

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 16.

발신처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수신처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 귀하

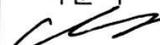
(우) 363-951 충청북도 청원군 오송읍 오송생명2로 200

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 :	100명	500vials
Plasma :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	500vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란
	장헌수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	100명	500vials
Plasma :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	500vials

접수담당자	자원관리자
	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 16.
발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행
 (주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170
 (TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023
 (E-mail) ran7136@schmc.ac.kr
수 신 처 :
 질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	명	vials
Urine_SUNT :	100명	1,494vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	1,494vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 장현수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	명	vials
Urine_SUNT :	100명	1,494vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	1,494vials

접수담당자	자원관리자
김한나	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 16.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	400명	3,304vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	400명	3,304vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란
	장현수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	400명	3,304vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	400명	3,304vials

접수담당자	자원관리자
홍은정	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 30.

발신처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수신처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	100명	911vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	911vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 장현수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	100명	911vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	911vials

접수담당자	자원관리자
홍은정	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치전식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 30.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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 :	324명	972vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타: SPU_SUNT	명	vials
합계 :	324명	972vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 장현수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	324명	972vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타: SPU_SUNT	명	vials
합계 :	324명	972vials

접수담당자	자원관리자
정민영	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 04. 30.
 발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행
 (주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170
 (TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023
 (E-mail) ran7136@schmc.ac.kr
 수 신 처 :
 질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
 Plasma : 명 vials
 Urine_SUNT : 100명 1,470vials
 Cell()*: 명 vials
 기타 : 명 vials
 합계 : 100명 1,470vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 장현수

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA : 명 vials
 Serum : 명 vials
 Plasma : 명 vials
 Urine_SUNT : 100명 1,470vials
 Cell() : 명 vials
 기타 : 명 vials
 합계 : 100명 1,470vials

접수담당자	자원관리자
김동안	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 21.

발신처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수신처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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)

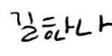
DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타: SPU_SUNT	200명	997vials
합계 :	200명	997vials

기탁자	운송자
박춘식 	이명란

* 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: SPU_SUNT	200명	997vials
합계 :	200명	997vials

접수담당자	자원관리자
김한나 	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 21.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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(LCLs)*:	50명	100vials
기타 :	명	vials
합계 :	50명	100vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란

* 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(LCLs):	50명	100vials
기타 :	명	vials
합계 :	50명	100vials

접수담당자	자원관리자
	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 21.
 발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행
 (주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170
 (TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023
 (E-mail) ran7136@schmc.ac.kr
 수 신 처 :
 질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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)

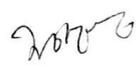
DNA : 891명 2,613vials
 Serum : 명 vials
 Plasm : 명 vials
 Urine : 명 vials
 Cell()*: 명 vials
 기타: SPU_SUNT 명 vials
 합계 : 891명 2,613vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA : 891명 2,613vials
 Serum : 명 vials
 Plasm : 명 vials
 Urine : 명 vials
 Cell() : 명 vials
 기타: SPU_SUNT 명 vials
 합계 : 891명 2,613vials

접수담당자	자원관리자
	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 21.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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(SPT_PELT-TZ)*:	159명	497vials
기타:	명	vials
합계 :	159명	497vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란

* 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(SPT_PELT-TZ) :	159명	497vials
기타:	명	vials
합계 :	159명	497vials

접수담당자	자원관리자
	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 21.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	100명	1,000vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	1,000vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	100명	1,000vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	100명	1,000vials

접수담당자	자원관리자
홍은정	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 28.

발신처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수신처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	74명	733vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	74명	733vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 양소연

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	74명	733vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	74명	733vials

접수담당자	자원관리자
홍은정	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 28.

발신처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수신처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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: SPU_SUNT	46명	224vials
합계 :	46명	224vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 양소연

* 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: SPU_SUNT	46명	224vials
합계 :	46명	224vials

접수담당자	자원관리자
김진나	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 28.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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)

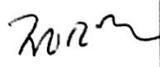
DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell(SPT_PELT-TZ)*:	3명	9vials
기타:	명	vials
합계 :	3명	9vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 양소연

* 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(SPT_PELT-TZ) :	3명	9vials
기타:	명	vials
합계 :	3명	9vials

접수담당자	자원관리자
	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 28.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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
Plasma :	명	vials
Urine_SUNT :	136명	2,013vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	136명	2,013vials

기탁자	운송자
박춘석	이명란 양소연

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	명	vials
Plasma :	명	vials
Urine_SUNT :	136명	2,013vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	136명	2,013vials

접수담당자	자원관리자
김소연	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 05. 28.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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 :	217명	1,292vials
Plasma :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	217명	1,292vials

기탁자	운송자
박춘식	이명란 양소연

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	명	vials
Serum :	217명	1,292vials
Plasma :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타 :	명	vials
합계 :	217명	1,292vials

접수담당자	자원관리자
김재민	

[별지 제5호 서식]

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과
 (우) 363-951 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 200
 TEL) 043-719-6518, 043-719-6531 FAX) 043-719-6539

인체자원 기탁 및 접수 확인서

(2014년도 (난치전식)오믹스 연구용 패널 자원 확보)

발신일자 : 2015. 06. 04.

발 신 처 : 순천향대학교 부천병원 인체자원단위은행

(주소) 경기도 부천시 원미구 조마루로 170

(TEL) 032-621-5007 (FAX) 032-621-5023

(E-mail) ran7136@schmc.ac.kr

수 신 처 :

질병관리본부 유전체센터 생물자원은행과 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 :	964명	2,886vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell()*:	명	vials
기타: SPU_SUNT	명	vials
합계 :	964명	2,886vials

기탁자	운송자
박춘심 	이명란 장연진

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

2. 인체자원들을 다음과 같이 접수하였습니다.

DNA :	964명	2,886vials
Serum :	명	vials
Plasm :	명	vials
Urine :	명	vials
Cell() :	명	vials
기타: SPU_SUNT	명	vials
합계 :	964명	2,886vials

접수담당자	자원관리자

RA-SOP01. 전혈로부터 Plasma, Buffy coat의 분리_ver1.3

1.1. Equipment and materials

4℃ Centrifuge
9ml EDTA tube
1.8ml Cryo tube(internal)
1000ul pipette Tip
Pipette
100hole plastic box

1.2. Procedure for Plasma & buffy coat

1. 9ml EDTA Tube에 Blood를 가득 채취한 후 5분정도 충분히 mix한다.(21G이상의 needle 사용하며, 채혈 후 분리 전까지 4℃에 보관하고 **최대 2시간 이내**에 후속 과정을 시행한다.)
2. 분주 할 1.8ml cryo Tube에 각각 label을 붙여 놓는다.(바코드작업 과정과 동일): Plasma 용 10개, buffy coat용 2개 tube 준비
3. 9ml EDTA Tube를 2,000g에서 10분간 4℃에서 Centrifuge(no braking)한 후 상층액(plasma)을 Buffy coat layer 위 500ul정도 남기고 라벨한 1.8ml cryo Tube에 300ul씩 10개 tube로 분주한다. (최소 5개 이상)
4. Buffy coat layer는 P1000 pipette Tip 끝을 0.1~0.2mm 정도 잘라준 후(Tip 끝이 너무 뽀족한 것만) 남은 plasma를 제거하고 cell layer가 있는 Tube 기벽을 Tip끝으로 살짝 따 주고 라벨한 1.8ml cryo Tube 한 개에 모두 넣고(600 μ l 정도) Tip으로 균질화되게 잘 섞어 준 후 새로운 1.8ml Cryo Tube(9ml EDTA Tube 1개분)에 절반을 (300 μ l 정도씩) 분주한다. (Platelet가 많아 세포가 뭉쳐 있으므로 많이 mix해서 풀어 준 후 분주해야 함)
5. 모든 Sample은 액체질소에 급속 동결하여 -80℃ 냉동고에 보관하는 것을 원칙으로 하되, 액체질소를 사용할 수 없을 시에는 -80℃ 냉동고에 직접 보관한다.

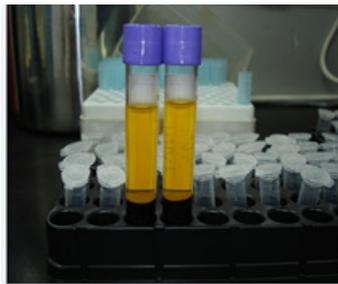
< 사진 참고 자료 >

1) 혈액의 채취



2) 라벨지 출력

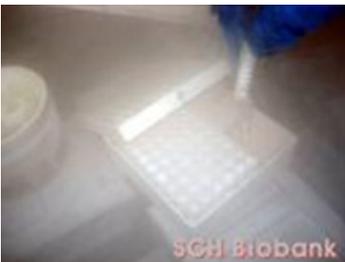
3) 2000g/10mins centrifuge 후 EDTA Tube의 모습



4) Plasma, Buffy coat layer aliquots



5) 보관



RA-SOP02. 요 분리 보관_ver1.3

2.1. Equipment and materials

- 4°C Centrifuge
- Urine cup
- 50ml conical tube
- 1.8ml Cryo tube(internal)
- 1000ul pipette Tip
- Pipette, 100hole Plastic box

2.2. Procedure for Urine

1. Urine cup에 중간요 30~40ml을 받도록 설명한다. 이때 이물질이 혼합되지 않도록 주의한다. 수거 후 4°C에 보관하고 **최대 2시간 이내**에 후속 과정을 시행한다.
2. 분주 할 1.8ml cryo tube에 바코드 라벨을 분주할 vial 수만큼 순서대로 붙여 놓는다. (Urine supernatant 15개 tube 준비)
3. 수거한 요는 50ml conical tube에 담아 1,300g에서 10분간 4°C에서 Centrifuge(no braking)한 후 상층액을 바코드 라벨한 1.8ml cryo tube에 1ml씩 15개 tube로 분주한다. (최소 10개 이상)
4. 모든 Sample은 액체질소에 급속 동결하여 -80°C 냉동고에 보관하는 것을 원칙으로 하되, 액체질소를 사용할 수 없을 시에는 -80°C 냉동고에 직접 보관한다.



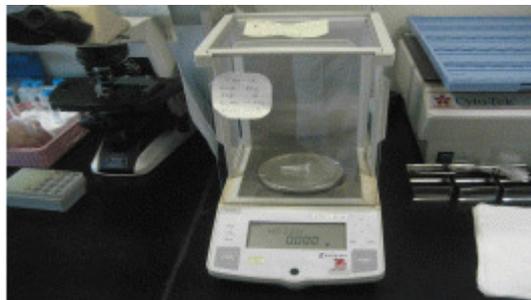
RA_SOP03. 객담 채취 후 세포와 상층액의 분리 및 보관_ver2.3

3.1. Equipment and materials

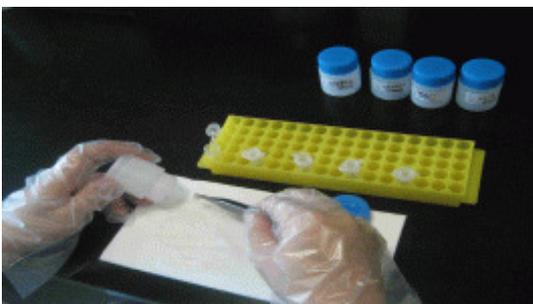
- * forcep, paper towel
- * 0.1% DTT(Dithiothreitol) in PBS(free Ca^{2+} , Mg^{2+})
- * PBS(free Ca^{2+} , Mg^{2+})
- * protease inhibitor : 0.1M EDTA in D.W(4°C보관), Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution(100X, -20°C보관, GenDEPOT, P3100)
- * TRIzol Reagent(ambion, 15596026, 4°C보관)
- * Cover glass, slide glass, cell counter
- * 0.4% Trypan blue stain solution(gibco, 15250-061), Neubaur counting chamber
- * 1.8ml Cryo tube(internal), 1.8ml EP tube(뚜껑 사이즈 작은 것)
- * Pipet 1000 μl , 200 μl , 10 μl
- * Voltex mixer, 4°C Micro Centrifuge
- * Cytospin
- *100hole plastic box, 81hole paper box

3.2. 객담 채취 후 상층액과 세포 분리 방법

3.2.1. 검사용기(EP tube)의 무게를 측정한다.



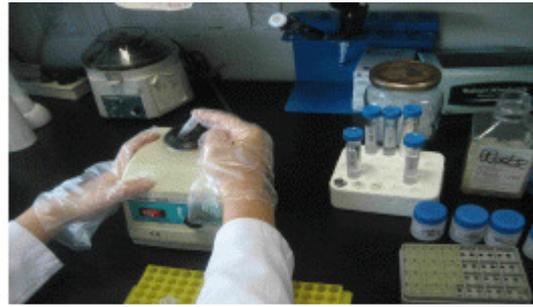
3.2.2. Sputum을 흡수가 잘 되는 Paper Towel에 놓고 타액성분을 흡수시키면서 객담에서 나온 점액만을 Forcep을 사용하여 적출 후 검사용기에 넣고 객담무게를 측정한다.



3.2.3. 검체 무게의 4배 해당하는 0.1% DTT in PBS^- 넣고 Vortex로 점액성분이 잘 풀릴 때까지 혼합 후 5분 정도 후에 검체 무게의 4배에 해당하는 PBS^- 를 추가하여 Vortex로 잘 섞어준다.

ex) 검체무게 0.038g 이면 $0.038 \times 4 \times \frac{1000}{1} = 152\text{mg} (\rightarrow 152\mu\text{l}$ 처리)

\rightarrow 검체무게(mg) \Rightarrow 피펫단위(μl)

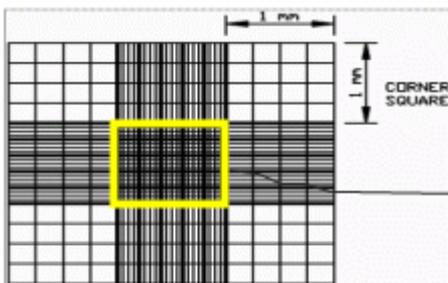


·※ 검체가 많을 경우 검체 무게의 8배의 PBS를 넣고 Vortex Mix하여 세포를 충분히 풀어준다.

3.2.4. 검체 $10\mu\text{l}$ 와 Trypan blue $10\mu\text{l}$ 를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. \rightarrow Neubaur counting chamber 사용

* Total Cell count = 25구획 세포수 x Total volume x 2×10^4

* Viability (%) = 25구획 내 살아있는 세포수 \div 25구획 내 전체 세포수 $\times 100$



cell count구역(25구획):가로x세로x높이
 $= 1 \times 1 \times 0.1 \text{mm} = 0.1 \text{mm}^3 (0.1\mu\text{l})$
그러므로 25구획 세포수 $\times 10^4$ 이 1ml의
세포수가 된다.

