

# 국가줄기세포은행 표준절차서

Standard Operation Procedures for National Stem Cell Bank  
of Korea

2017.12.31.

Ver. 3.0



질병관리본부  
국립보건연구원

본 문서는 국립보건연구원이 운영하는 국가출기세포은행의  
내부절차서입니다.

※ 본 절차서에 대하여 궁금한 사항은 아래로 문의하시기 바랍니다.

---

국립보건연구원	전화 : 043-249-2518
생명의과학센터	팩스 : 043-249-2548
난치성질환과	이메일 : hahy0130@korea.kr

---

# 목 차

<u>문서번호</u>	<u>제 목</u>	
NSCB-2016-1	인간 전분화능줄기세포주의 기탁, 보존, 분양	1
NSCB-2016-2	임상용 역분화줄기세포주를 위한 세포기증동의서 및 기증자적합성 기준	9
SOP#1	바이러스, 세균 및 진균 오염 시험	31
SOP#2	STR 검사	34
SOP#3	핵형 분석	37
SOP#4	HLA 유전자형 검사	40
SOP#5	마이코플라스마 시험 (PCR)	43
SOP#6	마이코플라스마 시험 (루미노메터)	49
SOP#7	세포부착 및 형태 관찰	54
SOP#8	세포생존율 측정 [Trypan blue]	57
SOP#8.2	세포생존율 측정 [Cell counter]	61
SOP#9	세포성장을 측정	65
SOP#10	STO 세포 배양접시의 준비	69
SOP#11	STO 동결 및 해동	72
SOP#12	STO 세포 입수 및 원물질 스톡 제조	76
SOP#13	인간 전분화능줄기세포 배양액 제조	80
SOP#14	인간 전분화능줄기세포 배양 (STO 세포 공동배양)	84
SOP#15	인간 전분화능줄기세포 계대	86
SOP#16	인간 전분화능줄기세포의 미분화 특성검사 (AP)	90
SOP#17	인간 전분화능줄기세포의 배아체 형성 시험	93
SOP#18	인간 전분화능줄기세포 해동	97
SOP#19.1	인간 전분화능줄기세포 동결 [cell-freezing container]	99
SOP#19.2	인간 전분화능줄기세포 동결 [CRF]	102
SOP#20	RNA 추출 및 cDNA 합성	105
SOP#21	비정량적 유전자 발현 조사	111
SOP#22	정량적 유전자 발현 조사	116
SOP#23	면역세포화학법을 이용한 마커 발현 조사	121
SOP#24	인간 전분화능줄기세포의 기형종 형성시험	125
SOP#25	ABO 유전자형 분석	130
SOP#26	줄기세포주의 유전체 분석 [CNV]	132
SOP#101	Xeno-free 세포 배양 접시의 준비	136
SOP#102	인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 배양액 제조	138
SOP#103	인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 계대 배양	140
SOP#104.1	인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 동결 [Cell-freezing container]	143
SOP#104.2	인간 전분화능줄기세포 Xeno-free 동결 [CRF]	146
SOP#105	Xeno-free 배양을 위한 인간 전분화능줄기세포 해동	149

## 인간 전분화능줄기세포주의 기탁, 보존, 분양

### Standard Operating Procedure for deposit, banking, and distribution of human pluripotent stem cell line

#### I 서론

본 절차서는 국가줄기세포은행 (이하 ‘은행’)에서 인간 전분화능줄기세포주 (이하 ‘줄기세포주’)<sup>1)</sup>를 기탁 받아 banking하고 분양하는 절차와 기준을 정하는데 목적이 있다.

은행은 연구자에게 고품질의 줄기세포주를 안정적으로 공급하여 연구자들이 전분화능줄기세포 연구에 보다 쉽게 접근하여 다양한 기초 연구와 실용화 연구가 이루어질 수 있도록 지원하고자 한다.

이를 위해 은행은 줄기세포주를 고유의 전분화능 (pluripotency)과 무한 증식능력 (self-renewal capacity)이 유지되며 바이러스, 세균, 진균 등에 오염되지 않도록 관리하고, 이를 동결 저장하여 연구자에게 공급함을 목표로 한다.

줄기세포주의 안정적 품질관리와 원활한 공급을 위해 「국가줄기세포은행 운영규정」<sup>2)</sup>와 「국가줄기세포은행 표준운영지침」(이하 “표준운영지침”)<sup>3)</sup>따라 본 절차서를 마련하여 줄기세포주의 기탁, 보존과 분양의 세부사항을 정하고자 한다. 줄기세포주의 배양 및 특성분석 등의 세부 절차는 별도의 절차에 자세한 사항을 기술한다.

#### II 절차

##### 1. 기탁 신청

- ① 인간 전분화능줄기세포주를 국가줄기세포은행에 기탁하고자 하는 연구자가 은행에 기탁 신청서를 작성하여 제출
- ② 은행 담당자는 기탁 신청서를 비전자문서로 접수하고, 기탁 신청 접수결과를 문서로

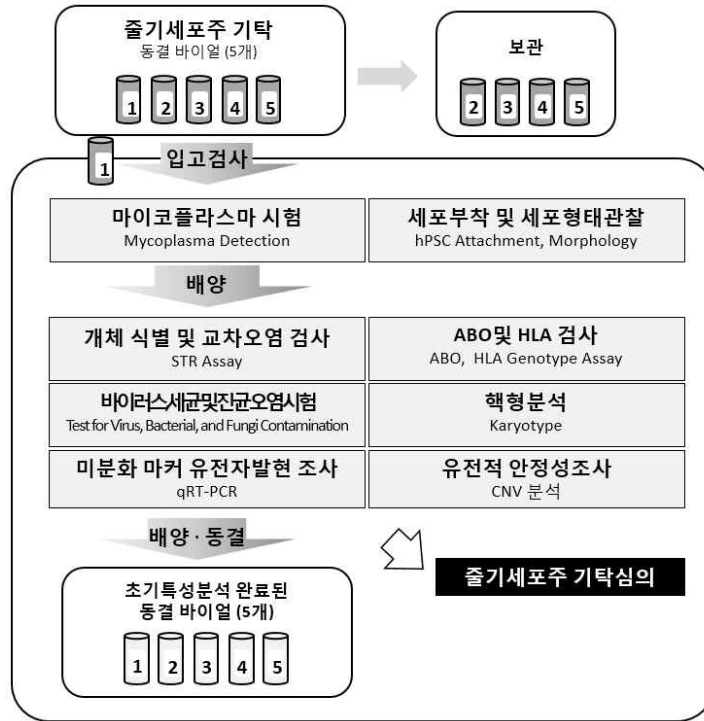
1) “전분화능줄기세포주”는 인체를 구성하고 있는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있고, 무한히 증식할 수 있는 배아줄기세포주 (embryonic stem cell line)와 역분화줄기세포주 (induced pluripotent stem cell line) 등을 말함

2) 질병관리본부 예규 292호 (개정2016.6.17)

3) 국가줄기세포은행 표준운영지침 (개정2016.3.14)

작성하여 이메일로 연구자에게 통보. 단, 내부 기탁의 경우에는 자체적으로 기탁 신청사항을 담당자가 메모보고로 보고

- ③ 은행 담당자는 기탁기관과 수령 방법 및 일자 등을 협의하여 동결 상태의 줄기세포주 바이얼 5개와 줄기세포주 기탁계약서 2부를 수령
- ④ 수령한 5개의 동결 바이얼은 지정된 증기상 (vapor phase) 액체질소탱크에 저장하고 은행 일정에 따라 초기 특성분석 실시



<그림> 기탁, 초기특성분석 및 기탁심의 절차

## 2. 초기특성분석

- ① 기탁된 1개의 바이얼은 해동하여 마이코플라스마 시험 및 세포부착 및 세포형태 확인을 위하여 기탁자 제공정보에서 feeder의 종류와 배양조건을 확인하여 불활화된 STO 세포 또는 feeder matrix (martigel, vitronectin, laminin 등) 배양접시 (35 mm 배양접시)에 파종하여 배양
  - ※ STO 준비 (SOP#확인)
  - ※ matrix 준비 (SOP#확인)
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 해동 (SOP#18) 참조
- ② 배양 후 2~3일째에 줄기세포 배양액을 채취하여 마이코플라스마 시험을 실시하고, 7일 또는 10일째에 세포부착 및 세포형태를 관찰하고 이미지를 캡처한다.
  - ※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5)
  - ※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (STO 세포 공동배양) (SOP#14) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 feeder free 배양 (SOP#1@) 참조

- ※ 마이코플라스마 시험은 계대 배양 시 매주 실시
- ③ 마이코플라스마 시험 및 세포부착을 확인한 줄기세포는 35 mm 배양접시에서 배양하여 7일째에 4개의 불활화된 STO 세포 또는 feeder matrix (martigel, vitronectin, laminine 등) 배양접시 (35 mm 배양접시)에 계대
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 계대 배양 (SOP#15) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 feeder free 배양 (SOP#1@) 참조
- ④ 계대 배양 중인 4개의 35 mm 배양접시 중 1개의 배양접시에 대해 배양 4일째 배양액 교체 시 배양접시 내의 배양액 2 ml을 수거하여 바이러스, 세균 및 진균 오염 시험 실시
  - ※ 바이러스, 세균 및 진균 오염 시험 (SOP#1) 참조
- ⑤ 7일간 배양한 4개의 35 mm 배양접시 내 줄기세포를 16개의 feeder matrix (martigel, vitronectin, laminine 등) 배양접시 (35 mm 배양접시)에 계대
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 계대 배양 (SOP#15) 참조
  - ※ 면역세포화학법을 이용한 미분화마커 발현 조사 (SOP#23) 참조
- ⑥ 배양 6일째 배양접시 각 1개씩을 이용하여 줄기세포 콜로니로 핵형분석, HLA 유전자형 검사, STR 검사와 ABO 유전자형 검사를 실시
  - ※ STR 검사 (SOP#2) 참조
  - ※ 핵형분석 (SOP#3) 참조
  - ※ HLA 유전자형 검사 (SOP#4) 참조
  - ※ ABO 유전자형 검사 (SOP#25) 참조
- ⑦ 35 mm 배양접시 중 1개 줄기세포는 배양 6~7일째에 미분화 특성검사 (Alkaline Phosphatase (AP) 염색) 실시하고, 2개는 콜로니를 수거한 후 배아체 형성 시험 실시
  - ※ 인간 전분화능줄기세포의 미분화 특성검사 (AP 염색) (SOP#16) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포의 배아체 형성 시험 (SOP#17) 참조
- ⑧ 35 mm 배양접시 중 1개 줄기세포는 배양 7일의 콜로니를 수거하여 RNA를 추출하고 이를 이용하여 정량적 분화마커 발현 조사 (qRT-PCR) 실시
  - ※ RNA 추출 및 cDNA 합성 (SOP#20) 참조
  - ※ 정량적 미분화 및 분화마커 발현 조사법 (SOP#22) 참조
- ⑨ 35 mm 배양접시 중 1개 줄기세포는 배양 7일의 콜로니를 수거하여 DNA를 추출하고 이를 이용하여 CNV 실시
  - ※ DNA 추출 (SOP#만들기) 참조
  - ※ CNV 분석 요청 (SOP#만들기) 참조
- ⑩ 잔여 배양접시는 계대 배양하고 각 바이얼 당 콜로니 약 100개에 해당하는 인간 전분화능줄기세포를 확보하여 5개의 동결 바이얼을 저장
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 동결 (SOP#19) 참조
- ⑪ 기탁 동결 바이얼의 해동 후 상기 ②의 과정에서 줄기세포의 콜로니를 관찰할 수 없거나 회수하여 계대배양하기 부적절한 수를 관찰하면, 기탁 동결 바이얼을 1개

해동하여 세포생존율을 확인한다.

※ 세포생존율 (SOP#8) 참조

### 3. 은행 심의위원회 기탁 심사 및 기탁 완료

※ 표준운영지침에 따름

※ 마이코플라스마 오염 등으로 기탁에 부적합할 경우 심의 후 1개월 내 결과 통보

### 4. 줄기세포주의 보존

#### 4.1 Pre-master cell bank (PCB) 구축

① 기탁이 결정된 줄기세포주는 초기특성분석을 완료하여 보관중인 5개의 동결 바이얼 중 1개를 해동한 후 마이코플라스마 시험과 세포부착 및 형태를 관찰하고 계대 배양 실시

※ 인간 전분화능줄기세포 해동 (SOP#18)

※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5) 참조

※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7) 참조

※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (STO 세포 공동배양) (SOP#14)

※ 인간 전분화능줄기세포 계대 배양 (SOP#15) 참조

② 계대 배양 중 적절한 수량의 줄기세포 배양 접시를 확보하여 아래의 항목과 같이 PCB에 대한 특성 분석 실시

※ STR 검사 (SOP#2) 참조

※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7)

※ 핵형분석 (SOP#3) 참조

※ HLA 유전자형 검사 (SOP#4) 참조

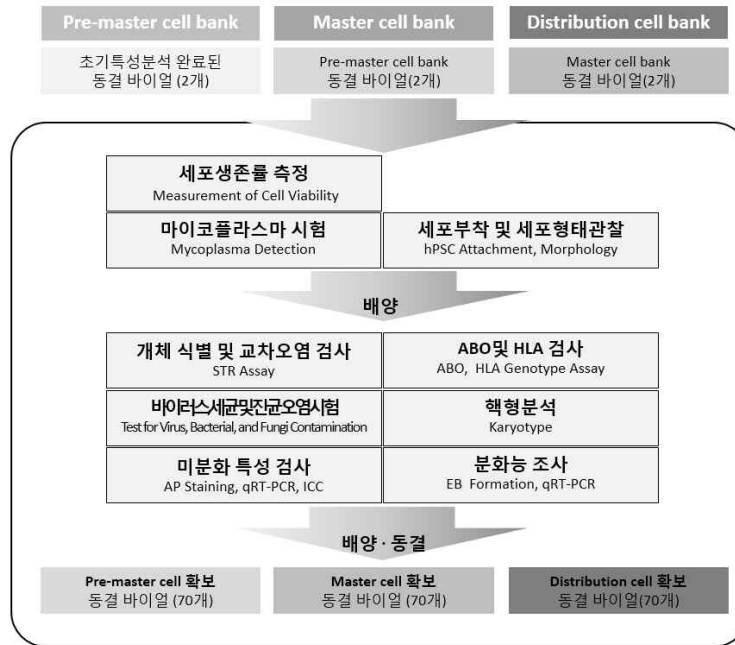
※ ABO 유전자형 검사 (SOP#25) 참조

※ 면역세포화학법을 이용한 미분화마커 발현 조사(SOP#23)

③ 특성분석 결과가 적합한 경우, 각 바이얼 당 줄기세포 약 100개씩의 콜로니를 70 바이얼에 나누어 동결 저장하여 PCB를 구축

※ 인간 전분화능줄기세포 동결 (SOP#19) 참조

※ PCB는 해동 후 5주 이내에 수립



<그림> PCB, MCB, 및 DCB 구축 절차

#### 4.2 Master cell bank (MCB) 구축

- ① 보관중인 PCB의 줄기세포 중 1 개의 바이얼을 해동하여 즉시 세포생존율을 측정
  - ※ 세포생존율 (SOP#8) 참조
- ② 1개의 PCB 바이얼을 해동하여 마이코플라스마 시험 및 세포부착 및 형태를 관찰하고 계대 배양 실시
  - ※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5) 참조
  - ※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7) 참조
- ③ 계대 배양 중 적절한 수량의 줄기세포 배양 접시를 확보하여 아래의 항목과 같이 MCB에 대한 특성 분석 실시
  - ※ STR 검사 (SOP#2) 참조
  - ※ 바이러스, 세균 및 진균 오염 시험 (SOP#1) 참조
  - ※ 핵형분석 (SOP#3) 참조
  - ※ 면역세포화학법을 이용한 미분화마커 발현 조사 (SOP#23) 참조
  - ※ 미분화 특성검사 (AP 염색) (SOP#16) 참조
  - ※ RNA 추출 및 cDNA 합성 (SOP#20) 참조
  - ※ 정량적 미분화 및 분화마커 발현 조사 (SOP#22) 참조
- ④ 특성분석 결과가 적합한 경우, 각 바이얼 당 줄기세포 콜로니가 100개 가량 포함 되도록 70 개의 바이얼에 나누어 동결 저장하여 MCB를 구축
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 동결 (SOP#19) 참조
  - ※ MCB는 PCB 해동 후 10주 이내에 수립



#### 4.3. Distribution cell bank (DCB) 구축

- ① 보관중인 MCB의 줄기세포 중 1 개의 바이얼을 해동하여 즉시 세포생존율을 측정
  - ※ 세포생존율 (SOP#8) 참조
- ② 1개의 MCB 바이얼을 해동하여 마이코플라스마 시험 및 세포부착 및 형태를 관찰하고 계대 배양 실시
  - ※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5) 참조
  - ※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7) 참조
- ③ 계대 배양 중 적절한 수량의 줄기세포 배양 접시를 확보하여 아래의 항목과 같이 MCB에 대한 특성 분석 실시
  - ※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5) 참조
  - ※ 세포부착 및 세포형태 관찰 (SOP#7) 참조
  - ※ STR 검사 (SOP#2) 참조
  - ※ 바이러스, 세균 및 진균 오염 시험(SOP#1) 참조
  - ※ 핵형분석 (SOP#3) 참조
  - ※ 면역세포화학법을 이용한 미분화마커 발현 조사 (SOP#23) 참조
  - ※ 미분화 특성검사 (AP 염색)(SOP#16) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포의 배아체 형성 시험 (SOP#17) 참조
  - ※ 정량적 미분화 및 분화마커 발현 조사 (SOP#22) 참조
- ④ 특성분석 결과가 적합한 경우, 각 바이얼 당 줄기세포 콜로니가 100개 가량 포함 되도록 70 바이얼에 나누어 동결 저장하여 DCB를 구축
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 동결 (SOP#19) 참조
  - ※ DCB는 MCB 세포 해동 후 10주 이내에 수립

#### 5. 출고 검사

- ① 동결 저장된 줄기세포는 분양 전에 품질 검사를 실시
- ② 동결 저장 후 최소 1주 이상 경과한 바이얼 2개를 해동하여 1개는 세포생존율 및 마이코플라스마 검사 실시하고, 1개는 불활성화된 STO 세포가 파종된 35 mm 배양 접시에 계대에 줄기세포를 계대 배양하여 핵형검사를 실시
  - ※ 세포생존율 (SOP#8) 참조
  - ※ 마이코플라스마 시험 (SOP#5) 참조
  - ※ 핵형분석 (SOP#3) 참조

#### 6. 줄기세포주의 분양

- ① 연구자가 제출한 분양신청서 및 이용계획서 상의 줄기세포주 명칭 및 수량을 검토하여 분양 여부를 결정
- ② 역분화줄기세포주에 대해서는 은행 자체 검토(과장, 연구관, 담당자)를 거쳐 분양하고, 배아줄기세포주에 대해서는 질병관리본부 기관생명윤리위원회에 제공에 관한 심

의를 요청하여 심의결과를 통보 받은 후 제공

- ③ (줄기세포주의 제공) 은행에서 줄기세포주의 제공은 신청한 줄기세포주별로 동결 바이얼 2개 제공하는 것을 원칙으로 하되, 필요에 따라 조정 가능
- ② (재분양) 은행으로부터 줄기세포주를 분양받은 신청자가 「줄기세포주분양계약서」에 명시된 계약기간 이내에 동일한 줄기세포주에 대하여 신청을 한 경우에는 1회에 한해서 재분양 신청을 할 수 있음
  - 은행은 분양신청자로부터 「줄기세포주 분양신청서[재분양]」를 제출 받고 기 작성된 「줄기세포주분양계약서」와 「줄기세포주이용계획서」에 의거하여 줄기세포주를 제공함
  - 은행은 재분양 신청에 대한 심의가 완료되면 해당 줄기세포주 동결 바이얼 1개를 분양신청자에게 제공함

[별첨1]

## 국가줄기세포은행 줄기세포주 특성분석 항목

제정 2013. 5.30.

