

국립중앙인체자원은행

인체자원 정도관리 숙련도시험 운영 매뉴얼

2019. 1.



질병관리본부



국립보건연구원

목 차

1. 개요	1
1.1. 목적	1
1.2. 용어의 정의	1
1.3. 숙련도 시험 운영 원칙	2
2. 숙련도시험 운영 절차 · 방법	3
2.1. 숙련도시험 물질 제작의 기본사항	3
2.2. 숙련도시험 물질 제작방법	3
2.3. 숙련도시험 물질 균질성 · 안정성 평가방법	5
2.4. 숙련도시험 신청 안내 및 접수 절차	6
2.5. 숙련도시험 물질 발송 절차	7
2.6. 숙련도시험 물질 수령 및 시험 절차	7
2.7. 숙련도시험 결과 분석 및 재시험	7
2.8. 숙련도시험 결과 배포 절차	8
[별지 제1호서식] 숙련도시험 신청서	9
[별지 제2호서식] 숙련도시험 물질 인수증	10
[별첨 1] 숙련도시험 설명서	11

1. 개 요

1.1. 목적

이 매뉴얼은 인체유래물은행의 정도관리 항목에 대한 숙련도(정확도 및 정밀도) 측정을 위해 국립중앙인체자원은행(이하 “중앙은행”이라 한다.)에서 운영하는 숙련도시험의 운영 원칙 및 절차를 정하는데 목적이 있다.

1.2. 용어의 정의

- ① “**숙련도시험**”이란 시험기관 간 비교를 통하여 미리 확립된 기준에 대한 참가자의 수행도를 평가하는 것을 말한다.
- ② “**숙련도시험 스킴/프로그램**”이란 시험, 측정, 교정 또는 검사 등의 특정 분야에 대한 하나 혹은 그 이상의 라운드로 설계되고 운영되는 숙련도시험을 말한다.
- ③ “**참가자**”란 숙련도시험 아이템을 수령하거나, 숙련도시험 운영기관에 의한 검토를 위해 결과를 제출하는 시험기관, 조직 또는 개인을 말한다.
- ④ “**로버스트 통계적 기법**”이란 기본적인 확률적 모형을 약간 벗어난 이상점의 영향에 둔감한 성질을 갖는 통계적 기법을 말한다.
- ⑤ “**숙련도평가의 표준편차**”란 유효한 정보에 근거한 숙련도시험 결과에 대한 평가에 사용되는 분산기준을 말한다.
- ⑥ “**Z-스코어**”란 숙련도 평가를 위한 설정값 그리고 표준편차를 사용하여 산출되는 시험소 편의의 표준화된 측정을 말한다.

1.3. 숙련도시험 운영 원칙

- ① 중앙은행은 인체유래물은행의 인체자원에 대한 관리 표준화를 위해 인체자원 정도 관리항목에 대한 숙련도시험 프로그램을 운영한다. 숙련도시험 프로그램은 KS Q ISO/IEC 17043에 준하여 운영한다.
- ② 중앙은행 운영부서(바이오뱅크과)는 매년 숙련도시험 프로그램을 계획하고 부서장 결정에 따라 숙련도시험을 운영한다.
 - 숙련도시험 프로그램 계획 수립 시 시험항목, 일정, 숙련도시험 물질 바이알 수, 안정성평가, 균질성 평가 방법 등을 포함한다.
 - 숙련도시험 프로그램 계획은 숙련도시험 프로그램 운영 결과보고와 함께 내부 결재를 진행한다.
- ③ 숙련도시험에 새로운 시험 항목을 개발하여 추가할 경우에는 시범사업을 실시하여 참여기관의 숙련도 수준 파악, 숙련도시험 물질 및 운영절차에 대한 문제점을 파악 및 개선한 후 추가한다.

2. 숙련도시험 운영 절차 · 방법

2.1. 숙련도시험 물질 제작의 기본사항

- ① 숙련도시험 물질은 자체 제작하거나 위탁하여 제작할 수 있다.
- ② 숙련도시험 물질 제작에는 K562 세포주를 사용한다. 세포의 해동 및 배양방법은 「국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼」(이하 “정도관리 매뉴얼”이라 한다)의 ‘Ⅲ.4.2. 세포해동’ 및 ‘Ⅲ.4.3. LCL 계대배양’을 참고한다.
- ③ 숙련도시험 물질 바이알 수는 숙련도시험 물질 배포기관 수, 균질성 검사, 안정성 검사 등을 고려하여 정한다.
- ④ 숙련도시험 물질에는 연도, 물질이름, 바이알번호가 기재된 바이알라벨을 부착한다.
(예, 2018년도 숙련도 물질, DNA tube 1, 001)

