



임상 검체 전처리 가이드

Version 1.3





Clinical Sample Processing Guide

Introduction

임상 검체 전처리 가이드는 사용자들의 전처리 과정의 이해를 돕기 위해 제작되었습니다. 제공된 가이드를 이용하여 다양한 임상 검체의 처리 과정을 거친 후 *ExiPrep™* Extraction Kit 군, *ExiStation™* Extraction Kit 군 또는 *AccuPrep™* Extraction Kit 군을 이용하여 정제된 핵산을 추출할 수 있습니다. 위와 같은 전처리를 통하여 검사하고자 하는 실험에서 정확한 결과를 얻을 수 있도록 도와드립니다. 최상의 결과를 얻기 위하여, 제공해드리는 전처리 가이드에 따라 실험을 진행해 주시기 바랍니다.

또한 이 임상 검체 전처리 가이드는 사용자의 편의를 위하여 작성되었음을 알려드립니다.

Safety Warnings and Precautions

BIONEER's Customer Service Center를 통하여 물질안전보건자료 (MSDS)를 제공받으시기 바랍니다. 임상 검체 전처리 가이드의 설명에 따라 검체, 시약, 전용 배지 등을 다루기 전에 관련된 법규 및 지침에 따르도록 합니다.

또한 임상 검체는 분자생물학 실험과 임상 실험에 자격이 있거나 잘 훈련된 자들만이 다루어야 합니다. 본 안내서를 철저히 숙지하시고 사용되는 시약들을 점검한 후에 실험을 수행하시기 바랍니다.

임상 검체를 다룰 시에는 항상 장갑을 착용하며 신체와 직접적인 접촉이 없도록 하여야 합니다. 만약 직접적인 접촉이 발생한 경우 병원(기관)의 감염관리 지침에 따라 신속하게 조치하십시오. 또한 실험에 사용되는 모든 소모품들(tip, tube 등)은 항상 멸균된 상태인 것을 사용하셔야 합니다.



Clinical Sample Processing Guide

[CONTENTS]

1. Processing Sputum.....	3
2. Processing Fluids.....	4
3. Processing Tissue.....	5
4. Processing FFPE.....	6
5. Processing Urine.....	7
6. Processing Bacterial Swabs.....	8
7. Processing Viral Swabs.....	9
8. Processing Stool.....	10
9. Index.....	11



Clinical Sample Processing Guide

1. Processing Sputum

1.1 검체량: 1 mL 이상

1.2 보관 조건 및 기간: 냉장 (7일), 냉동 (7일 이상)

1.3 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, 10N NaOH, 1X PBS buffer (pH 6.8~7.2)

1.4 검체 전처리 방법

① Sputum 검체가 들어있는 용기에 sputum의 1/10 volume의 10 N NaOH를 첨가 후 강하게 3분간 vortex한다

② 상온 (25°C) 에서 15분간 incubation 한다.

주) 검체의 끈적임이 심할 경우 첨가하는 NaOH양을 2배까지 늘리거나 incubation 시간을 30분까지 늘릴 수 있다. NaOH양을 늘려도 끈적임이 풀리지 않는 경우 conical tube로 옮겨 검체량과 동량의 PBS 혹은 DEPC water를 추가하여 vortex 한다.

③ 검체를 1분간 강하게 vortex한 후 1.5 mL을 멸균된 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮긴다.

④ 9,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 파이펫을 이용하여 상층액을 완전히 제거한다

주) 상층액 제거 시 pellet 윗부분에 하얗게 층이 형성된 경우 상층액과 함께 모두 제거하여 cell pellet만 남긴다.

⑤ 1X PBS buffer 1 mL을 넣은 후 30초간 vortex하여 cell pellet을 washing한 후 9,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 파이펫을 이용하여 상층액을 완전히 제거한다. (2~3회반복)

주) 상층액 제거 시 pellet 윗부분에 하얗게 층이 형성된 경우 상층액과 함께 모두 제거하여 cell pellet만 남긴다.

