

국립중앙인체자원은행

인체자원 정도관리 매뉴얼

2019. 1.



질병관리본부



국립보건연구원

목 차

I. 개요	1
1. 목적	2
2. 적용범위	2
3. 용어정의	2
4. 자원관리자의 안전을 위한 주의사항	4
4.1. 개인정보구 착용	4
4.2. 저장실 출입 시 주의사항	5
II. 자원접수, 검수 및 저장	6
1. 인체자원 접수, 검수 및 저장(신규자원 관리)	7
1.1. 일반사항	7
1.2. 자원접수 및 정보관리시스템 등록	9
1.3. 인체자원 입고	10
1.4. 자원검수	11
1.5. 자원저장(자원실물저장)	13
1.6. 부적합 자원의 처리	14
2. 인체자원 전수 검수(기존 저장자원 관리)	17
2.1. 일반사항	17
2.2. 자원검수	18
2.3. 불일치 유형별 조치방법	20
2.4. 불일치 정보의 수정	20

3. 인체자원 백업 및 백업은행 운영	22
3.1. 일반사항	22
3.2. 백업은행 운영	22
3.3. 백업자원의 출고 및 이송(증양은행 처리절차)	28
3.4. 백업자원의 입고 및 저장(백업은행 처리절차)	30
3.5. 백업자원 폐기	32
4. 인체자원 폐기	34
4.1. 일반사항	34
4.2. 기증자의 요청에 의한 폐기	34
4.3. 자원의 품질 이상 발생에 의한 폐기	35
4.4. 인체유래물의 폐기절차	35
4.5. 인체자원 정보관리시스템 내 폐기 자원 등록	36
Ⅲ. 인체자원 종류별 정도관리	37
1. 체액(혈청, 혈장, 뇨)자원 정도관리	38
1.1. 일반사항	38
1.2. 자원종류 불일치 확인	39
1.3. 체액자원의 품질 안정성 평가를 위한 임상화학 검사	40
1.4. 체액자원의 대사체 및 단백질 모니터링을 위한 오믹스 분석방법	41
1.5. 체액자원 관리를 위한 효소결합 면역침강 분석법(ELISA)	42
2. DNA 정도관리	45
2.1. 일반사항	45
2.2. 정도관리용 DNA 준비	46
2.3. DNA 순도 및 정량 분석	49

2.4. DNA 안정성(stability) 검사	54
2.4.1. Agarose gel 전기영동법	54
2.4.2. 전자동 미세관 전기영동법(Fragment Analyzer)	60
2.4.3. Long-PCR법(β -globin gene PCR)	67
2.5. 미생물 오염 검사	69
2.6. 부적합 DNA의 처리	73
3. RNA 정도관리	74
3.1. 일반사항	74
3.2. 정량 분석(RNA 농도측정)	75
3.3. RNA 전기영동	75
3.4. RIN(RNA Integrity Number)값 측정	77
3.5. RNA 정도관리 결과 확인	80
4. 세포자원 정도관리	81
4.1. 일반사항	81
4.2. 세포해동(Thawing)	84
4.3. LCL 계대배양	86
4.4. 세포주/세포생존율 확인	89
4.5. 세포자원 오염 확인	92
4.6. 정도관리 부적합 세포자원의 처리	93
Ⅳ. 인체자원 식별 분석	95
1. 일반사항	96
2. 분석시료 준비	97
2.1. 혈액자원 식별을 위한 DNA 추출	97
2.2. 혈청자원 식별을 위한 DNA 추출	99

2.3. 혈장자원 식별을 위한 DNA 추출	100
2.4. 뇨자원 식별을 위한 DNA 추출	102
3. Alphoid Repeat PCR: 성별 확인 검사	104
4. STR(Short Tandem Repeat): DNA genotyping	111

V. 시험장비 관리 118

1. 일반사항	119
2. Micropipette	121
3. NanoDrop	124
4. 시퀀서(3730 Sequencer)	126
5. 전자동 모세관 전기영동장치(Fragment Analyzer)	131
6. Bioanalyzer	135
7. 생물안전작업대(Biosafety Cabinet, BSC)	138
8. UV transilluminator	142
9. Cell counter	144

< 별지서식 > 146

[별지 제1호서식] 인체자원 전달 내역서	146
[별지 제2-1호서식] 인체자원 접수 확인서(기탁용)	147
[별지 제2-2호서식] 인체자원 접수 확인서(위탁용)	148
[별지 제3호서식] 인체유래물등(검사대상물) 관리대장	149
[별지 제4호서식] 인체자원정보 수정 요청서	150
[별지 제5호서식] 인체자원 반송 신청서	151
[별지 제6호서식] 인체자원 반송 확인서	152
[별지 제7호서식] 백업자원 보관 저장실 일일 안전 점검표	153
[별지 제8호서식] 백업자원기계식냉동고 점검표	154

[별지 제9호서식] 백업자원액체질소냉동고 점검표	156
[별지 제10호서식] 백업자원저장장비 경고시스템 알람 내역(백업은행용)	158
[별지 제11호서식] 백업자원 전달 내역서	159
[별지 제12호서식] 백업자원 전달 상세내역서	160
[별지 제13호서식] 인체자원 기증철회 신청서	161
[별지 제14호서식] 인체자원 폐기(요청/사유)서	162
[별지 제15호서식] 인체자원 폐기결과 통지서	163
[별지 제16호서식] β -globin PCR 정도관리 결과서	164
[별지 제17호서식] 세포배양 정도관리 결과서	165
[별지 제18호서식] 시험장비 사용일지	166
[별지 제19호서식] 시험장비 이력카드	167
[별지 제20호서식] Cell counter 내부점검 기록서	168

I. 개요

1. 목적	2
2. 적용범위	2
3. 용어정의	2
4. 자원관리자의 안전을 위한 주의사항	4

1. 목적

이 매뉴얼은 고품질의 인체자원을 확보하기 위해 「질병관리본부 국립중앙인체자원은행 운영·관리 규정(질병관리본부 예규 328호)」(이하, “규정”이라 한다.) 제3장 제9조에 따라 국립중앙인체자원은행(이하, “중앙은행”이라 한다.)에서 수집한 체액, 세포, DNA 등 인체자원을 효율적으로 보존·관리하기 위한 표준화 된 접수·검수·저장 절차 및 정도 관리 방법을 제시하는 것을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 매뉴얼은 중앙은행에 등록된 인체자원의 접수·검수·저장 절차, 정도관리방법, 품질 부적합 자원의 처리방법 등에 관한 사항을 규정하고 있다. 인체유래물을 수집·관리하는 인체유래물은행 및 인체유래물 연구를 수행하는 연구기관은 이 매뉴얼의 해당내용을 준용할 수 있다.

3. 용어정의

- ① “인체자원”이란 개인으로부터 수집된 임상·역학정보와 생명윤리 및 안전에 관한 법률(이하 “생명윤리법”이라 한다) 제2조제11호에 따른 인체유래물 및 이로부터 분석된 유전정보 등을 말한다.
- ② “인체유래물”(人體由來物)이란 생명윤리법 제2조제11호에 따른 인체로부터 수집하거나 채취한 조직·세포·혈액·체액 등 인체 구성물 또는 이들로부터 분리된 혈청, 혈장, 염색체, DNA(Deoxyribonucleic acid), RNA(Ribonucleic acid), 단백질 등 (배아줄기세포는 제외한다. 이하 같다)을 말한다.
- ③ “기탁자부여번호”란 인체자원 기탁(위탁)기관에서 부여한 기증자 식별기호를 말한다.

- ④ “**인체자원관리자**”¹⁾(이하 “**자원관리자**”라 한다)란 중앙은행의 인체자원 수집, 보존, 분양 등에 대한 실무를 담당하는 자를 말한다.
- ⑤ “**등록**”이란 중앙은행에 기증 또는 기탁된 인체자원을 관리하기 위하여 입고 시 중앙은행 내부의 관리체계에 따른 기호를 부여하고 해당 인체자원을 인체자원은 행정보관관리시스템에 입력 또는 기록하는 과정을 말한다.
- ⑥ “**보존**”이란 중앙은행에 등록된 인체자원을 저장하는 일련의 과정을 말한다. 보존 중인 인체자원에 대한 관리 책임은 중앙은행이 가지며, 중앙은행은 타당한 사유 없이 보존 중인 인체자원을 사용, 폐기, 손상시킬 수 없다.
- ⑦ “**접수파일**”이란 인체자원의 보관 및 관리를 위해 필요한 다양한 정보(기증자 기본 정보, 기탁자부여번호, 인체유래물 종류 및 양 정보, 정도관리 결과, SPREC 정보 등)를 기록한 파일을 말한다.
- ⑧ “**인체자원은행정보관관리시스템**(이하 “**정보관리시스템**”이라 한다)“이란 인체자원의 수집, 보존, 관리, 분양 등의 업무를 효율적으로 처리하기 위하여 인체자원 관련 정보(기증자 정보, 자원 입출고 정보, 정도관리 정보 등을 포함한다)를 관리하는 인체자원 정보시스템을 말한다.
- ⑨ “**SPREC(Standard PREanalytical Code)**”이란 인체자원 처리절차(검체유형, 1차 보관용기, 원심분리 전 검체 지연시간, 1차 원심분리조건, 2차 원심분리조건, 원심분리 후 검체 보관 전 지연시간, 장기 보관조건)에 대한 정보를 코드화하여 인체자원 수집과정을 추적할 수 있도록 한 7자리의 표준코드를 말한다.
- ⑩ “**bCODE**”란 인체유래물을 효율적으로 관리하기 위해 기증자의 개인정보를 익명화한 별도의 고유식별기호를 말한다²⁾.
- ⑪ “**기계식냉동고(Mechanical Freezer)**”란 전기를 사용하여 압축기를 작동하고 냉매를 순환시켜 냉동고 내부의 온도를 낮추는 장비를 말하며, 기계식냉동고는 온도에 따라 분류할 수 있다(예, -20℃, -75℃ 기계식냉동고).
- ⑫ “**액체질소냉동고(Liquid Nitrogen Freezer)**”란 진공으로 단열된 냉동고 내부에 액체 질소를 담아두어, 냉동고 내부의 온도를 낮추는 장비를 말하며, 액체질소를 담아두는 방법에 따라 기체형태 혹은 액체형태로 분류할 수 있다.

1) 본 매뉴얼 II.3.에서는 백업은행 자원관리자와 구분하기 위해, 기관명을 같이 표기하여 사용

2) 기증자의 익명화를 위한 기증자bCODE, 저장박스 단위의 관리를 위한 박스bCODE, 저장용기 단위의 관리를 위한 자원bCODE가 있다.

- ⑬ “**크라이오벤치(Cryobench)**”란 인체자원을 검수, 분양, 이동할 때 인체자원의 동결 상태를 유지하기 위해 사용하는 이동형 냉동작업대이다. 드라이아이스 혹은 액체 질소를 사용하여 냉동작업대 온도를 낮춰 인체자원의 온도변화를 최소화한다.
- ⑭ “**국가인체자원백업은행**(이하 “**백업은행**”이라 한다)“이란 규정 제9조제2항에 따라 지정된 인체유래물은행을 말한다. 중앙은행은 천재지변, 화재, 전쟁 등의 유사시를 대비하여 중앙은행 인체자원의 일부를 분산·보관하는 백업은행을 지정할 수 있다.
- ⑮ “**백업자원**”이란 백업은행에 분산·보관하는 중앙은행 인체자원을 말한다.

4. 자원관리자의 안전을 위한 주의사항

4.1. 개인보호구 착용

자원관리자는 사용하는 모든 화학, 물리 및 생물학적 위해물로부터 자신을 보호하고, 저장실 출입 시 안전사고를 예방하기 위해 개인보호구를 갖추고 업무에 임해야 한다(표 I-1-1). 개인보호구 종류 및 사용수칙은 「국립중앙인체자원은행 시설 및 저장장비 표준운영 매뉴얼」 및 「2013 실험실 안전관리 매뉴얼(질병관리본부 생물안전평가과)」을 참고한다.

표 I-1-1. 개인 보호구 종류

종류	용도
실험복, 실험실용 실내화	실험실과 저장실 입실 시 착용
라텍스 글러브	실험실 내 작업 시 착용
크라이오 글러브 초저온용 앞치마	크라이오벤치 내에 드라이아이스 적재 시 착용 기계식냉동고 또는 액체질소냉동고 내 자원 입·출고 시 착용
안면 보호구(보안경, 고글)	액체질소냉동고 내 자원 입·출고 시 착용
청력보호구(귀마개)	저장실 입실 시 착용
개인용 산소농도측정기	액체질소냉동고가 위치한 저장실 내 입실 시 착용

4.2. 저장실 출입 시 주의사항

인체자원을 안정하게 동결보존하기 위해 사용하는 드라이아이스 및 액체질소로 인해 저장실 내부의 산소농도가 정상(21%)보다 낮아질 위험이 있다. 산소 농도가 18% 미만으로 낮아지면 어지러움이나 두통 등의 증상이 나타날 수 있으며 심한 경우 의식을 잃을 수 있으므로, 자원관리자는 저장실 사용 시 다음 사항을 반드시 준수한다.

	확인사항	이상 시 조치방법
저장실 입실 전	<ul style="list-style-type: none"> 저장실 밖에 설치된 산소농도측정기의 산소농도가 18% 이상인지 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 산소농도가 18% 미만인 경우 출입을 금지하고 안전관리자에게 통보
저장실 입실 후	<ul style="list-style-type: none"> 개인 산소농도측정기를 착용, 산소 농도가 18% 이하로 낮아지면 산소 농도측정기의 알람스피커와 알람표시 등이 작동 	<ul style="list-style-type: none"> 산소농도측정기의 알람이 울리면 자원관리자는 즉시 작업을 중단하고, 저장실에서 나와 신선한 공기가 있는 곳으로 이동

II. 인체자원의 보존 및 관리

1. 인체자원 접수, 검수 및 저장(신규자원 관리)	7
2. 인체자원 전수 검수(기존 저장자원 관리)	17
3. 인체자원 백업 및 백업은행 운영	22
4. 인체자원 폐기	34

1. 인체자원 접수, 검수 및 저장 [신규자원 관리]

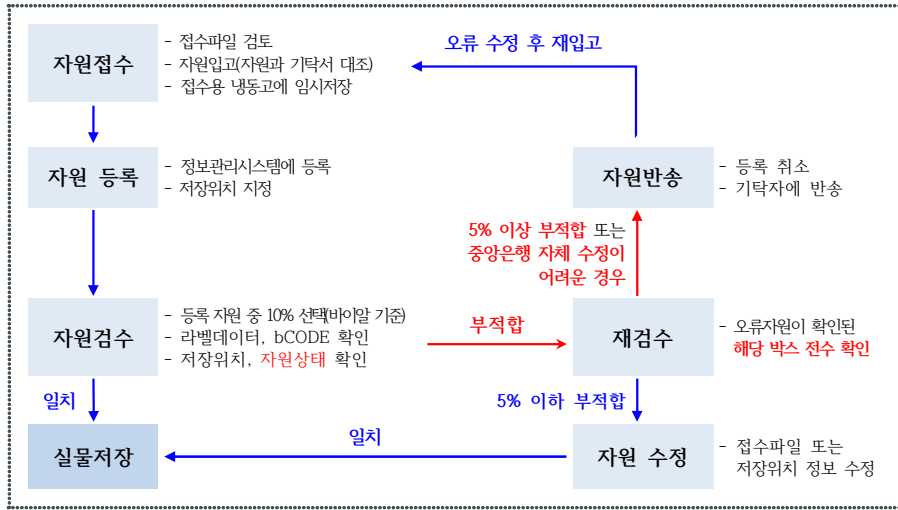
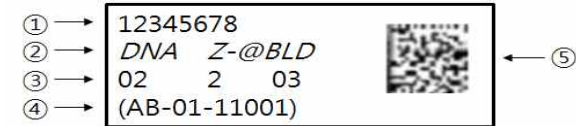


그림 II-1-1. 자원 접수·검수·저장 절차

1.1. 일반사항

- ① 대량의 인체자원을 효율적으로 관리하고 보관 자원에 대한 신뢰를 높이기 위해, 자원의 기본정보(자원 종류, 기탁자부여번호, 기증자bCODE, 저장위치정보 등)를 체계적으로 관리하는 것이 무엇보다 중요하다.
- ② 중앙은행에서는 자원입고 시 1차 검수, 정보관리시스템에 접수파일 등록 및 2차 검수 등 일련의 과정을 통해 자원의 기본정보 및 품질을 확인한다.
- ③ 검수 시 접수파일과 자원 실물간의 정보(인체자원 라벨데이터)를 비교·확인한다. 인체 자원 라벨에는 각 바이알에 대한 자원정보가 기록되어 있으며, 인체자원 라벨에 대한 상세한 내용은 그림 II-1-2와 같다.
- ④ 검수 및 정보관리시스템 등록이 완료된 인체자원은 인체자원의 종류, 연구목적, 연구방법, 저장기간 및 경제성 등을 고려하여 적절한 저장온도에서 안정하게 보존

한다. 중앙은행의 자원별 저장온도는 「국립중앙인체자원은행 인체자원 수집 및 등록 매뉴얼」(이하 “자원수집 및 등록 매뉴얼”)을 참조한다.



구분	상세내용	예시	비고
①	bCODE	은행 식별 코드(2자리), Randomized Sequence Number(6자리)	중앙은행(12)에 기탁한 홍길동(345678)
②	자원종류	자원코드(3자리), 자원상세코드(6자리)	Peripheral Blood에서 DNA를 추출하고, 습식으로 보관 : Z-@BLD
③	자원 특성정보	라벨 출력 회차(2자리), Batch/Aliquot회차(1자리), Vial sequence(2자리)	입고된 DNA자원 중 라벨이 2회차 출력, 2번째 aliquot한 자원 중 3번째 자원
④	기탁자 부여번호	자원 기탁기관에서 부여한 기증자 식별기호	홍길동을 식별하는 코호트의 식별자는 AB-01-11001
⑤	2D 바코드	바코드스캐너를 통해 식별하기 위한 이미지	bCODE(8자리), 자원코드(3자리), 자원특성정보(5자리)로 구성된 총 16자리 코드

그림 II-1-2. 인체자원 라벨

- ⑤ 자원의 온도 상승 및 오염 방지를 위해 다음의 사항을 준수하여 접수 및 검수 절차를 진행한다.
 - 크라이오벤치(Cryobench)에서 작업
 - 바이알 라벨 확인 시 핀셋 등을 사용
 - 요(Urine) 자원과 같이 박스 뚜껑이 없는 자원 취급 시 쏟아지지 않도록 주의
 - 세포자원을 기계식냉동고(-75℃)에서 장기간 보관할 경우 세포생존율에 영향이 미칠 수 있으므로, 접수 당일 검수 처리하고, 검수 후 즉시 액체질소냉동고(-175℃이하)에 보관
- ⑥ 관련 별지서식
 - [별지 제1호서식] 인체자원 전달 내역서
 - [별지 제2호서식] 인체자원 접수 확인서
 - [별지 제3호서식] 인체유래물등(검사대상물) 관리대장

- [별지 제4호서식] 인체자원정보 수정 요청서
- [별지 제5호서식] 인체자원 반송 신청서(자원제작 기관용)
- [별지 제6호서식] 인체자원 반송 확인서(중앙은행용)

1.2. 자원접수 및 정보관리시스템 등록

① 자원관리자는 자원 입고 일주일 전까지 기탁자(자원제작 기관 담당자 포함)로 부터 다음 서식을 수령한다(자원수집 및 등록 매뉴얼의 3.2. 참조).

- ‘인체자원 접수파일’
- 별지 제1호서식의 ‘인체자원 전달 내역서’
- 별지 제2호서식의 ‘인체자원 접수 확인서’

② 자원관리자는 제출된 ‘인체자원 접수파일’이 「자원수집 및 등록 매뉴얼」의 [별첨 2]에 따라 적절하게 작성되었는지를 확인하고, 정보관리자를 통해 정보오류 유무를 확인하고, 검토가 완료되면 정보관리시스템에 등록한다.

③ **(저장고 확인)** 정보관리시스템에 로그인 한다. ‘일괄처리’ → ‘저장고 관리’에서 저장될 자원을 선택하고 냉동고를 선택한다. 냉동고가 선택되어있지 않으면 화면 왼쪽의 ‘신규’를 선택하여 신규냉장고를 추가한다. 해당 저장고의 가용 공간, 저장고의 순서, 저장할 바이알 수를 확인하고, 화면 오른쪽 아래의 ‘저장’ 버튼을 클릭한다(그림 II-1-3).

※ 한 개의 저장고에 여러 종류의 자원을 등록할 수 있으므로 신규 설정 시 이를 고려하여 진행



그림 II-1-3. 저장고 관리

④ **(접수파일 등록)** ‘일괄처리’ → ‘일괄 자원접수데이터’ → ‘파일선택’ → ‘확인’을

선택한다(그림 II-1-4).



그림 II-1-4. 일괄 자원접수

⑤ **(유효성 검사)** 파일이 업로드 되었는지 확인하고, 화면 왼쪽 상단에 ‘엑셀유효성 검사’를 클릭하여 유효성 검사를 실시한다. 화면 중간에 ‘검증완료’가 나타나면 ‘DB유효성 검사 및 일괄처리’를 클릭한다(그림 II-1-5). 정보관리시스템 내 자원 정보의 익명화 처리로 일괄처리에 약간의 시간이 소요되므로 ‘처리현황판’에서 해당 접수파일의 등록여부를 확인한다.

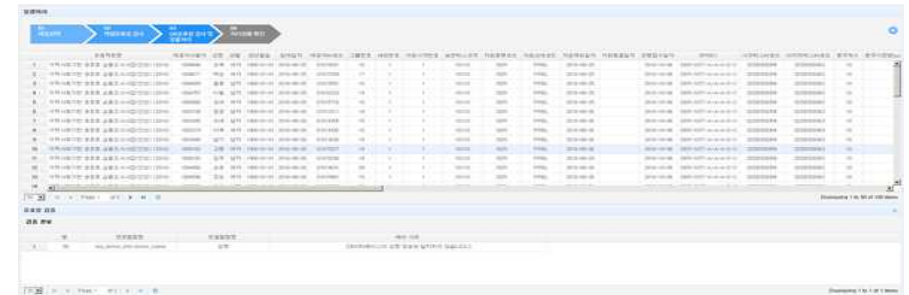


그림 II-1-5. 자원접수 검증 완료

⑥ **(접수파일 오류 확인)** DB유효성 검사 중 오류가 발생하면 접수파일 등록이 중단된다. 이 경우, 처리현황판의 오류내용을 확인하여 오류를 수정하고 ③의 접수파일 등록절차를 다시 진행한다.

1.3. 인체자원 입고

① 자원이 입고되면, 자원관리자는 「자원수집 및 등록 매뉴얼」의 3.3.2.에 따라 1차 검수를 진행한다. 기탁된 인체자원의 바이알 수, 자원상태 등을 확인하고, 별지 제3호서식의 ‘인체유래물등(검사대상물) 관리대장’에 자원종류, 바이알 수, 사업명,

기탁기관 등을 기입한다.

- ② 접수과정에서 부적합 사항이 확인되면, 이 매뉴얼의 'II.1.6.2. 자원의 반송'에 따라 부적합 자원을 반송한다. 기탁기관은 「자원수집 및 등록 매뉴얼」의 '3.1. 인체 자원 접수준비'에 따라 해당자원을 다시 확인하고, 이상이 없을 경우 접수절차를 다시 진행한다.

1.4. 자원검수

- 준비물품 : 크라이오벤치(Cryobench)*, 드라이아이스, 핀셋, 개인보호구(표1-1)
 - 크라이오벤치(Cryobench) 표준운영 매뉴얼(요약)
 - 「국립중앙인체자원은행 시설 및 저장장비 표준운영 매뉴얼」참조
- ① 다음과 같이 크라이오벤치 내부를 사전에 냉각한다.
 - 드라이아이스 적재통을 -75℃ 기계식냉동고에서 4시간 이상 냉각
 - 냉각된 적재통과 드라이아이스를 크라이오벤치에 적재하고, 뚜껑을 덮고 30분 이상 냉각 (크라이오벤치 내부온도 -45℃이하)
 - ② 크라이오벤치가 충분히 냉각되면 적정 수량의 자원박스를 적재한다. 저장박스 규격에 따른 적정 적재량은 다음과 같다.
 - 36hole cryo paper box : 10개 이하
 - 81hole & 100hole cryo box : 20개 이하
 - ③ 업무가 진행되는 동안 드라이아이스 소모량을 확인하고, 냉각 온도를 유지할 수 있도록 부족한 드라이아이스를 보충한다.
 - ④ 업무가 완료되면 남은 드라이아이스를 제거하고, 후속작업을 위해 적재통은 기계식냉동고에 넣어둔다. 크라이오벤치의 카트와 작업 공간 틀을 분리하여 건조 상태를 유지한다.
 - ⑤ 드라이아이스가 승화되면서 CO₂가 발생하므로 작업 중 실내 공기가 잘 순환되도록 해야 하며, 작업 종료 후에는 작업 공간 내 CO₂농도가 높아지지 않도록 충분히 환기 시킨다.

- ① 정보관리시스템에 접수파일 등록이 완료되면, 해당 자원 중 임의로 선택된 10%의 바이알에 대해 저장위치, 자원정보 및 자원상태에 대한 2차 검수를 진행한다.
- ② 크라이오벤치 표준운영 매뉴얼에 따라 최소 검수 30분 전에 드라이아이스를 적재 하여 벤치 내부를 완전히 냉각한 후, 검수할 자원을 준비한다.
- ③ 정보관리시스템에 로그인하여 '뱅킹업무' → '자원검수'를 선택한다. 그림 II-1-6과 같이 "박스바코드를 읽어주세요" 라는 문구가 나오면, 바코드 스캐너로 자원박스 윗면의 박스 바코드를 스캔한다.

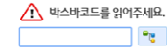


그림 II-1-6. 바코드 자원검수 화면

- ④ 검수량을 '10%'로 설정하고(그림 II-1-7), 검수할 자원이 화면에 표시되면 바코드 스캐너로 해당 자원의 바코드를 스캔한다(그림 II-1-8).



그림 II-1-7. 자원 검수량 설정

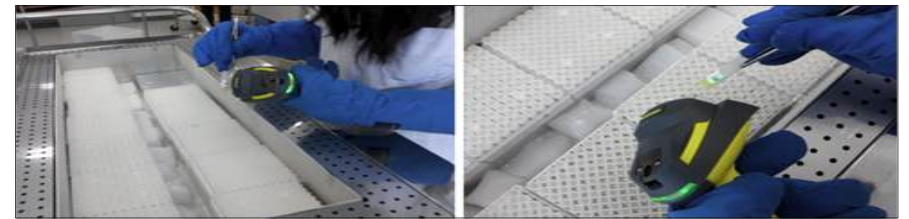


그림 II-1-8. 바코드 검수 모습

- ⑤ 정보관리시스템과 실물의 정보가 일치하면 화면의 홀이 파란색으로 표시되고, 정보가 불일치하면 빨간색으로 표시된다(그림 II-1-9).

33 41026843 SER 058291453	34 41078626 SER 058291454	35 41067922 SER 058291455	36 41058257 SER 058291456
43 41041068 SER 058291463	44 41036787 SER 058291464	45 41074542 SER 058291465	46 41063283 SER 058291466
53 41000679 SER 058291473	54 41070363 SER 058291474	55 41086812 SER 058291475	56 41029340 SER 058291476
63	64	65	66

그림 II-1-9. 검수 화면

- ⑥ 홀이 빨간색으로 표시되면 해당 바이알의 정보를 확인하고, 이 매뉴얼 II.1.6.에

따라 처리한다.

- ⑦ 동일 박스에서 5%이상 불일치 자원이 확인되면, 해당 박스의 바이알 전수를 검수하여 추가 오류가 있는지 확인한다.
- ⑧ 확인된 오류가 수정되지 않으면 다음 박스로 검수가 넘어가지 않으므로 즉시 확인이 불가능한 경우, 자원을 임시저장고에 다시 저장한다.
- ⑦ 검수가 끝난 후, “모든 박스의 검수가 완료 되었습니다”라는 팝업창이 뜨면 ‘확인’을 선택한다.
- ⑧ **(박스번호 기재)** 자원검수가 완료되면 자원기탁서의 박스bCODE와 실물의 박스bCODE를 확인하고, 정보관리시스템화면에 표시된 저장위치를 해당 박스*에 표시한다.

1.5. 자원저장(자원실물저장)

- ① 자원 실물의 2차 검수가 완료되면, 정보관리시스템에 등록된 저장고 위치에 자원을 저장한다.
- ② **(저장위치 지정방법)** 자원은 보존용, 분양용, 백업용으로 나누어 각각 다른 냉동고를 지정하여 보관하는 것을 원칙으로 하며, 박스의 위치는 다음과 같이 배정한다.

- i. 백업대상 코호트의 경우에는 다음과 같이 배정한다.

 - 첫번째 박스 : 보존용 냉동고에 저장위치 배정
 - 두번째 박스 : 백업용 냉동고에 저장위치 배정
 - 나머지 박스 : 분양용 냉동고에 저장위치 배정

ii. 비(非)백업대상 코호트의 경우에는 다음과 같이 배정한다.

 - 첫번째 박스 : 보존용 냉동고에 저장위치 배정
 - 나머지 박스 : 분양용 냉동고에 저장위치 배정

- ③ 백업용 자원은 백업은행으로 운송하기 전까지 백업용 냉동고에서 보관한다(이 매뉴얼의 ‘II.3.3. 백업자원의 출고 및 이송’ 참조).
- ④ 자원의 온도상승을 최소화하기 위해 반드시 크라이오벤치 안에 자원 박스를 적재하여 이동하며, 저장 냉동고 및 Rack의 위치를 확인하고 해당 냉동고에 자원을 저장한다.

1.6. 부적합 자원의 처리

- 임의로 추출한 검수 리스트(접수자원의 10%)에서 정보 불일치 등 부적합 사항이 확인되면, 검수 대상 자원의 박스 전체를 재확인한다. 부적합 사유, 발생 수량 등에 따라 중앙은행에서 자원정보를 수정하거나 해당 자원 전체를 기탁기관으로 반송한다.

1.6.1. 자원정보 수정

- ① 정보 불일치 등 자원정보 수정사항이 발생하면, 해당내용을 기탁자에게 전달·확인하고, 해당 자원에 대한 별지 제4호서식의 ‘인체자원정보 수정 요청서’를 수령한다.
- ② 수정 사유가 기재된 별지 제3호서식의 ‘인체자원정보 수정 요청서’가 접수되면, 중앙은행 자원관리자는 수정사항에 따라 다음과 같이 조치한다.
 - 정보관리시스템에 등록된 자원 정보 수정
 - 정보관리시스템에 등록된 자원 정보 정보관리자에게 수정 요청
 - 인체자원 라벨의 재부착
 - 인체자원 실물 저장위치 수정
- ③ 자원정보 수정이 완료되면 내부보고 후, 요청서는 문서 파일로 철하여 관리한다.

- ※ 검수 오류 외에도 기탁자의 요청에 따라 다음의 자원정보를 수정할 수 있다.
 - 접수파일 작성 오류로 인한 정보 수정(성별, 이름, 생년월일 및 고유식별기호)
 - 기증자에 대한 신규 또는 추적의 구분이 잘못된 경우
 - ※ 자원정보는 추후 연구에 영향을 미칠 수 있는 중요사항이므로, 정보수정 요청 시 반드시 자원 기탁 책임자의 확인(서명)을 받도록 한다.

1.6.2. 자원의 반송

- ① 자원검수를 통해 다음과 같이 부적합 사항이 확인되면 기탁자에게 자원을 반송할 수 있다. 반송된 자원은 기탁기관에서 해당 내용을 수정하여 입고기준에 적합한 자원만 재 입고한다.
 - **(자원정보 불일치)** 자원의 접수(입고 또는 검수) 과정에서 다음과 같이 자원실물 및 자원정보(인체자원 전달내역서 및 접수파일) 간의 불일치 사항을 확인한 경우

- 바이알에 자원이 없거나 바이알 자리가 비어있는 경우
 - 접수파일에 없는 실물이 존재할 경우
 - 접수파일의 정량값, 자원양 및 라벨 정보에 오류가 있는 경우
- (개인정보 포함) 자원 라벨에 개인정보(기증자 성명 등)가 있을 경우
- (자원손상) 자원의 누출 및 바이알(저장용기)이 손상된 경우
- (자원의 해동) 자원이 해동된 상태로 운송된 경우
- (자원의 냉·해동) 자원 바이알 외벽에 얼음 결정이 생성되어 박스 내 바이알이 서로 붙어있는 경우
- (정도관리 부적합) 이 매뉴얼의 자원품질 정도관리절차에 따라 부적합 결과가 확인된 경우

- * 입고된 자원의 5% 이하이면 해당 건만 반송
- * 5% 이상일 경우 같은 날에 입고된 해당 사업의 전체 자원을 반송

- ② 중앙은행 자원관리자는 별지 제6호서식의 ‘인체자원 반송 확인서’를 작성하고, 내부 보고 한다. ‘인체자원 반송확인서’ 원본과 해당 자원을 기탁기관으로 반송한다.
- ③ 정보관리시스템에서 반송 처리를 한다. 기탁자부여번호로 반송자원 검색 후 냉동 카트에 저장한다. ‘뱅크업무’ → ‘반송폐기’ → ‘신규’를 선택 한 후, 냉동카트를 선택하고 반송 사유를 선택한 후 저장한다(그림 II-1-10).



그림 II-1-10. 정보관리시스템에서 반송 처리

※ 검수 오류 외에도 기탁자의 요청에 따라 자원을 반송할 수 있으며, 절차는 다음과 같다 (그림 II-1-11).

- ① 기탁자로부터 ‘인체자원 반송 신청서’(별지 제5호서식)를 접수하여 내부 검토 한다.
- ② 반송 할 자원을 검수하고, 중앙은행에서 ‘인체자원 반송 확인서’(별지 제6호서식)를 작성한다.
- ③ ‘인체자원 반송 확인서’ 원본과 함께 해당 자원을 제작기관으로 반송한 후, 오류가 수정되면 자원을 재입고 한다.

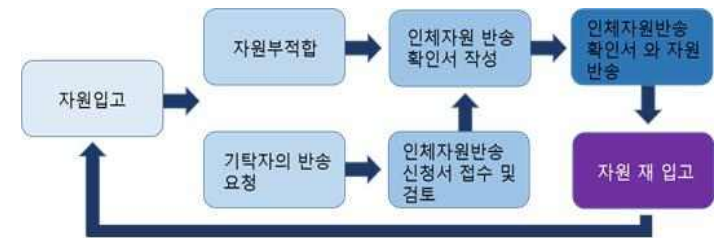


그림 II-1-11. 자원반송 절차

2. 인체자원 전수 검수 [기존 저장자원 관리]

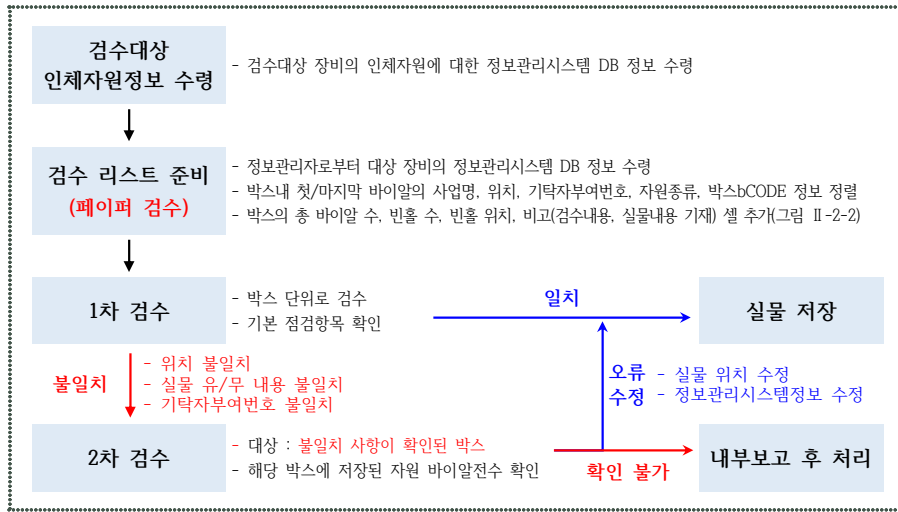


그림 II-2-1. 인체자원 전수 검수 모식도

2.1 일반사항

① 중앙은행 인체자원에 대한 신뢰도 향상 및 인체자원과 저장장비의 효율적 운영·관리를 위해 정보관리시스템과 인체자원 실물 간의 정보가 일치하는 것은 매우 중요하다. 자원관리자는 지속적인 확인을 통해 중앙은행 인체자원에 대한 신뢰도를 확보해야 한다.

② 실물과 정보간의 불일치가 발생하는 다음의 주요 원인을 참고하여 검수 대상 자원을 선정하고, 해당자원이 위치한 저장장비에 대한 전수 검수를 주기적으로 실시한다.

- 정보관리시스템의 자원정보를 다른 DB로 이관한 경우
- 대량의 인체자원을 다른 저장장비로 이동한 경우(단, 임시 이동하는 경우는 제외)
- 인체자원의 분양, 정도관리 등으로 인체자원 출고 시 불일치 사항이 확인된 경우
- 저장장비의 빈 공간에 대한 정리가 필요한 경우

③ 전수 검수는 다음 두 단계로 나누어 진행한다.

