PreAnalytiX
A QIAGEN / BD Company

2023년 2월

PAXgene® Blood RNA Kit(안내서) 사용 설명서

Σ 50

버전 3(V3)

IVD

체외 진단용

CE

REF 762174

PreAnalytiX® GmbH
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, 스위스

PreAnalytiX GmbH 를 위해 QIAGEN® GmbH 가 생산함

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

R2 MAT 1130774KO

등록 상표: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH)

QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®(QIAGEN 그룹)
BD™, BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™(Becton Dickinson and Company).
Eppendorf®(Eppendorf AG)

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. 달리 언급된 경우를 제외하고 PreAnalytiX, PreAnalytiX 로고 및 기타 모든 상표는 PreAnalytiX GmbH(Hombrechtikon, CH)의 자산입니다.

PAXgene Blood RNA Kit 에 대한 제한적 라이선스 계약

제품의 구매자 또는 사용자는 본 제품을 사용함으로써 다음 조건에 동의하게 됩니다.

1. 이 제품은 오직 제품과 함께 제공된 프로토콜과 이 안내서에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품만 함께 사용할 수 있습니다. PreAnalytiX®는 제품과 함께 제공된 프로토콜, 이 안내서, **www.qiagen.com** 및 **www.preanalytix.com** 에서 제공하는 추가 프로토콜에 기술된 경우를 제외하고, 해당 지적 재산권에 따라 본 패널에 포함된 구성품을 본 패널에 포함되지 않은 구성품과 통합하거나 사용하도록 라이선스를 부여하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 PreAnalytiX 는 본 키트 및/또는 본 키트의 사용이 제삼자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 본 키트는 1회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. PreAnalytiX 는 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시적 또는 묵시적으로 다른 라이선스를 명확히 부인합니다.
5. 키트 구입자 및 사용자는 위에서 금한 행위를 유도하거나 촉진할 수 있는 단계를 취하거나 이를 허용하지 않는 데 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.

업데이트된 라이선스 조항은 **www.qiagen.com** 및 **www.preanalytix.com** 에서 확인할 수 있습니다.

HB-3009-002 BD-8945 1130774KO © 2023 PreAnalytiX GmbH, 모든 권한 보유.

PreAnalytiX 유통업체

PreAnalytiX 제품은 PreAnalytiX 를 위해 QIAGEN 또는 BD 에서 생산하고 유통합니다.

목차

목차 3

용도 6

대상 사용자 6

설명 및 원리 7

- 소개 7
- 원리 및 절차 7
- 검체 수집 및 안정화 8
- RNA 분리 8
- 수동 RNA 분리 9
- 자동 RNA 분리 11

제공물 14

- 키트 내용물 14
- 키트 구성품 15

필요하지만 제공되지 않는 품목 16

- 모든 프로토콜의 경우 16
- 수동 프로토콜 17
- 자동 프로토콜의 경우 17

경고 및 사전 주의사항 19

- 안전성 정보 19
- 비상 정보 19
- 예방조치 20

시약 보관 및 취급 23

사용 중 안정성 23
검체 수집, 보관, 취급 24
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes 에 수집된 인간 전혈의 총 RNA 수동 분리 25
프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 인간 전혈의 총 RNA 자동 분리 33
제품의 사용상의 제한 41
정도 관리 41
성능 특징 42
검체 수집 및 안정화 42
수동 RNA 분리 47
자동 RNA 분리 56
분리된 RNA 의 안정성 59
중요 참고사항 60
QIAcube Connect MDx 사용 60
QIAcube Connect MDx 시작 60
QIAcube Connect MDx 에 프로토콜 설치하기 62
QIAcube Connect MDx 로딩 63
스핀 컬럼(PSC, PRC), MCT, QIAcube Connect MDx 플라스틱 용기 66
폐기 72
참고 문헌 73
문제 해결 가이드 74
기호 76
연락처 정보 78
부록 A: RNA 취급에 관한 일반적인 설명 79
부록 B: 총 RNA 의 정량화 및 품질 측정 80

부록 C: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 취급 82
주문 정보 84
문서 개정 이력 86

용도

체외 진단용입니다.

PAXgene Blood RNA System 은 채집 튜브(PAXgene Blood RNA Tube, BRT)와 핵산 정제 키(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 특징을 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.

대상 사용자

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

이 키트는 전문가용입니다.

설명 및 원리

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 1000배 이상 변경될 수 있는 것으로 나타났습니다(Rainen et al., 2002). 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 분리하는 프로토콜과 함께 사람의 전혈 검체를 수집, 안정화, 보관 및 운송할 수 있는 시스템을 개발했습니다. 이 시스템에서는 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 사용하여 채혈 및 RNA 안정화를 수행한 후 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 수동 또는 자동으로 RNA 를 분리해야 합니다. 수동 및 자동 프로토콜은 모두 RNA 품질 및 수율에서 성능이 실질적으로 동일합니다. 수동 프로토콜(47페이지부터 시작) 및 자동 프로토콜(56페이지부터 시작)의 성능 데이터가 이 안내서에 게재되어 있습니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하면 ISO 20186-1:2019, 분자 체외 진단 검사 — 정맥 전혈에 대한 사전 검사 프로세스 사양 — 1부에 따라 혈액 검체 수집에서 세포 RNA 분리에 이르는 사전 분석 워크플로 단계를 표준화할 수 있습니다. 분리된 세포 RNA.

검체 수집 및 안정화

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에는 특허에 등록된 RNA 안정화 시약이 포함되어 있습니다. 이 첨가물은 RNA 분자가 RNase 에 의해 분해되지 않도록 보호하며 유전자 발현의 생체 외 변화를 최소화합니다. PAXgene Blood RNA System 의 성능 특징은 FOS 및 IL1B 유전자 전사체에 대해서만 결정했고 42페이지부터 확인할 수 있습니다.

RNA 분리

PAXgene Blood RNA Kit 는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 2.5mL 의 사람 전혈에서 총 RNA 를 분리하는 제품입니다. 절차는 간단하며, 수동이나 자동 절차로 수행할 수 있습니다(10 또는 12페이지, 그림 1 또는 그림 3 각각 참조). 두 프로토콜 모두 분리는 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)의 핵산을 펠렛 상태로 만드는 원심분리 단계에서부터 시작합니다. 펠렛을 세척하고 재현탁한 후에 수동 또는 자동 RNA 분리 작업을 수행합니다. 원칙적으로 두 프로토콜 모두 동일한 키트 구성품으로 동일한 프로토콜 단계에 따라 수행합니다.

수동 RNA 분리

구체적으로, 재현탁한 펠렛을 최적화한 완충액에서 단백분해효소 K(PK)와 함께 배양하여 단백질 소화를 유발합니다. PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC)을 통해 추가 원심분리를 수행하여 세포 용해물을 균질화하고 잔류하는 세포 찌꺼기를 제거한 후에 통과액(flow-through) 분획의 상층액을 사용하지 않은 마이크로 원심분리기 튜브(MCT)에 옮깁니다. 에탄올을 추가하여 결합 조건을 조절하고 용해물을 PAXgene RNA 스핀 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 사용한 수동 RNA 분리의 성능 특징은 47페이지에서 확인할 수 있습니다.

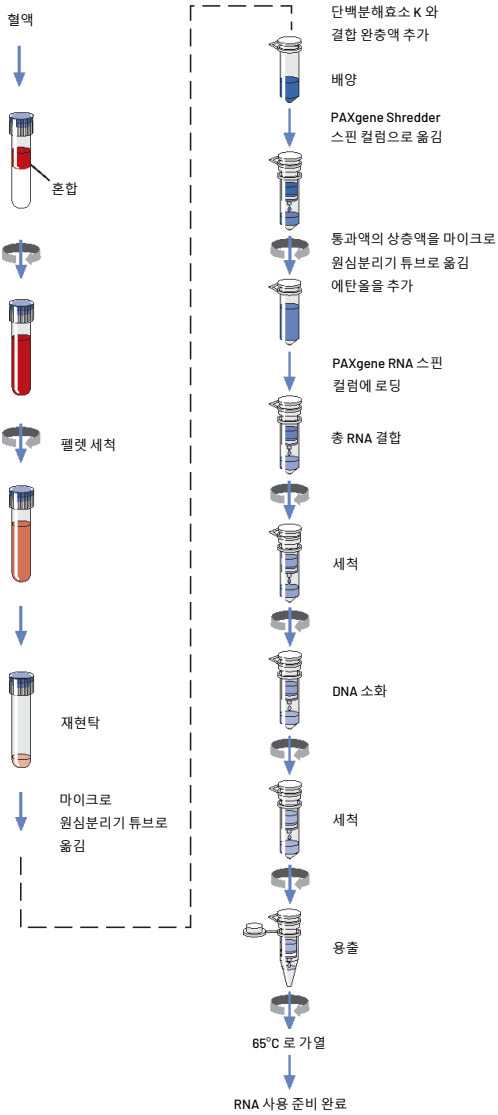


그림 1: 수동 PAXgene Blood RNA 절차.

자동 RNA 분리

혈액 RNA 의 분리는 QIAGEN QIAcube Connect MDx 에서 자동화됩니다. 이 혁신적인 기기는 고급 기술을 사용하여 QIAGEN 스핀 컬럼을 처리하므로, 적은 처리량의 자동 검체 준비를 실험실 작업 흐름에 매끄럽게 통합할 수 있습니다. QIAcube Connect MDx 를 사용한 검체 준비는 수동 절차(즉, 용해, 결합, 세척, 용출)와 동일한 단계를 따르며, 동일한 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용해 수행할 수 있습니다.

그림 2: QIAcube Connect MDx.

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

자동 RNA 분리 프로토콜은 2개의 파트(또는 프로토콜), 즉 'PAXgene Blood RNA Part A'(용출할 PAXgene Blood RNA Tube 내 혈액으로부터) 및 'PAXgene Blood RNA Part B'(RNA 사용 준비 완료 용출 이후) 그리고 2개의 파트 사이의 간단한 수동 개입으로 구성되어 있습니다(그림 3 참조).

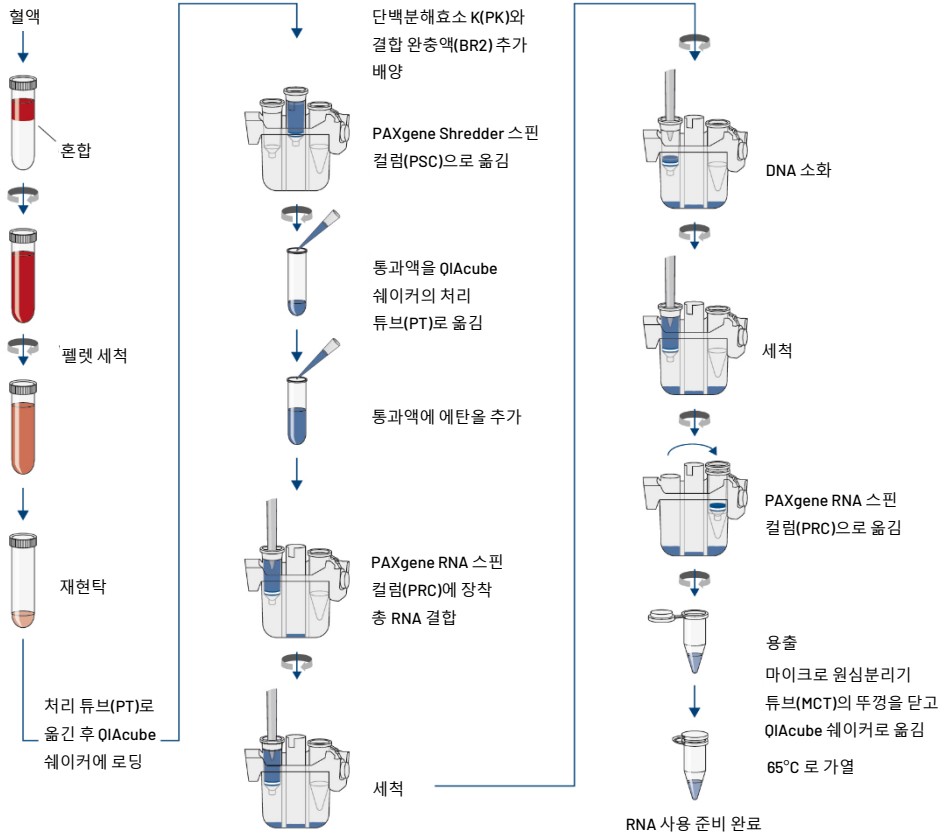


그림 3: 자동 PAXgene Blood RNA 절차.

원심분리하고, 세척하고 재현탁한 핵산 펠렛('RNA 분리', 8페이지 참조)을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에서 처리 튜브(Processing Tube, PT)로 옮긴 후 튜브를 QIAcube Connect MDx 작업대의 열 쉐이커에 넣습니다. 작업자가 메뉴에서 "PAXgene Blood RNA Part A" 프로토콜을 선택하고 시작합니다. QIAcube Connect MDx 가 용출 완충액(BR5)의 RNA 용출까지의 프로토콜 단계를 수행합니다. 작업자가 정제된 RNA 가 든 MCT 내용물을 QIAcube Connect MDx 의 열 쉐이커 장치로 옮깁니다. 작업자가 메뉴에서 "PAXgene Blood RNA Part B" 프로토콜을 선택하고 시작하면, QIAcube Connect MDx 가 열 변성을 수행합니다. QIAcube Connect MDx 의 PAXgene Blood RNA System 을 사용한 자동 RNA 분리의 성능 특징은 56페이지에서 확인할 수 있습니다.

