

# Sample Submission Guide

## for RNA-Seq or Microarray



### - 목 록 -

1. 세포(Cell) 샘플 준비
2. 조직(Tissue) 샘플 준비
3. 혈액(Blood) 샘플 준비
4. 미생물 샘플 준비
5. Total RNA 샘플 준비
6. 샘플 배송

# RNA Sample 준비 방법

## 1. 세포(Cell) 샘플 준비

### 1) 부착세포

- ① 세포를 원하는 조건에서 배양한 후 media 제거
- ② Cell culture dish에 1ml의 TRIzol reagent 처리 (cell :  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ )
- ③ Pipetting하여 세포를 파괴한 후  $-80^\circ\text{C}$  보관

### 2) 부유세포

- ① 세포를 원하는 조건에서 배양한 후 harvest한 후 centrifuge
- ② 상층액 제거 후 1ml의 TRIzol reagent 처리 (cell :  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ )
- ③ Pipetting하여 세포를 파괴한 후  $-80^\circ\text{C}$  보관

\* TRIzol 사용시 mRNA의 degradation을 피하기 위해 harvest 후 washing 과정을 권장 드리지 않습니다.

★ 다음은 Trizol 이용 시 예상되는 RNA양입니다. (tissue 1mg, cultured cell  $1 \times 10^6$  당)

Liver and spleen	6 ~ 10 ug
Kidney	3 ~4 ug
Skeletal muscles and brain	1 ~ 1.5 ug
Placenta	1 ~ 4 ug
Epithelial Cells ( $1 \times 10^6$ cultured cells)	8 ~ 15 ug
Fibroblasts ( $1 \times 10^6$ cultured cells)	5 ~ 7 ug

추출되는 RNA양은 species, developmental stage, growth condition, cell type, RNA 추출 시 사용하는 방법 등 다양한 요인에 따라 달라지게 됩니다. 이 점과 위의 내용을 참고하셔서 적절한 양의 sample을 준비하십시오.

## 2. 조직(Tissue) 샘플 준비

- 조직 샘플은 개체에서 절제된 이후 바로 세포 괴사와 RNA 분해가 시작되기 때문에, 가능한 빠른 시간 내에 RNA를 분리하는 것이 좋습니다.

바로 RNA 분리가 가능할 경우에는 조직을 TRIzol이 들어있는 tube에 넣고 power homogenizer (tissue grinder)를 이용하여 조직을 파괴합니다.

★ 바로 RNA를 분리하지 못하는 경우, 다음과 같은 방법으로 보관해 주시기 바랍니다.

### 1) 효소가 많이 없는 조직 (ex) brain, muscle, heart, etc.)

: 실험동물 개체에서 조직을 절제한 후 바로 액체 질소에 담근 뒤, 급속하게 냉각시켜서 deep-freezer에 보관해 주시면 됩니다.

### 2) 효소가 많은 조직 (ex) kidney, spleen, etc.)

: 실험동물 개체에서 조직을 절제한 후 적어도 한쪽의 두께가 5mm 이내가 되도록 신속하게 자른 후, 아래와 같은 방법으로 보관해 주시면 됩니다.

- ① 이바이오젠은 RNA degradation을 최소화 시키기 위해, RNAlater 사용을 권장 드립니다.
- ② Ambio 사에서 판매하는 RNAlater 시약에 절제한 조직을 넣습니다.  
(약 10배 volume의 RNAlater 사용)
- ③ 이후, Ambion 사에서 제공하는 protocol에 따라 조직을 보관해 주시면 됩니다.
- ④ RNAlater를 사용한 뒤 prep을 할 때에는, Trizol을 넣기 직전에 꼭 RNAlater를 제거하여 주십시오.
- ⑤ 저희에게 prep 의뢰 시에는 RNAlater 그대로 제공해 주시면 됩니다.

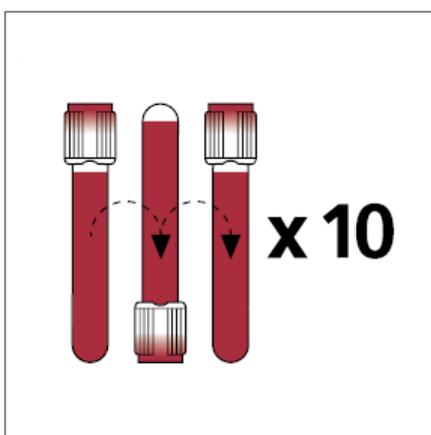
### 3. 혈액(Blood) 샘플 준비

- 혈액은 한번 얼렸다 녹이게 되면, 세포소기관 뿐만 아니라 RNA 또한 degradation이 되어 intact한 RNA를 얻는데 어려움이 있습니다. 아래 내용을 참고하셔서 적절한 양의 sample을 준비하십시오.