[선택사항]

1. 객담세포를 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 Slide를 제작한 후 Sample을 $100 \sim 120\mu\text{l}$ 취하여 Cytospin 400rpm, 5min 후 air dry 시킨다.

2. Diff -Quik Solution 으로 Slide 염색 후 분별 세포수를 측정한다.

\rightarrow 편평상피세포(squamous epithelial cell)를 제외한 Total cell 400개(Macrophage, Neutrophil, Eosinophil, Lymphocyte, Columnar epithelial cell)를 측정한다.

3.2.5. 2100rpm/10min 간 원심분리하여 상층액을 새로운 EP tube에 모두 옮기고, cell pellet에 TRIzol Reagent $800\mu\text{l}$ 를 넣고 완전히 lysis 후 $200\mu\text{l}$ 씩 바코드 라벨 한 EP tube 4개에 분주하여 -80°C 동결하여 보관한다.(DTT처리 pellet : gDNA 분리용, PBS처리 pellet : RNA 분리용)

3.2.6. EP tube에 옮긴 상층액은 4°C Micro Centrifuge로 12,000rpm에서 5분간 2차 원심분리 후 상층액 양의 1/100 volume으로 protease Inhibitor 두 가지를 미리 넣어 둔 바코드 라벨 한

cryo tube에 모두 옮겨 잘 섞은 후 100 μ l씩 4개의 cryo tube에 옮겨 담고, 나머지(마지막 라벨 tube가 됨)는 처음 cryo tube에 그대로 남겨 샘플 당 5개를 분주하고 분주전 총 용량을 기록한다.(상층액:100 μ l,100 μ l,100 μ l,100 μ l,rest)

-예) 상층액 600 μ l에 100mM EDTA 6 μ l와 Protease Inhibitor Cocktail Solution(100X) 6 μ l를 넣어 100 μ l씩 4개의 cryo tube에 넣고 나머지 200 μ l(rest)는 cryo tube(바코드 라벨 05번)에 그대로 둔다.

3.2.7. 상층액과 세포자원은 -80 $^{\circ}$ C 동결하여 보관한다.

RA_SOP04. 바코드 라벨 부착 및 기탁접수 파일 작성 방법_ver2.0

4.1 바코드 라벨

4.1.1. 바코드 구성은 <표1>과 같다.

구성 순서	예시 내용	설명
상위 1열	01234567	제공자바코드
상위 2열	PLA PRBL	Peripheral Blood에서 추출한 Plasma
상위 3열	01 1 01	첫 그룹_첫 번째 시료_첫 바이알
상위 4열	OM-AS-BC0001	제공자식별자(순천향대학 부천병원)

<표1>

4.1.2. 발행한 바코드 라벨의 [제공자식별자]는 아래 <표2>의 기관코드와 4자리 일련번호 조합으로 구성되어 있으니 바이알에 바코드를 부착하기 전에 제공자를 0001부터 순차적으로 부착할 수 있도록 라벨의 제공자식별자를 먼저 확인한다.

(ex)순천향대학교 부천병원 첫 번째 제공자식별자 : OM-AS-**BC**0001

기관명	기관코드
순천향대학교 부천병원	BC
순천향대학교 서울병원	SC
순천향대학교 천안병원	CA
순천향대학교 구미병원	GM
아주대학교병원	AJ
분당차병원	CH
강원대학교병원	GW
분당서울대학교병원	SB
인하대병원	IH
단국대학교병원	DK
서울아산병원	AM
이화여자대학교 의과대학 부속 목동병원	EH
중앙대학교병원	YS
연세대학교 세브란스병원	SE
한양대학교병원	HY
한림대학교 성심병원	HR
삼성서울병원	SM

<표2>

4.1.3. 바코드 라벨 자원코드, 분주수 및 분주량은 아래 <표3>과 같다.

자원종류	자원코드	자원상세	vial 수	volume / vial	비고
Blood-derived DNA(buffy coat)	DNA	@BLD	3	20ug, 20ug, rest	농도: 500ng/ul
Plasma	PLA	PRBL	10	300ul	
Serum	SER	PRBL	10	300ul	
Buffy coat	BUF	PRBL	2	300ul	
Lymphoblastoid Cell Line	LCL	PRBL	5	5-10X10 ⁶ Cells	
Urine-supernatant	URN	SUNT	15	1ml	
Sputum-supernatant	SPU	SUNT	5	100ul, 100ul, 100ul, 100ul, rest	
Sputum-pellet	SPU	PELT	4	200ul	TRIzol 처리한 상태
Mononuclear Cell	MNC	PRBL	5	200ul	TRIzol 처리한 상태
RNA-PBMC	RNA	@MNC	4	200ul	TRIzol 처리한 상태
RNA-monocyte	RNA	@MON	4	200ul	TRIzol 처리한 상태
RNA-CD8 ⁺	RNA	@CD8	4	200ul	TRIzol 처리한 상태
RNA-CD4 ⁺	RNA	@CD4	4	200ul	TRIzol 처리한 상태
DNA-PBMC	DNA	@MNC	2	200ul	TRIzol 처리한 상태
DNA-monocyte	DNA	@MON	2	200ul	TRIzol 처리한 상태
DNA-CD8 ⁺	DNA	@CD8	2	200ul	TRIzol 처리한 상태
DNA-CD4 ⁺	DNA	@CD4	2	200ul	TRIzol 처리한 상태

<표3>

4.1.4. 자원 바코드라벨 부착 방법

- 1.5ml EP tube : tube의 위쪽 평평한 면에 가로로 부착한다.
- 1.8ml cryotube : tube의 중간에 가로로 부착한다.
- 15ml conical tube : tube의 위쪽에 뚜껑을 가리지 않게 가로로 부착한다.



그림 2. 자원바코드 부착 예시

4.3. 기탁 일괄접수 파일 작성

- 4.3.1. 질병보건통합관리 시스템(<http://is.cdc.go.kr>)에 인증서 로그인 후 발행한 바코드 라벨을 부착한 자원은 제공자 기본정보 파일에 제공자 식별자⁽¹⁾, 식별번호⁽²⁾, 성명, 성별, 생년월일, 참여일자, 자원채취일자를 기본 정보로 기록한다.
- 4.3.2. 자원별로 실제 수집 후 최종 저장한 분주전자원량, 분주개수, 농도 및 순도, 세포수를 파일에 기록하고 완료 된 자원은 임시 박스에 자원별로 저장 후 저장고에 보관한다.
- 4.3.3. 국립중앙인체자원은행 인체자원 기탁지침 4.3.11항 자원박스 내 바이알 정렬방법에 따라 기탁할 박스 바코드라벨을 부착한 박스에 자원별로 분주개수만큼 정렬한다.
- 4.3.4. 질병보건통합관리 시스템에서 기탁할 자원별로 제공자식별자를 순서대로 넣어 일괄접수파일을 엑셀 파일로 다운받은 후 보관하고 있는 제공자 기본정보 파일과 vlookup함수를 사용하여 필수정보를 기록한다.
- 4.3.5. 기탁 박스에 정렬한 자원의 실물 정보와 일괄접수파일의 그룹번호, 시작박스 바코드번호, 마지막박스 바코드번호, 분주개수를 확인하고 수정한다.
- 4.3.6. Comment를 참고하여 매크로 보기를 통해 셀서식조정 및 유효성검사를 실행하여 잘못된 형식의 데이터를 조정한다.
- 4.3.7. 자원접수파일명을 [자원접수파일_(난치천식)오믹스 연구용 패널 자원 확보_자원명_000명_은행접수일자]로 한다.
- 4.3.8. 인체자원 기탁 및 접수 확인서(별지 제5호 서식), 국립중앙인체자원은행 인체자원기탁서(별지 제6호 서식)를 작성하여 자원접수파일과 함께 은행접수일자 일주일 전에 미리 자원별로 중앙은행 자원관리 담당자에게 메일로 송부하여 최종 검토한다. 이 후 수정 요청이 있을 경우 서류사항을 수정하여 재 송부한다.

- (1) [제공자식별자] 정보는 OM-AS-병원이니셜-0000(숫자4자리) 정보로 바코드 라벨 출력 후 질병보건 통합관리 시스템에서 다운 받은 그대로 엑셀 파일에 기록해서 관리함.
- (2) 식별번호는 병원이니셜(BC) + 병원 등록번호(1234567_(예)BC1234567 참고번호로 관리함.

4.4. 기탁 접수 자원 운송 준비

- 4.4.1. 기탁자원 운송수량 및 일정은 중앙은행 자원관리자와 미리 상호 협의하여 결정된다.(매주 화요일, 목요일 접수가능)
- 4.4.2. 최종 검토 완료 한 인체자원 기탁 및 접수 확인서(별지 제5호 서식)와 국립중앙인체자원은행 인체자원기탁서(별지 제6호 서식)를 출력하여 기탁자와 운송자란에 서명한다.
- 4.4.3. 자원운송용 아이스박스에 드라이아이스를 채워 인체자원이 최대한 냉동상태를 유지할 수 있도록 포장한다.
- 4.4.4. 직접 운송을 원칙으로 하며 중앙은행 자원관리자에게 기탁 자원을 인계하여 1차 검수를 진행한다.
- 4.4.5. 1차 검수결과 이상이 없는 경우 인체자원 기탁 및 접수 확인서(별지 제5호 서식)와 국립중앙인체자원은행 인체자원기탁서(별지 제6호 서식)에 중앙은행 자원관리자 서명을 받아 원본을 문서 보관함에 관리한다.

RA_SOP05. CD14+ 단핵구의 분리 SOP (Life Technology, Dynabead법; Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD14 Kit , Cat# 11367D)

준비물

- Magnet (DynaMag[™] portfolio).
- Tilting과 회전이 가능한 혼합기
- Isolation Buffer: PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free) supplemented with 0.1% BSA and 2 mM EDTA.

Note: BSA 대신 혈청알부민 (human serum albumin, HSA) 또는 2% FBS/FCS로 사용 가능함. EDTA 대신 0.6% sodium citrate 사용 가능함.

- 분리된 PBMC

실험 방법

본 지침은 5×10^7 의 PBMC를 기준으로 작성된 것이다. $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell에 대해서는 아래 표를 참고하여 세포 수에 따라 각 시약의 양을 증감한다.

Step	Step description	Volumes per 5×10^7 PBMC	Volumes per 5×10^8 PBMC
	Recommended tube size	5 mL	15 mL
	Recommended magnet	DynaMag [™] -5	DynaMag [™] -15
6	Cell Volume	500 μ L	5 mL
6	FlowComp [™] Human CD14 Antibody	25 μ L	250 μ L
10	Wash cells (Isolation Buffer)	2 mL	10 mL
11	Resuspend cells (Isolation Buffer)	1 mL	10 mL
12	FlowComp [™] Dynabeads [®]	75 μ L	750 μ L
14-20	Wash beads (Isolation Buffer)	2 x1 mL	2 x 10 mL
22	FlowComp [™] Release Buffer	1 mL	10 mL
27	Wash cells (Isolation Buffer)	2 mL	20 mL

I. Magnet bead의 세척

1. Dynabeads[®]가 들어있는 vial을 30초 이상 vortexing 하여 Magnet bead를 부유시킨다.
2. 필요한 부피의 Dynabeads를 새 용기에 담는다 (위 표 참조).
3. 동량의 isolation buffer를 첨가한 뒤 vortexing 하여 잘 섞는다. 최소 첨가량은 1ml이 되도록 한다.
4. 3.의 tube를 Magnet에 꽂아. 1분간 방치한 후, 꽂혀 있는 상태로 상층액을 버린다.
5. Magnet으로부터 tube를 분리한 후, 2에서 사용한 것과 동량의 isolation buffer를 첨가한다.

II. CD14+ 단핵구 분리

6. 분리를 위한 PBMC를 1×10^8 cells/ml이 되도록 isolation buffer에 부유시킨다.
7. Isolation buffer에 부유된 PBMC 500ul (즉, 5×10^7 cells)을 새로운 tube에 넣는다.
8. 25 ul의 FlowComp™ Human CD14 Antibody를 첨가한다.
9. 잘 섞은 뒤 10분간 4° C에서 배양한다.
10. 2 ml의 isolation buffer를 넣은 뒤, 수회 흔들여 잘 섞고 4° C, $350 \times g$ 에서 8분간 원심분리한 뒤, 상층액을 버린다. (세포 세척)
11. 세포 침전을 1ml의 isolation buffer에 재부유 시킨다.
12. 위 I.에서 준비한 세척된 FlowComp™ Dynabeads 75 μ L을 넣고 2-3초간 vortexing하여 섞는다.
13. 4° C에서 tilting and rotation 시키면서 15분간 배양한다.
14. 1 mL의 Isolation Buffer를 첨가한다. (만약 적은 수의 세포를 사용한 경우라도 1ml 이하로는 사용하지 않는다)
15. Bead가 부착된 세포를 2-3회 pipetting 하여 잘 섞는다. (또는 2-3초간 vortexing)
16. 15.의 tube를 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
17. Magnet에 장착된 채로 조심스럽게 CD14- cell이 포함된 상층액을 제거한다.
18. Bead와 결합된 세포가 남아있는 tube를 magnet에서 분리하여 1 mL의 Isolation Buffer를 첨가한 뒤, 15.과 같이 잘 섞는다.
19. 18.의 tube를 다시 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
20. Magnet에 장착된 채로 조심스럽게 CD14- cell이 포함된 상층액을 제거한다.
21. 바로 DNA/RNA등을 추출하려면 III.을 생략하고 IV.를 진행한다.

III. CD14+ 단핵구의 추출 (선택사항)

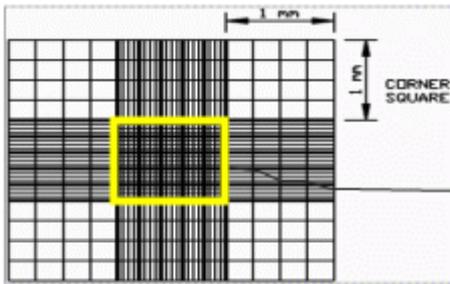
22. Magnet으로부터 tube를 분리한 후, 1ml의 release buffer를 첨가하여 bead가 부착된 세포를 재부유 시킨다.
23. 4° C에서 tilting and rotation 시키면서 10분간 배양한다. (4° C를 유지하는 것이 중요)
24. 거품이 생기지 않도록 주의하며 세포가 추출될 수 있도록 10회정도 pipetting한 뒤, magnet에 tube를 꽂아 2분간 방치한다.
25. Bead로부터 분리된 CD4+ 세포를 포함하는 상층액을 새로운 tube에 옮기고, 이 tube를 다시 magnet에 장착하여 1분간 방치한다 (잔여 bead의 제거)
26. 상층액을 다시 새로운 tube에 옮긴다.