개정 2017. 3.15.

개정 2016.11.30.

분석내용	입고검사	PCB	MCB	DCB	출고검사
STR 검사	V	V	V	V	V
HLA 유전자형 분석	V	-	-	-	-
ABO 유전자형 분석	V	-	-	-	-
유전적 안정성 분석(CNV 분석)	V	*	*	*	-
마이코플라스마 시험	V	V	V	V	V
바이러스, 세균 및 진균 오염 시험	V	-	-	-	V
세포생존율 시험(Cell counter)	*	*	*	*	V
세포부착 및 세포형태 관찰	V	V	V	V	-
세포성장을 시험(Cell doubling time)	-	*	*	*	-
핵형분석	V	V	V	V	V
AP staining	-	V	V	V	-
ICC 미분화	-	V	V	V	-
RT-PCR 미분화(Real-time)	V	V	V	V	-
EB 형성	-	V	V	V	-
RT-PCR 분화(Real-time)	-	V	V	V	-
기형종 검사	-	**	**	**	-
Parental cell STR 검사(iPSC)	V	-	-	-	-
Parental cell HLA 분석(iPSC)	*	*	-	-	-
Parental cell ABO형 분석(iPSC)	*	*	-	-	-

- V 분석 수행. - 분석 수행 하지 않음,
- \* 필요에 따라 수행, \*\* 단계별 banking 중 1회 실시
- <예시> 세포생존율 시험 \* 동결바이얼 해동 후 세포부착실패일 경우 여분의 동결바이얼 검사
- 입고검사 후 기탁심의
- 출고검사는 동결 후 최소 1주 이상 경과 후 실시하고 배치(batch) 당 1회 이상 실시
- banking은 3단계(PCB, MCB, DCB)를 원칙으로 하되, 질환자 역분화줄기세포주 등의 특정 연구를 위한 줄기세포주의 경우, 활용도를 고려하여 2단계(PCB, MCB) banking 가능

## 임상용 역분화줄기세포주를 위한 세포기증동의서 및 기증자적합성 기준

### Standard Procedures for Informed Consent of Somatic Cell or Tissue Donation and Donor Eligibility for Clinical-Grade Induced Pluripotent Stem Cell line

#### I 서론

본 절차서는 국립줄기세포재생센터(국가줄기세포은행, 이하 은행)에서 줄기세포치료제의 원료물질인 임상용 역분화줄기세포주(이하 줄기세포주)를 수립하고자 할 때, 체세포 등을 기증하는 사람(이하 기증자)에게 충분한 정보를 제공한 후에 기증에 대한 서면 동의를 받는 절차와 이들 기증자의 체세포 등이 의학적으로 적합한지를 확인하는 절차와 기준을 정하는데 있다.

적용대상은 은행에서 직접 수립하는 임상용 줄기세포주이다. 이 절차서 이전에 이미 수립되어 은행에 기탁된 줄기세포주에 대해서는 최대한 기증자 적합성 정보를 수집하고 실험실 검사가 누락된 경우에는 수립된 줄기세포주를 이용한 시험결과로 기증자 적합성을 평가한다.

줄기세포주를 수립하기 위해 필요한 세포와 그에 관련된 정보를 기증자로부터 제공받기 위해서는 체세포 등을 채취하기 전에 충분한 정보를 제공하고 자발적인 동의를 얻어야 한다. 줄기세포주의 활용성과 배양 과정에서 작업자의 안전을 위해 감염성 병원체와 유전질환을 가진 세포는 배제할 필요가 있다. 이를 위한 병원체 검사와 염색체에 대한 분석이 이루어질 수 있음을 기증자에게 알려야 한다.

인체유래물 등의 연구용 기증 절차와 서식은 「생명윤리 및 안전에 관한 법률」에서 정하는 규정을 따라야 하며, 기증자 적합성 평가에 대해서는 약사법, 제대혈 관리 및 연구에 관한 법률 등 관련 법률 및 그 하위 규정을 따라야 한다. 본 절차서는 식품의약품안전평가원의 「세포치료제 공여자 적합성 평가 가이드라인(2016.8)」을 반영하여 작성되었다.

#### 2. 동의서 (Informed consent)

##### 2.1 기증자 동의에 관한 일반 원칙

##### 2.1.1. 동의권자의 자발적 동의

- ① 줄기세포주의 수립에 이용될 체세포 등을 기증하는 사람에게 이용 목적과 계획을 설명하고 자발적으로 서면동의서에 서명하도록 하여야 한다.
- ② 동의능력이 없거나 불완전한 사람의 세포를 이용해야 하는 경우에는 법정대리인의 동의를 받아야 한다.
- ③ 동의를 받을 때에는 충분한 정보를 제공하여야 하며, 기증자가 이해할 수 있는 용어와 방식으로 그 내용을 설명하여야 하며, 이를 위하여 동의를 받는 사람은 그와 관련하여 교육을 받아야 한다.
- ④ 기증자는 체세포 등의 기증에 대한 결정을 위하여 설명자에게 질문할 수 있고, 주변의 사람들에게 조언을 구할 기회를 요청할 수도 있다.
- ⑤ 체세포 등의 기증은 무상 원칙임을 동의서에 명시하여야 한다. 다만, 채취 등 기증 과정에서 발생하는 비용은 적절한 한도 내에서 실비를 보상할 수 있으며, 이 경우 보상 내용에 대해 설명하여야 한다.

### 2.1.2. 동의 변경 및 철회 가능성

- ① 동의 내용이나 동의한 사항에 대하여 기증자의 결정에 변경이 있는 경우에는 이를 수용해야 한다.
- ② 동의한 후에도 원칙적으로 언제든지 변경 및 철회를 할 수 있지만, 기증된 체세포 등으로부터 이미 줄기세포주가 수립되어 연구에 활용된 경우에는 해당 연구로부터 줄기세포를 제외하는 것이 제한될 수 있다는 점을 설명해야 한다.
- ③ 기증자가 동의를 변경하거나 철회할 경우 기증자의 정보 등 연구자가 보유하고 있는 정보가 어떻게 처리되는지에 대해서도 사전에 설명해야 한다.
- ④ 기증자가 동의를 변경하거나 철회하려는 경우 연락할 수 있는 연락처와 방법에 대해 동의서에 명시해야 한다.

## 2.2. 연구의 목적 및 이용 절차에 대한 설명 내용

### 2.2.1. 연구의 목적 및 이용 절차

- ① 줄기세포를 이용하는 연구의 목적을 분명히 밝혀야 한다. 특히, 임상용 줄기세포연구를 위한 경우에는 임상연구임을 밝혀야 한다.
- ② 임상용 줄기세포연구의 경우에는 기증자의 생체정보를 가지고 있는 세포가 임상연구의 연구대상자에게 이식될 수 있음을 기증자에게 설명해야 한다.
- ③ 기증을 결정하게 되면 어떠한 절차를 거쳐야 하는지에 대해 정보를 제공해야 한다.
- ④ 기증자에게 자신의 세포가 어떤 과정을 거쳐 줄기세포주로 수립되는지, 그 과정에 대해 설명해야 한다.

### 2.2.2. 위험과 이득

- ① 기증으로 인한 직접적·잠재적 위험은 모두 설명해야 한다.
- ② 신체적인 위험 외에도 심리적 위험이 있을 수 있음을 알려야 하고, 필요할 경우 적절한 상담을 받을 수 있다는 점도 설명해야 한다.
- ③ 기증자에게는 연구결과로 직접적으로 얻어지는 의료혜택이 없다는 점과 이후에 연구결과로 인하여 상업적 개발과 특허 등 재산권이 발생할 때에도 기증자에게는 권리가 없다는 점도 설명해야 한다.

### 2.2.3. 개인정보보호

- ① 기증자의 프라이버시는 보호되어야 하지만, 연구과정과 임상적용에서의 안전성 확보를 위해 어느 정도의 의학정보, 추적가능성을 위한 정보 등은 연구자가 접근가능한 시스템이 마련되어야 하고, 이러한 시스템에 대한 설명이 이루어져야 한다.
- ② 기증자의 개인식별정보는 공개되지 않으며, 연구과제에서는 코드화 등 보호장치가 마련되어 있다는 점, 따라서 연구결과를 발표할 때에도 기증자가 누구인지 밝혀지지 않는다는 점을 설명해야 한다.
- ③ 관계법령에 따라 정부부처 등 규제기관이 연구를 심의 관리하는 과정에서 기증자의 정보를 포함하여 연구과제를 심사할 수도 있지만, 그럼에도 개인정보는 보호된다는 점을 명시해야 한다.
- ④ 줄기세포주 수립 후 이를 연구에 제공하게 될 경우, 기증자의 유전정보가 분석될 수 있으며, 연구결과를 통하여 기증자의 건강과 관련하여 중요한 정보가 나온 경우에 이를 전달받을 권리가 있으며, 그 방법에 대한 설명도 있어야 한다.

### 2.2.4. 동의서 설명 및 구득

- ① 동의서는 별표 1에 예시한 서식을 활용하되 필요에 따라 적절히 수정하여 사용할 수 있다.
- ② 동의서는 기증자로부터 인체유래물을 채취하는 의료진이 설명한다.
- ③ 동의서를 받는 의료진은 기증자의 서명을 확인하고 향후 기증받은 세포, 문진표와 함께 은행에 제출한다.

## 3. 기증자 적합성 (Donor eligibility)

### 3.1. 기증자 선별

- ① 체세포 등을 기증을 희망하는 사람의 감염병 및 기타 질병이나 약물 복용 등 의학·사회적 이력(Medical and Social History)에 대한 평가가 필요하다. 이를 위해 과거 병력 등에 대한 평가를 거쳐 결격사유가 없는 사람에 대해 실험실 검사를 실시하여 최종적으로 세포 기증자로서의 적합성을 결정한다.
- ② 감염병, 약물 복용, 유전질환 내력 등 의학·사회적 이력에 대한 문진표는 별표 2을 활용한다.
- ③ 문진표는 감염병 유행 등 상황을 고려하여 필요에 따라 문진 내용을 추가하여 활용할 수 있다.

- ④ 의료기관의 의료진은 기증자에게 문진표를 설명하고 문진 결과를 확인하여 감염병 감염 가능성과 특정 질병에 대한 가족력이 없는 것이 확인된 경우에만 인체유래물을 채취하여 실험실 검사를 진행한다.

### 3.2. 실험실 검사

#### 3.2.1. 검사항목

- ① 모든 기증자에 대해 HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, 매독 검사를 실시하고 그 결과가 음성이어야 한다.
- ② 세포 또는 조직의 종류에 따라 추가적인 검사를 실시해야 한다. 혈액 등 백혈구를 많이 포함하는 세포나 조직의 경우 인체 T림프영양성바이러스(HTLV type 1, 2)와 거대세포바이러스(CMV) 감염 여부를 확인하고, 생식기 감염병의 노출 위험이 있는 소변 등의 인체유래물을 채취할 경우에는 임질(Nesseria gonorrhoea)과 비임균성 요도염(Chlamydia trachomatis) 검사를 추가로 실시한다.
- ③ 기증 시기 및 기증자 문진 결과에 따라 검사항목을 추가할 수 있다.

#### 3.2.2. 검체 채취 시기

- ① 기증자의 감염원 보유 여부를 검사하기 위한 시료는 기증 세포를 채취하는 시기와 동시에 실시하는 것을 원칙으로 하되, 불가피한 경우에만 검사를 위한 채혈을 별도로 실시하되, 이 때에도 세포 채취 전후 7일 이내에 실시한다.

#### 3.2.3. 검체 채취 대상

- ① 줄기세포주의 수립에 사용할 인체유래물을 대상으로 실험실 검사를 실시하는 것을 원칙으로 한다. 단, 줄기세포주 수립에 이용할 기증자의 인체유래물의 양이 검사에 이용할 만큼 충분하지 않을 경우 기증자의 혈액을 추가로 채취하여 검사에 이용한다. 신생아(출생일로부터 28일 미만)의 조직을 줄기세포주 수립에 이용할 경우 산모의 혈액을 채취하여 검사한다.
- ② 이 절차서 이전에 수립되어 은행에 기탁된 줄기세포주에서 누락된 검사항목이 있는 경우, 최종 분양용 세포를 검체로 사용하여 검사한다.

#### 3.2.4. 검사방법

- ① 검사항목 및 방법은 표 1에 따른다.
- ② 은행의 품질관리 담당자는 별표3의 검사결과서를 정리하여 보관 관리한다.

〈표〉 기증자 적합성 평가를 위한 실험실 검사항목 및 방법

연번	검사 항목 <sup>1)</sup>	검사 방법 <sup>2)</sup>	적합 기준 <sup>4)</sup>	비고
1	B형간염검사	HBs Ag <sup>3)</sup>	음성	모든 세포
2		HBV NAT	음성	모든 세포
3	C형간염검사	Anti-HCV	음성	모든 세포
4		HCV NAT	음성	모든 세포
5	후천성면역결핍증검사	Anti-HIV 1/2 <sup>3)</sup>	음성	모든 세포
6		HIV NAT	음성	모든 세포
7	인체 T림프영양성 바이러스검사	Anti-HTLV-1/2 <sup>3)</sup>	음성	모든 세포
8	거대세포바이러스검사	Anti-CMV IgM or NAT	음성	모든 세포
9	매독검사	Syphilis (RPR 등)	음성	양성인 경우 FTA-ABS을 추가로 수행하여 확진함
10	비임균성요도염검사	Chlamydia Trachomatis NAT	음성	체세포가 소변 유래인 경우에만 수행
11	임질검사	Nesseria Gonorrhoea NAT	음성	체세포가 소변 유래인 경우에만 수행
12	전염성 해면상뇌증 (TSE)검사	TSE test	음성	체세포가 뇌조직인 경우에만 수행

주: 1. 검사항목은 3-2-1을 참고하여 필요한 항목을 선정한다.

2. 검사방법의 약어는 다음과 같다.

HBs Ag: Hepatitis surface antigen, HBV: Hepatitis B virus, NAT: Nucleic acid amplification test, HCV: Hepatitis C virus, HIV 1/2: Human immuno-deficiency virus type 1 and 2, RPR: Rapid Plasma Reagin, FTA-ABS: Fluorescent treponemal antibody absorption, HTLV: Human T-lymphotropic virus

3. HBs Ag, HCV Ab, HIV 1/2 Ab 검사방법은 효소면역측정법(EIA) 또는 이와 동등 이상의 감도를 가진 시험방법이어야 한다.

4. 기증자 적합성은 해당 검사가 모두 음성인 경우에 적합한 것으로 판정한다.

단, 매독검사 시 RPR 등에서 양성인 경우에는 FTA-ABS 검사를 추가로 수행하여 매독 감염여부를 최종 확인해야 한다.

### 3.3 기록 보존

- (1) 은행은 기증 세포를 의료기관으로부터 제공받을 때 동의서, 문진표, 검사 결과지를 확인한다. 동의서, 문진표는 은행의 ‘동의서 관리 및 익명화 절차서’에 따라 세포 기증자의 개인정보 및 적합성 관련 정보에 대한 기밀을 유지하여 관리한다.
- (2) 동의서, 문진표, 검사 결과는 줄기세포 치료제 등에 대한 원료 세포에 대한 추적이 필요할 경우를 대비하여 줄기세포주로부터 유래한 치료제 등의 사용기간 종료 후 30년간 보존한다.



<별표 1> 동의서 예시

## 임상용 줄기세포 연구를 위한 세포 기증 동의서

동의서 관리 번호			
연구과제			
연구책임자		연구기관	

### 1. 연구과제에 대한 정보

[연구책임자 성명]은 [연구기관 명]에서 인간줄기세포 연구과제를 수행합니다. 연구자는 줄기세포 수립을 위하여 \_\_\_\_\_(세포 종류)를 \_\_\_\_\_(세포의 양, 연구에 따라 적절하게 기술) 기증받고자 합니다. 당신은 \_\_\_\_\_(필요시 환자의 의학적 증상을 명시하십시오) 때문에 이 연구에 참여하게 되었습니다. 이 연구의 목적은 \_\_\_\_\_(특징을 명시하십시오)을 가진 줄기세포를 수립하는 것입니다.

줄기세포는 간 세포, 심장 세포, 신경 세포 등 어떤 특화된 세포로 변할 수 있는 독특한 능력을 가지고 있습니다. 이러한 이유로 줄기세포는 환자의 특정 세포가 죽거나 손상을 입어 생기는 질병이나 부상을 연구하는 데 사용될 수 있고, 향후 이러한 질병이나 부상을 치료하는 데에 도움이 될 것입니다.

연구자는 \_\_\_\_\_세포를 이용하여 역분화줄기세포를 만들고자 합니다.

역분화줄기세포를 만들기 위하여 연구자는 기증받은 체세포에 역분화 인자를 주입하고 일정 기간 배양하게 됩니다. 이 과정이 성공적으로 이루어져 수립된 줄기세포는 체세포를 기증한 사람과 동일한 유전적 특징을 가지게 됩니다.

### 2. 참여의 자발적인 선택

이 연구과제를 위하여 당신의 체세포를 기증하는 것은 전적으로 자발적이어야 합니다. 당신은 이 연구과제를 위하여 \_\_\_\_\_세포를 기증하는 것에 동의할 수도 있고 거절할 수도 있는 권리를 가집니다. 당신이 \_\_\_\_\_세포를 기증하는 것에 동의하는 경우, 기증자 적합성 판단을 위한 검사를 위해 당신의 혈액을 \_\_\_\_\_ml 채취하여 검사하고, 당신의 병력에 대해 설문하게 됩니다. 당신이 체세포 기증에 동의하든 거절하든 그러한 결정이 현재나 미래에 당신이 받을 진료의 질이나 당신과 [병원 명 또는 연구기관 명]의 관계에는 어떤 영향도 미치지 않을 것입니다.