제공물

키트 내용물

PAXgene Blood RNA Kit 카탈로그 번호 수집 장치 수			(50) 762174 50
구성품 이름	**설명**	**기호**	**수량**
BR1	Resuspension Buffer(재현탁 완충액)	RES BUF	20mL
BR2	Binding Buffer(결합 완충액)*	BIND BUF	18mL
BR3	Wash Buffer 1(세척 완충액 1)*	WASH BUF 1	45mL
BR4	세척 완충액 2(농축액)†	WASH BUF 2 CONC	11mL
BR5	Elution Buffer(용출 완충액)	ELU BUF	6mL
RNFW	RNase-free Water(bottle)(RNase 불포함수(병))	PEL WASH	125mL 2개
PK	Proteinase K(green lid)(단백분해효소(녹색 뚜껑))	PROTK	1.4mL 2개
PRC	PAXgene RNA Spin Columns(red)(PAXgene RNA 스핀 컬럼(적색))‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes(처리 튜브)(2mL)§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures(보조 BD Hemogard 마개)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes(마이크로 원심분리기 튜브)(1.5mL)§	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	2mL 2개
DRB	Dnase Resuspension Buffer(tube, lilac lid)(DNase 재현탁 완충액(튜브, 연보라색 뚜껑))	DNase RES BUF	2mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns(lilac)(PAXgene Shredder 스핀 컬럼(연보라색))‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
안내서	PAXgene Blood RNA Kit 안내서(버전 3)		1

* 표백제를 함유한 소독제와 함께 사용할 수 없습니다. 구아니딘염을 함유하고 있습니다. 안전성 정보는 19페이지를 참조하십시오.

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

‡ 각 컬럼에 일회용 블리스터가 동봉되어 있습니다. 폐기 안내는 안전성 정보를 참고하십시오.

§ 튜브는 비닐 봉지에 담아 제공해 드리며 각 튜브는 일회용입니다. 폐기 안내는 안전성 정보를 참고하십시오.

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

키트 구성품

구성품 이름	설명	활성 성분	농도
BR1	Resuspension Buffer(재현탁 완충액)	없음	-
BR2	Binding Buffer(결합 완충액)	구아니딘 티오시아네이트	≥30~<50% w/w
BR3	Wash Buffer 1(세척 완충액 1)	구아니딘 티오시아네이트 에탄올	≥10~<20% w/w ≥3~<10% w/w
BR4	Wash Buffer 2(세척 완충액 2)(농축액)	없음	-
BR5	Elution Buffer(용출 완충액)	없음	-
RNFW	RNase-free Water(bottle)(RNase 불포함수(병))	없음	-
PK	Proteinase K(green lid)(단백분해효소(녹색 뚜껑))	Proteinase K	≥1~<3% w/w
RNFD	DNase I, RNase-free(lyophilized)(DNase I, RNase 불포함(동결 건조))	DNase	≥90~≤100% w/w
RDD	DNA Digestion Buffer(white lid)(DNA 소화 완충액(흰색 뚜껑))	없음	-
DRB	DNase Resuspension Buffer(tube, lilac lid)(DNase 재현탁 완충액(튜브, 연보라색 뚜껑))	없음	-

필요하지만 제공되지 않는 품목

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

모든 프로토콜의 경우

- PAXgene Blood RNA Tubes(BRT, PreAnalytiX; 카탈로그 번호 762165)
- 에탄올(96~100%, v/v, 순도 등급 p.a.)
- 피펫*(10µL~4mL)
- 멸균 상태의 에어로졸 장벽 RNase 불포함 피펫 팁†
- 메스실린더‡
- 속도 성능이 3000~5000 × *g* 이고 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)가 들어가는 스윙 버켓 로터가 장착된 원심분리기*
- 볼텍스 믹서*
- 부순 얼음
- 라벨 작성용 유성펜

* 제조업체 권장 사항에 따라 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.
† RNA 취급에 관한 가이드라인(부록 A, 75 페이지)을 반드시 숙지하십시오.
‡ 완충액 BR4 농축액에 에탄올을 추가할 때 사용.

수동 프로토콜

- 2mL MCT 용 로터가 장착되어 있고, 더 낮거나 높은 관성력(*g* forces)을 적용할 수는 있지만(자세한 내용은 프로토콜 단계 참조) 최소한 1000~8000 × *g* 범위에 도달할 수 있는 가변 속도의 마이크로 원심분리기*
- 55°C 및 65°C 에서 배양할 수 있고 ≥400rpm 및 1400rpm 이하로 교반할 수 있는 쉐이커-배양기*(예: Eppendorf® Thermomixer Compact 또는 이와 동등한 장치)

자동 프로토콜의 경우

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

QIAcube Connect MDx 소모품:

- Filter-Tips, 1000 µL (1024)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24)(QIAGEN, 카탈로그 번호 990394)†

QIAcube Connect MDx 부속품:

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

* 제조업체 권장 사항에 따라 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.
† 또한 Starter Pack, QIAcube(QIAGEN, 카탈로그 번호 990395)에도 포함되어 있음.

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)

경고 및 사전 주의사항

유럽 연합 고객의 경우 기기와 관련하여 발생한 모든 중대한 사건을 제조업체와 사용자 및/또는 환자가 거주하는 회원국의 규제 당국에 보고해야 한다는 점에 유의하십시오.

유럽 연합 외 고객의 경우, 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.

안전성 정보

화학 물질 및 생물학적 유해물질로 작업할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 해당 정보는 편리하고 용량이 작은 PDF 형식으로 **www.qiagen.com/safety** 에서 온라인으로 제공되며, 해당 페이지에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 검색하여 보고 인쇄할 수 있습니다.

- 모든 화학 물질과 생물학적 물질은 잠재적으로 위험합니다. 혈액 시료 및 검체는 감염 가능성이 있으며 생물학적 유해물질로 취급해야 합니다.
- 생물학적 유해 폐기물 및 키트 폐기물은 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.

비상 정보

CHEMTREC
미국 및 캐나다 외부: +1 703-527-3887

예방조치

혈액으로 작업할 때는 혈액 매개 병원체(예: HIV, B 형 간염 및 기타 혈액 매개 바이러스)에 대한 잠재적 노출 위험을 피하기 위해 보편적 예방 조치를 실행하십시오. 장갑, 가운, 보안경, 기타 개인 보호 장비 및 공학적 통제를 사용하여 혈액 노출로부터 보호하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전보건자료는 **www.preanalytix.com** 에서 편리하고 용량이 작은 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 이 키트의 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

주의

검체 준비 과정의 폐기물에 표백제나 산성 용액을 직접 가하지 마십시오.

결합 완충액(BR2) 및 세척 완충액 1(BR3)은 표백제와 결합하여 높은 반응성의 화합물을 형성할 수 있는 구아니딘 티오시아네이트를 함유하고 있습니다. 결합 완충액(BR2) 또는 세척 완충액 1(BR3)을 엎지르면 적절한 실험실 세제와 물로 세척하십시오. 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 Tube(BRT)의 RNA 안정화 용액과 혈액 혼합물은 RNA 안정화 용액 및 혈액 혼합물의 9개 용량당 상용 표백제 용액(5% 차아염소산 나트륨)의 1개 용량을 사용하여 소독할 수 있습니다.

RNA 분리 절차의 원심분리 단계에서 생성된 상층액과 같은 검체 준비 과정의 폐기물은 감염 가능성이 있는 것으로 간주해야 합니다. 생물학적 물질을 폐기하려면 생물학적 위험 용기를 사용하십시오. 해당 시설의 현지 규정 및 절차에 따라 폐기해야 합니다.

PAXgene Blood RNA Kit 의 특정 구성 요소는 일회용입니다. 개별 구성 요소에 대한 정보는 14페이지의 키트 내용물을 참조하십시오.

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.

Buffer BR2

내용물: 구아니딘 티오시아네이트. 위험! 삼키면 해롭습니다. 피부와 접촉하거나 흡입하면 유해할 수 있음. 심각한 눈 손상을 유발함. 장기적인 영향으로 수생생물에게 유해함. 산과 접촉하면 매우 유독한 가스를 방출함. 환경에 방출되지 않게 하십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 눈에 들어간 경우: 물로 몇 분 동안 주의하여 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 노출 또는 우려 시: 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다.

Buffer 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 씻어냅니다. 콘택트 렌즈를 끼고 있으며 쉽게 뺄 수 있는 경우 빼냅니다. 계속 씻어냅니다. 즉시 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오.

DNase I

내용물: DNase. 위험! 알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있습니다. 흡입하면 알레르기 또는 천식 증상 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있습니다. 먼지를 흡입하지 마십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 호흡 보호구를 착용하십시오. 노출 또는 우려 시: 독성 물질 센터 또는 의사에게 연락하십시오. 신선한 공기가 있는 곳으로 사람을 옮기고 편히 호흡할 수 있는 상태를 유지하십시오. 오염된 의복은 다시 사용하기 전에 세탁하십시오.

시약 보관 및 취급

PAXgene RNA 스핀 컬럼(PRC), PAXgene Shredder 스핀 컬럼(PSC), 단백분해효소 K(PK) 및 완충액(BR1, BR2, BR3, BR4, 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 안정적입니니다.

모든 구성품의 포장 상자와 라벨에 인쇄된 유효 기간 및 보관 조건에 유의해야 합니다. 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

사용 중 안정성

키트를 처음 사용한 후 시약은 키트 상자 라벨에 표시된 온도와 만료 날짜까지 원래 병에 두어야 안정적입니다.

QIAcube Connect MDx 의 시약 병에 채워진 시약은 실온(15~25°C)에서 보관했을 때 3개월까지 안정적입니다.

재구성된 DNase I(RNFD)은 원래 유리 바이알(원액)에 보관했을 때 6주 동안 2~8°C 에서 안정적입니다.

1.5mL MCT(키트와 함께 제공됨)에 들어있는 표준 원액(stock solution)의 일회용 분주는 –20°C 에서 9개월 동안 안정적입니다. 일회용 분주는 해동 후 2~8°C 에서 6주 동안 안정적입니다.

검체 수집, 보관, 취급

PAXgene Blood RNA Kit 는 PAXgene Blood RNA Tubes 에 수집된 혈액에 사용하는 제품입니다. 혈액은 PAXgene Blood RNA Tube 안내서의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다루는 방법에 대한 권고사항을 보려면 부록 C(82페이지)를 참조하십시오. 모든 검체는 잠재적으로 유해한 것으로 취급해야 합니다. PAXgene Blood RNA System 의 성능 특징은 FOS 및 IL1B 유전자 전사체에 대해서만 결정했고 43~46페이지에서 확인할 수 있습니다.

프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes 에 수집된 인간 전혈의 총 RNA 수동 분리

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 올바르지 않은 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 PT 본체에 라벨을 표시하십시오. 액체를 각 튜브 또는 스핀 컬럼에 옮긴 후에는 튜브나 스핀 컬럼을 닫으십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엎지르면 RNA 의 수율 및 순도가 떨어질 수 있습니다.
- 원심분리 단계를 포함한 이 프로토콜의 모든 단계는 달리 지시된 경우를 제외하고는 실온(15~25°C)에서 수행해야 합니다.

핵산 증폭 기술의 민감도로 인해 검체를 다룰 때는 교차 오염을 방지하기 위해 다음의 사전 주의가 필요합니다.

- 피펫으로 검체를 스핀 컬럼(PSC, PRC)에 옮길 때는 컬럼의 가장자리를 적시지 않도록 피펫팅하십시오.
- 액체를 옮길 때마다 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용하십시오.
- 피펫 팁으로 스핀 컬럼(PSC, PRC) 막을 건드리지 마십시오.

- 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 스핀 컬럼(PSC, PRC)을 닫으십시오. 절차에서 설명한 대로 원심분리하십시오.
- 한 번에 스핀 컬럼(PSC, PRC) 하나만 열고 에어로졸이 생기지 않도록 주의하십시오.
- 여러 검체를 효율적으로 동시에 처리하려면 원심분리 후에 스핀 컬럼(PSC, PRC)을 옮길 수 있는 PT 로 랙을 채우십시오. 통과액이 들어 있는 이미 사용한 PT 를 버리고, 스핀 컬럼(PRC, PSC)을 새 PT 에 넣어 다시 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 경우에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다루는 방법에 대한 권고사항을 보려면 부록 C(82페이지)를 참조하십시오.
- 혈액 세포를 완전히 용해시키고 RNA 를 완전히 침전시키려면 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 실온에서 2시간 이상 배양해야 합니다. PAXgene Blood RNA Tube(BRT)를 밤새 배양하면 수율이 향상될 수 있습니다. 혈액을 수집한 후 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)를 2~8°C, –20°C 또는 –70°C 에서 보관하기 전에 2시간 동안 실온에서 초기 혈액 배양을 하지 않은 경우, 먼저 온도가 실온에 이르도록 하고 실온에서 2시간 동안 배양한 후에 절차를 시작하십시오.
- 19페이지의 안전성 정보를 읽어 보십시오.

