

RNeasy[®] DSP FFPE Kit 사용 설 명서(안내서)



버전 2

IVD

체외 진단용

RNeasy DSP FFPE Kit 와 함께 사용

CE

REF

73604



R1 MAT

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

1127532KO

목차

용도.....	4
대상 사용자.....	4
설명 및 원리.....	5
요약 및 설명.....	5
절차의 원리.....	6
제공 품목.....	8
키트 내용물.....	8
키트 구성품.....	9
필요하지만 제공되지 않는 품목.....	10
경고 및 예방조치.....	11
안전성 정보.....	11
응급 정보.....	12
예방조치.....	12
시약 보관 및 취급.....	14
사용 안정성.....	14
키트 구성품.....	14
절차.....	15
시작 전 중요 사항.....	15
완충액 준비.....	16
시작하기 전 해야 할 일.....	17
프로토콜: 포르말린 고정 파라핀 포매 (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직 절편에서 총 RNA 정제.....	18

품질 관리	22
제한	22
성능 특징	23
폐기	24
문제 해결 가이드	25
기호	28
연락처 정보	30
부록: RNA 취급에 관한 일반 사항	31
주문 정보	33
문서 개정 이력	34

용도

RNeasy DSP FFPE Kit 는 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직에서 총 RNA 를 수동 정제하기 위한 시스템입니다.

또한 최적화된 실리카 스핀 컬럼 기반 프로토콜을 사용하고, 잔류 DNA 의 효소적 제거를 포함합니다.

RNeasy DSP FFPE Kit 는 시험관 내 진단용입니다.

대상 사용자

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

설명 및 원리

요약 및 설명

RNeasy DSP FFPE Kit 는 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직 절편에서 총 RNA 를 정제하도록 특별히 설계되었습니다. 이 키트는 70 개의 뉴클레오티드보다 긴 RNA 분자를 분리하여 RT-PCR 등의 분야에 사용할 수 있는 RNA 조각을 회복하는 기능을 제공합니다.

응고와 삽입 조건 때문에 FFPE 검체 내의 핵산은 일반적으로 단편화되고 포르말데히드에 의해 화학적으로 변형됩니다. 따라서, FFPE 검체에서 분리된 핵산은 분자량이 갓 채취한 검체나 냉동된 검체에서 얻은 분자량보다 적은 경우가 많습니다. 단편화 정도는 검체의 유형과 수명, 검체의 응고, 삽입 및 보관 조건에 따라 달라집니다. 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직에 대한 사전 검사 프로세스의 표준화를 위해 ISO 20166-1:2018 “체외 분자 진단 검사 — 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직에 대한 사전 검사 프로세스를 위한 규격 — 파트 1: 분리 RNA”에 따라 진행하도록 권장합니다.

포르말데히드 변형은 젤 전기영동법, 랩온어칩(Lab-on-a-Chip) 분석 등의 표준 품질 관리 분석에서 검출할 수 없지만 효소 분석을 강하게 방해합니다.

RNeasy DSP FFPE Kit 는 추가 RNA 분해 없이 최대한 많은 포르말데히드 변형을 역전하도록 최적화되어 있지만, FFPE 검체에서 정제된 핵산을 전장 RNA 가 필요한 후속 공정에서 사용해서는 안 됩니다. 일부 분야에서는 단편화된 RNA 사용을 허용하기 위해 변경이 필요할 수 있습니다(예: RT-PCR 을 위한 작은 앰플리콘 설계). cDNA 합성을 위해서는 oligo-dT 프라이머 대신 무작위 또는 유전자 특이적 프라이머를 사용해야 합니다.

FFPE 절편의 염색도 후속 공정에서 RNA 품질과 성능을 저해할 수 있습니다. 많은 면역조직화학염색 프로토콜에서 특히 그렇습니다.

절차의 원리

RNeasy DSP FFPE 절차는 RNA 정제를 위해 잘 정립된 RNeasy 기술을 사용합니다. 특별히 최적화된 용해 조건은 총 RNA 가 FFPE 조직 절편에서 효과적으로 정제되게 해줍니다. DNase I 분해 단계에서는 고도로 단편화된 분자를 포함하여 DNA 오염을 효율적으로 제거합니다.

먼저, Deparaffinization Solution 으로 처리하여 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직 절편에서 모든 파라핀을 제거합니다. 다음으로, 프로테이나아제 K 를 함유한 최적화된 용해 완충액에서 검체를 배양하여 절편에서 RNA 를 방출시킵니다. 고온에서 이루어지는 짧은 배양은 방출된 핵산의 포르말린 가교 결합을 부분적으로 역전하여, RNA 수율과 품질을 향상할 뿐만 아니라 후속 효소 분석에서도 RNA 성능을 향상합니다. 그런 다음, 장기적 포르말린 응고 및/또는 장시간 보관 후 FFPE 검체에 흔히 존재하는 매우 작은 DNA 조각을 포함하여 유전체 DNA 를 제거하도록 최적화된 DNase I 처리가 이어집니다. 다음으로, 용해물을 Buffer RBC 와 혼합합니다. 에탄올을 추가하여 적절한 결합 조건을 RNA 에 제공한 후 검체를 RNeasy MinElute Spin Column 에 적용하면, 총 RNA 가 멤브레인에 결합하여 오염물질을 효율적으로 씻어낼 수 있습니다. 그런 다음 RNA 는 최소 14 μ l 의 RNase 를 제거한 물에서 용출됩니다.