⑥ 400 μ l 의 Resuspension Buffer 혹은 1x PBS, normal saline 등을 첨가한 후 파이펫을 이용하여 잘 풀어 준다

⑦ 6,000 rpm에서 5초간 spin-down 후 상층액을 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ l/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ l 사용)



Clinical Sample Processing Guide

2 Processing Fluids

2.1 검체 종류: BAL, Pleural fluid, Saliva 등 body fluid

2.2 검체량: 5 mL 이상

2.3 보관 조건 및 기간: 냉장 (7일), 냉동 (7일 이상)

2.4 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, 10N NaOH, 1X PBS buffer (pH 6.8~7.2)

2.5 검체 전처리 방법

① Fluid type의 검체가 들어있는 tube를 강하게 vortex한 후 5~10mL의 검체를 Conical tube에 옮긴다.

주) 검체가 끈적할 경우 10N NaOH 200 μ l를 첨가하여 액상화한 후 상온에서 15분간 incubation 한다. Fluid에 부유물이 떠있는 경우 제거하고 사용한다.

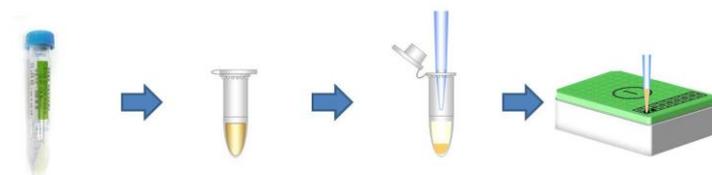
② 3,000rpm에서 20분간 원심분리 후 파이펫을 이용하여 상층액을 완전히 제거한다

③ 1X PBS buffer 1 mL을 넣은 후 30초간 vortex 한 후 1.5mL microcentrifuge tube에 옮긴다. 검체를 9,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 파이펫을 이용하여 상층액을 완전히 제거한다.

주) 상층액 제거 시 pellet 윗부분에 하얗게 층이 형성된 경우 상층액과 함께 모두 제거하여 cell pellet만 남긴다

④ 400 μ l의 Resuspension Buffer 혹은 1x PBS, normal saline 등을 첨가한 후 파이펫을 이용하여 잘 풀어 준다

⑤ 6,000 rpm에서 5초간 spin-down 후 상층액을 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ l/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ l 사용)



(Sample loading well or tube)



Clinical Sample Processing Guide

3 Processing Tissue

3.1 검체량: 50 mg ~ 100 mg

3.2 보관 조건 및 기간: 냉장 (7일), 냉동 (7일 이상)

3.3 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, shaking incubator(60°C)

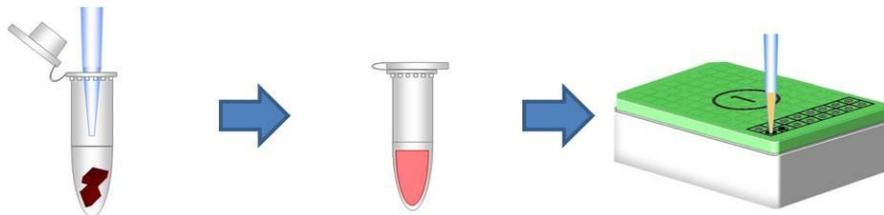
3.4 검체 전처리 방법

- ① Tissue 검체 50 mg-100 mg을 취하여 멸균된 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣는다.
- ② 20 μ L의 proteinase K (20 mg/mL, 별도 구매), 400 μ L의 Tissue lysis buffer (별도 구매)를 넣고 60°C shaking incubator에서 tissue가 완전히 lysis될 때까지 incubation한다.

주) 보통 1시간 정도 소요되며, 필요에 따라서는 overnight incubation도 가능하다.

- ③ 8,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후 상층액을 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ L/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ L 사용)

주) Pellet 윗부분에 하얗게 층이 형성된 경우 건드리지 말고 상층액만 취한다



(Sample loading well or tube)



Clinical Sample Processing Guide

4 Processing FFPE(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue)

4.1 검체량: 20 mg 이상

4.2 보관 조건: 실온

4.3 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, shaking incubator (56°C, 60°C)

