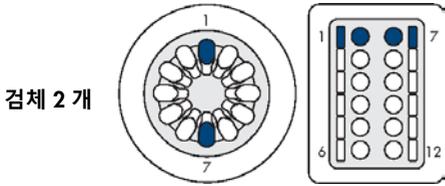


그림 26. 원심분리기 및 셰이커 로딩. 2 개~10 개의 검체 처리에 대한 원심분리기 및 셰이커 위치가 표시되어 있습니다. 1 개 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다. 12 개 검체를 처리하려면, 모든 원심분리기와 셰이커 위치에 로딩합니다(그림에 나와 있지 않음).

처리 튜브(PT)

이전 실행 후 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯에 남아 있는 모든 처리 튜브(PT)를 꺼냅니다(QIAcube Connect MDx의 경우 그림 21, 47 페이지 참조, QIAcube의 경우 그림 22, 48 페이지 참조). 실행에서 처리할 검체 수에 따라 표 5에 명시된 시약의 양을 처리 튜브(PT) 3 개에 채웁니다.

DNase I 배양 혼합액의 경우, DNA 소화 완충액(RDD)의 명시된 용량을 피펫으로 처리 튜브(PT)에 넣은 후에 DNase I(RNFD) 표준원액(stock solution)의 지정된 용량을 추가합니다. 1000 µl 피펫 팁으로 전체 혼합액을 위아래로 3 번 부드럽게 피펫팅하여 혼합합니다.

PAXgene Blood RNA Kit에 포함된 2 ml의 처리 튜브(PT)를 사용하십시오. 튜브에 시약 이름을 분명하게 기재한 라벨 표시를 한 후에 그림 6(54 페이지)에 표시된 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯 내 해당 위치에 배치합니다.



DNase I(RNFD)은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 전단(Shearing)을 줄이기 위해 넓은 내경(wide-bore)의 피펫 팁만 사용하여 혼합하십시오. 볼텍싱하지 마십시오.



표 5에 명시된 필요한 양만 피펫팅하십시오.

표 5. 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯의 튜브를 처리하는 데 필요한 시약 용량.

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

표 6. 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯

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

* PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2 ml 의 처리 튜브를 사용하십시오.

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

시작 전 중요 사항

- 키트 박스가 손상되지 않았으며 완충액이 누출되지 않았음을 확인하십시오. 손상된 키트는 사용하지 마십시오.
- 피펫 사용 시, 정확한 용량으로 설정되어 있고 액체가 신중하고 안전하게 흡인되고 분배되는지 확인하십시오.
- 검체를 올바르게 옮긴 튜브 또는 스핀 컬럼에 옮기지 않도록 하기 위해 유성펜을 사용하여 모든 튜브 및 스핀 컬럼에 적절하게 라벨 표시하십시오. 각 튜브(PT, MCT)의 뚜껑 및 본체에 라벨 표시하십시오. 스핀 컬럼의 경우에는 처리 튜브(PT)의 본체에 라벨 표시하십시오. 액체를 각 튜브 또는 스핀 컬럼에 옮긴 후에는 튜브나 스핀 컬럼을 닫으십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엮지르면 RNA의 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 교차 오염을 방지하기 위해 다음의 사전 주의가 필요합니다.

- 피펫으로 검체를 스핀 컬럼(PRC, PSC)에 옮길 때는 컬럼의 가장자리를 적시지 않도록 피펫팅하십시오.
- 액체를 옮긴 후 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용하십시오.
- 피펫 팁으로 스핀 컬럼(PRC, PSC) 막을 건드리지 마십시오.
- 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 볼텍싱하거나 가열한 후에는 잠깐 원심분리하여 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거하십시오.