구분	1차 검수(기본 점검항목)	2차 검수(불일치 내용 확인)	비고
검수 대상	검수 대상 냉동고에 저장된 박스 전수	1차 검수 중 불일치 사항이 확인된 자원 박스에 저장된 바이알 전수	필요시 해당 기탁일에 입고된 모든 자원에 대한 검수 진행
점검 내용	<ul style="list-style-type: none"> 프로젝트명 첫/마지막 바이알의 기탁자부여번호 박스 내 바이알 개수 비어있는 홀의 개수 비어있는 홀의 위치 	<ul style="list-style-type: none"> 박스 내 전체 기탁자부여번호 자원저장위치 성명 앞 두 글자(해당시) BANK 번호(해당시) 자원 종류 	

2.2. 자원검수

① 검수 대상 저장장비의 인체자원에 대한 정보관리시스템 DB 정보(위치, 프로젝트명, 기탁자부여번호, BANK 번호, 성명(앞 두 글자), 자원종류, 박스bCODE, 자원 bCODE)를 정보관리자에게 요청한다.

② 정보관리자로부터 수령한 인체자원 정보를 검수에 필요한 정보가 포함되도록 다음과 같이 정리하고, 페이퍼 검수를 위한 리스트를 출력한다.

- **1차 검수** (그림 II-2-2. 참조) : 위치, 프로젝트명, 박스bCODE, 박스 내 첫 번째 /마지막 바이알 기탁자부여번호, 박스 내 바이알 전체 개수, 빈 홀 개수, 빈 홀 위치, 비교란

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	자랑고	학	박스	tube_number	project_name	st_bcode	h_num	바이알 수	빈 홀 수	빈 홀 위치	비고
1	MF063	FR001	SB001	1	반외 사업 (2001)	0158949808	311406	81	0		
2	MF063	FR001	SB001	81	반외 사업 (2001)	0158949808	311486	81	0		
3	MF063	FR001	SB002	2	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949809	85-01-01-19	80	1	1	
4	MF063	FR001	SB002	81	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949809	87-02-01-27	80	1		
5	MF063	FR001	SB003	1	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949810	87-02-01-29	81	0		
6	MF063	FR001	SB003	81	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949810	87-01-01-47	81	0		
7	MF063	FR001	SB004	1	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949811	87-01-01-48	81	0		
8	MF063	FR001	SB004	81	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949811	83-01-01-16	81	0		
9	MF063	FR001	SB004	81	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949811	83-01-01-16	81	0		
10	MF063	FR001	SB004	81	통역면역도조사 사업 (2000)	0158949811	83-01-01-16	81	0		

그림 II-2-2. 1차 검수 리스트 예시

- **2차 검수** (그림 II-2-3. 참조) : 위치, 프로젝트명, 박스 내 전체 바이알 기탁자 부여번호, BANK 번호, 성명(앞 두 글자), 자원 종류, 박스bCODE

	위치			프로젝트명	기탁자부여 번호	BANK번호	성명	자원종류	박스bCODE	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	storage	rack	box	tube	project_name	h_num	kbn_donor	donor_name	sample_code	st_bcode
83	MF058	FR001	SB002	1	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-093	01030278	장자	SER	01S8947930
84	MF058	FR001	SB002	2	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-094	01030279	장재	SER	01S8947930
85	MF058	FR001	SB002	3	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-095	01030280	임종	SER	01S8947930
86	MF058	FR001	SB002	4	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-096	01030281	서창	SER	01S8947930
87	MF058	FR001	SB002	5	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-097	01030282	최순	SER	01S8947930
88	MF058	FR001	SB002	6	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-098	01030283	하일	SER	01S8947930
89	MF058	FR001	SB002	7	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-099	01030284	이주	SER	01S8947930
90	MF058	FR001	SB002	8	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-100	01030285	이준	SER	01S8947930
91	MF058	FR001	SB002	9	브루셀라 신태조사 사업 (2001)	12-46-1-101	01030286	이수	SER	01S8947930

그림 II-2-3. 2차 검수 리스트 예시

③ 인체자원의 온도 상승을 최소화하기 위해 검수 시 반드시 크라이오벤치를 사용한다. 크라이오벤치 표준운영 매뉴얼에 따라 검수 시작 30분 전에 드라이아이스 또는 액체질소를 사용하여 내부를 완전히 냉각한다(준비물품 및 크라이오벤치 사용법은 이 매뉴얼의 'II.1.4. 자원검수' 참조).

④ 검수대상 인체자원을 크라이오벤치로 이동한다.

⑤ **(1차 검수)** 다음 순서에 따라 검수 리스트와 자원 실물 정보를 대조한다.

- 박스 뚜껑에 표기 된 **사업명 및 박스bCODE**를 확인한다.

※ 다음 사항은 해당 사업의 관리자 또는 정보관리자를 통해 자원정보에 대해 추가 확인한다.

- ① 동일한 프로젝트이지만 이름이 다르게 기재되어 있는 경우
ex) 실물 - '국건영 05년도'는 정보 - '국민건강영양조사 사업 3기'와 같음
- ② 정보관리시스템 정보 정제로 인해 박스bCODE가 변경된 경우

- 박스 내 첫 바이알과 마지막 바이알의 **기탁자부여번호** 일치 여부를 확인한다. 기탁자부여번호의 확인이 불가능한 경우, BANK 번호 또는 성명(앞 두 글자)을 확인한다. 정보가 일치하지 않으면, 검수 리스트의 비고란에 기재한다.
- 박스 내 전체 바이알 수, 자원이 없는 홀의 수 및 위치 정보의 일치 여부를 확인한다.

⑥ **(2차 검수)** 불일치 항목이 있는 경우, 박스 내 전체 바이알에 대해 기탁자부여번호 및 위치를 확인한다. 해당 박스의 자원이 검수 리스트와 일치하지 않는 경우, 그 박스에 해당하는 '인체자원기탁서'를 확인하고 기탁서에 기재되어 있는 박스 전체를 추가로 확인한다.

⑦ 확인된 불일치 유형을 분류하고, 이 매뉴얼 II.2.3.에 따라 해당 자원을 처리한다.

2.3. 불일치 유형별 조치방법

표 II-2-1. 정보 불일치 유형

연번	불일치 유형	확인사항	처리방법
1	위치 불일치	<ul style="list-style-type: none"> 접수파일 상의 자원 기탁자부여번호 순서 확인 기탁서의 박스 번호bCODE 순서 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 정보관리시스템 정보 수정 실물 위치 이동
2	실물 유무 정보 불일치	<ul style="list-style-type: none"> 접수파일 확인 분양·반송·폐기 내역 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 정보관리시스템 정보 수정 실물 추가 폐기
3	식별번호 불일치	<ul style="list-style-type: none"> 접수파일 확인 정보 수정 요청 내역 확인 박스 간 또는 박스 내 바이알 위치 이동으로 해결이 가능한지 확인 기탁자 또는 사업관리자(자체수집)에 이력 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 실물 위치 이동 정보관리시스템 정보 수정 자원 라벨 재부착

① 일반적으로 발생하는 불일치 유형은 표 II-2-1과 같다. 유형에 따라 확인사항(접수, 분양, 반송, 폐기 이력 등)을 점검하여 불일치 발생 원인을 파악한다.

② 불일치 원인을 내부보고 한 후, 확인된 오류를 수정한다. 일반적으로 정보관리 시스템 정보 변경, 실물자원의 위치 변경, 자원 라벨 재부착하여 자원의 불일치 정보를 수정한다.

③ ②에서 불일치 발생 원인을 파악하지 못한 경우, 내부 논의를 통해 처리방법을 결정한다.

2.4. 불일치 정보의 수정

2.4.1. 인체자원 정보관리시스템 정보 수정

2.4.1.1. 저장위치정보 수정

- ① 정보관리시스템에서 '일괄처리'를 통해 수정하며, 변경할 자원의 '인체자원:기본_키', 수정되는 '박스bCODE'와 '홀 번호' 정보가 포함된 파일을 준비한다.
- ② 파일이 준비되면, 정보관리시스템에 로그인 후, '일괄처리' → '파일처리' → '외부 데이터/파일' → '저장'을 선택하여 일괄처리 한다.

2.4.1.2. 실물 유무정보 수정

- ① 분양 처리가 누락된 경우, 정보관리시스템에 로그인 후, ‘스마트 검색’ → 처리할 자원 bCODE로 검색 → 검색 결과 냉동카트로 저장 → ‘뱅크업무/자원분양’ → ‘분양 과제’ → 카트 모양 클릭 → 자원 불러오기 → ‘저장’을 선택하여 분양처리 한다.
- ② 분양된 자원으로 추정되는 경우 정보관리시스템에서 가상 분양 과제 생성하고, 위와 같이 분양 처리 한다.
- ③ 폐기 처리가 누락된 경우, ‘스마트 검색’ → 처리할 자원 bCODE로 검색 → 검색 결과 냉동카트로 저장 → ‘뱅크업무/반송폐기’ → ‘신규’ → 폐기할 자원이 담긴 카트 선택 → 폐기 사유 입력 후 ‘저장’을 선택하여 폐기처리 한다.

2.4.1.3. 기탁자 부여번호 수정

실물 자원의 기탁자 부여번호로 수정해야 하는 경우, 기증자의 추적 여부 및 자원 종류 등을 정보관리자에게 확인한 후, 자원의 정보를 수정한다.

2.4.2. 실물정보 수정

- ① **저장위치 수정** : 정보관리시스템의 정보에 따라 실물의 위치를 재배열한다.
- ② **실물 유무정보 수정**
 - 폐기 요청 자원, 빈 바이알 및 확인 불가 자원의 경우 「인체자원 관리지침」의 ‘3.3 인체자원 폐기 절차’에 따라 폐기한다. 특히 폐기 요청건의 경우 즉시 폐기 처리한다.
 - 정보관리시스템에 정보를 생성해야하는 경우 정보 관리자와 해당 자원을 확인한 후 처리한다.
- ③ **기탁자 부여번호 수정**(자원 라벨 재부착) : 정보관리시스템의 정보로 실물 라벨을 수정해야 하는 경우, 정보관리시스템에서 제공자를 검색하고, ‘제공자 바코드 재출력’으로 라벨을 출력하여 재부착 한다.

※ 실물 수정 시, 반드시 크라이오벤치에서 작업을 진행 하며, 빠른 시간에 작업을 마치도록 한다.

3. 인체자원 백업 및 백업은행 운영

3.1. 일반사항

- ① 이 매뉴얼은 규정 제3장제9조에 따라 국가인체자원백업은행의 시설·장비 및 백업 자원·정보 보관방법 등에 대하여 세부적인 사항을 정함으로써 백업자원을 안전하고 효과적으로 관리하는 것을 목적으로 한다.
- ② 이 매뉴얼은 국가로부터 시설·장비 및 운영예산을 지원 받는 국가인체자원백업은행에 적용된다.
- ③ 관련 별지서식
 - [별지 제3호서식] 인체유래물등(검사대상물)
 - [별지 제7호서식] 백업자원 보관 저장실 일일 안전 점검표(백업은행용)
 - [별지 제8호서식] 백업자원기계식냉동고 점검표(백업은행용)
 - [별지 제9호서식] 백업자원액체질소냉동고 점검표(백업은행용)
 - [별지 제10호서식] 백업자원저장장비 경고시스템 알람 내역(백업은행용)
 - [별지 제11호서식] 백업자원 전달 내역서
 - [별지 제12호서식] 백업자원 전달 상세내역서

3.2. 백업은행 운영

3.2.1. 백업은행 운영 일반사항

- ① **인력**
 - 필요인력 및 역할

인력	담당업무	비고
백업은행 책임자	백업은행 운영 총괄 및 책임	해당기관의 인체유래물은행장
자원관리자	자원의 이송 및 관리, 정보관리	
장비관리자	저장실 및 장비관리	중앙은행에서 실시하는 ‘저장장비 및 저장실 운영’에 대한 교육을 이수한 자원관리자가 업무 병행 가능

- 자원관리자 및 장비관리자는 이 매뉴얼에 따라 업무를 수행 한다. 정기적으로 업무와 관련된 교육을 이수하고 업무능력을 갖추어야 한다.
- 백업은행을 운영하는 인력은 인체자원을 백업하는 목적 및 백업은행 운영에 관한 사항을 숙지하고 있어야 하고, 인체자원의 처리에 관해 숙달된 지식과 기술을 가지고 있어야 한다.

② 중앙은행의 지원 및 관리·감독에 관한 사항

- 중앙은행은 예산의 범위에서 백업은행의 운영에 필요한 기술, 교육, 장비 및 소요 비용 등을 지원할 수 있다.
- 중앙은행은 백업은행이 이 매뉴얼에 따라 은행 운영 및 자원관리를 적절하게 수행 하고 있는지 주기적으로 확인한다. 필요할 경우 현장방문을 통해 점검할 수 있다.

③ 백업은행 운영 및 자원관리 상태가 부적합일 경우 조치사항

- 중앙은행은 해당 백업은행으로의 백업자원 이송을 즉시 중지하고, 백업자원 이송이 중단되는 동안 부적합 사항을 시정하도록 권고한다.
- 백업은행은 부적합 사항에 대하여 즉시 개선 조치하고, 개선사항을 중앙은행에 보고 한다.
- 중앙은행은 개선사항을 점검하고, 적합할 경우 백업자원의 이송을 재개한다.
- 단, 다음과 같은 사유로 개선이 불가능한 상황이라고 판단되면 질병관리본부장은 백업 은행 지정을 취소* 할 수 있다.

* 백업은행의 지정 취소 사유

- 인체유래물은행 허가 기준에 미달한 경우
- 시설미비, 장비관리 부실 등 백업자원의 관리에 문제가 있다고 판단되는 경우
- 중앙은행의 개선 권고사항을 따르지 아니한 경우
- 그 밖에 백업은행 설치 목적에 반하는 중대한 사유가 있는 경우

- 백업은행 지정이 취소되면, 해당 은행은 백업자원, ‘백업자원 상세정보 파일’, 별지 제8호서식의 ‘인체유래물등(검사대상물) 관리 대장’ 및 ‘저장장비 관리대장’ 일체를 중앙은행으로 이관해야 한다.

3.2.2 저장 시설 및 환경

① 저장실 구조

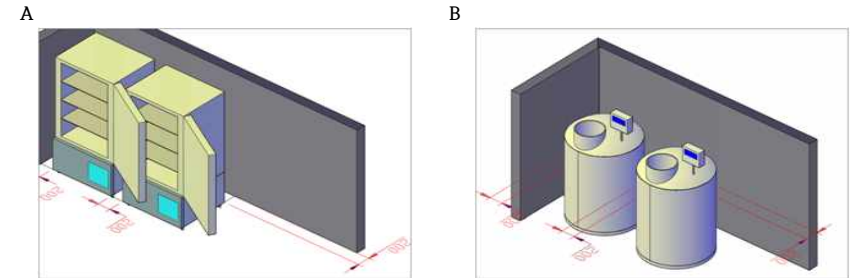


그림 II-3-1 기계식냉동고(A) 및 액체질소냉동고(B) 간격 예시 (최소 20cm)

- 계획된 저장장비와 설비의 하중을 버틸 수 있는 건물 내에 설치한다.
- 통행에 지장이 없도록 내부 공간을 잘 정리하고 동선을 짧게 유지한다.
- 저장장비의 전면 공간은 저장장비 및 검수와 관련한 장비 이동이 가능하도록 최소 1.2m 공간을 유지한다.
- 장비에서 발생하는 열이나 냉기로 인한 손상을 방지하고, 수리 등 필요시 서비스 공간을 확보하기 위해 벽면과 장비사이 간격 및 장비 간 간격은 최소 20cm 이상 적용한다(그림 II-3-1).

② 저장실 기본 설비

- 저장실 출입구와 액체질소냉동고 사용위치에 산소농도측정기*를 설치하며, 산소 농도가 18% 이하 일 때 외기를 공급할 수 있는 환기 시설을 구축한다.

* 저장실 내 산소농도가 18% 이상 되도록 유지한다.

산소 농도가 18% 미만이면 알람이 발생하고, 저장실 출입이 통제될 수 있도록 관리한다.

* 산소농도측정기 센서의 높이는 지면으로부터 1.5미터 높이에 설치한다.

- 기계식냉동고의 발열량을 처리할 수 있는 항온·항습기 혹은 그 이상의 설비를 설치하여, 저장실 내부 온도를 18℃~27℃로 유지한다.

③ 저장실 안전 설비

- 화재에 대비하여 화재경보기, 소화설비, 비상구 표시등, 비상전등을 설치한다.

- 알람발생시 비상연락이 가능한 전화기를 구비, 설치한다.
- 저장실 출입구는 화재 발생 시, 내부에서 열고 나갈 수 있는 방화문을 설치하고 CCTV 및 시건장치를 설치한다.
- 초저온용 보호구(표 1-1-1 참고) 및 응급용 호흡기를 구비한다.
- 액체질소 및 액화탄산가스를 사용할 경우, 잔류량을 확인할 수 있도록 압력계를 저장용기에 장착한다. 전도사고 예방을 위해 모든 가스용기는 전도방지 장치를 설치하여 안전하게 고정시키고, 사용하지 않는 용기는 안전캡을 장착하여 보관한다.



그림 11-3-2. 가스용기 전도 방지 장치

④ 저장실 전원 설비

- 저장실 내부에 전원차단기함을 설치한다. 단, 기계식냉동고의 전원차단기는 제조사에서 요구하는 용량으로 개별 설치한다(전원차단기함에 설치).
- 전원콘센트는 저장장비 및 액체질소 배관 높이보다 높은 곳에 설치한다.
- 온도모니터링 장비, 알람통보장치는 UPS전원을 사용한다.

※ 「국립중앙인체자원은행 시설 및 저장장비 표준운영 매뉴얼」 6 무정전전원장치 표준운영 매뉴얼 참조

- * 기계식냉동고는 UPS 전원을 사용하며, UPS 전원 사용이 불가능할 경우 액체질소 혹은 액체탄산 백업시스템과 자동전압보상장비를 사용한다.
- * 액체질소냉동고는 UPS 전원을 사용하며, UPS 전원 사용이 불가능할 경우 72시간 배터리 백업시스템을 사용한다.

⑤ 저장실 설비 관리 및 점검

- 장비관리자는 저장실을 점검하고 별지 제7호서식의 ‘백업자원 보관 저장실 일일 안전 점검표(백업은행용)’를 기록해야 한다.
- 자동화된 보안 시스템을 구축하여 인체자원 보관 시설의 작동 및 이상 유무를 지속적으로 모니터링 한다.
- 모든 설비에는 제조사 매뉴얼, 설비 작동 기록, 유지·보수·계량 기록을 기재한 일지를 비치하고, 관련 사항을 기록하여 문서화한다.
- 모든 시스템은 정기적으로 점검하고 점검일지를 기록하여 문서화한다.

3.2.3. 저장장비 운영

① 저장장비 공통 사항

- 저장장비 내 알람통보장치 연결 포트(remote alarm contact)를 장착한다.
- 저장장비 내부 온도 상승 시(정전 및 화재 발생 포함) 장비관리자 또는 자원관리자에게 통보될 수 있도록 알람 통보장치를 설치한다.
- 저장장비 개별 온도기록장치 또는 통합 온도 모니터링 시스템을 설치한다.
- 저장장비의 온도 및 액체질소 높이가 센서에 의해 표시되는 장비를 사용하며, 저장장비의 컨트롤러에서 교정 및 보정이 가능한 장비를 사용한다.
- 장비 고장 등 비상상황에 대비하여 저장장비 종류별로 동일한 용량(최소1대) 이상의 예비저장장비를 필요시 바로 사용할 수 있도록 항시 가동하여 운영한다.

② 기계식냉동고 일반 사항

- 최소 내부온도와 작동상태가 표시되는 장비를 사용한다. -80°C 이하로 온도 설정이 가능한 장비를 사용하되, -75°C 이하로 설정하여 사용한다.
- 기계식냉동고의 알람 온도는 상한 -55°C 이하, 하한 -90°C 이상의 범위로 설정한다.

③ 액체질소냉동고 일반 사항

- 최소 상부온도, 액체질소 높이, 작동상태가 표시되는 장비를 사용한다. 액체질소냉동고(vapor형태) 챔버 내부의 온도는 -180°C 이하로 유지가 가능한 장비를 사용한다.
- 액체질소 주입레벨 범위는 액체질소냉동고의 플랫폼 높이*에서 ‘-2인치’ 이상으로

설정*한다.

* 제조사별 플랫폼 높이가 다르므로, 제조사 또는 공급업체에 문의하여 설정한다.

- 레벨알람은 플랫폼 높이에서 '+1인치'를 상한값으로, 주입레벨 범위의 낮은 높이에서 '-1인치'를 하한 값으로 설정 한다. 액체질소 공급은 저장용기 또는 저장탱크를 연결하여 사용한다.
- 액체질소냉동고 알람 온도는 상한 -150℃ 이하, 하한 -200℃이상으로 설정한다.



그림 II-3-3. 중앙은행 저장실과 저장탱크 모습

④ 저장장비 점검 및 기록

- 모든 저장장비는 정기적으로 점검하고 점검일지를 기록한다.
 - 기계식냉동고는 매일 일정 시간에 온도를 점검하고 별지 제8호서식의 '백업자원 기계식냉동고 점검표(백업은행용)'에 기록하는 일상 점검을 해야 하며, 장비 사용 전·후에도 온도를 기록한다.
 - 액체질소냉동고의 온도와 액체질소량을 일정시간에 점검하고 별지 제9호서식의 '백업자원액체질소냉동고 점검표(백업은행용)'에 기록하는 일상 점검을 해야 하며, 장비 사용 전·후에도 온도와 액체질소량을 확인하여 점검표에 기록한다.
- 모든 장비에는 제조사 매뉴얼, 설비 작동 기록, 유지·보수·계량 기록을 기재한 일지를 비치하고, 관련 사항을 기록하여 문서화한다.
- 백업자원이 적재된 저장장비의 경고시스템에서 알람 발생 시, 별지 제10호서식의 '백업자원저장장비 경고시스템 알람 내역(백업은행용)'에 알람 내용 및 조치한 사항에 대해 기록하여 문서화한다.

3.3. 백업자원의 출고 및 이송(중앙은행 처리절차)

3.3.1 백업 자원 출고 전 준비

- ① 백업대상 자원(DNA, 혈장, 혈청)을 선정한다.
- ② 백업은행과 협의하여 자원 운송일정을 결정한다.
- ③ 정보관리시스템을 통해 백업대상 자원의 박스bCODE, 첫 번째 바이알과 마지막 바이알의 바코드 정보, 자원 개수를 확인한다.
- ④ 정보관리시스템에서 '백업자원 접수파일', 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서', 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'를 다운로드한다.

* 정보관리시스템 백업 절차

- ① 정보관리시스템에 로그인 한다
- ② '스마트검색'을 이용하여 백업대상자원을 검색한다.
- ③ 검색한 백업대상자원을 냉동카트에 담는다.
- ④ '뱅크업무' → '자원검수'를 선택하여 백업대상자원을 검수한다.
- ⑤ '뱅크업무' → '자원백업'을 선택한다.
- ⑥ '신규'를 선택하고 냉동카트에 담은 자원리스트를 선택한다.
- ⑦ 백업대상은행과 백업 출고일을 지정하고 저장한다.
- ⑧ '백업자원전달내역서', '엑셀다운로드'를 선택하여 백업자원전달내역서 및 백업자원 상세 정보를 다운로드 받는다.

- ⑤ 백업자원 운송 계획을 바이오뱅크과장에게 보고하고, 백업자원 상세내역과 일정을 백업은행에 공문으로 전달한다.
- ⑥ 중앙은행 자원관리자는 운송일 전까지 백업대상 자원에 대한 실물검수를 실시한다 (이 매뉴얼의 'II.1.4. 인체자원 폐기' 참조).

3.3.2. DNA 백업자원 출고

- ① '크라이오벤치 표준운영 매뉴얼(이 매뉴얼 II.1.4. 참조)'에 따라 자원 출고 30분전 크라이오벤치에 드라이아이스를 적재하여 내부를 완전히 냉각*한다. 벤치 내부가 완전히 냉각되면 백업대상 자원을 출고하여, 자원 실물과 별지 제12호서식의 '백업

자원 전달 상세내역서'의 박스bCODE 정보가 일치하는지 확인한다.

* 인체자원의 온도가 상승하지 않도록 자원 압-출고 및 근거리 이동 시 반드시 크라이오벤치를 사용

- ② 실물자원의 박스bCODE 확인이 완료되면, 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'의 순서대로 자원운송 전용 아이스박스로 옮긴다. 운송 용기의 바닥에서부터 '드라이아이스 - 백업자원 박스(최대 32개) - 드라이아이스'의 순서로 담아 자원을 준비한다.

* 드라이아이스는 필요량을 사전에 주문하며, 자원 운송용 아이스박스 1 개당 15kg 드라이아이스를 사용

3.3.3. 열정, 열장 백업자원 출고

- ① 이동식 액체질소냉동고에 백업 전일 오후 또는 백업 당일 오전에 액체질소를 충분히 충전한다. 자원 간 교차오염을 방지하기 위하여 rack의 가장 아래쪽 박스 적재 공간 높이까지(중앙바닥에서 2인치까지) 액체질소를 충전하여 vapor 형태로 사용한다.
- ② 이 매뉴얼 II.3.3.2. ①과 같은 방법으로 백업자원을 출고하여, 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'의 박스bCODE 정보와 일치하는지 확인한다.
- ③ 박스bCODE 확인이 끝나면, 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'에 따라 1번 이동식 액체질소냉동고 1번 rack의 첫 번째 칸부터 백업자원을 순서대로 적재한다. 이때 액체질소에 잠기는 맨 마지막칸은 자원의 오염방지를 위해 박스를 적재하지 않고 비워둔다. 적재가 완료된 rack에는 고정막대를 꽂아 박스가 빠지지 않도록 조치한다. 120ℓ 이동식 액체질소냉동고에는 최대 24개, 61ℓ 냉동고에는 최대 16개의 자원박스를 적재할 수 있다.
- ④ 자원 적재가 완료되면, 이동식 액체질소냉동고의 뚜껑이 열리지 않도록 잘 닫는다.

3.3.4. 백업자원 이송

- ① 백업자원 이송 2일 전까지 '백업자원 접수파일', 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서', 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'를 백업은행 담당자에게 메일(e-mail)로 송부한다.

- ② 백업자원이 적재된 운송용기(아이스박스, 이동식 액체질소냉동고)를 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서', 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'와 함께 자원 운송업체에 전달한다.
- ③ 자원 운송업체의 운송담당자는 도착예정시간을 해당 백업은행 담당자에게 미리 알린다.
- ④ 운송이 완료되면 백업은행 담당자로부터 수령자의 서명 및 자원입고 시 검토항목이 기록된 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서'와 자원의 수령 확인이 표시된 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'를 팩스나 스캔파일로 받아 관리한다.

3.4. 백업자원의 입고 및 저장(백업은행 처리절차)

3.4.1. 백업자원 입고 전 준비

- ① 자원 운송 일정 및 수량은 중앙은행과 협의하여 결정하고, 사전에 계약된 운송업체에 운송 일정 및 시간을 예약한다.
※ 백업은행은 사전에 운송업체를 선정하여, 중앙은행에 해당업체 정보를 전달한다.
- ② 운송 2~3일전 중앙은행으로부터 전달받은 '백업자원 접수파일', 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서', 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'를 확인한다.
- ③ 다음사항을 고려하여 자원 저장 공간을 확보한다.
백업자원을 적재할 rack은 냉동고에 미리 장착하여 자원 및 냉동고의 온도상승을 최소화한다.
 - DNA는 기계식냉동고, 혈장 및 혈청은 액체질소냉동고에 저장한다.
 - 백업자원용 저장장비에는 백업 자원 외에 다른 자원을 보관하지 않는다.
- ④ 이 매뉴얼의 'II.1.3. 인체자원 백업 및 백업은행 운영'을 참고하여 이메일(E-mail)로 전달받은 '백업자원 접수파일'을 정보관리시스템에 접수하고, '백업자원 전달 상세내역서'를 출력하여 백업자원의 저장위치를 기록한다.
- ⑤ '백업자원 접수파일'에서 검수 대상 자원을 임의로 5% 추출하여 검수 목록을 만든다.

3.4.2. 백업자원 입고

- ① 백업자원 도착예정 시간에 맞추어 작업테이블(또는 크라이오벤치)에 냉매를 채워 준비한다.

* '중앙은행 시설 및 저장장비 표준운영 매뉴얼'의 크라이오벤치(Cryobench) 사용방법 참조.
크라이오벤치가 없을 경우, 아이스박스에 충분히 냉매(드라이아이스)를 채워 사용

- ② 운송업체의 운송담당자에게 백업자원을 인계받는다.
- ③ **(운송 상태 확인)** 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서'의 '자원입고 시 검토 항목'에 따라 운송된 백업자원의 운송 및 포장상태를 확인하고, 해당 내용을 기록한다.

* **(검토 항목)** 자원 도착 시간, 운송 용기 내 냉매 용량, 박스 및 자원의 냉·해동 상태, 검수 시작 시간 및 장비 온도, 냉동고 저장 시간 및 온도, 기타 특이사항(파손, 분실 등)

- ④ **(자원 검수 및 저장)** 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세 내역서'와 이 매뉴얼 3.4.1.의 ⑤에서 추출한 검수 목록을 참고하여 다음과 같이 자원의 검수를 진행한다.
 - 자원의 검수는 자원의 온도변화를 최소화하기 위하여 반드시 드라이아이스 등 냉매가 준비된 작업테이블 위에서 신속히 진행한다.
 - 별지 제11호서식 '백업자원 전달 상세내역서'의 정보와 실물의 박스bCODE 일치 여부와 자원 개수를 확인한다.
 - 검수 목록의 정보와 실물의 자원 식별번호 일치 여부를 확인한다.
 - 검수가 완료되면 rack의 위부터 차례대로 자원박스를 적재하고, rack이 모두 채워지면 저장장비에 바로 적재한다.
 - 정보관리시스템과 실제 저장장비의 위치정보가 일치하는지 확인하고, 다를 경우 시스템에 실제 장비번호를 기록한다.
 - 검수 시 이상이 없는 경우 별지 제12호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'의 '수령확인'란에 표시한다.
- ⑤ 위의 절차가 모두 완료되면 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 내역서'에 기재되어 있는 운송내용을 확인하고 백업담당자가 서명한다.

3.4.3. 백업자원 정보관리

- ① 별지 제10호서식의 '백업자원 전달 내역서'와 백업자원이 저장된 냉동고의 최종 위치가 기록된 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 상세내역서'는 같이 묶어서 파일을 철하여 보관한다.
- ② 운송 업체와 백업은행의 서명 및 자원입고 시 검토항목이 기록된 별지 제10호서식의 '백업자원 전달 내역서'와 별지 제11호서식의 '백업자원 전달 상세내역서', 운송장 사본을 팩스나 스캔파일로 중앙은행에 송부한다.
- ③ 백업자원입고일, 자원종류, 저장위치 및 저장장비 이력* 등 인체자원 보관과 관련된 모든 사항을 기록한다.

▪ **(온도)** 장비별 자동온도기록계를 사용하거나, 별도의 측정 도구를 사용하여 온도를 기록한다.
(설비 고장 유무) 장비 및 설비의 고장 이력을 기록한다.

3.5. 백업자원 폐기 (이 매뉴얼의 'II.4. 인체자원 폐기' 참조)

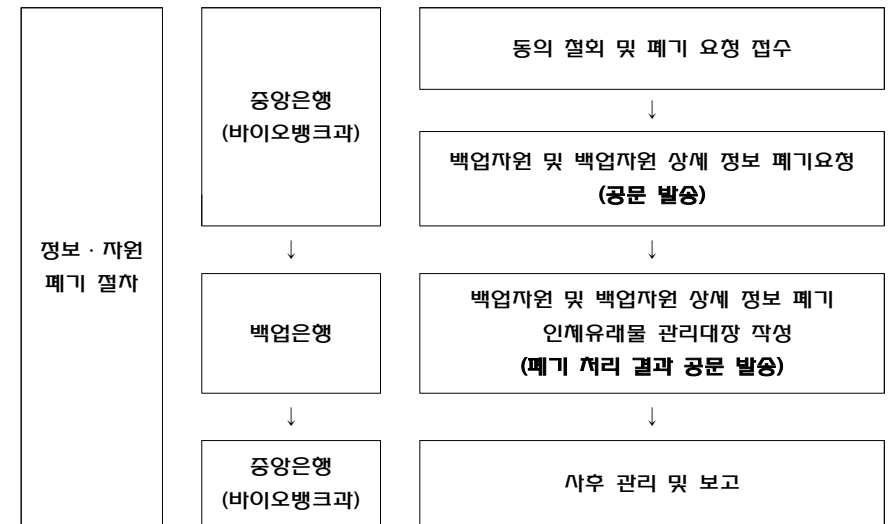


그림 II-3-4. 백업자원 폐기 절차도

- ① 중앙은행은 기증자의 동의 철회 및 폐기요청 사항이 발생하면 공문을 통해 백업 은행으로 백업자원 폐기를 요청한다.
- ② 백업은행은 정당한 사유가 없는 한 백업자원 폐기요청일로부터 7일 이내에 해당 자원 및 자원의 상세 정보(제공자 식별번호를 제외한 모든 정보)를 폐기한다.
- ③ 인체유래물 및 정보의 폐기방법, 정보관리시스템 폐기처리 방법은 이 매뉴얼 'II.4. 인체자원 폐기'를 참고하여 진행한다.

- 폐기 대상 백업자원은 생명윤리 및 안전에 관한 법률 제44조제3항 및 제39조, '폐기물관리법' 제13조 제2항 '의료폐기물'의 처리 기준에 따라 폐기한다.
- 해당 자원에 대한 상세 정보를 포함한 전자기록물은 물리적으로 복구할 수 없도록 삭제 또는 파기한다.

- ④ 백업은행은 백업자원 및 자원정보의 폐기가 완료되면 다음과 같이 이에 관한 사항을 기록·보관 한다.

- 기록사항에는 폐기일시, 폐기량, 폐기방법 등 폐기에 관한 사항을 기록하며, 이를 5년간 보관한다.
- 작성서류 : 인체유래물등(검사대상물) 관리대장(별지 제3호서식)

- ⑤ 백업은행은 백업자원 폐기 결과를 별지 제3호서식 인체유래물등(검사대상물) 관리대장'과 함께 중앙은행에 공문으로 통보하며, 결재를 득한 공문의 원본 역시 중앙 은행에 우편으로 발송 한다.

4. 인체자원 폐기

4.1. 일반사항

- ① 인체자원의 폐기는 '생명윤리 및 안전에 관한 법률' 및 '폐기물관리법'에 근거하여 「인체자원 관리지침」에 따라 진행한다.

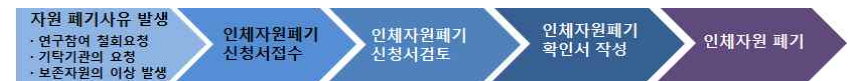


그림 II-4-1. 자원폐기 절차

- ② 관련 별지서식
 - [별지 제3호서식] 인체유래물등(검사대상물) 관리대장
 - [별지 제13호서식] 인체자원 기증철회 신청서
 - [별지 제14호서식] 인체자원 폐기(요청/사유)서
 - [별지 제15호서식] 인체자원 폐기결과 통지서

4.2. 기증자의 요청에 의한 폐기

- ① 별지 제13호서식 '인체유래물 기증철회 신청서(기증자용)'을 접수한 후 내부보고 한다.
- ② 폐기할 자원의 실물을 검수한 후, 「인체자원 관리지침」의 '3.3.3. 인체자원의 폐기' 및 이 매뉴얼 'II.4.4. 인체유래물의 폐기절차'에 따라 자원을 폐기한다.
- ③ 폐기대상 자원 중 일부가 백업, 분양 등으로 타기관에 보관되어 있는 경우, 「인체자원 관리지침」의 '3.3.2. 관련기관 업무협조 요청' 및 이 매뉴얼 'II.3.5. 백업자원 폐기'를 준용하여 해당 자원을 폐기한다.
- ④ 별지 제15호서식의 '인체자원 폐기결과 통지서'를 작성하여 폐기결과를 통보한다.
- ⑤ 폐기가 완료되면 별지 제3호서식의 '인체유래물등(검사대상물) 관리대장'에 폐기 일시, 폐기량 등 폐기에 관한 사항을 기록하여 5년간 보관한다.

Ⅲ. 인체자원 종류별 정도관리

1. 체액[혈청, 혈장, 뇨]자원 정도관리	38
2. DNA 정도관리	45
3. RNA 정도관리	74
4. 세포자원 정도관리	81

1. 체액[혈청, 혈장, 뇨]자원 정도관리

1.1. 일반사항

- ① 자원처리 방법을 코드화 한 SPREC의 기록·관리를 통해 체액자원의 품질을 간접적으로 확인한다.
- ② 혈청의 경우 SPREC과 함께 자원의 용혈, 황달, 지질혈증 정도를 측정한 혈청지표(HIL index ; Hemolysis, Icterus, Lipemia index)로 자원의 품질을 확인한다. 혈청지표는 자원수집과정에서 측정한 각각의 임상화학 검사값을 사용한다.
- ③ 자원의 오염 가능성 및 해동 여부 확인을 위해 자원접수 및 검수 과정에서 다음과 같이 육안검사를 실시한다.
 - 자원접수 : 각 박스의 첫 번째, 마지막 바이알의 색상 및 상태, 보관용기의 상태 확인
 - 자원검수 : 자원검수 시 해당 자원의 색상과 상태 관찰
 - 점검 항목 및 조치방법 : 표 III-1-1 참조

표 III-1-1. 육안검사 점검항목 및 조치방법

연번	항목	확인내용	조치방법
1	자원상태	색깔, 혼탁도 등	- 정상 자원과 차이가 심할 경우 해당일 입고자원에 대한 상태를 전수 검수 - 기탁기관에 발생사유 확인 후, 메모 보고로 과내에 상황 공유
		해동 및 이물질 혼합 여부	- 해당자원 반송조치
2	보관용기	개폐, 파손 및 검체 유출 유무	- 해당자원 반송조치
3	라벨	기증자 정보 기재 여부	- 해당자원 반송조치, 정보 삭제 후 재입고
4	용량	접수파일 정보와 일치 여부	- 기탁기관에 확인 후, 정보관리시스템 등록정보 수정
5	용기 외부	바이알 외벽 및 박스내부의 얼음 생성 여부 확인 ※ 냉·해동 여부에 대한 간접 확인 방법	- 기탁기관에 해당 내용을 통보 - 기탁기관은 발생 원인을 파악하여 조치 ※ 해당 내용은 메모보고로 과내에 상황 공유

- ④ 라벨정보가 접수파일 내용과 다를 경우, 필요에 따라 다음과 같이 추가 정도관리를 실시한다.