2.2. 숙련도시험 물질 제작방법

2.2.1. DNA 농도 및 순도 측정 항목, 미생물오염검사 항목을 위한 시험 물질 제작방법

- ① K562 세포주 배양 후, DNA 추출 키트로 DNA를 추출한다.
 - DNA 추출량은 시험물질의 농도 및 필요 바이알 수를 고려하여 정한다.
- ② 추출한 DNA는 A, B, C 세 구간의 농도로 희석하여 준비한다.
 - DNA의 농도는 100ng/ul 이하, 100 ~ 200ng/ul, 200ng/ul 이상의 범위로 정한다.
- ③ DNA 숙련도 시험물질 A, B, C 중 1개 또는 2개 물질에 bacteria DNA를 균일하게 섞는다.
- ④ ③에서 제작한 DNA 숙련도 시험물질을 40μl씩 분주한다.
- ⑤ ④의 물질을 보관박스에 담아 -80℃ 기계식냉동고에 보관한다.

2.2.2. RNA 안정성 항목을 위한 물질 제작방법

- ① K562 세포주 배양 후, RNA 추출 키트로 RNA를 추출한다.
 - RNA 추출량은 시험 물질의 농도 및 필요 바이알 수를 고려하여 정한다.
- ② 추출된 RNA는 500ng/μl 농도가 되도록 희석한다.
- ③ ②의 RNA는 A, B, C 세 구간의 RIN값을 갖도록 70℃에서 처리한다.
 - RIN값은 9이상, 7이상 9미만, 4이상 7미만의 범위에서 정한다.
- ④ ③에서 제작한 RNA 숙련도시험 물질을 40μl씩 분주한다.
- ⑤ ④의 물질을 보관박스에 담아 -80℃ 기계식냉동고에 보관한다.

2.2.3. 세포생존율 측정 항목을 위한 물질 제작방법

- ① K562 세포주 배양 후, 세포 생존율이 다른 세포 숙련도시험 물질 2개를 제작한다.
 - 세포를 배양하면서 주기적으로 세포생존율을 측정하여 계획한 생존율에 도달했는지 확인한다.
 - 「정도관리 매뉴얼」의 ‘Ⅲ.4.3.4. 동결보존’에 따라 세포를 동결한다.
- ② ①의 물질을 보관박스에 담아 -150℃이하 액체질소냉동고에 보관한다.

2.2.4. DNA 추출 시험 항목을 위한 물질 제작방법

- ① K562 세포주를 배양 후, 세포수가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ (세포생존율 90% 이상)이 되도록 세포 pellet을 준비하여 DNA 추출 시험 항목을 위한 시험 물질을 제작한다.
- ② ①의 물질을 보관박스에 담아 -80℃이하 기계식냉동고에 보관한다.

2.2.5. RNA 추출 시험 항목을 위한 물질 제작방법

- ① K562 세포주를 배양 후, 세포수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ (세포생존율 90% 이상)이 되도록 세포 pellet을 준비하여 RNA 추출 시험 항목을 위한 시험 물질을 제작한다.
- ② ①의 물질을 보관박스에 담아 -80℃이하 기계식냉동고에 보관한다.

2.3. 숙련도시험 물질 균질성 · 안정성 평가방법

2.3.1. 숙련도시험 물질에 대한 균질성 평가

* 균질성 평가는 최종 형태로 포장한 후 진행 한다 .

- ① 제작된 숙련도시험 물질이 균질한지 확인하기 위하여 보관박스 각 열의 1, 5, 9 번째에 해당하는 바이알을 선택하여 균질성 평가를 진행한다.

▪ 균질성 평가는 10바이알 이상에서 진행한다.

- ② 각 숙련도시험 물질에 대한 균질성평가 항목은 아래와 같다.

	숙련도 시험물질	평가 항목
1	DNA	농도 측정, 순도 측정, 미생물 오염 PCR
2	RNA	RIN 값 측정
3	세포	세포생존율 측정
4	DNA 추출 pellet	DNA를 추출하여 농도 및 순도 측정
5	RNA 추출 pellet	RNA를 추출하여 RIN 값 측정

- ③ 숙련도시험 물질은 ②측정항목을 3번 반복하여 측정한 후, ISO13528에서 제시된 통계방법에 따라 균질성을 평가한다.

▪ 반복측정은 무작위 순서로 진행한다.