- RNA 를 취급하는 방법에 관한 지침을 읽어 보십시오(부록 A, 79페이지).
- 제조업체 권장 사항에 따라 피펫 및 쉐이커-배양기와 같은 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션하십시오.
- 쉐이커-배양기는 단계 5 및 단계 20에서 필요합니다. 쉐이커-배양기의 온도를 55°C 로 설정하십시오.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 시 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 데워서 용해시킵니다.
- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96~100%, v/v, 순도 등급 p.a.) 4 용량을 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.
- RNase 불포함 DNase 세트를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 표준 원액(stock solution)을 준비하십시오. 고형 DNase I(RNFD, 1500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase 재현탁 완충액(DRB) 550µL 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.
- 재구성된 DNase I(RNFD)은 원래 유리 바이알(표준 원액)에 2~8°C 에서 보관하거나 유리 바이알에서 표준 원액을 제거하고 일회용 분주로 나눈 후 –20°C 에서 보관할 수 있습니다(키트와 함께 제공되는 1.5mL MCT 사용, 5개 분주물을 만들기에 충분함). 해동된 분주는 2~8°C 에서 보관할 수 있습니다. 해동 후 분주를 다시 냉동하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)를 동결건조 상태에서 용해하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(부록 A, 79페이지)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 밀리리터당 0.001 의 A_{260} 증가를 유발할 수 있는 DNase I 의 양으로 정의합니다(Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

절차

1. 스윙 버켓 로터를 사용하여 3000~5000 × *g* 의 속도로 10분 동안 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)를 원심분리합니다.

   혈액 세포를 완전히 용해시키고 RNA 를 완전히 침전시키려면 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에서 실온(15~25°C)에서 2시간 이상 배양해야 합니다.

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

2. 디캔팅 또는 피펫팅으로 상층액을 제거합니다. 4mL 의 RNase 불포함수(RNase-Free Water, RNFW)를 펠렛에 추가하고 (키트와 함께 공급된) 사용하지 않은 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 버켓 로터를 사용하여 3000~5000 × *g* 로 10분 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. 350µL 재현탁 완충액(BR1)을 추가하고, 펠렛이 육안으로 보기에 용해될 때까지 볼텍싱합니다.

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

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

6. 용해물을 2mL PT 에 있는 PSC(연보라색)에 바로 넣고 최대 속도(단 20,000 × *g* 미만)로 3분 동안 원심분리합니다.

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

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

   검체 중에는 원심분리를 하지 않더라도 PSC 를 통과할 수 있는 것도 있습니다. 이는 검체의 점도가 낮아서 발생하는 현상이며, 제품 불량의 표시로 이해해서는 안 됩니다.

7. 처리 튜브 내의 펠렛을 흔들지 말고 통과액 분획의 상층액 전체를 사용하지 않은 1.5mL MCT 에 조심스럽게 옮깁니다.

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

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

9. 피펫으로 2mL PT 에 있는 700µL 검체를 PRC(적색)에 넣고 8000~20,000 × *g* 로 1분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새 2mL PT 에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 PT 를 폐기합니다.

10. 피펫으로 잔여 검체를 PRC 에 옮기고 8000~20,000 × *g* 로 1분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새로운 2mL PT 에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 PT 를 폐기합니다.

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

11. 피펫으로 350µL 세척 완충액 1(BR3)을 PRC 에 넣습니다. 1분 동안 8000~20,000 × *g* 로 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 2mL PT 에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 PT 는 폐기합니다.

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

    예를 들어 10개 검체를 처리할 때는 100µL DNase I(RNFD) 표준 원액을 700µL DNA 소화 완충액(RDD)에 추가합니다. 키트와 함께 제공된 1.5mL 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(80µL)을 바로 PRC 막에 옮긴 후에 실험대(20~30°C) 위에 15분 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 350µL 세척 완충액 1(BR3)을 PRC 에 넣고 8000~20,000 × *g* 로 1분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새로운 2mL PT 에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 PT 를 폐기합니다.

15. 피펫으로 500µL 세척 완충액 2(BR4)를 PRC 에 넣고 8000~20,000 × *g* 로 1분 동안 원심분리합니다. 스핀 컬럼(PRC)을 새로운 2mL PT 에 넣고 통과액이 들어 있는 사용한 PT 를 폐기합니다.

세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 사용하기 전에 반드시 에탄올을 세척 완충액 2(BR4)에 추가하십시오(26페이지, "시작하기 전 해야 할 사항" 참조).

16. 피펫으로 500µL 세척 완충액 2(BR4)를 PRC 에 넣습니다. 3분 동안 8000~20,000× *g* 로 원심분리합니다.
17. 통과액이 포함된 PT 를 폐기하고 PRC 를 새 2mL PT 에 넣습니다. 1분 동안 8000~20,000× *g* 로 원심분리합니다.
18. 통과액이 들어 있는 PT 를 폐기합니다. 1.5mL MCT 에 PRC 를 놓고 PRC 막에 피펫으로 직접 40µL 의 용출 완충액(BR5)을 옮겨 담습니다. 8000~20,000 × *g* 로 1분 동안 원심분리하여 RNA 를 용출합니다.

    최대 용출 효율을 달성하려면 용출 완충액(BR5)으로 막 전체를 젖게 해야 합니다.
19. 설명된 대로 40µL 용출 완충액(BR5) 및 동일한 MCT 를 사용하여 용출 단계(단계 18)를 반복합니다.
20. 쉐이커-배양기(5단계)에서 용출액을 교반하지 않고 65°C 로 5분 동안 배양합니다. 배양 후에 즉시 얼음 위에서 식힙니다.

검체를 이렇게 65°C 에서 배양하면 RNA 가 다운스트림 공정에 적합하게 변성됩니다. 다운스트림 공정에 열 변성 단계가 있더라도 이 단계를 생략하지 마십시오. 다운스트림 공정에서 최대의 효율을 달성하려면 필수적으로 이 시점에 RNA 를 충분히 변성시켜야 합니다.

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.

    260nm 의 흡광도에서 RNA 를 정확하게 정량화하려면 검체를 10mM Tris-HCl, pH 7.5로 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⇒ 44µg/mL 의 관계식을 사용하십시오. 부록 B, 80페이지를 참조하십시오.

22. 완충액과 RNase 가 없는 물이 들어 있는 모든 병, 효소와 효소 완충액이 들어 있는 바이알과 튜브, 프로토콜에 사용된 키트의 플라스틱 재료가 들어 있는 백을 다시 닫으십시오. "시약 보관 및 취급"(23페이지) 및 "사용 중 안정성"(23페이지) 섹션에 설명된 대로 키트의 나머지 내용물을 나중에 사용할 때까지 보관하십시오.

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

프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 인간 전혈의 총 RNA 자동 분리

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 올바르지 않은 튜브 또는 플라스틱 소모품으로 옮기지 않으려면 유성펜을 사용하여 모든 PT, MCT 및 로터 어댑터에 적절하게 라벨을 표시하십시오. 각 MCT 뚜껑 및 본체, 각 PT 본체, 각 로터 어댑터의 외벽에 라벨 표시를 하십시오.
- 절차 중에 검체 및 완충액을 엎지르면 RNA 의 수율 및 순도가 떨어질 수 있습니다.
- 원심분리 단계를 포함한 이 프로토콜의 모든 단계는 달리 지시된 경우를 제외하고는 실온(15~25°C)에서 수행해야 합니다.

핵산 증폭 기술의 민감도로 인해 검체를 다룰 때는 교차 오염을 방지하기 위해 다음의 사전 주의가 필요합니다.

- 피펫으로 검체를 PT 에 옮길 때는 컬럼의 가장자리를 적시지 않도록 튜브의 하부에 피펫팅하십시오.
- 액체를 옮길 때마다 항상 피펫 팁을 교체하십시오. 에어로졸 장벽 피펫 팁을 사용하십시오.
- 피펫 팁으로 스핀 컬럼(PSC, PRC) 막을 건드리지 마십시오.
- 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 안내서*의 지침에 따라 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집해야 합니다. 필요한 경우에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 다루는 방법에 대한 권고사항을 보려면 부록 C(82페이지)를 참조하십시오.
- 혈액 세포를 완전히 용해시키고 RNA 를 완전히 침전시키려면 혈액을 수집한 후에 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)를 실온에서 2시간 이상 배양해야 합니다. PAXgene Blood RNA Tube(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 2시간 동안 보관한 후에 절차를 시작하십시오.
- 19페이지의 안전성 정보를 읽어 보십시오.
- '중요 참고사항'(60페이지)를 읽어 보십시오.
- RNA 를 취급하는 방법에 관한 지침을 읽어 보십시오(부록 A, 79페이지).
- 안전성 정보에 세심한 주의를 기울여, 기기와 함께 제공되는 QIAcube Connect MDx 사용자 설명서 및 추가 정보를 읽어 보십시오.
- 제조업체 권장 사항에 따라 피펫 및 QIAcube Connect MDx 와 같은 장치 및 기기를 정기적으로 점검, 유지보수, 캘리브레이션 하십시오.
- 결합 완충액(BR2)은 보관 시 침전물이 형성될 수 있습니다. 필요한 경우에 37°C 로 데워서 용해시킵니다.

- 세척 완충액 2(BR4)는 농축액으로 공급됩니다. 최초 사용 전에 병에 표시된 것과 같이 에탄올(96~100%, v/v, 순도 등급 p.a.)을 적절한 용량으로 첨가하여 작업 용액을 만듭니다.
- RNase 불포함 DNase 세트를 처음 사용하는 경우에는 DNase I 표준 원액(stock solution)을 준비하십시오. 고형 DNase I(RNFD, 1500 Kunitz 단위)*을 세트와 함께 제공된 DNase 재현탁 완충액(DRB) 550µL 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.
- 재구성된 DNase I(RNFD)은 원래 유리 바이알(표준 원액)에 2~8°C 에서 보관하거나 유리 바이알에서 표준 원액을 제거하고 일회용 분주로 나눈 후 –20°C 에서 보관할 수 있습니다(키트와 함께 제공되는 1.5mL MCT 사용, 5개 분주물을 만들기에 충분함). 해동된 분주는 2~8°C 에서 보관할 수 있습니다. 해동 후 분주를 다시 냉동하지 마십시오.
- DNase I(RNFD)를 동결건조 상태에서 용해하여 분주할 때는 RNA 취급에 관한 지침(부록 A, 79페이지)에 따라 수행하십시오.
- 올바른 쉐이커 어댑터(QIAcube Connect MDx 에 포함됨, 2mL 안전 잠금식 튜브용 어댑터 사용, '2'로 표시됨)를 설치하고 쉐이커 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. 62페이지의 'QIAcube Connect MDx 에 프로토콜 설치하기'를 참조하십시오.

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

절차

1. QIAcube Connect MDx 후드를 닫고 전원 스위치로 기기를 켭니다(61페이지, 그림 15 참조).

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

2. QIAcube Connect MDx 후드를 열고 필요한 시약 및 플라스틱 용기를 기기에 로딩합니다. 63페이지의 'QIAcube Connect MDx 로딩'을 참조하십시오.

   시간 절약을 위해 장착은 다음과 같은 하나 또는 두 개의 10분 원심분리 단계(단계 3 및 5) 중에 수행할 수 있습니다.

3. 스윙 버켓 로터를 사용하여 3000~5000 × *g* 의 속도로 10분 동안 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)를 원심분리합니다.

   혈액 세포를 완전히 용해시키고 RNA 를 완전히 침전시키려면 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에서 실온(15~25°C)에서 2시간 이상 배양해야 합니다.

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

4. 디캔팅 또는 피펫팅으로 상층액을 제거합니다. 상층액을 디캔팅할 때는 펠렛을 흔들지 말고 깨끗한 종이 타월로 튜브의 가장자리를 닦아내십시오. 4mL 의 RNase 불포함수(RNase-Free Water, RNFW)를 펠렛에 추가하고 (키트와 함께 공급된) 사용하지 않은 보조 BD Hemogard 마개를 사용하여 튜브를 닫습니다.

5. 펠렛이 육안으로 보기에 용해될 때까지 볼텍싱하고 스윙 버켓 로터를 사용하여 3000~5000 × *g* 로 10분 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. 350µL 재현탁 완충액(BR1)을 추가하고, 펠렛이 육안으로 보기에 용해될 때까지 볼텍싱합니다.
7. 피펫으로 검체를 2mL PT 에 넣습니다.

   PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2mL PT 를 사용하십시오.

8. 검체가 들어 있는 열린 PT 를 QIAcube Connect MDx 쉐이커에 로드합니다(65페이지, 그림 18 참조). 쉽게 로딩할 수 있도록 검체 위치에 번호가 매겨져 있습니다. 쉐이커 랙 플러그(QIAcube Connect MDx 기기에 포함됨)를 각 PT 옆의 쉐이커 랙 가장자리에 있는 슬롯에 삽입합니다. 이렇게 하면 로딩 확인 중에 검체를 찾을 수 있습니다.

   올바른 쉐이커 어댑터(쉐이커 어댑터, 2mL, 안전 잠금식 튜브, '2'로 표시, QIAcube Connect MDx 에 포함됨)가 설치되었는지 확인하십시오.