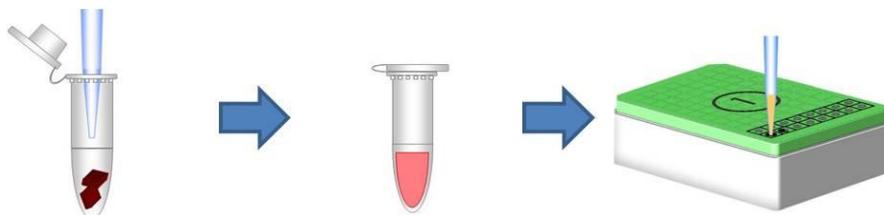
4.4 검체 전처리 방법

- ① FFPE 검체 20 mg을 취하여 멸균된 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣는다.
- ② 1200ul의 xylene 을 첨가하여 vortex 후 56°C에서 1시간 Heating 한다.
- ③ Paraffin이 녹은 것이 확인되면 가볍게 vortex 후 13,000rpm/RT/5min 원심분리 한다.
- ④ 상층액 제거 후 1mL의 100% ethanol 을 첨가하여 vortexing 한다.
- ⑤ 13,000rpm/RT/5min 원심분리 후 상층액을 제거하고 1mL의 80% ethanol을 첨가하여 vortexing 한다.
- ⑥ 13,000rpm/RT/5min 원심분리 후 상층액을 제거하고 1mL의 60% ethanol을 첨가하여 vortexing 한다.
- ⑦ 13,000rpm/RT/5min 원심분리 후 상층액을 완전히 제거한다. (Tube-Cap을 열어 실온 10분 방치)
- ⑧ 1X PBS buffer 1mL 첨가하여 vortex 후 13,000rpm/RT/5min 원심분리 후 상층액을 제거한다
- ⑨ 20μl의 proteinase K (20 mg/ml, 별도 구매), 400μl의 Tissue lysis buffer (별도 구매)를 넣고 60°C shaking incubator에서 tissue가 완전히 lysis될 때까지 incubation한다.

주) 보통 3시간 정도 소요되며, 필요에 따라서는 **overnight incubation**도 가능하다.

- ⑩ 8,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후 상층액을 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400μl/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200μl 사용)

주) Pellet 윗부분에 하얗게 층이 형성된 경우 건드리지 말고 상층액만 취한다.



(Sample loading well or tube)



Clinical Sample Processing Guide

5 Processing Urine

5.1 검체량: 10 mL 이상, 아침 첫 소변이 가장 농축된 상태이므로 권장

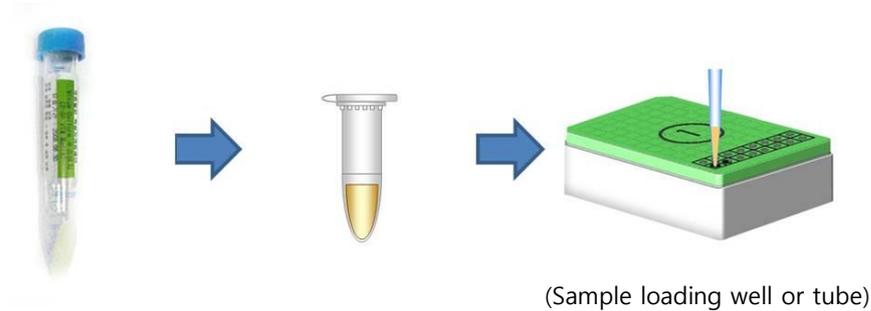
5.2 보관 조건 및 기간: 냉장 (7일), 냉동 (7일 이상)

5.3 준비물: Swing rotor centrifuge (3,000 rpm 가능), vortex mixer

5.4 검체 전처리 방법

- ① 검체가 들어있는 tube를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 모두 제거한다
- ② 400 μ l의 Resuspension Buffer 혹은 1x PBS, normal saline 등을 첨가한 후 파이펫을 이용하여 잘 풀어 준 다음 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ l/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ l 사용)

주) 검체의 침사층이 많아 뽁뽁한 경우 buffer의 양을 침사량의 3배까지 늘릴 수 있다.





Clinical Sample Processing Guide

6 Processing Bacterial Swabs

6.1 검체 단위: 1 개

6.2 검체 채취 방법

멸균된 전용 brush를 이용하여 요도 (비뇨기과용 brush 사용), Vaginal/Cervical 및 기관지 (호흡기용 brush 사용) 등 채취하고자 하는 부위에 2 cm (약 1 인치) 정도 까지 넣어 부드럽게 회전시켜 검체를 채취 후, 전용 용기에 넣어 보관한다.