1회	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2회	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
3회	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11

- ④ 균질성은 ISO13528의 통계방법에 따라 ANOVA 분석에 의한 95% 신뢰구간에서 균질성을 평가한다.

▪ $F_{\text{비}} < F$ 기각치 또는 $P\text{-value} > 0.05$ 이면 균질하다고 평가

- ⑤ ④의 결과 균질성 평가 기준을 만족하지 못하는 경우, 숙련도 결과를 평가할 때 시료 간 표준편차와 숙련도평가의 표준편차를 합성하여 만들어진 표준편차를 사용한다.

2.3.2. 숙련도시험 물질에 대한 안정성 평가

- ① 숙련도를 실시하는 동안 물질의 안정성과 운송 과정에서의 안정성을 확인하기 위하여 2개 이상의 바이알을 선택하여 안정성 평가를 진행한다.

- ② 안정성 평가는 시료 배포 전(1그룹), 기관의 시험결과 보고 직후에 측정(2그룹)하며 평가항목은 2.2.6.②와 동일하다.

- ③ 안정성 평가 전 시료는 참가기관의 예상되는 저장환경과 유사한 환경조건에 시료를 보관한 후 측정한다.

- ④ ②의 두 그룹(before and after)의 측정결과와의 평균을 계산하여 다음의 식을 만족하면 안정하다고 판단한다.

$$| \bar{y}_1 - \bar{y}_2 | \leq 0.3\sigma_{pt}$$

- ⑤ 안정성을 만족하지 못하는 경우, 다음의 공식을 사용하여 안정성 허용기준을 확장한다.

$$| \bar{y}_1 - \bar{y}_2 | \leq 0.3\sigma_{pt} + 2\sqrt{u^2(\bar{y}_1) + u^2(\bar{y}_2)}$$

- ⑥ ⑤의 기준을 만족하지 못하는 경우, 안정성 표준편차와 숙련도평가의 표준편차를 합성하여 만들어진 표준편차를 사용한다.

2.4. 숙련도시험 신청 안내 및 접수 절차

- ① 숙련도시험 신청에 관한 내용은 시험항목, 운영일정, 숙련도시험 내용, 숙련도신청서식 및 숙련도신청 일정을 포함하여 공문으로 안내한다.

- ② 참가기관은 별지 제1호서식의 ‘숙련도시험 신청서’를 작성하여 전자우편으로 신청한다.

- ③ 숙련도시험 담당자는 숙련도시험 신청서를 접수한 후, 신청기관, 신청자, 주소, 신청항목을 확인한다.

2.5. 숙련도시험 물질 발송 절차

- ① 숙련도시험 물질을 발송하기 전 숙련도시험 물질 발송에 필요한 드라이아이스, 포장박스, 아이스박스, 주소라벨을 준비한다.
- ② 숙련도시험 담당자는 참가기관에 숙련도시험 물질 발송예정일, 숙련도 시험 결과 제출일, 숙련도 시험 설명서(별첨 1), 별지 제2호서식 '숙련도시험 물질 인수증'을 전자우편으로 안내한다.
- ③ 각 항목별 숙련도시험 물질은 25 hole cryobox에 담아 준비한다.
 - DNA 농도 및 순도 측정항목은 blank buffer, 미생물오염검사 항목은 primer set와 positive control을 포함하여 포장한다.
- ④ 아이스박스에 드라이아이스, 숙련도물질, 드라이아이스 순으로 담고, 뚜껑을 덮은 후 테이핑하여 포장박스에 넣고 주소라벨을 붙인다.
- ⑤ 숙련도시험 담당자는 우체국 소포 또는 택배로 참가기관에 시험물질을 발송한다.

2.6. 숙련도 물질 수령 및 시험결과 (참가기관)

- ① 숙련도시험 참가기관은 숙련도 물질을 수령하여 배송상태를 확인한 후, 별지 제2호 서식의 '숙련도시험 물질 인수증'을 작성하여 중앙은행 숙련도시험 담당자에 제출한다.
- ② 숙련도시험 참가기관은 숙련도시험을 바로 수행하지 않을 경우, 시료취급 시 주의 사항에 따라 보관한 후, 숙련도시험을 진행한다.
- ③ 숙련도시험 결과를 숙련도 시험담당자에게 전자우편으로 발송한다.

2.7. 숙련도시험 결과 분석 및 재시험

- ① 숙련도시험 결과분석은 로버스트 통계적 기법 또는 Q method & Hampel estimator의 통계기법으로 분석한다.