#### 1) Whole Blood

- 혈액 (whole blood) 샘플로 준비해 주시는 경우, PAXgene® blood RNA tube (PreAnalytiX)에 혈액을 담아 얼려서 저희에게 제공해 주시면 됩니다.

★ 채혈 후에 아래와 같이 준비해 주세요.



- ① PAXgene® blood RNA tube를 8~10번 상하로 뒤집어 섞어준다.
- ② PAXgene® blood RNA tube를 똑바로 세운 상태로 상온에서 2~7시간 또는 2-8°C에서 최대 120시간 안정화 시킨 후 장기 보관을 위해 냉동 상태(-20 ~ -70°C)로 보관한다.

#### ★ PAXgene Blood Tube Specification

Feature	Specification
Tube size	16 x 100 mm
Blood draw volume	2.5 ml
Additive/concentration	Additive 6.9 ml
Length of stabilization	up to 3 days at room temperature (15–25°C) up to 5 days at 2–8°C 8 years at –20°C or –70°C*
Closure type/color	BD Hemogard/Red
Label type	Paper
Quantity	100/box

\* PAXgene® blood RNA Tube는 (주)이바이오젠을 통해 구매하실 수 있습니다.

#### 2) Serum/Plasma

- ① Whole blood에서 centrifuge를 통해 serum 또는 plasma 분리
- ② 1.5ml tube에 약 250µl 이상 담아 -80°C 보관

#### 4. 미생물 샘플 (Bacteria / Yeast / Fungi) 준비

\* 미생물 샘플도 TRIZOL을 표준방법으로 사용합니다.

- ① Sample을 seeding하여 over-night culture
- ② Media에 1/100으로 dilution하여 exponential phase의 원하는 O.D.까지 배양
- ③ 미생물 cell pellet을 1.5ml tube에 대략 높이 1ml이 되도록 담아 얼려서 저희에게 제공해 주시면 됩니다.

##### ★ 주의사항

1.5ml 또는 50ml tube에 준비해 주시는 경우, tube의 면적이 cell pellet에 비해 훨씬 넓기 때문에 Cell pellet를 꺼내기 위해서는 tube를 깨트려야 합니다. 이 경우 샘플의 loss가 생길 수 있으니, 되도록 1.5ml tube를 사용해 주시길 권장 드립니다.

## 5. Total RNA 샘플 준비

### 1) Total RNA Extraction

- RNA 분리는 Invitrogen 사에서 제공하는 Trizol Method로 수행해주시면 됩니다.  
(human, mouse, rat, fly의 경우)
- 기타 column 방식의 kit로 total RNA extraction 하셔도 됩니다.  
단, microRNA 실험 시에는 kit 선택에 주의해주세요.