- 전체 절차 내내 장갑을 착용하십시오. 장갑과 검체가 접촉한 경우에는 즉시 장갑을 교체하십시오.
- 마이크로 원심분리기에 넣기 전에 스피ن 컬럼(PRC, PSC)을 닫으십시오. 절차에서 설명한 대로 원심분리하십시오.
- 한 번에 스피ن 컬럼(PRC, PSC) 하나만 열고 에어로졸이 생기지 않도록 주의하십시오.
- 여러 검체를 효율적으로 동시에 처리하려면 원심분리 후에 스피ن 컬럼(PRC, PSC)을 옮길 수 있는 처리 튜브(PT)로 랙을 채우십시오. 통과액이 들어 있는, 사용한 처리 튜브(PT)를 버리고, 스피ن 컬럼(PRC, PSC)이 든 새 처리 튜브(PT)를 바로 마이크로 원심분리기에 넣으십시오.

시작하기 전 해야 할 사항

- 혈액은 *PAXgene Blood RNA Tube 안내서*의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우, PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 취급 방법에 대한 권장 사항은 부록 C(74 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 온도가 실온에 이르도록 하고 실온에서 2 시간 동안 보관한 후에 절차를 시작하십시오.
- 9 페이지의 안전성 정보를 읽으십시오.
- RNA 취급 방법에 관한 지침을 읽으십시오(부록 A, 71 페이지).
- 제조업체 권장 사항에 따라 피펫 및 슈이커-배양기와 같은 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.
- 슈이커-배양기는 단계 5 및 단계 20 에서 필요합니다. 슈이커-배양기의 온도를 55°C 로 설정하십시오.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 시 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 데워써 용해시킵니다.

- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 처음 사용하기 전에 병에 표시된 대로 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만드십시오.
- RNase 불포함 DNase 세트를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 표준 원액(stock solution)을 준비하십시오. 고품 DNase I(RNFD; 1,500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase 재현탁 완충액(DRB) 550 μ l 에 녹이십시오. 바이알을 개봉할 때 DNase I(RNFD)이 유실되지 않도록 주의하십시오. 재구성된 DNase I(RNFD)을 불텍싱하지 마십시오. DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 바이알을 부드럽게 거꾸로 하여 혼합해야 합니다.
- 현재 나와 있는 데이터에 따르면 재구성된 DNase I(RNFD)은 2~8°C 에서 최대 6 주 동안 보관할 수 있습니다. DNase I(RNFD)을 장기간 보관하려면, 유리 바이알에서 표준 원액을 취하여 1 회용 분주로 나누고 (키트와 함께 공급되는 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브[MCT]를 사용, 5 개 분주물을 만들기에 충분함) -20°C 에서 최대 9 개월 동안 보관하십시오. 해동한 분주물은 최대 6 주간 2~8°C 에서 보관할 수 있습니다. 분주물을 해동한 후에는 재동결하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)을 재구성하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(부록 A, 71 페이지)에 따라 수행하십시오.

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



로터에는 동근 바닥 튜브용 튜브 어댑터가 있어야 합니다. 다른 유형의 튜브 어댑터를 사용하는 경우에는 튜브가 원심분리 중에 파손될 수 있습니다.

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

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

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

볼텍싱한 후 원심분리 전에 상층액에 남아 있는 작은 찌꺼기는 절차에 영향을 주지 않습니다.



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

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

5. 피펫으로 검체를 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)에 넣습니다. 300 µl 결합 완충액(BR2)과 40 µl 단백질효소 K(PK)를 추가합니다. 웨이커-배양기를 사용하여 400~1400 rpm 에서 5 초 동안 볼텍싱으로 혼합하고 55°C 로 10 분 동안 배양합니다. 배양 후에 웨이커-배양기의 온도를 65°C 로 설정합니다(단계 20).



결합 완충액(BR2)과 단백질효소 K(PK)를 검체에 추가하기 전에 함께 혼합하지 마십시오.

6. 용해물을 2 ml 처리 튜브(PT)에 있는 PAXgene Shredder 스피ن 컬럼(PSC; 연보라색)에 바로 넣고 최대 속도(단 20,000 x g 미만)로 3 분 동안 원심분리합니다.



피펫으로 용해물을 조심스럽게 스피ن 컬럼(PSC)에 넣고 용해물이 스피ن 컬럼(PSC)에 완전히 옮겨졌는지 육안으로 확인하십시오.