▪ 정량 분석의 경우

Z-스코어	$ Z \leq 1$	$1 < Z \leq 2$	$2 < Z < 3$	$ Z \geq 3$
판정결과	매우만족	만족	의심	불만족

※ $|Z \text{ score}|$ 값은 숙련도시험 결과를 평가하는 지표로 결과값이 $|0|$ 에 가까울수록 정밀성과 정확도가 높은 것으로 평가함

▪ 정성 분석의 경우

시험결과	정답	오답
판정결과	만족	불만족

- ② 불만족기관은 원인 파악을 위해 재시험을 요청한다.
- ③ 재시험결과 불만족일 경우, 시험방법에 대한 문의를 통해 원인을 파악한 후 장비 검·교정, 시험방법 변경 등 불만족 원인에 대한 조치방법 제안한다.
- ④ 숙련도시험 결과 불만족 원인을 조치한 후 재시험을 진행한다.

2.8. 숙련도시험 결과 배포 절차

- ① 불만족 기관에 대한 재시험 완료 후, 숙련도 결과보고서를 작성하여 바이오뱅크 과장에게 보고한다.
- ② 항목별로 숙련도시험 참가기관에 대한 결과를 작성하여 결과를 배포한다.

* 숙련도 참가기관에 배포하는 결과서의 그래프 등은 타기관의 기관명을 임의의 숫자 등으로 변경하여 표기한다.

숙련도시험 신청서			
기관명			
담당자 성명		연락처(전화)	
주소	상세히 작성해 주세요.		

숙련도시험 항목	DNA 농도 및 순도 측정	참여 <input type="checkbox"/>
	미생물오염검사	참여 <input type="checkbox"/>
	RNA 안정성검사	참여 <input type="checkbox"/>
	세포생존율 측정	참여 <input type="checkbox"/>
	DNA 추출	참여 <input type="checkbox"/>
	RNA 추출	참여 <input type="checkbox"/>
상기 기관은 인체자원 정도관리 숙련도시험에 참여를 신청합니다.		
정도관리 책임자 (인 또는 서명)		
년 월 일		

※ 참여하시고자 하는 항목에 체크(√)해 주시기 바랍니다.

숙련도시험 물질 인수증

인수자

기관명			
담당자성명		연락처	

점검사항

시료 도착 시간	년 월 일 (시 분)	
시료 개봉 시간	년 월 일 (시 분)	
시료상태	시료가 모두 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
	시료가 냉동상태로 배송되었습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
	시료 용기 튜브에 라벨이 부착되어 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
	시료 용기의 튜브 외부에 시료가 누출된 흔적이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
	시료를 육안으로 관찰 할 때 오염 흔적이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
확인 후 보관 시간	년 월 일 (시 분)	

위와 같이 숙련도시험 시료를 인수하였습니다.

정도관리 책임자 (인 또는 서명)

년 월 일

□ DNA 농도 및 순도, 미생물오염검사 항목 시험 설명서

1. 숙련도 시험물질 구성

- 1.1. NBK PT DNA tube 1
- 1.2. NBK PT DNA tube 2
- 1.3. NBK PT DNA tube 3
- 1.4. Positive control: Bacterial DNA
- 1.5. Bacteria Primer: Bacteria F, Bacteria R
- 1.6. GAPDH Primer: GAPDH F, GAPDH R
- 1.7. Blank buffer

2. 숙련도 시험 종류

- 2.1. DNA 농도 및 순도 측정
- 2.2. 미생물오염 검사

3. 숙련도 시험 방법

3.1. DNA Quantification and Purity

- 3.1.1. 숙련도 시험물질은 수령직후 사용하기 전까지 기계식냉동고(-80℃)에 보관한다.
- 3.1.2. 숙련도시험 시작 전 시험물질을 실온에서 20분간 녹인 후 부드럽게 tapping 하여 사용한다(vortex 금지).
- 3.1.3. 참가기관은 3개의 시료에 대해 3회 반복하여 흡광도(260nm, 280nm)를 측정하고, 농도, Ratio 260/280 값을 제공된 서식에 맞추어 작성한 후 제출한다.
※ Blank는 배포하는 buffer를 사용한다.
- 3.1.4. 측정결과, 사용장비 관련 정보를 숙련도시험 결과지에 작성하여 제출한다.

3.2. Bacterial DNA contamination

- 3.2.1. 동봉된 Bacteria primer, GAPDH primer를 사용하여 PCR을 한다.
※ negative control은 TE buffer 또는 DW를 사용한다.