6.3 보관 조건 및 기간: 냉장(7일), 냉동(7일 이상)

6.4 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, 1X PBS buffer (pH 6.8~7.2)

6.5 검체 전처리 방법

① 검체가 들어있는 tube를 3분간 강하게 vortex한 후 500 μ l를 멸균된 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮긴다

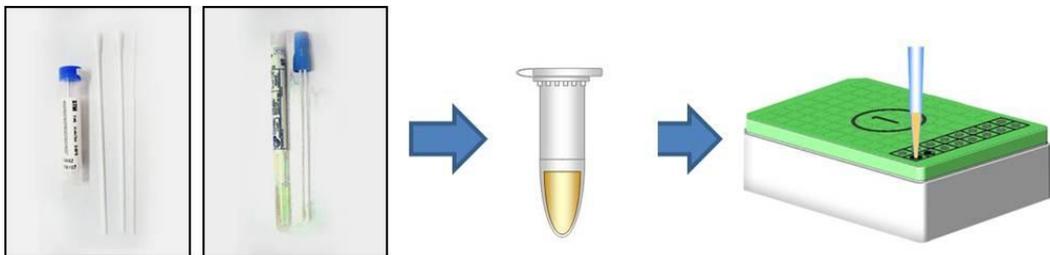
주) Buffer가 들어있지 않아 건조된 swab 검체는 진단에 사용할 수 없다.

주) 검체의 점성이 심하여 Tip에 부드럽게 달려오지 않는 경우 PBS 버퍼를 2mL 추가하여 Vortex하여 사용한다.

② 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 완전히 제거한다.

③ 400 μ l의 Resuspension Buffer 혹은 1x PBS, normal saline 등을 첨가한 후 파이펫을 이용하여 잘 풀어 준 다음 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ l/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ l 사용)

주) Resuspension이 마지막까지 잘 되지 않는 고체성 입자들은 핵산 추출 중 tip 막힘 현상이 유발될 수 있으므로 suspension이 된 pellet만 사용할 것.



(Sample loading well or tube)



Clinical Sample Processing Guide

7 Processing Viral Swabs

7.1 검체 단위: 1 개

7.2 검체 채취 방법

멸균된 전용 brush를 이용하여 채취하고자 하는 부위에 1 인치 정도 까지 넣어 부드럽게 회전시켜 검체를 채취 후, 전용 용기에 넣어 보관한다.

(Nasal swab 경우) swab을 돌리면서 가능한 콧속 깊숙이 넣어 분비물이 눈에 보일 정도로 채취 (코와 귀 사이 길이의 1/3)

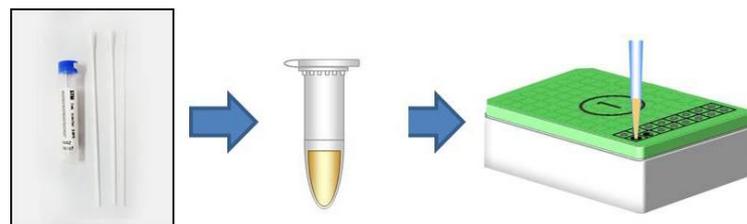
(Throat swab 경우) 목구멍 내부 편도선 표면이나 인후두 안쪽에 swab을 돌리면서 가능한 깊숙이 넣어 분비물이 눈에 보일 정도로 채취 (목젖은 건드리지 않도록 주의한다).

7.3 보관 조건 및 기간: 냉장(3 일), 냉동(3 일 이상)

7.4 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer

7.5 검체 전처리 방법

- ① Swab에 묻어 있는 virus가 수송 배지 혹은 1x PBS, normal saline 등으로 잘 옮겨 나올 수 있도록 vortex mixer를 이용하여 강하게 섞어준다.
- ② 1.5 ml microcentrifuge tube에 검체 500 μ l를 옮기고 6,000 rpm에서 5초간 가볍게 원심분리한다.
- ③ 상층액을 취하여 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 μ l/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 μ l 사용)



(Sample Loading well or tube)



Clinical Sample Processing Guide

8 Processing Stool

8.1 검체량: 1~2 g

8.2 검체 채취 방법

변에서 농, 혈액, 점액이 있는 부위를 1~2 g 정도 깨끗하고 건조한 용기에 담는다.

8.3 보관 조건 및 기간: 냉장 (3 일),

8.4 준비물: Table top centrifuge (13,000 rpm 가능), vortex mixer, shaking incubator (60°C), PBS, Stool lysis buffer (별도 구매), Proteinase K (별도 구매)

8.5 Stool for Virus 검체 전처리 방법

① 15 ml tube 에 약 1 g 의 검체를 옮겨 담은 후 9 ml의 PBS 를 첨가한다.