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



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

7. 처리 튜브 내의 펠렛을 흔들지 말고 통과액 분획의 상층액 전체를 신선한 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)로 조심스럽게 옮깁니다.

8. 350 µl 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.)을 추가합니다. 볼텍싱으로 혼합하고 잠깐(1-2 초 동안 500~1000 x g 로) 원심분리하여 튜브 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거합니다.



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

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

10. 피펫으로 남은 검체를 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC)에 넣고 8,000~20,000 x g 로 1 분 동안 원심분리합니다. 스피ن 컬럼(PRC)을 새 2 ml 처리 튜브(PT)에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 처리 튜브(PT)는 폐기합니다.



피펫으로 검체를 조심스럽게 스피ن 컬럼(PRC)에 넣고 검체가 스피ن 컬럼(PRC)에 완전히 옮겨졌는지 육안으로 확인하십시오.

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

12. 10 µl DNase I(RNFD) 표준 원액을 1.5 ml 의 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)의 70 µl DNA 소화 완충액(RDD)에 추가합니다. 튜브를 살짝 치면서 혼합한 후에 잠깐 원심분리하여 튜브 측면의 잔류 액체를 수집합니다.

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



DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 혼합은 튜브를 살짝 치는 방식으로만 수행해야 합니다. 볼텍싱하지 마십시오.

13. 피펫으로 DNase I(RNFD) 배양 혼합액(80 μ l)을 바로 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC) 막에 옮긴 후에 실험대(20~30°C) 위에 15 분 동안 놓아 둡니다.



DNase I(RNFD) 배양 혼합액을 막 위에 바로 배치해야 합니다. 혼합액의 일부가 스핀 컬럼(PRC)의 벽 또는 O 링에 묻어 남아 있는 경우에는 DNase 소화가 불완전하게 진행됩니다.

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

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



세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 사용하기 전에 에탄올을 세척 완충액 2(BR4)에 추가하십시오("시작하기 전 해야 할 사항", 56 페이지 참조).

16. 500 μ l 세척 완충액 2(BR4)를 다시 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)에 추가합니다. 8,000~20,000 $\times g$ 로 3 분 동안 원심분리합니다.

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

18. 통과액이 들어 있는 처리 튜브(PT)를 폐기합니다. PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC)을 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)에 넣고 피펫으로 40 μ l 용출 완충액(BR5)을 바로 PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC) 막 위로 옮깁니다. 8,000~20,000 $\times g$ 로 1 분 동안 원심분리하여 RNA 를 용출합니다.

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

19. 설명된 대로 40 μ l 용출 완충액(BR5) 및 동일한 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)을 사용하여 용출 단계(단계 18)를 반복합니다.

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

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

21. RNA 검체를 즉시 사용하지 않는 경우 -20°C 또는 -70°C 에서 보관하십시오.

RNA 는 동결 및 해동의 반복 후에 변성 상태를 유지하므로 65°C 의 배양을 반복할 필요가 없습니다. RNA 검체를 진단 분석에 사용하는 경우에는 제조업체가 공급하는 지침을 준수하십시오.

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

측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220 nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 수 있습니다.



Tris HCl 완충액 내 정량화에는 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ 의 관계식을 사용하십시오. 부록 B(72 페이지)를 참조하십시오.

*화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

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

시작 전 중요 사항

- 키트 박스가 손상되지 않았으며 완충액이 누출되지 않았음을 확인하십시오. 손상된 키트는 사용하지 마십시오.
- 피펫 사용 시, 정확한 용량으로 설정되어 있고 액체가 신중하고 완전하게 흡인되고 분배되는지 확인하십시오
- 검체를 올바르게 옮기지 않은 튜브 또는 스피ن 컬럼에 옮기지 않도록 하기 위해 유성펜을 사용하여 모든 처리 튜브(PT), 마이크로 원심분리기 튜브(MCT) 및 로터 어댑터에 적절하게 라벨 표시하십시오. 각 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)의 뚜껑 및 본체, 각 처리 튜브(PT)의 본체, 각 로터 어댑터의 외벽에 라벨 표시를 하십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엷지르면 RNA의 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 교차 오염을 방지하기 위해 다음의 사전 주의가 필요합니다.