RNeasy DSP FFPE 절차

포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직 절편

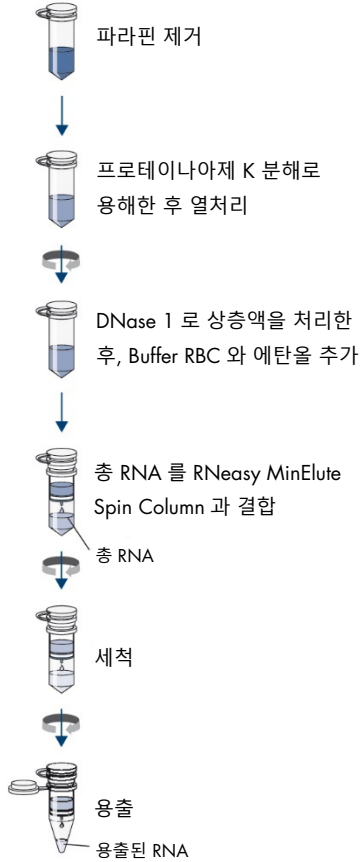


그림 1. RNeasy DSP FFPE Kit 를 사용하여 FFPE 조직에서 RNA 를 정제하는 절차.

제공 품목

키트 내용물

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
카탈로그 번호	73604
준비 수	50

	의미	기호	수량
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns(분홍색)(2ml 채집 튜브에 각각)	COL	50
ET	Elution Tubes(용출 튜브) (1.5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes(용해 튜브) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes(세척 튜브) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (프로테이나아제 K)	PROTK	1.25ml
DN	RNase-Free DNase I (RNase 를 제거한 DNase I) (냉동 건조)	DNase	1
RNFW	RNase 를 제거한 물	ELU DIL	3 x 1.5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE'(농축액)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	RNeasy DSP FFPE Kit 안내서		1

* 구아니딘염을 포함합니다. 표백제를 포함하는 소독제와 같이 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 11 페이지를 참조하십시오.

† 최초 사용 전에 병에 표시된 바와 같이 그리고 16 페이지에 설명된 대로 에탄올(96~100%, 비변성) 4 개 용량을 추가하여 작업 용액을 만듭니다.

키트 구성품

아래는 키트의 주요 구성품에 대한 설명입니다.

표 1. 활성 성분이 포함된 공급 시약

시약		구성품	용량
기호	이름		
DPS	Deparaffinization Solution	헥사데칸	≥90%~≤100%w/w
RBC	Buffer RBC	염산 구아니딘	≥30%~70%w/w
PKD	Buffer PKD	없음	-
PK	Proteinase K (프로테이나아제 K)	프로테이나아제 K	≥1%~<3%w/w
DN	RNase-Free DNase I (RNase 를 제거한 DNase I) (냉동 건조)	DNase	≥90%~≤100%w/w
RNFW	RNase 를 제거한 물	없음	-
DBB	DNase Booster Buffer	없음	-
RPE	Buffer RPE(농축액)	없음	-

RNA 분리 후 생성된 진단 결과에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 위험을 최소화하려면 후속 공정에 적절한 대조물질을 사용해야 합니다.

필요하지만 제공되지 않는 품목

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

제조업체의 권고 사항에 따라 기기를 점검하고 교정했는지 확인하십시오.

- RNase 를 제거한 멸균된 피펫 팁 및 피펫
- 마이크로 원심분리기(2ml 튜브용 로터 포함)
- 교반기
- 96~100% 에탄올(메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오.)
- 일회용 장갑
- 56°C 및 80°C 에서 배양 가능하며 셰이킹 기능이 있는 가열 블록

경고 및 예방조치

기기와 관련하여 발생한 중대한 사건을 제조업체 및/또는 사용자 및/또는 환자가 거주하는 국가의 규제 당국에 보고하는 데 있어 현지 규정을 따라야 할 수 있다는 점에 유의하십시오.


모든 완화 조치는 제품 개발의 이 단계에서 가능한 경우에 실시되었으며 체계적으로 검토되었습니다. 위험 관리에 기반하여 남은 잔류 위험은 허용 가능한 것으로 판단되며 기기 사용은 안전한 것으로 판단됩니다. RNeasy DSP FFPE Kit 에 대한 잔류 위험은 없습니다.

체외 진단용.

키트를 사용하기 전에 모든 지침을 주의 깊게 읽으십시오.

안전성 정보

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)는 www.qiagen.com/safety 에서 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

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

RNeasy DSP FFPE Kit의 완충액에는 아지드화 나트륨이 들어 있습니다. 키트의 완충액을 흘린 경우에는 적절한 실험실 세제 및 물로 닦아내십시오. 흘린 액체에 감염체가 포함될 가능성이 있으면 해당 부분을 우선 실험실 세제 및 물로 세척한 다음 1%(v/v)의 차아염소산 나트륨으로 세척하십시오.

응급 정보

CHEMTREC

미국 및 캐나다 1-800-424-9300

미국 및 캐나다 외 +1 703-527-3887

예방조치

다음과 같은 위험 및 예방조치 관련 설명이 RNeasy DSP FFPE Kit 구성품에 적용됩니다.

