
인체자원 품질관리 안내서

Quick Start Guide

2019 Version 1.0



질병관리본부



국립중앙인체자원은행
NATIONAL BIOBANK OF KOREA



인체자원 품질관리 및 기탁절차에 대한 추가정보가 필요할 경우에는 국립보건연구원 홈페이지(<http://nih.go.kr> > 연구자원인프라 > 한국인체 자원은행사업 > 발간자료 > 국립중앙인체자원은행 업무매뉴얼) 또는 인체자원분양데스크 홈페이지(<http://koreabiobank.re.kr> > 발간자료 > 국립중앙인체자원은행 업무매뉴얼)를 참고하시거나 아래 연락처로 문의하여 주시기 바랍니다.

 인체자원 품질관리 관련 문의사항

- 기탁절차 : 043-719-6534
- 품질관리 : 043-719-6541
- 동 의 서 : 043-719-6536

목 차

- 1. Genomic DNA 품질관리**
 - 2. 체액자원 품질관리**
 - 3. 세포자원 품질관리**
 - 4. 인체자원 동의서 구독가이드**
-



Genomic DNA 품질기준

- DNA를 녹이는 용매는 DNA hydration solution 또는 TE buffer를 사용한다.
- 순도는 OD260/OD280 ratio 1.8 ~ 2.0, OD260/OD230 ratio 1.7 이상이 되어야 한다.
- DNA의 전기영동 결과 smeared band 또는 double band가 없어야 한다.
- Bacteria나 mycoplasma 오염이 없어야 한다.(단, 폐렴 등 특이질환자는 제외)
- 국립중앙인체자원은행에 기탁 시,
 - DNA 총 양은 100 μ g 이상으로, 농도는 500ng/ μ l \pm 10%이어야 한다.
 - * 단, 소아 또는 노인에서 채혈하는 등 특이사항이 있는 경우 협의 가능
 - 분주는 3개 바이알로 하며, 각 바이알 당 20 μ g, 20 μ g, 잔여량(rest)으로 한다.



Genomic DNA 품질관리 방법

1) gDNA 농도/순도 측정

- ① 균질하게 혼합한 gDNA 2 μ l를 분광흡광도계(NanoDrop spectrophotometer)에 적용하여 농도 및 순도(OD260/OD280, OD260/OD230)를 측정한다.

※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼 p45-53 참조

2) gDNA 안정성 검사(Gel 전기영동)

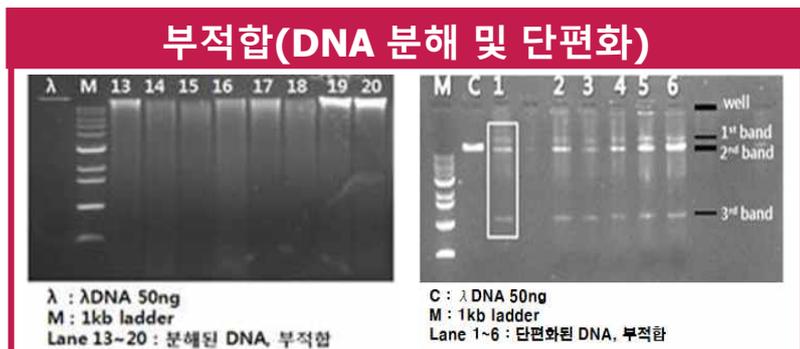
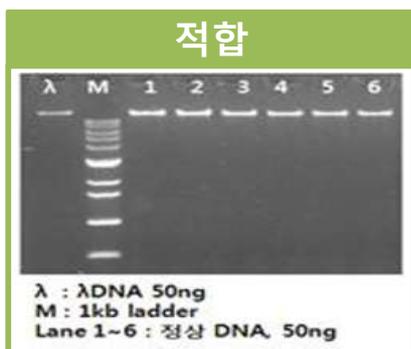
- ① 1XTBE buffer로 1% agarose gel을 제조한 후 DNA loading mixture 6 μ l(gDNA 50ng 포함)를 50V에서 2시간 전기영동한다.

* 전기영동 시 DNA size marker(1kb ladder), positive control(λ DNA 50ng)를 함께 loading한다.

- ② UV illuminator에서 전기영동 결과를 확인한다.

※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼 p54-59 참조

☞ gDNA 안정성 검사(Gel 전기영동) 판독 결과



Genomic DNA 품질관리 방법

3) gDNA 미생물 오염 검사

① gDNA의 미생물 오염 확인을 위해 다음 조성으로 각 미생물검사별 PCR mixture를 만든다.