- 피펫으로 검체를 처리 튜브(PT)에 옮길 때는 컬럼의 가장자리를 적시지 않도록 튜브의 하부에 피펫팅하십시오.
- 액체를 옮긴 후 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용하십시오.
- 피펫 팁으로 스피ن 컬럼(PRC, PSC) 막을 건드리지 마십시오.
- 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 볼텍싱하거나 가열한 후에는 잠깐 원심분리하여 뚜껑 내부의 액체 방울을 제거하십시오.

- 전체 절차 내내 장갑을 착용하십시오. 장갑과 검체가 접촉한 경우에는 즉시 장갑을 교체하십시오.

시작하기 전 해야 할 사항

- 혈액은 PAXgene Blood RNA Tube 안내서의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우, PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 취급 방법에 대한 권장 사항은 부록 C(74 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 온도가 실온에 이르도록 하고 실온에서 2 시간 동안 보관한 후에 절차를 시작하십시오.
- 9 페이지의 안전성 정보를 읽으십시오.
- "중요 참고사항"(40 페이지)를 읽으십시오.
- RNA 취급 방법에 관한 지침을 읽으십시오(부록 A, 71 페이지).
- 안전성 정보에 세심한 주의를 기울이면서, QIAcube 기기와 함께 제공되는 QIAcube 기기 사용자 설명서 및 추가 정보를 읽으십시오.
- 제조업체 권장 사항에 따라 피펫 및 QIAcube 기기와 같은 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 시 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 데워서 용해시킵니다.
- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 처음 사용하기 전에 병에 표시된 대로 적당한 용량의 에탄올(96~100%, 순도 등급 p.a.)을 첨가하여 작업 용액을 만드십시오.
- RNase 불포함 DNase 세트를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 표준 원액(stock solution)을 준비하십시오. 고품 DNase I(RNFD; 1,500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase

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

재현탁 완충액(DRB) 550 μ l 에 녹이십시오. 바이알을 개봉할 때 DNase I(RNFD)이 유실되지 않도록 주의하십시오. 재구성된 DNase I(RNFD)을 볼텍싱하지 마십시오. DNase I 은 특히 물리적 변성에 민감합니다. 바이알을 부드럽게 거꾸로 하여 혼합해야 합니다.

- 현재 나와 있는 데이터에 따르면 재구성된 DNase I(RNFD)은 2~8°C 에서 최대 6 주 동안 보관할 수 있습니다. DNase I(RNFD)을 장기간 보관하려면, 유리 바이알에서 표준 원액을 취하여 1 회용 분주로 나누고 (키트와 함께 공급되는 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브[MCT]를 사용, 5 개 분주물을 만들기에 충분함) -20°C 에서 최대 9 개월 동안 보관하십시오. 해동한 분주물은 최대 6 주간 2~8°C 에서 보관할 수 있습니다. 분주물을 해동한 후에는 재동결하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)을 재구성하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(부록 A, 71 페이지)에 따라 수행하십시오.
- 올바른 셰이커 어댑터(QIAcube 에 포함됨, 2 ml 안전 잠금식 튜브용 어댑터, "2"로 표시됨)를 설치하고 셰이커 랙을 어댑터 위에 놓으십시오.
- 폐기물 서랍을 확인하고 필요한 경우 비우십시오.
- 이전 실행을 위해 이미 수행한 프로토콜이 아닌 경우에는 모든 관련 프로토콜을 설치하십시오. QIAcube Connect MDx 를 사용하려면 관련 zip 파일에 있는 모든 프로토콜을 다운로드해야 합니다. 전형적 QIAcube 의 경우에는 "PAXgene Blood RNA Part A" 및 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 모두 설치하십시오. "QIAcube 기기에 프로토콜 설치"(43 페이지)를 참조하십시오.