### 3. 동의서의 목적

[동의 받는 사람 성명]은 이 연구과제에 대해 당신에게 정보를 제공하고 이 연구과제에 대

한 당신의 질문에 답을 할 권한을 부여받은 사람입니다. 당신이 이 연구과제를 위해 세포를 기증할지 여부를 신중하고 자발적으로 결정하기 위해서 동의 받는 사람과 세부적인 사항에 대해 충분히 대화하는 것은 매우 중요합니다.

당신은 이 연구과제에 대한 설명을 듣고 \_\_\_\_\_세포를 기증하기로 결정하게 되면 이 동의서 마지막 쪽에 서명하시면 됩니다. 동의서에 서명을 하는 것은 당신이 이러한 대화 과정을 거쳤다는 것과 이 연구과제에 \_\_\_\_\_세포를 기증하는 것에 대해 자유로운 상태에서 동의했다는 것을 의미합니다. 그 동의서가 실제 대화를 대신해서는 안 되며, 당신이 이러한 대화 과정을 거쳤다는 것을 확인하는 것이어야만 합니다.

당신이 동의서에 서명할지 여부를 결정하기 전에 가족이나 친구들과 이 연구과제에 관해 대화하고 질문하는 데 가능한 한 충분한 시간을 가지도록 하십시오. 당신은 어떤 선택을 할 것인지 결정하기 전에 이 동의서를 집으로 가져갈 수 있습니다. 만약 당신이 이 연구 과제를 위해 \_\_\_\_\_세포를 기증하는 데 있어 누군가에 의해 어떤 방법으로든 압력을 받았다고 느꼈다면 동의서에 서명하지 마십시오. 세포의 기증은 어느 누구도 아닌 당신 스스로의 결정이어야 합니다.

#### 4. 체세포를 이용한 줄기세포 수립

당신의 \_\_\_\_\_세포를 이용하여 성공적으로 줄기세포를 얻을 수 있다는 보장은 없습니다. 연구자는 당신의 \_\_\_\_\_세포를 배양하여 줄기세포를 수립하기 전까지 일정기간 동결하여 보관할 수도 있습니다. 줄기세포를 수립하고 남은 체세포는 수립한 줄기세포와 비교연구에 이용될 수도 있습니다. 연구에 이용 후에 남은 세포는 정해진 절차에 따라 의료용 폐기물로 처리할 것입니다.

#### 5. 수립된 줄기세포를 이용한 연구

수립된 줄기세포는 적절한 배양조건에서 무한히 증식시킬 수 있기 때문에 지속적으로 증식되어 수십 년간 보관될 수 있습니다. 줄기세포는 다른 기관에 있는 연구자들에게 제공되어 여러 가지 연구 목적을 위해 사용될 수 있습니다.

보관된 줄기세포를 이용하는 연구 중에는 줄기세포의 유전자를 분석하거나 일부 유전자를 변화시키는 것이 포함될 수 있습니다. 기증자의 체세포로부터 만들어진 역분화줄기세포는 기증자와 동일한 유전정보를 가지고 있기 때문에 줄기세포의 전체 유전자를 분석하는 것은 기증자의 전체 유전정보를 분석하는 것과 동일한 연구라고 볼 수도 있습니다. 그리고 또 다른 연구는 줄기세포를 실험동물에 주입하여 줄기세포를 연구하는 것일 수도 있습니다. 또한 보관된 줄기세포를 특정 세포로 분화시킨 후 인간에 이식을 목표로 하는 임상연구에 이용될 수도 있습니다. 이러한 연구는 보관된 줄기세포를 이용하여 수행되는 일반적인 연구의 사례입니다. 지금은 알 수 없지만 미래에는 보다 다양한 연구들이 많이 있을 수 있습니다.

당신은 당신의 \_\_\_\_\_세포를 이용하여 만들어진 줄기세포를 당신이 원하는 어느 특정 기관이나 특정 연구자만 공유하도록 지정할 수는 없습니다. 만약 미래에 줄기세포 이식연구가 발전하더라도 당신은 수립된 줄기세포의 이식 수혜자를 정할 수 없습니다.

보관된 줄기세포가 이용되기 위해서는 줄기세포가 과학적, 윤리적, 법적으로 적절한 방법으로 이용되는 것이 확실하다는 기관생명윤리위원회의 심의를 받아야만 합니다. 만약 당신이 이 연구과제를 통해 수립된 줄기세포를 미래에 이용하는 것에 관해 어떤 질문을 하고 싶거나 걱정되는 바가 있다면, 이 서식의 15. 연락정보에 적혀 있는 담당자에게 연락을 주시기 바랍니다.

## 6. 체세포 채취절차

[연구자는 당신의 \_\_\_\_\_ 세포를 \_\_\_\_\_ 만큼 기증받고 있습니다.]

[기증되는 세포의 종류에 따른 채취절차와 기증되는 양에 대해 상세히 설명하십시오.]

## 7. 세포 기증의 잠재적 위험

줄기세포 연구과제를 위해 당신의 세포를 채취할 때, 다음과 같은 신체적인 위험이 발생할 수 있습니다. [채취 과정에서 발생할 수 있는 위험이나 부작용을 상세히 기술하세요.]

아울러 심리적인 차원에서의 위험이 있을 수 있습니다. 줄기세포 연구를 위해 세포를 기증한 사람들 중 일부는 불안, 후회 등의 감정을 경험할 수도 있습니다.

## 8. 기증 세포의 감염 및 유전질환 검사

당신의 \_\_\_\_\_ 세포와 그 세포를 이용하여 수립한 줄기세포의 안전성을 평가하기 위하여 의학적력에 관한 설문지를 작성하게 됩니다. 설명자의 도움을 받아 작성하게 되며, 약 30분정도 소요될 것입니다. 또한 당신은 감염병과 유전질환에 대해 의학적·사회적 이력에 대한 질문을 받게 될 것입니다.

그리고 의학적 검사들을 위해 \_\_\_\_\_ ml의 채혈을 요청하며, 채혈은 최소한의 신체적 위험을 수반합니다. [채혈에 따른 위험과 부작용을 설명해 주십시오.]

일부 사람들은 검사결과가 어떨지를 걱정하기도 합니다. [어떤 검사가 이루어지는지와 기증자가 검사 결과를 알 수 있는지 여부를 구체화 하시오]

당신은 이러한 심리적 위험들을 최소화시키기 위해 동의서를 설명하는 사람에게 무엇이든 물어볼 수 있습니다. 그리고 주변사람들에게 충분히 물어보고 동의할 수 있도록 시간적 여유를 요청할 수도 있습니다.

[유전자 연구를 동반하는 경우 : 연구자들은 세포 기증자에 관한 유전 정보를 알아야 할 수 있습니다. 이런 경우 당신은 연구자들로부터 유전자 연구에 대해서도 동의하는지 묻고 유전자 연구에 대한 동의를 요청할 수 있습니다. 연구자는 유전자 연구를 위해 별도의 인체유래물 채취를 요구할 수 있습니다. (연구자가 유전자검사를 계획하는 경우, 어떤 유전인자에 대해 검사하고 어떤 연구를 하는 것인지 구체적으로 설명하고, 채취하는 인체유래물의 종류 및 양과 처리 절차에 대해 설명하십시오. 이 때 생명윤리 및 안전에 관한 법률에 따른 인체유래물 연구 동의서를 이용하여 어떤 유전인자에 대해 연구하는지 구체적으로 설명하고, 채취하는 인체유래물

의 종류 및 양과 처리 절차에 대해 설명하십시오. 이 때 생명윤리 및 안전에 관한 법률에 따른 인체유래물 연구 동의서를 이용하여 유전자연구에 대한 설명이 포함된 별도의 동의를 받으시오.)]

## 9. 연구 관련 상해발생시 보상

우리는 당신이 연구참여로 인해 상해가 발생할 경우에 대한 [기관 명]의 정책을 당신에게 알릴 의무가 있습니다. [연구과제 참여로 인한 상해와 관련하여 이루어질 치료 그리고/또는 보상에 대해 명시하고, 기관의 관련 정책에 대해 설명하십시오.]

## 10. 세포 기증으로 인한 직접적 이득 및 상업적 이익

이 연구과제는 당신이나 누군가에게 직접적인 의료 혜택을 제공하는 것을 의도하지 않습니다. 당신은 단지 이 연구과제와 줄기세포 연구의 전반적인 발전을 위하여 \_\_\_\_\_ 세포를 기증하는 것입니다.

줄기세포는 미래에 상업적 이익이라는 측면에서 상당히 중요한 잠재성을 가질 수 있습니다. 그러나 당신이 동의서에 서명하는 것은 줄기세포를 이용하여 이루어지는 미래의 상업적 개발과 과학적 특허를 이유로 당신에게 어떤 직접적인 재정적인 혜택이 주어지지 않을 것이라는 사실을 이해하고 있다는 것을 의미합니다. 세포의 기증에 대해 직접적인 재정적 혜택이 주어지기 어려운 이유는 특허에 대한 권리는 발명에 대한 기여가 있어야 하지만 세포의 기증만으로는 발명에 대한 기여가 있다고 판단하지 않으며, 세포의 기증에 따른 기증자의 직접적인 보상은 인체유래물을 매매나 금전적 보상의 대상으로 여기지 않고 있는 현재의 윤리적 관념 및 관행과 충돌하기 때문입니다. 하지만 당신의 세포 기증은 미래 환자의 치료를 위한 의학 발전에 크게 기여할 것입니다.

## 11. 동의의 변경 및 철회

당신은 \_\_\_\_\_ 세포를 채취하기 전이나 과정 중 언제라도 그리고 어떤 이유로든 이 연구과제에 참여하겠다는 동의를 철회할 수 있습니다. 마찬가지로 당신은 \_\_\_\_\_ 세포가 채취된 후라도, 연구에 이용되기 전이라면 동의를 철회할 수 있습니다. 동의를 철회하면 채취된 세포는 [기관명]의 정해진 절차에 따라 폐기될 것입니다. [기증자가 원하는 경우 폐기하지 않고 다른 연구 과제나 기관에 기증할 수 있음을 알려 줄 수 있음.] 아울러 검사를 위해 채취한 혈액 (또는 여타 인체유래물) 역시 폐기할 것입니다. [아울러 검사를 위해 채취한 혈액이나 인체유래물로부터 획득한 정보를 어떻게 처리할 것인지 구체적으로 설명하십시오.]

그러나 일단 줄기세포가 수립되면, 수립된 줄기세포를 진행중인 연구과제로부터 제거해 달라고 요청할 수 없을 것입니다.

동의서에 서명한 후 동의를 철회하기로 결정했다면, 이 서식의 15. 연락정보에 적혀 있는 명단의 누구에게라도 즉시 연락주시기 바랍니다.

## 12. 개인정보보호 및 비밀유지

이 연구과제에 당신이 참여하고 있다는 기록은 기밀로 유지될 것입니다.

당신의 이름을 포함하여 당신을 식별할 수 있는 정보를 사용하는 대신 별개의 코드를 부여하여 당신의 개인식별정보가 익명화될 것이고, 모든 기록은 오직 동의서관리자만 접근할 수 있는 장소에 보관될 것입니다. 당신의 의학적 선별검사의 결과 역시 비밀로 다루어질 것이고, 익명화되어 사용될 것입니다. [어떻게 개인정보를 보호할 것인지 설명하고, 익명화 방법 및 절차, 익명화 해제에 경우가 언제인지 상세히 설명하십시오.]

만약 당신이 기증한 \_\_\_\_\_ 세포를 이용하여 수립한 줄기세포 연구와 관련하여 이후에 안전성 문제가 발생할 경우 추가적으로 당신의 의학 정보를 요청하기 위하여 당신에게 연락을 취할 수도 있습니다.

[당신의 \_\_\_\_\_ 세포로부터 수립된 역분화줄기세포는 당신과 유전적으로 완전히 일치할 것입니다. 당신의 유전자 프라이버시를 보호하기 위해 줄기세포를 수립하는 연구자와 보관된 줄기세포를 향후 이용할 연구자에게는 당신의 이름과 같은 개인식별정보가 아니라 단지 익명화된 코드만 제공될 것입니다.]

[수립된 줄기세포의 연구에서 당신의 건강에 중요할 수도 있는 정보를 얻을 수 있습니다. 만약 향후 이런 정보들에 관하여 연락받기를 원한다면, (기관명)은 수립된 줄기세포 연구를 통해 얻게 된 중요한 정보에 관해서, 다른 연구자나 기관으로부터 받은 어떤 정보도, 가능한 한, 당신에게 전달할 것입니다.]

질병관리본부 기관생명윤리위원회는 기증자인 당신의 권리가 적절하게 보호되는 것을 확실하게 보장하기 위해 연구계획과 체세포 등의 채취 절차, 그리고 그 결과에 대해 심의할 것입니다. 그러나 당신이 누구인지는 드러나지 않을 것입니다.

연구자가 출판하는 보고서에는 기증자인 당신이 누구인지 확인할 수 있는 어떤 정보도 포함되지 않을 것입니다.

### 13. 기증에 대한 보상

당신은 이 연구과제를 위해 당신이 기증하는 \_\_\_\_\_ 세포의 수나 질에 대하여 현금이나 상품 및 서비스와 같은 보상을 받지 않을 것입니다. 본 연구를 위해 수행되는 검사에 대한 비용은 연구자가 부담합니다.

[당신의 \_\_\_\_\_ 세포가 이 연구과제에 기증되기 전, 해당 세포를 보관하는 데 소요되었던 비용은 상환되지 않을 것입니다.]

[당신이 동의 과정에 참여하기 위해 지불해야 했던 비용의 상환은 기관생명윤리위원회나 관련 심사위원회에 의해 결정될 것입니다.]

### 14. 연구자의 잠재적 재정상 이익에 대한 공개

줄기세포 연구를 하는 연구자들은 이 연구과제로부터 과학적 이익뿐만 아니라 재정적 이익을 얻을 수 있습니다. 당신이 기증한 세포를 통해 만든 줄기세포와 이 연구과제에서 도출된 결과는 연구책임자, 연구기관, 그리고 다른 연구자나 연구기관들에게 잠재적인 또는 현재의 재정적 이익이 될 수 있습니다. 만약 당신이 이 문제에 관해 어떤 질문을 하고 싶거나 걱정되는 바가 있다면 이 서식의 15. 연락정보에 적혀 있는 담당자에게 연락하시기 바랍니다.

만약 당신이 \_\_\_\_\_ 환자(의학적 증상을 구체화 하시오.)라면, 당신의 치료를 담당하는 의사는 당신이 이 연구과제를 위해 \_\_\_\_\_ 세포를 기증하는 것에 동의함에 따라 의사 자신이 얻게 되는 모든 개인적인 이익에 대하여 당신에게 알리는 것은 중요합니다. [이 연구과제를 통해 세포 기증자의 치료를 담당하는 의사가 받는 잠재적인 개인적 이익을 여기에 밝히시오.]

당신에게 정보를 제공하는 권한을 부여받은 사람도 또한 이 연구과제와 개인적 이해관계를 가질 수 있습니다. [이 연구과제에서 이 사람이 가질 수 있는 잠재적인 개인적 이익을 여기에 밝히시오.]

## 15. 연락정보

당신이 이 연구과제에 관하여 질문이 있다면, 아래로 연락하십시오.

(연구책임자) \_\_\_\_\_ (전화번호) \_\_\_\_\_

(연구담당자) \_\_\_\_\_ (전화번호) \_\_\_\_\_

만약 세포 기증자로서 당신의 권리에 관하여 질문이 있다면, 아래로 연락하십시오.

(기관생명윤리위원회 담당자) \_\_\_\_\_ (전화번호) \_\_\_\_\_

만약 당신이 세포 채취 절차에 관하여 질문이 있다면, 아래로 연락하십시오.

(담당자) \_\_\_\_\_ (전화번호) \_\_\_\_\_

## 16. 동의와 서명

아래의 문장을 읽고, 당신의 선택에 관하여 생각한 후, 동의할 준비가 되었다면 서명을 해주십시오. 그렇지 않으면 이 서식을 집으로 가져가 당신이 원하는 누군가와 상의한 후, 이 연구과제에 참여하기를 원한다면 서명하여 제출해 주십시오.

동의서를 설명하는 담당자는 나에게 이 연구과제의 목적과 내용을 내가 이해할 수 있는 방법으로 충분히 설명해 주었습니다.

동의서를 설명하는 담당자는 내가 적극적으로 대화에 참여할 수 있게 도와주었으며, 나의 모든 질문과 걱정스러운 점들에 대하여 만족스럽고 정중한 방법으로 대답해주었습니다.

동의서를 설명하는 담당자는 내가 결정하기 전에 이 연구과제와 무관한 의사, 상담자 등 내가 신뢰할 수 있는 사람들과 상의할 수 있는 기회를 제공해 주었고, 내가 결정할 할 수 있는 적절한 시간을 주었습니다.

동의서를 설명하는 담당자는 내가 기증에 동의한 후에라도 이 동의를 변경하거나 철회할 수 있음을 설명해 주었습니다.

선택사항	
나는 다음에 해당하는 세포를 줄기세포 연구를 위하여 이용하는 것에 동의합니다.	<input type="checkbox"/> 예 / <input type="checkbox"/> 아니오
1) 기증하는 체세포의 종류 :	
2) 체세포로 보존하는 기간 :            년	
3) 기증하는 체세포의 양 :	
나는 내가 기증한 _____ 세포를 이용하여 수립한 줄기세포를 임상연구용으로 이용하는 것에 동의합니다.	<input type="checkbox"/> 예 / <input type="checkbox"/> 아니오
나는 내가 기증한 _____ 세포를 이용하여 수립한 줄기세포를 다른 사람이 또는 다른 목적으로 이용할 수 있도록 제공하는 것에 동의합니다.	<input type="checkbox"/> 예 / <input type="checkbox"/> 아니오
나는 나의 개인식별정보가 코드화된 상태로 나의 유전정보를 다른 연구자에게 제공하는 것에 동의합니다.	<input type="checkbox"/> 예 / <input type="checkbox"/> 아니오
나는 수립된 줄기세포의 연구에서 나의 건강에 중요할 수도 있는 정보가 있을 경우, 이에 대해 연락받기를 원합니다.	<input type="checkbox"/> 예 / <input type="checkbox"/> 아니오
1) 연락처(휴대전화) :	
2) 메일주소 :	

나는 [연구기관 명]에서 [연구책임자 성명]에 의해 수행되는 [연구과제 명]이라는 제목의 연구과제에 본인의 세포를 기증하는 데 동의합니다.	
체세포 기증자 _____ (서명)	날짜 _____ 년    월    일
법정 대리인 _____ (서명)	날짜 _____ 년    월    일
동의 받는 사람 _____ (서명)	날짜 _____ 년    월    일

## 세포기증자의 의학적·사회적 이력 설문지

동의서 관리 번호			
기증자 이름		생년월일	
설문대상자 이름		기증자와의 관계	
		연락처	
설문 일시	년	월	일 ( : )
설문 확인 의료진	(서명)		

- ※ 기증자의 인적사항과 문진내용은 세포치료제 개발·제조·안전관리 이외의 다른 목적에 사용 또는 공개되지 않습니다.
- ※ 아래의 질문을 읽으신 후 “□예 □아니오”의 해당항목에 √ 표시하시고, 기타 해당사항을 자세히 기술하여 주시기 바랍니다.