시 약	Bacteria검사 조성($\mu\ell$)	Mycoplasma검사 조성($\mu\ell$)	최종농도
10×buffer	1.5	1.5	1×
2.5mM dNTP	1.2	1.2	0.2mM
Bacteria primer F/R(10pmoles/ $\mu\ell$)	각각 0.3		각각 0.2 μM
GAPDH primer F/R(10pmoles/ $\mu\ell$)	각각 0.1		각각 0.07 μM
Mycoplasma primer F/R(10pmoles/ $\mu\ell$)		각각 0.9	각각 0.6 μM
Taq polymerase(5.0U/ $\mu\ell$)	0.1	0.1	0.5U
멸균 증류수	9.4	8.4	
Template gDNA(100ng/ $\mu\ell$)	2	2	200ng
Total	15	15	

② 다음 조건으로 각 미생물 검사별 PCR을 수행한다.

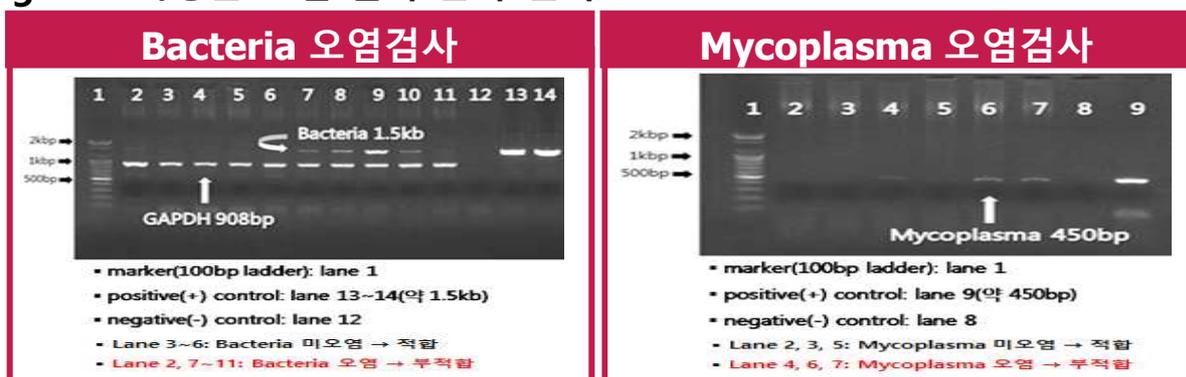
미생물 검사종류		Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
		Hold	35 cycles			Hold	Hold
Bacteria	(온도)	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
	(시간)	2 min	30 sec	40 sec	60 sec	10 min	∞
Mycoplasma	(온도)	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
	(시간)	2 min	30 sec	40 sec	60 sec	10 min	∞

③ PCR product 15 $\mu\ell$ 에 6x sample loading buffer 3 $\mu\ell$ 를 넣어 섞은 후 1% agarose gel에 6ul loading하고 150V, 30분간 1×TBE에서 전기영동한다.

④ UV illuminator에서 전기영동 결과를 확인한다.

※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼 p69-73 참조

gDNA 미생물 오염 검사 판독 결과



🔍 체액자원 품질기준: 혈장, 혈청, 뇨

- 혈장과 혈청은 혈색소가 육안으로 관찰되지 않아야 하나, 질환 및 환자의 특성에 따라 상이할 수 있다. 그러나 수집된 자원에서 혈색소가 관찰되는 수가 많다면, 혈액 채취방법을 점검할 필요가 있다.
- SPREC(Standard Preanalytical Code, 자원 제작 전처리 방법에 대한 코드), 체액자원 저장장비 유지 및 관리 자료를 확인할 수 있어야 하며, 자료를 검토하여 자원에 대한 전처리 단계와 보관 시 장비에 이상이 없음이 확인되어야 한다.
- 국립중앙인체자원은행에 기탁 시,
 - 바이알 당 자원의 양은 혈장과 혈청의 경우 300ul, 뇨의 경우 1ml이며, 동일 기증자의 자원을 5개 바이알 이상 기탁한다.

🔍 체액자원 품질관리 방법

- 체액자원의 품질을 직접적으로 확인할 수 있는 정도관리 지표가 아직까지 개발되지 않아 다음과 같이 간접적인 방법으로 품질을 관리한다.
 - ① SPREC(Standard Preanalytical Code, 자원 제작 전처리 방법에 대한 코드) 기록·관리
 - ※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 제작 및 등록 매뉴얼 [별첨 1] p33~40 참조
 - ② 자원 보관 장비에 대한 온도점검표, 유지보수 자료 등 유지 및 관리에 대한 자료 점검
 - ③ 혈청자원의 경우, 자원 제작 및 검사 과정에서 용혈, 황달, 지질혈증(HIL index ; Hemolysis, Icterus, Lipemia index) 정도 측정
 - ※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼 p38-39 참조

④ 세포자원 품질기준

- 해동 시 세포자원의 생존율은 최소 70% 이상이어야 한다.
- Bacteria나 mycoplasma 오염이 없어야 한다.
- 국립중앙인체자원은행에 기탁 시,
 - 바이알 당 세포 수는 5~10×10⁶개 이며, 동일 기증자의 자원을 5개 바이알 이상 기탁한다.
 - * 단, 세포 종류에 따라 바이알 당 세포 수 및 바이알 수는 조정 가능