절차

1. QIAcube 기기 후드를 닫고 전원 스위치로 QIAcube 기기를 켭니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41 페이지; QIAcube 의 경우 그림 18, 42 페이지 참조).
삐 소리가 나면서 시작 화면이 표시됩니다. 기기가 자동으로 초기화 검사를 수행합니다.
2. QIAcube 기기 도어를 열고 필요한 시약 및 플라스틱 용기를 QIAcube 기기에 로딩합니다.
"QIAcube 기기 로딩"(44 페이지)를 참조하십시오.
시간 절약을 위해 장착은 다음과 같은 10 분 원심분리 단계(단계 3 및 5)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)에서 2 시간 이상 배양해야 합니다.



로터에는 동근 바닥 튜브용 튜브 어댑터가 있어야 합니다. 다른 유형의 튜브 어댑터를 사용하는 경우에는 튜브가 원심분리 중에 파손될 수 있습니다.

4. 디캔팅 또는 피펫팅으로 상층액을 제거합니다. 4 ml 의 RNase 불포함수(RNFW)를 펠렛에 추가하고 (키트와 함께 공급된) 신선한 보조 BD Hemogard 마개를 사용하여 튜브를 닫습니다.

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

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

볼텍싱한 후 원심분리 전에 상층액에 남아 있는 작은 찌꺼기는 절차에 영향을 주지 않습니다.



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

6. 펠렛이 육안으로 보기에 용해될 때까지 350 µl 재현탁 완충액(BR1)을 추가하고 볼텍싱합니다.

7. 피펫으로 검체를 2 ml 처리 튜브(PT)에 넣습니다.



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

8. 검체가 들어 있는 열린 처리 튜브(PT)를 QIAcube 기기 웨이커에 로딩합니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 21, 47 페이지 참조; QIAcube 의 경우 그림 22, 48 페이지 참조). 쉽게 로딩할 수 있도록 검체 위치에 번호가 매겨져 있습니다. 웨이커 랙 플러그(QIAcube 기기에 포함됨)를 각 처리 튜브 옆의 웨이커 랙 가장자리에 있는 슬롯에 삽입합니다. 이렇게 하면 로딩 확인 중에 검체를 찾을 수 있습니다.



올바른 셰이커 어댑터(Shaker Adapter, 2 ml, 안전 잠금식 튜브, “2”로 표시된, QIAcube 기기에 포함됨)가 설치되었는지 확인하십시오.



12 개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 셰이커 랙이 방사상으로 균형을 이루도록 로딩해야 합니다(그림 26, 52 페이지 참조). 1 개 검체 또는 11 개 검체는 처리할 수 없습니다. 셰이커 랙의 위치 번호는 원심분리기의 위치 번호에 상응합니다.

9. QIAcube 기기 후드를 닫습니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41 페이지 참조; QIAcube 의 경우 그림 18, 42 페이지 참조).

10. “PAXgene Blood RNA Part A” 프로토콜을 선택한 후에 프로토콜을 시작하십시오.

QIAcube 기기의 터치 스크린에 표시된 지침에 따라 수행하십시오.



두 프로그램 파트 둘 다(Part A 및 Part B) QIAcube 에 설치되었는지 확인하십시오(“QIAcube 기기에 프로토콜 설치”, 43 페이지 참조).



QIAcube 기기가 검체, 팁, 로터 어댑터 및 시약 병의 로딩 확인을 수행합니다.

11. “PAXgene Blood RNA Part A” 프로토콜을 완료한 후, QIAcube 기기 후드를 엽니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41 페이지 참조; QIAcube 의 경우 그림 18, 42 페이지 참조). 로터 어댑터에서 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC)을, 셰이커에서 빈 처리 튜브(PT)를 제거하여 버립니다.



실행 도중, 로터 어댑터 위치 1(뚜껑 위치 L1)에서 로터 어댑터 위치 3(뚜껑 위치 L2)으로 스피ن 컬럼을 옮깁니다(그림 24, 50 페이지 참조).