IV. 분리된 CD14+ 세포 수의 측정 및 보관

27. 검체 10 μ l와 Trypan blue 10 μ l를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. →Neubaur counting chamber 사용

* Total Cell count = 25구획 세포수 x Total volume x 2 x 10⁴

* Viability (%) = 25구획 내 살아있는 세포수 ÷ 25구획 내 전체 세포수 × 100



cell count구역(25구획):가로x세로x높이
 $=1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 (0.1 \mu\text{l})$
 그러므로 25구획 세포수 $\times 10^4$ 이 1ml의
 세포수가 된다.

28. $350 \times g$ 에서 8분간 원심분리하여 상층액을 버리고, pellet에 적당량 (1×10^6 cell 당 TRIZol Reagent $800 \mu\text{l}$)의 Trizol을 넣어 녹인다.

29. 완전히 lysis 후 $200 \mu\text{l}$ 씩 EP tube 4개에 분주하여 -80°C 동결하여 보관한다.

[참고] $200 \mu\text{l}$ 의 Trizol 처리된 세포 (0.25×10^6 cell)당 약 500 ng 의 total RNA 및 $2 \sim 5 \text{ ug}$ 의 DNA 추출 가능

RA_SOP06. CD8+ 림프구의 분리 SOP (Life Technology, Dynabead법; Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD14 Kit , Cat# 11367D)

준비물

- Magnet (DynaMag[™] portfolio).
- Tilting과 회전이 가능한 혼합기
- Buffer 1: PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free) supplemented with 0.1% BSA and 2 mM EDTA, pH 7.4.

Note: BSA 대신 혈청알부민 (human serum albumin, HSA) 또는 2% FCS로 사용 가능함.
EDTA 대신 0.6% sodium citrate 사용 가능함.

- Buffer 2: RPMI 1640/1% FCS
- 분리된 PBMC

실험 방법

본 지침은 1×10^7 의 PBMC를 기준으로 작성된 것이다. $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell에 대해서는 아래 표를 참고하여 세포 수에 따라 각 시약의 양을 증감한다.

Step	Step description	Volumes per 5×10^7 PBMC	Volumes per 5×10^8 PBMC
	Recommended tube size	5 mL	15 mL
	Recommended magnet	DynaMag [™] -5	DynaMag [™] -15
6	Cell sample	1 mL	10 mL
8	Dynabeads CD8	25 μ L	250 μ L
12-17	Wash cells (Buffer 1)	1 mL \times 3	10 mL \times 3
18	Resuspend cells (Buffer 2)	100 μ L	1 mL
20	Release cells (DETACHaBEAD)	10 μ L	100 μ L
24	Collect residual cells (Buffer 2)	500 μ L \times 3	5 mL \times 3
26	Wash cells (Buffer 2)	Total of 4 mL	Total of 10 mL

I. Magnet bead의 세척

1. Dynabeads가 들어있는 vial을 30초 이상 vortexing 하여 Magnet bead를 부유시킨다.
2. 필요한 부피의 Dynabeads를 새 용기에 담는다 (위 표 참조).
3. 동량의 Buffer 1을 첨가한 뒤 vortexing 하여 잘 섞는다. 최소 첨가량은 1ml이 되도록 한다.
4. 3.의 tube를 Magnet에 꽂아. 1분간 방치한 후, 꽂혀 있는 상태로 상층액을 버린다.
5. Magnet으로부터 tube를 분리한 후, 2에서 사용한 것과 동량의 Buffer 1을 첨가한다.

II. CD8+ 림프구 분리

6. 분리를 위한 PBMC를 1×10^7 cells/ml이 되도록 Buffer 1에 부유시킨다.
7. Isolation buffer에 부유된 PBMC 1 mL (즉, 1×10^7 cells)을 새로운 tube에 넣는다.

8. 위 I.에서 준비한 25 ul의 세척된 Dynabead Human CD8 Antibody를 첨가한다.
9. 20분간 4° C에서 tilting 및 rotation하면서 배양한다.
10. 9.의 tube를 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
11. Magnet에 장착된 채로 조심스럽게 CD8- cell이 포함된 상층액을 제거한다.
12. Bead와 결합된 세포가 남아있는 tube를 magnet에서 분리하여 1 mL의 Buffer 1을 첨가한 뒤, 2-3회 pipetting (혹은 2-3초간 vortexing)하여 잘 섞는다.
13. 12.의 tube를 다시 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
14. Magnet에 장착된 채로 조심스럽게 CD8- cell이 포함된 상층액을 제거한다.
15. Bead와 결합된 세포가 남아있는 tube를 magnet에서 분리하여 1 mL의 Buffer 1을 첨가한 뒤, 2-3회 pipetting (혹은 2-3초간 vortexing)하여 잘 섞는다.
16. 15.의 tube를 다시 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
17. Magnet에 장착된 채로 조심스럽게 CD8- cell이 포함된 상층액을 제거한다.
18. Bead와 결합된 세포가 남아있는 tube를 magnet에서 분리하여 100 uL의 Buffer 2을 첨가한 뒤, 2-3회 pipetting (혹은 2-3초간 vortexing)하여 잘 섞는다.
19. 바로 DNA/RNA등을 추출하려면 III.을 생략하고 IV.를 진행한다.

III. CD8+ 림프구의 추출 (선택사항)

20. 10uL의 DETACHaBEAD를 첨가한다.
21. 45분간 상온에서 잘 섞으며 배양한다.
22. Magnet에 꽂고 1분간 방치한다.
23. 추출된 세포가 포함된 상층액을 새 tube에 옮긴다.
24. Magnet에서 tube를 분리하고 500ul의 buffer 2를 넣어 잘 섞은 뒤, 다시 Magnet에 꽂아 1분간 방치 후 상층액을 22.의 세포와 합친다.
25. 23.을 2회 반복한다.
26. 추출된 세포를 총 4ml이 되도록 Buffer 2를 첨가한다.
27. 400xg에서 6분간 원심분리하여 DETACHaBEAD를 제거한다.
28. 세포를 500ul의 Buffer 2에 부유시킨다.

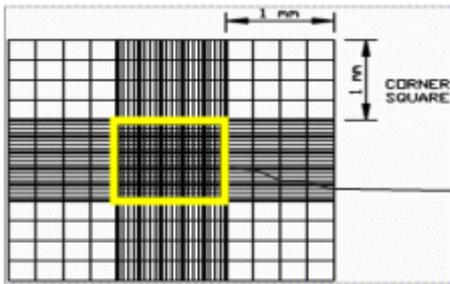
IV. 분리된 CD8+ 세포의 보관

29. 검체 10 μ l와 Trypan blue 10 μ l를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. →Neubaur counting chamber 사용

$$* \text{Total Cell count} = 25\text{구획 세포수} \times \text{Total volume} \times 2 \times 10^4$$

$$* \text{Viability}(\%) = 25\text{구획 내 살아있는 세포수} \div 25\text{구획 내 전체 세포수} \times 100$$

30. 350×g에서 8분간 원심분리하여 상층액을 버리고, pellet에 적당량 (1 x 10⁶ cell 당 TRIzol Reagent 800 μ l)의 Trizol을 넣어 녹인다.
31. 완전히 lysis 후 200 μ l씩 EP tube 4개에 분주하여 -80°C 동결하여 보관한다.



cell count구역(25구획):가로x세로x높이
 $=1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 (0.1 \mu\text{l})$
 그러므로 25구획 세포수 $\times 10^4$ 이 1ml의
 세포수가 된다.

[참고] 200 μl 의 Trizol 처리된 세포 (0.25×10^6 cell)당 약 500 ng의 total RNA 및 2
 ~ 5 μg 의 DNA 추출 가능

RA_SOP07. CD4+ 림프구의 분리 SOP (Life Technology, Dynabead[®]법; Dynabeads[®] Untouched^{™™} Human CD4 T Cells, Ct# 11346D/11352D)

준비물

- Magnet (DynaMag[™] portfolio).
- Tilting과 회전이 가능한 혼합기
- Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS)/Fetal Calf Serum (FCS).
- 완충용액: PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free) supplemented with 0.1% BSA and 2 mM EDTA.

Note: BSA 대신 혈청알부민 (human serum albumin, HSA) 또는 2% FBS/FCS로 사용 가능함. EDTA 대신 0.6% sodium citrate 사용 가능함.

- 분리된 PBMC

실험 방법

본 지침은 5×10^7 의 PBMC를 기준으로 작성된 것이다. $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell에 대해서는 아래 표를 참고하여 세포 수에 따라 각 시약의 양을 증감한다.

Step	Step description	Volumes per 5×10^7 PBMC	Volumes per 5×10^8 PBMC
	Recommended tube size	5 mL	15 mL
	Recommended magnet	DynaMag [™] -5	DynaMag [™] -15
6	Cell Volume	500 μ L	2 mL
8	FBS/FCS	100 μ L	400 μ L
9	Antibody Mix	100 μ L	400 μ L
11	Wash cells (Isolation Buffer)	~4 mL	~10 mL
12	Resuspend cells (Isolation Buffer)	500 μ L	2 ml
13	Depletion Dynabeads	500 μ L	2 ml
15-21	Increase volume (Isolation Buffer)	$2 \times \sim 4$ mL	$2 \times \sim 10$ mL

I. Magnet bead의 세척

1. Dynabeads[®]가 들어있는 vial을 30초 이상 vortexing 하여 Magnet bead를 부유시킨다.
2. 필요한 부피의 Dynabeads[®]를 새 용기에 담는다.
3. 동량의 isolation buffer를 첨가한 뒤 vortexing 하여 잘 섞는다.
4. 3.의 tube를 Magnet에 꽂아. 1분간 방치한 후, 꽂혀 있는 상태로 상층액을 버린다.
5. Magnet으로부터 tube를 분리한 후, 2에서 사용한 것과 동량의 isolation buffer를 첨가한다.

II. CD4+ 림프구 분리

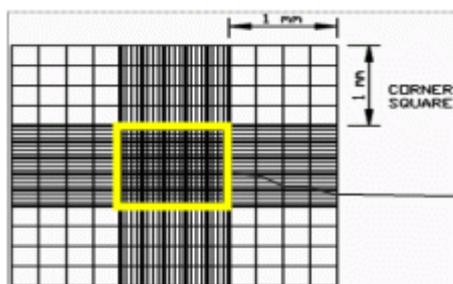
6. 분리를 위한 PBMC를 1×10^8 cells/ml이 되도록 isolation buffer에 부유시킨다.
7. Isolation buffer에 부유된 PBMC 500ul (즉, 5×10^7 cells)을 새로운 tube에 넣는다.
8. 100 ul의 heat-inactivated FBS (또는 FCS)를 첨가한다.
9. 100 ul의 antibody mix를 첨가한다.
10. 잘 섞은 뒤 20분간 4°C 에서 배양한다.
11. 4 ml의 isolation buffer를 넣은 뒤, 수회 흔들어 잘 섞고 4°C , $350 \times g$ 에서 8분간 원심분리한 뒤, 상층액을 버린다. (세포 세척)
12. 세포 침전을 500 ul의 isolation buffer에 재부유 시킨다.
13. 위 I.에서 준비한 세척된 Dynabeads 500 μL 을 넣는다.
14. 상온에서 tilting and rotation 시키면서 15분간 배양한다.
15. 4 mL의 Isolation Buffer를 첨가한다. (만약 적은 수의 세포를 사용한 경우라도 1ml 이하로는 사용하지 않는다)
16. Bead가 부착된 세포를 10회이상 pipetting 하여 잘 섞는다. (pipet tip 끝을 잘라 사용하며, 거품이 나지 않도록 주의한다)
17. 16.의 tube를 magnet에 꽂아 2분간 방치한다. Untouched human CD4+ T cells이 있는 상층액을 새 tube에 옮겨 담는다.
18. Bead와 결합된 세포가 남아있는 tube를 magnet에서 분리하여 4 mL의 Isolation Buffer를 첨가한 뒤, 16.과 같이 pipet으로 잘 섞는다.
19. 18.의 tube를 다시 magnet에 꽂아 2분간 방치한다.
20. Untouched human CD4+ T cells이 있는 상층액을 17의 상층액과 합친다.
21. 20.의 tube를 다시 magnet에 꽂아 2분간 방치한 후 상층액을 새 tube로 옮긴다.

III. 분리된 CD4+ 세포의 보관

22. 검체 $10\mu\text{l}$ 와 Trypan blue $10\mu\text{l}$ 를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. →Neubaur counting chamber 사용

* Total Cell count = 25구획 세포수 x Total volume x 2×10^4

* Viability (%) = 25구획 내 살아있는 세포수 ÷ 25구획 내 전체 세포수 × 100



cell count구역(25구획):가로x세로x높이
 $= 1 \times 1 \times 0.1 \text{mm} = 0.1 \text{mm}^3 (0.1 \mu\text{l})$
 그러므로 25구획 세포수 $\times 10^4$ 이 1ml의
 세포수가 된다.

23. $350 \times g$ 에서 8분간 원심분리하여 상층액을 버리고, pellet에 적당량 (1×10^6 cell 당 TRIZOL Reagent $800\mu\text{l}$)의 Trizol을 넣어 녹인다.
24. 완전히 lysis 후 $200\mu\text{l}$ 씩 EP tube 4개에 분주하여 -80°C 동결하여 보관한다.

[참고] 200 ul의 Trizol 처리된 세포 (0.25×10^6 cell)당 약 500 ng의 total RNA 및 2 ~ 5 ug의 DNA 추출 가능

RA_SOP08. Trizol로부터 Total RNA의 추출

준비물

※ RNA 추출에 사용되는 모든 기구는 RNase를 다음과 같이 제거하여 사용해야 한다.

- **DEPC-treated water**: 1L의 dH₂O에 1ml의 DEPC를 첨가하여 16시간동안 chemical hood bench에서 stirring bar를 이용하여 혼합시킨다.
- **PBS 및 시약**: DEPC-treated water를 아용하여 만든다.
- **pH meter electrode** : 10% SDS 처리 후 DEPC water에 1시간 담그기
- **Stirring bar** : 10% SDS 처리 후 DEPC water에 담가두기
- **Bottle뚜껑** : 10% SDS 처리 후 DEPC water에 O/N
- **Tube 및 pipette tip**: DEPC-water에 잠기도록 담가 stirring bar를 이용하여 저으며 O/N한 후, 물기를 털어 제거하고 멸균하여 말려서 사용
- **Automatic pipette**: 10% SDS를 묻힌 거즈를 사용하여 닦아 사용한다 (매 실험시마다 반복하여 처리)
- 항상 RNase-free globe를 착용하고 실험한다.