PKD, RPE, RNF, DBB

내용물: 아지드화 나트륨. 경고! 삼키면 해로울 수 있습니다. 불편함이 느껴지면 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오.

Deparaffinization Solution



내용물: 핵사데칸. 위험! 삼켜서 기도로 들어가면 치명적일 수 있습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 눈 자극을 일으킵니다. 호흡기 자극을 초래할 수 있습니다. 수중 생물에 장기적인 유해 영향을 초래할 수 있습니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 노출 또는 우려 시: 즉시 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 억지로 구토하려 하지 마십시오. 잠근 상태로 보관하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다.

Proteinase K



내용물: 프로테이나아제 K. 위험! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 흡입 시 알레르기나 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지/연기/가스/연무/증기/비말을 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 호흡기 보호구를 착용합니다. 노출 또는 우려 시: 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 신선한 공기가 있는 곳으로 사람을 옮기고 편히 호흡할 수 있는 상태를 유지하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다.

DNase I



내용물: DNase. 위험! 알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있습니다. 흡입 시 알레르기나 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지/연기/가스/연무/증기/비말을 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 호흡기 보호구를 착용합니다. 노출 또는 우려 시: 독성물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 신선한 공기가 있는 곳으로 사람을 옮기고 편히 호흡할 수 있는 상태를 유지하십시오.

Buffer RBC



내용물: 염산 구아니딘. 경고! 삼키거나 흡입하면 해롭습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 눈 자극을 일으킵니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

DNase Booster Buffer



경고! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

시약 보관 및 취급

RNase 를 제거한 DNase I 및 RNeasy MinElute Spin Columns 는 도착 즉시 2~8°C 에서 보관해야 합니다. 완충액은 실온(15~25°C)에서 보관할 수 있습니다. 이러한 조건에서 키트는 상자 라벨에 있는 만료일까지 성능 저하 없이 보관할 수 있습니다.

RNeasy DSP FFPE Kit 가 만료되었으면 사용하지 마십시오.

사용 안정성

키트는 첫 사용 후 10 개월 동안 또는 유효 날짜까지 사용할 수 있습니다.

키트 구성품

각 시약의 만료일은 개별 구성품 라벨에 표시되어 있습니다. 올바른 보관 조건에서, 동일한 배치의 구성품이 사용된다면 안정성 시간 동안 제품 성능이 유지됩니다.

재형성 후 DNase I 를 장기간 보관하려면 바이알에서 저장 용액을 빼서 일회용 분주로 나눠 최대 10 개월 동안 -15~-30°C 에서 보관하면 됩니다. 해동된 분주는 최대 8 주 동안 2~8°C 에서 보관할 수 있습니다. 해동 후 분주를 다시 냉동하지 마십시오.

시약을 자외선(예: 오염 제거용)에 노출하지 마십시오. 이러한 노출로 노화가 가속될 수 있기 때문입니다.

절차

시작 전 중요 사항

시재료

표준 FFPE 절차는 항상 핵산의 상당한 단편화와 가교 결합을 초래합니다. 핵산의 단편화와 가교 결합의 정도를 제한하려면 다음 사항을 확인하십시오.

- 조직 검체를 두께 5mm 미만으로 사용하여 포르말린이 완전히 침투할 수 있게 합니다.
- 수술적 제거 후 최대한 빨리 4~10%의 중성 완충 포르말린으로 조직 검체를 응고합니다.
- 24 시간의 최대 응고 시간을 사용합니다(응고 시간이 더 길어지면 과도한 응고와 보다 심한 핵산 단편화가 이루어져 다운스트림 분석에서 성능이 저하됨).
- 삽입하기 전에 검체를 철저히 건조합니다.
- 삽입을 위해 저융점 파라핀을 사용합니다.

RNA 정제를 위한 시재료는 각각 최대 20 μ m 두께로 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직에서 채취한 절편이어야 합니다. 더 두꺼운 절편은 프로테이나아제 K 를 사용한 장시간 배양 후에 핵산 수율이 낮아질 수 있습니다. 각각 최대 10 μ m 두께의 절편 최대 4 개를 준비 과정에서 결합할 수 있습니다. 절편 두께의 합이 40 μ m 이하인 경우에는 절편을 4 개 이상 결합할 수 있습니다(예: 5 μ m 두께의 절편 8 개).

특히 DNA 함량이 높은 조직의 경우에는 정제된 RNA 의 DNA 오염을 방지하기 위해 준비 과정당 절편을 더 적게 사용하는 것이 좋습니다.

시재료의 특성에 관한 정보가 없으면 준비 과정당 절편을 2 개 이하로 시작하는 것이 좋습니다. RNA 수율과 순도에 따라 후속 준비 과정에서 최대 4 개의 절편을 사용할 수 있습니다. 그러나 RNeasy MinElute Spin Column 이 과부하되면 RNA 수율과 품질이 현저하게 감소될 수 있습니다.

완충액 준비

DNase I 저장 용액 준비

550 μ l 의 RNase 를 제거한 물에 냉동건조된 DNase I 를 용해하여 DNase I 저장 용액을 준비합니다. DNase I 손실을 방지하려면 바이알을 열지 마십시오. RNase 를 제거한 바늘과 주사기를 사용하여 RNase 를 제거한 물을 바이알에 주입합니다. 바이알을 뒤집어서 부드럽게 혼합합니다. 볼텍싱하지 마십시오.