12. 로터 어댑터에 있는, 정제된 RNA 가 들어 있는 모든 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브(MCT) 뚜껑을 닫습니다(위치 3, 뚜껑 위치 L3, 그림 24, 50 페이지 참조). 1.5 ml 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 QIAcube 기기 셰이커 어댑터로 옮깁니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 21, 47 페이지 참조; QIAcube 의 경우 그림 22, 48 페이지 참조).

13. QIAcube 기기 후드를 닫습니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41 페이지 참조; QIAcube 의 경우 그림 18, 42 페이지 참조).

14. “PAXgene Blood RNA Part B” 프로토콜을 선택하여 시작합니다.

QIAcube 기기의 터치 스크린에 표시된 지침에 따라 수행하십시오.



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

15. "PAXgene Blood RNA Part B" 프로그램을 완료한 후, QIAcube 기기 후드를 엽니다(QIAcube Connect MDx 의 경우 그림 17, 41 페이지; QIAcube 의 경우 그림 18, 42 페이지 참조). 정제된 RNA 가 들어 있는 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)를 즉시 얼음 위에 놓습니다.



경고: 표면이 뜨겁습니다. 셰이커의 온도는 최대 70°C(158°F)까지 도달할 수 있습니다. 뜨거울 때 만지지 마십시오.



정제된 RNA 가 QIAcube 기기에 남아 있지 않도록 하십시오. 검체를 식히지 않았기 때문에 정제된 RNA 가 분해될 수 있습니다. 따라서 작업자가 없는 상태에서 밤새 검체 준비 실행은 권장되지 않습니다.

16. RNA 검체를 즉시 사용하지 않는 경우 -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.

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

측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220 nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 수 있습니다.

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



Tris-HCl 완충액에서 정량화할 때는 다음 관계식을 사용하십시오.

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\mu\text{g/ml}$. 부록 B(72 페이지)를 참조하십시오.

17. QIAcube 기기 작업대에서 시약 병을 꺼낸 후(QIAcube Connect MDx의 경우 그림 21, 47 페이지 참조; QIAcube의 경우 그림 22, 48 페이지 참조), 적절하게 라벨 표기된 뚜껑으로 모든 병을 닫습니다. 병에 든 완충액은 최대 3개월 간 실온(15~25°C)에서 보관할 수 있습니다. QIAcube 기기 마이크로 원심분리기 튜브 슬롯 내, 처리 튜브(PT)에 남아 있는 시약을 꺼내서 폐기합니다. 원심분리기에서 로터 어댑터를 꺼내서 폐기합니다. QIAcube Connect MDx 폐기물 서랍을 닫습니다(QIAcube Connect MDx의 경우 그림 17, 41 페이지 참조; QIAcube의 경우 그림 18, 42 페이지 참조). QIAcube 기기 후드를 닫고 전원 스위치로 기기를 끕니다.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생할 수 있는 문제를 해결하는 데 도움이 될 수 있습니다. 상세한 정보는 당사 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문(Frequently Asked Questions, FAQ) 페이지를 참조하시기 바랍니다. 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 항상 기꺼이 답변해 드립니다(연락처 정보는 마지막 페이지 참조 또는 www.qiagen.com 방문).

의견 및 제안

RNA 분해

RNase 오염



절차 중에 또는 나중에 취급할 때 RNase 가 시약에 유입되지 않도록 주의하십시오(부록 A, 71 페이지 참조).

낮은 RNA 수율

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



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

b) RNA 농도를 물에서 측정



정확한 정량화를 위해 RNA 는 10 mM Tris-HCl, pH 7.5*로 희석해야 합니다(부록 B, 72 페이지 참조).

c) 수동 프로토콜 단계 9 및 10 에서 세포 찌꺼기를 PAXgene RNA 스피ن 컬럼(PRC)으로 옮김



수동 프로토콜의 단계 7 에서 피펫으로 상층액을 옮길 때 큰 입자를 옮기지 마십시오(작은 찌꺼기를 옮기는 것은 절차에 영향을 주지 않음).

* 화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

의견 및 제안

- d) 단계 3 에서 상층액이 완전히 제거되지 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 사전주의를 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 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 를 사용하십시오 *(부록 B, 72 페이지 참조).