실험 방법

1. Trizol에 lysis된 세포(혹은 조직)을 준비한다.
2. 총 1ml이 되도록 trizol을 첨가한다.
3. 5분간 얼음위에 방치하여 균질화 시킨다.
4. Trizol의 1/5 volume (즉, 1ml trizol 당 200 ul)의 chloroform을 첨가하고 30회 tube의 상하를 뒤집어 섞는다.
5. 10~15분간 얼음에서 incubation 한다.
6. 4°C, 14000 rpm에서 15분간 원심분리한다.
7. 투명한 상층액을 RNase-free 1.5 ml에 옮긴다. 이때, 흰색 중간층을 건드리지 않도록 조심한다. pipette은 125ul로 맞추어 여러번에 나누어 옮기는 것이 좋으며, 이때 얼만큼의 상층액을 옮겼는지 부피를 대략 계산한다 (대략 400~500ul정도가 된다).
8. 옮긴 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 30회정도 tube의 상하를 뒤집어 잘 섞는다.
9. 10분간 얼음에서 incubation 한다.
10. 4°C, 14000 rpm에서 10분간 원심분리한다.
11. 상층액을 pipette으로 최대한 제거한다.
12. RNA 침전물에 70% DEPC-treated EtOH 1ml을 넣는다. 이때, 가급적 RNA 침전물이 움직이지 않도록 조심한다.
13. 4°C, 9000 rpm에서 5분간 원심분리한다.
14. 상층액을 pipette으로 최대한 (EtOH 방울이 남아 있지 않도록) 제거한다. 이때 가급적

RNA 침전물이 움직이지 않도록 주의한다.

15. tube 뚜껑을 열어놓고 공기중에서 RNA 침전을 건조시킨다.
16. 30ul의 DEPC-water (혹은 RNase inhibitor가 첨가된 증류수)를 넣고 60℃에서 10~15분간 배양하여 RNA를 녹인다.
17. RNA 용액의 260nm, 280nm, 230nm 에서의 흡광도를 측정한다. 이때, 1000배 희석하여 spectrophotometer를 이용하거나 nanodrop을 이용한다.
18. Spectrophotometer 이용시 다음 식을 이용하여 RNA 농도를 결정한다.
 - $A_{260} \text{ OD} \times 40 \times \text{dilution factor} = \text{Concentration of total RNA (ng/ul)}$
 - $\text{Total amount of RNA} = \text{Concentration of total RNA (ng/ul)} \times \text{total volume of final RNA solution}$
19. Tube에 label하고 -80℃에 보관한다. (시료는 가급적 3개월 이내에 사용한다)

RA_SOP09-1. Trizol로부터 genomic DNA의 추출

준비물

- Back extraction buffer (BEB)

250 ml BEB 조성(독성이 있으므로 주의하여 취급)

- 118.2 g of Guanidine Thiocyanate (FW 118.2) = 4 M
- 3.68 g of Sodium Citrate NaCi (FW 294.1) = 50 mM
- 30.29 g of Tris (free base)Tris (FW 121.14) = 1M

- 1x TE buffer
- Isopropanol
- 70% ethanol

실험 방법

1. RNA 층을 취하고 난 중간층 및 유기용매층을 4° C, 12,000 × g에서 5분간 원심분리한다.
(RNA 분리 보관 SOP 참조)
2. 조심스럽게 남아있는 RNA 상층액 (aqueous phase)을 제거한다. (최대한 제거하여 최종 DNA의 RNA 오염을 방지한다)
3. 0.5 ml의 BEB (back extraction buffer)을 tube에 첨가한다.
4. 최소 3분간 inversion 하거나 10분간 shaker에 올려 잘 섞는다.
5. 상온에서 12,000 × g로 30분간 원심분리한다.
6. 상층을 최대한 제거한다. (Protein 층)
7. 0.4 ml의 isopropanol 을 첨가하여 상온에서 5분간 섞어주며 배양한다.
8. 4° C, 12,000 × g에서 15분간 원심분리한다.
9. 상층액을 제거한 뒤, DNA 침전에 0.5ml의 70% ethanol을 첨가하여 inversion 한다
(DNA 침전의 세척)
10. 4° C, 12,000 × g에서 15분간 원심분리한다.
11. Ethanol 층을 제거하고 pellet을 완전히 말린다 (원심분리기로 말리지 않는다).
12. DNA pellet에 400 ul의 1× TE buffer를 첨가하여 DNA를 녹이고 농도를 측정한다.
[참고1] 10⁷ 세포로부터 분리된 DNA 침전에 300~600 ul을 첨가할 경우, 농도는 약 50~100 ug/ul 가량이 된다.

RA_SOP09-2. Qiazol로부터 genomic DNA의 추출

준비물

- 75% ethanol
- 100% ethanol
- 0.1 M sodium citrate solution (0.1 M sodium citrate in 10% ethanol [p.a.])
- 8 mM NaOH
- 0.1 M HEPES (free base)
- 100 mM EDTA

실험 방법

1. RNA가 함유된 상층을 완전히 제거한다. 최대한 제거하여 최종 DNA의 RNA 오염을 방지한다. (RNA 분리 보관 SOP 참조)
2. 남은 중간층과 유기용매층에 0.3 ml의 100% ethanol을 첨가한 뒤 inversion으로 잘 섞는다.
3. 시료를 상온에서 3분간 방치한다.
4. 4° C, 2000 × g에서 2 분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨다.
5. 상층액을 제거한다 (phenol/ethanol층; 단백 함유)
6. DNA 침전에 1 ml의 sodium citrate solution를 첨가하여 30분간 상온에서 방치한다. 이때, 5분마다 inverting 해준다.
7. 4° C, 2000 × g에서 5 분간 원심분리하고 상층액을 제거한다.
8. 6 ~7의 과정을 2회 반복한다.
9. DNA pellet에 1 ml의 75% ethanol을 첨가한다 (이 상태로 4° C에서 3개월간 보관 가능하다)
10. 20분간 상온에서 방치한다. 이때, 5분마다 inverting 해준다.
11. 4° C, 2000 × g에서 5 분간 원심분리하고 상층액을 제거한다. (남아있던 Qiazol의 붉은 색이 사라진다)
12. 5~15분간 방치하여 DNA 침전을 말린다 (원심분리기로 말리지 않는다).
13. DNA 침전물에 8 mM NaOH을 첨가하여 원하는 농도가 되도록 녹인다.
[참고1] 10⁷ 세포로부터 분리된 DNA 침전에 300~600 ul을 첨가할 경우, 농도는 0.2~0.3 ug/ul 가량이 된다.
[참고2] DNA 침전을 바로 TE buffer에 녹여도 무방하나, 잘 녹지 않는다.
[참고3] DNA pellet을 NaOH에 녹일 경우, 물에 녹지않는 gel 상태의 물질이 보이기도 한다. 이는 대부분 세포막 성분이다.
14. 상온에서 14,000 × g로 10 분간 원심분리하고, 상층액을 새 tube에 옮긴다.

15. DNA 시료를 중화하기 위해 500ul의 NaOH당 60 μ l의 0.1 M HEPES 과 5.5 μ l의 100 mM EDTA (final concentration 1 mM)를 첨가한다. (8 mM의 NaOH의 pH는 약 9이며, 중화 후 pH가 7~8 사이가 된다).
16. 추출된 DNA 용액은 4° C 혹은 -20° C에서 장기 보관이 가능하다.

RA_SOP10. Histopaque를 이용한 말초혈액단핵구의 분리 보관

준비물

- 400xg가 가능하며 swinging bucket rotor가 장착된 원심분리기
- plastic, conical tube (50mL, 15 mL)
- Isotonic phosphate buffered saline solution (PBS) 또는 appropriate cell culture medium

실험 방법

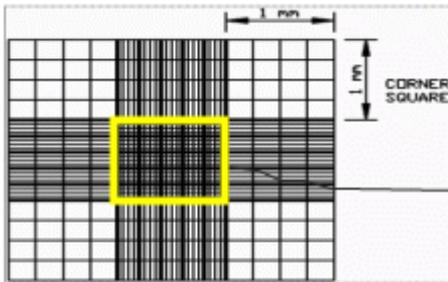
1. 50mL conical centrifuge tube에 10 mL의 Histopaque-1077를 넣고 상온으로 옮긴다. 만약 혈액량이 적다면 15mL tube에 3mL의 Histopaque-1077을 넣는다.
2. Pasteur pipette을 이용하여 Histopaque-1077층 위에 조심스럽게 전혈 30ml을 올린다. 만약 15ml tube를 사용한다면 전혈 3~5ml을 올린다.
3. 400 x g, 상온에서 정확히 30분간 원심분리한다. 만약 4° C에서 원심분리할 경우 cell clumping이 생겨 수율이 떨어질 수 있다.
4. 단핵구가 포함된 중간층 위 0.5cm만 남도록 Pasteur pipette을 이용하여 상층액을 제거한다.
5. Pasteur pipette을 이용하여 조심스럽게 중간 세포층을 새로운 conical centrifuge tube로 옮긴다.
6. 10 mL의 isotonic PBS (혹은 세포배양 배지)를 첨가한 뒤 Pasteur pipette으로 잘 섞는다.
7. 250 xg에서 10분간 원심분리한다.
8. 상층액을 버린다.
9. 5 mL의 isotonic PBS (혹은 세포배양 배지)를 첨가한 뒤 Pasteur pipette으로 잘 섞는다.
10. 250 xg에서 10분간 원심분리한다.
11. 8.~10의 과정을 반복하여 세포를 세척한 뒤, 0.5mL의 isotonic PBS (혹은 세포배양 배지)를 첨가한다.

분리된 세포 수의 측정 및 보관

1. 검체 10 μ l와 Trypan blue 10 μ l를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. →Neubaur counting chamber 사용

* Total Cell count = 25구획 세포수 x Total volume x 2 x 10⁴

* Viability (%) = 25구획 내 살아있는 세포수 ÷ 25구획 내 전체 세포수 × 100



cell count구역(25구획):가로x세로x높이
=1x1x0.1mm=0.1mm³(0.1μl)
그러므로 25구획 세포수x10⁴이 1ml의
세포수가 된다.

2. 1×10^6 cell 당 800μl의 Trizol을 넣어 녹인 뒤, 200μl 씩 분주하여 -80℃ 동결하여 보관하거나, 후속 CD14+/CD8+/CD4+ 세포등의 분리에 사용한다.
3. 혹은 세포를 그대로 보관하고자 한다면, 일반적인 세포주 보관 방법 (DMSO 첨가 및 지연 동결법)으로 동결하여 액체 질소 tank에 보관한다.

RA_SOP11. Vacutainer CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate를 이용한 말초혈액단핵구의 분리 보관

준비물

- 15 mL Plastic Conical Centrifuge Tubes
- Pasteur Pipettes.
- 1500 RCF (Relative Centrifugal Force) 이상이 가능한 Swinging Bucket Rotor가 장착된 원심분리기

실험 방법

12. BD Vacutainer CPT™ Tube 를 상온에 꺼내 놓는다.
13. 1.의 Tube를 이용해 채혈한다.
14. 채혈 후 2시간 이내로 원심분리하는 것이 좋으며, 원심분리 전까지 상온에 똑바로 세워 놓는다.
15. 상온에서 1500~1800 RCF로 20분간 원심분리한다.
16. 단핵세포와 혈소판이 혈장층 아래에 형성되었는지 확인하고, tube를 열어 세포 층이 흘러지지 않게 조심하며 혈장의 반을 Pasteur pipette으로 덜어 버린다. Pasteur pipette 으로 세포층을 15 mL conical centrifuge tube에 옮긴다.

[선택사항]

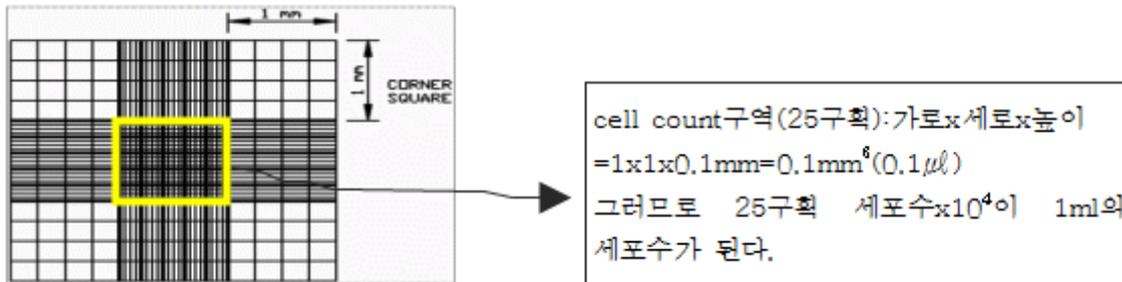
- 만약 원심분리 후 24시간 이내로 시료를 저장하거나 운송하고자 한다면, tube를 열지 않고 5~10회 정도 inverting 하여 세포와 plasma를 섞는다. 이후 tube를 열어 gel 층 위의 모든 세포층을 다른 용기로 옮겨 원심분리한다.
17. 15ml이 되도록 PBS를 채운다.
 18. 5회 inverting 하여 세포와 PBS를 섞는다.
 19. 300 RCF에서 15분간 원심분리한 뒤, 세포 침전에 조심하며 최대한 많은 상층액을 버린다.
 20. 세포 침전을 손가락으로 톡톡 치거나 vortex하여 풀어준다.
 21. PBS를 10ml까지 채우고 5회 inverting 하여 섞는다.
 22. 300 RCF에서 10분간 원심분리한 뒤, 세포 침전에 조심하며 최대한 많은 상층액을 버린다.
 23. 세포 침전을 적절한 배지(RPMI1640등) 0.5 ml에 풀어준다.

분리된 세포 수의 측정 및 보관

1. 검체 $10\mu\text{l}$ 와 Trypan blue $10\mu\text{l}$ 를 Plate에서 잘 혼합 후 Total Cell count 와 Viability 를 측정한다. →Neubaur counting chamber 사용

* Total Cell count = 25구획 세포수 x Total volume x 2 x 10^4

* Viability (%) = 25구획 내 살아있는 세포수 ÷ 25구획 내 전체 세포수 × 100



2. 1×10^6 cell 당 $800\mu\text{l}$ 의 Trizol을 넣어 녹인 뒤, $200\mu\text{l}$ 씩 분주하여 -80°C 동결하여 보관하거나, 후속 CD14+/CD8+/CD4+ 세포등의 분리에 사용한다.

3. 혹은 세포를 그대로 보관하고자 한다면, 일반적인 세포주 보관 방법 (DMSO 첨가 및 지연 동결법)으로 동결하여 액체 질소 tank에 보관한다.