   12개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 쉐이커 랙이 방사상으로 균형을 이루도록 로딩해야 합니다(69페이지, 그림 22 참조). 한 (1)개 검체 또는 11개 검체는 처리할 수 없습니다. 쉐이커 랙의 위치 번호는 원심분리기의 위치 번호에 상응합니다.

9. QIAcube Connect MDx 후드를 닫으십시오(61페이지, 그림 15 참조).
10. "PAXgene Blood RNA Part A" 프로토콜을 선택한 후에 프로토콜을 시작하십시오.

    QIAcube Connect MDx 기기의 터치 스크린에 표시된 지침에 따라 수행하십시오.

두 프로그램 파트 둘 다(Part A 및 Part B) QIAcube Connect MDx 에 설치되었는지 확인하십시오(62페이지, 'QIAcube Connect MDx 에 프로토콜 설치하기' 참조).

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

11. 'PAXgene Blood RNA Part A' 프로토콜을 완료했으면 QIAcube Connect MDx 후드를 엽니다(61페이지, 그림 15 참조). 로터 어댑터에서 PRC, 쉐이커에서 빈 PT 를 제거하여 버립니다.

    실행 도중, 로터 어댑터 위치 1(뚜껑 위치 L1)에서 로터 어댑터 위치 3(뚜껑 위치 L2)으로 스핀 컬럼을 옮깁니다(67페이지, 그림 20 참조).

12. 로터 어댑터에 있는, 정제된 RNA 가 들어 있는 모든 1.5mL MCT 뚜껑을 닫습니다(위치 3, 뚜껑 위치 L3, 67페이지, 그림 20 참조). 1.5mL MCT 를 QIAcube Connect MDx 쉐이커 어댑터로 옮깁니다(65페이지 그림 18 참조).

13. QIAcube Connect MDx 후드를 닫으십시오(61페이지, 그림 15 참조).

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

    QIAcube Connect MDx 의 터치 스크린에 표시된 지침을 따르십시오.

    이 프로그램은 검체를 65°C 로 배양하고 다운스트림 공정에 맞게 RNA 를 변성시킵니다. 다운스트림 공정에 열 변성 단계가 있더라도 이 단계를 생략하지 마십시오. 다운스트림 공정에서 최대의 효율을 달성하려면 필수적으로 이 시점에 RNA 를 충분히 변성시켜야 합니다.

15. 'PAXgene Blood RNA Part B' 프로토콜을 완료했으면 QIAcube Connect MDx 후드를 엽니다(61페이지, 그림 15 참조). 정제된 RNA 가 들어 있는 MCT 를 즉시 얼음 위에 놓습니다.

경고: 표면이 뜨겁습니다. 쉐이커의 온도는 최대 70°C 까지 도달할 수 있습니다. 뜨거울 때 만지지 마십시오.

정제된 RNA 가 QIAcube Connect MDx 에 남아 있지 않게 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.

260nm 의 흡광도에서 RNA 를 정확하게 정량화하려면 검체를 10mM Tris-HCl, pH 7.5로 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 완충액에서 정량화할 때는 다음 관계식을 사용하십시오 A_{260}=1 ⇒ 44µg/mL. 부록 B, 80페이지를 참조하십시오.

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

17. reagent bottle rack 을 QIAcube Connect MDx 작업대에서 제거하고(65페이지, 그림 18 참조), 모든 병을 라벨 표시된 해당 뚜껑으로 닫으십시오. 완충액과 RNase 가 없는 물이 들어 있는 모든 병, 효소와 효소 완충액이 들어 있는 바이알과 튜브, 프로토콜에 사용된 키트의 플라스틱 재료가 들어 있는 백을 다시 닫으십시오. '시약 보관 및 취급'(23페이지) 및 '사용 중 안정성'(23페이지) 섹션에 설명된 대로 키트의 나머지 내용물과 시약 병을 나중에 사용할 때까지 보관하십시오.

    QIAcube Connect MDx MCT 슬롯 내, PT 에 남아 있는 시약을 제거하여 폐기합니다. 원심분리기에서 로터 어댑터를 꺼내서 폐기합니다. QIAcube Connect MDx 폐기물 서랍을 비우십시오(61페이지, 그림 15 참조). 기기 후드를 닫고 전원 스위치로 기기를 끕니다.

제품의 사용상의 제한

PAXgene Blood RNA Kit 는 체외 진단에 사용하기 위해 사람의 전혈에서 수집한 세포내 RNA(4.8 × 10^6~1.1 × 10^7개 백혈구/mL)를 분리하는 제품입니다. 사람의 전혈에서 수집한 유전체 DNA 또는 바이러스 핵산을 분리하는 용도가 아닙니다. 안정화 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. 키트의 구성품은 이 사용 지침에 설명된 수동 및 자동 프로토콜에서만 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 Kit 의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 따라 검사를 받습니다.

성능 특징

검체 수집 및 안정화

PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에는 특허에 등록된 RNA 안정화 시약이 포함되어 있습니다. 이 첨가물은 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 3일 동안(각각 43및 44페이지, 그림 4 및 그림 5), 2~8°C 에서 최대 5일 동안(45및 46페이지, 그림 6 및 그림 7) 안정화하는 데 사용합니다. 또한 안정화된 혈액을 냉동 보관할 수 있습니다. 현재 나와 있는 데이터는 –20°C 또는 –70°C 에서 최소한 11년간의 세포 RNA 안정화를 보여 줍니다*. 더 긴 기간의 안정성 평가를 위해 현재 진행 중인 시험에 대한 자세한 내용은 **www.preanalytix.com** 에 방문하거나 QIAGEN 기술 서비스에 문의하십시오.

RNA 안정화의 실제 기간은 세포 RNA 의 종과 사용되는 다운스트림 공정에 따라 다를 수 있습니다. 안정화 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.

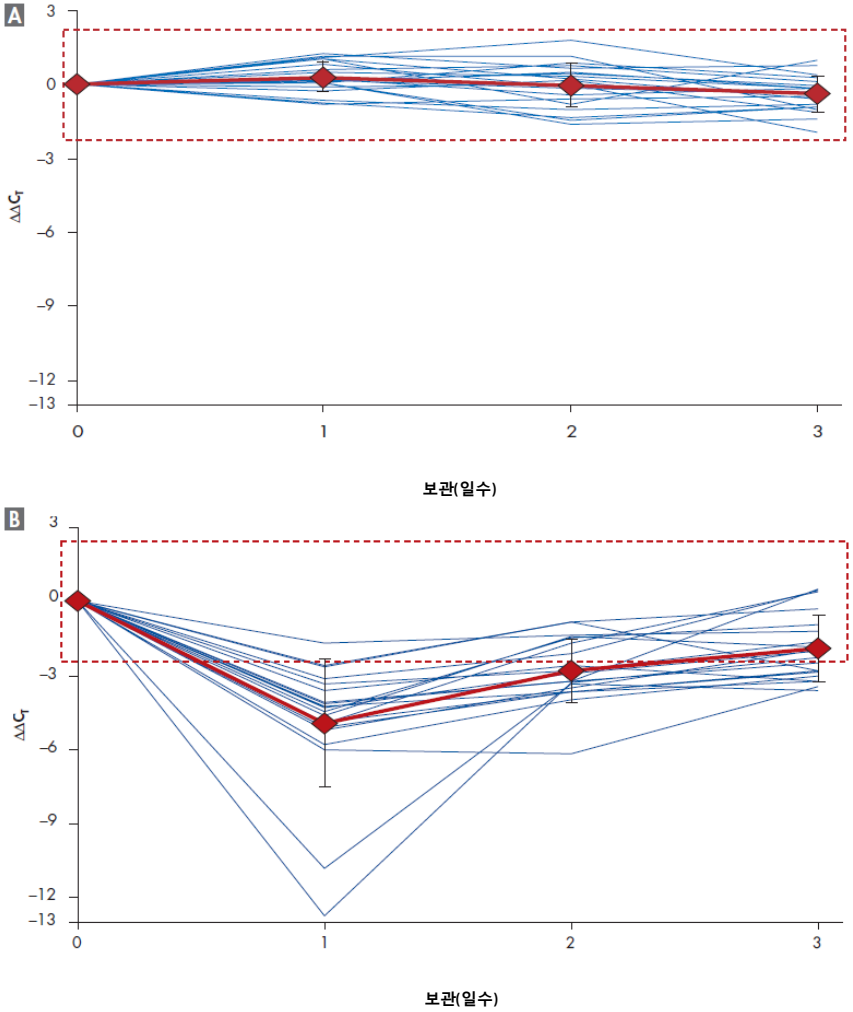


그림 4: 18~25°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: FOS. 혈액은 반복 검체와 함께 명확히 건강한10명의 헌혈자로부터 채취하여 18~25°C 에서 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 분리 작업을 수행했습니다. [**A**] PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. [**B**] EDTA 를 항응고제로 추가한 표준 채집 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 정제 기술의 표준 유기 분리 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× 분석의 총정밀도를 의미합니다($2.34C_T$).

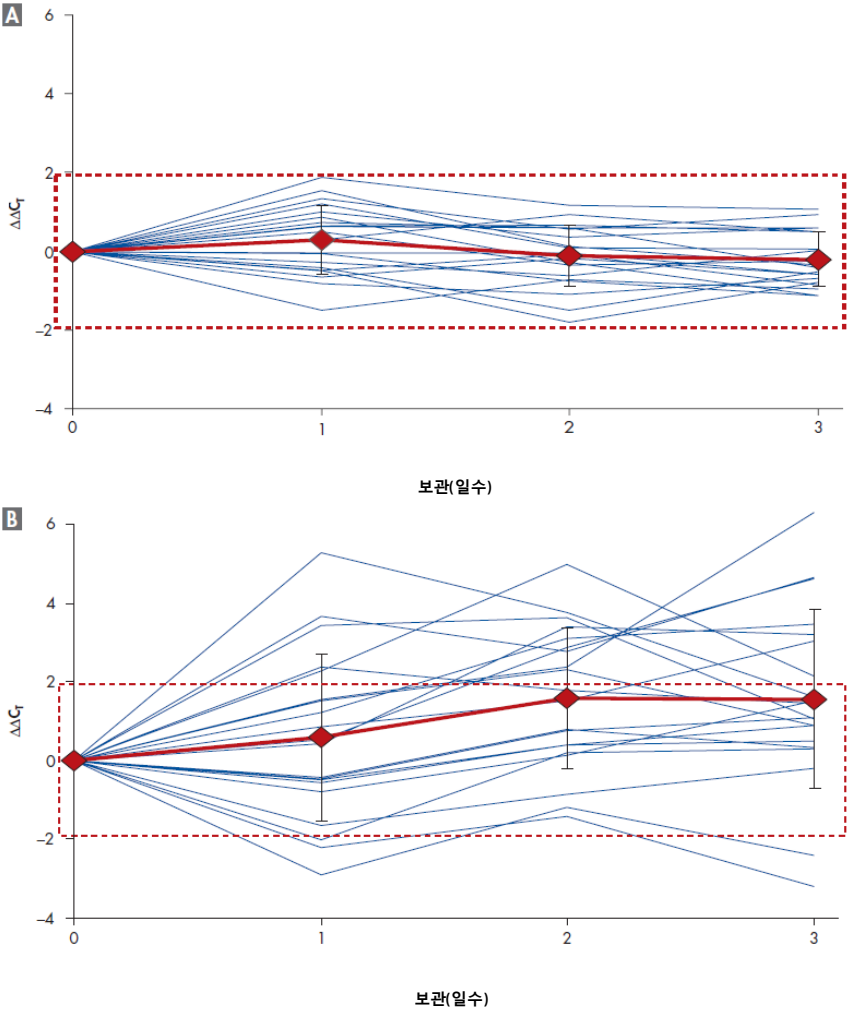


그림 5: 18~25°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 4에서 설명한 대로 18~25°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 ±3× 분석의 총정밀도를 의미합니다($1.93C_T$).