어떤 경우에는 DNase I 바이알이 비어 있는 것처럼 보일 수 있습니다. 이는 격벽에 붙어 있는 냉동건조된 효소 때문입니다. DNase I 손실을 방지하려면 바이알을 열지 마십시오. 대신, 아래에 설명된 대로 바늘과 주사기를 사용하여 DNase I 를 용해합니다.

참고: DNase I 는 특히 물리적 변성에 민감합니다. 혼합할 때는 바이알을 부드럽게 뒤집어서 해야 합니다.

참고: RNase 를 제거한 물의 전체 용량을 바이알에 주입해야 합니다.

DNase I 를 용해한 후에도 불용성 물질이 남아 있을 수 있습니다. 생산 프로세스 때문에 불용성 물질이 냉동건조된 DNase I 에 존재할 수 있습니다. 그렇더라도 DNase I 성능에는 영향을 미치지 않습니다.

DNase I 를 장기간 보관하려면 바이알에서 저장 용액을 빼서 일회용 분주로 나눠 최대 10 개월 동안 $-15\sim-30^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면 됩니다. 해동된 분주는 최대 8 주 동안 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서 보관할 수 있습니다. 해동 후 분주를 다시 냉동하지 마십시오.

Buffer RPE 준비

11ml 의 Buffer RPE 농축액이 들어 있는 병에 4 개 용량(44ml)의 에탄올(96~100%)을 추가합니다. 병 라벨의 체크박스에 체크하여 에탄올이 추가되었음을 표시하십시오.

참고: 절차를 시작하기 전에, 재형성된 Buffer RPE 를 흔들어 혼합하십시오.

시작하기 전 해야 할 일

- RNeasy DSP FFPE Kit 를 처음 사용하는 경우, "시작 전 중요 사항"(15 페이지)을 읽으십시오.
- RNA 를 사용하여 처음 작업하는 경우, "부록: RNA 취급에 관한 일반 사항"(30 페이지)을 읽으십시오.
- Buffer RBC 는 구아니딘염을 함유하고 있으므로 표백제가 포함된 소독 시약과 함께 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 11 페이지를 참조하십시오.
- 달리 명시되지 않는 한, 절차의 모든 단계는 실온(15°C~25°C)에서 수행합니다. 절차 도중에는 빠르게 작업하고 중간에 멈추지 마십시오.
- 15~25°C 에 있는 마이크로 원심분리기를 사용하여 모든 원심 분리 단계를 수행합니다. 냉장한 마이크로 원심분리기를 사용하는 경우에는 온도를 20~25°C 로 설정합니다. 그렇지 않으면 15°C 미만의 상당한 냉각이 발생할 수 있습니다.
- 아래 절차에서 ▲는 검체당 1~2 개의 절편을 처리하는 경우 사용할 용량을 나타내며 ●는 검체당 3~4 개의 절편을 처리하는 경우 사용할 용량을 나타냅니다.
- Buffer RPE 와 RNase 를 제거한 DNase I 를 처음 사용하는 경우, "완충액 준비"(16 페이지)에 설명된 대로 재구성하십시오.
- 모든 완충액이 실온(15~25°C)에 이르도록 합니다. 재구성된 Buffer RPE 를 흔들어 혼합합니다.
- 5 단계와 9 단계에서 사용할 열 혼합기를 56°C 로 설정합니다. 대기 시간을 줄이려면 9 단계에서 사용할 두 번째 열 혼합기를 80°C 로 설정합니다.
- 참고: 배양 시간을 늘리면 RNA 가 손실되거나 분해될 수 있으므로 정제 절차를 중간에 멈추지 마십시오. 최대 12 개 검체를 동시에 진행하는 평균 처리 시간은 약 130 분입니다.

프로토콜: 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 조직 절편에서 총 RNA 정제

1. 메스를 사용하여 검체 블록에서 여분의 파라핀을 잘라냅니다.
2. 절편을 5~20 μ m 두께로 자릅니다.
검체 표면이 공기에 노출된 경우에는 처음 2~3 개의 절편을 버립니다.
3. 즉시 절편을 ▲ 1.5 또는 ● 2ml 마이크로 원심분리기 튜브에 넣고 뚜껑을 닫습니다.
4. ▲ 160 또는 ■ 320 μ l Deparaffinization Solution 을 추가하고 10 초 동안 세계 보텍싱한 후, 잠시 원심분리하여 검체를 튜브 바닥으로 보냅니다.
5. 56°C 에서 3 분 동안 배양한 후 실온에서 5 분 동안 식힙니다.
Deparaffinization Solution 을 너무 적게 사용하는 경우 또는 너무 많은 파라핀이 검체와 함께 옮겨지는 경우, 냉각 후에 Deparaffinization Solution 이 왁스 같은 상태나 고체 상태가 될 수 있습니다. 이 경우에는 추가 Deparaffinization Solution 을 160 μ l 첨가하고 5 단계를 반복하십시오.
6. ▲ 150 또는 ● 240 μ l Buffer PKD 를 추가하고 3 초 동안 보텍싱하여 혼합합니다.
7. 1 분 동안 11000 $\times g$ 로 원심분리합니다.
8. 아래쪽 깨끗한 상에 10 μ l 의 프로테이나아제 K 를 추가하고 위아래로 부드럽게 10 회 피펫팅하여 혼합합니다(분리된 상을 섞지 마십시오).
9. 56°C 에서 15 분 동안 1100rpm 으로 배양한 후 80°C 에서 15 분 동안 1100rpm 으로 배양합니다.
가열 블록을 하나만 사용하는 경우, 56°C 배양 후 가열 블록이 80°C 에 도달할 때까지 검체를 실온에 둡니다.
참고: 프로테이나아제 K 에 의한 조직의 완전 분해는 최대 RNA 수율에 필요하지 않습니다. 그러나 80°C 배양 단계는 중요합니다.
중요: 15 분 배양을 시작하기 전에 가열 블록이 80°C 에 도달했는지 확인하십시오.
80°C 에서 15 분 동안 배양하는 것은 실시간 RT-PCR 등의 후속 공정에서 최적의 RNA 성능과 포름알데히드 가교의 역전에 중요합니다.