RA_SOP12. HumanHT-12 Beadchip를 이용한 유전자발현 실험방법

1. 준비사항

- Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit (R11490, Life tech), Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (AMIL1791, Life tech), Illumina Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Kit (Illumina), Illumina Hybridization equipment (Hyb Chamber, Gasket, Insert, Slide Rack 등), 100% Ethanol, Fluorometer (Victor2 등), Thermal Cycler, Oven (Rocker), Shaker, 0.5 ml Tube, 1.5 ml Tube 등

2. Quantification and qualification of total RNA

1) Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit을 이용한 Total RNA 정량

- 키트의 20x TE를 1X working 용액으로 만든다.
- 키트의 Standard RNA를 1X TE용액을 이용하여 2 ng/ul, 500 ul로 희석 및 aliquot한다.
- 키트의 Ribogreen 시약을 1X TE용액을 이용하여 working 용액 (200배 희석)을 만든다.
- 96 black OptiPlate (OptiPlate-96)를 이용하여 다음의 비율로 Standard Curve 및 샘플 측정용 시약을 분주한다.
- **0 ~ 100 ng/ul 범위의 DNA 희석 조건 (2반복 가능한 양)**

Volume(μl) of TE	Volume (μl) of RNA (2ng/ul)
0	100
50	50
90	10
98	2
100	0

- RNA 샘플을 1000배 희석한다. (Serial Dilution)
- 희석된 RNA Sample 100 ul를 반복하여 96 black OptiPlate Well에 분주한다.
- Ribogreen Working 용액을 100 ul씩 분주하고, 섞어준 후 5분간 상온의 어두운 곳에서 방치한다.
- Fluorometer를 이용하여 농도를 측정한다.
- 농도 측정 후 Standard RNA의 형광값을 DNA량을 환산한다. (최소 40ng/ul이상이 되는 샘플만 실험가능)

2) Qualification of total RNA

- * 준비사항: Aragose, 10X MOPS Buffer, 37% Formaldehyde 용액, RNA Loading Buffer (C-9032, Bioneer), EtBr (10 mg/ml)

- 1% Aragose Gel을 만든다. (100 ml기준 - 72 ml DW, 10 ml 10X MOPS Buffer, 18 ml 37% Formaldehyde, 37% Formaldehyde가 유독하므로 37% Formaldehyde를 제외한 용액을 끓인 후, 후드 안에서 넣어 식히고 Gel Casting Tray에 부어준다.)
- Gel Tank에 1X MOPS Buffer를 부어준다.
- Gel이 완성 되었으면 전기영동 Tank에 장착한다.
- RNA Loading Buffer Mix를 만든다 (0.35 ul EtBr / 9.65 ul RNA Gel Loading Buffer)
- 10 ul RNA Mixture에 5 ug RNA를 분주하여 67°C Thermal Cycler에서 10분간 방치하고 5분간 얼음에 둔다.
- Gel에 Loading 후 100v, 20분정도 전기영동을 한다.
- RNA Band의 비율이 28S:18S=2:1 정도 되는지 확인한다. (Ribosomal RNA Band가 확인 불가할 경우 Chip 실험 불가)

3. Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit을 이용한 cRNA 증폭

1) cDNA 합성

- 키트의 T7 Oligo(dT) Primer, 10X First Strand Buffer, dNTP Mix, RNase Inhibitor, ArrayScript를 이용하여 Reverse Transcription Master Mix (RT mix)를 만든다. (계산법은 www4.appliedbiosystems.com/tools/illumina 참조)
- 샘플 당 총 500 ng (11 ul)의 total RNA를 0.2-0.5 ml tube에 분주한다.
- RT mix를 9 ul를 분주하면서 섞어준다.
- 42°C에서 2시간동안 배양한다.
- 키트의 Nuclease-free Water, 10X Second Strand Buffer, dNTP Mix, DNA Polymerase, RNase H를 이용하여 Second Strand Master Mix (SS mix)를 만든다.
- SS mix를 80 ul 분주하고 섞어준다.
- 16°C에서 2시간동안 배양한다. 그리고 그동안 DW를 50-55°C에서 보관한다.
- 키트의 cDNA 필터 튜브를 세팅한다.
- 새로운 1.5 ml tube에 배양된 Mixture를 옮기고, 키트의 cDNA Binding Buffer 250 ul를 넣고 섞어준 후 필터 튜브에 옮긴다.
- 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- 필터를 통과한 액을 버리고 필터위로 Wash Buffer 500 ul를 넣는다.
- 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- 필터를 통과한 액을 버리고 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- cDNA를 담은 새로운 1.5 ml Tube를 필터튜브에 장착한다.
- Oven에 보관된 DW를 필터에 10 ul 분주하고 2분간 상온에 배양한다.
- 10,000g에서 1.5분간 원심분리를 한다.
- 다시 DW를 10 ul분주하고 1,000g에서 2분간 원심분리를 한다.
- 총 Volume이 17.5 ul정도가 되는지 확인하고 부족할 경우 채워 넣는다.
- 키트의 T7 10X Reaction Buffer, T7 Enzyme Mix, Biotin-NTP Mix를 이용하여 IVT

Master Mix를 만들고 7.5 ul를 분주 후 섞어준다.

- 37°C Oven에서 16시간정도 배양하여 cRNA를 만든다. (1일차 종료)
- 75 ul DW를 넣어주고 조심스럽게 피펫팅을 한다. (-20°C에서 2-3일간 보관가능)

2) cRNA 정제

- DW를 50-55°C에서 보관한다.
- cRNA 필터 튜브를 세팅한다.
- 키트의 cRNA Binding Buffer를 350 ul 넣어주고 Vortexing 후 Spin Down한다.
- 250 ul의 100% Ethanol를 넣어준 후 바로 섞어주고 즉시 필터에 옮긴다.
- 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- 필터를 통과한 액을 버리고 Wash Buffer 650 ul를 필터에 넣어준다.
- 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- 필터를 통과한 액을 버리고 10,000g에서 1분간 원심분리를 한다.
- 키트의 제공된 cRNA Collection Tube를 장착후 DW를 50-100 ul 분주한다.
- 2분간 상온에서 방치 후 1.5분간 10,000g에서 원심분리한다.
- Ribogreen이나 Qubit 등을 이용하여 cRNA를 정량한다.

4. Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization (Illumina Kit)

1) Hybridization Beadchip

- 키트의 HYB, HCB를 58°C에서 10분간 보관 후 상온에서 식힌다. (Oven은 켜 놓는다.)
- 750 ng (5 ul)의 cRNA를 준비하고 0.2 ml Tube에 분주한다.
- 10 ul의 HYB를 넣어주고 섞어준 후 65°C Thermal Cycler에서 5분간 방치한다.
- 200 ul의 HCB를 Hyb Chamber의 Reservoir에 분주한다.
- HYB Mixed cRNA를 Vortex후 Spin Down 후 상온에서 식힌다.
- 1x High-temp Wash Buffer를 준비한다. (키트의 10x Stock 50 ml과 450 ml DW의 혼합으로 준비)
- HumanHT-12 Expression BeadChip을 개봉 후 Insert에 장착한다.
- HYB Mixed cRNA 15 ul를 Chip에 분주 후 Chamber에 장착하고, 58°C, Rocker 속도는 5에 맞추어 18시간동안 배양한다. (2일차 종료)

2) Beadchip 세척 및 형광염색

- 키트의 E1 Buffer를 꺼내 놓는다.
- E1BC 용액을 만든다. (7.5 ml E1BC buffer / 2.5 L DW)
- 1x High-Temp Buffer를 적당한 용기에 붓는다. (250 ml)
- Chip 커버를 벗길만한 공간에 E1BC용액을 붓고 공기에 닿지 않게 커버를 벗긴후 slide rack에 옮긴 후 바로 1x High-Temp buffer에 담겨 10분간 배양한다.
- 다른 용기에 250 ml E1BC용액을 붓는다.

- 10분이 지난 후 Slide Rack을 E1BC용액에 옮긴 후 Shaker에서 용액이 넘치지 않을 만큼의 속도로 5분간 혼합한다.
- 다른 용기에 250 ml 100% Ethanol을 준비한다.
- Slide Rack을 Ethanol용기에 옮긴 후 Shaker에서 용액이 넘치지 않을 만큼의 속도로 10분간 혼합한다.
- 3 ml의 E1 Buffer에 Cy3-Streptavidin 3 ul (1 mg/ml)을 넣어 준비한다.
- 새로운 250 ml E1BC용액을 준비한다.
- 10분이 지난 후 E1BC용기에 옮겨 2분간 Shaker에서 용액이 넘치지 않을 만큼의 속도로 방치한다.
- 키트의 Wash Tray에 E1 Buffer 4 ml을 분주한다.
- 반응이 끝난 Chip을 E1 Tray에 장착한다.
- 상온의 Oven에 놓은 후 Rocker 속도를 12에 맞추어 10분간 반응한다.
- 이전에 준비한 E1-Cy3 용액 2 ml을 Wash Tray에 분주한다.
- 10분이 지난 후 준비된 E1-Cy3 Tray에 옮기고 다시 Oven에 넣어 Rocker 속도를 12에 맞추어 10분간 반응한다.
- 새로운 250 ml E1BC용액을 준비한다.
- 10분이 지난 후 Slide Rack을 E1BC용액에 옮겨 Shaker에서 용액이 넘치지 않을 만큼의 속도로 5분간 반응한다.
- 5분 후 275g에서 4분간 원심분리한다.
- Chip의 Decode File을 스캐너에 저장한다.
- Chip을 스캐너에 장착 후 저장폴더를 설정 후 스캔을 시작한다.

유전자발현 통계분석 (Illumina HumanHT-12 BeadChip)

1. Gene expression 원본 데이터 추출

- 1) 칩 scanning 결과물 (*.idat)과 manifest file (제조사 제공 probe 정보)을 Illumina에서 제공하는 GenomeStudio software로 읽어 'Project' 파일을 만든 후 Expression level을 추출함

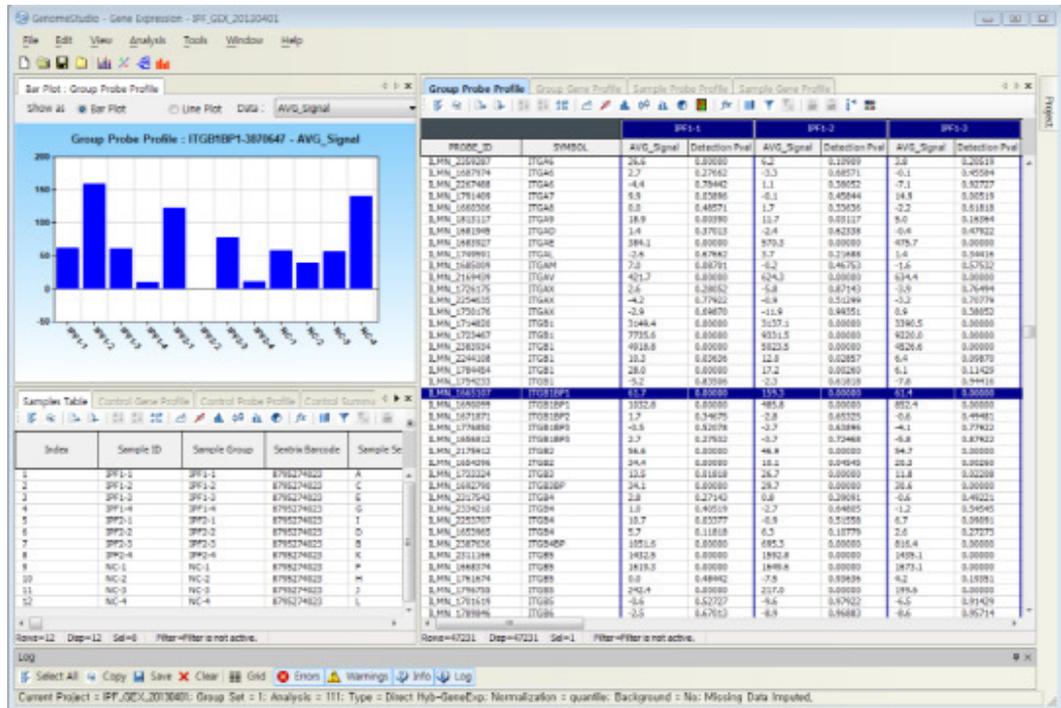


그림. GenomeStudio를 이용한 HT-12 chip 분석 이미지

- 2) GenomeStudio software는 Illumina 칩자료 분석을 위한 전용 software로서 데이터 추출 및 가공에 사용함. 'AVG_Signal' (expression level), 'Detection P-value' (expression 여부 확인값)을 제공함
- 3) GenomeStudio에서 GeneID, AVG_Signal, Detection P-value 등의 원본값을 text 또는 Excel 파일로 추출함. 이 때 Probe 기준 또는 Gene 기준으로 추출이 가능함. 일반적으로 하나의 유전자에 여러개의 probe가 제작되어 있기 때문에 Probe 기준으로 추출하면 유전자 평균값은 따로 계산해야 하면, Gene 기준으로 추출하면 여러 Probe의 평균값을 바로 분석에 활용할 수 있음. 분석의 목적에 맞게 적절히 선택함
- 4) HumanHT-12 chip의 probe는 약 47K이며, Gene은 약 35K의 정보를 가짐

2. 데이터 가공 (기초분석)

- 1) Expression chip 데이터는 Avg_signal과 Detection P-value로 구성됨. 아래 표를 보면

Avg_signal이 “-” 값을 갖거나 값이 매우 낮은 것은 P-value가 0.05 이상임을 확인할 수 있는데, 이것은 Expression되지 않음을 의미함. 통계분석시에 “-” 값이나 1 이하의 값은 fold change 등의 분석이 불가능하기 때문에 분석자의 판단에 따라 삭제하거나 변환된 값을 사용함

표. Expression Chip 데이터의 기본구조

Gene	S1_Avg_signal	S1_Det_P-val	S2_Avg_signal	S2_Det_P-val	S3_Avg_signal	S3_Det_P-val
7A5	-2.86	0.697	4.39	0.188	9.83	0.030
A1BG	8.56	0.018	7.91	0.055	7.05	0.195
A1CF	6.05	0.018	-1.91	0.698	-0.53	0.556
A26C3	-2.94	0.819	-1.46	0.550	5.00	0.146
A2BP1	-0.46	0.640	-3.20	0.813	-1.23	0.660
A2LD1	44.95	0.000	53.63	0.000	67.60	0.000
A2M	-4.27	0.781	70.60	0.000	47.01	0.000
A2ML1	-0.22	0.505	-5.00	0.829	-3.49	0.742
A3GALT2	0.26	0.430	1.46	0.261	-2.33	0.706
A4GALT	89.29	0.000	256.66	0.000	137.59	0.000
A4GNT	14.46	0.016	18.55	0.001	9.06	0.045
AAA1	-0.58	0.606	2.20	0.144	-0.04	0.381
AAAS	30.53	0.000	32.90	0.000	37.77	0.000
AACS	50.67	0.000	38.50	0.000	29.91	0.000
AACSL	20.30	0.003	22.06	0.000	11.15	0.027
AADAC	-0.41	0.517	1.41	0.365	0.14	0.435
AADACL1	285.40	0.000	140.45	0.000	162.26	0.000
AADACL2	3.98	0.197	-2.97	0.665	-7.31	0.934
AADACL3	4.10	0.192	-1.96	0.590	-8.04	0.951
AADACL4	7.39	0.073	3.19	0.243	3.58	0.214
AADAT	18.98	0.229	20.90	0.208	20.34	0.131
AAGAB	103.38	0.000	110.58	0.000	133.72	0.000
AAK1	2.58	0.358	3.99	0.352	7.12	0.047
AAMP	177.85	0.000	167.77	0.000	195.49	0.000
AANAT	-3.61	0.756	-9.15	0.974	0.18	0.431
AARS	1243.02	0.000	1490.21	0.000	1556.55	0.000
AARS2	140.03	0.000	60.11	0.000	63.72	0.000
AARSD1	127.71	0.000	106.99	0.000	134.40	0.000
AASDH	54.25	0.000	73.53	0.000	50.01	0.000