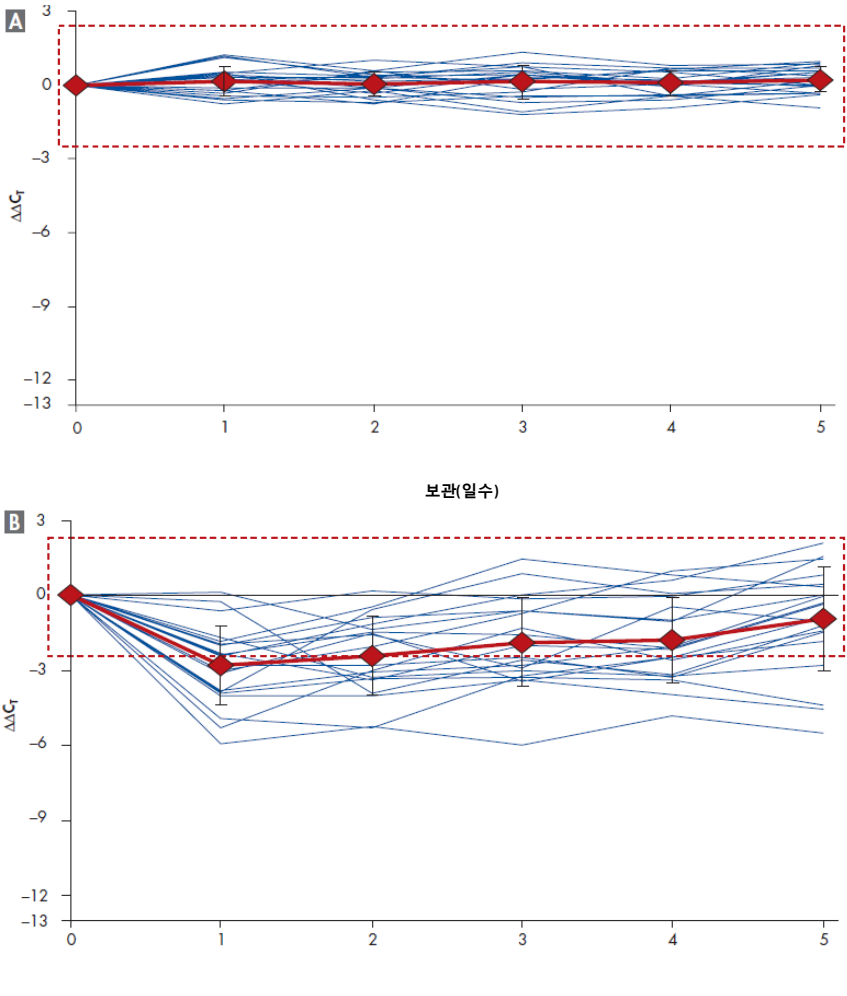


그림 6: 2~8°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: FOS. 10명의 헌혈자로부터 중복 검체가 있도록 채혈하였으며, 2~8°C 에서 지정된 일수 동안 보관한 후에 총 RNA 분리 작업을 수행했습니다. [**A**] PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 혈액을 수집 보관한 후에 PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 총 RNA 를 정제했습니다. [**B**] EDTA 를 항응고제로 추가한 표준 채집 튜브에 혈액을 수집 보관한 후에 실리카 막 기반 RNA 정제 기술의 표준 유기 분리 방법을 사용하여 총 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× 분석의 총정밀도를 의미합니다($2.34C_T$).

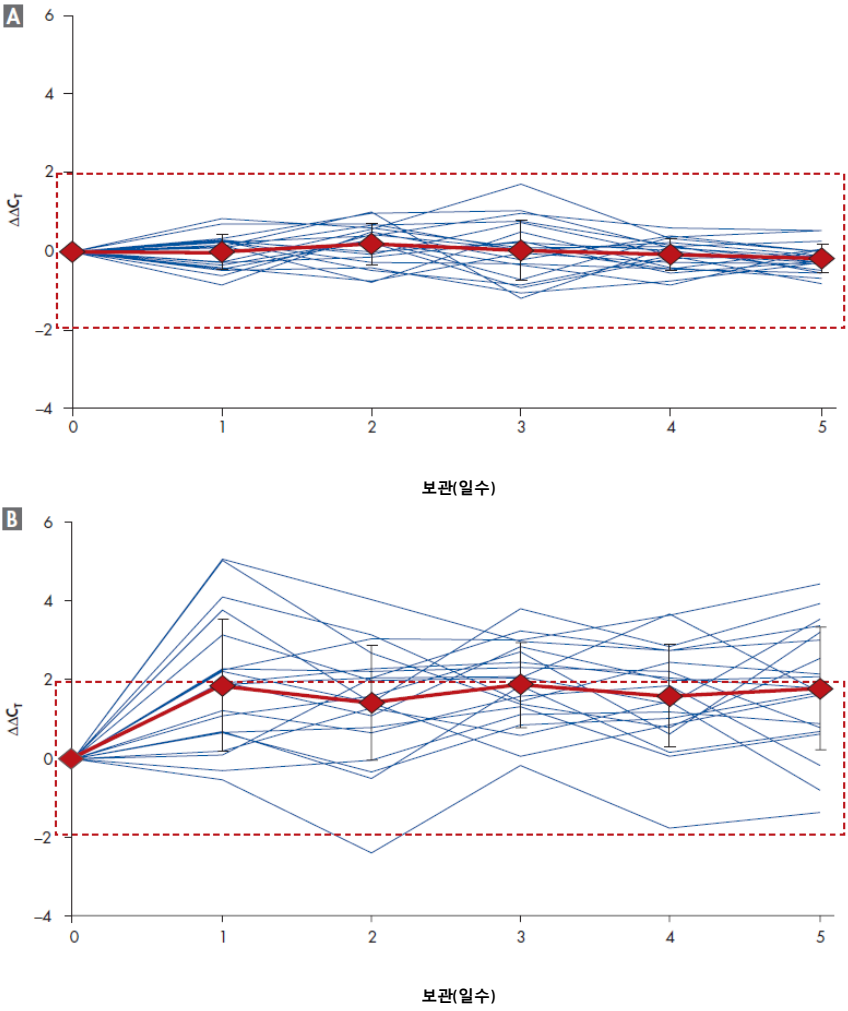


그림 7: 2~8°C 에서 혈액 검체 내 RNA 안정성: IL1B. 혈액을 채취한 후에 그림 6에서 설명한 대로 2~8°C 에서 보관한 후에 총 RNA 를 정제했습니다. IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 결정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균 및 표준 편차를 표시하면서 플로팅했습니다. 대시 선은 ±3× 분석의 총정밀도를 의미합니다($1.93C_T$).

수동 RNA 분리

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 1.8~2.2이며, 모든 검체의 ≥95%에서 ≤1%(w/w)의 유전체 DNA 가 존재합니다. 용출액이 RT-PCR 반응 부피의 최대 30%를 차지할 때 최소한 95%의 RT-PCR 에서의 억제를 나타내지 않았습니다.

수동 프로토콜을 사용하는 경우에 평균 검체 준비 시간(12회 검체 준비 실행의 데이터 기준)은 약 90분*이며, 직접 실험 시간은 단 40분입니다. 2.5mL 의 건강한 사람 전혈의 RNA 수율은 처리한 검체의 ≥95%에서 ≥3µg 입니다. 수율은 헌혈자 의존성이 높기 때문에 개별적 수율이 다를 수 있습니다. 개별 헌혈자의 경우에 PAXgene Blood RNA System 은 재현성 및 반복성이 높은 수율(48및 49페이지, 그림 8 및 그림 9) 그리고 재현성 및 반복성이 있는 RT-PCR(각각 54 및 55페이지, 그림 10 및 그림 11)을 제공하므로 임상 진단 검사에 사용할 때 안정성이 높습니다.

그림 8(48페이지)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(49페이지, 그림 9 참조).

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

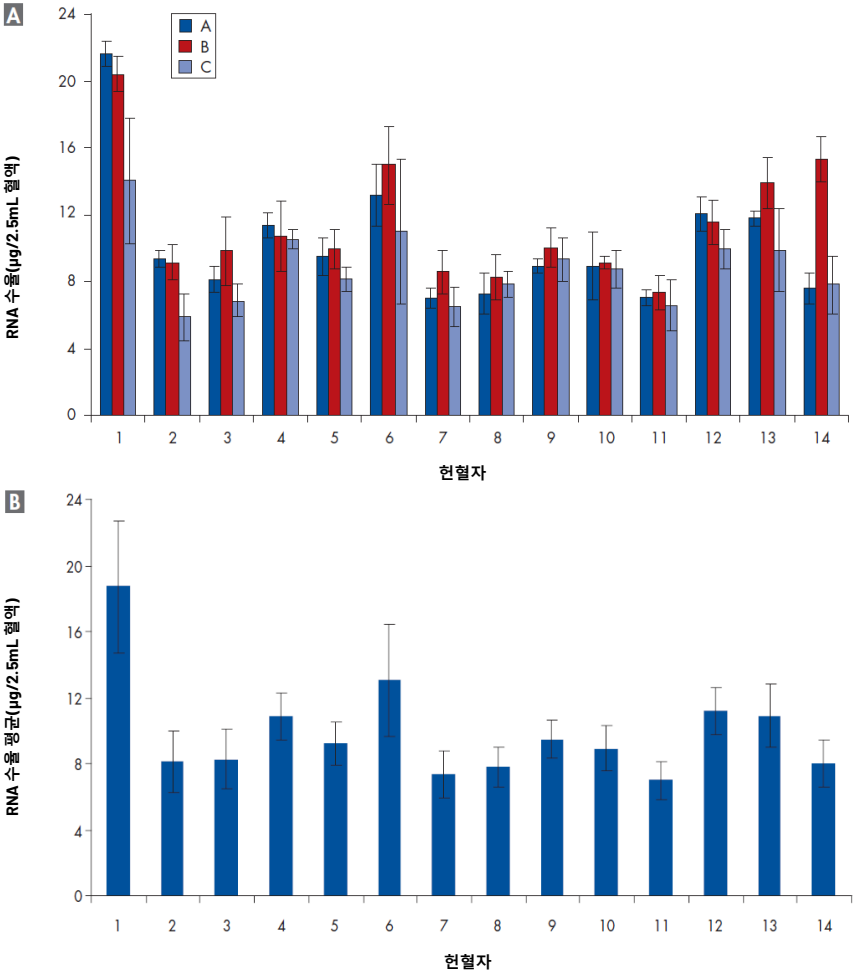


그림 8: 재현성 및 반복성 있는 RNA 분리. 14명의 헌혈자로부터 4회 반복 채취한 혈액 검체를 3명의 기술자(A, B 및 C)가 각각 수동으로 처리했습니다. 세 대의 장비 세트를 사용했으며, 단일 기사가 준비한 모든 검체를 동일한 장비를 사용하여 처리했습니다. [**A**] 동일한 헌혈자로부터 다른 기사가 채취한 중복 검체당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 표시되어 있습니다. [**B**] 14명의 헌혈자 중 각각으로부터 채취한 12개 중복 혈액 검체를 3명의 다른 기사가 처리했습니다. 동일한 헌혈자로부터 모든 기사가 채취한 검체당 RNA 수율의 평균 및 표준 편차가 제시되어 있습니다. 모든 RNA 검체에서 A_{260}/A_{280} 비율의 범위는 1.8~2.2였습니다.

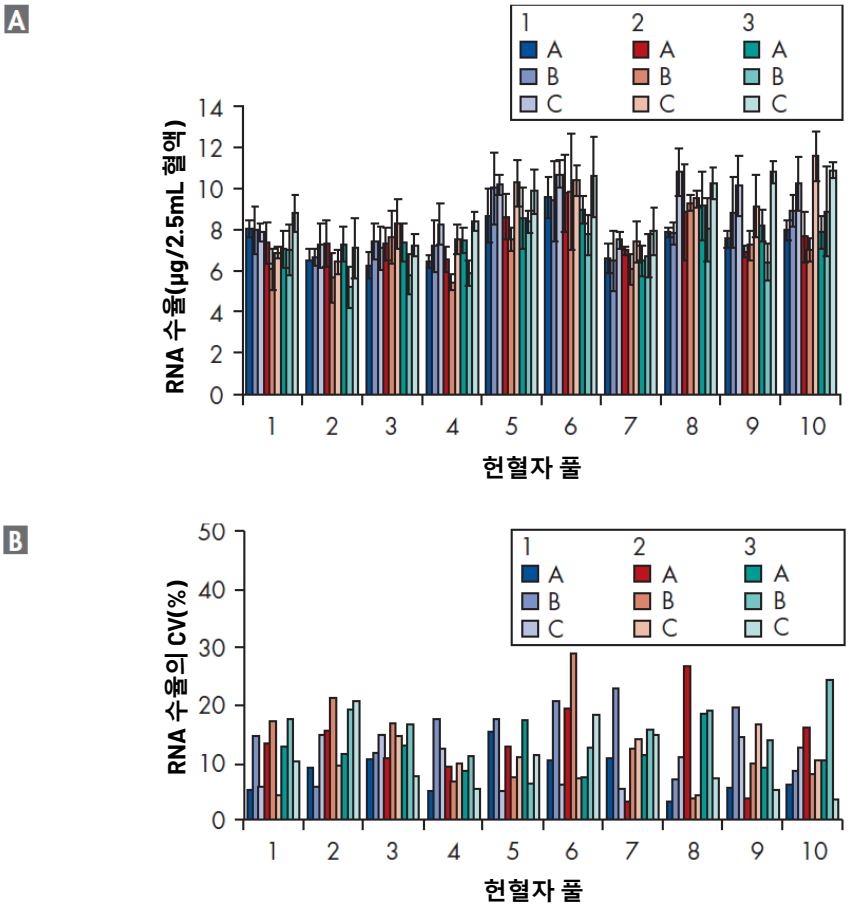


그림 9: 취합 혈액 검체를 사용한 여러 작업자 및 PAXgene Blood RNA Kit 로트의 RNA 수율의 반복성 및 재현성. 30명의 다른 헌혈자로부터 채취한 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; 헌혈자당 12개 튜브, 총 360개 튜브)에 수집했습니다. 3명의 헌혈자로부터 수집한 튜브의 내용물을 혼합한 후에 36개 검체로 재분주했습니다. 3명의 헌혈자 풀당 36개의 검체를 3명의 다른 작업자가 수동으로 처리했습니다. 각 작업자가 3개의 다른 PAXgene Blood RNA Kit 로트를 사용하여 분리했으며, 10인의 헌혈자 풀 각각에서 4회 반복 채취한 검체를 처리했습니다. [**A**] 모든 작업자-로트 조합에 대한 RNA 수율 및 표준 편차. 10개 헌혈자 풀에서 4회 반복 채취한 혈액 검체를 3명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 3개 키트 로트(1, 2 및 3) 각각으로 처리했습니다. 각 작업자마다 그리고 각 키트 로트마다 동일한 헌혈자로부터 4회 반복 채취한 검체당 평균 수율(컬럼) 및 표준 편차(오류 막대)가 제시되어 있습니다. [**B**] 그림 9A 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 헌혈자 풀(1, 6, 9, 10)에 대한 각 로트 및 각 사용자 내 재현성

데이터 조합	헌혈자 풀 1(5.1 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 6(6.5 × 10^6cells/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
	헌혈자 풀 9(8.4 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 10(10.2 × 10^6cells/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 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 6(6.5 × 10^6cells/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
	헌혈자 풀 9(8.4 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 10(10.2 × 10^6cells/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)에 대한 각 로트 내부 및 모든 사용자 간 재현성

데이터 조합	헌혈자 풀 1(5.1 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 6(6.5 × 10^6cells/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
	헌혈자 풀 9(8.4 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 10(10.2 × 10^6cells/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 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 6(6.5 × 10^6cells/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
	헌혈자 풀 9(8.4 × 10^6cells/mL)			헌혈자 풀 10(10.2 × 10^6cells/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

4개의 대표적인 헌혈자 풀의 세부 분석. 풀은 백혈구 수치에 따라 선택했으며 백혈구 수치(4.8 × 10^6 ~ 1.1 × 10^7개 백혈구/mL) 정상 범위의 상한 수치, 중간 수치 및 하한 수치를 반영합니다. 백혈구 수치는 헌혈자 풀당 3명의 헌혈자로부터 채취한 3가지 백혈구 수치의 평균 값을 의미합니다.