② Tube 를 강하게 3 분간 vortexing 해준다.

③ 3,000 rpm, 4 °C에서 20 분간 원심분리 후 상층액을 취하여 추출에 이용한다.

(ExiPrep™ 16 Dx: 400 µl/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 µl 사용)

8.6 Stool for Bacteria 검체 전처리 방법

① 1.5 ml tube 에 50~200 mg의 검체를 옮겨 담은 후 400 µl의 Stool lysis buffer 와 10 µl 의 proteinase K (40 mg/ml)를 첨가한다.

② Tube 를 강하게 1 분간 vortexing 해준 후 60°C shaking incubator 에서 검체가 완전히 풀어질 때까지 incubation 한다. (30 분 가량 소요)

③ 검체가 완전히 lysis 된 후 12,000 rpm 에서 5 분간 원심분리 후 상층액을 취하여 추출에 이용한다. (ExiPrep™ 16 Dx: 400 µl/ 기타 ExiPrep™ 16 장비: 200 µl 사용)

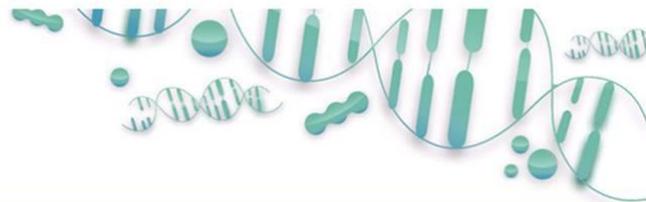


Clinical Sample Processing Guide

9 Index

검사항목	검체 종류	검사항목	검체 종류
결핵 (Tuberculosis)	Sputum	Influenza/ Adenovirus	Nasal Swab
	BAL		Throat swab
	Fluids		
	Tissue		
성병 (STD)	Urine	폐렴 (Pneumonia)	Sputum
	Swab		Fluids
장내세균	Stool	Norovirus	Stool
	Swab		Swab
HSV	Swab	HPV	Swab
	CSF		

검체	적용 검사	관련 페이지
Sputum (1 mL 이상)	Tuberculosis, Pneumonia	Page 3
Fluids (5 mL 이상)	Bacteria - Tuberculosis, Pneumonia	Page 4
Tissue (50 ~ 100 mg)	Tuberculosis, Pneumonia	Page 5
FFPE (20 mg 이상)	Tuberculosis	Page 6
Urine (10 mL 이상)	Tuberculosis, <i>C.trachomatis</i> , <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>M.genitalium</i> , <i>U.urealyticum</i> , STI, etc.	Page 7
Swab (1 개 이상)	Bacteria – <i>C.trachomatis</i> , <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>M.genitalium</i> , <i>U.urealyticum</i> , STI, etc.	Page 8
	Virus – Respiratory virus, Adenovirus, Norovirus, HSV, HPV	Page 9
Stool (50 ~ 200 mg /200 µL)	Virus – Norovirus, Enterovirus, Enterovirus 71	Page 10
	Bacteria – <i>V.parahaemolyticus</i> , <i>S.aureus</i> , <i>B.cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S.typhimurium</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>E.coli</i> O157:H7	Page 10



Bioneer Worldwide

Headquarters

Address 8-11, Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon 306-220, Korea
Tel +82-42-930-8777 (Korea only: 1588-9788)
Fax +82-42-930-8600
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.co.kr

Pangyo R&D Center

Address #702, Building B, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-400
Tel +82-31-628-0500 (Korea only: 1588-9788)
Fax +82-31-628-0555
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.co.kr

Bioneer, Inc.

Address 1000 Atlantic Avenue Alameda, CA 94501 USA
Tel +1-877-264-4300 (Toll Free)
Fax +1-510-865-0350
E-mail order.usa@bioneer.com
Web us.bioneer.com

Bioneer Trade (Shanghai) Co, Ltd

Address 403 Room, Building 88, no.887, Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park, PuDong New District, Shanghai 201203, China
Tel +86-21-5080-0969
Fax +86-21-5080-1620
E-mail asan@bioneer.com
Web www.bioneer.com

Copyright © 2012 **Bioneer Corporation**. All rights reserved.

AccuPrep[®], *ExiPrep*[™] and *ExiStation*[™] are trademarks of Bioneer Corporation.

Please contact us for more information: md@bioneer.co.kr / ds@bioneer.co.kr