### 의학적 이력

1. 현재 건강상태에 대한 질문입니다.

건강상태	해당여부
① 최근 3일 이내 섭씨 37.5도 이상 발열	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                      언제 <span style="margin-left: 150px;">기타</span>
② 최근 1주일내 약물복용 또는 주사	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                      언제 <span style="margin-left: 150px;">기타</span>
③ 최근 1개월 이내 반복적인 고열·오한 또는 단순 감기 이외의 질병 진단·치료	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                      언제 <span style="margin-left: 150px;">기타</span>

2. 다음과 같은 질환을 앓고 있거나, 과거에 앓은 적이 있습니까?

질환명	해당여부



① B형 간염	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
② C형 간염	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
③ 매독/임질/클라미디아 등 성병	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
④ 후천성면역결핍증 (AIDS)	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑤ 치매 등 퇴행성 신경질환	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑥ 박테리아 또는 곰팡이뇌막염	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑦ 결핵, 한센병, 말라리아	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑧ 대상포진 (herpes zoster)	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑨ 단순포진 (herpes simplex)	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑩ 디프테리아, 성홍열	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑪ 급성회백질 척수염	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)
⑫ 레이증후군	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예                   언제) 기타)

<p>⑬ 광견병</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>
<p>⑭ 뇌수막염 또는 뇌염  ※ 박테리아, 바이러스 또는 원인불명에 의한 경우 포함</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>
<p>⑮ 암</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>
<p>⑯ 백혈병</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>
<p>⑰ 림프성 악성종양  ※ 중추신경 원발성 림프종 포함</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>
<p>⑱ 크로이츠펠트 야콥병 (Creutzfeldt-Jakob)  ※ 유전적 가족력이 있는 사람 포함</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제  <input type="checkbox"/> 가족력 있음(                    )</p>
<p>⑲ 쿠루(kuru)  ※ 유전적 가족력이 있는 사람 포함</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제  <input type="checkbox"/> 가족력 있음(                    )</p>
<p>⑳ 호흡기질환, 심혈관질환, 간장질환, 신장질환, 자가면역질환(류마티즘 등) 등 중증질환</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제  상세내역)</p>
<p>※ 기타 질환 (SARS, MERS, 지카, 에볼라 등)</p>	<p>상세내역)</p>

3. 다음과 같은 약물을 투여 받거나, 이식을 받은 적이 있습니까?

약물 및 이식사항	해당여부
<p>① 기증 전 4주 이내에 예방접종</p>	<p><input type="checkbox"/> 아니오  <input type="checkbox"/> 예                    언제                                        기타</p>

② 장기 또는 뇌막, 경막, 각막이식	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
③ 사람유래 성장호르몬 또는 성선자극호르몬주사	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
④ 기증 전 3개월 이내에 항암치료를 받았거나 면역억제제 투여	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
※ 기타 약물 및 이식 사항 (향후 혈액이나 조직기증이 금지되는 것으로 안 내받은 임상시험 참여, 조직이식 등)	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 상세내역)

4. 다음 물질에 중독된 적이 있습니까?

중독 물질	해당여부
① 혈관 내 약물주입 (헤로인 등)	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
② 납, 크롬 또는 비소 등 중금속	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
③ 살충제	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타
④ 고엽제	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 기타

5. 아래와 같은 유해성 물질에 노출된 적이 있습니까?

유해성 물질	해당여부
예시) 방사능, 불산, 석면 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 언제 상세내역)

6. 기증자와 혈연관계가 있는 4촌 이내 친척 중에서 아래 질환을 가진 사람이 있습니까?

가족 병력	해당여부
<b>① 암</b> ※ 20세 이전에 발생한 암	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>② 혈액질환</b> ※ 백혈병, 지중해빈혈(Thalassemia), 겸상적혈구증, 구상적혈구증, 타원형적혈구증, 적혈구효소결핍증, 선천성순적혈구빈혈(Diamond-Blackfan 증후군), 만성육아종질환(Chronic granulomatous disease), 혈소판무력증(Glanzmann's disease), 유전성혈소판감소증 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>③ 신경계질환</b> ※ 크로이츠펠트 야콥병 및 광우병, 헌팅턴 무도병(Huntington's Chorea), 근위축성측삭경화증(루게릭병) 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>④ 대사장애/축적성질환</b> ※ 테이삭스병(Tay-Sachs Disease), 백색질형성장애(Leukodystrophies), 포르피린증(Porphyria), 혈관확장성운동실조증(Ataxia-Telangiectasia), 헐러병(Hurler's Disease), 헌터증후군(Hunter's Disease), 고셔병(Gaucher's Disease), 글리코겐 축적 질환 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>⑤ 면역질환</b> ※ 중증복합성 면역결핍증(Severe combined immunodeficiency, SCID), 저글로블린혈증, DiGeorge 증후군, 루푸스, 류머티스성 질환 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>⑥ 근골격계질환</b> ※ 골화석증, 연골무형성증, 연골저형성증 등	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)
<b>⑦ 기타</b> ※ 용혈성 빈혈, 혈우병, 만성적 수혈이 필요한 질환, 기타 유전질환	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 (언제) 상세내역)

**사회적 이력**

생활방식 및 행동	해당여부
1. 최근 5년 이내에 배우자 또는 친밀한 이성이 아닌 사람과 성관계가 있었습니까?	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예

<p>2. 최근 5년 이내에 <u>비의학적 방법</u>(예, 병원 외 투여)으로 <u>정맥주사, 근육주사, 피하주사 등 약물을 주입</u>한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 상세내역)
<p>3. 최근 1년 이내에 <u>비의학적 방법</u>으로 <u>문신, 피어싱, 침술 등을 시술</u>받은 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 ※ 1회용 도구 사용여부 <input type="checkbox"/> 사용 <input type="checkbox"/> 미사용 <input type="checkbox"/> 모름
<p>4. 최근 1년 이내에 <u>간염, 에이즈환자 (또는 의심자)와 상처 또는 체액접촉</u>이 있었습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>5. 최근 1년 이내에 <u>3일 이상 소년원, 구치소 등의 교도시설에 수감</u>된 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>6. <u>1980년 ~ 1996년까지</u> 1개월 이상 <u>영국</u>을 거주/방문/여행한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>7. <u>1997년 ~ 현재까지</u> 3개월 이상 <u>영국</u>을 거주/방문/여행한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>8. <u>1980년 ~ 현재까지</u> 5년 이상 <u>유럽국가</u>를 거주/방문/여행한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>9. <u>1980년 이후 영국, 프랑스</u>에서 <u>수혈</u>을 받은 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>10. 최근 3년 이내에 국내·외 <u>말라리아 위험지역</u>에서 <u>6개월 이상 거주</u>한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>11. 최근 1년 이내에 국내·외 <u>말라리아 위험지역</u>을 여행한 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예
<p>11. 최근 1개월이내 <u>외국 여행</u>을 다녀온 적이 있습니까?</p>	<input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 방문국가)

설문 적합성 평가 의견

--

적합성 결과	평가일	책임자
<input type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합		(서명)

<별표 3> 기증자 실험실 검사 결과 기록서

## 기증자 실험실 검사 결과서

동의서 관리 번호	
검체 채취일	년    월    일
채취 기관	

연번	검사 항목	검사 방법	검사결과	비고	
1	B형간염검사	HBs Ag		공통	
2		HBV NAT			
3	C형간염검사	Anti-HCV			
4		HCV NAT			
5	후천성면역결핍증검사	Anti-HIV 1/2			
6		HIV NAT			
7	인체 T림프영양성 바이러스검사	Anti-HTLV-1/2			
8	거대세포바이러스검사	CMV NAT			
9	매독검사	Syphilis(RPR 등)			
9	비임균성요도염검사	NAT			소변 등 생식기와 접촉이 있는 인체유래물의 경우에만
10	임질검사	NAT			소변 등 생식기와 접촉이 있는 인체유래물의 경우에만
11	전염성 해면상뇌증 (TSE)검사	TSE test			인체유래물이 뇌조직인 경우에만
12	그 밖에 검사			필요한 경우	

※ 검사별 결과지는 본 결과서에 첨부하여 보관

## 인체유래물 연구 동의서

<b>동의서 관리번호</b>	(앞쪽)	
인체유래물 기증자	성명	생년월일
	주소	
	전화번호	성별
법정대리인	성명	관계
	전화번호	
연구책임자	성명	
	전화번호	

이 동의서는 귀하로부터 수집된 인체유래물등(인체유래물과 그로부터 얻은 유전정보를 말합니다)을 질병의 진단 및 치료법 개발 등의 연구에 활용하기 위한 것입니다. 동의는 자발적으로 이루어지므로 아래의 내용을 읽고 궁금한 사항은 상담자에게 묻고 질문할 기회를 가지고 충분히 생각한 후 결정하시기 바라며, 이 동의서에 대한 동의 여부는 귀하의 향후 검사 및 치료 등에 어떤 영향도 미치지 않습니다.

1. 인체유래물이란 인체로부터 수집하거나 채취한 조직·세포·혈액·체액 등 인체 구성물 또는 이들로부터 분리된 혈청, 혈장, 염색체, DNA, RNA, 단백질 등을 말하며, 귀하의 인체유래물을 채취하기 전에 채취 방법 및 과정에 관한 설명을 충분히 들어야 합니다.
  2. 귀하가 귀하의 인체유래물등을 아래의 연구 목적에 이용하도록 동의하는 경우, 귀하의 인체유래물등의 보존기간, 다른 사람 또는 다른 연구 목적에 대한 제공 여부, 제공 시 개인정보 처리에 관한 사항 및 폐기 등을 결정할 수 있습니다. 또한 동의한 사항에 대해 언제든지 동의를 철회할 수 있습니다. 이 경우 연구의 특성에 따라 철회 전까지 수집된 귀하의 인체유래물등과 기록 및 정보 등의 처리방법이 달라질 수 있으므로 연구자로부터 별도의 설명문 등을 통해 정보를 받으실 것입니다.
  3. 귀하는 이 연구 참여와 관련하여 귀하의 동의서 및 귀하의 인체유래물등의 제공 및 폐기 등에 관한 기록을 본인 또는 법정대리인을 통하여 언제든지 열람할 수 있습니다.
  4. 귀하가 결정한 보존기간이 지난 인체유래물은 「폐기물관리법」 제13조에 따른 기준 및 방법에 따라 폐기되며, 해당 기관의 휴업·폐업 등 해당 연구가 비정상적으로 종료될 때에는 법에서 정한 절차에 따라 인체유래물등을 이관할 것입니다.
  5. 귀하의 인체유래물등을 이용하는 연구는 「생명윤리 및 안전에 관한 법률」에 따라 해당 기관의 기관생명윤리위원회의 승인 후 진행될 것이며 해당 기관 및 연구자는 귀하의 개인정보 보호를 위하여 필요한 조치를 취할 것입니다.
  6. 귀하의 인체유래물등을 이용한 연구결과에 따른 새로운 약품이나 진단도구 등 상품개발 및 특허출원 등에 대해서는 귀하의 권리를 주장할 수 없으며, 귀하가 제공한 인체유래물등을 이용한 연구는 학회와 학술지에 연구자의 이름으로 발표되고 귀하의 개인정보는 드러나지 않을 것입니다.
- ※ 위의 모든 사항에 대해 충분한 설명을 듣고, 작성된 동의서 사본을 1부 받아야 합니다.

동의 내용	연구 목적	
	인체유래물 종류 및 수량	
	인체유래물 보존기간	1. 영구보존 [    ] 2. 동의 후 [    ]년
	보존 기간 내 2차적 사용을 위한 제공 여부	1. 유사한 연구 범위 안에서만 제공하는 것에 동의합니다. [    ] 2. 포괄적 연구 목적으로 제공하는 것에 동의합니다. [    ] 3. 동의하지 않습니다. [    ]
	2차적 사용을 위한 제공 시 개인정보 포함 여부	1. 개인식별정보 포함 [    ] 2. 개인식별정보 불포함 [    ]



본인은 「생명윤리 및 안전에 관한 법률」 제37조 및 같은 법 시행규칙 제34조에 따라 해당 인체유래물연구의 목적 등 연구 참여와 관련하여 인체유래물 채취 방법 및 과정 등에 대한 동의서의 내용에 대하여 충분한 설명을 들어 이해하였으므로 위와 같이 본인의 인체유래물등을 기증하는 것에 자발적인 의사로 동의합니다.

동의서 작성일

년 월 일

인체유래물 기증자

(서명 또는 인)

법정대리인

(서명 또는 인)

상담자

(서명 또는 인)

구비서류

법정대리인의 경우 법정대리인임을 증명하는 서류

## 바이러스, 세균 및 진균 오염 시험

### Test for virus, bacteria, and fungi contamination

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포는 바이러스, 세균, 진균 등의 오염이 되지 않도록 관리되고 동결 저장 되어야 함
- 이에 관리중인 전분화능줄기세포에 대한 바이러스, 세균, 진균 오염 시험은 배양 전 과정에 걸쳐 주기적으로 실시되어야 함
- 은행에서 배양 중인 세포 및 배양 관련 시약 등에 대하여 필요에 따라 바이러스, 세균, 진균 오염 시험을 수행할 경우 그 절차는 이 절차서에 준함
- 인간 전분화능줄기세포의 배양액을 분석 전문 기관에 위탁하여 시험 수행
- 검사 결과가 음성이 나온 경우 적합, 양성인 경우 부적합 판정

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 마이크로피펫 (Micropipette)  
- P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시험 과정

- ※ 전문기관 위탁 분석 시, 질병관리본부 내 용역계약체결 절차에 따라 분석 기관 선정
- ※ 분석 기관이 지정하는 방식에 따라 시료 준비 및 분석 실시하고 분석 및 판독 결과를 확인

### 2.1. 시료의 준비 및 분석 의뢰

- ① 인간 전분화능줄기세포를 계대 배양 또는 해동한 후 이산화탄소배양기에서 4일 동안 배양
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14) 참조
- ② 미생물 검사를 위한 시료는 4일째 인간 전분화능줄기세포 배양액 교체 시 P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양접시 내의 배양액 2 ml를 15 ml 원심분리용 튜브에 넣어 준비
- ② 바이러스 검사는 P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양액 1 ml과 함께 인간 전분화능줄기세포 콜로니를 수거한 후 1.5 ml 원심분리용 튜브 2개를 준비
  - ※ 콜로니 수거 방법은 인간 전분화능줄기세포 계대 (SOP#15) 참조
- ③ 시료가 보관된 튜브를 분석 전문 기관에 위탁하여 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 2.2. 바이러스 검사

- ① 검사는 분석 전문 기관의 지침에 따라 수행하고, 각 바이러스에 대한 분석 방법에 따라 DNA 또는 RNA를 분리
- ② 시험 바이러스의 항목과 시료 및 분석 방법은 아래의 표와 같음
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

**<표> 바이러스 검사의 시료 및 실험 방법**

바이러스 검사 항목	시료 (DNA 또는 RNA)	실험 방법
CMV	DNA	qPCR
EBV	DNA	qPCR
HBV	DNA	qPCR
HCV	RNA	qRT-PCR
HIV 1&2	RNA	qRT-PCR
HPV	DNA	PCR & Liquid Bead Microarray
HSV1	DNA	PCR
HSV2	DNA	PCR
HHV6	DNA	PCR
HTLV1	RNA	qRT-PCR
HTLV2	RNA	qRT-PCR

### 2.3. Culture & ID, Fungus Culture

- ① 배양액에 세균 및 진균 배양액을 첨가한 후 3주간 이산화탄소배양기에 배양
  - 배양기 온도 : 세균 (37°C), 진균 (30°C)
  - 세균 및 진균 배양액 : 세균 (Blood agar plate, Chocolate agar, MacConkey agar), 진균 (Sabouraud dextrose agar, Mycosel agar)
- ② 3주 후에 육안으로 대조군과 비교 확인
  - 대조군과 차이가 없을 경우 : No growth
  - 대조군과 차이가 있을 경우 : 세균, 진균 동정

### 3. 판정 및 결과

- 각 바이러스, 세균 및 진균 검사의 결과는 전문 기관의 표준운영절차서의 기준에 따름
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조
- 각 바이러스, 세균 및 진균 검사의 결과가 “음성”(negative)일 때 합격

## STR 검사

### STR Assay

#### □ 개 요

- 인체의 모든 세포로부터 유전자형 분석이 가능하고 이러한 유전자형은 개체 식별이 가능한 고유의 유전정보를 제공
- 개체 식별이 가능한 유전자형 분석기법으로 유전자감식, 유전자지문(DNA fingerprint) 또는 DNA typing 등이 있음
- 유전자 감식은 비정보성 유전부위에 특정염기가 반복 (STR, short tandem repeat) 되어 있어 이를 증폭하여 개체 식별에 활용
- 인간 전분화능줄기세포의 신원 식별 및 교차오염 확인을 위해 반드시 수행되어야 하는 분석
- 유전자형을 검사하기 위해 인간 전분화능줄기세포를 분석 전문 기관에 위탁하여, 성염색체를 포함한 총 16개의 STR 유전자 좌위를 분석

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시험 과정

- ※ 전문기관 위탁 분석 시, 질병관리본부 내 용역계약체결 절차에 따라 분석 기관 선정
- ※ 분석 기관이 지정하는 방식에 따라 시료 준비 및 분석실시하고 분석 및 판독 결과를 확인

### 2.1. 시료의 준비 및 분석 의뢰

- ① 인간 전분화능줄기세포를 계대 배양 또는 해동한 후 35 mm 배양접시에 파종하여 이산화탄소배양기에서 6일 동안 배양
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14) 참조
- ② P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양액 1 ml과 함께 인간 전분화능줄기세포 콜로니를 수거한 후 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김
  - ※ 콜로니 수거 방법은 인간 전분화능줄기세포 계대 (SOP#15) 참조
- ③ 시료가 포함된 튜브를 분석 전문 기관에 위탁하여 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 2.2. 검사 방법

- ① 검사는 분석 전문 기관의 지침에 따라 수행
- ② 인간 전분화능줄기세포의 genomic DNA (Qiagen, DNA micro kit, 56304)를 추출, 정량한 후 다중증폭키트 (Promega, PowerPlex 16 system, DC6530)를 사용하여 각 유전자좌를 증폭한 다음 자동염기서열 분석 장비를 이용하여 유전자형을 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 3. 결과 보고(예시)

<표> STR 분석의 결과

STR 유전자좌	결과
D3S1358	15/17
TH01	9/10
D21S11	29/30
D18S51	13/13
Penta E	18/18
D5S818	12/12
D13S317	11/11
D7S820	11/12
D16S539	11/11
CSF1PO	12/12
Penta D	9/11
vWA	14/15
D8S1179	10/11
TPOX	8/9
FGA	20/23
Amelogenin	XY