10. 간단히 원심분리하고 ▲ 145 또는 ● 230 μ l 의 아래쪽 무색 상을 새로운 1.5ml 마이크로 원심분리기 튜브로 옮깁니다.
11. 3 분 동안 얼음 위에서 배양한 후 20,000 \times g 에서 15 분 동안 원심분리합니다.
12. 펠릿을 방해하지 않도록 주의하면서, 상층액을 새로운 2ml 의 마이크로 원심분리기 튜브로 옮깁니다.
펠릿은 가교 DNA 를 포함한 불용성 조직 파편을 함유하고 있습니다.
13. 총 검체 용량(▲ 14.5 또는 ● 23 μ l) 및 10 μ l DNase I 저장 용액의 1/10 에 해당하는 DNase Booster Buffer 를 추가합니다. 튜브를 뒤집어서 혼합합니다. 간단히 원심 분리하여 튜브 측면에서 잔류액을 채취합니다.
참고: DNase I 는 냉동 건조된 상태로 제공되며 "DNase I 저장 용액 준비"(16 페이지)에 설명된 대로 재구성해야 합니다.
참고: DNase I 은 특히 변성에 민감합니다. 혼합할 때는 튜브를 부드럽게 뒤집어서 해야 합니다. 볼텍싱하지 마십시오.
14. 실온에서 15 분 동안 배양합니다.
15. ▲ 320 또는 ● 500 μ l Buffer RBC 를 추가하여 결합 조건을 조정합니다. 그리고 3 초 동안 볼텍싱하고 간단히 원심분리하여 용해물을 완전히 혼합합니다.
16. ▲ 720 μ l 또는 ■ 1200 μ l 에탄올(96~100%)을 검체에 추가합니다. 원심 분리하지 마십시오. 즉시 17 단계로 진행합니다.
에탄올 추가 후 침전물이 보일 수 있습니다. 그렇더라도 이 절차에는 영향을 미치지 않습니다.
17. 위아래로 5 회 피펫팅하여 잘 혼합하고, 형성된 침전물을 포함하여 700 μ l 의 검체를 2ml 채집 튜브에 있는 RNeasy MinElute Spin Column 으로 옮깁니다. 뚜껑을 부드럽게 닫고 8,000 \times g 이상에서 15 초 동안 원심분리합니다. 통과액 *이 있는 채집 튜브를 버리고 컬럼을 새 채집 튜브(제공됨)에 넣습니다.

* 통과액에는 Buffer RBC 가 함유되어 있으므로 표백제와 함께 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 8 페이지를 참조하십시오.

18. 전체 검체가 RNeasy MinElute Spin Column 을 통과할 때까지 17 단계를 반복합니다(추가 혼합 없음).
19. 500 μ l 의 Buffer RPE 를 RNeasy MinElute Spin Column 에 추가합니다. 뚜껑을 부드럽게 닫고 8,000 \times g 이상에서 15 초 동안 원심분리합니다. 통과액*이 있는 채집 튜브를 버리고 컬럼을 새 채집 튜브(제공됨)에 넣습니다.
- 참고: Buffer RPE 는 농축액으로 공급됩니다. "Buffer RPE 준비"에 설명된 대로 사용하기 전에 에탄올을 추가해야 합니다.
20. 500 μ l 의 Buffer RPE 를 RNeasy MinElute Spin Column 에 추가합니다. 뚜껑을 부드럽게 닫고 \geq 8,000 \times g 이상에서 2 분 동안 원심분리하여 스피ن 컬럼 멤브레인을 세척합니다. 통과액 *이 있는 채집 튜브를 버리고 컬럼을 새 채집 튜브(제공됨)에 넣습니다.
- 참고: 원심 분리 후 컬럼이 통과액에 접촉되지 않도록 채집 튜브에서 RNeasy MinElute Spin Column 을 조심스럽게 제거합니다. 그렇지 않으면 에탄올 캐리오버가 발생합니다.
21. 스피ن 컬럼의 뚜껑을 열고 최고 속도로 5 분 동안 원심분리합니다. 통과액이 든 채집 튜브를 폐기합니다.
- 뚜껑 손상을 방지하기 위해 컬럼 사이에 적어도 하나의 빈 위치가 있도록 하여 스피ن 컬럼을 원심분리기에 넣습니다. 뚜껑이 로터의 회전 방향과 반대 방향으로 향하게 합니다(예: 로터가 시계 방향으로 회전하면 뚜껑을 시계 반대 방향에 맞춤).
- 잔류 에탄올이 후속 반응을 방해할 수 있기 때문에 스피ن 컬럼 멤브레인을 건조하는 것이 중요합니다. 뚜껑을 연 상태로 원심 분리하면 RNA 용출 과정에서 에탄올이 함께 옮겨지지 않습니다.
22. RNeasy MinElute Spin Column 을 새로운 1.5ml 채집 튜브(제공됨)에 넣습니다. 14~32 μ l 의 RNase 를 제거한 물을 스피ن 컬럼 멤브레인 중심에 직접 추가합니다. 뚜껑을 부드럽게 닫고 최고 속도로 1 분 동안 원심분리하여 RNA 를 용출합니다.
- 더 적은 양의 RNase 를 제거한 물로 용출하면 총 RNA 농도는 더 높아지지만 RNA 수율은 더 낮아집니다.