### 2) Total RNA Submission

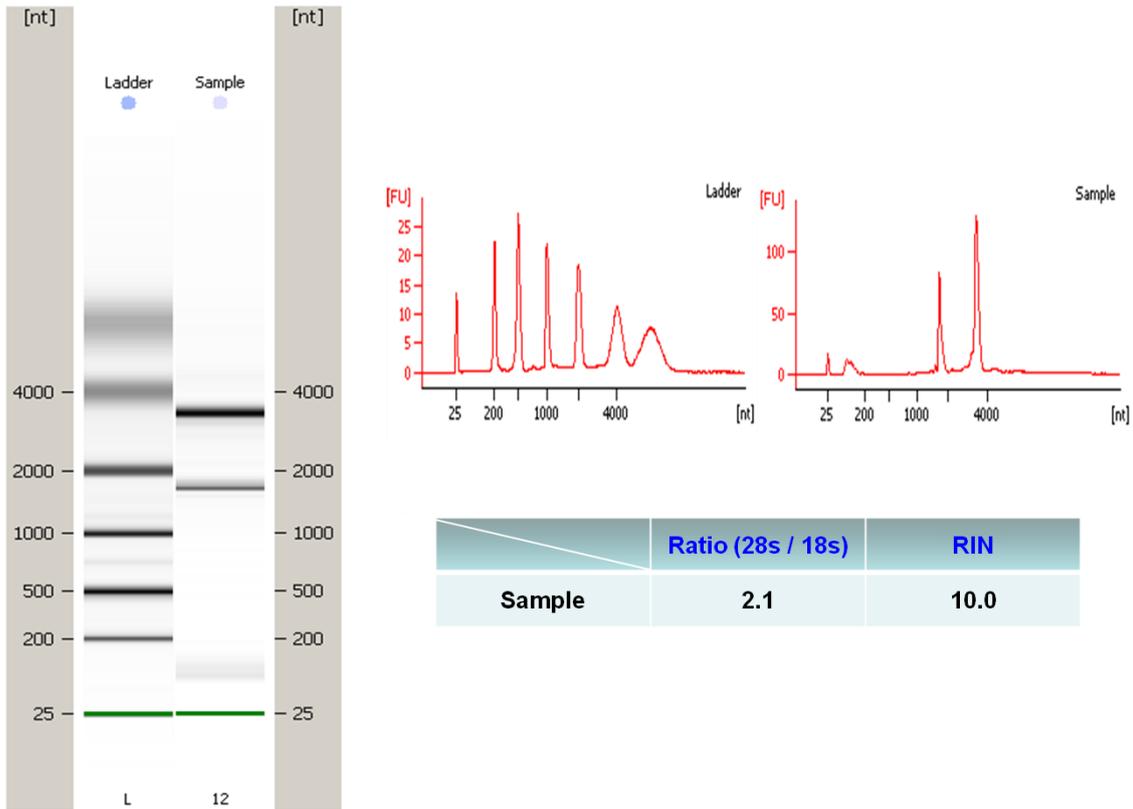
#### (1) Total RNA의 Concentration 및 Volume

- Total RNA는 반드시 RNase free water에 녹여져 있어야 합니다. 다른 buffer나 salt 등이 첨가되어 있을 경우 실험 진행에 영향을 미칠 수 있습니다.
  - ① Microarray / Total RNA-Seq / mRNA-Seq
    - Concentration : 200ng/ $\mu$ l, 총 2 $\mu$ g 이상
    - Volume : 최소 15 $\mu$ l 이상
  - ② Quant-Seq / Ampli-Seq
    - Concentration : 100 $\mu$ g/ $\mu$ l, 총 1 $\mu$ g 이상
    - Volume : 최소 15 $\mu$ l 이상

#### (2) Total RNA의 Quality Check

- 성공적인 실험을 위해서는 양질의 RNA 샘플이 가장 중요 합니다.
- Total RNA 샘플이 실험에 적당한 순도와 온전한 상태인지를 확인하기 위하여 다음과 같은 QC 과정을 수행합니다. 가능하시다면 아래와 같은 QC를 진행하신 후 샘플을 보내주세요.
- ①  $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ ,  $OD_{260}/OD_{230} > 1.6$
  - ② RNA Ratio (28S/18S) > 1.5
  - ③ RIN (RNA Integrity Number) value > 7.0

★ 정확한 판단을 위해 Agilent 2100 Bioanalyzer 장비 (capillary electrophoresis)를 이용해 total RNA의 quality를 측정 한 후, 실험을 진행합니다.



- 본 장비에서 제시하는 RIN 값은 migration 및 peak pattern, 28S/18S ribosomal RNA의 비율을 근거로 한 통계적인 수치로서 1~10의 범위를 가지며, 진핵생물 total RNA samples의 quality 지표로 사용되고 있습니다. High quality 시료를 요하는 DNA microarray analysis를 위한 권장 값은 7.0 이상 입니다.

## 6. 샘플 배송

- 준비하신 total RNA 샘플은 deep-freezer에 보관하시고, 샘플을 보내주실 때에는 아래와 같은 방법으로 보내주시기 바랍니다.
- 서울과 경기 일부는 이바이오젠에서 직접 방문하여 샘플을 수령하고 있습니다.
  - ① 의뢰하시는 실험 서비스에 해당하는 주문서에 서비스 정보 및 시료 정보, 분석 정보를 기입
  - ② 배송 중 샘플 tube의 파손을 막기 위하여 deep-freezer에 보관 중인 샘플 tube를 50ml tube나 sample box에 packing
  - ③ 드라이 아이스와 함께 아이스 박스에 샘플과 주문서를 동봉
  - ④ 익일 택배를 이용하여 아래 주소로 발송

### <샘플 배송 주소>

서울시 영등포구 선유로 13길 25, 에이스하이테크시티 2차 304-1호, (주)이바이오젠

Tel : 02-3141-0791

\* 택배 보내신 후 택배 회사와 운송장 정보를 알려주시면 감사하겠습니다.