- 결과 예시 : “검체의 Sample에서는 총 16개의 STR 유전자좌에서 유전자형이 검출되었으며, 성염색체 분석결과 XY로 나타나 남성의 유전자형이 검출되었음을 증명함”

## 핵형 분석 Karyotyping

### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포는 장기간의 계대 배양 시 핵형의 변화 등이 일어날 수 있음이 보고됨
- 핵형 분석이란 세포 분열 중기 (Metaphase)에 관찰되는 염색체를 광학현미경으로 관찰하여 수적, 구조적 이상을 확인하는 시험법임
- 은행에서 충분한 양의 줄기세포 확보·저장을 위해 대규모 배양이 필수적이며, 관리·분양하는 세포의 유전자 변형 등에 대한 품질관리를 위해 핵형 분석은 필수적임
- 인간 전분화능줄기세포의 염색체 이상 유무에 대한 거시적 평가를 위해 계대 배양 과정 중 주기적으로 핵형분석을 실시함
- 핵형 분석은 시료를 분석 전문 업체에 위탁하여 실시

### 1. 필요한 물품

#### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)

#### 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음



## 2. 시험 과정

- ※ 전문기관 위탁 분석 시, 질병관리본부 내 용역계약체결 절차에 따라 분석 기관 선정
- ※ 분석 기관이 지정하는 방식에 따라 시료 준비 및 분석실시하고 분석 및 판독 결과를 확인

### 2.1. 시료의 준비

- ① 인간 전분화능줄기세포를 계대배양 또는 해동한 후 35 mm 배양접시에 파종하여 이산화탄소배양기에서 6일 동안 배양
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14) 참조
- ② 배양접시에 배양액을 가득 채운 후 파라필름으로 밀봉
- ③ 밀봉한 배양접시를 상온 상태로 분석 전문 기관에 위탁하여 분석
  - 시료 준비 후 24시간 이내 위탁 접수를 원칙으로 하고, 지연될 4℃에서 냉장보관 하여야 하나 절대 냉동해서는 안됨
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

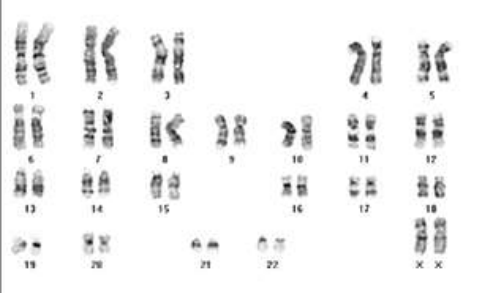

### 2.2. 검사 방법

- ① 세포 방추사의 작용과 동원체의 분리를 억제시키는 유사분열 억제제(Colchicine 등)를 사용하여 중기의 세포 획득
- ② 분열 억제된 세포의 팽창을 위하여 저장액을 처리하고 적절한 고정액으로 세포를 고정
- ③ 고정시킨 세포를 슬라이드 위에 떨어뜨려 표본을 제작하고 Giemsa법으로 염색하여 광학현미경으로 염색체를 분석함
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

## 3. 판정 및 결과

- ① 사람의 정상 염색체는 46개 (23쌍)이고, 22쌍의 상염색체와 1쌍의 성염색체로 구성됨
- ② 이를 명명할 때는 먼저 염색체의 수를 기술하고, 다음에 성염색체를 기록하며, 정상인의 핵형은 46,XX 또는 46,XY로 기술함
- ③ 염색체의 명명은 세포유전학 국제명명규약 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature; ISCN, 2013)에 따라 핵형을 표기
  - 각 시료 당 적어도 metaphase 20 개 이상을 조사
  - 적어도 metaphase 2 개 이상의 핵형이미지 저장하고 확인함
  - 모자이시즘이 관찰된 경우는 지침에 따라 분석 진행
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

<판정 예시>

세포유전학 결과 보고서	
검체 번호 : 이 름 : 검사 인 : 보고 인 :	증 명 : 검체 종류 : 의뢰 기관 : 의뢰 자명 :
<b>결 과 : 46,XX</b>	
	 <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">                         염색체 계수하는 세포 수: 20                          핵형 분석하는 세포 수: 1                          분석법: GTG                          해상도: 550 Bands                     </p>
<p style="font-size: small; margin-top: 0;"> <b>의 견</b>                          염색체 분석 결과 정상 핵형입니다.                     </p>	

<그림> 핵형분석 결과의 예시

## HLA 유전자형 검사

### Human leukocyte antigen genotype assay

#### □ 개 요

- HLA (human leukocyte antigen)는 사람의 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex : MHC) 유전자에 의해 만들어지는 단백질이며, 인간의 모든 유핵 세포 표면에 존재하고 세포에서 분비되기도 하는 물질로 조직의 적합성을 결정하는 인자
- HLA의 유전자는 유전자의 위치, 분자의 구조 및 기능에 따라 Class I과 Class II로 구별되고 Class I에는 HLA-A, B, C가 있고, Class II에는 HLA-DR, DQ, DP 유전자가 존재함
- HLA는 타인의 골수 세포나 바이러스 등 자신 이외의 물질이 신체에 들어올 경우 자신을 보호하기 위하여 그 물질이 자신과 같은 것인지 아닌지에 대한 판단하는 주요 인자임
- HLA typing 에는 항원-항체 방법 (serotyping)과 HLA 유전자의 염기 서열을 판독하는 분자생물학 기법을 이용한 DNA typing 방법이 존재함
- HLA DNA typing 방법은 HLA 유전자 염기서열 PCR로 변이가 많은 부분을 증폭하여 typing 하게 되는데, 1) PCR-SSP (sequence-specific primer) 특정서열로 증폭하는 방법, 2) PCR-SSOP(sequence specific oligonucleotide probe) 증폭된 oligonucleotide probe로 Southern blot을 하는 방법과 3) PCR-SBT (sequencing based typing) HLA 유전자를 증폭하여 자동화 DNA 염기서열분석기로 염기서열을 결정하고 해석하여 allele 형을 판정이 있으며 이들 방법 중 PCR-SBT 방법이 가장 정확한 결과를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있음
- HLA 검사는 시료를 분석 전문 기관에 위탁하여 실시
- 은행에서는 필수적으로 HLA-A, B, C, 와 DRB1의 유전자형 분석을 실시하고 다른 유전자위의 분석은 필요에 따라 추가적으로 실시

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)(Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)

- 마이크로피펫 (Micropipette)  
- P1000 (200~1000  $\mu$ l)

## 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시험 과정

- ※ 전문기관 위탁 분석 시, 질병관리본부 내 용역계약체결 절차에 따라 분석 기관 선정
- ※ 분석 기관이 지정하는 방식에 따라 시료 준비 및 분석실시하고 분석 및 판독 결과를 확인

### 2.1. 시료의 준비 및 분석 의뢰

- ① 인간 전분화능줄기세포를 계대 배양 또는 해동한 후 35 mm 배양접시에 파종하여 이산화탄소배양기에서 6일 동안 배양
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14) 참조
- ② P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양액 1 ml과 함께 인간 전분화능줄기세포 콜로니를 수거한 후 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김
  - ※ 콜로니 수거 방법은 인간 전분화능줄기세포 계대 (SOP#15) 참조
- ③ 시료가 포함된 튜브를 분석 전문기관에 위탁하여 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 2.2. 검사 방법

- ① 검사는 분석 전문기관의 지침에 따라 수행
- ② 인간 전분화능줄기세포의 genomic DNA를 추출하고 유전자 증폭하여 염기서열을 분석

③ 검사시약명 : AVITATM PCR-SBT

※ 줄기세포주 특성분석 전문 기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 3. 판정 및 결과

○ 결과의 표기 형식은 2010년 개정된 HLA명명법 기준

<표> HLA 분석의 결과 (예시)

분석일자	Name	HLA-A	HLA-B	DRB1
2013.01.14	Cell Name	*02:07 *11:01	*18:01 *46:01	*04:05 *11:04

## 마이코플라스마 시험 (PCR) Mycoplasma Detection by PCR Method

### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포는 바이러스, 세균, 진균 등의 오염이 되지 않도록 관리되고 동결 저장 되어야함
- 마이코플라스마는 세포벽 없는 세균 (cell wall-free bacteria)의 일종으로 세포에 오염 시 세포 품질에 치명적이고 유해한 영향을 초래할 수 있음
- 마이코플라스마는 세포배양액의 혼탁도 등으로 오염 여부를 감지할 수 없어 특별한 주의를 기울여야 함
- 마이코플라스마 오염 확인은 직접 배양법이 가장 믿을 만한 시험법으로 알려져 있으나, 결과를 확인하기까지 4주 이상의 긴 시간이 소요됨
- 세포의 배양 과정 중 주기적으로 확인 가능한 쉽고 믿을 만한 방법이 필요함
- <TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set>는 배양세포 등에 오염 가능한 마이코플라스마를 PCR법을 이용하여 검출하는 kit임

### 1. 필요한 물품

#### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- PCR 기기 (Bio-rad, PTC-0200)
- 미량원심분리기 (한일, Micro-12)
- PCR 튜브용 원심분리기 (Labnet, DW41F-230v)
- 전자렌지 (대우, KOR-811K)
- Gel 카세트
- 500 ml 삼각플라스크
- 메스실린더
- 저울
- 전기영동장치 (Mupid, Mupid-2 plus)
- Davinch-gel gel imaging system (코아바이오시스템, GDS-145DE)
- 마이크로피펫 (Micropipette)

- P10 (1~10  $\mu\ell$ )
- P20 (2~20  $\mu\ell$ )
- P1000 (200~1000  $\mu\ell$ )

## 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (E-tube) (Axygen, MCT-150-C)
- 8-strip PCR 튜브 (SSI, 3240-00)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)

## 1.3. 시약

- Emeraldamp GT PCR master mix (2X premix) (Takara, RR310)
- RNase/DNase-free water (Welgene, ml019-02)
- Seakem<sup>®</sup> LE agarose (Lonza, 50004)
- 1X TAE buffer (Gendepot, T8050-100)
- Safe-pinky DNA gel staining solution (Gendepot, S1001-025)
- TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set (Takara, 6601 for 50 tests)

※ 내용물 :

MCGp F1 Primer (20 pmol/ $\mu\ell$ )	50 $\mu\ell$
MCGp R1 Primer (20 pmol/ $\mu\ell$ )	50 $\mu\ell$
MCGp F2 Primer (20 pmol/ $\mu\ell$ )	50 $\mu\ell$
MCGp R2 Primer (20 pmol/ $\mu\ell$ )	50 $\mu\ell$
Control Template (1 ng/ $\mu\ell$ )	50 $\mu\ell$

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 시험 과정

### 2.1. 시료의 준비

- ① 생물안전작업대 내에서 35 mm 배양접시 내 배양중인 인간 전분화능줄기세포 혹은 STO 세포의 배양액 1 ml를 P1000 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김

- ② 튜브에 시료명 (예시 : CHA-hES15 p34 KIM등)을 적절히 기입하고 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 시험수행 전까지 보관

## 2.2. 1차 PCR

※ 마이코플라스마 검출시험은 환경으로부터 시료의 오염을 방지하기 위해 PCR 기기 내 반응 이외 가능한 모든 작업을 생물안전작업대 등 무균작업대 내에서 멸균된 마이크로피펫용 필터팁 등을 사용

- ① 1차 PCR을 수행할 시료의 개수를 고려하여 생물안전작업대 등 무균작업대 내에서 1.5 ml 원심분리용 튜브에 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 아래의 순서로 시약을 첨가, vortex mixer로 혼합하여 반응액을 준비

※ 반응액 (시료 1개 당 시약 첨가량)

2× PCR Buffer	10 $\mu$ l
MCGp F1 Primer	0.5 $\mu$ l
MCGp R1 Primer	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l

- ② 교차오염에 주의하며 시료를 P10 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 5  $\mu$ l 씩 8-strip PCR 튜브에 첨가한 후 위의 반응액을 P20 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 15  $\mu$ l 씩 각 튜브에 첨가
- ③ 8-strip PCR 튜브 뚜껑에 적절히 시료명 혹은 정보를 기재
- ④ 8-strip PCR 튜브용 원심분리기로 spin-down 한 후 손가락으로 각 튜브 하단을 3회 씩 튕겨 혼합한 다음 8-strip PCR 튜브용 원심분리기로 spin-down 함
- ⑤ PCR 기기에 8-strip PCR 튜브를 옮긴 후 아래의 조건으로 PCR 실시

94°C	30 min	
↓		
94°C	30 sec	30 Cycles
55°C	2 min	
72°C	1 min	
↓		
4°C		

## 2.3. 2차 PCR

- ① 1차 PCR 종료시점에 맞추어 2차 PCR을 수행할 시료의 개수를 고려하여 1.5 ml 원심분리용 튜브에 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 아래의 순서로 시약을 첨가, vortex mixer로 혼합하여 반응액을 준비

2× PCR Buffer	10 $\mu$ l
MCGp F2 Primer	0.5 $\mu$ l
MCGp R2 Primer	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l



- ② 교차오염에 주의하여 1차 PCR 산물을 P10 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 2  $\mu$ l 씩 8-strip PCR 튜브에 첨가한 후, 위의 반응액을 P20 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 18  $\mu$ l 씩 각 튜브에 첨가
- ③ 8-strip PCR 튜브 뚜껑에 적절히 시료명 혹은 정보를 기재
- ④ 8-strip PCR 튜브용 원심분리기로 spin-down 한 후 손가락으로 각 튜브 하단을 3회 씩 튕겨 혼합한 다음 8-strip PCR 튜브용 원심분리기로 spin-down 함
- ⑤ PCR 기기에 8-strip PCR 튜브를 옮긴 후 아래의 조건으로 PCR 실시

94°C	30 min		
↓			
94°C	30 sec	┌	30 Cycles
55°C	2 min	└	
72°C	1 min	└	
↓			
4°C			

#### 2.4. 증폭 산물의 전기영동에 의한 해석

- ① 500 ml 삼각플라스크에 메스실린더를 이용하여 필요한 양의 1X TAE 버퍼를 측정하여 담고 전자저울로 agarose 분말을 1.5%의 농도가 되도록 측정하여 TAE 버퍼에 첨가하여 덩어리가 풀릴 때까지 섞어줌
- ② 전자렌지를 이용하여 TAE 버퍼에서 agarose가 완전히 녹을 때까지 끓인 후 60°C 정도가 되도록 상온에서 식힘
- ③ Safe-pinky를 P10, P20 마이크로피펫을 이용하여 agarose 혼합용액의 1/10000 부피만큼 넣어 잘 섞음
- ④ Gel 카세트에 cast, comb등을 적절히 배치하고 agarose 혼합액을 부어주고 차광하여 상온에서 20분 이상 정치하여 굳힘
- ⑤ Agarose gel이 완전히 굳은 것을 확인한 후 전기영동장치에 gel을 세팅하고, 1차와 2차 PCR 반응산물을 P10 마이크로피펫을 이용하여 각 well 별로 5  $\mu$ l 씩 loading 함
- ⑥ 100 V에서 15분 동안 전기영동 (PCR 생성물의 크기에 따라 전기영동 시간을 조절 함)
- ⑦ Davinch-gel™ gel imaging system에의 컴퓨터의 전원을 켜고 바탕화면의 core imager 프로그램을 실행하고 전기영동 완료한 gel을 거치대 위에 올림
- ⑧ Davinch-gel™ gel imaging system의 왼쪽 상단의 UV transilluminator 버튼을 눌러 UV 램프를 켜
- ⑩ Core imager 프로그램 하단의 ZOOM과 FOCUS를 이용하여 적절히 크기와 초점을 조절
- ⑪ Core imager 프로그램 오른쪽의 EXPOSURE TIME을 조절 (auto 모드를 선택하여 자동 조절 가능)
- ⑫ Core imager 프로그램 오른쪽 하단의 acquire 버튼을 클릭하여 사진을 촬영함

- ⑬ 촬영된 사진이 새로운 창으로 뜨면 사진 오른쪽의 SAVE 버튼을 누르고 저장경로를 설정함

2.5. 시료의 보관

- 시료들은 -20℃ 냉동고에 보관함

3. 판정

- 마이코플라스마 오염 여부는 아래의 마이코플라스마 종류에 따라 생성되는 증폭단편의 길이에 해당하는 PCR 밴드의 유무에 의해 판정함

<표> 12종류의 Mycoplasma 종의 증폭단편의 길이

	F1 and R1 ( bp)	F2 and R2 ( bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. pulmonis</i>	477	189
<i>M. hyorhinis</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. capricolum</i>	415	179
<i>M. arthritidis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370,369	147,148
<i>M. arginini</i>	369	145
<i>U. urealyticum</i>	482,481	154
<b>Positive Control</b>	<b>810</b>	<b>590</b>

4. 사용 시 주의점

- 실험실 및 연구자 환경에 따라 마이코플라스마가 환경적으로 오염되어 있을 가능성이 있으므로 본 시험 수행을 위해서는 **환경관리가 필수적임**
- ※ 마이코플라스마 시험은 생물안전작업대 또는 무균작업대 내에서 멸균된 마이크로 피펫용 필터 팁 등을 사용하는 것이 바람직함
- ※ 반응의 위양성 (false positive)을 방지하기 위하여 마이코플라스마 시험에 사용되는 피펫 팁을 포함한 소모성 비품과 용액 등의 개봉 후 재사용하지 않음
- 손에 nuclease가 존재하는 것으로 알려져 있으므로, 맨손으로 시험을 수행하지 말고, 일회용 장갑 등을 사용할 것
- 얼음 위에서 시료를 다룰 것

## 5. 결과 보고

- 줄기세포주 시료와 양성 대조군 (positive) 및 음성 대조군 (negative)의 PCR 결과 산물의 전기영동 이미지를 제시

시험일자: 20__년__월__일	
시료명	판정 (positive, negative or 재검사)

## 마이코플라스마 시험 (루미노메터) Mycoplasma detection by a biochemical method

### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포는 바이러스, 세균, 진균 등의 오염이 되지 않도록 관리되고 동결 저장 되어야함
- 마이코플라스마는 세포벽 없는 세균 (cell wall-free bacteria)의 일종으로 세포에 오염 시 세포 품질에 치명적이고 유해한 영향을 초래할 수 있음
- 마이코플라스마는 세포배양액의 혼탁도 등으로 오염 여부를 감지할 수 없어 특별한 주의를 기울여야 함
- 마이코플라스마 오염 확인은 직접 배양법이 가장 믿을 만한 시험법으로 알려져 있으나, 결과를 확인하기까지 4주 이상의 긴 시간이 소요됨
- 세포의 배양 과정 중 주기적으로 확인 가능한 쉽고 믿을 만한 방법이 필요함
- Lonza 사의 <MycoAlet Mycoplasma Detection Kit>는 쉽고 빠르게 마이코플라스마를 감지할 수 있는 방법으로 알려져 있음

### 1. 필요한 물품

#### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 큐벳/튜브용 루미노메터 (Berthold, Cuvette/tube luminometer)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

#### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (E-tube) (Axygen, MCT-150-C)
- 루미노메터용 큐벳 또는 튜브
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)

- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)