- 2) 유전자 전체가 Detection P-value 0.05 이상이면 해당 유전자는 삭제하고 분석함. 각 유전자 기준으로 하나의 샘플이라도 Detection P-value 0.05 이하인 것이 있다면 해당 유전자는 분석에 포함하되, Avg_signal을 보정함. Avg_signal 1 이하의 값을 변환하는 것은 정해진 기준은 없으나 보통 1 이하를 모두 1로 맞추거나, 0.5 이하를 0.5로 하거나... 다양한 방법이 있음. 여기서는 0.5 이하를 모두 0.5로 맞춰서 분석함
- 3) 아래 표에서 모든 샘플의 Detection P-value가 0.05 이상인 경우 expression되지 않은 것으로 판단하고 해당 유전자를 삭제함

표. Detection P-value를 기준으로 유전자 삭제

Gene	S1_Avg_signal	S1_Det_P-val	S2_Avg_signal	S2_Det_P-val	S3_Avg_signal	S3_Det_P-val	삭제여부
7A5	-2.86	0.697	4.39	0.188	9.83	0.030	
A1BG	8.56	0.018	7.91	0.055	7.05	0.195	
A1CF	6.05	0.018	-1.91	0.698	-0.53	0.556	
A26C3	-2.94	0.819	-1.46	0.550	5.00	0.146	전체삭제
A2BP1	-0.46	0.640	-3.20	0.813	-1.23	0.660	전체삭제
A2LD1	44.95	0.000	53.63	0.000	67.60	0.000	
A2M	-4.27	0.781	70.60	0.000	47.01	0.000	
A2ML1	-0.22	0.505	-5.00	0.829	-3.49	0.742	전체삭제
A3GALT2	0.26	0.430	1.46	0.261	-2.33	0.706	전체삭제
A4GALT	89.29	0.000	256.66	0.000	137.59	0.000	
A4GNT	14.46	0.016	18.55	0.001	9.06	0.045	
AAA1	-0.58	0.606	2.20	0.144	-0.04	0.381	전체삭제
AAAS	30.53	0.000	32.90	0.000	37.77	0.000	
AACS	50.67	0.000	38.50	0.000	29.91	0.000	
AACSL	20.30	0.003	22.06	0.000	11.15	0.027	
AADAC	-0.41	0.517	1.41	0.365	0.14	0.435	전체삭제
AADAACL1	285.40	0.000	140.45	0.000	162.26	0.000	
AADAACL2	3.98	0.197	-2.97	0.665	-7.31	0.934	전체삭제
AADAACL3	4.10	0.192	-1.96	0.590	-8.04	0.951	전체삭제
AADAACL4	7.39	0.073	3.19	0.243	3.58	0.214	전체삭제
AADAT	18.98	0.229	20.90	0.208	20.34	0.131	전체삭제
AAGAB	103.38	0.000	110.58	0.000	133.72	0.000	
AAK1	2.58	0.358	3.99	0.352	7.12	0.047	
AAMP	177.85	0.000	167.77	0.000	195.49	0.000	
AANAT	-3.61	0.756	-9.15	0.974	0.18	0.431	전체삭제
AARS	1243.02	0.000	1490.21	0.000	1556.55	0.000	
AARS2	140.03	0.000	60.11	0.000	63.72	0.000	
AARSD1	127.71	0.000	106.99	0.000	134.40	0.000	
AASDH	54.25	0.000	73.53	0.000	50.01	0.000	

4) Detection P-value를 기준으로 유전자를 삭제한 후, 아래 표와 같이 Avg_signal 이 1 이하인 값들은 모두 0.5로 보정함. 분석자의 판단에 따라 1 이하는 모두 1로, 5 이하는 모두 5로 변환... 등의 다양한 방법이 가능함

표. Avg_signal 1 이하의 값을 0.05로 변환

Gene	S1_Avg_signal	S1_Det_P-val	S2_Avg_signal	S2_Det_P-val	S3_Avg_signal	S3_Det_P-val
7A5	0.50	0.697	4.39	0.188	9.83	0.030
A1BG	8.56	0.018	7.91	0.055	7.05	0.195
A1CF	6.05	0.018	0.50	0.698	0.50	0.556
A2LD1	44.95	0.000	53.63	0.000	67.60	0.000
A2M	0.50	0.781	70.60	0.000	47.01	0.000
A4GALT	89.29	0.000	256.66	0.000	137.59	0.000
A4GNT	14.46	0.016	18.55	0.001	9.06	0.045
AAAS	30.53	0.000	32.90	0.000	37.77	0.000
AACS	50.67	0.000	38.50	0.000	29.91	0.000
AACSL	20.30	0.003	22.06	0.000	11.15	0.027
AADACL1	285.40	0.000	140.45	0.000	162.26	0.000
AAGAB	103.38	0.000	110.58	0.000	133.72	0.000
AAK1	2.58	0.358	3.99	0.352	7.12	0.047
AAMP	177.85	0.000	167.77	0.000	195.49	0.000
AARS	1243.02	0.000	1490.21	0.000	1556.55	0.000
AARS2	140.03	0.000	60.11	0.000	63.72	0.000
AARSD1	127.71	0.000	106.99	0.000	134.40	0.000
AASDH	54.25	0.000	73.53	0.000	50.01	0.000

표. Detection P-value를 제거한 최종 데이터 양식

Gene	S1_Avg_signal	S2_Avg_signal	S3_Avg_signal
7A5	0.50	4.39	9.83
A1BG	8.56	7.91	7.05
A1CF	6.05	0.50	0.50
A2LD1	44.95	53.63	67.60
A2M	0.50	70.60	47.01
A4GALT	89.29	256.66	137.59
A4GNT	14.46	18.55	9.06
AAAS	30.53	32.90	37.77
AACS	50.67	38.50	29.91
AACSL	20.30	22.06	11.15
AADACL1	285.40	140.45	162.26
AAGAB	103.38	110.58	133.72
AAK1	2.58	3.99	7.12
AAMP	177.85	167.77	195.49
AARS	1243.02	1490.21	1556.55
AARS2	140.03	60.11	63.72
AARSD1	127.71	106.99	134.40
AASDH	54.25	73.53	50.01

5) Avg_signal은 그대로 분석할 수 있고, 또는 log 값으로 변환해 분석할 수 있음. log 값으로 변환 해서 fold change 등을 분석하면 그룹 간에 차이가 큰 것만 찾아낼 수 있으나, 반대로 주요유전

자의 개수가 매우 작게 분석되는 경향이 있음. Avg_signal을 그대로 분석하면 차이가 크지 않은 유전자들도 많이 발굴하지만 False positive가 많은 단점이 있음. 분석자의 판단에 따라 적절히 선택함. 이 자료에서는 원본 그대로 분석함

- 6) 각 그룹의 평균값을 구해, Fold change와 그룹 간 차이 (Diff)를 계산함. 통계 툴을 이용해 T-test 등의 유의성을 분석함. 일반적으로 Fold change는 2배 이상, T-test 0.05 이하를 동시에 만족하는 유전자를 선발하지만, false positive를 줄이기 위해, Diff값이 10 이하로 큰 차이가 나지 않는 유전자는 제외시키거나 TNoM을 추가분석해서 T-test와 함께 유의성 평가를 엄격하게 할 수 있음

표. 기본 통계분석 결과

GeneID	Group1 평균	Group2 평균	Fold Change	Diff	T-test	TNoM
ABCA6	13.19	2.70	4.89	10.49	0.10	0.26
ABCA8	102.13	25.08	4.07	77.05	0.06	0.26
ABCA9	13.60	7.06	1.93	6.54	0.10	0.26
ABCB10	93.19	104.37	-1.12	-11.18	0.50	0.26
ABCB6	107.72	93.18	1.16	14.54	0.55	0.26
ABCB7	56.01	125.22	-2.24	-69.21	0.006	0.05
ABCB9	48.57	38.75	1.25	9.83	0.14	0.26
ABCC1	95.54	83.93	1.14	11.61	0.58	0.26
ABCC10	38.60	44.05	-1.14	-5.45	0.15	0.26
ACER2	15.05	14.40	1.05	0.65	0.76	0.26
ACER3	10.69	8.12	1.32	2.57	0.53	0.26
ACIN1	377.40	399.11	-1.06	-21.72	0.49	0.26
ACLY	790.88	1027.28	-1.30	-236.40	0.008	0.05
ACN9	126.73	130.16	-1.03	-3.42	0.78	0.26
ACO1	2052.82	1455.44	1.41	597.38	0.08	0.26
ACO2	122.72	112.33	1.09	10.39	0.45	0.26
ADAM17	63.68	50.34	1.27	13.34	0.13	0.26
ADAM23	58.24	14.37	4.05	43.87	0.04	0.26
ADAM33	6.83	7.18	-1.05	-0.35	0.89	0.26
ADAM6	4.20	5.73	-1.37	-1.53	0.46	0.26
AFF1	26.35	36.32	-1.38	-9.96	0.006	0.05
AFF4	449.50	452.48	-1.01	-2.98	0.94	0.26
ALKBH1	41.47	37.28	1.11	4.20	0.43	0.26
ALKBH2	65.36	225.33	-3.45	-159.97	0.003	0.05
ALKBH3	170.37	177.84	-1.04	-7.46	0.53	0.26
ALKBH4	19.15	16.16	1.19	2.99	0.40	0.26

- 7) T-test는 Excel의 통계툴을 활용할 수 있고, TNoM (threshold number of misclassification)은 scoregenes software를 이용함

(<http://compbio.cs.huji.ac.il/scoregenes/ScoreGenesManual.html>)

3. 다양한 분석툴을 이용한 Gene Ontology, Pathway 분석

- 1) Expression chip 분석을 위해 웹에서 제공되는 Full Package 형식의 software는 대표적으로

GENE-E와 IPA (Ingenuity Pathway Analysis)가 있으며 GENE-E는 무료이고 IPA는 유료임. IPA는 License을 신청하면 1주일 정도 무료로 사용할 수 있음. 이 Software들은 Excel로 Fold chage 등의 분석을 할 필요없이 원본 데이터만 입력하면 분석을 자동으로 진행함

2) GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>)

IPA (<http://www.ingenuity.com/>)

3) Excel로 기본 분석을 진행하고 Gene Ontology (functional annotation & classification), Pathway 등을 분석하고자 한다면, 웹에서 무료로 제공하는 툴을 이용할 수 있음

Gene Ontology

- WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)
- DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

Pathway Analysis

- Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>)
- Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>)

4) Clustering (HeatMap)을 그리기 위해서는 Cluster3를 이용하거나 GenomeStudio에서 제공하는 HeatMap 툴을 이용할 수 있음

Clustering Software

- Cluster3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>)
- GenomeStudio (Open Source 아님)

RA_SOP13. Infinium II Methylation Assay를 이용한 후성유전체 분석 방법

1. Bisulfite conversion

1) 준비과정

- EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) 준비
- CT Conversion Reagent Tube에 750 ul DW와 210 ul M-dilution Buffer 혼합
- 10분간 Vortexing 하면서 상온에서 혼합
- 24 ml 100% 에탄올을 6 ml M-Wash Buffer가 있는 통에 넣는다.

2) Bisulfite Conversion

- 5 ul M-dilution Buffer를 500 ng DNA 시료에 넣고, 총 50 ul 되도록 DW 추가하고 37°C에서 15분간 반응한다.
- 100 ul CT Conversion Reagent를 넣고 혼합한다.
- 95°C에서 30초, 50°C에서 1시간을 16 cycle 반복해 반응하고, 4°C에서 10분간 반응한다.
- 400 ul의 M-binding Buffer를 Zymo-Spin IC Column에 넣고, Column을 Collection Tube와 결합한다.
- 반응물을 준비된 Column에 Loading한 후, 여러 번 Inverting 한다.
- 10,000g에서 30초간 Spin Down한다.
- 100 ul M-wash buffer를 Column에 넣고, 30초간 Spin Down한다.
- 200 ul M-Desulphonation Buffer를 Column에 넣고, 상온에서 20분간 반응 후 30초간 Spin Down한다.
- 200 ul M-wash buffer를 Column에 넣고, 30초간 Spin Down한다.
- 새로운 1.5 ml E-tube에 Column을 옮기고, 10 ul M-elution Buffer를 Column에 넣고, 30초간 Spin Down한다.

* Bisulfite conversion DNA는 QC과정 없이 Chip 실험에 사용됨

2. DNA 증폭 및 Fragmentation (Illumina Kit)

1) MSA2 plate

* 준비사항

- MA1, MA2, MSM을 실험 시작 1시간 전에 미리 녹여둔다.
- BCD Deep Well Plate를 준비하여 MSA2 Barcode 스티커 붙인다. (확인용)
- 37°C 오븐을 미리 준비한다.
- 20 ul의 MA1시약을 MSA2 Plate에 넣는다.

- 4 ul의 Bisulfite-Conversion DNA를 MSA2 Plate에 넣는다.
- 4 ul의 0.1 N NaOH를 넣고, 96-Well Cap Mat으로 MSA2 Plate를 밀봉한다.
- 1600 rpm에서 1분간 vortex하고, 280g에서 1분간 Spin Down한다.
- 상온에서 10분간 방치하고, 68 ul MA2, 75 ul MSM 시약을 MAS2 Plate에 넣는다.
- 96-Well Cap Mat으로 MSA2 Plate를 밀봉하고, 10회 정도 Inverting하며 섞는다.
- 280g에서 1분간 Spin Down하고, 37°C 오븐에서 20-24시간 방치한다.

2) Fragment MSA2

* 준비사항

- FMS 시약을 실험 시작 1시간 전에 미리 녹여둔다.
- 37°C 오븐을 준비한다.
- 오븐에서 MSA plate를 꺼내, 50 g에서 1분간 Spin Down하고, 50 ul FMS 시약을 넣는다.
- 96-Well Cap Mat으로 MSA2 Plate를 밀봉하고, 1600 rpm에서 1분간 vortex한 후 50g에서 1분간 Spin Down하여 37°C 오븐에서 1시간 방치한다.