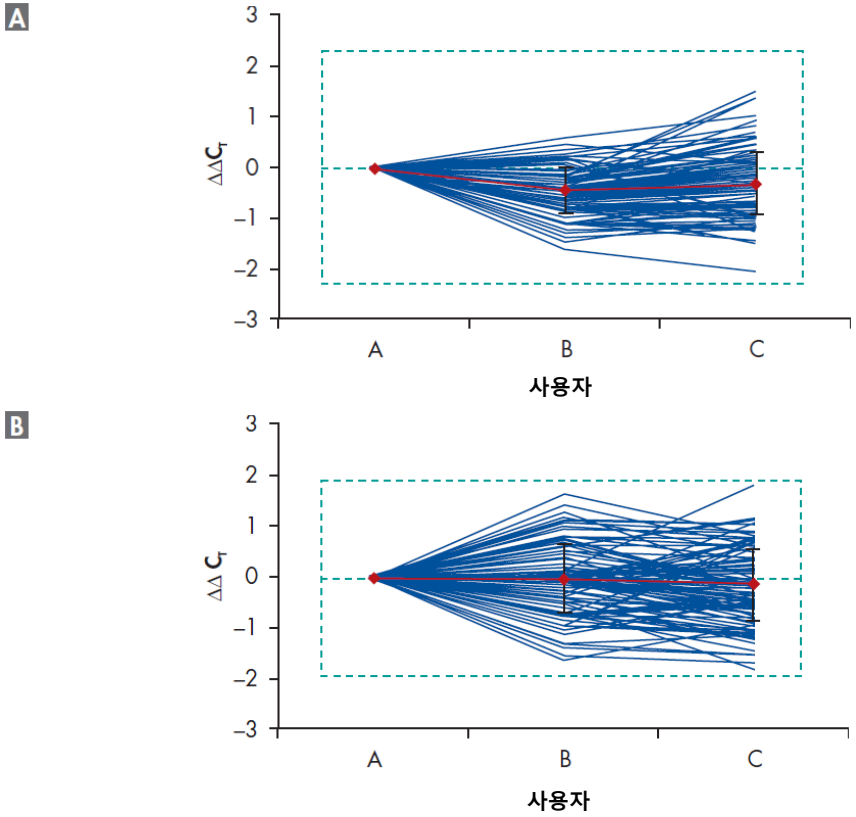


그림 10: RT-PCR 의 재현성 – 사용자 간. 그림 9에서 설명한 실험에서 정제된 RNA 를 real-time RT-PCR 에 사용했습니다. [**A**] FOS 및 [**B**] IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 측정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시하면서 사용자 A 의 값(10개 헌혈자 풀 × 3개 키트 로트 × 4회 반복 채취 = 유전자당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 ±3x 분석의 총정밀도를 의미합니다(FOS: 2.34 C_T, IL1B: 1.93 C_T).

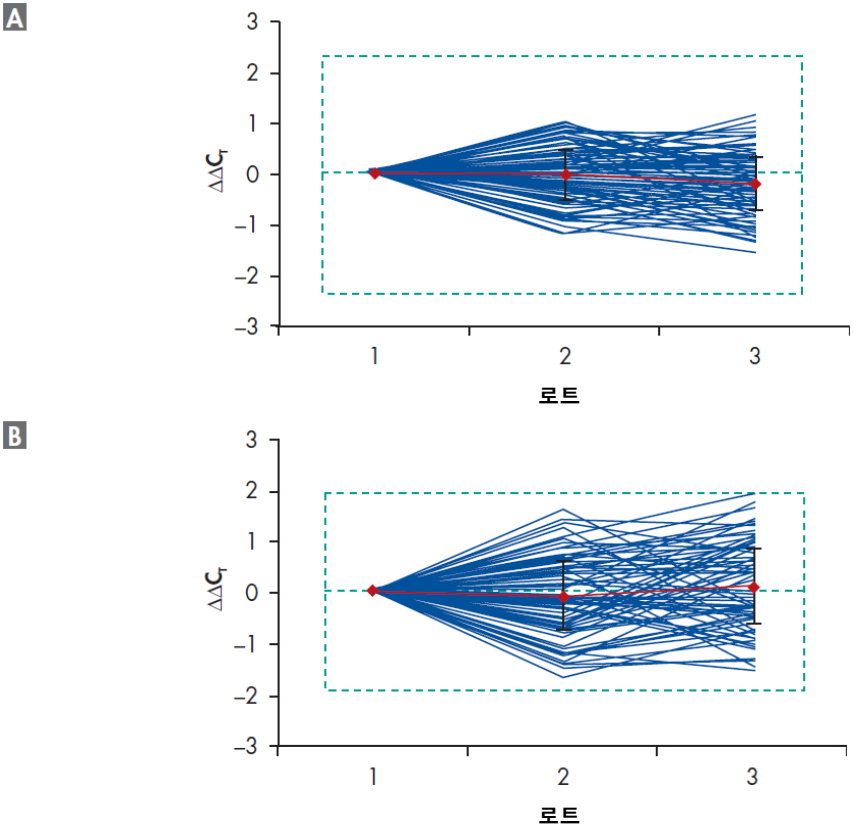


그림 11: RT-PCR 의 재현성 – 키트 로트 간. 그림 9에서 설명한 실험에서 정제된 RNA 를 real-time RT-PCR 에 사용했습니다. [**A**] FOS 및 [**B**] IL1B 의 상대적 전사 수준은 18S rRNA 를 내부 표준으로 사용하여 실시간 이중 RT-PCR 로 측정했습니다. 모든 검체의 값은 검체의 평균(적색선) 및 표준 편차(검은색 막대)를 표시하면서 키트 로트 1의 값(10개 헌혈자 풀 × 3명 사용자 × 4회 반복 채취 = 유전자 당 120개 데이터 세트)을 기준으로 플로팅했습니다. 대시 선은 ±3x 분석의 총정밀도를 의미합니다(FOS: 2.34 C_T, IL1B: 1.93 C_T).

표 2: 그림 10 및 11의 RT-PCR 데이터 요약

검사 시스템	FOS/18S rRNA 분석		IL1B/18S rRNA 분석	
데이터 비교	평균($\Delta\Delta C_T$)	±SD($\Delta\Delta C_T$)	평균($\Delta\Delta C_T$)	±SD($\Delta\Delta C_T$)
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 10 및 그림 11에 제시된 데이터에는 평균 $\Delta\Delta C_T$ 값(N = 120) 및 표준 편차가 표시되어 있습니다.

자동 RNA 분리

2.5mL 의 건강한 사람 전혈의 RNA 수율은 처리한 검체의 ≥95%에서 ≥3µg 입니다. 그림 12(57페이지)는 3명의 작업자가 3개 키트 로트에 대해 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216개 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(57페이지, 그림 12).

용출액이 RT-PCR 반응 부피의 최대 30%를 차지할 때 최소한 95%의 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 1.8~2.2로 나타납니다. 유전체 DNA 는 베타 액틴 유전자 염기서열의 정량적 real-time PCR 로 측정할 때 모든 검체의 ≥95%에서 ≤1%(w/w)로 존재합니다. 그림 13 및 그림 14(58페이지)는 3명의 작업자가 3개 키트 로트로 자동 프로토콜을 사용하여 준비한 총 216개 검체의 A_{260}/A_{280} 값 및 상대적 유전체 DNA 를 나타냅니다.

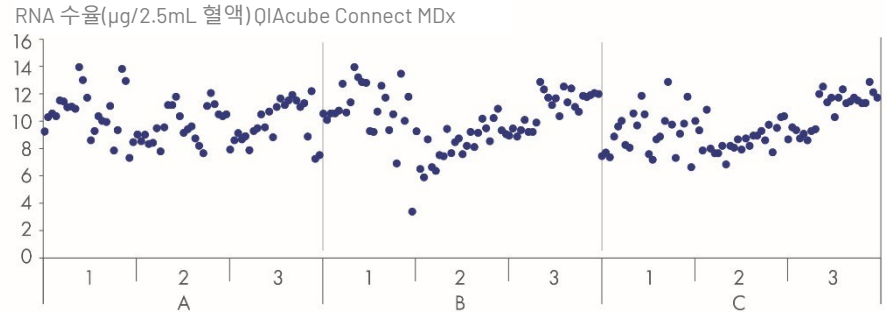


그림 12: RNA 수율 — QIAcube Connect MDx 자동 처리. 개별 헌혈자의 혈액 검체를 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 채취했습니다. 튜브 내용물을 6개의 헌혈자 풀로 취합한 다음 재분주하였습니다. 3명의 다른 작업자(A, B 및 C)가 총 216개 튜브(즉, 풀당 36개)를 처리했습니다. 각 작업자가 여러 QIAcube Connect MDx 를 사용하여 자동 분리 목적으로 PAXgene Blood RNA Kit 의 3개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용했으며, 각 6개의 헌혈자 풀로부터 4회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

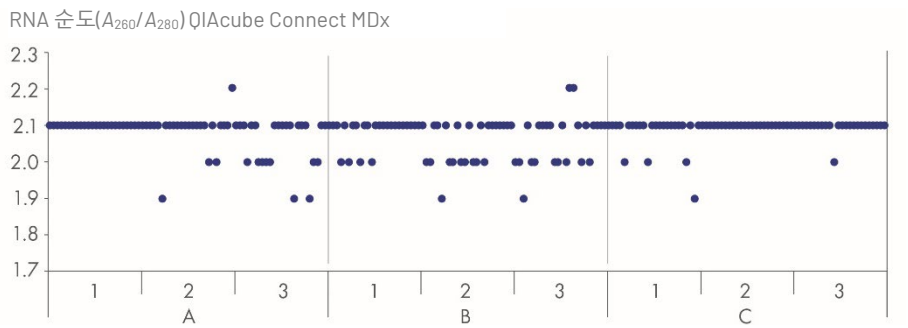


그림 13: RNA 순도(A_{260}/A_{280} 값) — QIAcube Connect MDx 로 자동 처리. 3명의 다른 작업자(A, B, C)가 그림 12에서 설명한 실험에서 QIAcube Connect MDx 에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 3개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 RNA 를 정제했습니다. 모든 개별 검체의 A_{260}/A_{280} 값이 모든 작업자–로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

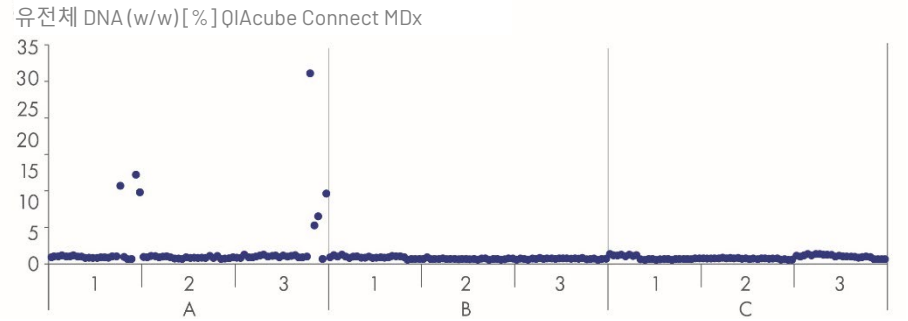


그림 14: RNA 순도(% 유전체 DNA 오염) – QIAcube Connect MDx 로 자동 처리. 3명의 다른 작업자(A, B, C)가 그림 12에서 설명한 실험에서 QIAcube Connect MDx 에서 PAXgene Blood RNA Kit 의 3개의 다른 로트(1, 2, 3)를 사용하여 RNA 를 정제했습니다. 모든 개별 검체의 유전체 DNA 양(w/w)이 모든 작업자-로트 조합에 대해 표시되어 있습니다.