### 1.3. 시약

- MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-418 for 50 tests)

※ 내용물 :

MycoAlert™ Reagent. Lyophilized. 2.5 ml x 2 vials (LT27-237)  
 MycoAlert™ Mycoplasma Assay Buffer. 10 ml x 1 bottle (LT27-218)  
 MycoAlert™ Substrate. Lyophilized. 2.5 ml x 2 vials (LT27-238)

- MycoAlert™ Assay Control Set (Lonza, LT07-518 for 10 tests)

※ 내용물 :

MycoAlert™ Assay Control. 300 µl x 1 vial (LT27-235)  
 MycoAlert™ Assay Buffer. 2 ml x 1 bottle (LT27-236)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임  
 ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 MycoAlert™ Reagent의 준비

※ 마이코플라스마 검출시험은 환경으로부터 시료의 오염을 방지하기 위해 PCR 기기 내 반응 이외 가능한 모든 작업을 생물안전작업대 등 무균작업대 내에서 멸균된 마이크로피펫용 필터 팁 등을 사용

- ① 생물안전작업대 내에서 P1000 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 <MycoAlert™ Reagent>가 들어있는 바이얼에 2.5 ml 의 <MycoAlert™ Assay Buffer> 첨가
- ② 바이얼 뚜껑을 돌려 잠근 후 바이얼 하단을 손가락으로 가볍게 튕겨 섞어줌
- ③ 내용물이 잘 섞이도록 15분 간 상온에 정치
- ④ P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5 ml 원심분리용 튜브에 <MycoAlert™ Reagent>를 각각 100 µl 씩 분주한 후 튜브 뚜껑에 시료명 표기

### 2.2. <MycoAlert™ Substrate>의 준비

- ① 생물안전작업대 내에서 P1000 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 <MycoAlert™ Substrate>가 들어있는 바이얼에 2.5 ml의 <MycoAlert™ Assay Buffer> 첨가

- ② 바이얼 뚜껑을 돌려 잠근 후 바이얼 하단을 손가락으로 가볍게 튕겨 섞어줌
- ③ 내용물이 잘 섞이도록 15분 간 상온에 정치
- ④ P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5 ml 원심분리용 튜브에 <MycoAlert™ Substrate>를 각각 100  $\mu$ l 씩 분주한 후 튜브 뚜껑에 시료명 표기

### 2.3. <MycoAlert™ Assay Control>의 준비

#### 2.3.1. 양성대조군 (Positive Control)

- ① 생물안전작업대 내에서 P1000 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 Lyophilized <MycoAlert™ Assay Control>이 들어있는 바이얼에 1 ml의 <MycoAlert™ Assay Buffer> 첨가
- ② 바이얼 뚜껑을 돌려 잠근 후 바이얼 하단을 손가락으로 가볍게 튕겨 섞어줌
- ③ 내용물이 잘 섞이도록 15분 간 상온에 정치
- ④ P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5 ml 원심분리용 튜브에 <MycoAlert™ Assay Control>을 각각 100  $\mu$ l 분주한 후 튜브 뚜껑에 시료명 표기 (예 : PC)

#### 2.3.2. 음성대조군 (Negative Control)

- ① 생물안전작업대 내에서 P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5 ml 원심분리용 튜브에 MycoAlert™ Assay Buffer를 각각 100  $\mu$ l 분주한 후 튜브 뚜껑에 시료명 표기 (예 : NC)

### 2.4. 시료의 보관

- 대조군을 제외한 시료들은 사용 전까지 -20℃ 냉동고에 보관함
- 분주한 양성대조군 (Positive Control)은 사용 전까지 -70℃ 초저온냉동고에 보관함
- Reagent와 substrate는 냉동과 해동을 반복하지 않아야 하며, 4℃ 냉장고에서는 5일간 보관 가능

### 2.5. 시료의 라벨링

- 분주된 시료는 튜브에 분주 날짜를 다음과 같은 방식으로 표기

YYYYMMDD
성 명

## 3. 시험 과정

※ 본 시험을 통해 준비된 배양액 시료는 마이코플라스마 시험법 (PCR)에 함께 사용됨

- ① 생물안전작업대 내에서 35 mm 배양접시 내 배양중인 인간 전분화능줄기세포 혹은 STO 세포의 배양액 1 ml를 P1000 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 멸균된 1.5

ml 원심분리용 튜브로 옮김

- ② 튜브에 시료명 (예시 : CHA-hES15 p34 KIM등)을 적절히 기입하고 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 시험수행 전까지 보관
- ③ 시험 전 Reagent와 substrate, 분석 대조군을 상온에 미리 꺼내두어 충분히 녹을 수 있도록 준비하고 루미노미터와 연결된 컴퓨터 전원을 켜 프로그램을 가동함
- ④ 시료가 담긴 튜브를 200 rpm에서 5분 간 원심 분리 함
- ⑤ P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 100  $\mu$ l의 시료를 reagent가 담긴 큐벳 또는 튜브에 첨가하고 5회 피펫팅 하여 혼합한 다음 5분 간 상온에서 정치
- ⑥ 루미노미터의 프로그램 가동 : 1 second integrating reading으로 지정
- ⑦ Luminescence 확인 (Reading A)
- ⑧ P200 마이크로피펫과 필터팁을 이용하여 100  $\mu$ l의 시료를 substrate가 담긴 큐벳 또는 튜브에 첨가하고 5회 피펫팅 하여 혼합한 다음 10분 간 상온에서 정치
- ⑨ Luminescence 확인 (Reading B)
- ⑩ 흡광도 비율을 계산함(비율=Reading B/Reading A)

#### 4. 판정

- 시험 과정의 검증: 양성대조군 (Positive control)의 B/A 비율은 1.2 이상, 음성대조군 (Negative control)은 0.9 미만이어야 함

<표> 마이코플라스마 시험 결과의 판정

B/A 비율	판정과 결론	
< 0.9	Negative	마이코플라스마 미검출
> 1.2	Positive	마이코플라스마 오염
0.9 ~ 1.2	Borderline	다른 방법으로 재시험 (세포를 지속적으로 관찰하여 24시간 후 재시험)

#### 5. 원리

- 마이코플라스마에 존재하는 특정 luciferase 기능을 가진 효소의 생화학적 특성을 이용함
- 살아있는 마이코플라스마가 파괴되면서 ADP를 ATP로 전환시킴. Luciferase를 이용하여 ATP의 수준을 조사함

## 6. 사용시 주의점

- 손에 ATP가 많으므로 장갑 사용할 것/맨손으로 사용하지 말 것
- 22℃가 가장 적절한 온도/사용 전에 상온에서 시료를 다룰 것
- 실험실 및 연구자 환경에 따라 마이코플라스마가 환경적으로 오염되어 있을 가능성이 있으므로 본 시험 수행을 위해서는 **환경관리가 필수적임**
- ※ 반응의 위양성 (false positive)을 방지하기 위하여 마이코플라스마 시험에 사용되는 피펫 팁을 포함한 소모성 비품과 용액 등의 개봉 후 재사용하지 않음

## 7. 결과 보고

<표> 마이코플라스마 시험 결과보고

시료명	A 값	B 값	B/A 비율	판정 (positive, negative or 재검사)



## 세포부착 및 형태 관찰

### Examination of hPSC attachment and morphology

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포 동결 바이얼의 해동 및 계대 배양할 경우 적정 수 이상의 세포 클로니가 부착되어야 안정적인 배양을 할 수 있음
- 인간 전분화능줄기세포는 클로니 형태로 자라며, 미분화를 유지하고 있는 핵/세포질의 비율이 높은 특징을 가지고 있는데 이러한 특징은 세포주의 미분화 유지의 지표로 이용되고 있음
- 동결 바이얼 해동 후 7 또는 10일간 배양 시 세포부착을 확인하고 줄기세포주의 클로니 및 세포 형태를 관찰하고 이미지를 기록함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical, JP/SZ61TR)
- 역상현미경 (Olympus Optical, JP/IX-71-22FL)
- 원심분리기
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2 소모품

- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)

- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4°C 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37°C 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 37°C에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF를 (최종농도 4 ng/ml) 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 15 ml 원심분리용 튜브에 5 ml씩 분주함
- ④ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 보관
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동 시 사용함.

## 3. 시험 과정

- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고 37°C 항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결세포 바이얼을 스폰지형 튜브 고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 빠르게 해동함
- ② 해동된 동결바이얼 내의 세포액은 P1000 마이크로피펫으로 모두 수거하여 5 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액이 분주된 15 ml 원심분리용 튜브에 첨가하고 800 rpm으로 5분 간 원심분리
- ③ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 배양액을 2 ml 첨가하고 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ④ 두 개의 35 mm 배양접시에 세포 부유액 1 ml과 배양액 1 ml를 각각 첨가하고 세포가 표면에 고루 퍼지도록 전후좌우로 3회씩 흔들어 줌 (하나의 세포 바이얼을 두 개의 35 mm 배양접시로 나눔)
- ⑤ 세포계수기를 이용하여 넣어준 세포 덩어리의 수를 실체현미경으로 관찰하며 계수

하고 이산화탄소배양기로 배양접시를 옮겨 전후좌우로 3회씩 흔들어 준 후 정치하여 세포를 배양함

- ⑥ 세포 해동 후 2일째부터 7~10일 까지 매일 배양액을 교체
- ⑦ 7일 또는 10일째 배양접시에 부착하여 자란 세포 콜로니의 형태를 실체현미경 또는 위상차현미경으로 관찰하고 이미지를 기록함.

#### 4. 결과의 기록 및 판정

##### 4.1 콜로니 및 세포 이미지의 기록

- ① 실체현미경 : 배율 x8, x15
- ② 역상현미경 : 위상차 이미지 배율 x40, x100

##### 4.2 세포부착의 판정

세포부착	판정
해동 후 콜로니 및 세포 회수 불가능	부적격
해동 후 콜로니 및 세포 회수 가능	합격

## 세포생존율 측정 [Trypan blue]

### Measurement of cell viability [Trypan blue]

#### □ 개 요

- 은행에서 동결 보존하고 있는 세포는 해동하여 세포 회수율의 한 지표로 세포생존율을 측정함
- Trypan blue 염색액을 이용하여 생세포와 사세포를 구분하고 생세포의 비율이 50% 이상일 경우 적합

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 원심분리기
- 역상현미경 (Olympus Optical, JP/IX-71-22FL)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 혈구계수기 (Hemocytometer)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2 소모품

- 15 ml 원심분리용 튜브 (NUNC, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

##### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액

※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조

- Accutase (Sigma, A6964)
- Trypan blue (Sigma, 93595)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4℃ 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동
- ② 37℃에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종 농도 4 ng/ml) 첨가하고 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용 후 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

### 2.2 Accutase의 준비

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 -20℃ 냉동고에 보관중인 accutase는 사용 전 37℃ 항온수조에서 해동함
- ② 해동된 accutase는 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ③ 사용 후 남은 accutase는 파라필름으로 밀봉하여 -20℃ 냉동고에 보관

### 2.3 Trypan blue의 준비

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 상온에 보관중인 trypan blue는 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ② 사용 후 남은 trypan blue는 파라필름으로 밀봉하여 상온에 보관

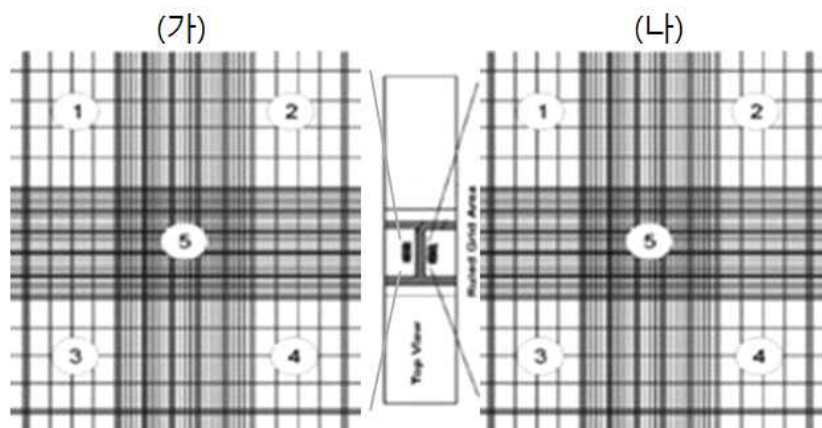
### 2.4 1X DPBS의 준비

- ① 50 ml씩 분주 하여 4℃ 냉장고에 보관중인 1X DPBS는 측면을 70% 알코올 등으로 적절히 세척하여 생물안전작업대 내로 옮겨 사용

- ② 사용 후 남은 1X DPBS는 밀봉한 후 4°C 냉장고에 보관

### 3. 시험 과정

- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고 37°C 항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결세포 바이얼을 스폰지형 튜브고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 빠르게 해동함
- ② 해동된 동결바이얼 내의 세포액은 P1000 마이크로피펫으로 모두 수거하여 4 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액이 분주된 15 ml 원심분리용 튜브에 넣고 1000 rpm으로 3분 간 원심분리
- ③ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ④ 1000rpm에서 3분 간 원심분리 후 P1000 마이크로피펫으로 상층액 제거
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 500  $\mu$ l의 accutase를 첨가 후 20회 피펫팅 하여 단일세포화 하고 1000 rpm에서 3분 간 원심분리
- ⑥ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 P200 마이크로피펫으로 1X DPBS 50  $\mu$ l를 첨가하고 가볍게 5회 피펫팅하여 세포를 재부유시킴
- ⑦ 파라필름위에 세포 부유액 20  $\mu$ l 와 trypan blue 20  $\mu$ l를 잘 섞어서 혈구계수기 한 면에 10  $\mu$ l씩 두 면에 각각 주입
- ⑧ 역상현미경으로 관찰하며 (X100) 아래와 같이 혈구계수기의 (가)면과 (나)면의 네 모서리의 사각형 (①~④) 안에 있는 생세포와 사세포를 계수
  - ※ 생세포 : 염색되지 않아 밝게 보이는 세포
  - ※ 사세포 : 어둡게 염색된 세포



<그림> 혈구계수기 모식도

- ⑨ 두 면의 생세포와 사세포 계수 값의 합을 각각 8로 나누어 생세포와 사세포수의 평균값을 구함
- ⑩ 생존율을 아래와 같이 구함

※ 계산법 : 생존율 = 생세포 평균값/(생세포 평균값+사세포 평균값)×100

#### 4. 판정

생존율	등급	판정
25% 이상	+	부적합
50% 이상	++	적합
75% 이상	+++	

## 세포생존율 측정 [Cell counter]

### Measurement of cell viability [Cell counter]

#### □ 개 요

- 은행에서 동결 보존하고 있는 세포는 해동하여 세포 회수율의 한 지표로 세포생존율을 측정함
- 자동화 세포계수기 (Cell counter)를 이용하여 핵산에 결합하는 성질을 가진 두 종류의 색소, 아크리딘 오렌지 (acridine orange, AO)와 프로피딘아오다인 (propidine iodine, PI)를 이용하여 살아있는 세포 (생세포)와 죽은 세포 (사세포)를 구분함
  - ※ AO는 생세포와 사세포 모두를 투과하여 세포 내 침투되어 녹색 형광을 발현하고, PI는 세포막의 구성이 불안정한 사세포 만 투과하여 적색 형광을 발현으로 생세포와 사세포를 구분함
- 세포생존율은 생세포에 대한 사세포의 비율이 50% 이상일 경우 적합

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 원심분리기
- 자동화 세포계수기 (Luna, L20001)
- 일회용 혈구계수기 (Luna, L12002)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2 소모품

- 15 ml 원심분리용 튜브 (NUNC, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)



- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조
- Accutase (Sigma, A6964)
- AO/PI cell viability kit (Logos Biosystems, F23001)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4℃ 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동 시 사용함.
- ② 37℃에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종 농도 4 ng/ml) 첨가하고 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용 후 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

### 2.2 Accutase의 준비

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 -20℃ 냉동고에 보관중인 accutase는 사용 전 37℃ 항온수조에서 해동함
- ② 해동된 accutase는 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ③ 사용 후 남은 accutase는 파라필름으로 밀봉하여 -20℃ 냉동고에 보관

### 2.3 AO/PI cell viability kit의 준비

- ① 4℃ 냉장고 보관 중인 AO/PI cell viability kit의 1 바이얼을 꺼내 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용

- ② 사용 후 남은 AO/PI cell viability kit는 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

### 2.4 1X DPBS의 준비

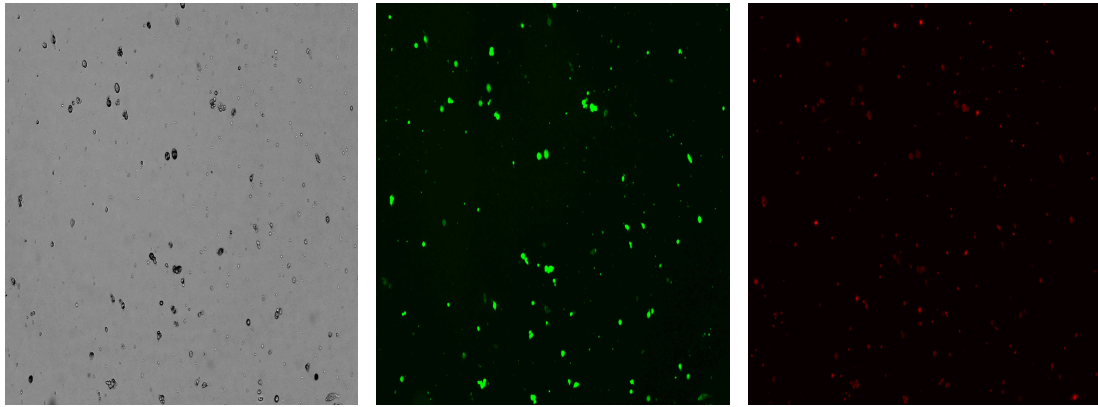
- ① 50 ml씩 분주 하여 4℃ 냉장고에 보관중인 1X DPBS는 측면을 70% 알코올 등으로 적절히 세척하여 생물안전작업대 내로 옮겨 사용
- ② 사용 후 남은 1X DPBS는 밀봉한 후 4℃ 냉장고에 보관