- 3.2.2. 숙련도 시험물질은 농도를 측정하여, 200ng을 PCR template로 사용한다.
※ positive control은 1μl를 사용한다.
- 3.2.3. PCR product의 1/3을 취하여 1% agarose gel, 0.5× TBE buffer에서 150V, 30분 동안 전기영동 한다.
※ 전기영동 loading 순서는 Marker, negative control, Bacterial DNA(positive control), tube 1, tube 2, tube 3 순으로 한다.
- 3.2.4. Bacterial band가 있으면 '양성', 없으면 '음성'으로 결과를 판정하여 기록하며, 전기영동 결과, 사용시약 정보, 장비정보를 제출한다.

□ RNA 안정성 항목 시험 설명서

1. 숙련도 시험물질 구성

- 1.1. NBK PT RNA tube 1
- 1.2. NBK PT RNA tube 2
- 1.3. NBK PT RNA tube 3

2. 숙련도 시험 종류

- 2.1. RNA 안정성 시험

3. 숙련도 시험 방법

3.1. RNA integrity

- 3.1.1. RNA 시료 1ul를 취하여 bioanalyzer 장비를 사용하여 측정한다.
- 3.1.2. RNA integrity는 각 기관에서 측정하는 프로토콜을 사용하여 3회 반복 측정한다.
- 3.1.3. 측정결과(RIN)와 사용장비의 모델명, 사용 칩에 대한 정보를 숙련도시험 결과지에 작성하여 제출한다.

□ 세포생존율 측정 항목 시험 설명서

1. 숙련도시험 물질 구성

- 1.1. NBK PT Cell tube 1
- 1.2. NBK PT Cell tube 2

2. 숙련도시험 종류

- 2.1. 세포생존율 측정

3. 숙련도 시험 방법

- 3.1. 숙련도 시험물질은 수령직후 바로 측정하는 것을 권장한다. 바로 측정이 불가능할 경우 시험 전까지 액체질소냉동고(-150℃)에 보관한다.
- 3.2. Cell viability 측정은 각 기관의 프로토콜을 사용하여 측정한다.
 - ※ Cell viability를 측정할 때 숙련도 시험물질을 37℃ 항온수조에서 녹인 후 배지를 사용하여 1회 washing 한 다음 측정한다.
- 3.3. 참가기관은 2개의 시료를 3회 반복하여 측정한다.
- 3.4. 측정결과와 시험방법을 숙련도시험 결과지에 작성하여 제출한다.

□ DNA 추출 항목 시험 설명서

1. 숙련도 시험물질 구성

- 1.1. NBK PT Cell pellet(DNA)

2. 숙련도시험 종류

- 2.1. DNA 추출

3. 숙련도시험 방법

- 3.1. 숙련도시험 물질은 수령직후 바로 DNA를 추출하는 것을 권장한다. 바로 추출이 불가능할 경우 시험 전까지 기계식냉동고(-80℃)에 보관한다.

3.2. DNA 추출은 Silica membrane-based 프로토콜을 사용하여 측정한다.

3.3. 참가기관은 추출한 DNA를 국립중앙인체자원은행에 제출한다.

※ DNA 배송전까지 -70℃에 보관하며, 냉동상태가 유지될 수 있도록 포장하여 배송한다.

※ DNA 배송시 elution buffer 20 μ l도 포함한다.

3.4. DNA 추출 결과와 시험방법을 숙련도시험 결과지에 작성하여 제출한다.

□ RNA 추출 항목 시험 설명서

1. 숙련도 시험물질 구성

- 1.1. NBK PT Cell pellet(RNA)

2. 숙련도 시험 종류

- 2.1. RNA 추출

3. 숙련도 시험 방법

3.1. 숙련도 시험물질은 수령직후 바로 RNA를 추출하는 것을 권장한다. 바로 추출이 불가능할 경우 시험 전까지 기계식냉동고(-80℃)에 보관한다.

3.2. RNA 추출은 각 기관의 프로토콜을 사용하여 측정한다.

3.3. 참가기관은 추출한 RNA를 국립중앙인체자원은행에 제출한다.

※ RNA 배송전까지 -70℃에 보관하며, 냉동상태가 유지될 수 있도록 포장하여 배송한다.

※ RNA 배송시 elution buffer 20 μ l도 포함한다.

3.4. RNA 추출 결과를 숙련도시험 결과지에 작성하여 제출한다.

국립중앙인체자원은행

인체자원 정보관리 숙련도 시험운영 매뉴얼

제정일 : 2019년 1월

담당부서 : 질병관리본부 국립보건연구원 유전체센터 바이오뱅크과

작성자 : 김혜련

전화 : 043-719-6531

이메일 : biobank@korea.kr

팩스 : 043-719-6539