* 통과액에는 Buffer RBC 가 함유되어 있으므로 표백제와 함께 사용할 수 없습니다. 안전성 정보는 8 페이지를 참조하십시오.

참고: 낮은 RNA 수율이 예상되는 경우, 용출을 위해 Low Bind 튜브를 사용하는 것이 좋습니다(제공되지 않음). RNeasy MinElute Spin Column 의 평균 불용 용량은 2 μ l 입니다. 14 μ l 의 RNase 를 제거한 물로 용출하면 약 12 μ l 의 용출액이 나옵니다.

23. RNA 용출액은 $-60\sim-90^{\circ}\text{C}$ 또는 $-15\sim-30^{\circ}\text{C}$ 에서 최대 12 주 동안 보관할 수 있습니다.

참고: 용출액 안정성은 분리된 RNA 의 함량과 유형, 용출량, 보관 조건에 따라 다릅니다. 사용자가 특정 요건의 필요에 따라 용출액 안정성을 확립할 것을 권장합니다.

품질 관리

QIAGEN의 ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라, RNeasy DSP FFPE Kit의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 대해 검사됩니다.

제한

시스템 성능은 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 검체에서 인간 RNA를 정제하는 성능 평가 연구를 통해 입증되었습니다.

QIAGEN 성능 평가 연구에서 다루지 않은, 사용자 실험실에서 사용된 절차에 대한 시스템 성능을 검증하는 것은 사용자의 책임입니다.

진단 결과에 부정적 영향을 미칠 위험을 최소화하려면 후속 공정에 대한 적절한 관리가 이루어져야 합니다.

생성된 진단 결과는 다른 임상 소견이나 검사 결과와 함께 해석해야 합니다.

성능 특징

해당 성능 특징은 www.qiagen.com의 제품 페이지 리소스 탭에서 확인할 수 있습니다.

폐기

폐기물에는 검체와 시약이 포함됩니다. 이 폐기물은 독성 또는 감염 물질을 함유할 수 있으며 적절하게 폐기해야 합니다. 적절한 폐기 절차는 현지 안전 규정을 참조하십시오.

자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)는 www.qiagen.com/safety 에서 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 더 자세한 정보는 또한 당사 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문(Frequently Asked Questions, FAQ) 페이지를 참조하십시오. www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN 기술 서비스 소속 과학자들은 본 안내서의 정보 및/또는 프로토콜 또는 검체 및 분석 기술에 대해 가질 수 있는 어떠한 질문이든 기꺼이 답변해 드립니다(연락처 정보는 www.qiagen.com 을 방문하십시오).

의견 및 제안

RNeasy MinElute Spin Column 막힘 현상

- | | |
|-------------------|---|
| a) 시재료가 너무 많음 | 시재료의 양을 줄이십시오. 정확한 양의 시재료를 사용해야 합니다(15 페이지 참조). |
| b) 원심분리 온도가 너무 낮음 | 원심 분리 온도는 15~25°C 여야 합니다. 일부 원심분리기는 20°C 로 설정한 경우에도 15°C 아래로 냉각될 수 있습니다. 이렇게 되면 RNeasy MinElute Spin Column 을 막는 침전물이 형성될 수 있습니다. 이 현상이 발생하면 원심 분리 온도를 25°C 로 설정하십시오. |

낮은 RNA 수율

- | | |
|---------------|--|
| a) 시재료 품질이 나쁨 | 24 시간 이상 응고되거나 매우 오래 보관한 검체에는 사용 가능한 RNA 가 거의 없을 수도 있습니다.
현미경 슬라이드에 장착된 절편은 장시간 공기에 노출되어 사용 가능한 RNA 가 거의 나오지 않을 수 있습니다. |
| b) 시재료가 너무 많음 | RNeasy MinElute Spin Column 이 과부하되면 핵산 수율이 크게 감소합니다. 시재료의 양을 줄이십시오(15 페이지 참조). |

의견 및 제안

- | | | |
|----|---|--|
| c) | RNA 가 여전히 RNeasy MinElute Spin Column 멤브레인에 붙어 있음 | RNA 용출을 반복하되, 원심 분리 전에 RNFW 를 사용하여 10 분 동안 실험대에서 RNeasy Min Elute 스피ن 컬럼을 배양하십시오. |
| d) | 완충액/시약의 잘못된 보관 | RNeasy MinElute Spin Columns 뿐만 아니라 DNase I 도 키트 도착 시 2~8°C 에서 보관해야 합니다. 더 높은 온도에 더 긴 시간 동안 노출되면 기능이 저하될 수 있으므로 올바른 보관 온도를 확인하십시오. |