- **(자원 종류 불일치)** 혈청, 혈장 자원의 라벨 혹은 위치가 바뀌어(혈청위치에 혈장이 입고 혹은 그 반대) 입고된 경우, 임상검사 항목 값을 비교하여 자원 종류를 확인한다(이 매뉴얼 III.1.2. 참고).

- **(기증자 ID 불일치)** 체액자원에서 DNA를 추출하여(이 매뉴얼 IV.2. 참고), 이 매뉴얼 ‘IV. 인체자원 식별정보 확인’을 참고하여 해당 자원의 교차오염 여부를 확인한다.

⑤ 체액(혈장, 혈청, 뇨)자원은 보관에 따른 안정성 평가 등을 위해 입고 및 보관 시료에 대한 임상화학 검사(이 매뉴얼 III.1.4. 참고)와 오믹스 방법을 이용한 단백질, 대사체 등을 측정하여 품질을 확인할 수 있다(이 매뉴얼 III.1.5. 참고).

⑥ 체액(혈장, 혈청, 뇨)자원은 자원처리 시, 분리 전 자연시간 및 상온 노출정도, 냉·해동 반복에 따른 안정성 평가 등을 위해 효소결합 면역 침강 분석법(ELISA)으로 cytokine의 농도를 측정하여 자원의 품질을 확인할 수 있다. (이 매뉴얼 III.1.6. 참고)

⑦ 자원의 품질(Quality)을 안정적으로 유지하기 위해 검수, 정도관리 시 크라이오 벤치를 사용하여 자원의 온도가 상승하지 않도록 주의하고, 작업이 끝나는 즉시 액체질소냉동고(-175℃ 이하)에 보관한다.

⑧ 품질 이상에 의한 반송, 폐기 처리는 이 매뉴얼 II.1.6.2.와 II.4.에 따른다.

⑨ 특이 사항이 있을 경우는 인체자원 정보관리 시스템 내 해당바이알의 비교란에 기재한 후 저장한다.

1.2. 자원종류 불일치 확인

① 자원 수집과정에서 동일기증자의 혈청, 혈장자원의 라벨이 바뀌거나, 저장박스 위치를 바꿔 자원 바이알을 정렬하는 경우가 발생하기도 한다.

② 접수 및 검수과정에서 라벨 혹은 위치가 바뀐 자원으로 의심되는 경우, 임상화학 검사(Glucose, Calcium, Potassium)를 통해 자원명(자원종류)을 확인한다.

③ 혈청과 혈장의 판정 기준은 표 III-1-2와 같고, 해당 검사는 임상검사기관에 의뢰하여 진행한다.

표 III-1-2. 혈청, 혈장 판정 기준

항목	기준 값	참고
Glucose	혈장 < 혈청	혈장은 분리 전 까지 혈구 세포의 해당 작용으로 glucose 농도가 시간당 5-7% 감소
Calcium	혈청 : 8.6-10.0 mg/dL 혈장 : < 0.2 mg/dL	<ul style="list-style-type: none"> ■ 혈장 수집을 위해 채혈 시 EDTA tube를 사용 ■ EDTA가 혈액 내 Ca²⁺와 결합하여 항응고 작용 → 혈장 내 calcium 농도가 정상치보다 낮게 측정
Potassium	혈청 : 3.5-5.1 mmol/L 혈장 : > 10.0 mmol/L	<ul style="list-style-type: none"> ■ EDTA tube 내 potassium으로 인해, 혈장 내 potassium 농도가 정상치보다 높게 측정

1.3. 체액자원의 품질 안정성 평가를 위한 임상화학 검사

① 체액자원은 보관기간, 보관 중 냉해동 반복, 보관온도 변화 등의 물리적·환경적 변화에 의해 품질이 변화되기도 한다.

② 자원의 품질안정성 평가는 자원 수집 시의 임상화학 검사수치와 보관 중인 자원의 임상화학 검사수치를 비교하여 확인할 수 있다.

③ 임상화학 검사 항목은 표 III-1-3을 참조하며, 해당 검사는 임상검사기관에 의뢰하여 진행한다.

표 III-1-3. 체액자원별 임상화학 검사 항목

연번	자원	항목
1	혈장(plasma)	Fibrinogen, HbA1c, Hematocrit, Hemoglobin, Platelet, RBC, WBC 등
2	혈청(serum)	Albumin, ALP, ALT, AST, Bilirubin(total, direct), Calcium, Chloride, Cholesterol(total), Creatinine, C-reactive protein, Free T4, Glucose, γ-GTP, Homocysteine, LDL-cholesterol, Lipoprotein, Phosphorus, Potassium, Protein(total), Sodium, Triglyceride, TSH, Uric acid 등
3	뇨(urine)	Amylase, Calcium, Chloride, Citric acid, Creatinine, Glucose, Ketone, Magnesium, Micro-albumin, Nitrate, Phosphate, Potassium, Protein(total), Sodium, Urea, Uric acid 등

1.4. 체액자원의 대사체 및 단백질체 모니터링을 위한 오믹스 분석방법

- ① 체액자원의 대사체, 단백질체 등을 모니터링하기 위해 오믹스 분석방법을 활용한다.
- ② 오믹스 분석방법의 개요는 표 III-1-4, 5와 같고, 해당 시험분석은 전문시험기관에 의뢰하여 진행한다.

표 III-1-4. 대사체 분석방법 개요

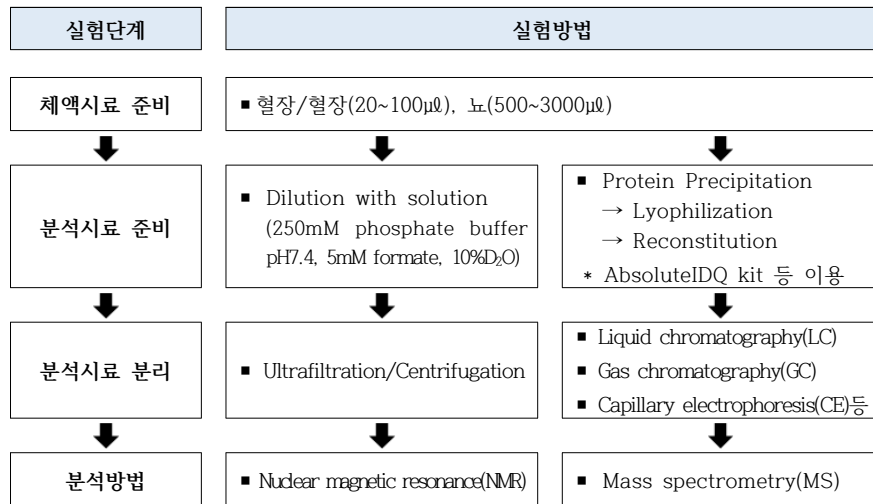
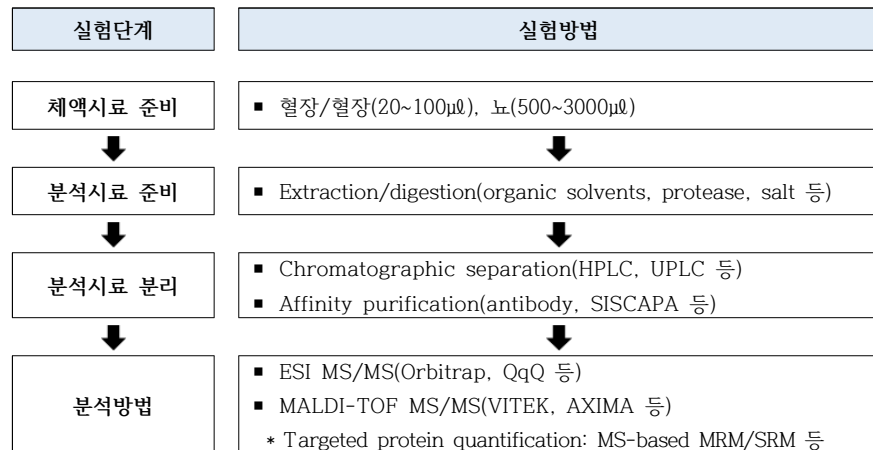


표 III-1-5. 단백질체 분석방법 개요



1.5. 체액자원 관리를 위한 요소결합 면역분석법 (ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay)

- ① 체액자원의 분리 전 지연시간과 상온 노출 정도, 냉·해동 반복 횟수 등에 따라 자원의 품질은 영향을 받을 수 있다.
- ② 체액자원의 품질에 따라 향후 cytokine 분석 결과에 영향을 줄 수 있으므로 cytokine 결과 생산에 적합한 체액자원의 품질상태를 확인해야 한다.
- ③ 체액자원 정도관리를 위한 cytokine은 다음 III-1-6과 같고, cytokine 정도관리 수행은 시판되는 ELISA kit를 이용하여 진행한다.

표 III-1-6. 체액자원 정도관리를 위한 cytokine 목록

항목 [†]	기준 값 [‡]	분석 전 변화 원인
IL- 8	serum ~30 pg/ml	■ 분리 전 지연(증가) - 24시간 이후 125pg/ml 이상
sCD40L	serum 7~17 ng/ml	■ 상온 노출(감소)
TfR	serum 171~212 U/ml	■ 분리 전 지연(8시간 후 증가)
MMP-7	serum 1.07~4.40 ng/ml plasma 1.10~4.59 ng/ml	■ 냉·해동 반복, 30회 이후 감소
GM-CSF	plasma 214±163 pg/ml	■ 분리 전 지연(2시간 후 11~20배 증가)
IL-1α	plasma 9.4±7.7 pg/ml	■ 분리 전 지연(2시간 후 11~20배 증가)
G-CSF	plasma 119±60 pg/ml	■ 분리 전 지연(2시간 후 11~20배 증가)

[†] IL-8: interleukin 8, sCD40L: soluble CD40 ligand, TfR: transferrin receptor, MMP-7: matrix metallo proteinase-7, IL-1α: interleukin 1 alpha, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor

[‡] 1) Betsou F, Gunter e, Clements J, DeSouza Y, Goddard K, Guadagni F, Yan W, Skubitz A, Somiari S, Yeadon T, Chuaqui R. Identification of evidence-based biospecimen quality-control tools: a report of the International Society for Biological and Environmental Repositories(ISBER) Biospecimen Working Group, J Mol Diagn 2013,15:3-16

2) Kofanova O, Henry E, Quesada R.A, Bulla A, Linares H.N, Lescuyer. P, Shea K, Stone M, Tybring G, Bellora C, Betsou F. IL8 and IL6 levels indicate serum and plasma quality. Clin Chem Lab Med 2018, 56(7):1054-1062

1.5.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : Microplate reader, 원심분리기, micropipette (200 μ l), Horizontal orbital microplate shaker (500 \pm 50 rpm)
- ② 시약 : Quantikine ELISA (R&D systems), Deionized/distilled water(DDW), Human cytokine controls (optional)
- ③ 소모품 : micropipette tip (200 μ l), 1.7ml microcentrifuge tube

1.5.2. 분석 순서 (sandwich ELISA)

- ① 실험 시약 중 reconstitution buffer, wash buffer는 상온에 두고 용액 내 결정 (crystal)이 완전히 녹은 상태인 것을 확인 후 사용한다.
- ② (Standard 준비) 각 cytokine 별 standard 용액을 준비한다.
 - Standard stock 제조 : ELISA kit 프로토콜에 따라 제시된 농도에 맞도록 reconstitution buffer를 넣고 상온에서 15분 이상 안정화 후 사용한다.
 - Cytokine 별로 ELISA kit 프로토콜에서 제시한 농도범위로 standard stock을 희석하여 준비한다.
- ③ (샘플 준비) 채액시료(혈청, 혈장)는 cytokine 별로 ELISA kit 프로토콜에서 추천한 적정 희석배수에 따라 sample dilution buffer로 희석하여 준비한다.
(예, sCD40L: 혈청 5배 희석, IL-8: 혈청 원액 사용)
- ④ Microplate strip (ELISA kit에 포함된 단일클론 항체가 plate 바닥에 코팅된 strip)을 필요한 만큼 꺼내어 사용하고 나머지는 제공된 foil pouch에 밀봉하여 4℃에서 보관한다.
- ⑤ 각 well 에 assay diluent 100 μ l를 넣고 ⑥번 과정을 진행한다.
- ⑥ (1차 반응) ⑤의 각 well 에 standard, control, sample을 넣은 후 동봉된 film을 plate 상면에 부착한다.
 - 각 cytokine별 반응 양, 반응시간, 온도, shaking 조건은 ELISA kit 프로토콜에서 제시한 방법을 따른다.
(예, sCD40L : 상온, 2시간, shaking)

- 농도가 낮은 cytokine의 경우 4℃에서 18시간 이상 반응시킨 후 상온에서 반응 과정을 진행할 수 있다.
(예, IL-8 : 4℃, 18시간 후 상온 2시간)

- ⑦ (Washing) 각 well의 내용물을 제거하고 wash buffer를 각 well에 400 μ l로 채워 세척한다. 총 4회 세척한다.
- ⑧ (2차 반응) 각 cytokine별 secondary antibody-conjugate를 넣은 후 동봉된 film을 plate 상면에 부착한다.
 - 각 cytokine별 반응 양, 반응시간, 온도, shaking 조건은 assay kit 프로토콜에서 제시한 방법을 따른다.
(예, sCD40L: 200 μ l, 상온, 2시간, shaking; IL-8: 100 μ l, 상온, 1시간)
- ⑨ (Washing) 각 well의 내용물을 제거하고 wash buffer를 각 well에 400 μ l로 채워 세척한다. 총 4회 세척한다.
- ⑩ (발색) 발색시약 2종류를 동량(1:1)로 섞은 다음, 각 well에 200 μ l를 넣고 차광하여 상온에서 30분간 반응시킨다.
 - color reagent A 및 B는 섞은 후 15분 이내 사용한다.
- ⑪ 각 well에 stop solution 50 μ l를 넣어 반응을 정지시킨다.
 - Well 내 용액은 노란색으로 변해야 하며, 초록색인 경우 가볍게 tapping하여 섞어 준다.
- ⑫ Stop solution을 넣고 30분 이내에 450nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 540nm 혹은 570nm의 흡광도를 측정하여 보정해 준다.
- ⑬ (정량) Standard curve는 four parameter logistic(4-PL) curve fit을 사용한다.

2. DNA 정도관리

2.1. 일반사항

- ① 중앙은행은 입고 시 DNA 자원 전량에 대한 정량 및 순도 정보를 수령하고, 그 중 10%를 임의로 선택하여, 입고 후 7일 이내에 해당 자원에 대한 안정성 검사 및 미생물 오염 검사를 실시한다.
- ② **(정량)** DNA 정량에는 분광흡광도법, Ethidium Bromide(EtBr) 형광염색법, 형광측정법 등을 사용한다(표 III-2-1). 중앙은행에서는 일반적으로 NanoDrop을 이용한 분광 흡광도법을 사용하며(이 매뉴얼 III.2.3.), 이때 A260, A280, A230을 함께 측정하여 DNA의 농도, 양 뿐만 아니라 A260과 A280, A230의 비율 값으로 해당 자원의 순도를 측정한다.

표 III-2-1. DNA 정량법 비교

Method	Detection	Detection limit
Spectrophotometry	Absorbance at 260nm	5µg/ml
Ethidium Bromide	UV light(254nm)	~5ng
Hoechst 33258 dye	Fluorometer	10ng/ml
YO-PRO, YOYO-1	Fluorometer	0.5ng/ml
SYBR-Green	Fluorometer	25~50ng per band
PicoGreen	Fluorometer	25pg/ml

- ③ **(안정성 검사)** 중앙은행에서는 전기영동방법과 PCR 방법을 사용하여 DNA 안정성을 확인한다.
 - **(Agarose gel 전기영동법)** DNA의 분자 크기나 구조에 따라 달라지는 agarose gel matrix 이동 패턴을 분석하여 DNA의 분해 정도를 확인(이 매뉴얼 III.2.4.)
 - **(전자동 모세관 전기영동법)** DNA의 모세관(capillary) 이동패턴을 형광 측정 장치로 분석하여 DNA 분해 정도를 판단(이 매뉴얼 III.2.5.)
 - **(Long PCR법)** 17kb 이상의 β-globin gene(housekeeping gene) fragment를 PCR 방법으로 증폭하고, 해당 크기의 유전자 증폭 여부를 통해 DNA 분해(degradation) 여부를 간접적으로 확인(이 매뉴얼 III.2.6.)

- ④ **(미생물 오염검사)** 박테리아와 마이코플라스마(mycoplasma)의 16s rRNA(rDNA) coding region을 증폭하는 PCR 방법을 사용하여 미생물 오염여부를 확인하며, 이를 통해 혈액 전처리부터 DNA 추출까지 자원 제작 과정에 대한 전반적인 관리 상태를 확인한다(이 매뉴얼 III.2.7.).
- ⑤ 실험실 환경 및 실험자에 의한 오염이 발생하지 않도록 다음사항에 주의하여 정도 관리를 수행한다.
 - 깨끗한 실험실 환경 유지 : 실험대 및 공기 중의 미생물로 인한 오염 방지
 - 보호구 착용 : 실험자에 의한 미생물 및 nuclease 오염 방지
 - nuclease free 기자재 사용 : 실험 기자재에 의한 nuclease 오염 방지
- ⑥ 관련 별지서식
 - [별지 제16호서식] β-globin PCR 정도관리 결과서

2.2. 정도관리용 DNA 준비

2.2.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : MicroPipette (10µl, 20µl), Multi channel pipette(필요시), 무균작업대, 원심분리기
- ② 시약 : TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 70% 에탄올(소독용)
- ③ 소모품 : MicroPipette tip (10µl, 20µl), 1.7ml microcentrifuge tube, 1.7ml microcentrifuge tube rack(96well), 96 well plate

2.2.2. 정도관리 대상 DNA의 선별

- ① 정도관리 대상 DNA는 박스 내 바이알 수를 기준으로 10%(81 바이알 기준 9개)를 임의로 선정한다(그림 III-2-1). 단, DNA 접수 시 받은 정도관리 결과가 DNA 분해나 오염으로 의심되는 경우 해당 자원을 우선 선별하여 정도관리를 수행할 수 있다.
- ② 대상 자원은 그림 III-2-1과 같이 보관박스에서 1.7 microcentrifuge tube rack(96well)으로 옮긴 후, 4℃ 냉장고에 보관한다.

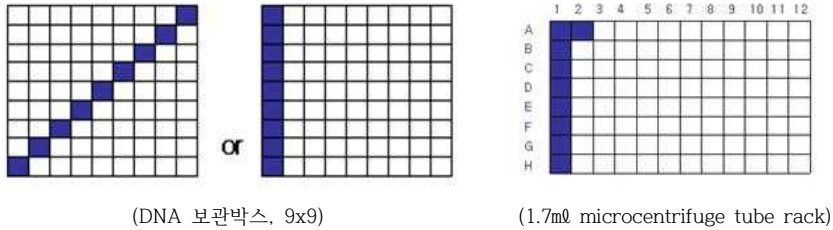


그림 III-2-1. 정도관리용 DNA의 선별방법(예시)

2.2.3. DNA 정도관리 리스트 출력

- ① 정보관리시스템에 로그인한 후 ‘스마트 검색’ → ‘냉동카드’ → ‘신규’를 선택한다.
신규 카드 설정 시 카드 이름, 내용, 공개여부(yes), 기본냉동카드여부(yes)를 설정한다(그림 III-2-2).

냉동카드 관리 수정

기본 정보

이름:

내용:

공개여부:

기본냉동카드여부:

자원등록: 자원 bCODE:

그림 III-2-2. 냉동카드 설정

- ② 바코드스캐너로 자원에 붙어 있는 자원라벨을 스캔하여 냉동카드에 저장(등록)*한다.

- * 냉동카드 내 자원 저장(등록) 방법
- (파일선택) 정보관리시스템 내에서 자원을 검색하여 다운받은 파일을 업로드
 - (자원bCODE) 바코드스캐너로 스캔하여 냉동카드에 바로 저장

- ③ ‘뱅킹업무’ → ‘정도관리’ → ‘신규 정도관리 등록’ → ②에서 저장한 ‘냉동카드’를 선택한다. 그림 III-2-3과 같이 정도관리명을 선택한 후, ‘시행일자’, ‘plate와 plate 수’, ‘필요량(μg)’, ‘입력순서’를 설정*한 후 ‘확인’을 선택한다.

안전성검증 신규등록

카드 선택

이름	내용	개수	등록일
1	9/6국건열486건_63건OC	63	2016-09-06
2	9/6국건열567건_53건OC	53	2016-09-06
3	2016-28 LCL 분할처리(12건)	12	2016-09-01
4	20160926 참여자실험 폐기	2	2016-09-31
5	2016-28LCL 분할 12건	12	2016-09-10
6	배양실험 폐기(20160903)	6	2016-09-03

정도관리 선택

정도관리명	시행일자	Plate	plate 수	필요량(μg)	입력순서
1	<input type="checkbox"/> 혈구세포 오염 확인 검사				
2	<input type="checkbox"/> 조직 적정성 검사				
3	<input type="checkbox"/> 면역조직 화학염색 검사				
4	<input type="checkbox"/> DNA 순도 측정				
5	<input checked="" type="checkbox"/> DNA 미생물 오염 검사				
6	<input checked="" type="checkbox"/> DNA 전기영동 검사				
7	<input type="checkbox"/> 세포 생존율 검사				
8	<input type="checkbox"/> 조직 미생물 오염 검사				
9	<input type="checkbox"/> RNA 순도 측정 검사				
10	<input type="checkbox"/> RNA 전기영동 검사				
11	<input type="checkbox"/> 용혈 확인 검사				

그림 III-2-3. DNA 안전성 검증 신규 등록

- * 정도관리 결과 업로드 시, 2개 이상의 항목을 동시에 선택할 수 있다. ‘DNA 미생물 오염 검사’와 ‘DNA 전기영동 검사’를 동시에 업로드할 경우,
- ‘필요량’은 한 개 항목에 전체 사용한 DNA양을 입력하고, 나머지 항목은 “0”으로 입력
 - ‘입력순서’는 A ↓으로 선택

- ④ 냉동카드의 자원 리스트와 정도관리 결과를 입력하는 화면이 보이면 엑셀 파일로 다운로드하여 출력한다.

2.2.4. DNA 희석

- ① 1.7ml microcentrifuge tube rack(96well)에 옮겨 담은 DNA는 4℃에서 6시간 이상 서서히 해동하며, 자원의 안정성 유지를 위해 4℃에 7일 이상 꺼내놓지 않도록 주의한다.
- ② 오염방지를 위해 DNA 희석의 모든 과정은 무균작업대에서 수행한다. 무균작업대는 UV로 30분간 살균하고 70% 에탄올로 바닥을 소독한 후 사용한다.
- ③ 2.2.3-④의 리스트에 따라 최종 농도가 100ng/μl가 되도록 적정량의 DNA와 TE buffer를 96 well plate에 덜어 희석한다.
- ④ ③에서 희석한 DNA(100ng/μl)를 사용하여 DNA 안정성 검사(이 매뉴얼 2.4.)와 미생물 오염 검사(이 매뉴얼 2.7.)를 수행한다.

- ⑤ 정도관리를 통해 품질이 확인된 원본 DNA는 박스bCODE와 기탁자부여번호를 확인한 후, 원심분리(30sec, 1,200rpm)한다.
- ⑥ 정보관리시스템에서 기탁자부여번호로 위치를 검색하여 등록된 위치에 저장한다.

2.3. DNA 순도 및 정량분석 (분광흡광도법, NanoDrop Spectrophotometer)

2.3.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : NanoDrop Spectrophotometer(ND-2000, ND-8000), Micropipette(2.5 μ l), Multi channel pipette(10 μ l)
- ② 시약 : 멸균 증류수, TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)
- ③ 소모품 : Micropipette tip(2.5 μ l), kimwipes

2.3.2. 농도 측정 시 유의사항

- ① 정확한 농도측정을 위해 genomic DNA를 균질하게 혼합하는 것이 중요하다. 단, 진동혼합(vortexing) 같은 과도한 충격을 가하면 DNA가 분해될 수 있으므로, 가볍게 tapping 하여 균질하게 혼합한다.
- ② NanoDrop으로 농도 측정 시 기기별 정량범위를 확인하고(표 III-2-2 참고), 정확한 농도 측정을 위해 이 범위를 벗어나는 경우 DNA 자원을 농축 또는 희석하여 재 측정한다.

표 III-2-2 NanoDrop의 DNA 농도측정(정량) 범위

종류	최소 측정농도	최대 측정농도	농도 측정의 재현성
ND-2000	2ng/ μ l	15,000ng/ μ l(dsDNA)	2~100ng/ μ l \pm 2ng/ μ l(SD), >100ng/ μ l \pm 2%(CV)
ND-8000	2ng/ μ l	3,700ng/ μ l(dsDNA)	

- ③ NanoDrop으로 DNA를 정량할 경우, double-stranded DNA 뿐만 아니라 작은 DNA 단편, nucleotide가 같이 측정되므로, 온전한 double-stranded DNA만 정량하고자 할 경우, PicoGreen 방법 등을 추가로 사용하도록 한다.

※ 또한, NanoDrop 정량으로는 DNA의 안정성을 확인할 수 없으므로 반드시 DNA 전기영동 방법을 통해 DNA 분해 여부를 확인해야 한다.

2.3.3. NanoDrop을 이용한 DNA 정량 방법

2.3.3.1. ND-2000 사용 방법

- ① 2.2.4-③의 tube를 가볍게 tapping 하여 시료를 균질하게 혼합한다.
- ② ND-2000(그림 III-2-4)과 기기에 연결된 컴퓨터를 켜고, ND-2000 program을 실행한다.
- ③ 윗덮개를 열어 멸균 증류수 2 μ l를 측정대(Measurement pedestal)에 올린 후(그림 III-2-5) 윗덮개를 닫는다. 2~3분 후, 측정대의 증류수를 kimwipes로 닦아 측정대를 세척한다.

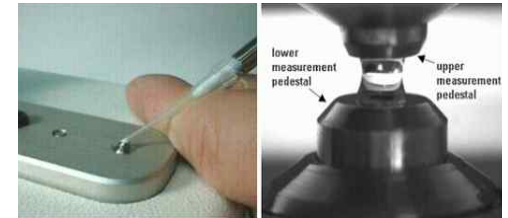


그림 III-2-4. ND-2000의 구조 그림 III-2-5. NanoDrop의 측정대(Measurement pedestal)

- ④ ND-2000 프로그램의 메인화면에서 'Nucleic acid'를 선택하고(그림 III-2-6), 이어서 뜨는 창 의 'OK'를 선택하여 기기를 초기화한다.
- ⑤ 'File' → 'New workbook' → 저장할 폴더 생성 후 '저장'을 선택한다.
- ⑥ 'Sample type'을 'DNA-50'으로 설정한다.

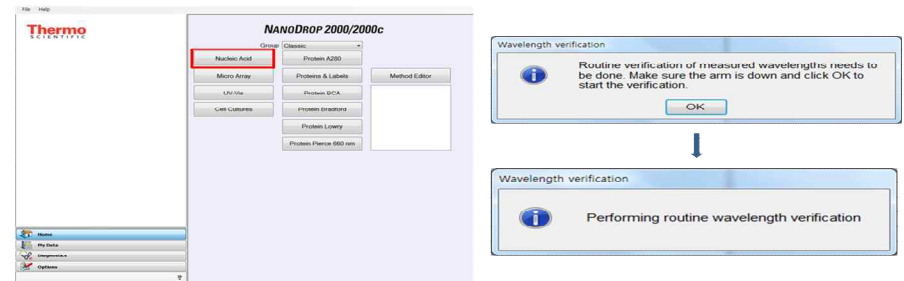


그림 III-2-6. ND-2000 프로그램의 메인화면 및 초기화 단계

- ⑦ DNA 회석에 사용한 용매(TE 혹은 멸균 증류수) 2 μ l를 측정대에 올린 후, 윗덮개를 닫고 'Blank'를 선택한다(그림 III-2-7). Blank 설정이 끝나면, 측정대의 용액을 kimwipes로 닦아준다.

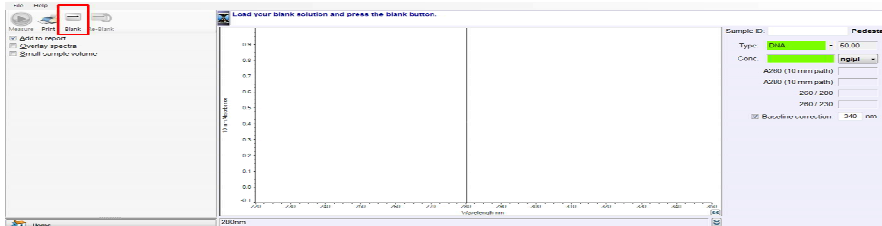


그림 III-2-7. Blank 작업

- ⑧ 'Sample ID'를 입력하고 정량할 DNA를 가볍게 tapping 한다. 측정대에 DNA 2 μ l (양이 적으면 1 μ l도 가능)를 올리고 윗덮개를 닫는다. 'Measure'를 선택하여 DNA 농도 및 순도를 측정하고(그림 III-2-8), 측정대를 kimwipes로 닦아준다.

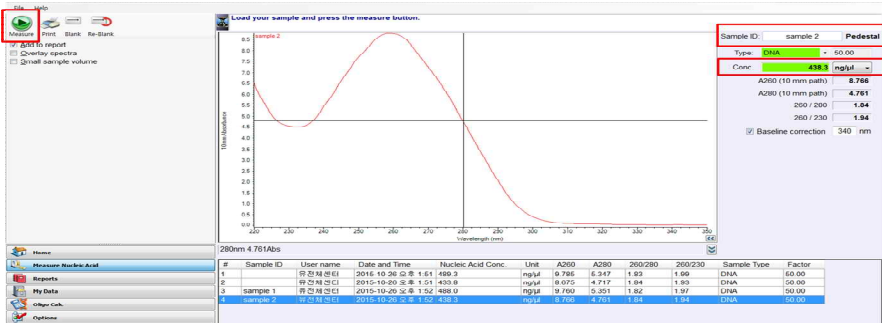


그림 III-2-8. DNA 농도 측정 및 확인

- ⑨ ⑧번을 반복하여 DNA 농도 및 순도를 측정한다.
- ⑩ 'Reports'를 선택한 후 측정된 전체 결과를 최종 확인한다. 'Export'를 선택하여 파일(그림 III-2-9)로 다운로드 받는다.
- ⑪ (측정대 세척) 멸균 증류수 2 μ l를 측정대에 올리고, 윗덮개를 닫았다 열어 준 뒤 kimwipes로 닦아준다.

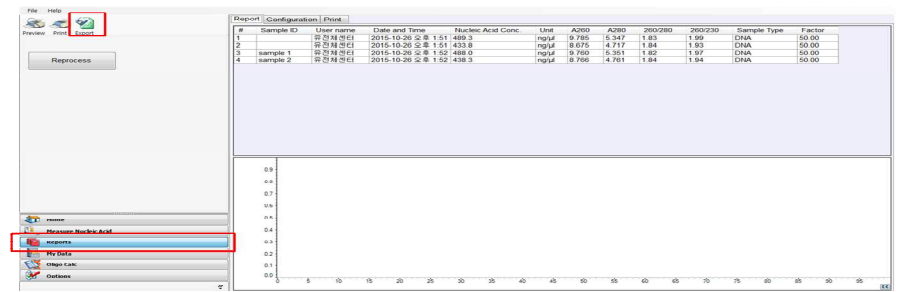


그림 III-2-9. DNA 측정값에 대한 report

2.3.3.2. ND-8000 사용 방법

- ① 2.2.4-③의 tube를 가볍게 tapping 하여 시료를 균질하게 혼합한 후, 원심분리 하여 시료를 모은다.
- ② ND-8000(그림 III-2-10)과 기기에 연결된 컴퓨터를 켜고, ND-8000 program을 실행한다.
- ③ ND-8000 프로그램의 메인화면에서 'Nucleic acid'를 선택하고, 이어서 뜨는 창에서 'OK'를 선택한다(그림 III-2-11). 기기가 초기화*되는 동안 측정대를 세척한다.

* ND-8000은 초기화 단계에서 미리 작성해 놓은 sample ID 파일을 업로드 시켜 측정 시 시료의 ID 입력을 하지 않고 바로 측정할 수 있다.

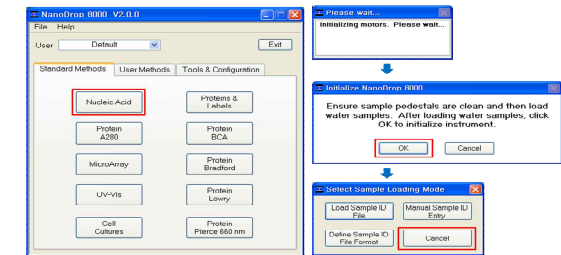


그림 III-2-10. ND-8000의 구조 그림 III-2-11. ND-8000 program 실행과 초기화

- ④ 'Sample type'을 'DNA-50'으로 설정한다. 측정대 위에 멸균 증류수 2 μ l를 올린 후, kimwipes로 닦아준다. Blank를 설정하기 위해 DNA 회석에 사용한 용매(TE 혹은 멸균 증류수) 2 μ l를 multi channel pipette으로 측정대에 올린 후, 윗덮개를

닫고 'Blank'를 선택한다(그림 III-2-12).

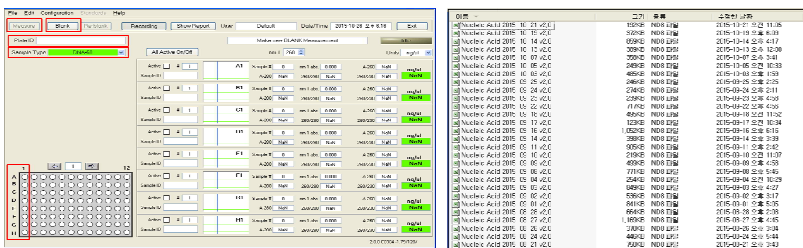


그림 III-2-12. ND-8000 측정 화면과 결과 파일

- ⑤ Blank 설정이 끝나면 측정대의 용액을 kimwipes로 가볍게 닦아준 후, 'Plate ID'를 입력한다.
- ⑥ 2.2.4.에서 희석한 DNA를 multi channel pipette으로 $2\mu\text{l}$ 취하여 측정대에 올리고 윗덮개를 닫는다.
- ⑦ 'Measure'를 선택하여 DNA 농도 및 순도를 측정하고, 측정대의 용액을 kimwipes로 닦아준다.
- ⑧ ⑦을 반복하여 DNA 농도 및 순도를 측정한다. 측정이 모두 끝나면 프로그램을 닫고 ND-8000 폴더 내에 저장된 파일을 열어 최종 결과를 확인한다.
- ⑨ (측정대 세척) 멸균 증류수 $2\mu\text{l}$ 를 측정대에 올리고 윗덮개를 닫았다 열어 준 뒤 kimwipes로 닦아준다.

2.3.4. DNA 순도 측정

- ① 2.3.3.의 측정결과 중 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 및 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 값을 통해 DNA의 순도를 측정한다.
- ② 중앙은행은 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 값이 1.8~2.0, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 값이 1.7 이상인 자원을 정도관리 적합자원으로 판단하며, 부적합 판정 사유는 다음과 같다.
 - $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 비율이 1.8 미만일 경우 단백질 혹은 페놀화합물 등 오염
 - $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 비율이 2.0 이상일 경우 RNA 오염
 - $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 비율이 1.7 미만이면 에탄올 혹은 탄수화물 등 오염

2.4. DNA 안정성(stability) 검사

2.4.1. Agarose gel 전기영동법

2.4.1.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : Gel casting system(gel caster, gel tray, comb), 전기영동 tank, power supply(그림 III-2-13), Micropette($10\mu\text{l}$), Multi channel pipette($10\mu\text{l}$), 전자레인지, 마그네틱 stirrer, UV transilluminator(그림 III-2-14)
- ② 시약 : Agarose powder, 1× TBE buffer*, 멸균 증류수, 6× sample loading buffer**, Safeview™Nucleic Acid Stain(Applied biological materials Inc.)

* (5×TBE buffer 제조) Tris 53g, Boric acid 27.5g을 0.5M EDTA pH8.0 20mL에 녹인 후 멸균 증류수에 1ℓ까지 채운다. 전기영동 시에 1× TBE buffer로 희석해서 사용한다.

** (6×sample loading buffer 제조) Bromophenol blue 0.25%, xylen cyanol FF 0.25%, glycerol 30%(sucrose의 경우 40%)를 멸균 증류수에 녹여서 만든다. (Bromophenol blue의 dye 위치는 약250bp, xylen의 dye 위치는 약 3kb이다)

- ③ 소모품 : Micropette tip($10\mu\text{l}$), 96 well plate, 유리병, 마그네틱 stirrer bar

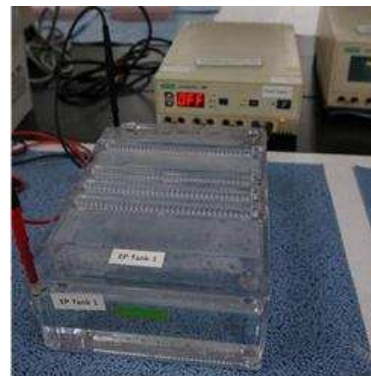


그림 III-2-13. 전기영동 장치



그림 III-2-14. UV transilluminator

2.4.1.2. Agarose gel 만들기

- ① Gel caster에 gel tray 장착 후, comb을 꽂는다(그림 III-2-15).