④ 세포자원 품질관리 방법

1) 세포 생존율 검사

- ① 동결세포를 해동하여 세포 부유액 10ul를 취한 후 동량의 0.4% trypan blue solution을 넣고 pipetting으로 잘 섞어 세포를 염색한다
- ② 염색한 mixture 10ul를 hemocytometer 혹은 cell counting chamber(세포수 측정기용)에 loading한다.
- ③ Hemocytometer를 이용하여 현미경으로 세포 수 측정 시, 한 square 내 살아있는 세포(염색되지 않은 세포) 수(A)와 죽은 세포(짙은 푸른색으로 염색된 세포) 수(B)를 측정한다.
- ④ 세포 생존율과 세포 수를 다음과 같이 계산한다.

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ Cell viability(세포 생존율, \%)} &= \frac{\text{살아있는 세포 수(A)}}{\text{전체 세포 수(A+B)}} \times 100 \\ \blacksquare \text{ 1m}\ell\text{당 세포 수} &= (\text{한 square에 살아 있는 세포 수, A}) \times 2(\text{Trypan blue 희석배수}) \times 10^4 \\ \blacksquare \text{ 총 세포 수} &= \text{1m}\ell\text{당 세포 수} \times \text{PBS 혹은 배양배지 희석양(m}\ell\text{)} \end{aligned}$$

* 세포수 측정기는 총 세포 수, 살아있는 세포 수, 생존율 등 결과 값 자동 계산

2) 미생물 오염 검사

- ① 세포 배양과정에서 박테리아 및 곰팡이 오염을 1차적으로 육안 관찰하여 오염유무를 확인한다.
- ② 배양세포의 일부에서 gDNA를 추출하여 gDNA 미생물 오염 검사 절차에 따라 PCR방법을 이용하여 bacteria와 mycoplasma를 검사한다.

※ 상세내용은 국립중앙인체자원은행 인체자원 정도관리 매뉴얼 p81-86 참조

 인체자원 동의서 개요

- 인체자원의 기탁 및 기증을 위한 동의서는 두 가지 법정서식이 있으며, 둘 중 한 가지 동의서라도 구득하였다면 기탁이 가능합니다. 아래 동의서 목적에 따라 동의서를 구득하시고, 연구와 기탁을 모두 할 예정인 경우 두 가지 동의서 모두를 받는 것을 권장합니다.

구분	인체유래물 연구 동의서 [생명윤리법 시행규칙 제34호서식]	인체유래물등의 기증 동의서 [생명윤리법 시행규칙 제41호서식]
목적	연구자가 인체유래물 연구를 위해 구득하는 동의서(연구자용)	인체유래물은행에 기탁을 위해 구득하는 동의서(은행용)
IRB 제공심의	연구자가 중앙은행 기탁 시 기관 IRB 제공 심의를 받아야 함	연구자가 중앙은행 기탁 시 기관 IRB 제공 심의 필요 없음

 동의서 필수 확인(기재) 사항

- 기탁을 하고자 하는 인체자원은 반드시 해당 인체자원의 기증자로부터 동의서가 구득되어야 하며, 동의서 구득 정보가 미흡한 경우에는 기탁이 불가할 수 있습니다. 따라서 아래 내용을 확인하시어 동의서 구득 시 참고하시기 바랍니다.

구분	인체유래물 연구동의서	인체유래물등의 기증 동의서
공통 필수 정보	1. 기증자 성명 2. 기증자 생년월일(동일인 확인 시 필요) 3. 성별 4. 법 제16조 2항(동의능력이 없거나 불완전한 사람)의 법정대리인 성명, 관계 정보 작성 5. 동의서 작성일 6. 기증자(성명/서명) / 법정대리인이 있을 경우 법정대리인(성명/서명)	
양식별 필수 정보	연구동의서의 동의내용 [¶] ※ 동의내용 누락 및 중복표기는 기탁 불가	-
주의사항	중앙은행에 기탁을 원하는 경우 기탁 시점으로부터 동의 기간이 최소 5년 이상 필요(중앙은행 지침)	기증동의서 내에 인체유래물 은행명(질병관리본부)과 연락처 필수 기재

¶ 동의내용: 연구목적, 인체유래물 종류 및 수량, 인체유래물 보존기간, 보존 기간 내 2차적 사용을 위한 제공 여부, 2차적 사용을 위한 제공 시 개인식별정보 포함 여부

- 동의서 구득과 관련하여 문의사항이 있을 시 아래 연락처로 연락주시기 바랍니다.

 **동의서 구득 관련 문의 : 바이오뱅크과 연종우 (719-6536)**

인체자원 품질관리 안내서

Quick Start Guide

2019 Version 1.0

제작일 : 2019. 10. 8.

제 작 : 질병관리본부 국립보건연구원 유전체센터 바이오뱅크과