PAXgene Blood RNA System 을 사용하는 자동 RNA 분리 프로토콜은 재현성과 반복성이 높은 RT-PCR 결과를 제공하므로 임상 진단 검사에 아주 안정적으로 사용할 수 있습니다.

분리된 RNA 의 안정성

PAXgene Blood RNA Kit 를 사용하여 혈액이 채워진 PAXgene Blood RNA Tubes 에서 분리한 RNA 샘플은 -20°C 에서 5년, -70°C 에서 7년 동안 안정적입니다(연구 일차 평가변수).

중요 참고사항

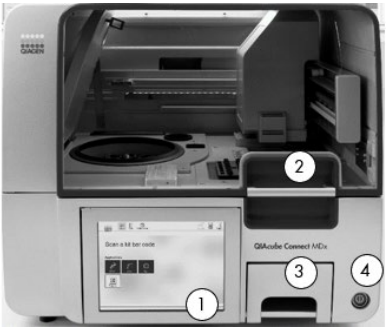
QIAcube Connect MDx 사용

QIAcube Connect MDx 기기 작동을 반드시 숙지해야 합니다. 자동 PAXgene Blood RNA 프로토콜을 시작하기 전에 안전성 정보에 세심한 주의를 기울여 기기와 함께 제공되는 기기 사용자 설명서 및 추가 정보를 읽어 보십시오.

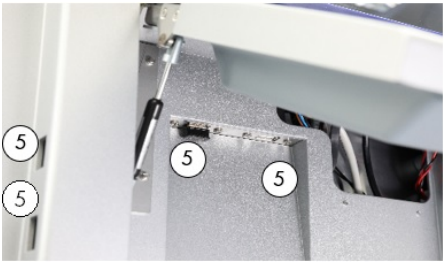
QIAcube Connect MDx 시작

QIAcube Connect MDx 후드를 닫고 전원 스위치로 기기를 켭니다(61페이지, 그림 15 참조).

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



QIAcube Connect MDx 정면도



꺼내진 터치스크린

QIAcube Connect MDx 후면도(왼쪽)

QIAcube Connect MDx 후면도(오른쪽)

그림 15: QIAcube Connect MDx 의 외부 구조.

1. 터치 스크린
2. 후드
3. 폐기물 드로워
4. 전원 스위치
5. 터치스크린의 좌측에 있는 USB 포트 2개, 터치스크린 뒤에 있는 USB 포트 2개(Wi-Fi 모듈이 USB 포트 1개에 꽂혀 있음)
6. RJ-45 이더넷 포트
7. 전원 코드 소켓
8. 냉각 공기 배출구

터치 스크린

QIAcube Connect MDx 는 터치 스크린을 사용하여 제어합니다. 사용자가 터치스크린을 사용하여 기기를 작동하고 작업대를 설정할 수 있습니다. 검체 처리 동안, 터치 스크린에 프로토콜 상태와 남은 시간이 표시됩니다.

그림 16: QIAcube Connect MDx 에서 터치스크린을 꺼낸 모습.

QIAcube Connect MDx 에 프로토콜 설치하기

QIAcube Connect MDx 에서 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 용 프로토콜은 **www.qiagen.com** 에서 제공되며 기기와 함께 제공된 USB 스틱에 다운로드해야 합니다. 이 프로토콜들은 USB 포트를 통해 기기로 전송됩니다.

USB 포트(터치스크린 측면에 위치, 61페이지, 그림 15 참조)를 통해 QIAcube Connect MDx 를 기기와 함께 제공되는 USB 에 연결할 수 있습니다. 로그 파일 또는 보고서 파일과 같은 데이터 파일 또한 USB 포트를 통해 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 Connect MDx 에 업로드하는 과정에 대한 상세한 정보는 기기의 사용자 안내서를 참조하십시오.

QIAcube Connect MDx 로딩

시간 절약을 위해 장착은 33페이지의 "프로토콜: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 수집된 인간 전혈의 총 RNA 자동 분리"의 10분 원심분리 단계(단계 3 및 5)중 하나 또는 두 단계 중에 수행할 수 있습니다.

시약 병

QIAcube Connect MDx 에서 모든 실행을 실시하기 전에 표 3(64페이지)에 명시된 시약을 시약 병 4개에 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. (64 및 65페이지, 그림 17 및 그림 18,)에 표시된 것처럼 랙을 기기 작업대 위에 장착합니다.

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 Connect MDx 기기에서 실행당 검체 수가 2~12인 경우 RNA 를 최대 7회까지 준비하기에 충분합니다. 일반적으로 키트당 총 50개의 검체를 처리하려면 실행당 검체 수가 적게 실행하는 것은 피해야 합니다. RNA 를 7회보다 많이 준비하려면 마지막 검체를 처리하는 데 완충액 양이 부족할 수 있습니다.

표 3: 시약 병 랙의 위치

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

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

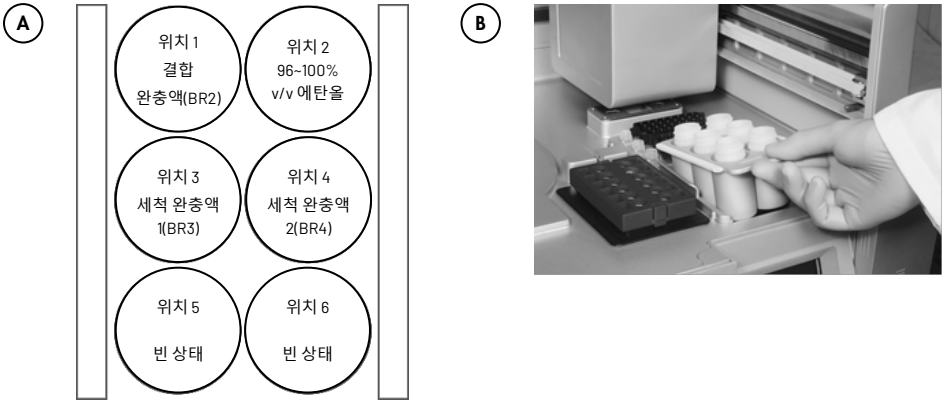


그림 17: 시약 병 랙 로딩. [A] reagent bottle rack 내 병의 위치 및 내용물의 도해. **[B]** 랙을 QIAcube Connect MDx 위에 장착하기.

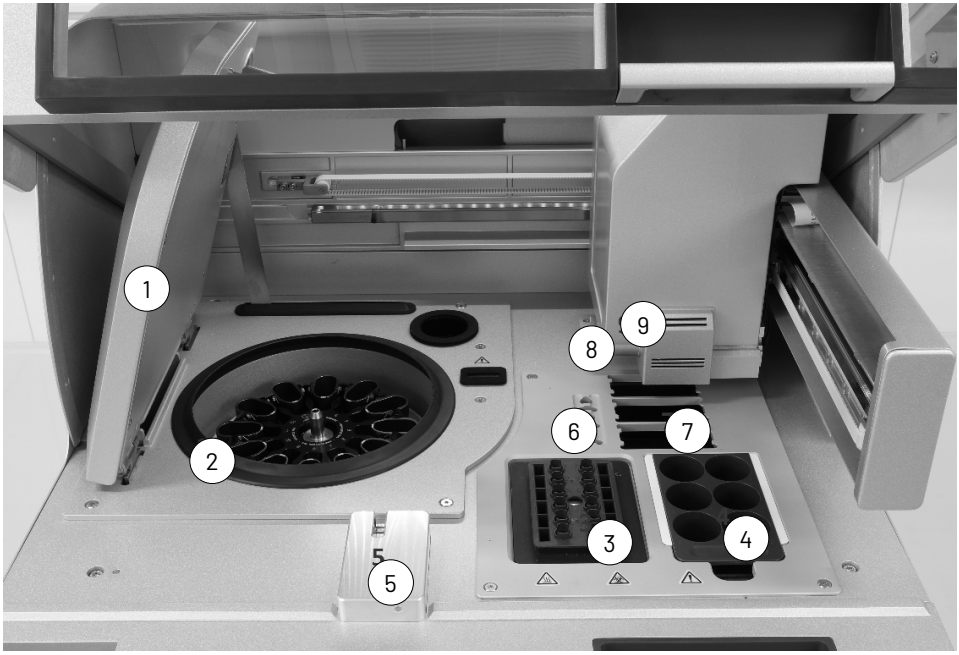


그림 18: QIAcube Connect MDx 의 내부 뷰.

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

스핀 컬럼(PSC, PRC), MCT, QIAcube Connect MDx 플라스틱 용기

필터 팁 1000µL 을 채운 2개의 팁 랙을 QIAcube Connect MDx 위에 장착합니다(65페이지, 그림 18 참조). 필요한 경우에 랙에 팁을 다시 채웁니다.

QIAcube Connect MDx 에 사용할 수 있도록 제작된 1000µL 필터 팁만 사용하십시오.

유성펜을 사용하여 각 검체에 대한 로터 어댑터 및 MCT 에 라벨을 표시합니다. 사용할 PSC 를 열고 가위를 사용하여 뚜껑을 완전히 잘라냅니다(그림 19 참조).

QIAcube Connect MDx 기기 로봇 그리퍼가 제대로 작동하려면 뚜껑과 PAXgene PSC(그림 19 참조)에 뚜껑을 연결하는 모든 플라스틱 부품들을 완전히 제거(절단)해야 합니다. 그렇지 않으면 로봇 그리퍼가 PSC 를 제대로 집을 수 없습니다.

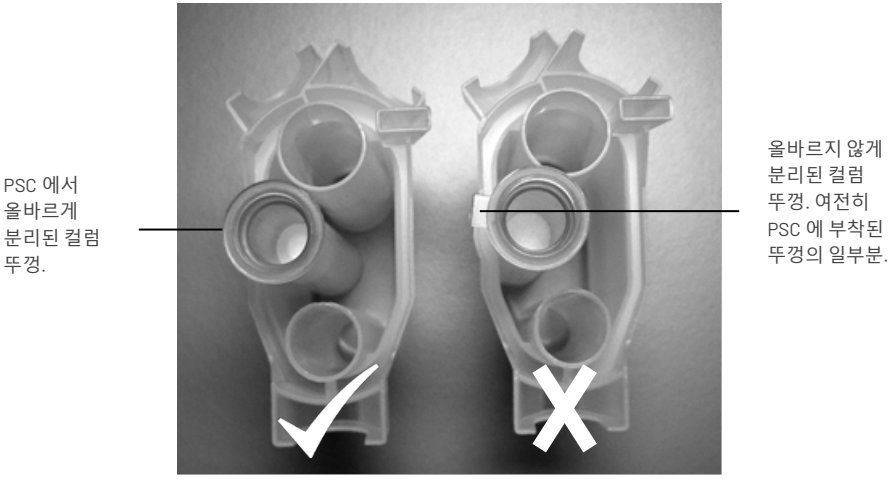


그림 19: PSC 장착. PSC 를 로터 어댑터의 중앙 위치에 로딩합니다. 컬럼을 장착하기 전에 PSC 의 뚜껑을 잘라냅니다.

표 4 및 그림 20에 표시된 것과 같이 PSC(뚜껑 없음, 66페이지, 그림 19 참조), PRC 및 라벨 표시한 MCT 를 라벨 표시한 각 로터 어댑터의 적절한 위치에 로딩합니다.

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

표 4: 로터 어댑터의 플라스틱 소모품

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

* PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 MCT(1.5mL)를 사용하십시오.

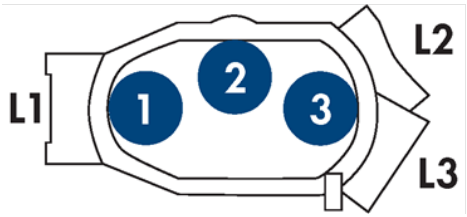


그림 20: 로터 어댑터 내 위치. 로터 어댑터에는 튜브 위치가 3개(1~3), 뚜껑 위치가 3개(L1~L3) 있습니다.

원심분리기 로딩

아래 그림 21에 표시된 것과 같이 조립한 로터 어댑터를 QIAcube Connect MDx 의 원심분리기 버켓에 로딩하십시오.

12개 미만의 검체를 처리하는 경우에는 원심분리기 로터가 방사상으로 균형을 이루도록 로딩해야 합니다(69페이지, 그림 22 참조). 12개 미만의 검체를 처리해야 하는 경우에도 프로토콜 실행을 시작하기 전에 모든 원심분리기 버켓을 장착해야 합니다. 단일 검체 또는 11개 검체는 처리할 수 없습니다.

그림 21: QIAcube Connect MDx 에 원심분리기 로딩. 조립된 로터 어댑터를 원심분리기 버켓에 장착합니다.