3) Precip MSA2

* 준비사항

- PM1 시약을 실험 시작 1시간 전에 미리 꺼내둔다
- 100% 2-propanol
- 오븐에서 MSA plate를 꺼내, 280g에서 1분간 Spin Down한다.
- 100 ul PM1 시약을 넣고 96-Well Cap Mat으로 MSA2 Plate를 밀봉한다.
- 1600 rpm에서 1분간 Vortex하고, 50g에서 1분간 Spin Down한 후, 37°C 오븐에서 5분간 반응하고, 50g에서 1분간 Spin Down 한다.
- 300 ul 100% 2-Propanol을 넣고 새로운 Cap Mat으로 MSA2 Plate를 밀봉하고 Inverting하며 섞어 4°C에서 30분간 반응한다.
- 4°C에서 3,000g로 20분간 원심분리하고, 빠르게 상층액을 모두 제거한다.
- 1시간동안 상온에서 건조한다.

4) Resuspension MSA2

* 준비사항

- RA1 시약을 실험시작 3시간 이상 전에 꺼내둔다.
- 48°C 오븐을 준비한다.
- 42 ul RA1 시약을 넣고, 접착 호일 Sheet로 Plate를 Heat Seal한다.
- 48°C 오븐에서 1시간 반응 후, 1800 rpm에서 1분간 Vortex, 280g에서 1분간 Spin Down 한

다.

5) Hyb Multi Beadchip (amplify 후 단계)

* 준비사항

- PB2 시약, Hyb Chamber, Hyb Chamber Gaskets, Hyb Chamber Inserts
- Beadchip을 실험시작 1시간 전에 꺼내 둔다.
- 95°C Heat Block을 준비한다.
- 오븐을 48°C, Rocker Speed 5로 맞춰둔다.

- Hyb Chamber Gasket을 Hyb Chamber에 미리 넣어둬 온도를 맞춘다.
- 42 ul PB2 시약을 Hyb Chamber의 Buffer Reservoir에 넣는다. (습도조절용)
- MAS2 Plate를 95°C Heat Block에서 20분간 Incubation하고, 상온에서 30분간 식힌다.
- Chip을 Hyb Chamber Insert 위에 올리고 15 ul DNA 샘플을 Chip 에 Loading하고 chip을 Hyb Chamber에 넣는다.
- Hyb Chamber를 48°C 오븐에 넣고, Rocker Speen 5 맞춰 최소 16시간 이상에서 최대 24시간 이하로 반응한다.
- XC 시약에 330 ul 100% 에탄올을 넣는다. 15초간 잘 섞어준 후, Shaker에 Overnight Mix한다.

6) BeadChip 세척

* 준비사항

- PB1 시약, Multi-Sample Chip Alignment Fixture, Black Frame
- TE-Flow-Through Chambers
- Wash Dish 2개, Wash Rack 1개

- Hyb Chamber를 오븐에서 꺼내 25분간 상온에 둔다.
- 200 ul PB1 시약을 Wash Dish 2개에 넣고. Wash Dish에 Wash Rack을 넣는다.
- 150 ul PB1 시약을 Chip Alignment Fixture에 넣는다.
- Hyb Chamber를 열어 Chip을 꺼낸다.
- Chip의 Cover Seal을 벗겨내고, Wash Dish안의 Wash Rack에 장착한다.
- 1분간 Wash Dish에서 Wash Rack을 위 아래로 흔들어준다.
- 두 번째 Wash Dish에서 위 과정을 반복한다.
- Chip을 Black Frame에 올리고, Chip Spacer를 올린다.
- Alignment Fixture 위에 Alignment Bar를 둔다.
- Glass Black Plate를 올리고, Metal Clamp로 위, 아래를 고정하여 가위로 Spacer의 가장자리를 제거한다.
- TE Flow-Through Chambers에 방치한다.

7) X-stain BC2 (amplify 후 단계)

* 준비사항

- RA1, XC1, XC2, TEM, XC3, STM, ATM 시약을 실험 시작 3시간 전에 미리 녹여둔다.
- PB1, XC4, Alconox Powder Detergent, 에탄올
- 95% Formamide / 1 mM EDTA
- Chamber Rack 44°C

- 150 ul RA1 시약을 Assemble된 Chip에 넣고, 5회 반복한다.
- 450 ul XC1를 넣고 10분간 incubation, 450 ul XC2를 넣고 10분간 incubation, 200 ul TEM을 넣고 10분간 incubation한다.
- 450 ul 95% Formamide / 1 mM EDTA를 넣고 1분간 incubation하고, 한 번 더 반복한다.
- 5분간 incubation 후에 37°C로 Chamber 온도를 설정한 후,
- 450 ul XC3를 넣고. 한 번 더 반복 후, 온도가 떨어질 때 까지 기다린다.
- 250 ul STM를 넣고 10분간 incubation, 450 ul XC3를 넣고, 1분간 incubation 후 한 번 더 넣고 5분간 incubation한다.
- 250 ul ATM를 넣고 10분간 incubation, 450 ul XC3를 넣은 후, 1분간 incubation 후 한 번 더 반복하고 5분간 incubation한다.
- 250 ul STM를 넣고 10분간 incubation, 450 ul XC3를 넣고, 1분간 incubation 후 한 번 더 반복하고 5분간 incubation한다.
- 250 ul ATM를 넣고 10분간 incubation, 450 ul XC3를 넣고, 1분간 incubation 후 한 번 더 넣고 5분간 incubation한다.
- 250 ul STM를 넣고, 10분간 incubation, 450 ul XC3를 넣고, 1분간 incubation 후 한 번 더 넣고 5분간 incubation한다.

8) 세척

- 310 ml PB1을 Wash Dish에 넣는다.
- Wash Dish안에 Staining Rack을 넣는다. Locking Arm이 자신을 바라보도록 Assemble한다.
- Chip의 Metal Clamp, Glass, Spacer를 제거하고 Chip을 Staining Rack에 끼운다.
- 천천히 위아래로 10번 섞은 후에 5분간 incubation한다.
- 310 ml XC4를 Wash Dish에 넣는다. (10분 이상 방치하지 않는다.)
- Chip이 들어간 Staining Rack을 PB1에서 XC4 Wash Dish로 옮긴다.
- 천천히 위아래로 10번 섞은 후에 5분간 incubation한다.
- Staining Rack을 꺼내서 Chip이 수평이 되게, Barcode가 위로 향하도록 둔다.
- Chip을 Staining Rack에서 꺼내서 Tube Rack에 놓는다.
- Tube Rack을 Vacuum Desiccator에 두고 1시간 정도 건조한다. (508 mmHg)
- Chip 의 뒷면을 70% 에탄올로 닦아준 후, iScan 기기에서 Scan한다.

메틸레이션 통계분석 (Illumina HumanMethylation450 BeadChip)

1. DNA Methylation 원본 데이터 추출

- 1) 칩 scanning 결과물 (*.idat)과 manifest file (제조사 제공 probe 정보)을 Illumina에서 제공하는 GenomeStudio software로 읽어 'Project' 파일을 만든 후 DNA Methylation level을 추출함

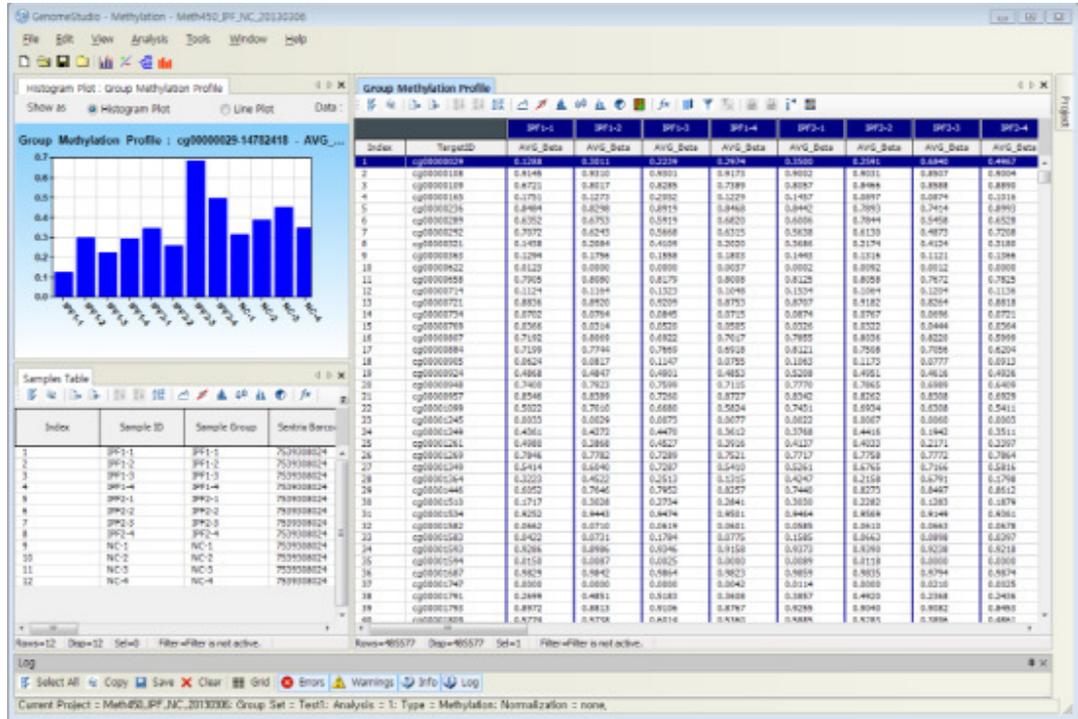


그림. GenomeStudio를 이용한 HumanMethylation450 chip 분석 이미지

- 2) GenomeStudio software는 Illumina 칩자료 분석을 위한 전용 software로서 데이터 추출 및 가공에 사용함. 'AVG_Beta' (methylation level), 'Detection P-value' (methylation여부 확인값)을 제공함. Methylation 분석에서는 Detection P-value는 의미없기 때문에 분석에서 제외함
- 3) GenomeStudio에서 GeneID, AVG_Beta 등의 원본값을 text 또는 Excel 파일로 추출함. 각 CpG site 별로 AVG_Beta 값을 추출하면 하나의 유전자에 여러개의 CpG site가 추출됨
- 4) HumanMethylation450 chip의 CpG site는 약 450K개임

2. 데이터 가공 (기초분석)

- 1) Methylation 데이터는 단순한 구조로 Avg.beta가 CoG site별로 나열됨. Avg.beta는 0에서 1의 값으로서, methylation되지 않았을 때는 0, 완전히 methylation되면 1의 값을 보임

Beta value: estimate of methylation level using ratio of intensities between methylated and unmethylated alleles

$$\text{Beta} = \frac{\text{Methylated allele intensity (M)}}{[\text{Unmethylated allele intensity (U)} + \text{Methylated allele intensity (M)} + 100]}$$

표. Methylation Chip 데이터의 기본구조

TargetID	Chr	Position	G1-1	G1-2	G1-3	G1-4	G2-1	G2-2	G2-3	G2-4
cg00259849	8	4183880	0.014	0.226	0.303	0.95	0.013	0.21	0	0
cg00322062	15	43032408	0.913	0.921	0.926	0.899	0.872	0.955	0	0.914
cg01270299	19	53099757	0.959	0.953	0.803	0.94	0	0.871	0.924	0.959
cg01591343	6	169857450	0.586	0.92	0.641	0.927	0.953	0	0.907	0.517
cg01600516	17	6904263	0.93	0.928	0.942	0.063	0	0.926	0	0.896
cg04245305	3	195940754	0.022	0.964	0.641	0.908	0.739	0.667	0.925	0.883
cg05176970	17	724273	0.896	0.342	0.941	0.33	0.947	0.027	0.273	0.875
cg08299859	10	13259274	0.18	0.932	0	0.933	0	0.96	0	0.941
cg09462281	19	3191030	0.134	0	0.038	0	0.454	0.92	0.833	0.942
cg10263003	2	235766844	0.941	0.909	0.265	0	0.249	0.92	0.897	0.924
cg10526376	2	1788254	0.943	0.932	0.946	0.952	0	0.936	0.932	0.94
cg11660308	10	127817363	0.92	0.939	0.928	0.915	0.01	0.899	0.912	0.933
cg11935063	13	114161875	0.916	0.943	0.882	0.95	0.914	0.937	0.91	0.951
cg11987751	1	1663860	0.932	0.938	0	0.929	0.93	0.922	0.894	0.949
cg12770425	6	33585071	0.903	0	0.9	0.931	0.921	0.946	0.856	0.916
cg13810332	9	114421433	0.896	0.949	0.886	0.818	0.89	0.887	0.858	0
cg14651435	7	157209551	0.483	0.939	0.029	0.533	0.965	0.954	0.939	0.947
cg15408512	10	135105487	0.949	0.344	0.907	0.939	0.936	0	0.065	0.97
cg15599437	5	40676198	0	0.921	0.941	0.941	0.925	0.947	0.912	0.921
cg16094767	17	821595	0.315	0.676	0.28	0.014	0.759	0.604	0.928	0.38
cg17441804	6	29714059	0.944	0	0.928	0.744	0.916	0.732	0.894	0.806
cg18969004	6	31164743	0.908	0.924	0	0.82	0.926	0	0.961	0.934
cg19249811	10	29747315	0.963	0.942	0.961	0.938	0.933	0.961	0.009	0.967
cg19362774	8	6664522	0.906	0.907	0.904	0.859	0.907	0.847	0.844	0.789
cg20667334	2	236676021	0.964	0.981	0.972	0.974	0.97	0.01	0.972	0.969
cg20720056	10	101910498	0.631	0.005	0.877	0.827	0.612	0.939	0.625	0.892
cg21543103	5	6740855	0.886	0.87	0.887	0.918	0	0.946	0.887	0.939
cg21589417	2	170834853	0.581	0.005	0	0.913	0.944	0.556	0.025	0.954
cg23505044	17	9129824	0	0.933	0.462	0.919	0.429	0.905	0.84	0.908
cg23699809	8	28745972	0.275	0.315	0.519	0.294	0.976	0.256	0.057	0
cg25138752	5	1650942	0.953	0.14	0.853	0.895	0.616	0	0.925	0.845
cg26709433	6	169571488	0.898	0.905	0.9	0.912	0.214	0.949	0.917	0.203
cg27516925	16	90095949	0.884	0.834	0.944	0.92	0	0.915	0.735	0.907

2) Methylation data는 CpG id, 각 샘플별 methylation level이 0에서 1의 값으로 표시됨. CpG site가 450,000개로 데이터 용량이 매우 크기 때문에 분석용 컴퓨터의 memory가 4G 이상 필요함