- b) 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않음



측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl, pH 7.5 로 구성된 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220 nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 수 있습니다.

기기 고장

- QIAcube 기기가 제대로 작동하지 않음

문제 해결 절에 세심한 주의를 기울이면서 해당 QIAcube 사용자 설명서를 읽으십시오. 사용자 설명서에서 설명된 대로 QIAcube 기기가 올바르게 유지보수되도록 하십시오.

* 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 A: RNA 취급에 관한 일반적인 설명

RNA 취급



리보핵산분해효소(RNase)는 매우 안정적이고 활성도 높은 효소로, 기능을 위해 일반적으로 보조 인자가 필요하지 않습니다. RNase 는 불활성화하기 어려우며, 아주 적은 양으로도 RNA 를 분해할 수 있으므로 플라스틱 용기나 유리 용기를 사용하기 전에 반드시 RNase 오염을 제거해야 합니다. 정제 절차 도중 또는 이후에 RNase 가 우발적으로 RNA 검체에 혼입되지 않도록 각별히 주의해야 합니다. RNase 가 없는 환경을 조성하고 유지하려면 RNA 작업을 수행할 때 일회용 및 비일회용 용기의 전처리 및 사용 시 사전조치를 취해야 합니다.

일반 취급



RNA 로 작업할 때는 항상 적절한 미생물학적 무균 기법을 사용해야 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 분주액을 피펫팅할 때는 정제된 RNA 를 얼음 위에 두십시오.

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 측정

RNA 의 정량화

RNA 의 농도는 분광 광도계로 260 nm(A_{260})에서 흡광도를 측정하여 측정해야 합니다. 유의성을 보장하기 위해서는 측정치가 분광 광도계의 선형 범위 내에 속해야 합니다. 260 nm 에서 1 유닛의 흡광도는 ml 당 RNA 44 μg 에 해당합니다($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). 이 관계식은 10 mM Tris-HCl, pH 7.5*에서의 측정치에만 유효합니다. 따라서 RNA 검체를 희석해야 하며, 희석은 10 mM Tris-HCl 로 수행해야 합니다. 아래에 논의하는 바대로("RNA 의 순도", 73 페이지 참조) 260 nm 및 280 nm 에서의 흡광도 값 비율은 RNA 순도의 추정치입니다. RNA 검체를 측정할 때는 큐벳이 RNase 불포함 상태여야 합니다. 측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 Tris-HCl 완충액으로 구성된 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220 nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 수 있습니다. RNA 정량화에 관련된 계산 예가 아래에 나와 있습니다.

$$\begin{aligned} \text{RNA 검체 양} &= 80 \mu\text{l} \\ \text{희석(1/15)} &= \text{RNA 검체 } 10\mu\text{l} + 140 \mu\text{l } 10 \text{ mM Tris-HCl, pH } 7.5 \\ \text{큐벳 내 희석 검체의 흡광도 측정(RNase 불포함).} & \\ A_{260} &= 0.3 \\ \text{검체 농도} &= 44 \times A_{260} \times \text{희석 배수} \\ &= 44 \times 0.3 \times 15 \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \\ \text{총 수율} &= \text{농도} \times \text{검체 양(밀리리터)} \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0.08 \text{ ml} \\ &= 15.8 \mu\text{g RNA} \end{aligned}$$

* 화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

RNA 의 순도

260 nm 및 280 nm(A_{260}/A_{280})에서의 측정치 비율은 단백질 등과 같이 UV 에서 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 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 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220 nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 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) 취급



아래의 BD 권장 사항은 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 취급 시 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 BD Hemogard 마개가 풀리자마자 마개를 위로 미는 데 사용한 엄지를 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 마십시오. 고무 스톱퍼를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에서 조심스럽게 제거하십시오.