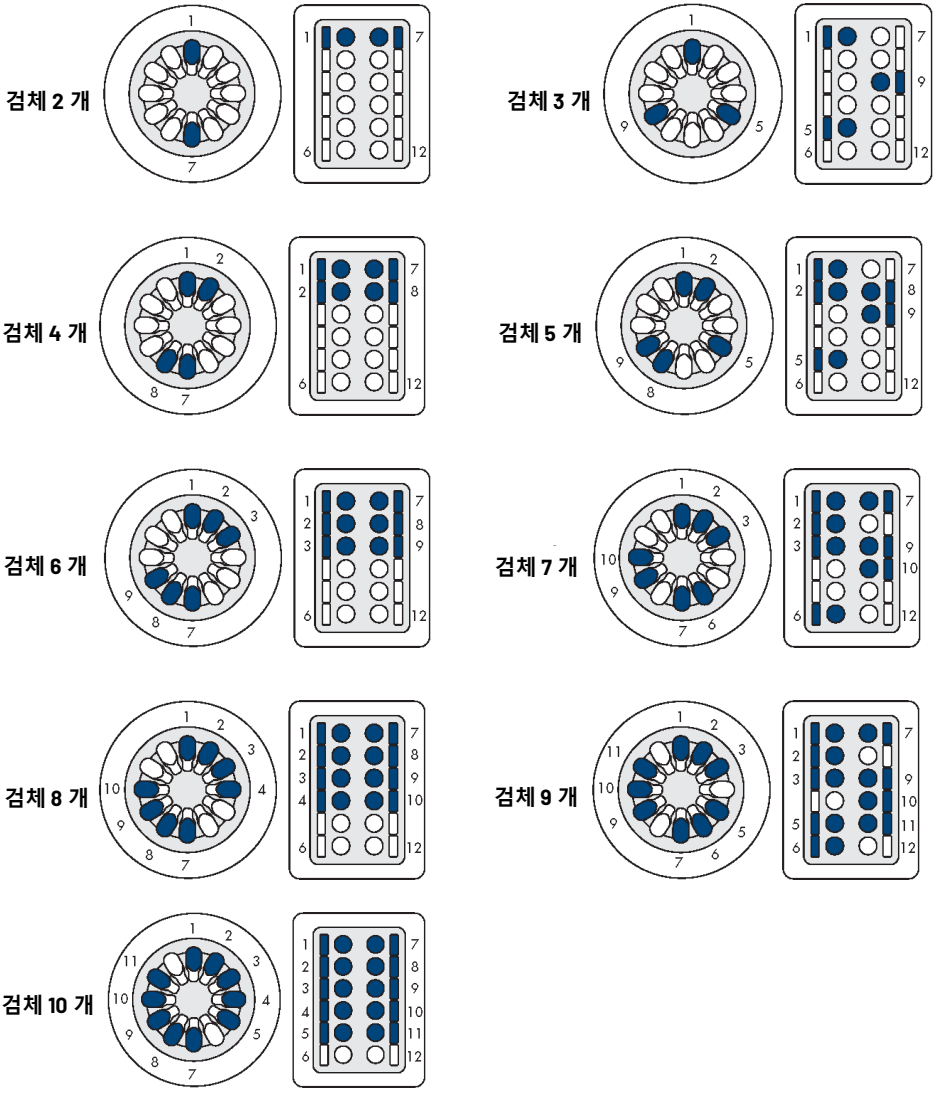


그림 22: 원심분리기 및 쉐이커 로딩. 2개~10개의 검체 처리에 대한 원심분리기 및 쉐이커 위치가 표시되어 있습니다. 한(1) 개 검체 또는 11개 검체는 처리할 수 없습니다. 12개 검체를 처리하려면, 모든 원심분리기와 쉐이커 위치에 로딩합니다(그림에 나와 있지 않음).

처리 튜브

이전 실행에 사용했다가 아직 MCT 슬롯에 남아 있는 PT 를 모두 제거하십시오(65페이지, 그림 18 참조). 실행에서 처리할 검체 수에 따라 표 5에 명시된 시약의 양을 PT 3개에 채웁니다.

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

PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2mL PT 를 사용하십시오. 튜브에 시약 이름을 분명하게 기재한 라벨 표시를 한 후에 표 6(71페이지)에 표시된 MCT 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.

아래 표 5에 명시된 필요한 양만 피펫팅하십시오.

표 5: MCT 슬롯 용의 튜브를 처리하는 데 필요한 시약의 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: MCT 슬롯

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

* PAXgene Blood RNA Kit 에 포함된 2mL PT 를 사용하십시오.

폐기

검체 채취 및 수동 RNA 분리 후 안전한 폐기를 위해서는19 및 20페이지의 안전성 정보 및 주의 사항을 각각 참조하십시오.

또한 QIAcube Connect MDx 를 사용하여 자동으로 RNA 를 분리한 경우 68 및 69페이지의 그림 21 및 그림 22를 참조하여 각각 사용한 팁과 폐기용 컬럼의 전용 슬롯을 표시합니다.

참고 문헌

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883-90.

Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Organization for Standardization (2019) Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Part 1: Isolated cellular RNA (ISO Standard No. 20186-1:2019).

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.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움을 드릴 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 기꺼이 답변해드립니다(연락처 정보는 마지막 페이지를 참고하거나 **www.qiagen.com** 을 방문해주십시오).

	의견 및 제안
RNA 분해	
a) RNase 오염	절차 중에 또는 나중에 취급할 때 RNase 가 시약에 유입되지 않도록 주의하십시오(부록 A, 79페이지 참조).
낮은 RNA 수율	
b) PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 혈액이 2.5mL 미만	PAXgene Blood RNA Tube(BRT; *PAXgene Blood RNA Tube 안내서* 참조)에 2.5mL 혈액을 수집하십시오.
c) RNA 농도를 물에서 측정	정확한 정량화를 위해 RNA 를 10mM Tris-HCl, pH 7.5*로 희석해야 합니다(부록 B, 80페이지 참조).
d) 수동 프로토콜 단계 9 및 10에서 PRC 에 옮겨진 세포 찌꺼기	수동 프로토콜의 단계 7에서 피펫으로 상층액을 옮길 때 큰 입자를 옮기지 마십시오(작은 찌꺼기를 옮기는 것은 절차에 영향을 주지 않음).
e) 단계 3에서 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.

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

	의견 및 제안
f) 혈액을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 후에 2시간 미만으로 배양합니다	혈액을 PAXgene Blood RNA Tube(BRT)에 수집한 후 최소 2시간 동안 배양하십시오.
낮은 A_{260}/A_{280} 값	
g) A_{260}/A_{280} 측정을 위해 RNA 를 희석할 때 물을 사용	순도를 측정하기 전에 RNA 를 희석할 때는 10mM Tris-HCl, pH 7.5를 사용하십시오*(부록 B, 80페이지 참조).
h) 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않음	측정할 검체와 동일한 비율의 용출 완충액(BR5) 및 10mM Tris-HCl, pH 7.5로 구성된 공시료를 사용하여 분광 광도계를 영점 조정하십시오. 용출 완충액(BR5)은 220nm 에서 흡광도가 높으므로 분광 광도계를 제대로 영점 조정하지 않으면 배경 흡광도가 높아질 수 있습니다.
기기 고장	
i) QIAcube Connect MDx 기기가 제대로 작동하지 않음	문제 해결 절에 세심한 주의를 기울여 *QIAcube Connect MDx 사용자 설명서*를 읽어 보십시오. 사용자 설명서에서 설명된 대로 기기를 올바르게 유지보수하십시오.

* 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.

기호

사용 설명서 또는 포장물 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다. 키트 내용물(6페이지)에 추가 기호가 설명되어 있습니다.

기호	기호 정의
V<N1>	제품의 <N1>버전
<N2>	<N2>회 검사에 충분한 시약 포함
	사용 설명서 참조
	사용 기한
IVD	체외 진단용 의료 기기
REF	카탈로그 번호
LOT	로트 번호
MAT	물품 번호
COMP	구성품
NUM	수
KU	Kunitz 단위
ADD	추가
CONT	내용물

RCNS	재구성됨
DNase	데옥시리보뉴클레아제 I
EtOH	에탄올
GITC	구아니딘 이소티오시아네이트
RNase-Free DNase Set	RNase 불포함 DNase 세트
GTIN	국제 거래 단위 번호
	온도 제한
	온도 상한
	제조업체
EC REP	규정에 따른 유럽 공인 대리인(EU) 2017/746
	중요 참고사항
	에탄올 추가
CE	CE 마크입니다. 이 제품은 체외 진단 의료 기기에 대한 유럽(EU)2017/746의 요구 사항을 충족합니다.
UDI	의료기기 고유식별코드
	주의
	경고: 고온 표면

연락처 정보

QIAGEN 은 당사 기술 지원의 수준이 높고 가용성이 높다는 데 긍지를 느낍니다. 본사의 기술 서비스 부서는 분자 생물학과 PreAnalytiX 제품의 사용에 대해 방대한 실무적 이론적 전문기술을 갖춘 숙련된 과학자들로 구성되어 있습니다. PAXgene Blood RNA Kit 에 대해 질문이 있으면 주저 없이 문의해 주십시오.

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

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. 분리 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 결정해야 합니다. 유의성을 보장하기 위해서는 측정치가 분광 광도계의 선형 범위 내에 속해야 합니다. 260nm 에서 1유닛의 흡광도는 mL 당 RNA 44µg 에 해당합니다(A_{260} = 1 ⇒ 44µg/mL). 이 관계식은 10mM Tris-HC pH 7.5 * 에서의 측정치에만 유효합니다. 따라서 RNA 검체를 희석해야 한다면, 희석은 10 mM Tris-HCl 로 수행해야 합니다. 아래에 논의하는 바와 같이(81페이지, 'RNA 의 순도' 참조) 260nm 및 280nm 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.

RNA 검체 부피 = 80µL

희석(1/15) = RNA 검체 10µL + 140µL 10mM Tris-HCl, pH 7.5

큐벳 내 희석 검체의 흡광도 측정(RNase 불포함).

A_{260} = 0.3

검체 농도 = 44 × A_{260} × 희석 배수

= 44 × 0.3 × 15

= 198µg/mL

총수율 = 농도 × 검체 양(밀리리터)

= 198µg/mL × 0.08mL

= 15.8 µg RNA

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

RNA 의 순도

260 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 7.5에서 흡광도를 측정할 것을 권장합니다. 순수한 RNA 는 A_{260}/A_{280} 비율이 10mM Tris-HCl, pH 7.5에서 1.8~2.2입니다. 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 스토퍼가 풀릴 때까지만 다른 손의 엄지로 밀어 올립니다.
2. 마개를 들어 올리기 전에 엄지를 다른 곳으로 치웁니다. 엄지로 PAXgene Blood RNA Tube(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 풀리자 마자 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 스토퍼로부터 분리되는 경우에도 마개를 재조립하지 마십시오. 고무 스토퍼를 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. 스토퍼가 다시 완전히 자리를 잡을 때까지 비틀면서 강하게 아래로 누르십시오. 취급 중 PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)에 마개가 단단히 유지되려면 스토퍼를 완전히 다시 삽입해야 합니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene 스핀 컬럼, 50 Shredder 스핀 컬럼, 처리 튜브, RNase-Free DNase I, RNase-Free 시약 및 완충액. PAXgene Blood RNA Tubes 와 함께 사용	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100개 채집 튜브	762165
QIAcube 에서 자동으로 RNA 를 분리하기 위해 QIAGEN 에서 주문할 수 있는 관련 제품		
Starter Pack, QIAcube	팩 구성품: reagent bottle rack(3); 랙 라벨링 스트립(8); 200µL 필터 팁(1024); 1000µL 필터 팁(1024); 1000µL 필터 팁, 넓은 내경(1024); 30mL 시약 병(18); 로터 어댑터(240); rotor adapter holder	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	멸균 1회용 필터 팁, 랙	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	뚜껑이 있는 시약 병(30mL); 6개 들이 팩; QIAcube reagent bottle rack 과 함께 사용	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	240회분: 1회용 로터 어댑터 240개, QIAcube 기기와 함께 사용	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube 작업대에서 6 x 30mL 시약 병을 수용하는 랙	9026197
Rotor Adapter Holder	1회용 로터 어댑터용 홀더 12개, QIAcube 와 함께 사용	990392

제품	목차	카탈로그 번호
PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)*에서 사용할 혈액 수집을 위해 BD 에서 주문할 수 있는 관련 제품		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0.75인치(0.8 × 19 mm) 바늘, 루어 어댑터가 있는 12인치(305 mm) 튜브; 상자당 50개, 케이스당 200개	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 3/4인치(0.8 × 19mm) 바늘, 12인치(305mm) 튜브(루어 어댑터 포함). 상자당 50개, 케이스당 200개	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	케이스에는 13 mm 및 16 mm 직경만 해당; 케이스당 1000개	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	적색 BD Hemogard 마개 및 종이 라벨이 있는 13 × 75mm 4.0mL 서랍, 상자당 100개, 케이스당 1000개	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	투명 BD Hemogard 마개 및 투명 라벨이 있는 13 × 75mm 3.0mL 서랍, 상자당 100개, 케이스당 1000개	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	투명 BD Hemogard 마개 및 종이 라벨이 있는 13 × 75mm 3.0mL 서랍; 상자당 100개, 케이스당 1000개	366703

* 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.

문서 개정 이력

날짜	변경 사항
[R1] 2022년 4월	최초 IVDR 발행
[R2] 2023년 2월	PreAnalytiX GmbH 의 도로명 주소를 'Feldbachstrasse'에서 'Garstligweg 8'으로 변경. 주문 정보에 BD 제품을 추가. 안전성 정보 업데이트.

참고

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

Better samples
More to explore

PreAnalytiX
A QIAGEN / BD Company

다음 링크에서 자세히 알아보세요. www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023