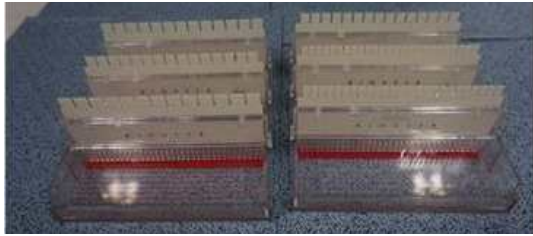


그림 III-2-15. Gel casting system

- ② Gel 농도(w/v)가 1%가 되도록 agarose powder와 1× TBE buffer를 유리병에 넣고 전자레인지 넣은 후, 용액이 끓어 넘치지 않도록 주의하면서 녹인다.

※ Agarose gel 제조 방법(예시) - 1.0% agarose gel 100mL 제조

Agarose powder 1g과 100mL의 1× TBE buffer를 유리병에 넣는다. 뚜껑을 조금 열고 전자 레인지에 1분 30초 이상 충분히 가열하여 agarose를 녹인다. 만약 agarose가 다 녹지 않으면 한 번 더 전자레인지에 넣고 agarose powder를 완전히 녹여준다.

※ 표 III-2-3 DNA 크기 별 agarose gel의 적정농도(%)

Gel 농도[%(w/v)]	DNA size(Kb)	Gel 농도 [% (w/v)]	DNA size(Kb)
0.50	1-30	1.25	0.4-7
0.75	0.8-12	1.50	0.2-3
1.00	0.5-10	2-5	0.01-0.5

- ③ 유리병에 마그네틱 바를 넣고 stirrer 위에 올린 후 agarose gel 용액에 Safeview를 넣어 잘 섞어준다. Safeview™ stain은 agarose gel 용액 100mL당 5μL씩 넣는다.
- ④ Agarose gel 용액이 너무 뜨거울 때 gel caster에 부으면 뒤틀림 현상이 생기므로 적당히(약 60℃) 식힌 후, 기포가 생기지 않도록 주의하며 gel tray에 부어 준다 (그림 III-2-16).

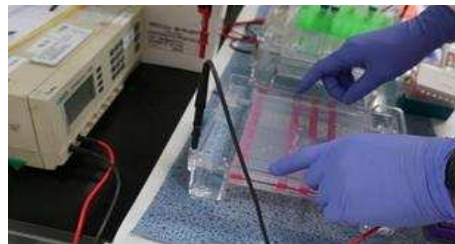


그림 III-2-16. Agarose gel 용액 붓기 그림 III-2-17. 전기영동 tank 내 agarose gel 모습

- ⑤ 30분~1시간 정도 실온에 두어 agarose gel 용액을 완전히 굳힌다.
- ⑥ Agarose gel이 완전히 굳으면 comb을 제거하고, gel tray를 전기영동 tank 안에 설치(그림 III-2-17)한다.
- ⑦ Agarose gel이 잠기도록 충분한 양의 1× TBE buffer*를 tank에 넣어 준다.
- * 전기영동과 agarose gel 제조에 동일한 조성과 농도의 buffer를 사용한다.

2.4.1.3. DNA 전기영동

- ① 희석된 DNA(이 매뉴얼 III.2.2.)와 sample loading buffer를 섞어* agarose gel loading 용 시료를 준비한다. DNA loading mixture 조성은 다음과 같다.

표 III-2-4 Loading mixture 조성

Loading mixture	
DNA(100ng/μL)	1μL
6×sample loading buffer	2μL
멸균 증류수	9μL
Total	12μL

- ② Agarose gel의 왼쪽 끝 well에서부터 DNA size marker(1kb ladder, 260ng), positive control(분해되지 않은 human genomic DNA 또는 λ DNA 50ng), ①에서 준비한 DNA loading mixture(6μL, DNA 50ng) 순으로 loading 한다.
- ③ 전기영동 tank의 뚜껑을 닫고, 음극(-)에 검은색 전선을, 양극(+)에 빨간색 전선을 연결한 후, 50V에서 2시간 동안 DNA를 전기영동 한다(그림 III-2-18).

※ DNA 전기영동 조건(TBE buffer 사용)

Size	Voltage
≤ 1kb	5V/cm
1kb~12kb	4~10V/cm
> 12kb	1~2V/cm

확인할 DNA의 size, Gel casting system의 (-)에서 (+)극까지 길이에 따라 전기영동 전압 조건을 설정한다(좌측 표 참조).

중앙은행에서 사용하는 전기영동 tank의 길이는 228mm로 50V에서 2시간 전기영동 한다.

gDNA와 같이 12kb 이상의 큰 DNA는 5V/cm 이상의 전압을 부화시킬 경우 밴드의 모양이 고르지 않게 된다. 따라서 1~2V/cm의 조건으로 전기영동 한다.

- ④ 전류를 걸고 도선에서 기포가 발생하는 것과 loading dye가 이동하는 것을 확인 한다(그림 III-2-19).

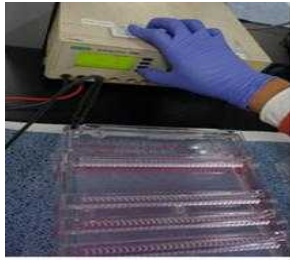


그림 III-2-18. 전기영동기기와 연결

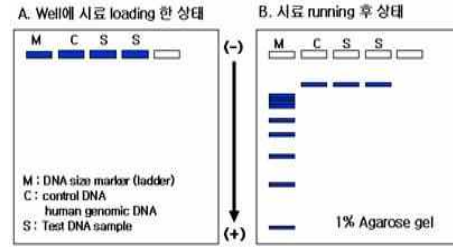


그림 III-2-19. DNA loading

2.4.1.4. Agarose gel 전기영동 결과 확인

- ① 전기영동이 완료되면 Agarose gel을 tank에서 꺼내어 UV transilluminator 안에 넣는다(그림 III-2-20).



그림 III-2-20. Agarose gel 준비

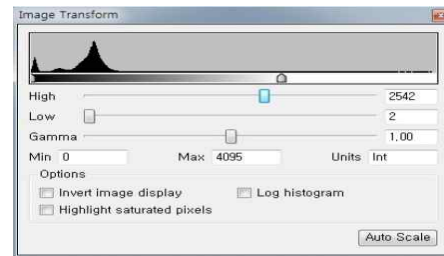


그림 III-2-21. 이미지 조절

- ② Image Lab 프로그램을 실행시킨 후, 'Protocols' → 'New'를 클릭한다. '1. Gel Imaging' → 'Application'을 클릭하여 'Nucleic Acid Gels' → 'Ethidium Bromide'를 선택하고 'Display Options'의 'Highlight saturated pixels' 여부를 선택한다. 'Highlight saturated pixels' 선택 시 전기영동밴드의 두께를 측정해서 밴드가 두꺼울 경우 빨간 보조선으로 나타낸다.

- ③ 'Position Gel' → 'Filter 1' → 'OK'를 선택하고 'Run Protocol'을 클릭한다. Gel 이미지가 나타나면 그림을 클릭하여 화면에 나타나는 gel 이미지의 밝기, 노출 등을 조절한다(그림 III-2-21).

- ④ 'Save'를 클릭하여 해당 파일을 저장한 후, 'Screenshot' → 'To File'을 클릭해

해당 파일을 이미지로 저장(그림 III-2-22)한 후 'Print'를 하여 사진을 출력한다(그림 III-2-23).



그림 III-2-22. 이미지 저장



그림 III-2-23. 이미지 출력


- ⑤ 정보관리시스템에 전기영동 결과를 저장한다(이 매뉴얼 III.2.4.5.). DNA가 분해되지 않은 경우는 '적합', DNA가 분해된 경우 '부적합'으로 판독 결과를 입력한다.

2.4.1.5. 전기영동 결과 정보관리시스템 등록

- ① 정보관리시스템에 로그인하여 '뱅킹업무' → '정도관리' → '신규 정도관리 등록' → 2.2.3-②에서 저장한 '냉동카드'를 선택한다. 그림 III-2-3과 같이 정도관리명을 선택한 후, '시행일자', 'plate와 plate 수', '필요량(μg)', '입력순서'를 설정한 후 '확인'을 선택한다.
- ② 자원 리스트를 확인하고, 화면 우측에 정도관리 결과('적합/부적합')를 선택한 후 '저장'한다(그림 III-2-24).

- * DNA 전기영동결과는 genomic DNA의 agarose gel 전기영동 결과를 입력한다.
- * PCR 후 전기영동을 통해 얻은 미생물 오염 검사 결과도 같은 방법으로 입력한다.

그림 III-2-24. DNA 정도관리 결과 입력

- ③ 화면 상단에 plate를 선택한다. 이미지등록 하단에서  버튼을 선택한 후 전기영동 사진 파일을 업로드 한다. 'Maker', 'loading위치', 'Negative', 'Positive'등을 입력한 후 '저장'을 선택한다(그림 III-2-25).

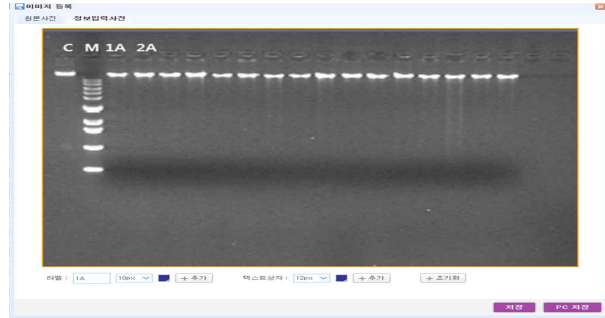


그림 III-2-25. 전기영동 결과 이미지 등록

2.4.1.6. DNA 안정성에 대한 평가

- ① DNA band가 positive control 위치와 비교하여, 아래쪽에 있거나, 아래로 끌림 현상이 나타나면 DNA가 분해된 것으로 판단한다(그림 III-2-26). 분해 의심 자원의 경우, 정도관리용 DNA의 농도를 재확인하고, 전기영동을 다시 수행한다.

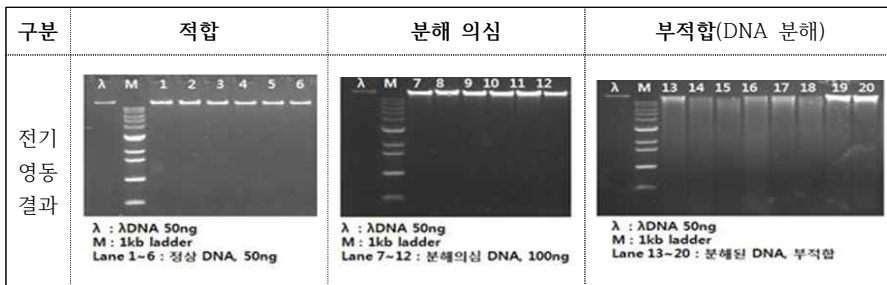


그림 III-2-26. DNA 전기영동 결과 분석

- ② DNA band가 그림 III-2-27과 같이 이중 또는 삼중 밴드로 나타날 경우에도 DNA가 분해된 것으로 판단 한다.
- ③ 전기영동 결과 DNA 분해로 판단되는 경우, 이 매뉴얼 'III.2.2.4. DNA 회석'에서 사용한 원본 DNA를 사용하여 전기영동 방법으로 다시 확인한다.

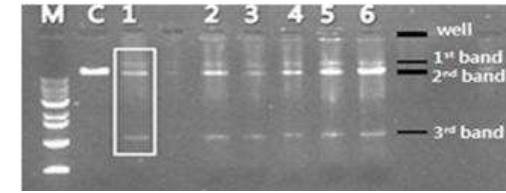


그림 III-2-27. DNA band의 단편화

2.4.2. 전자동 모세관 전기영동법(Fragment Analyzer)

2.4.2.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : Fragment analyzer™, 96-capillary CE system with PROSize® 2.0 data analysis software, Micropipette(2.5μl, 10μl, 20μl, 200μl, 1000μl)
- ② 시약 : DNF-930 dsDNA Reagent Kit(#DNF-930-K1000)*, TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0), 멸균 증류수, 100bp No limit marker(0.5ng/μl)
- ③ 소모품 : Micropipette tip(2.5μl, 10μl, 20μl, 200μl, 1000μl), 50ml centrifuge tube, 96 Deep Well 1ml Plate(buffer용), non-skirted 96-well PCR plate

* 표 III-2-5 DNF-930 dsDNA Reagent Kit(#DNF-930-K1000) 구성 및 사용방법

Reagent(보관온도)	보관온도	사용 방법
dsDNA Separation gel, 75-20,000bp 5× 930 dsDNA Inlet buffer Dilution buffer 1× TE	4°C	사용하기 30분 전 상온에 둔 후 사용
Intercalating dye	-20°C	호일로 감싼 후 상온에서 녹여 사용
1,000bp plus DNA ladder	-20°C	사용하기 전 상온에서 녹여 사용
5× capillary conditioning solution	상온	멸균 증류수를 넣어 1× 용액으로 희석
Storage solution	상온	96 well plate에 50μl 씩 분주, Drawer 3에 장착
No Limit 100bp marker	-20°C	1× TE buffer로 0.5ng/μl로 희석하여 사용

- 장비 좌측 「Drawer W」에 빈 96 Deep well plate를 장착하여 사용하며, 분석 후 남은 buffer가 모아지므로 사용 전.후에는 항상 비워둔다.
- 장비 사용 전.후 우측의 'Waste bottle'을 항상 비워둔다.

2.4.2.2. Reagent 준비

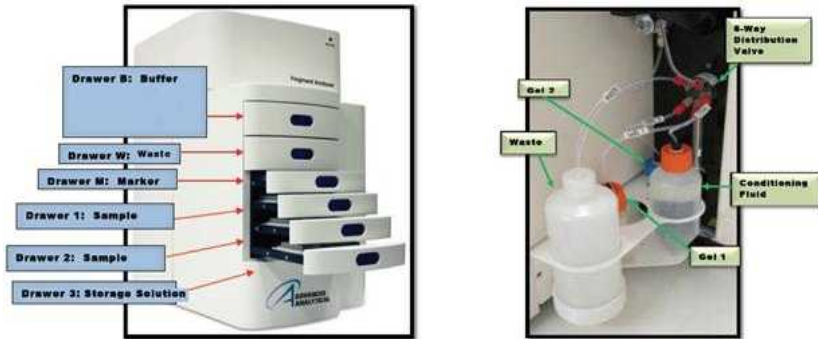


그림 III-2-28. Fragment analyzer 구성

- ① 표 III-2-6의 분석할 시료수에 따른 solution의 소모량을 참고하여 Gel-dye mix solution을 만든다. 실온에 꺼내 놓은 dsDNA separation gel과 Intercalating dye를 기포가 생기지 않도록 가볍게 흔들어 섞어준다. Gel-dye mix solution은 2주내에 다시 사용이 가능하나, 분석 전 바로 만들어 사용하는 것을 권장한다.

표 III-2-6. 96-capillary Fragment Analyzer system 소모량

Sample 갯수	96	192	288	384	480
Intercalating dye(μl)	4	8	12	16	20
Separation gel(mL)	40	80	120	160	200

- ② ①의 gel-dye mix solution을 그림 III-2-28의 gel 1에 기포가 생기지 않도록 넣어준다.
- ③ 1× Capillary conditioning solution을 그림 III-2-28의 conditioning fluid에 기포가 생기지 않도록 주의하여 넣어준다.
- ④ 96 deep well plate에 1× Inlet buffer를 1.1mL씩 분주하고, 'Drawer B'에 장착한다.
- ⑤ No Limit 100bp marker($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 96 well plate의 각 well에 30 μl 씩 분주한 후 mineral oil을 한 방울 씩(약 20 μl)씩 첨가한다. 분주한 marker는 -20℃에서 1달간 보관할 수 있다.
- ⑥ ⑤의 marker plate는 장비의 좌측 'Drawer M'에 장착한다.

- ⑦ 새로운 96 well sample plate의 각 well에 1× TE buffer를 22 μl 씩 분주한다.
- ⑧ DNA sample은 100ng/ μl 로 준비(이 매뉴얼 3.2.)하여 2 μl 씩 ⑦에 넣고 잘 섞어 준다. 단 plate의 제일 마지막인 12H well은 제외한다.
- ⑨ 1,000bp plus ladder 2 μl 를 ⑧의 plate 12H well에 넣고 잘 섞어준 후, 장비의 좌측 Drawer 1, 2 중 선택하여 장착한다.
- ⑩ 96 well plate의 각 well에 Storage solution 50 μl 씩 분주한 후 mineral oil을 한 방울 씩(약 20 μl)씩 첨가하고 'Drawer 3'에 장착한다.

2.4.2.3. 소프트웨어를 통한 기기 작동

- ① 컴퓨터의 전원을 켜고, 장비 본체 뒷면 우측 하단의 전원 스위치를 켜다.
- ② 바탕화면의 'Fragment analyzer software'를 실행하여 로그인 한다(그림 III-2-29).



그림 III-2-29. Fragment analyzer 아이콘 및 로그인 화면

- ③ 상단 메뉴의 'Utilities-Solution levels'를 선택한다. 준비해둔 Gel, conditioning solution, waste 용량 정보를 입력한 후 'OK' 버튼을 선택 한다(그림 III-2-30).

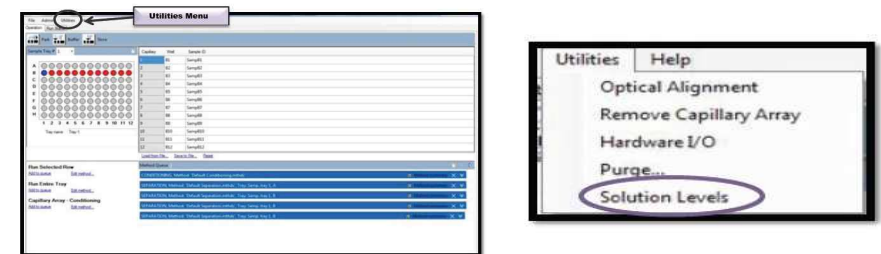


그림 III-2-30. Utilities-solution 용량 정보 입력

- ④ 분석하고자하는 sample tray의 위치를 선택 한다(그림 III-2-31).

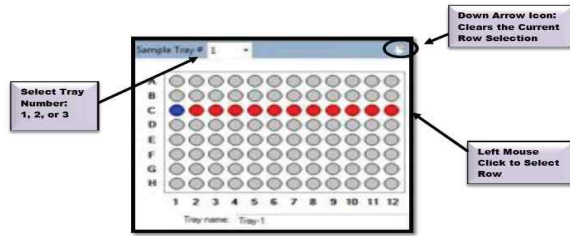


그림 III-2-31. Sample tray 선택

- ⑤ Sample ID는 화면 내에서 직접 입력하거나, '.txt'형태로 저장된 파일을 'Load from file'을 선택하여 불러온다(그림 III-2-32).

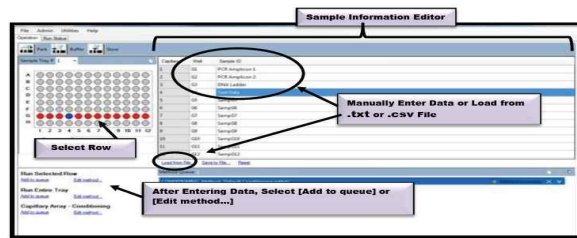


그림 III-2-32. sample ID 입력 또는 저장된 파일 업로드


- ⑥ Run Entire tray 메뉴의 'Add to queue'를 선택하여 separation setup 설정에 저장된 method(DNF-930-33-DNA 75-20,000bp. mthds)를 선택 한다.
- ⑦ Separation setup이 끝나면 메인 화면 실행창에 ⑥에서 설정한 작업이 뜨며(그림 III-2-33),  아이콘을 선택하여 실행한다.



그림 III-2-33. 설정된 작업 창 화면

2.4.2.4. 결과 분석 방법

- ① DNA 측정이 끝나면 분석결과는 PROSize® 2.0 software에 자동으로 기록된다.
- ② 「C:\PROSize 2.0\Configurations」 디렉토리 아래에 날짜 및 시간순으로 결과가 저장된다.
- ③ 결과가 저장된 폴더에서 분석하고자 하는 파일을 선택한다(그림 III-2-34).

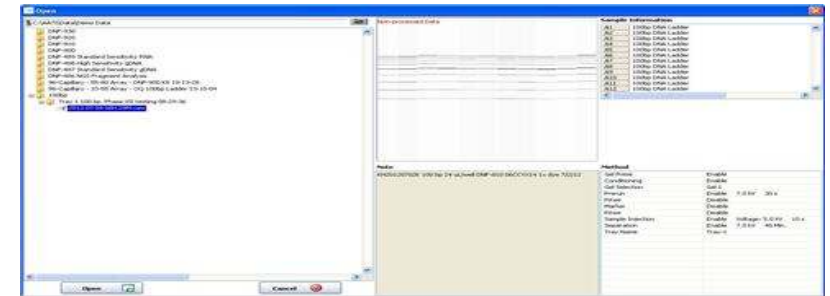


그림 III-2-34. 파일 불러오기

- ④ 메인화면 우측 상단에 있는 'Show size calibration'을 선택한다. 'Show size calibration' 화면에 측정된 ladder가 화면에 뜨며, 기본 저장된 ladder 파일을 불러와 'calibration curve'를 설정한다(그림 III-2-35).
- ⑤ 메인화면 좌측 하단에 'Set individual parameters'를 선택한 후, 'Set individual parameters' → 'marker analysis-marker peak analysis' → 'Use lower marker only'의 'Final conc.'를 0.5ng/μl로 설정한다(그림 III-2-36).

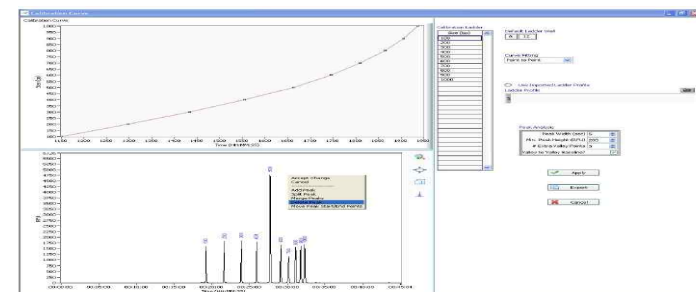


그림 III-2-35. Show size calibration

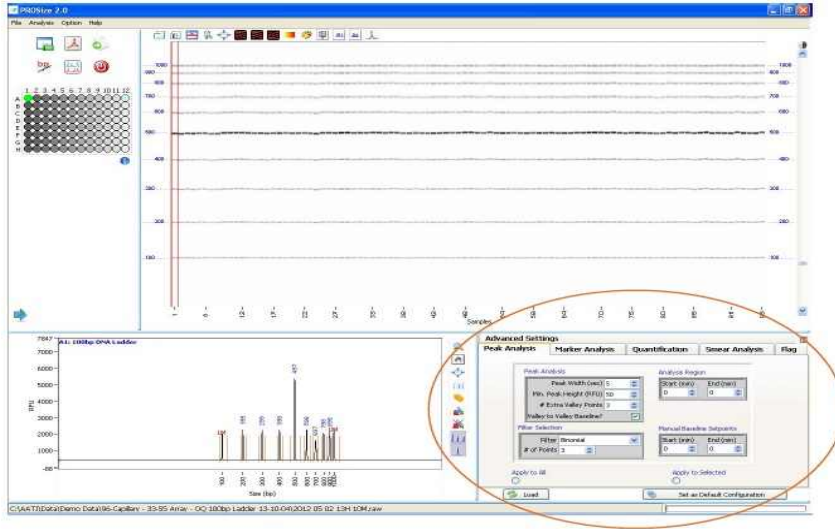


그림 III-2-36. Set individual parameters 설정

⑥ Dilution factor는 $12\mu\text{l}$ ($2\mu\text{l}$ sample + $22\mu\text{l}$ dilution buffer)로 설정한다.

⑦ ⑤에서 설정한 lower marker의 peak가 동일한 size에 위치하는지 확인하고, peak 모양과 GQN(Genomic Quality Number)* 값을 확인하여 샘플의 상태를 확인한다.

* GQN 값은 사용자가 설정한 DNA size 값을 얼마나 포함하고 있는지를 수치화하여 표현한 값이다. 예를 들어 설정 값이 10kb이고, GQN값이 9.7이면 DNA size 10kb 이상이 약 97%로 분석한다.

2.4.2.5. 전자동 모세관 전기영동 결과 분석

‘Agarose gel 전기영동’ 결과에서 gDNA가 분해(sample 3) 또는 분해의심(sample 5)으로 판단되는 경우(그림 III-2-37), ‘전자동 모세관 전기영동’ 결과를 통해 gDNA의 품질을 정확하게 분석을 할 수 있다. ‘전자동 모세관 전기영동’ 결과(그림 III-2-38)에서는 GQN값을 제시하여 자료로 적합한 DNA 인지를 판단할 수 있게 한다.

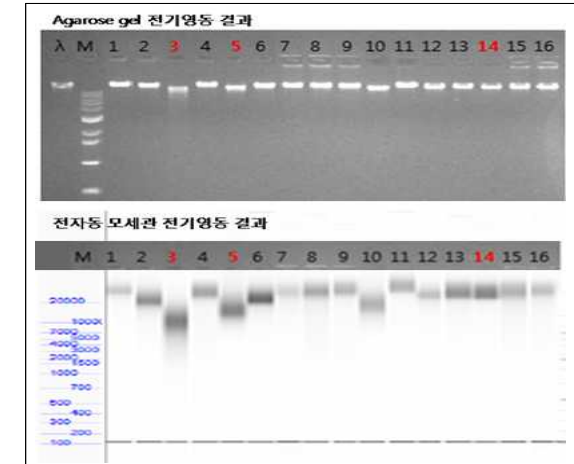


그림 III-2-37. 전기영동 결과 비교

DNA size	모세관전기영동 결과	결과 분석
20kb 이상 (sample 14)		size: 23,065bp GQN: 9.7
10~20kb (sample 5)		size: 14,405bp GQN: 5.3
10kb 이하 (sample 3)		size: 9,707bp GQN: 4.2

그림 III-2-38. 전자동 모세관 전기영동 분석 결과 예시

2.4.3. Long-PCR법(β -globin gene PCR)

2.4.3.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : Micropipette(1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l, 2 μ l), 유전자 증폭기, gel casting system, 전기영동 tank, Power supply, vortexer, 원심분리기, 전자레인지, UV transilluminator
- ② 시약 : High efficiency PCR reaction kit(KOD FX Neo KFX-201, TOYOBO), β -globin Primer set(이 매뉴얼 2.6.2.), 멸균 증류수(PCR grade), Agarose powder, 0.5 \times TBE buffer, 1Kb ladder, λ /HindIII digest marker, 6 \times sample loading buffer, SafeviewTMNucleic Acid Stain(Applied biological materials Inc.)
- ③ 소모품 : Micropipette tip(1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l, 2 μ l), 96 well PCR plate

2.4.3.2. PCR 수행 및 확인

- ① DNA를 준비한다(이 매뉴얼 III.2.2. 참조).
- ② 멸균증류수로 primer set의 농도가 100pmoles/ μ l가 되도록 녹인다. primer 서열은 다음과 같다.

Primer name	Sequence
β -globin_17.7kb	RH1024* TTGAGACGCATGAGACGTGCAG RH1053** GCACTGGCTTAGGAGTTGGACT
β -globin_24.2kb	RH1063* CACAAGGGCTACTGGTTGCCGATT RH1053** GCACTGGCTTAGGAGTTGGACT

- ③ PCR 수행을 위해 ②의 primer stock을 10pmoles/ μ l의 농도로 희석한다.
- ④ High efficiency PCR reaction kit를 사용하여 다음과 같이 PCR mixture*를 만든다.

시 약	용량(μ l)	최종농도
2 \times PCR buffer for KOD FX Neo	25	1 \times
2mM dNTPs	10	0.4mM
RH1024(10pmoles/ μ l, 17.7kb 증폭 시)	0.75	0.15 μ M
RH1063(10pmoles/ μ l, 24.2kb 증폭 시)	0.75	0.15 μ M
RH1053(10pmoles/ μ l)	1	1U
Tag polymerase(1.0U/ μ l)	11.5	
멸균 증류수	1	100ng
Template DNA (100ng/ μ l)	50	
Total		

- ⑤ 다음 온도 조건으로 PCR을 수행한다.

Gene	2-step cycle				
	Pre--denaturation	Denaturation	Extension	Final Extension	Final Step
	Hold	35 cycles	Hold	Hold	
β globin_17.7kb	94°C	94°C	68°C	72°C	16°C
β globin_24.2kb	2 min	15 sec	12 min	10 min	∞

- ⑥ PCR을 수행 후, 1% agarose gel을 만들어 전기영동을 준비한다(이 매뉴얼 III.2.4.2. 참조).
- ⑦ PCR이 완료되면, PCR product(10 μ l)에 6 \times sample loading buffer 2 μ l를 넣어 잘 섞는다.
- ⑧ Agarose gel의 맨 왼쪽 well부터 λ DNA(50ng/ μ l), 1kb ladder(130ng/ μ l) 2 μ l, λ /HindIII digest marker(50ng/ μ l)를 각각 loading 한 후 ⑦의 샘플을 6 μ l씩 loading 한다.
- ⑨ 50V, 120분간 0.5 \times TBE에서 전기영동(이 매뉴얼 III.2.4.3.) 한 후, UV transilluminator로 결과를 확인한다.

2.4.3.3. 결과 판정 및 분석

- ① 'Agarose gel 전기영동 정도관리 결과'에서 DNA 분해가 의심되나, β -globin_17.7kb, β -globin_24.2kb PCR을 수행하여 결과가 적합하면 자원의 품질에 이상이 없는 것으로 판단한다.
- ② β -globin PCR 결과는 'Agarose gel 전기영동 정도관리 결과'와 병행하여 자원의 품질을 판단하도록 하며, 자원 입고 및 분양 여부를 결정한다.
- ③ 전기영동 결과는 별지 제16호서식의 ' β -globin PCR 정도관리 결과서'에 기록한다. β -globin PCR결과가 적합이면 (+)로 표시하고, β -globin PCR 결과가 부적합이면, (-)로 표시하고 전기영동 gel 사진(그림 III-2-39)과 함께 보관한다.

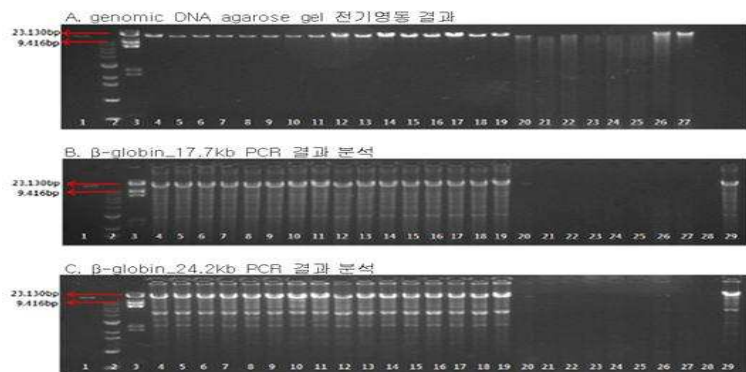


그림 III-2-39. Long-PCR 방법을 통한 DNA 안정성 검사 결과*

* 전기영동법을 이용한 DNA 안정성 검사결과 비교

- Marker : λDNA(Lane 1), 1kb marker(lane 2), λ/HindIII digest marker(lane 3)
- 적합 판정시료 : 전기영동 QC pass, 50ng(lane 4-11),
전기영동 재검 후 QC pass, 100ng(lane 12-19)
- 부적합 판정시료: 전기영동 결과 QC fail(lane 20-27)
- Control : negative(D.W., lane 28), positive(LCL-DNA, lane 29)

2.5. 미생물 오염 검사

2.5.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : Micropipette(1000μl, 200μl, 100μl, 10μl), 유전자 증폭기, gel casting system, 전기영동 tank, Power supply, vortex, 원심분리기, 전자레인지, UV transilluminator
- ② 시약 : PCR reaction kit, Primer(이 매뉴얼 3.7.2.의 ②), 멸균 증류수(PCR grade), Agarose powder, 100bp ladder, 5× TBE buffer, 6× sample loading buffer, Safeview™Nucleic Acid Stain(Applied biological materials Inc.)
- ③ 소모품 : Micropipette tip(1000μl, 200μl, 100μl, 10μl), 96 well PCR plate

2.5.2. PCR 수행 및 확인

- ① DNA를 준비한다(이 매뉴얼 3.2. 참조).
- ② 미생물 오염 검사에 사용하는 primer set를 농도가 10pmoles/μl가 되도록 준비 한다.
primer 서열은 다음과 같다.

Primer name	Sequence		Product size	적용시료
Bacteria	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1.5 kb	Blood DNA LCL DNA
	R	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC		
Mycoplasma	F	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	450 bp	
	R	CGGATAACGCTTGCGACCTATG		
GAPDH	F	GGGTCTTTGCAGTCGTATGG	908 bp	
	R	CCCCAGCTACAGAAAGGTCA		
EBV	F	AGGGGAAGCCGATTATTTTG	200 bp	LCL DNA
	R	GTTGGAACCTCCTTGACCAC		

- ③ 미생물 오염 검사 항목에 따라 다음과 같이 PCR mixture를 만든다.

- 박테리아(Bacteria) 오염 검사를 위한 PCR mixture 조성

시 약	용량(μl)	최종농도
10×buffer	1.5	1×
2.5mM dNTP	1.2	0.2mM
Bacteria primer F(10pmoles/μl)	0.3	0.2μM
Bacteria primer R(10pmoles/μl)	0.3	0.2μM
GAPDH primer F(10pmoles/μl)	0.1	0.07μM
GAPDH primer R(10pmoles/μl)	0.1	0.07μM
Taq polymerase(5.0U/μl)	0.1	0.5U
멸균 증류수	9.4	
Template	2	200ng
Total	15	

- 마이코플라스마(Mycoplasma) 오염 검사를 위한 PCR mixture 조성

시 약	용량(μl)	최종농도
10×buffer	1.5	1×
2.5mM dNTP	1.2	0.2mM
Mycoplasma primer F(10pmoles/μl)	0.9	0.6μM
Mycoplasma primer R(10pmoles/μl)	0.9	0.6μM
Taq polymerase(5.0U/μl)	0.1	0.5U
멸균 증류수	8.4	
Template	2	200ng
Total	15	

▪ LCL DNA의 EBV 검사를 위한 PCR mixture 조성

시 약	용량(μl)	최종농도
10×buffer	1.5	1×
2.5 mM dNTP	1.2	0.2mM
EBV primer mix(10pmoles/μl)	0.9	0.6μM
EBV primer mix(10pmoles/μl)	0.9	0.6μM
Taq polymerase(5.0U/μl)	0.1	0.5U
멸균 증류수	8.4	
Template	2	200ng
Total	15	

④ Mixture를 만든 후, 다음과 같이 유전자 증폭기에 온도를 설정하고 PCR을 수행한다.

정도관리 항목		Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
		Hold	35 cycles			Hold	Hold
박테리아 (Bacteria)	(온도)	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
	(시간)	2 min	30 sec	40 sec	60 sec	10 min	∞
마이코플라즈마 (Mycoplasma), (EBV)	(온도)	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
	(시간)	2 min	30 sec	40 sec	60 sec	10 min	∞

⑤ PCR이 완료되면 PCR product(15μl)에 6×sample loading buffer 3μl를 넣어 잘 섞어준다.

⑥ 1% agarose gel에 ⑤의 각 샘플 6μl와 100bp ladder(135ng/μl) 1.5μl를 loading 한다.

⑦ 150V, 30분간 1× TBE에서 전기영동한다(이 매뉴얼 III.2.4. 참조).

⑧ Gel 사진을 찍어 원본 파일을 저장하고, 이 매뉴얼 III.2.4.5.을 참조하여 정보관리 시스템에 정도관리 결과를 입력한다.

2.5.3. 결과 분석 및 미생물 오염 판정

① 박테리아 오염 검사에 사용되는 positive control(lane13, 14) size는 1.5kb이며, 950bp에서 GAPDH 밴드는 나타나지 않아야 한다. Lane 2와 7~11은 박테리아 밴드가 확인되어 오염으로 판정한다(그림 III-2-40).



그림 III-2-40. 박테리아 오염 PCR 결과

② 마이코플라즈마의 positive control size는 450bp(lane 9)이다. Lane 4,6,7에서 450bp의 밴드가 확인 되어 오염으로 판정한다(그림 III-2-41).



그림 III-2-41. 마이코플라즈마 오염 PCR 결과

③ Lymphoblastoid cell line(LCL) 또는 LCL-DNA에서 EBV infection을 확인할 경우 EBV 확인 검사를 수행한다. Positive control의 size는 200bp(lane 2)이다. Lane 4~11은 EBV가 포함된 것을 확인할 수 있다(그림 III-2-42).



그림 III-2-42. EBV 확인 PCR 결과

2.5.4. 재검 및 부적합 DNA 판정

① (재검) 정도관리 결과가 다음과 같은 경우, 원본 DNA(회석하기 전 DNA, 약 500ng/μl) 1μl를 사용하여 이 매뉴얼의 III.2.7.2.와 같은 방법으로 정도관리를 수행한다.