3) AVG_Beta의 그룹별 평균을 계산하고, 그룹 간 차이 (delta Beta), 통계적 유의성 (T-test) 등의 분석을 통해 주요 methylation site를 선발함. 아래 표를 보면 delta Beta값이 그룹 간에 0.3 이상을 주요 유전자로 정의했고, t-test, TNoM P-value 0.05 이하를 유의한 CpG site로 선발함

표. Detection P-value를 기준으로 유전자 삭제

TargetID	Chr	Position	G1 평균	G2 평균	delta Beta	T-test	TNoM
cg00259849	8	4183880	0.373	0.056	-0.318	0.18	0.12
cg00322062	15	43032408	0.915	0.685	-0.230	0.36	0.12
cg01270299	19	53099757	0.914	0.689	-0.225	0.37	0.12
cg01591343	6	169857450	0.769	0.594	-0.174	0.49	0.12
cg01600516	17	6904263	0.716	0.456	-0.260	0.47	0.12
cg04245305	3	195940754	0.634	0.804	0.170	0.48	0.12
cg05176970	17	724273	0.627	0.531	-0.097	0.74	0.12
cg08299859	10	13259274	0.511	0.475	-0.036	0.93	0.12
cg09462281	19	3191030	0.043	0.787	0.744	0.0007	0.03
cg10263003	2	235766844	0.529	0.748	0.219	0.48	0.12
cg10526376	2	1788254	0.943	0.702	-0.241	0.34	0.12
cg11660308	10	127817363	0.926	0.689	-0.237	0.34	0.12
cg11935063	13	114161875	0.923	0.928	0.005	0.78	0.12
cg11987751	1	1663860	0.700	0.924	0.224	0.37	0.12
cg12770425	6	33585071	0.684	0.910	0.226	0.36	0.12
cg13810332	9	114421433	0.887	0.659	-0.229	0.34	0.12
cg14651435	7	157209551	0.496	0.951	0.455	0.05	0.12
cg15408512	10	135105487	0.785	0.493	-0.292	0.37	0.12
cg15599437	5	40676198	0.701	0.926	0.226	0.37	0.12
cg16094767	17	821595	0.321	0.668	0.347	0.10	0.12
cg17441804	6	29714059	0.654	0.837	0.183	0.45	0.12
cg18969004	6	31164743	0.663	0.705	0.042	0.90	0.12
cg19249811	10	29747315	0.951	0.718	-0.234	0.36	0.12
cg19362774	8	6664522	0.894	0.847	-0.047	0.13	0.12
cg20667334	2	236676021	0.973	0.730	-0.243	0.35	0.12
cg20720056	10	101910498	0.585	0.767	0.182	0.44	0.12
cg21543103	5	6740855	0.890	0.693	-0.197	0.43	0.12
cg21589417	2	170834853	0.375	0.620	0.245	0.47	0.12
cg23505044	17	9129824	0.579	0.771	0.192	0.47	0.12
cg23699809	8	28745972	0.351	0.322	-0.029	0.91	0.12
cg25138752	5	1650942	0.710	0.597	-0.114	0.70	0.12
cg26709433	6	169571488	0.904	0.571	-0.333	0.16	0.12
cg27516925	16	90095949	0.896	0.639	-0.256	0.29	0.12

4) T-test는 Excel의 통계툴을 활용할 수 있고, TNoM (threshold number of misclassification)은 scoregenes software를 이용함
<http://compbio.cs.huji.ac.il/scoregenes/ScoreGenesManual.html>)

3. 다양한 분석툴을 이용한 Gene Ontology, Pathway 분석

1) DNA methylation이 유전자 발현에 직접적인 영향을 주는 것은 아니지만 필요하다면 Gene Ontology, Pathway 분석을 Expression chip 분석과 동일한 방법으로 수행할 수 있음. 웹에서 제공되는 Full Package 형식의 software는 대표적으로 GENE-E와 IPA (Ingenuity Pathway Analysis)가 있으며 GENE-E는 무료이고 IPA는 유료임. IPA는 License를 신청하면 1주일 정도

무료로 사용할 수 있음. 이 Software들은 원본 데이터만 입력하면 분석을 자동으로 진행함

2) GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>)

IPA (<http://www.ingenuity.com/>) (Open Source 아님)

3) Excel로 기본 분석을 진행하고 Gene Ontology (functional annotation & classification), Pathway 등을 분석하고자 한다면, 웹에서 무료로 제공하는 툴을 이용할 수 있음

Gene Ontology

- WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)

- DAVID Bioinformatics Resources

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

Pathway Analysis

- Pathway Express

(<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>)

- Cytoscape

(<http://www.cytoscape.org/>)

4) Clustering (HeatMap)을 그리기 위해서는 Cluster3를 이용하거나 GenomeStudio에서 제공하는 HeatMap 툴을 이용할 수 있음

Clustering Software

- Cluster3.0

(<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>)

- GenomeStudio

(Open Source 아님)

RA_SOP14. 표적 대사체 정량 SOP

준비물

- 탠덤 질량분석시스템 (LC-MS/MS, Agilent 2890/Qtrap 5500)
- Vacuum centrifuge
- Centrifuge
- Reverse phase column 또는 HILIC column
- IS 용액 (Stable isotope labeled internal standard or surrogate internal standard)
- Calibration 용액

실험 방법

본 지침은 혈청, 혈장과 같은 생체 시료액 (biological fluids)에 적용한다.

표적 대사체에 따라 실험방법은 다소 차이가 나며, 여기에서는 예로 **스핑고지질 (세라미드, 스펡고미엘린)**에 대한 **표적 대사체 정량**을 기준으로 기술한다.

I. 시료전처리

1. -80°C 에 보관중이던 약 $100\ \mu\text{L}$ 생체 혈청을 얼음에서 서서히 해동한다.
2. 생체 시료액을 1.5mL microcentrifuge tube에 옮기고, $400\ \mu\text{L}$ chloroform/methanol (1/2, v/v)과 $100\ \mu\text{L}$ IS 용액 (500nM C17 세라미드)를 첨가한다.
3. Vortex mixer를 이용하여 1분 이상 충분히 용액이 혼합되도록 한 후, 10분 동안 $14,000\text{rpm}$ 에서 원심분리한다.
4. 시료 용액이 두 개의 층으로 분리되면, organic layer (아래층)을 새로운 tube에 옮긴다.
5. 기존의 남아있는 시료 용액에 $1\ \text{mL}$ H_2O /methanol (1/1)을 넣고 vortex mixer를 이용하여 1분 이상 충분히 용액을 혼합한다.
6. 원심분리하여 용액이 두 개의 층으로 분리되면, 아래층을 채취하여 위 4번에서 준비한 tube에 있던 organic layer와 합친다.
7. Vacuum centrifuge를 이용하여 시료액을 모두 건조하고, 건조 후 -20°C 에 LC-MS/MS 분석전까지 보관한다. (Note: Vacuum centrifuge를 이용한 건조과정 동안 열을 가하지는 않음. 시료전처리후 건조한 시료는 한달내 LC-MS/MS 분석을 수행하는 것이 바람직함)

II. Calibration 용액의 준비

8. 다양한 탄소길이를 가지는 세라미드와 스펡고미엘린을 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 nM의 농도가 되도록 500nM IS 용액을 용매로 하여 준비한다.

III. 표적 대사체 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법 정립

9. MRM 기법을 이용하여 해당 대사체에 특이적인 검출법을 정립한다.
(각 대사체별 collision energy, CXP 등은 기기상태에 따라 최적화 필요)

10. Pursuit C18 column (150x2.1 mm)을 이용하여 양전하 모드에서 분석한다.
0.2mL/min의 flow rate와 23°C에서 분석을 수행하며, 상세한 이동상 구배는 아래표와 같다.

A: 5mM ammonium formate/methanol/THF (500/200/300)		
B: 5mM ammonium formate/methanol/THF (100/200/700)		
Time (min)	A(%)	B(%)
0	50	50
5	50	50
8	30	70
15	30	70
22	10	90
25	10	90
25.1	50	50
30	50	50

IV. LC-MS/MS를 이용한 표적 대사체의 정량

11. 건조되어 있는 시료에 20 μ L methanol을 첨가후 15초간 vortex한다.
12. 위 용액을 15분간 14,000rpm에서 원심분리하고, 상층액만 autosampler vial에 옮겨 담고 4°C로 온도가 맞춰진 autosampler에 위치시킨다.
13. 시료주입량은 3 μ L로 하여 분석하고, 위 III에서 정립한 분석법을 이용하여 분석을 수행한다.
14. Blank, Calibration 용액을 포함하여 최대 30개 시료의 분석이 하나의 batch를 구성하도록 한다. Blank 시료 (methanol)의 분석을 매 batch의 처음과 마지막에 시행하고, Calibration 용액중 하나를 QC 시료로 하여 매 5-6개의 생체 시료 분석마다 반복하여 분석이 시행되도록 한다. 생체시료액 분석은 무작위순 (randomized order)으로 시행한다.

V. 결과의 분석

15. 각 대사체의 특이적 검출값에 해당하는 EIC (extracted ion chromatograph)의 면적을 기준으로 하며, internal standard로 사용된 C17 세라마이드의 검출값으로 normalize한다.
16. Calibration 용액을 이용하여 얻은 calibration curve (0.1-1000nM, $R^2 > 0.95$, 1/x weight)의 dynamic range에 시료의 정량값이 포함되어야 한다. 벗어나는 경우, IS 용액을 이용하여 희석하거나 시료의 양을 조절한 후 재분석을 수행한다. QC 시료의 정량값은 $RSD < 15\%$ 일때 양호한 것으로 본다.

RA_SOP15. 글로벌 대사체 프로파일링 SOP

준비물

- 초고분해능 질량분석시스템 (LC-MS, Ultimate3000/Orbitrap XL)
- Vacuum centrifuge
- Centrifuge
- Reverse phase column
- HILIC column
- IS 용액
(10 μ M Glycine-d₅, 10 μ M Succinic acid-d₄, 100nM 18:0 D17 PC, 500nM AUDA)
- QC 용액 (시판중인 human plasma)
- Mass calibration 용액
(Pierce LTQ ESI positive/negative ion calibration solution)

실험 방법

본 지침은 혈청, 혈장, 또는 뇨와 같은 생체 시료액 (biological fluids)에 적용한다. 아래의 실험 방법은 시료 및 기기의 상태에 맞춰 변경이 가능하다.

I. 시료전처리

1. -80°C에 보관중이던 약 500 μ L 생체 시료액을 얼음에서 서서히 해동한다.
2. 생체 시료액을 2mL microcentrifuge tube에 옮기고, 50 μ L IS 용액과 1mL methanol을 첨가한다.
3. Vortex mixer를 이용하여 20초 이상 충분히 용액이 혼합되도록 한 후, 15분 동안 14,000rpm에서 원심분리하여 침전물을 제외한 상층액을 15mL centrifuge tube에 옮긴다.
4. 상층액이 담긴 tube에 2 mL chloroform/methanol (3/1)을 넣고 vortex mixer를 이용하여 1분 이상 충분히 용액을 혼합한다.
5. Centrifuge하여 용액이 두 개의 층으로 분리되도록 한다.
6. 위층 (aqueous layer)과 아래층 (organic layer)를 취하여, 각각을 별도의 2mL microcentrifuge tube에 넣는다.
7. Vacuum centrifuge를 이용하여 시료액을 모두 건조하고, 건조 후 -20°C에 LC-MS 분석전까지 보관한다. (Note: Vacuum centrifuge를 이용한 건조과정 동안 열을 가하지는 않음. 시료전처리후 건조한 시료는 한달내 LC-MS 분석을 수행하는 것이 바람직함)

II. QC 시료의 준비

8. QC 시료인 human plasma는 위 1-7와 동일한 과정을 거쳐 준비한다.

III. 초고분해능 질량분석기의 준비

- LC-MS를 이용한 글로벌 대사체 프로파일링전에 mass calibration 용액을 초고분해능 질량분석기에 직접 주입하여 양전하/음전하 모드에서 각각 질량보정 과정을 수행한다.

IV. LC-MS를 이용한 글로벌 대사체 프로파일링

- 건조되어 있는 시료에 LC mobile phase 용액 100 μ L를 첨가후 15초간 vortex한다.
- 위 용액을 15분간 14,000rpm에서 원심분리하고, 상층액만 autosampler vial에 옮겨 담고 4°C로 온도가 맞춰진 autosampler에 위치시킨다.
- 시료주입량은 10 μ L로 하여 분석하고, m/z 50-1,000 (centroid mode)와 resolution 30,000을 이용하여 질량분석을 수행한다.
- Aqueous layer 용액은 HILIC column을 사용하고, organic layer 용액은 reverse phase column을 사용하여 분석을 수행한다.
- 0.4mL/min의 flow rate와 50°C에서 분석을 수행하며, 상세한 이동상 구배는 아래표와 같으며, 양전하/음전하 모드에서 모두 분석한다.

HILIC A: 0.1% FA in H ₂ O / B: 0.1% FA in Methanol			Reverse phase(A: 0.1% FA in H ₂ O / B: 0.1% FA in Methanol/TPA(85/15))		
Time (min)	A(%)	B(%)	Time (min)	A(%)	B(%)
0	99.9	0.1	0	25	75
2	99.9	0.1	1	25	75
6	75	25	6	15	85
10	20	80	10	15	85
12	10	90	15	10	90
21	0.1	99.9	17	10	90
23	0.1	99.9	18	9	91
24	99.9	0.1	21	9	91
26	99.9	0.1	22	8	92
			27	8	92
			29	0.1	99.9
			32	0.1	99.9
			33	25	75
			35	25	75

- QC 시료를 포함하여 총 30개 시료의 분석이 하나의 batch를 구성하도록 한다. Blank 시료 (50% methanol)의 분석을 때 batch의 처음과 마지막에 시행하고, QC 시료의 분석은 5-6개의 생체시료액 분석마다 반복되도록 시행한다. 생체 시료액의 분석은 무작위순 (randomized order)으로 시행한다.

V. 결과의 분석 및 검증

- 양전하/음전하 모드, aqueous phase/organic phase에서 분석한 각각의 글로벌 대사체 프로파일링 결과가 하나의 생체 시료액을 위한 데이터 세트를 구성한다.
- 대사체 분석을 위한 소프트웨어 (e.g. SIEVE)를 이용하여 비교 실험군간에 통계적으로 유의한 component (m/z)를 추출한 후, 데이터베이스 (e.g. METLIN, Chempidder)를 이용하여 accurate mass를 기준으로 각 component에 해당하는 대사체를 동정 (identification)한다.
- 동정된 대사체들이 관여하는 대사경로 (metabolic pathway)를 분석한다.