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. 취급 중 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 마개가 단단히 유지되려면 스톱퍼를 완전히 다시 삽입해야 합니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Column, 50 Shredder Spin Column, 처리 튜브, RNase-Free DNase I, RNase-Free 시약 및 완충. 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 라벨링 스트립(8); 200 µl 필터 팁(1,024); 1000 µl 필터 팁(1024); 1000 µl 필터 팁, 넓은 내경(1024); 30 ml 시약 병(18); 로터 어댑터(240); 로터 어댑터 홀더	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	멸균 1 회용 필터 팁, 랙	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	뚜껑이 Reagent Bottles (30 ml); 6 개들이 팩; QIAcube 기기 시약 병 랙과 함께 사용	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 회 준비용: 240 개 1 회용 로터 어댑터; QIAcube 기기와 함께 사용	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube 기기 작업대에서 6 x 30 ml 시약 병이 들어가는 랙	990390
Rotor Adapter Holder	12 개 1 회용 로터 어댑터용 홀더; QIAcube 기기와 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(0.8 × 19 mm) 바늘, 루어 어댑터가 있는 12 인치(305 mm) 튜브; 상자당 50 개, 케이스당 200 개	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	케이스에는 13 mm 및 16 mm 직경만 해당; 케이스당 1,000 개	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	적색 BD Hemogard 마개 및 종이 라벨이 있는 13 × 75 mm 4.0 ml 서랍; 상자당 100 개, 케이스당 1,000 개	368975

* 이 채혈 부속품은 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)와 함께 사용할 수 있는 전형적인 제품입니다. 주문 방법을 비롯한 이 부속품에 대한 자세한 내용을 확인하려면 www.preanalytix.com 을 방문하십시오.

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 서비스에 요청할 수 있습니다.

안내서 개정 이력

문서 및 개정	변경 사항	날짜
HB-0101-004, R2	문서 전체에서 GHS 규정을 준수하기 위한 개정	2015 년 6 월
HB-0101-005, R3	새 양식: 자동 프로토콜 및 성능 데이터 개정, GHS 규정을 준수하기 위한 안전성 정보의 개정, 기기 세부사항 및 제품 사용 제한 고지문에 대한 개정.	2019 년 2 월
HB-0101-006, R3	5 페이지의 키트 내용물 표에서 키트 이름 정정.	2020 년 1 월
HB-0101-007, R4	자동 프로토콜에 QIAcube Connect MDx 추가, QIAcube Connect MDx 에 대한 언급을 포함시키도록 문서 전체에 걸쳐 업데이트, 문서 전체에 걸쳐 표, 페이지 및 그림 번호 업데이트.	2020 년 12 월

PreAnalytiX Worldwide

QIAGEN 및 BD 회사가 PreAnalytiX 제품의 유통업체입니다.

QIAGEN – 고객 서비스

주문 www.QIAGEN.com/shop | 기술 지원 support.qiagen.com | 웹사이트 www.qiagen.com

BD – 고객 서비스

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

E-mail: customer.service.canada@bd.com

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customercare.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa
Orders: 971.45.592.555
Fax: 971.45.592.599
E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands
Orders: 31.20.582.94.20
Fax: 31.20.582.94.21
Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand
Orders: 0800.572.468
Fax: 0800.572.469
E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway
Customer Support: 64.00.99.00
E-mail: bdnorge@bd.com
Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia
E-mail: PAS.SEA@bd.com
Indonesia orders: 622.1577.1920
Malaysia orders: 603.2093.8788
Philippines orders: 63.2478.8881
Singapore orders: 65.6861.0633
Thailand orders: 662.646.1800
Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea
Orders: 02.3404.3706
Fax: 02.3404.3785
Technical: 02.3404.3706
Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra
Orders: 34.91.848.8174
Customer support: 34.902.27.17.27
Fax: 34.91.848.8115
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden
Orders: 46.8.775.51.00
Fax: 46.8.645.08.08
Orders: order.se@bd.com
Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland
Orders: 41.61.485.22.24
Fax: 41.61.485.22.00
E-mail: info.ch@bd.com

UK
Orders: 0800.917.8776
E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA
Customer support: 800.631.0174
E-mail: productcomplaints@bd.com



A QIAGEN / BD Company

HB-0101-007 1122120KO BD-8945 12/2020

독일 제품