- DNA band가 흐려서 판독이 어려운 경우(그림 III-2-44 lane 2, 4)
- Positive와 negative control 실험결과가 확실하게 나오지 않은 경우
- 오염으로 의심되는 경우(그림 III-2-43 lane 11, 12)

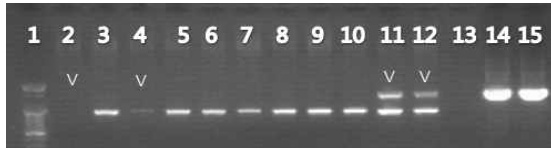


그림 III-2-43. 박테리아 PCR 재검 대상

- ② 재검 결과가 처음과 다르거나, 판별이 어려운 경우 추가 실험을 수행하고 신뢰성이 높은 실험결과를 따르도록 한다.
- ③ 재검 후 적합판정을 받은 경우, 재검 결과와 전기영동 사진을 정보관리시스템에 입력한다(이 매뉴얼 III.2.4.5. 참조).
- ④ 재검 결과가 부적합일 경우 이 매뉴얼 III.2.8.에 따라 자원을 반송할 수 있다.

2.6. 부적합 DNA의 처리

- ① III.2.에 따른 DNA 정도관리 결과, 부적합 시료가 5% 미만인 경우, 부적합 판정을 받은 DNA만 기탁기관으로 반송한다.
- ② 정도관리 결과 부적합 시료가 5% 이상일 경우, 부적합이 발생한 시료 세트(입고일 기준)를 기탁기관으로 반송하고, 전체인수에 대해 정도관리 결과를 첨부해 재입고 하도록 한다. 재입고 된 DNA는 동일 과정(이 매뉴얼 III.2.2.~III.2.7.)으로 정도관리를 시행한다.



그림 III-2-44. 부적합 DNA 처리과정

- ③ 기존 보관자원의 경우, 정도관리 결과 부적합으로 판단되는 경우, 이 매뉴얼 II.4.2.에 따라 검토 후 폐기한다.

3. RNA 정도관리

3.1. 일반사항

- ① 중앙은행은 혈액에서 유래한 세포자원을 확보하여 다양한 전사체 분석을 위한 연구 자원으로 활용하고 있다. 이에 필요에 따라 세포자원의 품질관리 또는 전사체 분석을 위해 RNA를 추출하고 정도관리를 실시한다.
- ② RNA의 품질확인을 위해 분광흡광도법을 사용한 정량 및 정성분석을 실시하고, agarose 전기영동 및 Bioanalyzer를 사용하여 RNA의 안정성을 확인한다.
- ③ **(정량)** NanoDrop을 이용한 분광흡광도법을 사용한다. 이때 A260, A280, A230을 함께 측정하여 농도, 양과 함께 해당 자원의 순도를 확인한다(이 매뉴얼의 'III.3.2. 정량 분석(RNA 농도측정)' 참조).
- ④ **(안정성 검사)** 중앙은행에서는 agarose 전기영동 및 bioanalyzer를 이용한 RIN(RNA Integrity number)값 측정을 통해 RNA 안정성을 확인한다.
 - **(Agarose gel 전기영동)** agarose gel상의 band 패턴(18s ribosomal RNA와 28s ribosomal RNA band의 비율, 분해여부)을 분석하여 RNA의 분해 정도를 확인(이 매뉴얼의 'III.3.3. RNA 전기영동' 참조)
 - **(Bioanalyzer)** 모세관(capillary) 전기영동장치로 RNA의 18s와 28s rRNA ratio를 분석한 후, RIN(RNA Integrity Number)값을 계산하여 RNA의 안정성을 확인(이 매뉴얼의 'III.3.4. RIN(RNA Integrity Number)값 측정' 참조)
- ⑤ 실험실 환경 및 실험자에 의한 오염이 발생하지 않도록 다음사항에 주의하여 정도관리를 수행한다.
 - 깨끗한 실험실 환경 유지 : 실험대 및 공기 중의 미생물로 인한 오염 방지
 - 보호구 착용 : 실험자에 의한 미생물 및 nuclease 오염 방지
 - nuclease free 기자재 사용 : 실험 기자재에 의한 nuclease 오염 방지

3.2. RNA 정량

3.2.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : NanoDrop Spectrophotometer(ND-2000), Micropipette(2.5 μ l, 10 μ l)
- ② 시약 : RNase-free water
- ③ 소모품 : Micropipette tip(10p), kimwipes

3.2.2. NanoDrop을 이용한 RNA 정량

- ① 이 매뉴얼의 'III.2.3.3.1 ND-2000 사용 방법'을 준용하여 RNA의 농도를 측정한다.
단, ND-2000 program 실행 시 「Sample type」을 'RNA-40'으로 설정한다.
- ② 정량 시 RNA의 안정성 유지를 위해 시료를 ice에서 보관하며, 상온에 오랫동안 노출되지 않도록 주의한다.

3.3. RNA 전기영동

3.3.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : Micropipette(2.5, 10 μ l), gel casting system, 전기영동 tank, power supply, 전자레인지, UV transilluminator
- ② 시약 : DEPC Water, 포름알데히드(37% formaldehyde, 12.3 M), MOPS buffer(pH 7.0), agarose powder, gel loading buffer, loading dye

- (MOPS buffer) 0.4 M MOPS, 0.1M 아세트산나트륨(Sodium acetate), 0.01M EDTA
- (Gel loading buffer-100 μ l 기준) 48 μ l Formamide, 17.3 μ l 37% formaldehyde, 34.7 μ l Loading dye
- (Loading dye) 80 μ l MOPS buffer(10 \times), 50 μ l DEPC water, 40 μ l 멸균한 Glycerol, 40 μ l Bromophenol blue, 50 μ l EtBr(10mg/ml)

- ③ 소모품 : Micropipette tip(10 μ l), 1.7ml microcentrifuge tube, 0.2ml RNase-free PCR tube, 라텍스 장갑

3.3.2. 전기영동

- ① 이 매뉴얼의 'III.2.4. Agarose gel 전기영동법'을 준용한다.
- ② 단, 전기영동 조건은 다음과 같다(표 III-3-1). DNA와 같은 조건으로 전기영동을 실시하여도 무방하나, 정확한 18s, 28s의 밴드를 확인하기 위해서는 아래 조건으로 전기영동을 수행하는 것을 권장한다.

표 III-3-1. RNA 전기영동 용 Agarose gel 조성

시 약	Agarose gel		
	50ml	100ml	200ml
Agarose powder(g)	0.2	1	2
DEPC Water(ml)	36	72	144
10 \times MOPS buffer(ml)	5	10	36
37% 포름알데히드(ml)	9	18	36

3.3.3. 전기영동 결과 확인

- ① 그림 III-3-1과 같이 18S : 28S의 비율이 1 : 2 가 되는지 확인한다.
- ② 18s와 28s의 밴드가 보이지 않고 전체적으로 끌리는 현상(smear)이 보이면 RNA가 분해된 것으로 판단한다.

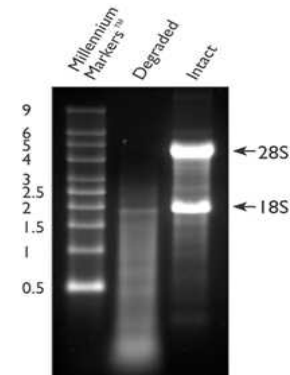


그림 III-3-1. RNA 18S : 28S ratio

3.4. RIN(RNA Integrity Number) 값 측정

3.4.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : Agilent 2100 Bioanalyzer, IKA vortexer, Nano chip, Micropipette(2.5, 10 μ l)
- ② 시약 : ZAP, DEPC Water, Agilent RNA 6000 Nano Kit
- ③ 소모품 : Micropipette tip(10p), kimwipes, 라텍스 장갑, 0.2ml RNase-free PCR tube, 1.7ml microcentrifuge tube

3.4.2. Agilent 2100 Bioanalyzer washing

- ① Washing용 chip에 ZAP을 넣고 1분 동안 probe가 적혀진 상태로 놓아둔다.
- ② ZAP을 버린 후 DEPC water를 넣고 1분 동안 probe가 적혀진 상태로 놓아둔다.
- ③ Bioanalyzer 뚜껑을 열어놓은 상태로 건조한다.

3.4.3. Sample 준비

※ Agilent RNA 6000 Nano Kit 사용

- ① **(RNA ladder 준비)** Ladder*를 녹여 spin down한 후 70℃에서 2분 동안 Heat denaturation 시킨다. 즉시 아이스로 옮겨 식혀준다.

* 사용 후 남은 RNA ladder는 0.2ml RNase-free PCR tube에 1.5 μ l씩 분주(Aliquot)하여 -75℃에 보관한다. 사용 전에는 다시 heating하지 않는다.

- ② **(Gel 준비)** RNA gel matrix는 사용하기 30분 전에 꺼내 녹여준다. 녹은 RNA gel matrix 550 μ l를 취하여 spin filter에 넣은 후 원심분리(1,500g, 10min, 20℃)한다. 65 μ l씩 분주하여 0.5ml RNase-free microcentrifuge tube에 넣어 4℃에 보관한다.
- ③ **(Gel-dye Mix 준비)** RNA gel matrix(65 μ l)에 dye 1 μ l를 넣고 잘 섞어 준 후 원심분리(13,000g, 10min, 20℃) 한다(그림 III-3-2). Gel-dye mixture는 제조 후 하루 동안 사용할 수 있다.

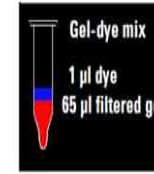


그림 III-3-2. Gel-dye mixture

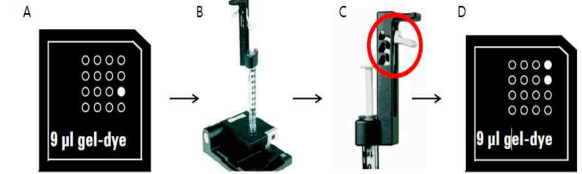


그림 III-3-3. Gel-dye mix 준비

- ④ **(Gel-Dye Mix 준비)** RNA chip에 gel-dye mix 9 μ l를 ㉔에 넣어준다(그림 III-3-3-A).
- ⑤ Press plunger를 끝까지 내려 피스톤 끝을 걸어준다(그림 III-3-3-B). 30초 동안 기다린 후 피스톤을 풀어준다(그림 III-3-3-C). 피스톤이 서서히 올라오면 1ml까지 올라오도록 피스톤을 끌어당긴다. chip을 열고 gel-dye mix 9 μ l를 두 군데 ㉔에 넣어준다(그림 III-3-3-D).
- ⑥ **(Marker loading)** ladder well과 12개 sample well에 RNA loading marker 5 μ l를 넣는다(그림 III-3-4-A).

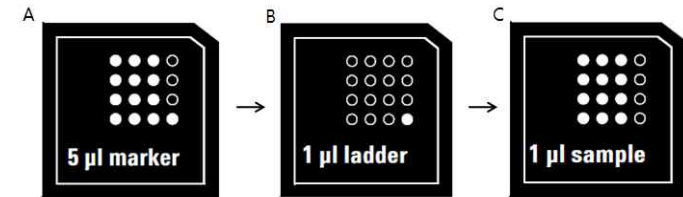


그림 III-3-4. Nanno chip loading 위치(Marker, ladder, sample)

- ⑦ Ladder well에 ladder 1 μ l씩 넣는다(그림 III-3-4-B). RNA sample 1 μ l를 sample well에 넣어 준다(그림 III-3-4-C). Nano chip에 최대 12개 RNA sample을 측정할 수 있다. sample 수가 12개 미만일 경우 나머지 well에 RNA loading marker를 1 μ l 넣어 다른 well과 총 volume을 맞추어 준다.
- ⑧ Nano chip을 IKA vortexer에 올리고 1분 동안 섞어(2,400rpm)준 후, Bioanalyzer에 장착한다(그림 III-3-5).



그림 III-3-5. IKA vortexer 와 Nano chip 장착 모습

3.4.4. Agilent 2100 Bioanalyzer 소프트웨어 실행

- ① Bioanalyzer의 뚜껑을 닫고, 소프트웨어를 실행한다(그림 III-3-6).
- ② 'Assay' → 'RNA' → 'Nano Chip Eukaryote'을 선택한다.
- ③ 'Start'를 선택한 후 Nano chip에 로딩 된 Sample 이름을 입력한다(그림 III-3-7).

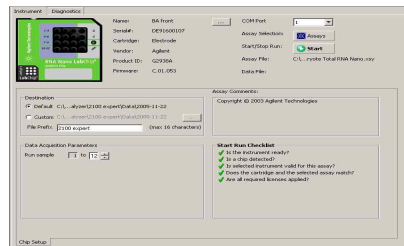


그림 III-3-6. Bioanalyzer 소프트웨어 실행 모습

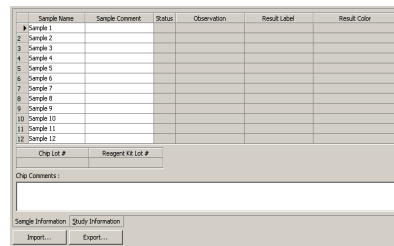


그림 III-3-7. sample 입력

- ④ RNA Integrity Number 결과 값을 확인한다(그림 III-3-8).

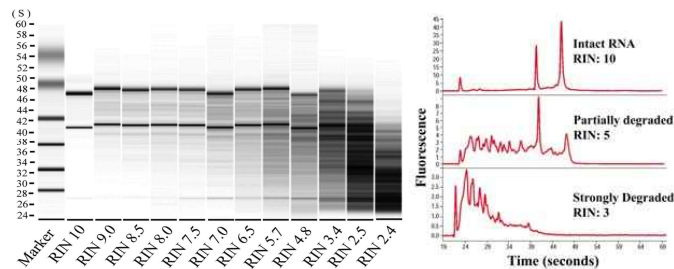


그림 III-3-8. RIN(RNA Integrity Number) 값의 예

3.5. RNA 정도관리 결과 확인

- ① 표 III-3-2를 참조하여 RNA의 품질 부적합 여부를 판단한다.

표 III-3-2. RNA 정도관리 결과 분석

평가 항목		기준	분석 결과
순도	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 비율	1.8 ~ 2.0	적합
		1.6 ~ 1.8	활용목적에 따라 적합여부 판단
		1.6 미만	부적합
	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ 비율 ³⁾	2.0 ~ 2.2	적합
		1.7 ~ 2.0	활용목적에 따라 적합여부 판단
안정성	전기영동 (28s:18s band)	2 : 1	적합
		분해 없음	
		분해/ smear현상	부적합
	RNA Integrity Number ⁴⁾ (RIN)	7 이상	적합
		4 ~ 7	활용목적에 따라 적합여부 판단
		4 미만	부적합

- 3) 세포주로부터 추출한 경우 2.0 이상, 조직으로부터 추출한 경우 1.8 이상을 적합으로 판정
- 4) High quality 시료를 요하는 RNA microarray analysis를 위한 권장 값은 7 이상

4. 세포자원 정도관리

4.1. 일반사항

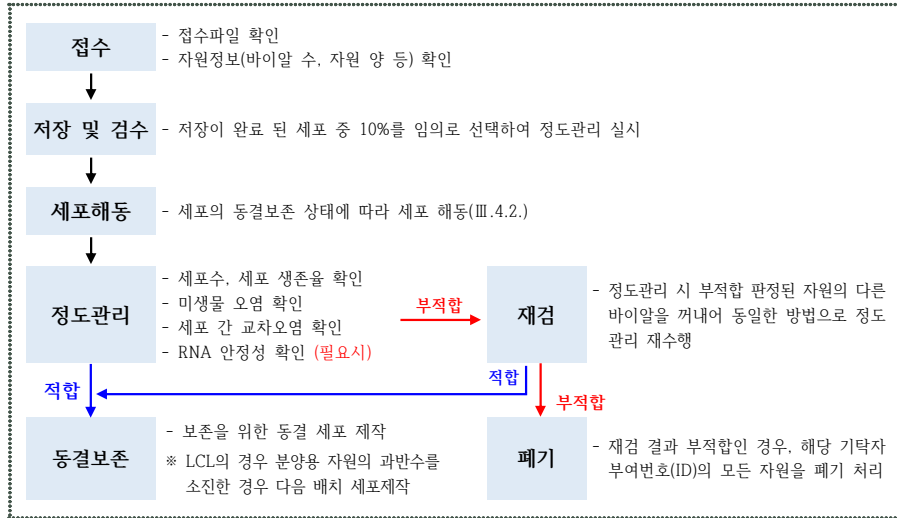


그림 III-4-1. 세포자원 정도관리 흐름도

① 이 매뉴얼에서 다루는 세포 자원은 다음과 같다.

- **연막(Buffy coat)**은 전혈을 원심분리하였을 때 적혈구층과 혈장층 사이에 형성되는 흰색 층(채혈량의 1% 미만)으로 백혈구와 혈소판이 다량 포함
- **PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)**는 Ficoll과 같은 밀도가 높은 용액을 첨가하여 전혈을 분리시켜 얻은 단핵세포 층
- **LCL(Lymphoblastoid Cell Line)**은 EBV(Epstein-Barr Virus) 감염에 의해 불멸화된 B-림프구 세포주

② 세포를 장기간 안정하게 보관하기 위해서는 동결보존이 필수적이며, 보존방법은 동결보존제 사용 여부에 따라 다음의 두 가지 방법으로 나눌 수 있다.

- **(동결보존제 미사용)** 세포를 washing 한 후 원심분리하여 pellet의 형태로 세포를 모아 동결보존 한다. 향후 활용 목적에 따라 trizol 등의 isolation reagent를 처리하여 동결 저장할 수 있다.

- **(동결보존제 사용)** 세포를 살아있는 상태로 장기간 보존할 경우, 동결보존제가 포함된 동결배지에 섞어 초저온(-175℃ 이하)에서 동결보존(stock) 한다. 이 때 세포 증식이 일시적으로 중단되어 안정성을 유지할 수 있고, 필요에 따라 해동하여 사용할 수 있다. 일반적으로 동결배지의 조성은 배양배지, FBS, DMSO (동결보존제)를 5:4:1로 잘 혼합하여 미리 만들어놓은 후 사용한다.

③ 중앙은행은 세포 생존율 확인, 미생물 오염 검사 등을 실시하여 자원의 제작 및 저장 상태를 확인하고, 필요에 따라 세포에서 추출한 핵산(DNA/RNA)의 안정성 및 오염 검사 등을 통해 간접적으로 자원의 품질을 모니터링 한다(표 III-4-1). 또한 세포의 계대배양 가능여부에 따라 다음 사항을 고려하여 정도관리를 실시한다.

- LCL과 같이 계대배양이 가능한 경우, 세포배양을 통해 미생물 오염 또는 다른 세포와의 교차오염 여부를 확인한다.
- 계대배양을 할 수 없는 경우, 해동한 즉시 세포수와 세포생존율을 측정하여 세포 보존 상태를 확인하며, DNA를 추출하여 미생물 오염 여부를 확인한다.

④ 세포자원 정도관리 항목

표 III-4-1. 세포자원 정도관리 항목

정도관리	항목	분석 방법
적혈구 오염 확인	적혈구 유무	현미경 관찰
세포수/세포생존율	(live, dead, total) cell count	Trypan blue exclusion, Hemocytometer
미생물 오염 확인	박테리아, 마이코플라즈마 Fungi, Yeast	PCR 육안, 현미경 관찰
동일성/교차 오염 확인	16개 특정염기서열 마커	STR(short tandem repeat)분석
RNA 안정성 확인	OD230/260/280, 농도	NanoDrop spectrophotometer
	18s : 28s비율	Agarose gel 전기영동
	RNA integrity number	Bioanalyzer

- **(적혈구 확인)** 육안점검 시 자원이 전체적으로 붉은빛을 띠거나, pellet에 적혈구가 섞여있을 경우 적혈구가 완전히 제거되지 않은 것으로 판단하며, 필요에 따라 Hemocytometer로 적혈구, 백혈구 수를 측정할 수 있다. 세포는 DNA/RNA 추출을 위한 연구자원으로 주로 활용되는데, 적혈구가 많이 포함된 세포에서 추출한 DNA/RNA의 경우 안정성이 낮은 경향이 있으므로, 자원 제작 시 주의하여 적혈구를 제거한다.
- **(세포수 측정)** 배양 세포를 최적의 상태로 유지하기 위해 적절한 세포 밀도(cell density)를 유지해야 한다. 세포 밀도(cell density)와 생존율(cell viability)은

세포의 성장과 실험의 재현성에 영향을 미치므로 세포수 측정은 실험과정의 표준화를 위한 중요한 정도관리 과정 중 하나이다(이 매뉴얼 III.4.4.2.).

- **(세포 생존율)** 동결 세포를 해동한 직후나 계대 배양하는 동안 trypan blue exclusion 방법으로 살아있는 세포의 수와 죽은 세포의 수를 측정하여 세포의 생존율을 확인한다(전체 세포 중에서 살아있는 세포수의 비율을 %로 계산, 이 매뉴얼 III.4.4.3.).
- **(미생물 오염 확인)** 제작 및 배양과정에서 세포가 미생물에 오염되면, 세포의 성장, 기능, 형태, 분화상태 및 유전자 발현 등이 영향을 받게 된다. 초기 검체 및 배양 용품, 배양액, 배양실 공기 등의 원인에 의해 다양한 미생물(박테리아, 효모, 곰팡이, 바이러스, protozoa, 마이코플라스마 등) 오염이 발생할 수 있으며, 중앙은행에서는 육안검사, 현미경 관찰 및 PCR 방법(III.2.7. 참조)을 통해 배양 세포의 미생물 오염을 확인한다(이 매뉴얼 III.4.5.).
- **(교차오염, Cross Contamination)** 세포 배양 시 가장 주의해야 하는 오염 중 하나가 세포 간에 발생하는 교차오염이다. 교차오염은 잘못된 연구결과를 초래할 수 있으므로 연구에 사용하는 세포와 다른 세포와의 오염여부를 확인하는 것은 세포 관리에 있어서 매우 중요하다. 중앙은행은 Short Tandem Repeat(STR) 분석을 활용, 각 세포의 DNA 프로파일 분석을 통해 세포 간 교차오염 발생 여부를 확인한다(이 매뉴얼 IV.3.).
- **(RNA 안전성 확인)** 세포는 전사체 분석 등 RNA를 활용한 다양한 연구의 자원으로 활용되고 있다. RNA의 안정성을 높이기 위해서는 세포자원의 품질이 중요하며, 특히 혈액 세포에 적혈구가 많이 포함되거나 세포의 동결과 해동이 SOP에 따라 이루어지지 않았을 경우 추출된 RNA의 안정성이 낮아지는 경향이 있다. 일반적으로 연막 보다는 PBMC에서 추출한 RNA의 RIN 값이 높은 경향이 있으며, 이 매뉴얼 III.3.3. 또는 III.3.4.에 따라 안정성 검사를 실시하여 자원의 품질을 확인해야 한다. Bioanalyzer를 이용한 경우, RIN 값이 보통 7 이상이 우수, 4 이상 7 미만은 양호, 4 미만은 부적합으로 판단한다.

- ⑤ **(자원의 품질관리를 위한 주의 사항)** 오염방지를 위해 배양하기 전·후 생물안전작업대, pipette aid 등은 UV로 30분 이상 살균하고, 배양 직전에는 70% 에탄올로 소독한다. 세포 배양은 생물안전작업대 내에서 수행하며, 공기 중 미생물 오염 방지를 위해 세포배양실 출입 인원은 최소한으로 제한한다.

⑥ 관련 별지서식

- [별지 제17호서식] 세포배양 정도관리 결과서

4.2. 세포 해동(Thawing)

4.2.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : freezing container, 원심분리기, 항온수조, CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C), vacuum pump, 세포수 측정기(cell counter), 생물안전작업대(Class II safety cabinet), 현미경(Inverted phase contrast microscope), Pipette aid
- ② 배양배지 : RPMI-1640, Fetal Bovine Serum(FBS), antibiotics
- ③ 시약 : 0.4% Trypan blue solution, 70% 에탄올(소독용), Phosphate Buffered Saline(PBS)
- ④ 소모품 : disposable pipette(1, 5, 10, 25 μ l), micropipette(20, 200, 1000 μ l), tip, 라텍스 장갑, culture flask(T25, T75), centrifuge tube(15ml, 50ml), 세포이동용 밀폐 용기

4.2.2. Non-viable 상태의 동결세포의 해동

- 동결 보존제 없이 냉동 저장된 연막/PBMC가 non-viable 상태의 세포자원에 해당 된다.
- 항온수조를 사용하지 않고 상온에서 가볍게 tapping 하여 녹여준다.
- Non-viable상태의 연막/PBMC는 해동 후 필요에 따라 세포수와 세포생존율을 확인한다.
- 세포의 활용 목적에 따라 미생물 확인 등의 추가 정도관리를 실시한다.

- ① 15ml centrifuge tube에 PBS(1X) 5ml를 넣어둔다.
- ② 냉동고에서 꺼내온 자원을 상온에서 가볍게 tapping 하여 녹여준다.
- ③ 잘 녹여준 자원을 ①에 넣어 섞어 준 후, 원심분리(200g, 3min, 20°C)한다.
- ④ 상층액을 버리고, PBS(1X) 5ml를 섞어서 세포를 잘 풀어준다.
- ⑤ 일부를 취하여 세포수와 세포생존율을 측정한다(이 매뉴얼 III.4.4. 참조).

4.2.3. Viable 상태의 동결세포 해동

- Viable 상태로 동결 배지에 보존된 세포자원(LCL/PBMC)은 37°C 항온수조에서 빠르게 녹인다. 또한 해동 후 배양이 가능하므로 세포자원에 적합한 배양배지를 미리 준비한다.

- ① 항온 수조(37℃)에 배양배지를 넣어둔다
- ② 15ml centrifuge tube에 해동할 세포의 기탁자부여번호를 기재하고, 37℃로 데워진 배양배지 5ml를 넣어준다.
- ③ 해동할 세포자원을 액체질소냉동고(-175℃ 이하)에서 꺼내 냉동상태를 유지할 수 있는 밀폐된 용기에 담아 배양실로 이동한다. 이때 반드시 개인 보호구를 착용한다.
- ④ 바이알의 뚜껑이 완전히 닫혀있는지 확인하고, 항온 수조(37℃)에서 빠르게(1분 30초 이내) 해동 한다.
- ⑤ 세포가 완전히 녹으면 70% 에탄올로 바이알을 소독한다. 특히 오염원이 될 수 있는 뚜껑 부분을 철저히 소독한다.
- ⑥ 녹은 세포를 1ml micropipette으로 pipetting 하여 ②에서 준비한 배양배지와 잘 섞은 후, 원심분리(200g, 3min, 20℃) 하여 세포를 washing 한다.

※ 세포동결에 동결보존제로 사용되는 DMSO는 4℃ 이상에서 세포에 toxic하므로 빠르게 해동하고 배양배지에 희석하여 toxic effect를 최소화하는 것이 중요하다.

- ⑦ 상층액을 버리고 PBS(1X) 5ml를 넣어 잘 섞은 후, 원심분리(200g, 3min, 20℃) 한다.
- ⑧ 상층액을 완전히 제거하고 배양배지 5ml를 넣어 pellet을 잘 풀어준다. 이 중 일부 (약 100μl)를 취하여 세포수와 세포생존율을 측정한다(이 매뉴얼 III.4.4. 참조).
- ⑨ 별지 제17호서식의 ‘세포배양 정도관리 결과서’에 기탁자부여번호, 출고위치, 해동일자, passage number, 세포수, 세포생존율을 기재한다.
- ⑩ 세포수와 세포생존율을 확인한 후, T25 flask에 넣어 배양배지 9ml를 채운다. 배양 배지의 양은 세포수에 따라 조절할 수 있으며, 9ml 이상 넘지 않게 한다.
- ⑪ 현미경으로 세포를 관찰한 후, CO₂ incubator (5% CO₂, 37℃)에서 배양한다.

* 불멸화된 세포주인 LCL은 계대배양이 가능하나, PBMC는 해동 후 2~3일 동안만 배양할 수 있다.

- ⑫ 24시간 후 세포를 현미경으로 관찰하고 필요에 따라 계대배양을 수행한다.

4.3. LCL(Lymphoblastoid cell line) 계대배양

■ 중앙은행의 주요 세포자원인 LCL(Lymphoblastoid cell line)은 입고 자원의 10%를 임의로 선택하여 계대 배양 후, 세포생존율과 미생물 오염검사를 수행한다.

4.3.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : CO₂ incubator(5% CO₂, 37℃), 원심분리기, 항온수조, Pipette aid, 생물안전작업대(class II safety cabinet), Vacuum pump, 세포 수 측정기 (cell counter), 현미경(Inverted phase contrast microscope)
- ② 배양배지 : RPMI-1640, Fetal Bovine Serum(FBS), Antibiotics
- ③ 시약 : 0.4% Trypan blue solution, 70% 에탄올(소독용), Phosphate Buffered Saline(PBS), Germicidal Detergent(폐수통에 사용)
- ④ 소모품 : Disposable pipette(1, 5, 10, 25ml), tip, 라텍스 장갑, Culture flask(T25, T75), Centrifuge tube(15ml, 50ml), COUNTESS cell counting chamber, 72 Micro Well Mini Tray

4.3.2. 배양조건 및 특징

- ① LCL 배양 조건
 - (배양배지) RPMI 1640(2mM L-glutamine포함), 10% FBS, antibiotics
 - (배양환경) CO₂ incubator(5% CO₂, 37℃), culture flask(T25 또는 T75)
 - (세포밀도) 배양 시 세포의 밀도는 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cell/ml을 유지하도록 하며, 배양배지의 양은 T25 flask의 경우 15ml, T75 flask는 50ml을 넘지 않도록 한다. 그 이상이 될 경우에는 계대배양을 실시한다.
- ② LCL 특징
 - LCL은 clump를 형성하는 세포이다(그림 III-4-2). clump의 크기가 큰 경우 안쪽의 세포는 죽을 수 있으므로 배지를 흔들어주거나, 천천히 pipetting하여 clump를 풀어주는 것이 좋다. 세포수 측정 시, single cell 상태로 만들어 세포수를 측정해야 한다.

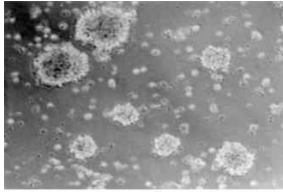


그림 III-4-2. LCL clump 형성

- 배양배지의 FBS 농도는 5~15%이다. 다만 세포의 성장 상태에 따라 FBS 농도는 조절할 수 있다. 성장 속도가 느리거나 죽는 세포가 많은 경우 20%까지 늘려서 배양하는 것도 좋다.
- Cell density가 2×10^5 cell/ml 이하로 낮은 경우 세포 성장이 늦어질 수 있으므로 주의한다.

4.3.3. 배양

- ① 개인보호구를 착용하고 생물안전작업대 내부와 pipette aid를 70% 에탄올로 소독한 후, UV를 작동시켜 30분 이상 살균한다.
- ② 배양배지와 PBS(1×)를 항온수조(37℃)에 넣어 따뜻하게 한다.
- ③ 70% 에탄올로 배양배지와 PBS(1×)가 담긴 용기를 소독한 후, 생물안전작업대 안에 놓아둔다. 생물안전작업대의 에어커튼을 작동시켜 내부 공기를 순환시킨다.
- ④ CO₂ incubator에 배양 중인 LCL을 꺼내어 15ml centrifuge tube에 옮긴다.
- ⑤ 원심분리(200g, 3min, 20℃) 한 후, 상층액을 제거한다. PBS(1×) 5ml를 넣어 준 후 LCL을 잘 풀어준다. 이 중 일부를 취하여 세포수와 세포생존율을 측정한다(이 매뉴얼 III.4.4. 참조).
- ⑥ 별지 제17호서식의 '세포배양 정도관리 결과서'에 기탁자부여번호, 출고위치, 해당 일자, passage number, 세포수, 세포생존율을 기재한다.
- ⑦ 2×10^6 cell/ml 이상으로 세포가 자란 경우 계대 배양을 실시한다.
- ⑧ Seeding cell density는 2×10^5 cell/ml 이상이 되도록 한다. seeding 할 세포를 제외하고 세포수에 맞춰 freezing stock을 만들어 동결보존 한다(이 매뉴얼 III.4.4. 참조).

- ⑨ ①~⑤번 과정을 2~3일에 한 번씩 반복한다.
- ⑩ 계대배양을 할 때 마다 LCL의 passage number를 기록한다.

4.3.4. 동결보존

- ① 동결 보존할 세포는 미생물 오염을 포함하여 오염이 없고, 세포 생존율이 90% 이상 되는 log phase 상태의 건강한 세포를 사용한다.
- ② 15ml centrifuge tube에 세포를 모은 후, 원심분리(200g, 5min, 20℃) 한다.
- ③ 상층액을 제거한 뒤 5ml PBS(1×)를 넣어 섞어준다.
- ④ 원심분리(200g, 3min, 20℃)하여 washing 한다.
- ⑤ 상층액 제거하고, 5ml PBS(1×)를 섞어 cell을 잘 풀어 준 뒤 일부를 취해 세포수를 측정한다(이 매뉴얼 III.4.4. 참조).
- ⑥ 원심분리로 cell pellet을 모아 준 후, 한 바이알 당 5×10^6 cells/ml가 되도록 동결배지를 넣어 1.8ml cryotube에 분주한다. 세포 오염을 줄이기 위해 internal thread 형태의 cryotube를 사용한다(그림 III-4-3 참조).
- ⑦ 바이알에 자원 라벨을 붙이고 freezing container*(그림 III-4-4)에 넣어 기계식 냉동고(-75℃)에서 16시간 이상 저장한 후, 액체질소냉동고(-175℃이하)에 저장한다.

* 세포 동결 시 -1℃/min 속도로 천천히 온도가 낮아진다. isopropanol을 freezing container에 넣고, 동결할 세포 바이알을 홀에 넣어서 사용하며, 5-6회 사용 후 교체해준다.



<Internal thread tube> <External thread tube>



그림 III-4-3. 세포 동결보존 용 cryotube

그림 III-4-4. Freezing container

4.4. 세포수/세포생존을 확인

4.4.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : 생물안전작업대(class II safety cabinet), Vacuum pump, 세포수 측정기 (cell counter), 현미경(Inverted phase contrast microscope), 항온수조, 원심분리기, pipette aid, Micropipette(20 μ l)
- ② 시약 : 0.4% Trypan blue solution, 70%에탄올(소독용), Phosphate Buffered Saline(PBS)
- ③ 소모품 : Disposable pipette (1, 5, 10, 25ml), Micropipette tip (200p), Centrifuge tube (15ml, 50ml), 1.7ml micro centrifuge tube, 라텍스 장갑, Culture flask(T25, T75), Cell Counting chamber, Hemocytometer, Cover glass

4.4.2. 세포수 측정

4.4.2.1. Trypan blue 염색

- ① Flask에서 충분히 배양된 세포를 15ml 또는 50ml centrifuge tube에 옮긴다.
- ② 원심분리(200g, 3min, 20℃)하여 상층액을 제거한다.
- ③ 1× PBS 5~10ml을 넣어준다.
- ③ 세포를 잘 풀어준 후 이 중 일부(50~100 μ l)를 취하여 1.7ml microcentrifuge tube에 옮긴다.
- ④ ③에서 10 μ l을 취한 후 동량의 0.4% trypan blue solution을 넣고 pipetting으로 잘 섞어 세포를 염색*한다.

* Trypan blue로 세포를 염색하면 죽은 세포는 짙은 푸른색으로 염색이 되고 살아 있는 세포는 염색이 되지 않는다.

4.4.2.2. 세포수 측정기(Cell counter) 사용 방법

- ① 세포수 측정기(cell counter)를 켜고, cell counting chamber를 준비한다.
- ② Cell counting chamber의 홈에 4.4.2.1.에서 염색한 mixture 10 μ l을 loading 한다.

이때 공기방울이나 다른 debris가 들어가지 않도록 주의한다.

- ③ 세포수 측정기에 counting chamber를 넣고 세포수를 측정한다(그림 III-4-5). 세포 수 측정 결과 값(총 세포 수, 살아있는 세포 수, 생존율 등)을 별지 제17호서식의 '세포배양 정도관리 결과서'에 기록하고, 4.4.2.1의 ③에서 사용한 PBS의 양(희석 배수)을 곱해서 총 세포 수를 계산한다.



그림 III-4-5. 세포수 측정기(Cell counter)

4.4.2.3. Hemocytometer 사용 방법

- ① Hemocytometer(그림 III-4-6)에 cover glass를 덮고, 4.4.2.1.에서 염색한 mixture 10 μ l을 V-모양의 홈에 loading 한다.

* Hemocytometer(그림 III-4-6)의 격자(grid)는 9개의 큰 square로 구성되어 있다. 가로 1mm, 세로 1mm, 높이 0.1mm인 각 square의 부피는 0.1mm³(1mm×1mm×0.1mm) 또는 10⁻⁴cm³이다. 1cm³=1ml³이므로 한 square에는 시료 0.1 μ l가 loading 된다.

* 대각선 방향의 4개 square에서 세포수를 센 다음 평균을 구한다. 때에 따라 가운데 칸을 포함한 5개 칸의 세포수를 측정하거나, 9개 칸을 모두 측정하기도 하며, 경우에 따라 가운데 한 칸만 세포수를 측정하기도 한다.

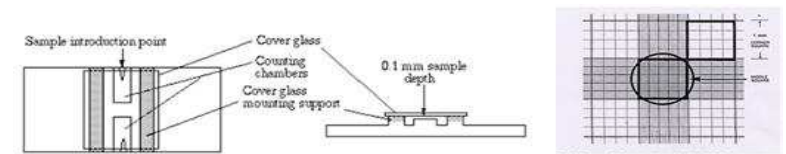


그림 III-4-6. Hemocytometer

- ② 현미경으로 세포수를 측정한다. 살아 있는 세포 수를 측정하고, 죽은 세포 수를 포함한 전체 세포 수를 측정한다. 세포 수 측정 방법은 그림 III-4-7과 같다. 4 곳의 가장자리 중 2곳만 선택하여 세포수를 측정 하고 나머지 2곳의 가장자리에 위치한 세포는 측정하지 않도록 한다.