### 3. 시험 과정

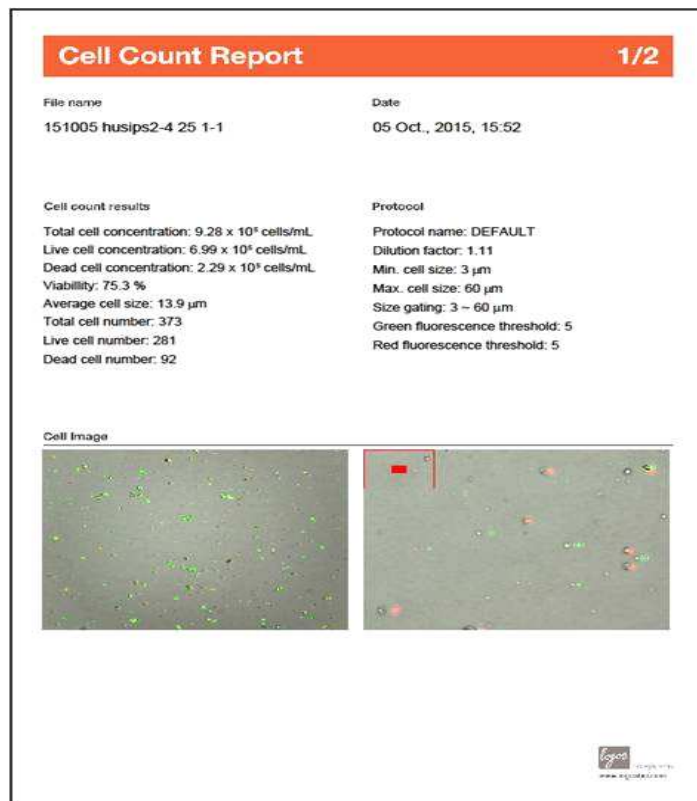
- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고 37℃ 항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결세포 바이얼을 스폰지형 튜브고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 빠르게 해동함
- ② 해동된 동결바이얼 내의 세포액은 P1000 마이크로피펫으로 모두 수거하여 4 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액이 분주된 15 ml 원심분리용 튜브에 넣고 1000 rpm으로 3분 간 원심분리
- ③ 상층액 제거 후 P1000 마이크로피펫으로 500  $\mu$ l의 accutase를 첨가 후 20회 피펫팅 하여 단일세포화 하고 1000 rpm에서 3분 간 원심분리
- ④ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 P200 마이크로피펫으로 1X DPBS 100  $\mu$ l를 첨가하고 가볍게 5회 피펫팅하여 세포를 재부유시켜 1.5 ml tube로 옮김
- ⑤ 1.5 ml tube 3개에 균질화 각각 샘플 1, 2, 3으로 표시한 후 세포부유액을 18  $\mu$ l씩 나누어 넣어 줌
- ⑥ 분주해둔 세포부유액 18  $\mu$ l에 AO/PI cell viability kit 용액 2  $\mu$ l를 첨가 한 후 일회용 혈구계수기 A와 B면에 각각 10  $\mu$ l씩 주입
- ⑦ 자동화 세포계수기를 이용해 A면과 B면을 차례로 계수
- ⑧ 계수가 끝난 후 화면에 결과가 나타나면 파일을 저장하여 관리

#### ※ 자동화 세포계수기(Luna, L20001)사용법

- ▷ 기기 전원을 켜 후 기본 화면 중에 <Fluorescence Cell Counting> 화면을 클릭하여 프로그램을 실행
- ▷ 세포를 로딩 해 둔 혈구계수기를 삽입한 다음 오른쪽 원형 레버를 이용하여 초점을 맞춤
- ▷ <Count> 버튼을 눌러 계수를 시작 (Exposure level ; Green 5, Red 5)
- ▷ 분석 후 결과 값이 화면에 뜨면 <Save/Print> 버튼을 눌러 데이터 저장 (데이터 저장 시에는 기본 부품으로 제공되는 USB가 반드시 꽂혀있어야만 함)



<그림> 자동화 세포계수기로 확인한 세포 모습, 왼쪽에서부터 BF, 생세포 (녹색), 사세포 (적색)으로 나타냄



<그림> 세포계수 보고서

#### 4. 판정

생존율	등급	판정
25% 이상	+	부적합
50% 이상	++	적합
75% 이상	+++	

## 세포성장을 측정 Measurement of doubling time

### □ 개 요

- 성장률은 세포주 고유의 특성으로 은행은 관리·분양하는 전분화능줄기세포의 특성 정보 제공 차원에서 성장률 정보를 제공함
- 세포를 feeder-free 상태에서 48 시간 배양하여 세포 수의 변화를 관찰함
- 배양한 세포는 0시간, 48 시간 두 번에 걸쳐 촬영 한 후 세포핵의 수를 측정함

### 1. 필요한 물품

#### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 역상현미경 (Olympus Optical, JP/IX-71-22FL)
- 항온수조기 (WISEBATH, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 영상분석장비
  - 컴퓨터

#### 1.2 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

### 1.3 시약

- hESC-qualified Matrix (Matrigel) (Corning Matrigel, 354277)
- mTeSR-1 supplement (Stem Cell Technol, 05850)
- mTeSR-1 media (Stem Cell Technol, 05850)
- Dispase (Gibco, 17105-041)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 Matrix 코팅액 제조 및 배양접시 코팅

- ① 140  $\mu$ l씩 분주되어 냉동고에 보관 중인 hESC-qualified Matrix를 냉장고에 넣어 해동, 해동된 hESC-qualified Matrix와 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관 중이던 DMEM/F12 배지는 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮김

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

- ② 해동된 hESC-qualified Matrix 140  $\mu$ l당 DMEM/F12 배지 12 ml 을 새로운 15 ml 튜브에 혼합 후 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어줌
- ③ 사용하고 남은 DMEM/F12배지는 파라필름으로 밀봉하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관
- ④ Matrix가 혼합된 배지로 35 mm 배양접시 2 ml을 넣어 배양접시 표면이 고르게 도포하여 한 시간 이상 상온에서 정치하여 코팅한 후 코팅액을 P1000 마이크로피펫으로 제거

※ Matrix 코팅은 사용 직전에 준비하고 코팅액 제거 후에 배양접시의 표면이 건조되지 않도록 주의

### 2.2 mTeSR-1 배지 준비

- ① 시약의 준비(APPENDIX#1)을 참조하여 보관되어 있는 mTeSR-1 supplement와 mTeSR-1을 꺼내 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮 혼합하여 배지를 준비

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.3 Dispase 준비

- ① 10 ml 씩 분주되어 냉동 보관중인 dispase는 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 해동한 후 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮김

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 3. 시험 과정

- ① 인간 전분화능줄기세포 계대 및 배양에 따라 해동 후 2~3 계대가 경과된 인간 전분화능줄기세포를 35 mm 배양접시에 약 80% 정도의 세포 밀도가 되도록 파종한 후 일주일 동안 세포를 배양 함
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 계대 (SOP#15, 3. 시험 과정의 ②~⑥항) 참조
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14, 3. 시험 과정의 ②~⑥항) 참조
- ② 세포를 떼어내기 전 세포를 배양하고자하는 35 mm 배양접시의 바닥부분에 네임펜을 격자무늬로 구역을 설정함
- ③ 격자무늬를 표시한 35 mm 배양접시를 “2.1 Matrix 코팅액 제조 및 배양접시 코팅”의 절차에 따라 matrix를 코팅함
- ④ ①의 한 35 mm 배양접시 (약 80% 밀도)에 배양된 인간 전분화능줄기세포 (약 80% 밀도) dispase로 세포를 떼어내어 15 ml 튜브에 옮겨 담아 보관
- ⑥ ⑤의 미리 떼어둔 세포를 P1000 마이크로피펫으로 5회 정도 피펫팅하여 세포를 잘게 쪼개어 준 후 1:4의 비율로 세포부유액을 희석하여 mTeSR-1 배지를 2 ml 씩 35 mm 배양접시에 새롭게 파종함
- ⑦ 3일 배양 후 적당한 크기의 세포를 찾아 0시간으로 촬영을 하고 48시간 후 같은 위치의 세포를 찾아 다시 현미경 촬영(x100), 총 3개의 배양접시를 촬영하고 하나의 배양접시에서 3개의 세포를 촬영 (총 9개의 세포촬영)

#### 3.1. Cell doubling time 계산

- ① 사진파일을 컴퓨터로 옮겨와 세포의 핵을 세어 증가한 세포를 계산하고 세포 doubling time 측정 공식에 대입하여 doubling time 측정

※ **Doubling time (generation time) :**

▷ 이분법으로 분열하는 세포수의 2배 증가 시간으로 결정

$N_0$  = 측정 최초의 세포 수

$N_t$  = 시간 t에서의 세포 수

n = t 시간 동안의 세대 수

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

평균생장율 상수  $K = (\text{Log } N_t/N_0)/0.301t$

Doubling time  $\rightarrow N_t = 2N_0$  일 때의 시간 g로 표현하면

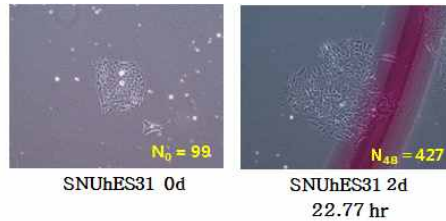
$$K = \text{Log}2/0.301g$$

따라서 Doubling time g는  $0.301t/(\text{Log } N_t/N_0)$  이다.

▷ 본 실험에서는 48시간 배양 후 doubling time을 측정하기 때문에  
**Doubling time = 14.448/(Log  $N_t/N_0$ )**

○ SNUhES31의 세포성장율 (예시)

$$48\text{hr} \Rightarrow \frac{14.448}{\log N_{48} - \log N_0}$$



- 위와 같은 방법으로 총 9개의 세포성장율은 측정 후 평균 결과 표시

4. 판정결과

Cell Doubling Time (n=9)	
Time (mean±SD)	29.6±5.4 hr

SOP#10
Ver 1. 20130530

## STO 세포 배양접시의 준비

### Inactivated STO cell seeding on culture plates

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- T75 플라스크 (Nunc, 156499)
- 35 mm 배양접시 (Nunc, 153066)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, 4488)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 혈구계수기
- 유성사인펜
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

##### 1.3. 시약

- Mitomycin C (Sigma, M4287)
- Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, 1X) (T/E) (GIBCO, 25300-054)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)



※ 시약의 준비(APPENDIX#1) 참조

○ STO 배양액

※ “STO 세포 입수 및 원물질 스톡 제조 (SOP#12)”의 “2.2.1 STO 배양액 조제” 참조

○ 멸균 3차 증류수

○ 0.1% Gelatin in Water (Stem Cell Technol, 07903)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. Mitomycin C의 준비

- ① 분주된 mitomycin C는 STO를 불활성화 할 때 사용하며, 필요할 때마다 냉장고에서 꺼내어 바로 사용하고, 제조 후 2주 이후에는 폐기

※ 시약의 준비(APPENDIX#1) 참조

### 2.2. 배양접시의 Gelatin 코팅

- ① 생물실험안전대에서 0.1% gelatin 1 ml로 표면 전체에 고르게 도포하여 30분 이상 정치
- ② 젤라틴을 제거하고 사용

## 3. 시험 과정

- ① T75 플라스크 (일반적으로 3개)에서 배양된 STO는 최소 하루에 한 번씩 역상현미경으로 성장 정도를 확인하고 생물안전작업대에서 이틀에 한 번씩 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 STO 배양액을 제거하고 새로운 STO 배양액을 10 ml 넣어주며 배양액을 교체하여 배양
- ② 배양 6일째에 생물안전작업대에서 50 ml 원심분리용 튜브에 P200 마이크로피펫을 이용하여 200  $\mu$ l의 mitomycin C를 첨가하고 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 STO 배양 배지 10 ml를 첨가한 후 5회 피펫팅하여 잘 혼합 (T75 플라스크 한 개 기준)
- ③ 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 T75 플라스크 안의 STO 배양액을 제거한 후 T75 플라스크 한 개당 10 ml의 mitomycin C 용액을 첨가하고, 배양된 세포 전체에 고르게 퍼지도록 조심스럽게 흔들어줌
- ④ T75 플라스크를 이산화탄소배양기에 넣고 2시간 30분 동안 배양하여 STO의 불활성화를 유도

- ⑤ 불활성화 유도 후 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 T75 플라스크 안의 STO 배양액을 제거하고 10 ml의 1X DPBS를 넣어서 부착되어있는 STO를 2회 반복하여 세척함
- ⑥ 세척한 1X DPBS를 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 완전히 제거한 후 P1000 마이크로피펫으로 2 ml의 T/E를 첨가하고, 고루 퍼지도록 조심스럽게 흔들어준 후 이산화탄소 배양기에 넣고 3분 동안 배양
- ⑦ 역상현미경으로 T75 플라스크 안의 STO가 모두 분리되었는지 확인한 다음 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 10 ml의 STO 배양액을 넣어 T/E의 작용을 중화함
- ⑧ T75 플라스크 안의 세포 부유액을 수거하여 15 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1000 rpm에서 3분 간 원심분리
- ⑨ P1000 마이크로피펫을 이용하여 펠렛이 딸려오지 않도록 상층액을 제거한 후 2 ml의 STO 배양액을 넣고 50회 피펫팅하여 단일세포화
- ⑩ 깨끗하게 건조된 혈구계수기 위에 커버글라스를 덮어 계수 준비
- ⑪ 계수할 세포 부유액에 P1000 마이크로피펫을 이용하여 STO 배양액 8 ml를 첨가하고 5회 피펫팅한 후 P10 마이크로피펫을 이용하여 10  $\mu$ l를 취함
- ⑫ 혈구계수기 한쪽 면의 V모양 홈에 P10 마이크로피펫을 이용하여 계수할 시료 10  $\mu$ l를 넣고 모세관 현상에 의해 시료가 잘 퍼진 것을 확인
- ⑬ 계수할 시료를 넣은 혈구계수기를 현미경으로 관찰하며 혈구계수기 모서리 부분에 있는 네 곳의 사각형 안에 있는 세포의 수를 계수한 뒤 4로 나누어 그 평균값을 산출
- ⑭ 세포의 수 = (살아있는 세포수의 평균값) $\times 10^4$  cells/ml
- ⑮ STO를 옮길 0.1% 젤라틴이 코팅된 35 mm 배양접시에 STO 배지를 1 ml 씩 분주함
- ⑯ 세포수가  $1.8 \times 10^4$  cells/ml이 되도록 STO 배양액을 첨가하여 희석한 세포 부유액을 P1000 마이크로피펫을 이용하여 미리 분주해 놓은 35 mm 배양접시에 1 ml씩 넣어 배양접시의 표면에 고루 퍼지도록 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 주고 이산화탄소 배양기에 넣어 최소 12시간 이상 배양함
- ⑰ 다음날 역상현미경 아래에서 35 mm 배양접시에 부착된 STO의 수와 모양을 확인

SOP#11
Ver 1. 20130530

## STO 동결 및 해동

### Cryopreservation and thawing of STO cells

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- T75 플라스크 (Nunc, 156499)
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, 4488)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 혈구계수기
- 세포 동결 컨테이너 (Nalgene, 5100-0001)
- 유성사인펜
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- Isopropanol (MEKK, K39379234 850)
- 일회용 장갑

##### 1.3. 시약

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Amresco, N182-1)
  - Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, 1X) (T/E) (GIBCO, 25300-054)
  - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

○ STO 배양액

※ “STO 세포 입수 및 원물질 스톡 제조 (SOP#12)”의 “2.2.1 STO 배양액 조제” 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. 세포 동결 컨테이너 (cell freezing container)의 사용

- ① 세포 동결 컨테이너는  $-70^{\circ}\text{C}$  이하의 초저온 냉동고에서 1분에  $1^{\circ}\text{C}$  씩 천천히 온도를 낮추어 주는 용기로, 인간 전분화능줄기세포 및 STO를 액체 질소탱크에 보관하기 위해 동결 처리를 한 후 완만 동결 (slow freezing) 방법을 사용하여 세포를 동결할 때 사용함
- ② 세포 동결 컨테이너 는 채움선 까지 이소프로판올을 넣어서 사용하여야 하며, 다섯 번 사용 후에는 이소프로판올을 교체해 줌
- ③ 세포 동결 컨테이너에는 2 ml 동결 바이얼이 18개가 들어감

### 2.2. 세포 동결액

#### 2.2.1 STO 동결액 만들기

- ① STO를 동결보존하기 위한 동결액은 배양된 STO의 수량에 따라 적정량을 계산하여 동결하기 직전에 만듦 (바이얼 당 1 ml 기준)
- ② 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 STO 배양액에 DMSO를 9:1의 비율로 첨가하고 잘 섞어 STO 동결액 제조

## 3. 시험 과정

### 3.1. STO passage number 3 (p3) 바이얼 해동 및 배양

- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결 상태의 STO 바이얼을 스폰지형 튜브 고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 해동함
- ② STO 바이얼을 70% 알코올로 적절히 소독하고 생물안전작업대로 옮긴 후 P1000 마이크로피펫을 이용하여 바이얼 내 STO 동결액을 4 ml의 STO 배양액이 들어있는 15 ml 원심분리용 튜브로 옮겨 5회 피펫팅하여 잘 혼합시킴
- ③ STO를 옮겨 넣은 15 ml 원심분리용 튜브를 1200 rpm에서 3분 간 원심분리를 한 후 P1000 마이크로피펫을 이용하여 상층액을 제거하고 1 ml STO 배양액을 넣고 50회 피펫팅하여 재부유함

- ④ 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 튜브에 STO 배양액 14 ml를 첨가하고 5회 피펫팅하여 혼합
- ⑤ T75 플라스크에 세포 부유액을 모두 옮긴 후 이산화탄소배양기에 넣고 플라스크 전체에 세포 부유액이 잘 퍼지도록 조심스럽게 전후좌우로 흔들어줌
- ⑥ 이틀에 한 번씩 실체현미경 아래에서 STO의 성장 정도를 확인하고 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 STO 배양액을 모두 제거한 후 새로운 상온 상태의 STO 배양액을 15 ml 넣어주어 배양액을 교체

### 3.2. STO p3 동결 및 보관 (p2-> p3)

- ① 해동한 저장용 STO (p2)를 두 개의 T75 플라스크에 넣고 배양
- ② 위 3.1의 ⑥의 배양방법으로 STO를 배양한 후 세포의 밀도가 95%에 도달할 때 STO를 동결처리하여 보관
- ③ 동결 바이얼의 라벨링은 세포명과 계대수, 분주 날짜를 다음과 같은 방식으로 표기하며, 동결 보관할 바이얼의 개수를 사전에 고려하여 준비

세포명 Passage YYYYMMDD 성 명	(예시)	STO P2 20130321 홍길동
-----------------------------------	------	------------------------------

- ④ STO를 배양 중인 T75 플라스크 안의 배양액을 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 제거한 후 10 ml DPBS를 T75 플라스크에 넣어서 부착되어있는 STO를 세척하고 DPBS를 제거, 본 과정 2회 반복
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 2 ml T/E를 첨가하고, 고루 퍼지도록 조심스럽게 흔들어 준 후 이산화탄소배양기에 넣고 3분 동안 배양함
- ⑥ 플라스크를 부드럽게 상하로 흔들어 STO를 플라스크에서 모두 분리시킨 다음 10 ml STO 배양액을 넣어 T/E의 작용을 중화함
- ⑦ 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 세포 부유액을 수거하여 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1000 rpm에서 5분 간 원심분리
- ⑧ 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 상층액을 제거한 후 P1000 마이크로피펫을 이용하여 2 ml의 STO 배양액을 넣고 50회 피펫팅하여 단일세포화 한 다음 STO 배양액 8 ml를 첨가하여 P1000 마이크로피펫으로 10회 피펫팅하여 재부유
- ⑨ 세포 부유액 10  $\mu$ l를 혈구계수기를 사용하여 계수함  
※ 세포 계수법은 “STO 세포 배양접시 준비 (SOP#10)”, “3. 시험 과정”의 ⑫~⑭항 참조
- ⑩ 하나의 동결바이얼에 들어갈 세포의 수가  $2.0 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 동결 보관할 바이얼의 개수를 고려하여 필요한 만큼의 세포 부유액을 새로운 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 생물안전작업대에서 3분 간 정치하여 자연스럽게 세포를 아래