낮은 A_{260}/A_{280} 값

A_{260}/A_{280} 측정을 위해 핵산 희석에 사용되는 물	순도 측정 전에 10mM Tris Cl, pH 7.5(물 아님)를 사용하여 물을 희석하십시오.
--	--

후속 실험에서의 DNA 오염

- | | | |
|----|-----------------------|---|
| a) | 시재료가 너무 많음 | 일부 조직 유형의 경우, 매우 많은 양을 처리할 때 DNA 제거 효율이 감소될 수 있습니다. 용출된 RNA 에 상당한 DNA 오염이 포함되어 있는 경우에는 준비 과정당 더 적은 수의 조직 절편을 처리하십시오. |
| b) | 조직의 DNA 함량이 높음 | DNA 에 있는 매우 많은 양의 조직(예: 흉선)을 처리하면 DNA 가 완전히 분해되지 않을 수 있습니다. 조직 절편을 더 적게 사용하여 정제 절차를 반복하십시오.

"시약 보관 및 취급"과 "DNase I 저장 용액 준비"에 설명된 대로 DNase I 이 올바르게 보관되었는지 확인하십시오. |
| c) | 불충분한 양의 RNA 를 사용한 역전사 | 대부분의 역전사 효소는 약 1µg 의 RNA 와 함께 사용하기 위한 것입니다. 매우 적은 양의 RNA 로 역전사를 수행하는 경우, 매우 민감한 역전사를 위해 특별히 만들어진 역전사 효소를 사용하는 것이 좋습니다. |

의견 및 제안

RNA 가 다운스트림 분석/공정에서 제대로 기능하지 못함

- a) 포르말데히드 변형 때문에 RNA 가 단편화되거나 막힘
- RNeasy DSP FFPE 절차에서 80°C 배양은 역전사 및 기타 효소적 후속 공정에서 최적의 RNA 성능을 위해 중요합니다. 전체 15 분의 배양 시간 동안 배양 온도가 80°C 로 유지되는지 확인하십시오.
- 80°C 배양으로 포르말데히드 변형의 일부가 제거되기는 하지만, 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 절편에서 정제된 RNA 가 효소 반응을 위한 최적의 모형은 아닙니다. cDNA 합성에는 무작위 프라이머 또는 유전자 특이적 프라이머만 사용하는 것이 좋습니다. 또한 앰플리콘은 PCR 에 대해 최대한 짧게 유지하는 것이 좋습니다(500 뉴클레오티드 미만).
- b) 에탄올 캐리오버
- Buffer RPE 로 두 번째 세척하는 동안 8000 x g 이상에서 2 분 동안 15~25°C 로 원심분리하여 RNeasy MinElute Spin Column 멤브레인을 건조합니다. 원심 분리 후 컬럼이 통과액에 접촉되지 않도록 채집 튜브에서 컬럼을 조심스럽게 제거합니다. 그런 다음, 컬럼을 새 채집 튜브에 넣고 최고 속도로 5 분 동안 원심분리합니다.
- c) RNA 용출 과정의 염분 캐리오버
- 정확한 용량의 에탄올을 추가하여 Buffer RPE 를 재형성하고 완충액을 실온(15~25°C)에 둡니다.
- d) 불충분한 양의 RNA 를 사용한 역전사
- 대부분의 역전사 효소는 약 1µg 의 RNA 와 함께 사용하기 위한 것입니다. 매우 적은 양의 RNA 로 역전사를 수행하는 경우, 매우 민감한 역전사를 위해 특별히 만들어진 역전사 효소를 사용하는 것이 좋습니다.

기호

사용 설명서 또는 포장물 및 라벨에 다음과 같은 기호가 표시됩니다.

기호	기호 정의
 <N>	<N>회 반응에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	이 제품은 체외 진단 의료 기기에 대한 유럽 규정 2017/746 의 요구 사항을 충족합니다.
	체외 진단용 의료 기기
	도착 시
	DN
	RNeasy MinElute 스피ن
	카탈로그 번호
	로트 번호
	품목 번호(즉, 구성품 라벨링)
	구성품(즉 내용물 목록)
	내용물
	번호(즉, 바이알, 병)

기호

기호 정의

	국제 거래 단위 번호
Rn	R 은 사용 설명서(안내서)의 개정 버전을 나타내며, n 은 개정 번호입니다.
	온도 제한
	제조업체
	사용 설명서 참조
	주의
	프로테이나아제 K
	아지드화 나트륨
	의료기기 고유식별코드

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 www.qiagen.com/Support 에서 기술 지원 센터를 참조하여 00800-22-44-6000 으로 전화하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체에 연락하십시오(뒷 표지를 참조하거나 www.qiagen.com 을 방문하시기 바랍니다).

부록: RNA 취급에 관한 일반 사항

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 파괴할 수 있으므로 플라스틱 용기나 유리 용기를 사용하기 전에 반드시 RNase 오염을 제거해야 합니다. 정제 절차 중에 또는 그 후에 RNA 검체에 RNase 를 실수로 넣지 않도록 매우 주의해야 합니다. RNase 가 없는 환경을 조성하고 유지하려면 RNA 로 작업하면서 일회용 및 비일회용 용기와 용액을 전처리하고 사용하는 동안 다음 주의사항을 준수해야 합니다.