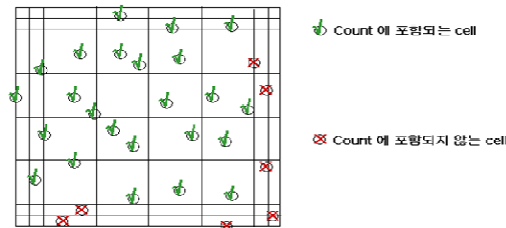


그림 III-4-7. 세포수 측정 방법

③ 한 square에 들어있는 세포의 수는 30~200개가 적당하며, 이 범위를 벗어나면 정확도가 떨어질 수 있다. 세포수가 30개 미만이면 처음 보다 적은 양의 PBS로 재 희석하여 세포 수를 측정하고, 200개 이상인 경우는 희석배수를 늘려서 다시 측정 하는 것이 좋다.

④ **(세포 수 계산방법)** 1㎖당 세포수 및 총 세포수는 다음과 같다.

- 1㎖당 세포 수 = (한 square에 살아 있는 세포 수) × 2(Trypan blue 희석배수) × 10⁴
- 총 세포 수 = 1㎖당 세포 수 × PBS 희석배수

<예시>

PBS 5㎖에 suspension한 세포를 hemocytometer로 세포수를 측정한 경우, hemocytometer의 4개 square에 분포하는 세포수가 160개이면,

- 한 square의 평균 세포 수는 40개이고,
- 1㎖당 세포 수는 (40×2)×10⁴ cells/ml ⇒ 8×10⁵ cells가 된다.
- 총 세포 수는 여기에 PBS 희석배수 5를 곱한다.
⇒ 총 세포 수는 40×10⁵ cells/ml = 4×10⁶ cells/ml 이다.

4.4.3. 세포 생존율(Viability) 측정

- ① Trypan blue 염색법을 이용하여 살아있는 세포의 수(A)와 죽은 세포(B)를 측정한다.
- ② 세포 생존율 계산 방법은 다음과 같다.

$$\text{Cell viability(세포 생존율, \%)} = \frac{\text{살아있는 세포 수(A)}}{\text{전체 세포 수(A+B)}} \times 100$$

4.5 세포자원 오염 확인

4.5.1. 박테리아 & 곰팡이 오염

- ① 세포배양 시 미생물 오염이 발생하면 배양액이 혼탁해지고, pH 변화로 세포성장이 억제된다. 일반적으로 박테리아나 곰팡이(mold, yeast 포함) 오염은 눈으로 확인할 수 있으며, 주기적인 현미경 관찰을 통해 박테리아나 곰팡이 오염 여부를 확인한다.
- ② 미세한 양의 오염을 확인하기 위해서는 미생물 배양배지에서 직접 배양하는 방법을 사용하기도 하지만, 오염을 확인하기까지 시간이 오래 걸린다는 단점이 있어서 일반적으로 PCR 방법을 통해 미생물 오염을 확인한다. 미생물 오염 검사 절차에 따라 PCR 방법(이 매뉴얼 III.2.7. 참조)을 통해 박테리아 오염을 검사한다.
- ③ 일부 미생물의 오염은 세포배양 시 항생제(antibiotics)를 사용하여 예방할 수 있다.

4.5.2. 마이코플라즈마(Mycoplasma) 오염

- ① 마이코플라즈마 오염은 눈으로 관찰하기 어려워 오염 여부를 쉽게 알아내기 힘들다. 또한, 급속하게 주변으로 퍼져나가는 성질이 있어 오염이 발생하면 주변 배양세포 및 세포배양 환경에도 영향을 미칠 수 있으므로 특히 주의해야 한다. 따라서 미생물 오염 검사 절차(이 매뉴얼 III.2.7. 참조)에 따라 주기적으로 마이코플라즈마 오염을 검사한다.
- ② 마이코플라즈마에 오염 된 경우 세포의 증식이 현저하게 떨어지므로 1달 이상 세포가 일정 수 이상으로 자라지 않을 경우에도 마이코플라즈마 오염을 검사한다.
- ③ 마이코플라즈마 오염이 확인되는 즉시 배양 환경으로부터 오염된 세포를 제거하는 것이 오염의 확산을 방지하는 가장 좋은 해결 방법이다.

4.5.3. 세포 간 교차오염(Cross contamination)

※ 이 매뉴얼의 'IV. 인체자원 식별정보 확인' 참조

- ① 세포자원 제작 및 배양 과정에서 자주 발생하는 오염 중 하나가 세포 간 교차오염이다. 세포 교차오염의 확인은 세포 관리에 있어서 매우 중요한 부분이다. 이를 검출하는

여러 가지 방법들이 개발되었으며, 대표적으로 많이 사용되고 있는 것이 STR 방법이다.

- ② STR 방법으로 각 LCL의 DNA 프로파일을 확보하고, 세포 간 DNA 프로파일 비교를 통해 교차오염 여부를 확인할 수 있다.
- ③ LCL 세포주의 DNA 프로파일 비교를 통해 세포배양 중 발생할 수 있는 세포 교차오염을 확인할 수 있으며, 같은 기증자의 혈액(blood) DNA 프로파일과의 간 비교를 통해 세포 제작 과정의 교차오염도 확인할 수 있다.

4.6 정도관리 부적합 세포자원의 처리

- ① (세포배양 실패) 동결 세포를 해동하여 배양 1개월 이내에 세포수가 1×10^7 개 이상으로 증식하지 않으면 해당 바이알은 폐기한다. 해당 시료의 다른 바이알을 꺼내 같은 방법으로 세포의 상태를 확인한다. 추가로 확인한 바이알의 세포 증식도 실패하면 폐기 절차에 따라 해당 세포 자원은 모두 폐기한다.
- ② (미생물 오염) Fungi 및 yeast(그림 III-4-8-A, B), 박테리아(그림 III-4-8-C), 마이코플라스마(그림 III-4-8-D) 등 미생물 오염이 확인된 경우 해당 바이알은 폐기한다. 해당 자원의 다른 바이알을 꺼내 미생물 오염 여부를 확인하고, 추가로 확인한 바이알도 미생물 오염으로 확인되면 폐기 절차에 따라 해당 세포자원은 모두 폐기한다.

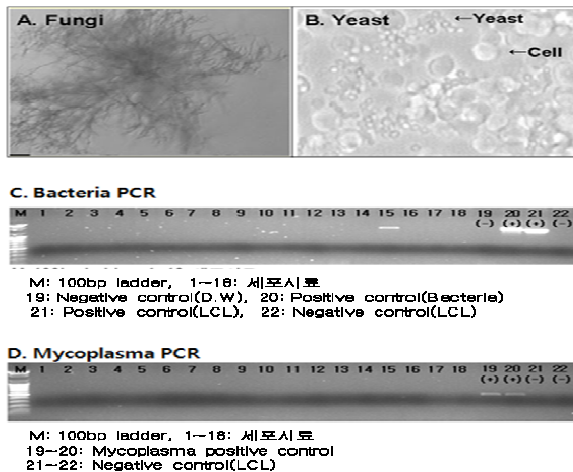
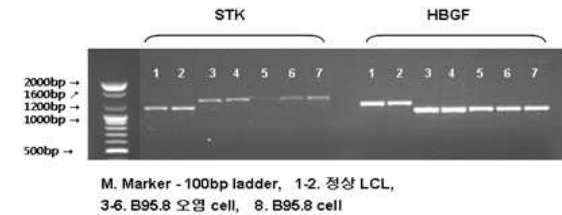


그림 III-4-8. 미생물 오염 정도관리

- ③ (교차오염) LCL은 B95.8 cell과의 교차오염이 확인되거나(그림 III-4-9-A), 혈액 DNA 또는 다른 LCL과 프로파일을 비교하여 세포 간 교차 오염이 확인되면(그림 III-4-9-B) 정해진 다음 절차에 따라 자원을 처리한다.
 - 자원 기탁자부여번호 오류인 경우, 시료 간 확인을 통해 자원라벨과 정보를 수정하고, 두 개 세포가 혼재된 것으로 확인된 경우에는 절차에 따라 해당 배양 세포는 폐기한다.
 - 해당 시료의 다른 바이알을 꺼내어 교차오염 여부를 확인한다. 다른 바이알도 교차오염으로 확인되면 세포 폐기 절차에 따라 해당 세포 시료는 모두 폐기한다.

A. B95.8 cell 오염 확인(PCR)



B. 교차오염 확인(STR)



그림 III-4-9. 세포 간 동일성·교차오염 확인

IV. 인체자원 식별 분석

1. 일반사항	96
2. 분석시료 준비	97
3. Alphoid Repeat PCR: 성별 확인 검사	104
4. STR(Short Tandem Repeat): DNA genotyping	111

1. 일반사항

1.1. 일반사항

- ① 인체자원을 대량으로 수집, 관리하는 과정에서 인체자원 정보 기재 오류, 교차오염(cross-contamination) 및 라벨 부착 오류 등이 종종 발생한다. 이에 필요한 경우 중앙은행은 자원식별정보 확인을 통해 오류사항을 수정하고, 정확한 정보를 확보하는 등 보유자원의 신뢰확보를 위해 노력한다.
- ② 중앙은행은 보유자원의 식별확인 방법으로 PCR 방법을 이용한 성별확인, STR(Short tandem repeat) 분석 방법을 사용한다.
- ③ 인체자원 식별을 위한 확인방법은 대부분 성별 또는 각 개체의 특이적인 genotype(유전형)을 확인하는 방법을 사용한다. 이에 DNA 외에 세포(연막, PBMC, LCL 등) 및 체액 등의 인체유래물에 대한 식별이 필요한 경우, 「자원수집 및 등록 매뉴얼」의 2.2.2.9. 및 이 매뉴얼 IV.2.을 참고하여 DNA를 추출한 후, 해당하는 식별정보 확인 절차를 수행한다.
- ④ **(성별확인)** 인체유래물의 성별정보 확인이 필요한 경우, X, Y 염색체 특이적인 alphoid Repeat sequence를 PCR 방법으로 증폭하고, 해당 sequence의 증폭여부로 인체유래물의 성별을 확인한다(이 매뉴얼 IV.2.). 이 매뉴얼에서 사용하고 있는 방법은 민감도가 높아 gDNA 약 60pg으로도 성별 분석이 가능하다.
- ⑤ **(STR 분석)** 16개 STR(Short Tandem Repeat) marker를 분석하여 개별 자원의 DNA 프로파일을 확보할 수 있다. 필요한 경우, 개별 시료의 프로파일을 분석하여 시료 간 동일성을 확인할 수 있으며, 자원 제작과정에서 발생한 시료 간의 교차오염(cross-contamination) 및 기탁자부여번호 기재 오류 등도 STR 분석을 통해 확인할 수 있다.
- ⑦ 성별 PCR, STR 및 SNP 분석 등을 통해 확인한 자원 식별정보가 기존 확보한 정보와 다르거나 교차오염이 발생했다고 판단되는 경우, 이 매뉴얼의 'II.1.6. 부적합 자원 처리', 'II.2.4. 불일치 정보의 수정', 'II.4. 자원폐기' 및 「인체자원 관리 지침」의 '3. 인체자원의 폐기'를 기준으로 판단하여 해당자원을 처리한다.

2. 분석시료 준비

2.1. 혈액자원 식별을 위한 DNA 추출

※ 「자원수집 및 등록 매뉴얼」의 '2.2.2.9. 혈액 Genomic DNA' 참고

2.2.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : 원심분리기, micropipette, Rotating mixer, 37°C incubator, vortexer, ice bucket, NanoDrop Spectrophotometer
- ② 시약 : RBC lysis solution, cell lysis solution, protein precipitation solution, RNase A solution, isopropyl alcohol, ice, 70% ethyl alcohol, DNA hydration solution 또는 TE buffer
- ③ 소모품 : micropipette tip, 1.7mL microcentrifuge tube, 15mL centrifuge tube
※ micropipette 및 tip : 채혈량에 따라 적합한 규격의 장비 및 소모품 사용

2.2.2. DNA 추출

- ① 채혈튜브에서 연막층을 분리하여 새로운 15mL centrifuge tube로 옮긴다.
- ② 연막의 3배에 해당하는 양의 RBC lysis solution을 첨가하여 섞어준 후 실온 (15-25°C)에서 10분간 방치한다.
- ③ 원심분리(2,000g, 5분, 실온) 후 상층액을 제거한다.
- ④ 원심분리 후, 적혈구가 완전히 분해되지 않으면 ②,③과정을 한 번 더 반복한다.
- ⑤ 세포가 쉽게 용해될 수 있도록, cell lysis solution을 첨가하기 전에 pellet을 tapping 하거나 vortexing 하여 세포를 잘 풀어준다.
- ⑥ 연막 분리 전 전혈과 동량의 Cell lysis solution을 넣고 pipetting으로 혼합하여 세포를 완전히 용해한다. 세포 clump가 보이지 않을 때까지 37°C에서 incubation하여 완전히 용해(lysis)한다.

- ⑦ (선택사항) Cell lysis solution의 1/200(최종농도: 20ug/mL)에 해당하는 RNase A solution (4mg/mL) 넣고 25회 정도 흔들어서 시료를 섞어준 후 37°C에서 15 ~ 60분간 incubation 한다.
- ⑧ (37°C에서 incubation을 한 경우 시료를 ice에서 식힌 후 다음 단계를 시행한다) Protein precipitation solution을 cell lysis solution의 1/3에 해당하는 양을 넣고, 20초간 강하게 vortexing하여 균일하게 섞이도록 한 후, 원심분리(2,000g, 5분, 실온) 한다.
- ⑨ Protein pellet이 들어가지 않도록 주의하여 ⑧의 상층액을 새로운 15mL centrifuge tube에 옮기고, cell lysis solution과 동량의 아이소프로필알코올을 첨가한다.
※ ⑧의 상층액에 protein pellet이 섞여있을 경우, ice에서 5분간 incubation 한 후, 다시 원심분리(2,000g, 5분, 실온) 한다.
- ⑩ 50회 정도 부드럽게 흔들어 시료를 섞은 후, 원심분리(2,000g, 3분, 실온)하여 DNA pellet을 분리한다.
- ⑪ DNA pellet이 떨어지지 않도록 주의하여 상층액을 제거하고, 흡수성이 있는 깨끗한 종이에 tube를 거꾸로 하여 아이소프로필알코올을 완전히 제거한다.
- ⑫ 70% 에탄올 3mL을 넣어 여러 번 흔들어 DNA pellet을 washing 한다.
- ⑬ 원심분리(2,000g, 1분, 실온) 후, DNA pellet이 떨어지지 않도록 주의하여 상층액을 제거한다.
- ⑭ 다시 한 번 원심분리(2,000g, 2분, 실온)하고, micropipette으로 남아있는 에탄올을 완전히 제거한다.
- ⑮ DNA pellet을 실온에서 10~15분간 건조 후, DNA hydration solution 또는 TE buffer를 넣어 pellet을 완전히 녹인다.
- ⑯ DNA가 완전히 녹으면 「인체자원 정도관리 매뉴얼」을 참조하여 DNA를 정량한다.

2.2. 혈청(Serum)자원 식별을 위한 DNA 추출

2.2.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : 원심분리기, micropipette(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), Rotating mixer, MagaRack
- ② 시약 : ChargeSwitch gDNA Serum kit, 0.2~1ml(Thermo Fisher Scientific, CS11040)
- ③ 소모품 : micropipette tip(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), 1.7ml microcentrifuge tube

2.2.2. DNA 추출

- ① Lysis mixture 시약 만들기 (Serum 100 μ l 기준)
 - ChargeSwitch Lysis Buffer: 70 μ l, Proteinase K: 30 μ l
 - (optional) RNase A : 5 μ l
- ② 1.7ml microcentrifuge tube에 혈청 100 μ l 넣고 Lysis mixture 100 μ l와 혼합한다.
- ③ Rotating mixer 사용하여 상온에서 20분 동안 반응시킨다.
- ④ **(Binding DNA)** ChargeSwitch Purification Buffer 250 μ l를 추가하여 혼합하고, ChargeSwitch magnetic beads 30 μ l를 혼합한다.
- ⑤ 상온에서 2분 동안 방치하여 magnetic bead에 DNA가 결합하도록 한다.
- ⑥ Magnetic bead-DNA가 혼합되어 있는 튜브를 3분 동안 MagnaRack에 거치한다. Pellet이 단단히 형성될 때까지 충분히 거치한다.
- ⑦ 튜브를 MagnaRack에 거치한 상태로 pellet을 건드리지 않도록 주의하면서 상층액을 제거한다.
- ⑧ **(Washing DNA)** Washing buffer 1ml로 파이펫팅하여 magnetic beads를 세척한다. 이 과정에서 bubble이 생기지 않도록 주의한다.
- ⑨ Bead가 혼합되어 있는 튜브를 2분 동안 MagnaRack에 거치한다. Pellet이 단단히 형성될 때까지 충분히 거치한다.
- ⑩ 튜브를 MagnaRack에 거치한 상태로 pellet을 건드리지 않도록 주의하여 상층액을 제거한다.

⑪ ⑧ ~ ⑩ 과정을 반복한다.

⑫ **(Eluting DNA)** MagnaRack에 거치된 워싱 튜브의 상층액을 깔끔히 제거한 후, 20 μ l ChargeSwitch Elution Buffer 혹은 TE Buffer(PH 8.5)를 넣어 DNA를 용해한다. 양이 적어 상당한 주의가 필요하며 MagnaRack에 튜브를 거치해 놓고 pellet이 단단히 형성될 때 까지 2분 정도 방치한 후, DNA를 포함하고 상층액을 다른 튜브로 옮긴다.

⑬ DNA 농도가 낮기 때문에 일정량씩 분주하여 바로 -20℃에 보관한다.

2.3. 혈장(Plasma)자원 식별을 위한 DNA 추출

2.3.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : 원심분리기, micropipette(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), Rotating mixer, Vortexer
- ② 시약 : MagMax Total Nucleic Acid Isolation kit, 0.2~1ml(Thermo Fisher Scientific, CS11040)
- ③ 소모품 : micropipette tip(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), 1.7ml microcentrifuge tube

2.3.2. DNA 추출

- ① 시약 만들기
 - Washing Solution I : 12ml 100% isopropanol 추가하기
 - Washing Solution II : 32ml 100% ethanol 추가하기, 상온 보관
 - Lysis/Binding Solution

구성	Per reaction
Lysis/Binding Solution Concentrate	232 μ l
Carrier NA(1 μ g/sample)*	3 μ l

* Carrier NA 용액에 결정이 생기며 37℃에서 방치 한 후, 잘 혼합한 후 사용한다.

▪ Bead mix

구성	Per reaction
NA Binding Beads*	10 μ l
Lysis/Binding Enhancer	10 μ l

* NA Binding Beads 파이펫으로 덜기 전에 vortexer로 혼합한다.

- ② Bead mix 용액이 담겨진 튜브에 Lysis/Binding 용액 235 μ l를 혼합한다.
- ③ 혈장(100~200 μ l : kit 권고 175 μ l)을 추가한다.
- ④ 15분 동안 Rotating mixer 사용하여 방치한다.
- ⑤ 16,000g에서 3분 동안 원심 분리한다.
- ⑥ Elution buffer를 65℃ 방치한다.
- ⑦ 원심 분리한 튜브에 상층액 115 μ l를 새로운 튜브로 옮긴다.
- ⑧ 100% isopropanol 65 μ l를 1분 동안 혼합한다.
- ⑨ Bead mix 20 μ l를 추가한 후, 5분 동안 잘 혼합한다.
- ⑩ Bead가 혼합되어 있는 튜브를 5분 동안 MagnaRack에 거치한다. pellet이 단단히 형성될 때까지 충분히 거치한다.
- ⑪ Washing Solution 1 150 μ l로 파이펫팅하여 beads를 1분 동안 세척한다. 이 과정에서 bubble이 생기지 않도록 주의한다(2 반복).
- ⑫ Washing Solution 2 150 μ l로 파이펫팅하여 beads를 1분 동안 세척한다. 이 과정에서 bubble이 생기지 않도록 주의한다(2 반복).
- ⑬ Washing Solution 2를 용액을 제거한 후, pellet을 건조시킨다.
- ⑭ ⑥의 과정에서 65℃에 방치 한 elution buffer를 20~50 μ l pellet에 3분 동안 잘 혼합한다.

2.4. 뇨(Urine)자원 식별을 위한 DNA 추출

2.4.1. 장비 및 소모품

- ① 장비 : 원심분리기, micropipette(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), Rotating mixer, Vortexer
- ② 시약 : QiagenMicroDNA kit, 0.2~1ml(Thermo Fisher Scientific, CS11040)
- ③ 소모품 : micropipette tip(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l), 1.7ml microcentrifuge tube

2.4.2. DNA 추출

- ① 1.5ml 튜브로 뇨 1ml 옮긴다
* (1~10ml) 뇨 까지 가능, 튜브 상태에 따라 원심분리기 선택
- ② 뇨가 담겨진 1.5ml 튜브를 6000g(8,000rpm)에서 2분 동안 원심 분리한다.
- ③ 상층 액을 버리고 AE buffer 500 μ l 추가한 후, 5초 동안 혼합한다.
- ④ 6000g(8,000rpm)에서 2분 동안 원심 분리한다.
- ⑤ 상층 액을 버리고 ATL buffer 300 μ l, proteinase K 20 μ l를 잘 혼합한 후, 10초 동안 잘 혼합한다.
* 1 M DTT 혹은 β -mercaptoethanol 20 μ l를 추가하며 추출 민감도를 증가 시킬 수 있음 (kit에 포함되지 않음)
- ⑥ 1시간 동안 rotating mixer에서 56℃, 900rpm으로 방치한 후 원심분리를 간략히 한다.
* 15분 간격으로 10초 정도 vortex를 활용하여 혼합하며 lysis 양을 증가시킬 수 있다.
- ⑦ Lysis가 완료된 튜브에 Buffer AL 300 μ l와 100% ethanol 50 μ l를 추가 한 후 혼합하여 원심분리를 간략히 한다.
- ⑧ QIAamp Mini Elute column 으로 1.5ml에 담겨있는 용액을 옮겨 담는다.
- ⑨ 6000g(8,000rpm)에서 1분 동안 원심 분리한다.
- ⑩ AW1 500 μ l를 column의 membrane 넣어준다.

- ⑪ 6,000g(8,000rpm)에서 1분 동안 원심 분리한 후 collection 튜브에 모아진 용액을 버린다.
- ⑫ AW2 500 μ l를 column의 membrane 넣어준다.
- ⑬ 6,000g(8,000rpm)에서 1분 동안 원심 분리한 후 collection 튜브에 모아진 용액을 버린다.
- ⑭ 20,000g(14,000rpm)에서 3분 동안 원심 분리 한 후, column의 membrane을 완전히 말린다.
- ⑮ Column의 collection tube를 깨끗한 것으로 교체 해 준 후, column의 membrane에 buffer AE를 20 μ l-50 μ l 넣어 1분 동안 방치 한 후 DNA를 녹인다.
- ⑯ 20,000g(14,000rpm)에서 1분 동안 원심 분리하여 DNA를 추출 한다.

3. Alfold Repeat PCR: 성별 확인 검사

3.1. 시약 및 기자재

3.2.1. PCR

- ① 장비 : Micropipette(1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l, 2.5 μ l), 유전자 증폭기, NanoDrop, vortexer, 원심분리기
- ② 시약 : PCR MasterMix kit, Primer set(IV.2.2. 참조)
- ③ 소모품 : 96-well PCR plate, Micropipette tip(1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l, 2.5 μ l)

3.2.2. Agarose gel 전기영동(이 매뉴얼 III.2.4.1. 참조)

- ① 장비 : Power supply, 전기영동 tank, gel casting system, UV transilluminator, 전자레인지
- ② 시약 : Agarose powder, 5 \times TBE buffer, 멸균증류수, 6 \times sample loading Buffer, SafeviewTMNucleic Acid Stain(Applied biological materials Inc.)
- ③ 소모품 : Micropette tip(10 μ l), 96 well plate, 유리병, 마그네틱 stirrer bar

3.2.3. Fragment analyzer(이 매뉴얼 III.2.5.1. 참조)

- ① 장비 : Fragment Analyzer 96 capillary system
- ② 시약 : dsDNA 905 Reagent Kit*, 멸균증류수(PCRgrade)
- ③ 소모품 : 96 Deep Well 1ml Plate(buffer 용), non-skirted 93-well PCR plate

* dsDNA 905 Reagent kit 구성

보관온도	시약
-20℃	Intercalating Dye(99% Dimethyl sulfoxide**), 35-400bp Range DNA Ladder, 1bp and 500bp Marker(10% Formamide**),
4℃	5× 930 ds DNA Inlet Buffer(2% Triethylamine**), ds DNA 905 Separation Gel, Dilution Buffer 1X TE
실온	5× Capillary Conditioning Solution, Mineral Oil

** 해당 시약에 포함된 유해물질 : 해당 시약은 피부와 눈에 손상 및 자극을 줄 수 있으므로, 취급 시 실험복, 장갑 등의 안전보호구를 반드시 착용하고, 폐기물은 반드시 지정된 폐기물 박스에 처리한다.

3.2. PCR 수행

- ① 정도관리용 DNA 시료를 준비한다(이 매뉴얼 III.2.2. 참조).
- ② 성별 확인 검사에 사용하는 primer의 염기서열은 다음과 같다.

	Primer name	Sequence	Product size
X	Forward_F8	5'-TACCATCCAGGCTGAGGTTTAT-3'	200bp
	Reverse_F8	5'-AAAGAGTTGTAAACGCCACCATT-3'	
Y	Forward_Y11	5'-ATGATAGAAACGAAATATG-3'	170bp
	Reverse_Y22	5'-AGTAGAATGCAAAGGGCTC-3'	

- ③ alphoid repeat X와 Y를 한 번에 확인하기 위해, 다음과 같이 multiplex PCR mixture를 만든다.

시 약	용량 (μl)	최종농도
MasterMix.(2×)	7.5	1×
F_F8 (10pmoles/μl) / R_F8 (10pmoles/μl)	0.5(각 0.25)	0.25μM / 0.25μM
F_Y11 (10pmoles/μl) / R_Y22 (10pmoles/μl)	1.5(각 0.75)	0.5μM / 0.5μM
멸균 증류수	4.9	
Template DNA	0.6	300ng
Total	15	

- ④ 유전자 증폭기의 온도를 다음 조건으로 설정한 후 PCR을 수행한다.

	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
cycle 횟수	Hold	30 cycles			Hold	Hold
(온도)	95℃	95℃	56℃	72℃	72℃	4℃
(시간)	5 min	40 sec	40 sec	60 sec	2 min	∞

3.3. 결과확인

3.3.1. Agarose gel 전기영동 법 (이 매뉴얼 III.2.4. 참조)

- ① 200bp 이하인 PCR의 product 확인을 위해 2% agarose gel을 만들어 전기영동을 준비한다(이 매뉴얼 III.2.4.2.참조).
- ② PCR이 완료되면, 6× sample loading buffer 3μl를 PCR product(15μl)에 넣어 loading mixture를 만든다.
- ③ Agarose gel의 왼쪽 끝 well에서부터 size marker(100bp ladder, 135ng/μl) 2μl, PCR product loading mixture 6μl를 순서대로 loading한다.
- ④ 150V, 40분간 1× TBE에서 전기영동한 후, UV transilluminator로 결과를 확인한다.
- ⑤ 이 매뉴얼 III.2.4.5.를 참고하여 정보관리시스템에 결과를 입력한다.

3.3.2. fragment analyzer 법 (이 매뉴얼 III.2.5. 참조)

3.3.2.1. 시약 및 샘플 준비 (1 plate 기준)

- ① 실험 전에 각 시약을 다음과 같이 준비한다.
 - 5× 930 ds DNA Inlet Buffer를 멸균증류수로 희석하여, 1× 용액 110ml를 만든다.
 - 5× Capillary Conditioning Solution를 멸균증류수로 희석하여, 1× 용액 35ml를 만든다.
 - Intercalating Dye, 1bp and 500bp Markers, 35-400bp Range DNA Ladder는 실온에서 20-30분간 해동한다.
- ② 1× 930 ds DNA Inlet Buffer를 96 Deep Well 1ml Plate(buffer 용) 각 well에 1.1ml 씩 분주한 후, 기기의 Buffer 서랍(그림 IV-3-1의 Drawer B)에 plate를 장착한다.
- ③ 1× Capillary Conditioning Solution을 Conditioning 통에 넣는다(그림 IV-3-1).
- ④ 해동한 Intercalating Dye 4μl와 ds DNA 905 Separation Gel 40ml을 가볍게 흔들여 섞은 뒤, 기기의 Gel1통에 넣는다(그림 IV-3-1).

- ⑤ 해동한 1bp and 500bp Markers를 96-well plate 각 well에 30 μ l씩 넣고, 위에 Mineral Oil을 한 방울씩 떨어뜨린다(12번 재 사용 가능, 단 사용 전에 반드시 spin-down한다).
- ⑥ 96-well plate의 H12 위치를 제외한 모든 well에 Dilution Buffer 1 \times TE 23 μ l와 PCR mixture 3 μ l를 넣는다(측정하지 않는 well에는 Dilution Buffer 1 \times TE 23 μ l만 넣는다). H12위치에는 해동한 35-400bp Range DNA Ladder 25 μ l를 넣는다.
- ⑦ 멸균증류수 50ml을 기기의 Gel2통에 넣는다. 기기의 waste서랍에 빈 plate를 넣어준다.



그림 IV-3-1. Fragment analyzer 구성

3.3.2.2. Fragment analyzer 실행

- ① Fragment analyzer를 실행하고 왼편 상단의 메뉴에서 'Utilities' → 'Solution Levels'를 설정한다. Gel1(ds DNA 905 Separation Gel), Gel2(3차D.W), Conditioning Solution, Waste 각 항목에 현재 용량 정보를 입력한다(그림 IV-3-2).

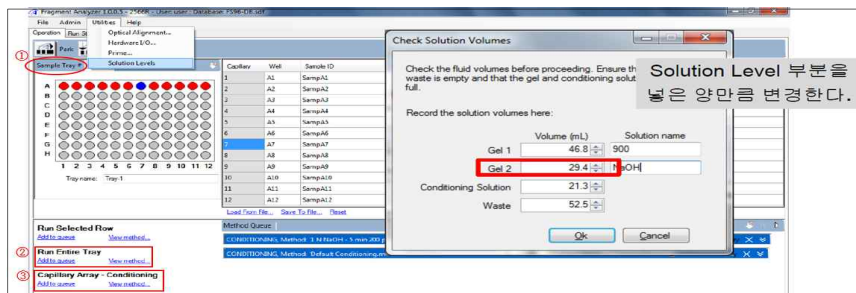


그림 IV-3-2. Solution Level 변경

- ② 화면 왼편상단의 Sample Tray#(그림 IV-3-2-①)에서 PCRMixture Plate를 넣은 트레이를 선택한다.
- ③ 화면 왼편하단의 Run Entire Tray에서 'Add to Queue'(그림 IV-3-2-②)를 클릭한다. Tray name, Folder prefix, Notes를 기록하고 OK를 누른다.
- ④ 화면 왼편하단의 Capillary Array-conditioning에서 'Add to Queue'(그림 IV-3-2-③)를 클릭한 다음 OK를 누른다. 화면 오른쪽의 ▶ 버튼을 눌러 프로그램을 실행 한다(그림 IV-3-3).

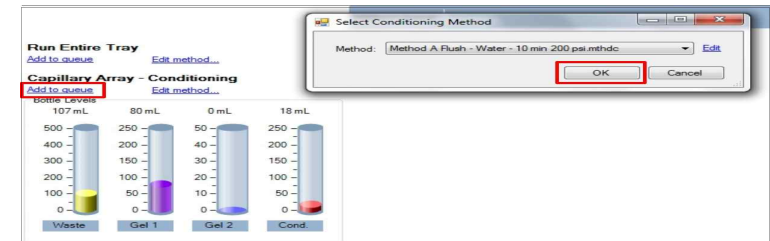


그림 IV-3-3. Conditioning 설정

3.3.2.3. 결과분석

- ① 바탕화면의 Pro size 3.0을 실행한다. 화면 왼쪽의 📁 아이콘을 클릭해서 폴더에서 실행한 데이터를 불러온다.
- ② 데이터를 확인한다. 170bp와 200bp의 밴드를 excel 데이터로 변환하려면 오른쪽의 📄 아이콘을 클릭해서 flag를 설정한다. flag설정은 밴드가 2개이기 때문에 두 개를 설정한다. tag명에 a value 값은 170, Range값은 밴드를 보고 결정하되 3-5정도로 한다. 같은 방법으로 tag b 도 설정한다.
- ③ 화면왼쪽의 📄 아이콘을 클릭해 이미지와 flag의 데이터를 다운받는다. 선택화면에서 Flag Criteria Analysis Table을 체크, gel에 체크, Image Format Electropherogram and gel 에서 JPEG에 체크하고, Export를 클릭한다. 바탕화면의 폴더에서 데이터를 확인한다(그림 IV-3-4).

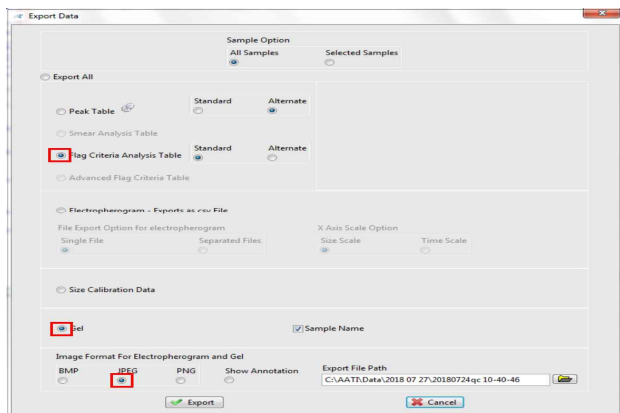
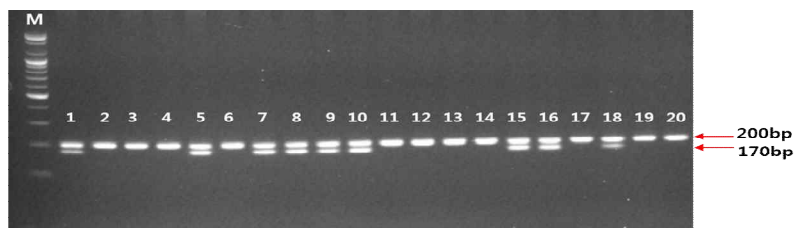


그림 IV-3-4. 결과 다운로드 설정 팝업창

3.4. 결과 판정 및 분석

- ① Agarose gel 전기영동 결과, X 염색체 특이적인 200bp size의 DNA 밴드만 나타난 경우 여성에서 유래된 인체자원으로 판정하며, 200bp 밴드와 함께 Y 염색체 특이적인 170bp size의 DNA 밴드가 같이 확인되면 남성에서 유래된 인체자원으로 판정한다(그림 IV-3-5).



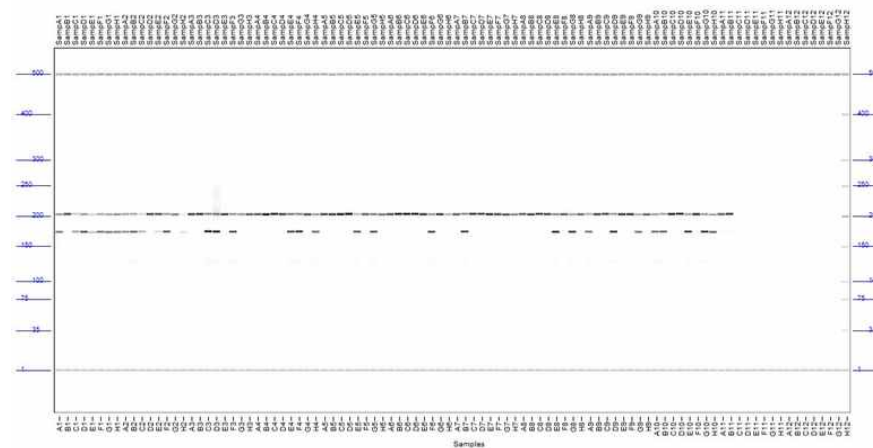
- M : 100bp marker
- Lane 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20 : female sample(200bp)
- Lane 1, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 18 : male sample(170bp, 200bp)

그림 IV-3-5. Agarose gel(2%) 전기영동 성별확인 및 결과 분석

- ② Fragment Analyzer로 결과를 확인한 경우, 그림 IV-3-6와 같이 전기영동 패턴 이미지와 함께 엑셀파일 형태로 결과를 다운받을 수 있다(이 매뉴얼 IV.2.3.2.3-

③ 참고). Agarose gel 전기영동법과 마찬가지로, X 염색체 특이적인 200bp size의 DNA 밴드만 있는 경우는 여성, Y 염색체 특이적인 170bp의 DNA 밴드가 같이 나타나는 경우 남성으로 판정한다.

- ③ 시행일자, plate종류, plate 수, 필요량, 입력순서, 성별확인 결과(성별정보, 전기영동 이미지 파일)를 정보관리시스템에 입력한다. 입력 방법은 「인체자원은행정보관리시스템 사용자매뉴얼」의 19.3 성별확인 검사를 참고하여 입력한다.