일반 취급

RNA 를 사용하여 작업을 수행할 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 단아 두십시오. 후속 공정을 위해 분주를 피펫팅할 때는 정제된 RNA 를 얼음 위에 두십시오.

벤치 표면, 비일회용 플라스틱 용기 및 실험실 장비(예: 피펫 및 전기영동 탱크)에서 RNase 오염을 제거하려면 Ambion®의 RNaseZap®(카탈로그 번호 AM9780)을 사용하는 것이 좋습니다. 또는 일반 실험실 시약을 사용하여 RNase 오염을 제거할 수 있습니다. 플라스틱 용기의 오염을 제거하려면 0.1 M NaOH, 1mM EDTA 로 씻은 후에 RNase 를 제거한 물로 씻거나(32 페이지, "용액" 참조), 플라스틱 용기가 클로로포름 내성이 있으면 클로로포름으로 씻으십시오. 전기영동 탱크의 오염을 제거하려면 세제(예: 0.5% SDS)로 닦고 RNase 를 제거한 물로 씻은 후 에탄올로 씻고(탱크가 에탄올 내성이 있는 경우) 건조하십시오.

일회용 플라스틱 용기

절차 전반에 걸쳐 멸균된 일회용 폴리프로필렌 튜브를 사용하는 것이 좋습니다. 이 튜브는 일반적으로 RNase 가 없으며, RNase 를 비활성화하기 위해 전처리가 필요하지 않습니다.

유리 용기

유리 용기는 RNase 가 없도록 사용하기 전에 처리해야 합니다. RNA 작업에 사용되는 유리 용기는 사용하기 전에 세제로 닦은 후 철저히 헹구고 오븐에 넣어 240°C 에서 4 시간 이상(괜찮다면 밤새) 두어야 합니다. 고압 멸균만으로는 많은 RNase 가 완전히 비활성화되지 않습니다. 아니면 유리 용기를 아래 "용액"에 설명된 대로 DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 사용하여 처리해도 됩니다.

용액

용액(물 및 기타 용액)은 0.1% DEPC 로 처리해야 합니다. DEPC 는 강력하지만 절대적이지는 않은 RNase 억제제입니다. 유리 용기나 플라스틱 용기에서 RNase 를 비활성화하거나 RNase 를 제거한 용액과 물을 만드는 데 일반적으로 0.1% 농도를 사용합니다. DEPC 는 공유 변이로 RNase 를 비활성화합니다. 0.1ml 의 DEPC 를 처리할 용액 100ml 에 추가하고 세계 흔들어서 DEPC 를 용액에 섞습니다. 용액을 37°C 에서 12 시간 동안 배양합니다. 미량의 DEPC 를 제거하려면 15 분 동안 오토클레이브합니다. DEPC 는 일차 아민과 반응하며, Tris 완충액을 처리하는 데 직접 사용해서는 안 됩니다. DEPC 는 트리스 완충액이 있을 때 매우 불안정하며, 에탄올 및 CO₂ 로 빠르게 분해됩니다. Tris 완충액을 준비할 때는 먼저 DEPC 로 물을 처리한 후 Tris 를 용해하여 적절한 완충액을 만드십시오. 미량의 DEPC 는 에톡시카르보닐화에 의해 RNA 에서 푸린 잔류물을 변형시키게 됩니다. 에톡시카르보닐화된 RNA 는 무세포 시스템에서 매우 낮은 효율을 의미합니다. 그러나 푸린 잔류물의 많은 부분이 변형된 경우를 제외하고는, DNA:RNA 또는 RNA:RNA 혼성을 형성하는 기능은 심각한 영향을 받지 않습니다. 잔류 DEPC 는 항상 15 분 동안 고압 멸균하거나 100°C 로 가열하여 용액이나 용기에서 제거해야 합니다.

참고: RNeasy 완충액은 DEPC 처리 없이 RNase 가 없는 상태를 보장하므로 어떠한 DEPC 오염도 없습니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, 용출 튜브, 세척 튜브, 용해 튜브, RNase를 제거한 시약 및 완충액	73604

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.

문서 개정 이력

개정판

설명

R1, 2022년 6월

IVDR 준수를 위해 키트 버전 2로 업데이트
키트 버전 1과 비교하여 프로토콜 또는 성능 변화 없음
경고 및 예방조치 업데이트(잔류 위험, 응급 정보 추가)
폐기 섹션 추가

RNeasy DSP FFPE Kit 에 대한 제한된 라이선스 계약

본 제품을 사용함으로써 다음 품목에 대한 모든 제품 구입자 또는 제품 사용자의 협약을 준수합니다.

1. 이 제품은 오로지 제품과 함께 제공된 프로토콜과 이 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 제공된 추가 프로토콜에서 설명한 경우를 제외하고 지적 재산권에 따라 본 키트에 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.
1. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN 은 본 키트 및/또는 본 키트의 사용이 제 3 자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
2. 본 키트 및 해당 구성품은 일회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
3. QIAGEN 은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
4. 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 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 업데이트는 www.qiagen.com 을 참조하십시오.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy®(QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap®(Thermo Fisher Scientific 또는 그 자회사). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

06/2022 HB-3027-001 1127532KO © 2022 QIAGEN, 모든 권한 보유.