	A	B	C	D
1	Well	Sample ID	1 200 +/- 8 bp	2 170 +/- 8 bp
2	A1	SampA1	1	1
3	B1	SampB1	1	0
4	C1	SampC1	1	1
5	D1	SampD1	1	1
6	E1	SampE1	1	1
7	F1	SampF1	1	1
8	G1	SampG1	1	1
9	H1	SampH1	1	1
10	A2	SampA2	1	1
11	B2	SampB2	1	0
12	C2	SampC2	1	1
13	D2	SampD2	1	1
14	E2	SampE2	1	0
15	F2	SampF2	1	1
16	G2	SampG2	1	1
17	H2	SampH2	1	0
18	A3	SampA3	1	1
19	B3	SampB3	1	0
20	C3	SampC3	1	0
21	D3	SampD3	1	0
22	E3	SampE3	1	0
23	F3	SampF3	1	0
24	G3	SampG3	1	0
25	H3	SampH3	1	0
26	A4	SampA4	1	0
27	B4	SampB4	1	1
28	C4	SampC4	1	0
29	D4	SampD4	1	1
30	E4	SampE4	1	1
31	F4	SampF4	1	1
32	G4	SampG4	1	1
33	H4	SampH4	1	0

그림 IV-3-6. Fragment Analyzer 성별확인 및 결과분석

4. STR[Short Tandem Repeat] 분석: DNA genotyping

4.1. 시약 및 기자재

- ① 장비 : 3730 sequencer, GeneMapper ID software, 유전자 증폭기, 원심분리기 (Beckman Coulter, Allegra 25R), Micropipette(2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l)
- ② 시약 : AmpFISTR® Identifiler PCR Amplification kit(ABI 4322288), POP7, Hi-Di, formamide, GeneScan-500(LIZ), 10X buffer/EDTA, Allelic Ladder, 멸균 증류수(18M Ω ultrapure D.W.)
- ③ 소모품 : tip, 1.7ml microcentrifuge tube, 96-well PCR plate

4.2. STR 분석

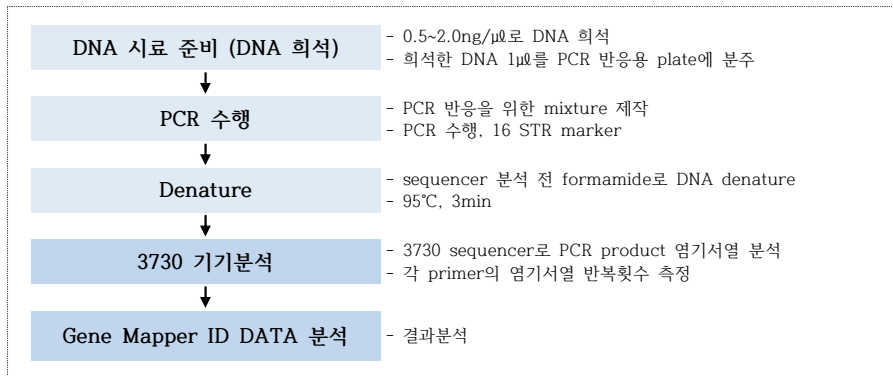


그림 IV-4-1. STR 분석 절차 흐름도

4.2.1. DNA 시료 준비 (DNA 희석)

- ① 이 매뉴얼 III.2.3.을 참조하여 분석 대상 DNA의 농도를 측정한다.
- ② 측정 농도를 기준으로 DNA의 최종농도가 0.5~2.0ng/ μ l가 되도록 멸균 증류수h 희석한다.
- ③ 희석한 DNA 1 μ l를 96-well PCR plate에 분주한다.

4.2.2. PCR 수행

- ① 다음과 같은 조성으로 16개 STR marker PCR을 위한 mixture를 만든다(AmpFISTR® Identifiler PCR amp. kit 설명서 참조).
- ② DNA가 분주된 96-well PCR plate 각 well에 PCR mixture를 6.5 μ l씩 분주한다.

시 약	용 량 (μ l)
PCR reaction mixture	3
Primer Mixture	1.35
Tag	0.15
멸균 증류수	2
Template DNA(0.5~2 ng/ μ l)	1
Total	7.5

- * 시약은 AmpFISTR® Identifiler PCR amp. kit에 포함되어 있다.
 * 분석할 시료가 많은 경우, 분주 시 소모량을 고려하여 mixture 총량을 정한다.
 * kit 안에 들어 있는 control template를 control DNA(1 μ l)로 사용한다.

- ③ 유전자증폭기의 온도를 다음과 같이 설정하고 PCR을 수행한다.

	Initial Step	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
	Hold	28 cycles			Hold	Hold
온도	95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4~25°C
시간	11 min	1 min	1 min	1 min	60 min	∞

4.2.3. PCR product 변성 (Denaturation)

- ① PCR이 완료되면 PCR product 1 μ l를 denaturation 용 96-well palte에 분주한다.
- ② 다음과 같이 Hi-Di formamide/GeneScan-500 Liz size standard mixture를 준비한다.

	권장 사용량	중양은행 사용량 ^①
HiDi formamide	11.6 μ l	11.9 μ l
GeneScan-500 Liz size standard	0.4 μ l	0.1 μ l

- ① GeneScan 500 Liz size standard는 0.4 μ l를 넣는 것이 원칙이나, 중양은행에서는 현재 3730 sequencer의 laser 감도를 고려하여 0.1 μ l를 사용한다.
- ② Gene mapper ID 분석 시 기준이 되는 Allelic Ladder를 1-3 well에 추가한다. (Sample 1 μ l 대신 Allelic Ladder를 첨가하여 분석할 때 marker로 사용한다)
- ③ PCR 산물은 denaturation 반응 전 일정기간 보관이 가능하다.
 - 보관온도(기간) : 2 to 6°C(2주 이내), -15 to -25°C(2주 이상)
 - 보관조건 : PCR 산물이 빛에 노출되지 않도록 주의

- ③ ②에서 준비한 mixture를 12 μ l씩 ①의 96-well plate 각 well에 분주한다. 분주시 팁 끝이 PCR product에 닿지 않도록 주의한다.
- ④ 95℃에서 3분간 PCR product를 denaturation 시킨다.
- ⑤ 4℃에서 1시간 이상 방치하여 plate 겔 표면까지 충분히 식힌 후, 3730 sequencer에서 sample을 running 한다.

4.2.4. PCR product 3730 분석 (이 매뉴얼 V.4.2. 참조)

4.2.4.1. 프로그램 시작 전 확인

- ① Run 3730 DATA collection software를 실행한다.
- ② 시퀀서 기기 왼쪽 하단에 초록색 표시를 확인하고, DATA collection 프로그램과 기기가 연결되었는지 service console이 모두 ON 상태가 되었는지 확인한다.
- ③ Capillary와 polymer가 기기에 장착되어있는지 확인한다.
- ④ Buffer tray에 1× buffer, water tray와 waste tray에 멸균 증류수가 80ml 이상 채워져 있는지 확인한다.

4.2.4.2. Sample running

- ① Sample plate를 'In Staker Tower'에 넣는다.
- ② 'plate manager' → 'OK'를 선택한다. plate record가 열리면 'New'를 선택하여 "New Plate Dialog"를 확인한다. 분석 할 sample의 plate 정보를 다음과 같이 입력(그림 IV-4-2)한 후, 'OK'를 선택하면 "Plate Editor"가 열린다.


	<ol style="list-style-type: none"> 1. ID, NAME → 실험 날짜 및 분석 내용 입력 2. Application → Gene-mapper Generic 3. Run type → 96 well plate 4. Plate Sealing → Septa 5. Owner and Operator 입력 → 미입력 시 실행 안 됨
---	--

그림 IV-4-2. Plate 정보 입력

- ③ Plate editor의 정보를 그림 IV-4-3과 같이 입력한 후 저장한다.

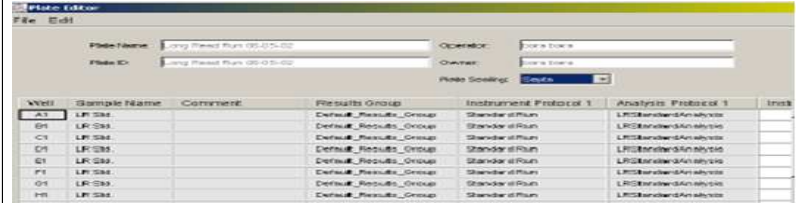
	
Sample Name	→ Sample 명 기입
Result Group	→ Kobb3730_Result_Group으로 설정
Instrument Protocol 1	→ STR_Test 으로 설정

그림 IV-4-3. Plate 정보 입력

- ④ Program display에서 'Run scheduler'를 선택하고, loading 할 plate를 검색 한 후 실행 시키면, '▶(실행버튼)'이 초록색으로 바뀐다. '▶(실행버튼)'을 선택하면 'Run'이 시작된다.

- * Sequencer DATA File위치 : My computer → "E" → AppliedBioSystems → UDC → Data collection → Data → file(기기 작동 시 설정한 Plate name)
- * 해당 파일을 선택하여 기기에서 산출되는 원본 데이터를 휴대용 저장장치에 저장한다.

4.3. GeneMapper program을 이용한 결과 분석

- ① GeneMapper ID 프로그램을 실행 한다.

- * Data collection 또는 GeneMapper가 설치된 컴퓨터에는 프로그램간의 충돌로 인해 OS가 훼손 될 수 있으므로 GeneMapper ID를 설치하지 않는다.

- ② 휴대용 저장 장비에 저장한 DATA file에서 'Add to list' → 'Add'를 선택한 후 아래와 같이 설정한다.

- Control: sample type을 positive control로 변경
- Allelic ladder: sample type을 allelic ladder로 변경
- Panel: identifier V1
- Analysis method: 자동지정(CO)
- Size standard: HID_500LIZ

- ③ Allelic ladder를 기준으로 allele 값을 부여한다. 각 Marker의 위치 및 allele 범위는 다음과 같다.

Marker name	Chromosome location	Allele range	Marker name	Chromosome location	Allele range
D8S1179	8	8-19	D2S1338	2q35-37.1	15-28
D21S11	21q11.2-q21	24-38	D19S433	19q12-13.1	9-17.2
D7S820	7q11.21-22	6-15	vWA	12p12-pter	11-24
CSF1PO	5q33.3-34	6-15	TPOX	2p23-2per	6-13
D3S1358	3p	12-19	D18S51	18q21.3	7-27
TH01	11p15.5	4-13.3	Amelogenin	X: p22.1-22.3, Y: p11.2	X, Y
D13S317	13q22-31	8-15	D5S818	5q21-31	7-16
D16S539	16q24-qter	5-15	FGA	4q28	17-51.2

- ④ 분석 결과가 부적합한 경우, 다음 내용을 참고하여 원인에 따라 재반응을 수행한다.

Fail 원인	재 반응 수행 범위
PCR 반응 error	<ul style="list-style-type: none"> Peak의 양상은 양호하나 일부 maker의 peak이 낮은 경우 DNA 농도 조건을 변경하여 PCR 단계부터 재시행
Peak 검출 실패	<ul style="list-style-type: none"> 대부분의 marker peak의 높이가 500 미만일 경우 PCR 수행 시 error가 있는 경우로 동일 조건으로 DNA 농도측정부터 GeneMapper ID 분석까지 재시행
Off Scale	<ul style="list-style-type: none"> Raw data 확인 결과 기기데이터에 peak은 있지만 GeneMapper ID에서 off scale이 나올 경우 PCR product를 희석하여 시퀀서 재 반응을 시행하거나 DNA 농도 측정부터 재시행 Raw data 확인 결과 기기데이터에 peak 미 검출된 경우 PCR 수행 시, 적정 template 농도 미만이거나 template를 넣지 않았을 경우이므로 DNA 농도 측정부터 재시행 시퀀서 분석 시, 특정 마커의 감도가 민감하여(pink bar 검출), 다른 dye set 검출로 분석이 어려울 경우 PCR product를 희석하여 재 반응을 시행
교차오염	<ul style="list-style-type: none"> 실험상의 handling 문제로 교차오염이 발생하였을 경우 PCR부터 재 진행 2번 이상의 재 반응을 실시하여도, 교차오염일 경우, 희석된 DNA의 오염으로 판단되어 원본 DNA로 재시행

- ⑤ 원본 결과 값을 다시 확인 할 때 찾기 쉽도록, 데이터 파일을 저장할 때 DATA collection 프로그램에 입력했던 실험 날짜 및 분석 내용과 동일하게 입력한다.

4.4. STR 결과 정보관리시스템 등록

4.4.1. 유효성 검사

- ① 정보관리시스템에 로그인하여 ‘뱅킹업무’ → ‘STR’ → ‘신규’를 선택한 후 STR 목적, 자원종류, 실험일을 지정한다.
- ② STR 원본데이터 업로드 후 유효성 검사를 실행하여 오류 사항(이 매뉴얼 IV.4.3.-③ 참조)이 있는지 확인한다.
- ③ 유효하지 않은 allele 값이 있으면 엑셀 다운로드 메뉴를 선택하여 엑셀로 다운로드 한 뒤, 유효한 allele 값으로 수정 후 다시 업로드 하여 저장한다.

4.4.2. 자원식별 확인

- ① 유효성 검사 후 「파일 내 비교」를 선택하여 해당 파일 내 같은 allele 값을 가지는 시료가 있는지 확인 한다(실험상의 중복 오류 확인 및 동일인, 일란성 쌍둥이 여부 확인).
- ② 비교하고자 하는 marker 값의 수를 설정함에 따라 동일한 marker 값을 갖는 시료는 같은 색으로 표시된다.
- ③ 최종 저장 시, DB와 파일 간 비교를 통해 동일한 식별번호지만 다른 marker 값을 가지거나, 다른 식별번호지만 동일한 marker 값을 가지는 해당 식별번호를 알려준다. 해당 식별 번호는 실험결과를 다시 확인하거나 재반응을 실시한다.
- ④ 최종 DB에는 한 개의 식별번호의 marker 값만 저장된다(기반, 추적 이종으로 데이터 저장 불가).

4.5. STR 결과 검색

- 기탁자부여번호와 STR marker값으로 정보관리시스템 내 STR결과 값을 확인할 수 있다.
- 정보관리시스템에서 검색 시 'STR 검사 상세'를 활용 한다.

- ① 정보관리시스템에 로그인 한 후, '스마트검색' → '검색기반관리'를 선택한다.
- ② 기탁자부여번호로 STR 결과를 검색 할 경우 그림 IV-4-2와 같이 검색 식을 설정한다.

그림 IV-4-2. 기탁자부여번호로 STR 결과 검색

- ③ Allele 값으로 STR 결과를 검색할 경우 원하는 allele 값을 그림 IV-4-3과 같이 설정한다.

그림 IV-4-3. Allele 값으로 STR 결과 검색

V. 시험장비 관리

1. 일반사항	119
2. Micropipette	121
3. NanoDrop	124
4. 시퀀서(3730 Sequencer)	126
5. 전자동 모세관 전기영동장치(Fragment Analyzer)	131
6. Bioanalyzer	135
7. 생물안전작업대(Biosafety Cabinet, BSC)	138
8. UV transilluminator	142
9. Cell counter	144

1. 일반사항

1.1. 일반사항

- ① 인체자원 정도관리 결과의 정확도 및 신뢰도 확보를 위해 시험장비를 정상상태로 유지, 관리하는 것이 중요하다.
- ② **(사용자 교육)** 장비 사용자는 장비의 안정적 운영을 위해 장비의 사용방법 및 주의 사항을 충분히 습득한 후 장비를 사용하여야 한다.
- ③ **(사용이력 관리)** 장비관리자는 각각의 시험장비에 별지 제18호서식의 '시험장비 사용일지'를 비치한다. 장비 사용 시, 사용자 이름, 사용일자, 사용시간, 용도 및 특이사항을 기록한다. 단, 사용 이력이 저장되는 장비의 경우 이를 활용하여 장비 사용 이력을 관리할 수 있다.
- ④ **(검·교정)** 정도관리 결과의 정확도 및 신뢰도 확보를 위해 시험 장비별로 정해진 주기에 따라 검·교정을 실시한다. 검·교정은 한국표준과학연구원 또는 KOLAS에서 인정받은 국제공인교정기관에 의뢰하여 실시하는 것을 원칙으로 한다. 단, 국제 공인 교정기관의 점검 대상 장비가 아닌 경우, 이를 수행할 수 있는 기관에서 검·교정을 받는다. 장비관리자는 장비의 검·교정 내용을 별지 제19호서식의 '시험장비 이력카드'에 기록하여 보관한다. 검·교정을 위한 장비 반출 시, 물품 인수증을 반드시 작성한다.
 - 매년 검·교정 주기가 도래하는 장비에 대해 검·교정 계획을 보고한 후 용역으로 진행한다.
 - 오랫동안 사용하지 않아 관리 상태에서 벗어난 장비, 고장에 의하여 수리를 받은 장비, 내부 점검 결과 점검기준을 이탈하고 있는 장비의 경우 교정 주기에 상관 없이 검·교정을 실시 할 수 있다.
- ⑤ **(관리 및 수리)** 이 매뉴얼의 'V. 시험장비 관리'에 따라 유지·관리하며, 장비에 이상이 발생한 경우, 내용연수를 확인하고 장비 수리를 진행한다. 장비관리자는 해당 장비의 수리내용을 별지 제19호서식의 '시험장비 이력카드'에 기록하여 보관한다. 수리를 위한 장비 반출 시, 물품 인수증을 반드시 작성한다.

⑥ **(불용)** 다음의 경우 내부검토를 통해 「공유재산 및 물품 관리법」에 따라 해당 장비를 폐기 처리한다.

- 장비의 파손, 열화, 마모로 사용이 불가능한 경우
- 장비 교정 결과 사용이 불가능한 경우
- 장비의 수리비용이 수리한계비용을 초과할 경우
- 장비내용연수를 초과한 경우
- 기타 장비 불용의 사유가 발생한 경우

⑦ 관련 별지서식

- [별지 제18호서식] 시험장비 사용일지
- [별지 제19호서식] 시험장비 이력카드
- [별지 제20호서식] Cell Counter 내부점검 기록서

2. Micropipette

2.1. 일반사항

- ① 일정한 부피의 액체를 옮기는데 사용하는 pipette의 한 종류인 micropipette은 미량($0.2\mu\text{l} \sim 10\text{ml}$)의 액체를 정확히 측정하여 옮기는데 사용하는 시험기기이다.
- ② 중앙은행은 인체자원 수집, 정도관리, 분양과정에서 주로 1ml 미만의 액체 시료를 다루며, 소량의 인체자원을 정확하게 측정하기 위해 다양한 종류의 micropipette을 사용한다. 측정할 부피에 따라 적합한 micropipette($2.5\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $20\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$, $200\mu\text{l}$, $1000\mu\text{l}$, $5000\mu\text{l}$)을 사용하며, 용도에 따라 1 채널 및 다채널(8, 12채널)로 된 micropipette을 사용할 수 있다.
- ③ 장비관리자는 개인별 보유하고 있는 micropipette의 serial number, 단위, 수량, 제조사 정보를 기록, 관리한다.
- ④ **(외부교정)** 5년을 주기로 공인교정기관이나 전문업체를 통하여 기기의 정확도 및 정밀도를 교정한다.

2.2. 사용 시 주의사항

- ① **(허용범위 확인)** 정확한 부피 측정을 위해 micropipette 허용범위(표 V-2-2의 range 참조)를 확인하고, 적절한 용량의 micropipette을 사용한다.
- ② **(공기 유입 방지)** Micropipette으로 시료를 빨아올릴 때 중간에 공기가 들어가면 부피 측정이 부정확할 수 있으므로 다음 사항을 주의한다.
 - Micropipette의 tip 장착부분이 손상될 경우, 손상된 부분으로 공기가 유입될 수 있으므로 Tip 장착 시 큰 충격을 주거나, 떨어뜨려 기기가 손상되지 않도록 주의한다.
 - Tip 장착 시 중간에 공기가 들어가지 않도록 주의하여 tip과 micropipette을 일직선으로 완전히 장착한다.
- ③ **(기기 오염 방지)** 시료에 의한 기기내부 오염 및 부품 손상을 방지하기 위해 다음 사항을 주의한다.

- Tip에 시료를 빨아올릴 때, push button을 천천히 눌러 micropipette 내부로 시료가 유입되지 않도록 주의한다.
- Tip에 시료가 담겨져 있는 상태로 micropipette을 놓거나 뒤집어 시료가 micropipette 내부로 유입되지 않도록 주의한다.
- Micropipette 내부 장치에 손상을 줄 수 있는 염산 등의 용액은 사용하지 않는다.

④ **(Push button 작동)** 시료 흡인 시, 다음 사항을 주의한다.

- 시료 흡인 전 Push button을 끝까지 눌렀다 떼 경우 부피 측정이 부정확하므로 가볍게 첫 번째 정지지점까지만 push button을 작동한다.
- 기포가 들어가지 않도록 Tip 끝을 시료에 충분히 잠기게 한 후, push button을 작동한다. Push button을 천천히 놓으며, 시료가 tip 안으로 완전히 들어가도록 충분한 시간을 두고 기다린다. 특히 점성이 높아 시료의 주입속도가 느린 고농도의 DNA나 시약의 경우, 충분한 시간을 갖고 서서히 push button을 작동하여야 정확하게 부피를 측정할 수 있다.

2.3. 점검방법

- ① 장비의 성능 및 정확도 확인을 위해 정기적으로 micropipette의 상태를 점검하고, 필요한 경우 이 매뉴얼에 따라 누수 여부 및 부피 정확도를 점검한다.
- ② 점검사항, 문제 원인 및 조치사항은 표 V-2-1을 참고한다.

2.3.1. 누수 테스트 방법

- ① Tip-holder에 각각의 micropipette에 적합한 tip을 끼운다.
- ② Micropipette의 최대 부피로 설정한다.
- ③ 멸균 증류수를 흡인하고, 20초 동안 micropipette을 수직으로 세워 유지한다.
- ④ Tip의 끝 부분에 멸균 증류수가 맺히는지 육안으로 확인한다.
- ⑤ Tip의 끝 부분에 물방울이 맺히지 않으면, 멸균 증류수가 흡인된 높이(위치)를 tip에 눈금 표시하고, tip을 증류수에 약간 잠길 정도로 담근다.
- ⑥ Tip에 흡인된 멸균 증류수의 부피가 줄었는지 확인한다.

2.3.2. 부피 정확도 테스트 방법

- ① 표 V-2-2를 참고하여 각각의 micropipette에 맞는 testing volume으로 부피를 설정한다.
- ② 저울을 이용하여, 멸균 증류수의 무게를 4번 이상 측정한다.
- ③ 평균 질량을 계산한다.
- ④ 밀도를 이용하여 평균 부피로 환산한다.
(평균부피 = 평균질량 × 밀도, 물의 밀도=0.998 g/ml at 20℃)
- ⑤ 표 V-2-2를 참고하여, 계산한 평균 부피가 오차 범위 안에 드는지 확인한다.

표 V-2-1. Micropipette의 점검 사항 및 문제 원인

증상	원인	해결 방법
시료 누출	• Tip-holder 손상	• Tip-holder 교체
	• O-ring, seal 파손	• O-ring, seal 교체
시료 흡입 이상	• Tip-holder 손상	• Tip-holder 교체
	• O-ring 손상	• O-ring, seal 교체
	• Piston 부식	• Piston 교체 ※ 점검 기관에 의뢰
부정확한 pipetting	• Connecting nut의 풀림	• Connecting nut 조임
Tip 고정 이상	• Tip-holder 손상	• Tip-holder 교체
	• Tip-ejector 손상	• Tip-ejector 교체

표 V-2-2. Micropipette 오차 허용 범위표

Range (μl)	Testing volume (μl)			최대 오차 허용 범위(ISO 8655)	
	1회	2회	3회	Systematic error(μl)	Random error(μl)
0.2~2	0.2	1	2	±0.08	≤0.04
1~10	1	5	10	±0.12	≤0.08
2~20	2	10	20	±0.20	≤0.10
10~100	10	50	100	±0.80	≤0.30
20~200	20	100	200	±1.60	≤0.60
100~1000	100	500	1000	±8	≤3.0
0.5~5000	1000	2000	5000	±40	≤15

3. NanoDrop

3.1. 일반사항

- ① NanoDrop은 소량(1~2μl)의 DNA 또는 RNA를 사용하여 시료의 양과 순도를 측정하는 시험기기이다. 시료의 낭비를 줄이고, 측정이 간편한 장점이 있지만 극소량의 시료를 사용하기 때문에 장비의 정확도 및 정밀도를 일정하게 유지시켜주는 것이 매우 중요하다.
- ② 중앙은행은 DNA, RNA의 정량 및 정성분석에 ND-2000, ND-8000(Thermo Scientific Inc.)을 사용한다(그림 V-3-1). ND-2000은 한번에 1건, ND-8000은 8건을 동시에 정량할 수 있으므로, 측정할 시료의 수량에 맞게 장비를 선택하여 사용한다.
- ③ ND-8000을 사용할 경우 먼저 샘플 측정대에 올린 시료가 증발될 수 있으므로, 시료 간 loading 시간의 차이가 크게 나지 않도록 주의하여 작업한다.
- ④ (외부교정) 1년을 주기로 공인교정기관이나 전문업체를 통하여 검·교정을 실시한다.

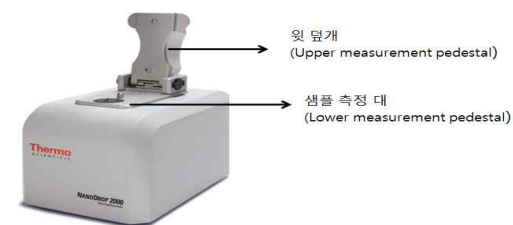


그림 V-3-1. NanoDrop의 구조(ND2000, Thermo Scientific Inc.)

3.2. 사용 시 주의사항

- ① 샘플 측정대가 손상되지 않도록 주의한다. 샘플 측정 시 샘플 측정대가 손상되지 않도록 주의하여 윗덮개를 내리고, 측정 완료 시 윗덮개와 샘플 측정 대 사이에 스펀지를 넣어 마찰에 의한 충격이 없도록 한다.
- ② 샘플 측정 후 샘플 측정 대를 멸균증류수로 세척하고 kimwipes로 닦아 오염이 없도록 한다.


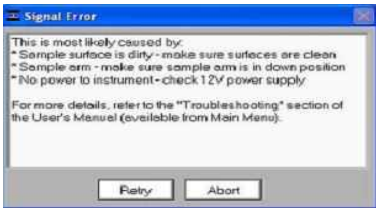


3.3. 점검

- ① 장비관리자 및 사용자는 표 V-3-1 사항에 대해 주기적으로 장비를 점검하고, 이상이 있을 경우 제조업체에서 점검을 받는다(표 V-3-2 참조).

표 V-3-1. NanoDrop 연간 점검 사항

번호	점검 사항	번호	점검 사항
1	1~2µl sample volume	6	0.002 absorbance precision
2	220~750 nm operating range	7	0.005 absorbance accuracy
3	1 nm wavelength accuracy	8	10 second measurement cycle
4	2 nm wavelength resolution	9	recalibration with CF-1 reagent
5	0.02~0.50 absorbance	10	light source(lamp) intensity

표 V-3-2. NanoDrop 사용 시 발생하는 문제점·원인·해결 방법

에러 메시지	문제점	원인	조치 방법
	Software와 기기간의 연결 불량	<ul style="list-style-type: none"> • USB cable 연결 불량 • 정전기 발생 • USB port 이상 	<ul style="list-style-type: none"> • USB cable 재연결 • 접지대 사용 • 다른 컴퓨터로 교체
	검출기에 불충분한 신호 전달	<ul style="list-style-type: none"> • Sample surface 오염 • 불완전하게 닫힌 sample arm • 전원 공급 이상 	<ul style="list-style-type: none"> • Sample surface cleaning • Sample arm 이상 점검 • 전원 공급 점검
	초기화 과정에서 검출기에 과도한 신호 전달	<ul style="list-style-type: none"> • Pedestal 오염 	<ul style="list-style-type: none"> • 멸균 증류수로 pedestal cleaning • Software를 on / off 시킴
	기기가 계산하는 short path의 흡광도가 long path의 흡광도의 20% 이하인 경우	<ul style="list-style-type: none"> • 시료가 pedestal위에 둥글게(bead up) 분주 되지 못하고 전체 표면에 퍼짐 • 시료에 공기 방울 존재 • 시료 양이 너무 적을 때 	<ul style="list-style-type: none"> • 시료에 계면활성제 등의 시약이 첨가되는지 확인 • 시료 양을 늘려 재측정

4. DNA Analyzer(3730 Sequencer)

4.1. 일반사항

- ① 시퀀서는 DNA 염기서열분석, 유전자 변이 검출 및 DNA fragment 분석 등에 사용하는 시험기기이다.
- ② 중앙은행은 식별번호 라벨 오류, 자원 간 교차오염 등의 특정 인체자원 식별분석을 위해 DNA 프로파일 분석을 활용한다. DNA 프로파일 분석법 중 하나인 STR(Short Tandem Repeat) 패턴 확인 시 시퀀서를 사용하며, 중앙은행은 48 capillary가 장착된 3730 DNA analyzer(Thermo Scientific Inc.)를 사용하여 STR 분석을 실시한다(그림 V-4-1).
- ③ 데이터의 안정성을 위해 capillary 등 기기 부품의 적절한 유지관리가 중요하다. 사용기간에는 1주일에 한번 씩 기기 wash wizard를 반드시 실행시켜주어야 하며, capillary가 마르지 않도록 주기적으로 buffer를 관리해야 한다. 이를 위해 buffer와 water는 수시로 교체한다.
- ④ Power button의 상태가 노란색이나 빨간색일 경우 기기와 프로그램의 연결이 완료되지 않았거나 오류가 발생한 경우이므로 초록색인지 확인하며 장비를 작동한다.
- ⑤ (외부교정) 1년을 주기로 공인교정기관이나 전문업체를 통하여 검·교정을 실시한다.

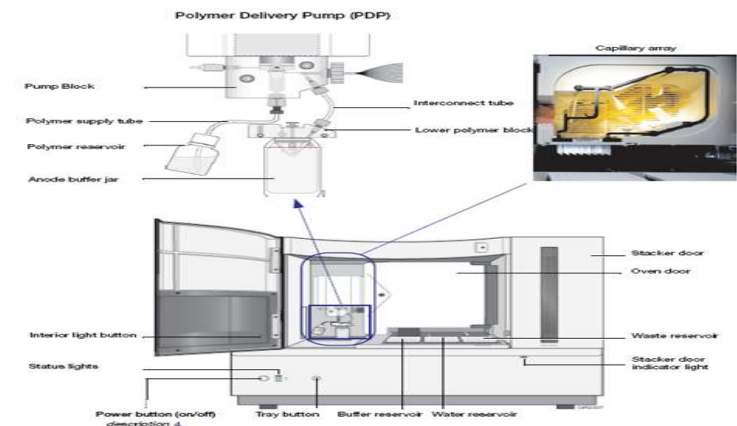


그림 V-4-1. 시퀀서 구조 및 각 부분의 명칭

4.2. 관리 및 사용 시 주의사항

4.2.1. 3730 시퀀서의 프로그램 시작

- ① 시퀀서 내에 buffer tray가 장착되어 있는지 확인 한 후, Run 3730 DATA collection software를 실행한다.
- ② 시퀀서기기 왼쪽 하단에 초록색 표시를 확인하고, DATA collection 프로그램이 켜져 있는지 확인한다(그림 V-4-2). 시퀀서가 계속 주황색인 경우, GA3730 IP주소 (192.168.0.1.) 또는 랜선 위치 변경 여부를 확인한다.
- ③ Service console이 모두 ON 상태가 되면 DATA Collection 프로그램이 열린다(그림 V-4-3).



그림 V-4-2. 기기와 program의 올바른 ON 상태

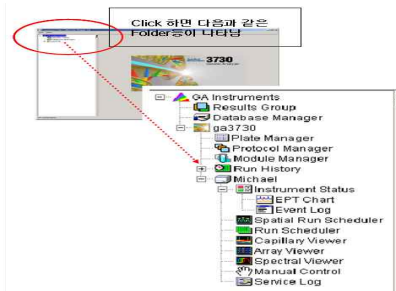


그림 V-4-3. Program Display

4.2.2. Preparing Instrument

- ① 기기 작동 전에 water wash를 실시하며, 최소 3번 이상 Water wash wizard를 실행한다. Water wash 방법은 program의 안내에 따라 진행한다.
- ② **(Plate 장착)** 그림 V-4-4와 같이 Buffer* plate, water** plate, waste plate 순으로 장착한다. Buffer plate를 장착한 뒤에는 heating 선을 연결하며, 연결 후 plate가 이동할 때 선에 걸리지 않도록 위치를 확인한다.

* Buffer: 10X 3730 buffer를 1X로 희석하여 80mL 사용

** Water: 3차 멸균 증류수 80mL 사용

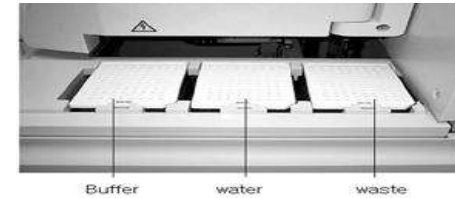


그림 V-4-4. Buffer plate 장착

- ③ **(Capillary 장착)** 기기 사용 시, capillary는 항상 장착되어 있어야 하며, 10,000회 이상 'Run'을 시행하였거나, 데이터 질이 저하 된 경우 교체한다.

* Install capillary wizard를 시행하여 교체하며, capillary의 끝 부분이 마르지 않게 항상 buffer에 담가둔다(수시로 확인). 장시간 기기를 사용하지 않을 경우, capillary를 기기에서 분리 하여(Uninstall Capillary Wizard) capillary 끝을 buffer에 담가 보관하도록 한다.

- ④ **(Polymer)** 냉장고에서 바로 꺼낸 Polymer는 온도차로 인해, 버블이 생길 수 있다. 사용 전 미리 실온에 보관하며, 버블 유무를 확인 후 기기에 장착한다.

4.2.3. Spatial Calibration 설정 방법

- ① 다음의 경우 Spatial calibration을 설정한다.
 - Capillary를 교환하거나 Data collection software를 uninstall 하였을 경우
 - Detection cell 부위가 움직이거나, 기기를 들거나 옮긴 경우
 - 기기를 오래 동안 사용하지 않았거나, 기기 사용 계획이 당분간 없을 경우
- ② 그림 V-4-3의 program display에서, 'GA instrument' → 'ga3730' → 'instrument status' → 'Spatial Run Scheduler' → 'Spatial protocol'을 선택한다.
 - capillary가 fresh한 polymer로 채워져 있지 않은 경우는 'spatial fill'(6분 소요)을 선택
 - 장시간 사용계획이 없어 polymer를 비워야 할 경우는 'spatial No fill'(2분 소요)을 선택
- ③ Quality에 따라 accept 또는 reject를 선택한다. pixel 간격이 '9-12'일 경우 accept로 pixel 수치가 미달 일 경우 capillary를 교환한다.

4.2.4. G5 DYE SET 설정

- ① 다음의 경우 Fragment 분석을 위한 DYE SET을 새로 설정한다. STR 프로파일 분석 시에는 G5로 DYE SET을 설정한다.
 - CCD 카메라를 교체한 경우
 - 데이터에서 peak 모양이 일정치 않은 경우
 - Capillary를 교환한 경우
- ② **(48 Capillary 기준)** G5 DYE 3.5 μ l, Hi-Di Formamide 496.5 μ l을 넣어 mixture를 만든 후, 96 plate 1, 3, 5, 7, 9, 11 well에 10 μ l 씩 분주한다.
- ③ 95℃에서 5분 동안 denaturation 한 후, 얼음 위에서 바로 식혀준다.
- ④ 96 well plate를 원심 분리 한 후, 시퀀서 안쪽 notched corner에 맞추어 sample을 'In Staker Tower'에 넣는다(그림 V-4-5).



그림 V-4-5. 시퀀서 staker

- ⑤ 'plate manager' → 'OK'를 선택한다. plate record가 열리면 'New'를 선택하여 "New Plate Dialog"를 확인한다. 분석 할 sample의 plate 정보를 그림 V-4-6와 같이 입력한 후, 'OK'를 선택하면 "Plate Editor"가 열린다.

	<ol style="list-style-type: none"> 1. ID, NAME → 실험 날짜 입력 2. Application → Spectral Calibration 3. Run type → 96 well plate 4. Plate Sealing → Septa 5. Owner and Operator 입력 → 미입력 시 실행 안 됨
--	---

그림 V-4-6. plate 정보 입력

- ⑥ Plate editor의 정보를 입력(그림 V-4-7) 후 저장한다.
- ⑦ Program display에서 「Run scheduler」를 선택한다(그림 V-4-3). loading 할 plate를 검색 한 후 실행 시키면, '▶ (실행버튼)'이 초록색으로 바뀐다. '▶ (실행버튼)'을 선택하면 'Run'이 시작된다.

Sample Name	→ Sample 명 기입
Result Group	→ Kobb3730_Result_Group으로 설정
Instrument Protocol 1	→ STR_Test 으로 설정

그림 V-4-7. Plate Editor 정보 입력

5. 전자동 모세관 전기영동장비(Fragment Analyzer)

5.1. 일반사항

- ① 수용액 속 DNA는 음전하를 갖게 되는데 전기영동 상에서 전류가 흐르면 DNA 분자는 양극으로 이동한다. 전자동 모세관 전기영동장치는 8×12개의 Capillary (모세관)에 전기를 흘려보내 gel 상에서 DNA를 분자를 크기에 따라 분리함으로써 genomic DNA의 분해 유무, PCR의 결과를 통한 미생물 오염의 유무, 성별 확인 등을 할 수 있다.
- ② 중앙은행에서는 genomic DNA의 분해 유무, 미생물 오염 및 성별확인 등의 정도 관리에 전자동 모세관 전기영동장치를 사용한다. 정도관리 결과는 PROSize 2.0 프로그램을 통해 확인할 수 있고 결과를 사진, excel의 형태로 저장한다.
- ③ 장비관리자는 Storage buffer와 기기 사용일지를 주기적으로 관리하도록 한다.
- ④ (외부교정) 1년을 주기로 공인교정기관이나 전문업체를 통하여 검·교정을 실시한다.
- ⑤ 전자동 모세관 전기영동장치의 일반적인 구조는 그림 V-5-1과 같다.

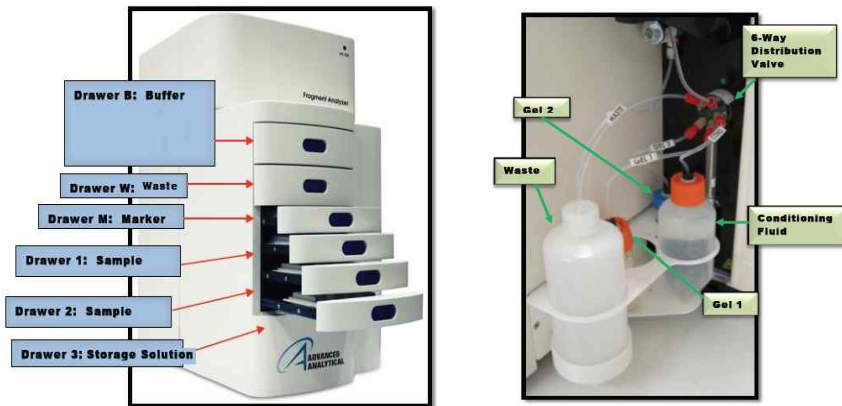


그림 V-5-1. 전자동 모세관 전기영동장치의 일반적인 구조

5.2. 사용 시 주의사항

- ① 기기의 모세관(Capillary)은 Storage buffer에 담겨 항상 같은 환경을 유지해야 한다. 장비관리자는 최대 2주 간격으로 Storage buffer의 용량과 색을 확인하고, Storage buffer는 한 달 주기로 교체 하도록 한다.
- ② 확인하고자 하는 결과의 종류에 따라 사용하는 kit가 다르므로 용도에 맞는 kit*를 사용한다. 또한 사용 전에 kit에 맞는 프로그램을 설정 하고 장비를 사용한다.

* Analysis Kits

- Genomic DNA 50Kb Analysis Kit, DNF-467: 75bp~50,000bp
- dsDNA Regent Kit, DNF-930: 75bp~20,000bp
- dsDNA Regent Kit, DNF-915: 35bp~5,000bp
- dsDNA Regent Kit, DNF-905: 1bp~500bp

- ③ 96 well buffer tray와 시약(gel, conditioning solution, 3차증류수) bottle은 2개월에 한번 새 것으로 교체하도록 하고, 96 well plate에 분주 한 용액은 반드시 원심분리기로 spin-down해서 기포를 제거한 후 기기에 넣는다.
- ④ 기기작동이 멈추므로 기기가 구동 중일 때는 절대로 buffer tray와 waste tray를 열지 않는다.

5.3. 관리

5.3.1 Storage solution 교체

Storage solution PLT는 샘플 측정 동안에는 「Drawer 3」로 이동하며, 측정이 종료되면 capillary 보호를 위해 자동으로 이동한다. storage solution은 1~2개월 주기로 교체한다.

- ① 바탕화면의 'Fragment analyzer software'를 실행하여 로그인한다.

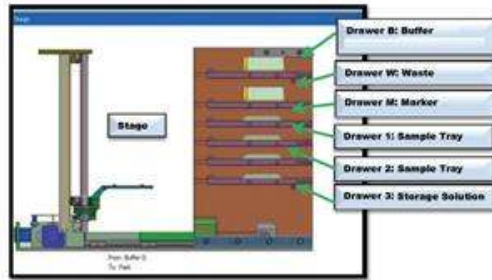


그림 V-5-2. Fragment analyzer 작업화면

- ② 멸균된 3차 증류수 50ml를 gel2위치에 넣고, Drawer B와 W에 모두 96well buffer tray를 넣어준다. 메뉴의 'Solution Level' 용량을 50ml로 변경한다.
- ③ 화면의 좌측 하단 'Capillary Array'에서 'Add to queue'를 누른 뒤 'A Flush' Method를 선택하고 ok버튼을 누른다.
- ③ storage solution 180μl를 새로운 plate에 분주하고 분주 한 날짜를 plate에 적는다.
- ④ 'Drawer 3'로 이동 된 plate를 새 storage solution이 담긴 plate로 교체한다. 교체된 plate가 capillary* 위치로 이동 된다.

5.3.2 Capillary washing

Capillary는 샘플 측정 할 때를 제외하고 항상 storage solution에 담가 놓는다. 실험 전·후 capillary washing을 통해 capillary 상태를 최상으로 유지한다.

- ① 메인화면에서 좌측 하단의 'Capillary Array-Conditioning-Conditioning Method Select'를 선택한다.
- ② Conditioning method 화면의 'Drop-down' 메뉴에서 'Default Capillary Conditioning Method'를 선택(그림 V-5-3)한다.

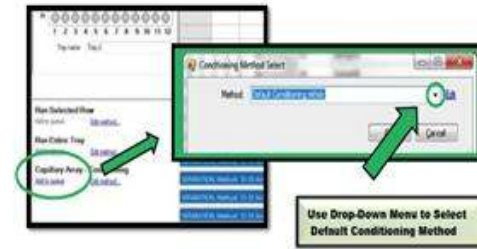


그림 V-5-3. Conditioning Method 화면

- ③ Default capillary conditioning method(그림 V-5-4)는 Gel 1(conditioning solution)을 사용하며, 7분으로 시간을 설정하여 사용한다. 사용 전 Gel1의 양을 최소 150ml를 채워 놓는다.

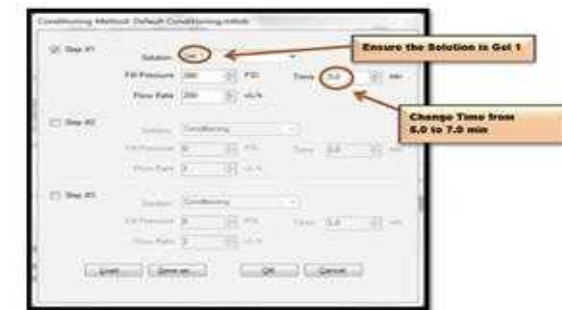



그림 V-5-4. Default Capillary Conditioning Method

- ④ 'OK'를 선택 한 후, 이 매뉴얼 III.2.5.3.의 ⑦과 동일한 과정으로 실행하면 capillary washing이 진행된다.

6. Bioanalyzer

6.1. 일반사항

- ① Bioanalyzer는 모세관 전기영동장치로 DNA, RNA, 단백질의 크기와 농도를 자동으로 분석 할 수 있다.
- ② 중앙은행은 세포자원과 RNA 자원의 안정성 검사 항목을 확인할 때 사용한다.
- ③ 장비관리자는 반기별 1회 자가 점검을 진행하고, 점검 결과를 보관한다.
- ④ **(외부교정)** 1년을 주기로 공인교정기관이나 전문업체를 통하여 검·교정을 실시한다.
- ⑤ Bioanalyzer 장비 규격은 아래와 같다.

	장비명(제조사)	모델명	규격
	모세관 전기영동장치 (Agilent)	Agilent 2100 Bioanalyzer	<ul style="list-style-type: none"> · 크기 : 162-412-290 (W-D-H) · 전압 : 100-240 VAC \pm10% · 주파수 : 50 - 60 \pm5% · 소비전력 : 30W/60VA · 작동온도 : 5-40°C · 습도 : <80%, at 5-31°C

6.2. 사용 시 주의사항

- ① 진동이 없는 평면에 장비를 배치한다.
- ② 장비 주변을 깨끗이 유지한다.
- ③ 가연성 가스 또는 연기가 있는 곳에서 작동하지 않는다.
- ④ 샘플을 처리하는 동안 보호장비(장갑, 실험복)를 착용한다.
- ⑤ 장비를 사용한 후 전원을 끈다.

6.3. 점검

Agilent 2100 Bioanalyzer Test chip kit*을 사용하여 년1회 자가 점검을 실시한다. 표 V-6-1의 점검 항목 중 1개 이상 'executed, failed' 일 경우 제조사에 연락해 기기 점검을 받는다.

* Agilent 2100 Bioanalyzer Test Chip Kit

(Autofocus Test Chip) Electrophoresis autofocus, laser stability 항목 점검

(Electrode/Diode Test Chip) Electrode/Diode, Optics 항목 점검

- ① Agilent 2100 Bioanalyzer의 전원을 켜 후, 「Diagnostics」 선택한다.
- ② 'Available tests' → 'Select All' → 'Start'를 선택한다.
- ③ 표 V-6-1의 점검 항목 중 [Electronics Test], [Fan Test]가 진행된다.
- ④ 'Please insert a cartridge! Close the lid and press OK!' 메모가 보이면 빈 카트리지를 넣고 'OK'를 선택한다.
- ⑤ 'Please open the Lid' 메모가 보이면 Bioanalyzer 뚜껑을 열어주고, [Lid Sensor Test]를 진행 한다.
- ⑥ 'Please insert Cartridge and an empty chip! Close the lid and press OK' 메모가 보이면 빈 카트리지를 넣고 'OK'를 선택한다.
- ⑦ 표 V-6-1의 점검 항목 중 [Stepper Moter Test], [Temperature Test], [HV Stability and Accuracy Test], [HV Accuracy Test], [Short Circuit Test]가 진행된다.
- ⑧ Electrode/Diode Test Chip을 장착 한 후, [Electrode/Diode Test], [Optic Test] 점검을 진행한다.
- ⑨ Autofocus Test Chip을 장착한 후, [Electrophoresis Autofocus Test], [Laser Stability Test]점검을 진행한다.
- ⑩ 최종 점검결과 1개 이상의 항목에서 'Executed, failed'이 나올 경우 다시 한 번 자가 점검을 실시하고, 동일한 결과가 나오면 제조사에 연락해 기기점검을 받는다.

표 V-6-1 자가 점검 항목

No.	점검 항목	No.	점검 항목
1	Electronics Test	7	HV Accuracy Test
2	Fan Test	8	Short Circuit Test
3	Lid Sensor Test	9	Electrode/Diode Test
4	Stepper Moter Test	10	Optic Test
5	Temperature Test	11	Electrophoresis Autofocus Test
6	HV Stability and Accuracy Test	12	Laser Stability Test

7. 생물안전작업대(Biosafety Cabinet, BSC)

7.1. 일반사항

- ① 생물안전작업대는 병원체 및 감염성물질을 다루는 실험실에서 취급물질, 실험종사자 및 연구 환경의 보호를 위한 1차적 밀폐장치이다.
- ② 중앙은행에서는 인체자원 오염 방지 및 자원관리자의 안전을 위해 세포자원의 배양, 인체자원의 정도관리 및 분양 업무를 생물안전작업대에서 수행한다.
- ③ 중앙은행에서는 자원관리자의 보호뿐만 아니라 작업하는 인체자원의 보호에 적합한 Class II 생물안전작업대를 사용하며, 특징은 다음과 같다(그림 V-7-1).
 - 유입공기와 배기가 모두 HEPA 필터로 처리
 - HEPA 필터로 처리된 유입공기가 위에서 아래로 내려오면서 laminar flow를 유지

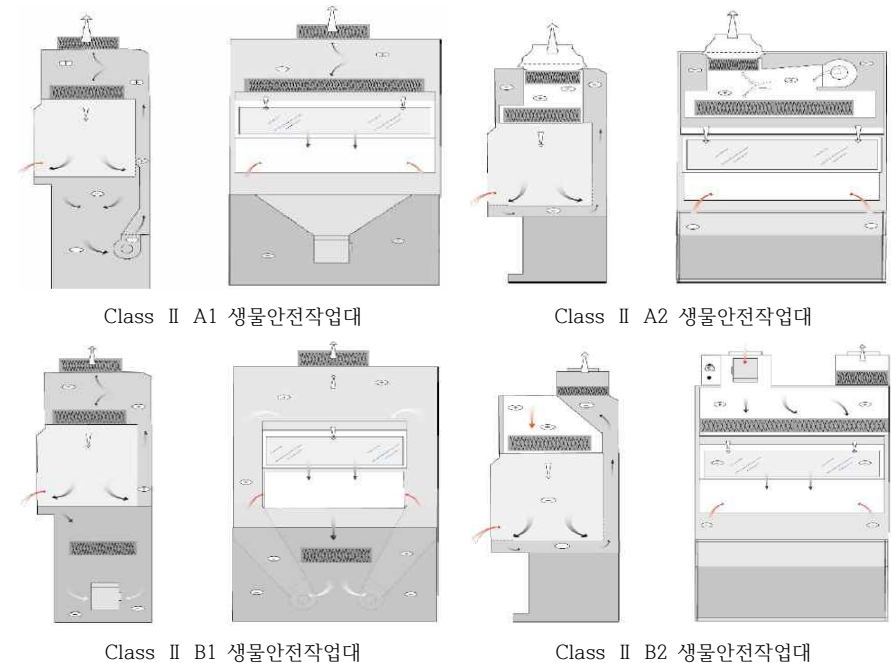


그림 V-7-1. 생물안전작업대 class II type

7.2. 사용 시 주의사항

7.2.1. 생물안전작업대 내 실험 재료 및 장비 배치

- ① 생물안전작업대 내에 실험기기 및 재료의 수와 양을 최소화 하고, 여분의 물품(라텍스장갑, flask 등)은 보관하지 않는다.
- ② 실험 재료 및 장비는 생물안전작업대 앞면부 그릴에서 적절한 거리를 두어 비치하고, 에어로졸을 발생시키는 장비(vortex mixer, tabletop centrifuge)는 안쪽에 둔다.
- ③ 생물안전작업대 내 실험재료는 교차오염을 최소화하기 위해 작업의 흐름이 청정구역에서 시작하여 오염구역으로 수행될 수 있도록 배치*한다(그림 V-7-2).

* 생물안전작업대 왼편을 청정구역으로 멸균 배치 및 물품을 두고, 가운데 부분은 실험구역으로 하며, 사용한 물품을 폐기할 의료폐기물상자는 생물안전작업대 내부 오른편에 배치한다.



그림 V-7-2. 생물안전작업대 내 실험 수행 방향

7.2.2. 생물안전작업대 사용 시 주의사항

- ① 실험자가 생물안전작업대 안으로 팔을 넣었을 때, 에어장벽을 안정화시키기 위해 약 1분 후 실험을 시작한다.
- ② 생물안전작업대 내에서는 알코올램프의 사용을 금하고, 화기가 필요할 경우에는 마이크로 버너(micro burner)사용을 권장한다.
- ③ 생물안전작업대 안의 에어흐름으로 인한 교차오염을 줄이기 위하여 에어로졸 발생 가능성이 있는 작업 시 멸균한 물품과 최소 30cm의 거리를 두어야 한다.

- ④ 실험재료와 생물안전작업대 내 아래로 순환하는 공기와의 직접적인 접촉을 최소화 하기 위하여 개방된 tube 및 bottle은 수직으로 세워두지 않아야 하며, culture dish 사용 시 노출을 최소화 하도록 뚜껑을 살짝 열어 실험하고 가능한 빨리 닫는다.
- ⑤ 실험종료 후, 생물안전작업대 내에서 사용했던 모든 재료 및 장비는 밖으로 꺼낸다. 또한 의료폐기물상자는 밀봉 후, 밖으로 꺼내어 폐기한다.
- ⑥ 생물안전작업대의 작업창과 내부표면은 사용 전 후 로 적합한 소독제를 사용하여 소독한다. Blower moter는 10분 이상 작동 후, sash를 내려 작동을 멈춘다.
- ⑦ 생물안전작업대 내의 형광등을 끈 후, UV 램프를 30분 이상 작동시킨다.

7.3. 관리

- ① 생물안전작업대의 UV 램프(그림 V-7-3)를 선택하여, 사용 전 UV를 30분 동안 켜 놓는다(30분 후 자동으로 꺼짐).

* UV 램프는 살균력이 강한 253.7nm의 자외선을 발생하는 램프이다. 자외선은 세균, 바이러스, 곰팡이 살균에 효과적이다. 램프 표면이 먼지 등에 의해 살균력이 떨어질 수 있으므로 정기적으로 점검 및 청소를 한다. 또한 수명이 남아 있더라도 1년마다 교체하여 특정 파장대의 자외선이 일정하게 나오도록 유지한다.



- ① Blower moter
- ② 형광등
- ③ UV램프

그림 V-7-3. 생물안전작업대 조작버튼

- ② Sash를 생물안전작업대 양 옆에 표시된 지점까지 올린 후 blower moter(그림 V-7-2)를 선택하여 5분 이상 에어커튼을 작동시켜 생물안전작업대 내부 공기를 정화시킨다.
- ③ 형광등을 켜 후, 개인 보호구를 착용한 상태에서 생물안전작업대 내부 표면을 70% 에탄올로 소독*한다.

* 70% 에탄올 이외 1:100 희석한 가정용 락스 또는 0.05% sodium hypochlorite가 있으며, 수행 할 실험에 맞는 적절한 소독제를 사용한다. 단, 락스를 사용할 경우 잔류염소로 인해 생물안전작업대 표면이 부식될 우려가 있으므로 멸균 증류수로 다시 닦아주어야 한다. 3달에 한 번씩 소독해 주는 것이 좋다.

- ④ 년1회 생물안전작업대 내의 필터상태와 에어커튼의 풍속 및 균일성, 공기누출 등을 확인하기 위하여 제조사로부터 성능점검을 받는다.

8. UV transilluminator

8.1. 일반사항

- ① DNA를 전기영동한 겔을 이미징하여 DNA를 확인하고 분석하는 장비이다.
- ② EtBr이나 혹은 EtBr을 대체하여 개발된 형광시약(파장 450nm~490nm)에 UV가 투과되어 gel 이미지가 영상화 된다.

8.2. 사용 시 주의사항

- ① 형광시약을 사용하기 때문에 장비, 주변 물품 등을 반드시 장갑을 착용하고 사용한다.
- ② UV에 직접 노출되지 않도록 사용법을 정확히 숙지한다.
- ③ 사용 완료 된 겔은 반드시 폐기물 박스에 버린다.

8.3. 관리

- ① 사용 전, 후 트레이 부분을 알코올로 깨끗이 소독한다.



그림 V-8-1. 트레이 화면

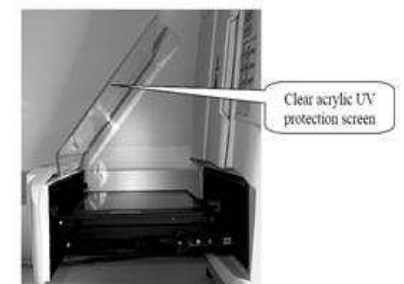


그림 V-8-2. 트레이 커버 장착화면

- ② 트레이에 UV 보호 플라스틱 커버를 덮은 후, 5개의 UV 등이 다 켜지는지 주기적으로 확인하고 UV등이 켜지지 않을 경우, UV 등 전체를 구입 후 교체를 제조사에 요청한다.



UV transilluminator without cover
그림 V-8-3. UV 등 설치된 화면




그림 V-8-4. starter 교체 화면

- ③ 그림 V-8-4와 같이 트레이와 UV등을 연결하는 starter의 이상으로 UV등이 들어오지 않을 경우도 발생한다. UV등을 교체 할 때 Starter의 이상 유무를 확인하고, 이상이 있을 경우 구입 후 제조사에 교체를 요청한다.

9. Cell Counter

9.1. 일반사항

- ① Cell counter는 Hemocytometer를 사용하지 않고 자동으로 세포수와 세포생존율 분석 할 수 있다.
- ② 중앙은행은 세포자원의 세포생존율을 확인할 때 사용한다.
- ③ 장비관리자는 년 1회 자가 점검을 진행하고, 별지 제20호서식의 'Cell counter 내부점검 기록서'를 작성하여, 점검 결과를 보관한다.
- ④ Bioanalyzer 장비 규격은 아래와 같다.

	장비명(제조사)	모델명	규격
	자동 세포수 측정기 (Invitrogen)	Countess™ Automated Cell Counter	<ul style="list-style-type: none"> · 크기 : 27cm-19cm-20cm (W-H-D) · 측정범위 : $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ · 측정 소요시간 : < 60 s · 작동온도 : 10-35 °C · 습도 : 20 ~ 80%

9.2. 사용 시 주의사항

- ① 정교한 광학이 포함되어 있으므로, 진동이 없는 평면에 장비를 배치한다.
- ② 장비 주변을 깨끗이 유지한다.
- ③ 샘플을 처리하는 동안 보호장비(장갑, 실험복)를 착용한다.
- ④ 장비를 사용한 후 전원을 끈다.

9.3. 관리

Countess® Test Beads를 사용하여 자가 점검을 실시한다. 점검 결과 측정한 평균값이 1×10^6 beads/mL $\pm 10\%$ 범위에 포함되지 않을 경우 제조사에 의뢰하여 기기 점검을 받는다.

* Countess® Test Beads
(bead size) $10\mu\text{m} \pm 10\%$
(Concentration) 1×10^6 beads/mL $\pm 10\%$

- ① 세포수 측정기의 장비의 전원을 켜 후, 「Settings」 선택한다.
- ② Count mode의 「Beads」를 선택한다(화면에 「Count beads」의 큰 버튼이 나옴).
- ③ Countess® Test Beads를 30초 동안 vortex 한다.
- ④ Beads $10\mu\text{L}$ 와 0.4% trypan blue 시약 $10\mu\text{L}$ 을 섞어준다.
- ⑤ Countess® chamber slide A, B에 각각 ④의 mixture $10\mu\text{L}$ 를 loading 한다.
- ⑥ 장비의 slide 입구에 chamber slide를 장비에 넣는다.
- ⑦ beads에 초점을 맞추고 「Count beads」를 선택한다.
- ⑧ ③부터 ⑦과정을 두 번 더 반복하여 총 3회에 걸쳐 beads를 측정한다.
- ⑨ 총 3회 측정한 결과를 별지 제20호서식의 'Cell counter 내부점검 기록서'에 작성하고, 평균과 표준편차를 구하여 판정한다.
- ⑩ 평균값이 1×10^6 beads/mL $\pm 10\%$ 범위에 포함되지 않을 경우 제조사에 의뢰하여 기기 점검을 받는다.

인체자원 전달 내역서

(00000사업 0000 년도)

사이트명	자원명	총 개수	기탁자부여번호	박스 bCODE	비고
A병원 (사이트가 따로 없을 경우 코호트 명을 적는다)	DNA(1)	81	A8-TT-01234~A8-TT-01315	02SB999997	
	DNA(2)	81	A8-TT-01234~A8-TT-01315	02SB999998	
	DNA(3)	81	A8-TT-01234~A8-TT-01315	02SB999999	
B병원					
C병원					
D병원					

접수일자 : 0000년 00월 00일
운송담당자 : 김기탁 서명
인체자원관리자 : 김접수 서명

인체자원 접수 확인서(기탁)

(0000년도 사업명)

발신일자 : 2012. 5. 3

발 신 처 : 000 연구소

(주소) 서울 00구 00동

(TEL) (FAX)

(E-mail)

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 바이오뱅크과 귀하

(우) 363-951 충청북도 청원군 오송읍 오송생명2로 200

TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

1. 인체자원들을 다음과 같이 운반하였습니다.(참조 : 인체자원기탁서)

인체자원 상세정보는 별도로 첨부하였음.(참조 : 인체자원 접수파일)

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	명	vials

기탁자	운송자

* 세포자원 LCL, MNC, buffy coat 중 해당 자원종류 상세작성

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	명	vials

인체자원 관리자	인체자원관리 책임자

인체자원 접수 확인서(위탁)

(0000년도 사업명)

발신일자 : 2012. 5. 3

발 신 처 : 000 연구소

(주소) 서울 00구 00동

(TEL) (FAX)

(E-mail)

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 바이오뱅크과 귀하

(우) 363-951 충청북도 청원군 오송읍 오송생명2로 200

TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

1. 인체자원들을 다음과 같이 운반하였습니다.(참조 : 인체자원기탁서)

인체자원 상세정보는 별도로 첨부하였음.(참조 : 인체자원 접수파일)

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	명	vials

기탁자	운송자

* 세포자원 LCL, MNC, buffy coat 중 해당 자원종류 상세작성

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	명	vials

인체자원 관리자	인체자원관리 책임자

인체유래물등(검사대상물) 관리대장

기관 명칭									기관 허가(신고)번호								
일련 번호	관리 번호	인체유래물등/ 검사대상물 종류	수증내역			제공내용			폐기내용				기타		결재		
			연 월 일	수증량	검체기증자 명 (기관명)	연 월 일	제공량	제공 기관명	연 월 일	폐기량	폐기 방법		보관 조건	담당	관리 책임자		
											자가 처리	위탁처리 (위탁기관명)					
1	A2-DK-00000	DNA	15.00.00	3	단국대학교병원	15.00.00	1	부산대학교병원	15.00.00	2	0		-80℃	김자원	이관리		

인체자원정보 수정 요청서

상기와 같은 사유로 인하여 자원의 정보 수정을 요청합니다.

신청자의 성명 및 직위: 김신청
신청기관명(주소)/전화번호:

<자원 기본정보>

구분 ¹⁾	기탁자부여번호	성명	채취일자
신규	A2-DK-99999	김자원	2014.09.06

1) 신규 또는 추적 기재

<기본정보수정 내용>

자원종류	기본정보수정				
	수정 사항 ²⁾	수정 전 ³⁾	수정 후 ⁴⁾	수정 대상 ⁵⁾	
				자원 라벨 ⁶⁾	정보
DNA	기탁자부여번호변경	A2-DK-99999	A2-DK-11999	O	O
SERUM	성별	F	M	X	O
Plasma	나이	22	33	X	O

2) 기탁자부여번호, 성명, 성별, 나이 등의 항목 기재
3) 성별을 F에서 M으로 수정 시, 수정 전의 내용 F 기재
4) 성별을 F에서 M으로 수정 시, 수정 후의 내용 M 기재
5) 특이사항이 있는 경우 ex) 입고되기 전 자원의 정보 수정 내역 등 기재
6) 바이알 라벨의 정보를 수정할 경우 자원라벨을 함께 제출

<수정사유>

*구체적으로 기재

년 월 일
신청기관명:
연구책임자: (인)

인체자원 반송 신청서

신청기관

기관명

주 소

전화번호

전자우편

팩스번호

수신기관

기관명

주 소

전화번호

전자우편

팩스번호

No	코호트 명 (사업 명)	자원종류	기탁일	기탁자부여번호	박스 bCODE	반송 사유
1	선천성기형 및 유전	DNA	20120515	B0-A20154847		해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
2	도시코호트	DNA	20120518		01SB507019	해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
3					01SB507020	
4					01SB507021	
5					01SB507022	
6					01SB507023	
7	국민건강영양조사	DNA	20120519	B0-A20154847		해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
8				B0-B20154847		
9				B0-C20154847		
10						

총 DNA 명 (박스/ 바이알)

상기의 인체자원을 반송 신청 합니다.

년 월 일

신청기관명: (인)

연구책임자: (인)

*기탁기관(자원제작 기관)에서 반송 신청 할 경우 운송담당자/기탁자의 확인 필요

*자원은행에서 신청할 경우 자원담당자(실무자) /자원관리자(바이오뱅크과장) 확인 필요

- 151 -

국립중앙인체자원은행
인체자원
정도관리
매뉴얼
[별지 제6호서식]

인체자원 반송 확인서

발송기관

기관명

주 소

전화번호

전자우편

팩스번호

수신기관

기관명

주 소

전화번호

전자우편

팩스번호

No	코호트 명 (사업 명)	자원종류	기탁일	기탁자부여번호	박스 bCODE	반송 사유
1	선천성기형 및 유전	DNA	20120515	B0-A20154847		해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
2	도시코호트	DNA	20120518		01SB507019	해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
3					01SB507020	
4					01SB507021	
5					01SB507022	
6					01SB507023	
7	국민건강영양조사	DNA	20120519	B0-A20154847		해당 코호트 자원이 아님. 불출오류
8				B0-B20154847		
9				B0-C20154847		
10						

총 DNA 명 (박스/ 바이알)

상기의 인체자원을 반송 확인 합니다.

년 월 일

인체자원 수령자: (인)

인체자원 관리책임자: (인)

*제작기관으로 반송할 자원과 함께 전달

*원본전달, 사본 보관

- 152 -

백업자원 보관 저장실 일일 안전 점검표(백업은행용)
(
월)

소속:
실명(호실):
점검자:
(서명)
책임자:
(서명)

점검항목	평가																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	저장실 정리정돈 상태 및 통로 확보																															
2	개인보호구의 적절한 비치 및 착용																															
3	소화기 비치 및 이상 유무 확인																															
4	구급약품 비치																															
5	산소 또는 공기 호흡기 비치																															
6	저장실 내 일정한 온도(18~27℃) 유지																															
7	저장실 내 산소농도 모니터링 및 농도(18% 이상) 유지																															
8	저장장비의 작동상태 모니터링 및 점검표 작성																															
9	저장장비 이상 발생을 알리는 알람통보 시스템 유무 및 작동상태																															
10	저장장비 운영을 위한 충분한 액체질소의 보유																															
11	정전 대비 보완시스템 구비 (비상발전기, 비상조명 등) 및 작동상태																															
12	가스배관/호수의 연결상태																															
13	가스배관/호스의 주기적 누설 점검																															
14	전원 콘센트와 플러그 외관의 연결 상태																															

* 평가: 양호 O, 미흡 △, 불량 X, 해당없음 /

백업자원기계식냉동고 점검표(20○○년 ○월)
관리자
검토자
총괄책임자
(백업은행용)

1. 저장장비 이력사항							
장비번호				Warranty 만료일			
모델번호				설정 온도		-75℃	
고유번호				허용 온도 범위		℃ ~ ℃	
장비 취득일				열교환기 온도 범위(작동시)		℃ ~ ℃	
2. 일상점검표							
날짜	주간			야간			특이사항
	표시온도	냉동기 작동여부	열교환기 온도	표시온도	냉동기 작동여부	열교환기 온도	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
관리자 의견							

[illegible]

백업자원액체질소냉동고 점검표(2000년 0월)
(백업은행용)

관리자	검토자	총괄책임자

장비번호		장비 취득일	
모델번호		Warranty 만료일	
고유번호		액체질소 높이 범위	~ Inch
냉동고 타입	<input type="checkbox"/> Liquid <input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> 기타	허용 온도 범위	- ℃ ~ - ℃

[illegible]

[illegible]

■ 국립중앙도서관은 정보문화서비스 제공을 위하여 노력하겠습니다.
본서적은 공공누리 제1유형에 해당합니다.

백업자원저장장비 경고시스템 알람 내역(백업은행용)

기기명		소속	
모델명		허용범위	냉장
점검일	년 월 일		냉동
일시	알람 내용 및 사유	조치사항	담당자
책임자			

인체자원 기증철회 신청서				
신청인	성명			
	주소	(우편번호: -)		
	전화번호	핸드폰번호		
	전자우편			
수신기관	기관명	질병관리본부 바이오뱅크과		
	주소	충청북도 청원군 오송읍 오송생명2로 200		
	전화번호	043-719-	팩스번호	043-719-6539
<p>(참여일)참여한 (사업명)사업에 관련된 인체유래물 기증 철회를 요청합니다.</p>				
폐기관련 추가 기록 사항				
<p>폐기와 관련하여 추가적으로 기록해야 할 사항이 있으면 기록해 주세요.</p>				
<p>()사업철회요청 이전에 연구를 위해 이미 제공된 인체유래물과 정보는 폐기요청 대상에서 제외됩니다. 또한 위 기증철회 결과는 신청서 수령 후 45일 이내에 신청자의 이메일 또는 우편을 통해 알려드립니다.</p> <p style="text-align: right;">년 월 일</p> <p style="text-align: right;">자원기증자: (인)</p>				

인체자원 폐기(요청/사유)서						
1. 참여자 정보						
사업명						
조사기관						
ID						
이름						
생년월일		년	월	일		
조사 참여일자		년	월	일		
2. 폐기요청 내용						
폐기요청일자		년	월	일		
폐기요청사유		자세히 기술할 것(필요시 참고자료 첨부)				
접수자						
3. 정보·자원 폐기 대상						
참여횟수		1차	2차	3차	4차	5차
조사 참여일자						
폐기요청 자원	자원종류					
	자원종류					
	자원종류					
	자원종류					
비고						
<p>위 폐기요청 사유에 따라 국립중앙인체자원은행에서 보유하고 있는 모든 정보 및 인체자원을 폐기하고자 하오니 년 월 일까지 폐기 처리 후 결과를 보고해 주시기 바랍니다.</p> <p style="text-align: right;">년 월 일</p> <p style="text-align: right;">바이오뱅크과장</p>						

인체자원 폐기결과 통지서

수신자

(우편번호: , 주소:)

폐기 요청 내용

(참여일)에 참여하신 (사업명)사업의 인체자원 기증 철회 요청을 하셨습니다.

폐기 처리사항

자원종류

폐기일

폐기량

미 폐기 자원의 유무

유 ☐ 무 ☐

(*미 폐기 자원이 있을 시 아래 사항을 적어주세요)

미 폐기 사항

☐ 자원종류 :

☐ 미 폐기 사유:

☐ 예상 폐기 완료일:

「생명윤리 및 안전에 관한 법률」 제39조제1항 및 동법 제44조제3항에 따라 귀하의 요구에 대한 결과를 위와 같이 통지합니다.

년 월 일

바이오뱅크과장 직인

유의사항

1. 귀하께서 아래와 같이 요청하신 _____사업의 인체자원 기증 철회 요청에 대하여 모든 역학정보 및 임상정보, 인체유래물(혈액, 소변, 유전자 등)은 적절한 절차에 따라 삭제되거나 폐기되었습니다.

2. 따라서, _____사업을 통하여 수집되었던 귀하의 자료 및 자원은 폐기요청일 이후 어떠한 연구에도 이용되지 않으며, 관련 연구기관 및 연구자에게도 제공되지 않습니다.

3. 단, 철회 요청 이전에 이미 연구에 사용된 정보와 인체유래물은 해당 연구과제에 한하여 사용 후 폐기됩니다.

β-globin PCR 정도관리 결과서

분양번호	자원bCODE	gel 결과	plate 위치	
KoBB7-4237		(+)	1	A
KoBB7-4238		(+)	1	B
KoBB7-4239		(+)	1	C
KoBB7-4240		(+)	1	D
KoBB7-4241		(+)	1	E
KoBB7-4242		(+)	1	F
KoBB7-4243		(+)	1	G
KoBB7-4244		(+)	1	H
KoBB7-4245		(+)	2	A
KoBB7-4246		(+)	2	B
KoBB7-4247		(+)	2	C
KoBB7-4248		(+)	2	D
KoBB7-4249		(+)	2	E
KoBB7-4251		(+)	2	F
KoBB7-4252		(+)	2	G
KoBB7-4253		(+)	2	H
KoBB7-4254		(+)	3	A
KoBB7-4255		(+)	3	B
KoBB7-4256		(+)	3	C
KoBB7-4257		band약함	3	D
KoBB7-4258		(+)	3	E
KoBB7-4259		(+)	3	F
KoBB7-4260		(+)	3	G
KoBB7-4261		(+)	3	H
KoBB7-4262		(+)	4	A
KoBB7-4263		(+)	4	B
KoBB7-4265		(+)	4	C
KoBB7-4266		(+)	4	D
KoBB7-4267		(+)	4	E
KoBB7-4268		(+)	4	F
KoBB7-4269		(+)	4	G
KoBB7-4270		(+)	4	H

세포배양 정도관리 결과서

cell name	기탁자 부여번호	출고 위치				thawing 일자	passage #	Stock label				
No.	날짜	cell counter data (/ ml)				Media vol. (ml)	total cell no. (X 10 ⁶)	Cell stock			QC data	
		viable cells (X 10 ⁶)	/	total cells (X 10 ⁶)	dead cells (X 10 ⁵)			viability (%)	cell no. (X 10 ⁶)	vial 수	passage No	myco plasma (-/+)
1		/										
2		/										
3		/										
4		/										
5		/										
6		/										
7		/										
8		/										
9		/										
10		/										
11		/										
12		/										
13		/										
특이사항							stock 저장 위치					

(시험장비명) 사용일지

연 번	사용자		사용일자	사용시간	용도	특이사항
	소속	이름				
1	000000과	0 0 0	'00. 00. 00.	00:00 ~ 00:00		
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

(시험장비명) 이력카드

장비명		제조사	
모델명		취득금액	
물품자산번호		취득일	
관리번호(RFID)		관리자	

연번	점검(수리)일	점검(수리)내용	점검(수리)자	수리비용(천원)	특이사항
1	'00. 00. 00.				
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

Cell counter 내부점검 기록서

기기명		관리번호	
model명		Serial No.	
점검일자		점검자	

Trypan Blue stain	Catalog No. : Concentration :	
Bead Solution	Catalog No. : Concentration :	
Channel	A(× 10 ⁶ /mL)	B(× 10 ⁶ /mL)
Counting value(1차)		
Counting value(2차)		
Counting value(3차)		
Average	× 10 ⁶ Beads/mL	
Cv value		
판정		

측정한 평균값이 1×10⁶ Beads/mL ± 10% 범위에 포함되지 않을 경우 업체에 의뢰하여 적절한 조치를 취한다.

국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼

개정일 : 2019년 1월

담당부서 : 질병관리본부 국립보건연구원 유전체센터 바이오뱅크과

작성자 : 남혜영, 홍은정

전화 : 043-719-6530, 6518

이메일 : biobank@korea.kr

팩스 : 043-719-6539