로 가라앉힘

- ① 세포가 가라앉는 동안 DMEM, FBS, DMSO (각각 최종 80%, 10%, 10% 농도) 순서대로 혼합하여 동결액을 준비

※ 동결액은 1 바이얼당 1 ml 로 준비

- ② 세포가 가라앉은 튜브의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 최대한 제거하고 미리 준비한 동결액을 넣어 가볍게 피펫팅(3회)하여 재부유 시킴

- ③ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 분주한 후, 세포 동결 컨테이너에 넣고 뚜껑을 잘 닫아 초저온냉동 (-70℃)에서 24시간 동안 완만 동결

※ DMSO가 포함된 동결보존액은 상온 상태에서 30분 간 세포 보관 가능

- ④ 24시간 동안 완만 동결을 마친 STO 바이얼은 세포 보관 상자에 넣어 액체질소탱크에 보관

## STO 세포 입수 및 원물질 스톡 제조

### Preparation of STO cell original stock for human pluripotent stem cell culture

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 역상현미경 (Olympus Optical, JP/IX-71-22FL)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- T75 플라스크 (Nunc, 156499)
- 100 mm 배양접시 (Nunc, 172958)
- 15 ml, 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015, 50050)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, 4488)
- 혈구계수기
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑
- 멸균 3차 증류수
- 1000 ml 유리병
- 전자저울
- 약수저
- 유산지
- 1000 ml 메스실린더

- 알루미늄 호일
- 고압증기멸균기
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3. 시약

- Fetal bovine serum (FBS) USA, certified (Gibco, 16000-044)
- Antibiotic-antimycotic (100X) (Gibco, 15240-112)
- Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, 1X) (T/E) (GIBCO, 25300-054)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* (Sigma, M4287)
- ※ 시약의 준비(SOP# 25) 참조
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Amresco, N182-1)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (1X) (Gibco, 11995-073)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 배양 관련 시약 준비

#### 2.1.1. FBS

- ① FBS는 50 ml씩 분주하고 밀봉하여 -20℃ 냉동고에 보관하고 사용 시 필요한 양을 계산하여 청정실 상온에서 녹인 후 사용
- ② 이때 사용하고 남은 FBS은 다시 얼리지 않고 폐기하도록 함

#### 2.1.2. Antibiotic-antimycotic

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 6 ml씩 분주, 밀봉되어 -20℃ 냉동고에 보관중인 antibiotic-antimycotic는 인간 전분화능줄기세포 배양액과 STO 배양액을 만들 때 필요하며, 필요한 양을 청정실 상온에서 녹인 후 사용
- ② 사용하고 남은 antibiotic-antimycotic는 재사용하지 않고 폐기

#### 2.1.3. T/E

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 6 ml씩 분주, 밀봉되어 4℃ 냉장고에 보관중인 T/E는



STO의 계대배양 시 필요하며, 필요한 양을 청정실 상온에서 녹인 후 사용함

- ② 이때 사용하고 남은 T/E는 폐기하도록 함

#### 2.1.4. DPBS

- ① 분주해 놓은 DPBS는 사용하기 전에 필요한 양을 청정실 상온에 30분 간 두어 가온하고, 이물질이 없는지 확인한 후 사용함

### 2.2. 배양액의 조제

#### 2.2.1 STO 배양액의 조제

- ① STO 배양액의 조성은 아래와 같음

물 질	첨가량 (500 ml 기준)
DMEM	445 ml
Heat-inactivated FBS	50 ml
Antibiotic-antimycotic	5 ml

### 3. STO 배양 및 보관

#### 3.1. STO의 구입

- ① 사용하고자 하는 STO를 American Type culture Collection (ATCC)의 인터넷 웹사이트 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))에서 확인한 후 주문함 (ATCC, CRL1503)
- ② 해외 배송이므로 사용하고자 하는 시점의 최소 한 달 전에는 주문해야 하며 배송 직후 보관해 놓을 액체질소탱크 내 STO 전용 공간을 미리 마련해야 함

#### 3.2. STO의 배양 및 보관방법

- ① 입수한 STO 바이얼은 최소 일 년은 사용할 수 있도록 충분한 양으로 배양하여 저장하며, 배양 및 저장 후 1년 이상 경과한 STO 바이얼은 사용하지 않도록 함

#### 3.3. STO 계대

- ① 플라스크 바닥면적의 95% 이상 STO가 배양되었을 때 계대 실시
- ② 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 STO가 배양되고 있는 T75 플라스크 안의 STO 배양액을 제거한 후 10 ml의 1X DPBS를 넣어서 부착되어있는 STO를 세척, 본 과정 2회 반복
- ③ 세척한 1X DPBS를 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 완전히 제거한 후 P1000 마이크로피펫으로 2 ml의 T/E를 첨가하고, 고루 퍼지도록 조심스럽게 흔들어준 후 이산화탄소 배양기에 넣고 3분 동안 배양함
- ④ 역상현미경으로 T75 플라스크 안의 STO가 모두 분리되었는지 확인한 다음 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 10 ml의 STO 배양액을 넣어 T/E의 작용을

## 중화함

- ⑤ T75 플라스크 안의 세포 부유액을 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 15 ml 원심분리용 튜브로 수거하고 1000 rpm에서 3분 간 원심분리
- ⑨ P1000 마이크로피펫을 이용하여 펠렛이 떨어져오지 않도록 상층액을 제거한 후 2 ml의 STO 배양액을 넣고 50회 피펫팅하여 단일세포화
- ⑩ 28 ml의 STO배지가 담겨있는 50 ml 원심분리용 튜브에 P1000 마이크로피펫을 이용하여 세포 부유액 2 ml를 첨가하고 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫을 이용하여 5회 피펫팅
- ⑪ T75 플라스크 1개에 전동피펫과 25 ml 일회용 피펫을 이용하여 15 ml 씩 세포 부유액을 옮겨 플라스크 전체에 잘 퍼지도록 조심스럽게 흔들어주고 이산화탄소배양기에 넣음
- ⑫ 최소 하루에 한 번씩 역상현미경으로 STO의 성장 정도를 확인하고 이틀에 한 번씩 전동 피펫과 10 ml 일회용 피펫을 사용하여 STO 배양액을 빼낸 후 새로운 STO 배양액을 10 ml 넣어주며 배양액을 교체함
- ⑬ 플라스크 바닥 면적의 95% 이상 STO가 배양되었을 때 STO 계대

## 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조

### Preparation of human pluripotent stem cell culture media

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포 배양액은 항상 신선한 상태를 유지하여야 하며 미생물과 이물질 등에 의해 오염되지 않도록 항상 주의 하여야 함
- 이에 따라 사용하고 남은 배양액은 다시 사용하는 일이 없도록 폐기 처분함
- 배양액에는 다양한 성분으로 구성되어 있어 원료 성분, 배지 조성 과정 등 여러 과정에서 오염과 변질의 위험이 있어 배양액과 관련된 시약은 엄격한 관리 아래에서 사용되도록 하여야 함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 37°C 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 진공펌프
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (2~10  $\mu$ l)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (MCT-150-X)
- 여과막 시스템 (Filter system)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 50 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4490)
- 5 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4487)

- 전동피펫 (Drummond, 50938E)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 25 ml 주사기 (KOREA-VACCINE CO, 일회용 주사기 25 ml)
- 1 ml 주사기
- 0.22  $\mu\text{m}$  주사기필터 (PALL, PN4612)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3. 시약

- Knock-out Serum Replacement (KO-SR) (Gibco, 10828-028)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco, 15240-112)
- Tris 버퍼 (20 mM Tris)
- Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Sigma, F0291-25 $\mu\text{g}$ )
  - ※ 시약의 준비(SOP# 25) 참조
- MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco, 11140-050)
- 2-Mercaptoethanol (Gibco, 21985-023)
- MycoZap Plus-PR (Lonza, VZA2021)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12) (Gibco, 11320-082)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. KO-SR

- ① -20 $^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관된 500 ml KO-SR은 4 $^{\circ}\text{C}$  냉장고에서 이틀간 해동하여 병을 흔들어 균질화함
- ② 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대 내로 옮김
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.2. Antibiotic-antimycotic

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 분주, 밀봉되어 -20 $^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관중인 antibiotic-antimycotic는 사용 전 37 $^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 10분 이상 가온하여 완전히 용해시킴

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

### 2.3. DMEM/F12

- ① 50 ml 튜브에 분주하여 4℃ 냉장 보관 중인 DMEM/F12 배지를 사용전에 꺼내 37℃ 항온수조에서 10분 이상 데운 후 70% 에탄올로 소독

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 데움

### 2.4 Tris 버퍼

- ① 4℃ 냉장 보관 중인 Tris 버퍼는 사용 전에 상온에서 10분 간 정치한 후 70% 에탄올로 소독

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.5. bFGF

- ① -20℃ 냉동 보관 중인 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bFGF를 사용 전에 상온으로 옮겨 해동
- ② 사용 후 남은 는 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bFGF는 -20℃ 냉동 보관

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.6. NEAA

- ① 4℃ 냉장고에 보관중인 NEAA는 사용 전 상온 보관
- ② 사용 후 남은 NEAA는 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

### 2.7. 2-Mercaptoethanol

- ① 상온 보관중인 2-Mercaptoethanol는 사용 후 파라필름으로 밀봉하여 상온 보관

### 2.8. MycoZap Plus-PR

- ① -20℃ 냉동고에 보관 중인 MycoZap Plus-PR은 사용 후 파라필름으로 밀봉한 후 -20℃ 냉동고에 보관

## 3. 시험 과정

### 3.1. 인간 전분화능줄기세포 배양액 만들기

- ① 500 ml 멸균 여과막 병에 77.5% DMEM/F12, 0.1mM NEAA, 0.25 mM antibiotic-antimycotic, 0.1mM 2-mercaptoethanol을 넣은 후 0.22  $\mu\text{m}$  여과막 시스템과 진공 펌프를 사용하여 여과
- ② 제조 날짜 및 여과 상태 등을 적고 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

hPSC 배양액 YYYYMMDD
----------------------

<표> 인간 전분화능줄기세포 배양액 조성

시약명	Stock 농도	시약농도	Stock 용액 사용 양
			500 ml 기준
DMEM/F12	100 %		390 ml
NEAA	10 mM	0.1 mM	5 ml
Antibiotic-antimycotic	50 mM	0.25 mM	5 ml
KO-SR			100 ml
2-Mercaptoethanol	14.3 M	0.1 mM	3.5 $\mu$ l
MycZap™ Plus-PR			500 $\mu$ l
bFGF	50 $\mu$ g/ml	4 ng/ml	4 $\mu$ l/ 50 ml

### 3.2. 인간 전분화능줄기세포 배양액 만들기

- ① 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용하기 전 필요한 양을 계산하여 50 ml 씩 원심 분리용 튜브에 분주
- ② 50 ml 배지에 bFGF를 최종농도 4 ng/ml로 혼합하여 배양액 제조  
예) 50 ml DMEM/F12 + 4  $\mu$ l bFGF (50  $\mu$ g/ml)

KO-SR#Lot.  
YYYYMMDD

### 6. 사용 시 주의점

- 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용하기 전에 bFGF를 최종농도 4 ng/ml로 첨가
- 배양액은 제조 후 2주가 넘으면 사용을 금함

## 인간 전분화능줄기세포 배양 (STO 세포 공동배양) Culture of human pluripotent stem cell on STO feeder

### □ 개 요

- 은행에 기탁된 인간 전분화능줄기세포의 유지, 배양, 특성분석, 동결 및 해동 등의 품질관리를 위한 표준 절차를 마련하고 본 절차에 따라 일관성 있고 안전하고 지속적으로 배양 가능한 인간 전분화능줄기세포의 분양 하고자 함
- 은행에서는 기탁된 인간 전분화능줄기세포주가 수립될 당시의 환경에 따라 배양하는 것을 기본 원칙으로 하고, 필요에 따라 그 배양환경을 적절한 방법으로 교체함

### 1. 필요한 물품

#### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (2~10  $\mu$ l)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

#### 1.2. 소모품

- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

#### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액

※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조

○ Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. 인간 전분화능줄기세포 배양액

① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4°C 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37°C 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

② 37°C에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종농도 4 ng/ml) 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용

③ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 보관

## 3. 시험 과정

① 인간 전분화능줄기세포는 일주일 단위로 계대하며, 새로운 배양접시에 옮긴 후 2 일째 일부터 매일 배지 교체

② 이산화탄소배양기에서 배양중인 35 mm 배양접시를 생물안전작업대 안으로 옮김

③ 실체현미경을 이용해 콜로니를 관찰하며 P1000 마이크로피펫으로 배양액을 모두 제거

④ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 부착된 세포의 표면을 세척 후 1X DPBS 제거

⑤ P1000 마이크로피펫으로 인간 전분화능줄기세포 배양액을 2 ml 첨가 해준 후 실체현미경을 이용해 콜로니 상태 관찰

⑥ 이산화탄소배양기로 옮겨 배양

## 4. 주의점

○ 인간 전분화능줄기세포 배양에 사용되는 모든 배양액과 시약은 사용 전 항온수조에서 가온 후 사용

○ 실체현미경으로 관찰 중 분화된 콜로니는 즉시 P200 마이크로피펫 팁으로 제거하여 배양접시 내의 미분화 상태 유지

○ 배양액 교체에 있어서는 모든 작업을 실체현미경위에서 함



## 인간 전분화능줄기세포 계대

### Subculture of human pluripotent stem cells

#### □ 개 요

- 은행에 기탁된 인간 전분화능줄기세포의 유지, 배양, 특성분석, 동결 및 해동 등의 품질관리를 위한 표준 절차를 마련하고 본 절차에 따라 일관성 있고 안전하고 지속적으로 배양 가능한 인간 전분화능줄기세포의 분양 하고자 함
- 은행에서는 기탁된 인간 전분화능줄기세포주가 수립될 당시의 환경에 따라 배양하는 것을 기본 원칙으로 하고, 필요에 따라 그 배양환경을 적절한 방법으로 교체함
- 은행에서는 dispase 효소 처리를 통해 인간 전분화능줄기세포를 계대하는 것을 권장 함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 역상현미경 (Olympus Optical, JP/IX-71-22FL)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (2~10  $\mu$ l)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (MCT-150-X)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 25 ml 주사기 (KOVAX50CC21G)
- 0.22  $\mu$ m 필터

- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3 시약

- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- Dispase (Gibco, 17105-041)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조
- 인간 전분화능줄기세포 배양액
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조
- Y27632 (Sigma, Y0503-5MG)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. 인간 전분화능줄기세포 배양액

- ① 50 ml 튜브에 분주되어 4℃ 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 37℃에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종농도 4 ng/ml) 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

### 2.2. STO 배양액

- ① 사용 전 37℃ 항온수조에 분주된 STO 배양액을 넣어 1시간 정치하여 가온함
  - ※ “STO 세포 입수 및 원물질 스톡 제조 (SOP#12)”의 “2.2.1 STO 배양액 조제” 참조
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

### 2.3. STO 배양접시

① 필요한 만큼 STO 배양접시 준비

※ STO 세포 배양접시의 준비 (SOP#10) 참조

## 2.4. Dispase

① Dispase를 2.0 mg/ml로 DMEM/F12배지를 이용해 녹임

② 0.22  $\mu$ m 주사기 필터 및 25 ml 주사기를 사용해 여과 후 15 ml 원심분리튜브에 10 ml씩 분주하고 정보를 기재하여 -20°C 냉동고에 보관

③ 사용 전 37°C 항온수조에 배양액을 넣어 가온함

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

## 3. 시험 과정

### 3.1. 인간 전분화능줄기세포는 이전 계대 혹은 해동 후 7일 뒤 계대를 원칙으로 하며, 본 과정은 35 mm 배양접시에서 배양중인 전분화능줄기세포를 기준으로 작성하였음

① 이산화탄소배양기에서 배양중인 35 mm 배양접시를 생물안전작업대 안으로 옮김

② 실체현미경을 이용해 콜로니를 관찰하며 P1000 마이크로피펫으로 배양액 제거

③ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 부착된 세포의 표면을 세척 후 1X DPBS 제거

④ P1000 마이크로피펫으로 1 ml의 dispase를 첨가 후 이산화탄소배양기에서 10분 간 배양

⑤ 배양 후 P1000 마이크로피펫으로 dispase를 제거하고, 1 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 배양접시에 첨가한 후 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 세척하고 배양액 제거

⑥ 세척 후 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 2 ml 첨가한 후 실체현미경으로 관찰하면서 P1000 마이크로피펫으로 세포 콜로니를 덩어리째로 바닥에서 분리 (실체현미경 관찰로 자발적 분화된 세포는 P200 마이크로피펫 팁을 이용하여 제거하여 미분화를 유지함)

⑦ 배양접시에서 떨어진 세포 콜로니를 P1000 마이크로피펫으로 인간 전분화능줄기세포 배양액과 함께 15 ml 원심분리용 튜브에 옮긴다.

⑧ 생물안전작업대에서 3분 간 정치하여 세포 덩어리가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거

⑨ P1000 마이크로피펫으로 인간 전분화능줄기세포 배양액을 5 ml 첨가하고 조심스럽게 흔들어 한 번 더 세척하고, 생물안전작업대에서 3분 간 정치하여 세포 덩어리가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거

⑩ P1000 마이크로피펫으로 인간 전분화능줄기세포 배양액을 4 ml 첨가한 후 10회 피펫팅하여 재부유 하여 세포 덩어리를 잘게 쪼갬

⑪ 4개의 35 mm STO 배양접시에서 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 제거한 후 각 1

ml 인간 전분화능줄기세포 배양액을 첨가

- ⑫ 세포 부유액을 4개의 STO 배양접시에 옮긴 후 배양접시를 이산화탄소배양기로 옮겨 손으로 전후좌우로 각 10회 조심스럽게 흔들어 세포 부유액을 고르게 펼침
- ⑬ 계대 시 필요에 따라 세포 부착을 도와주는 ROCKi 인 Y27632를 사용할 수 있음 (최종 농도 10  $\mu$ M)

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

#### 4. 주의점

- 인간 전분화능줄기세포 계대 배양에 사용되는 모든 배양액과 시약은 사용 전 1시간 동안 항온수조안에서 정치하여 가온 후 사용
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동.
- 계대 배양에 있어서 모든 작업을 실체현미경 위에서 함

## 인간 전분화능줄기세포의 미분화 특성검사 (AP) Alkaline Phosphatase Staining

### □ 개 요

- 배양하고 있는 인간 전분화능줄기세포가 미분화 상태의 특성을 유지하고 있는지 확인하기 위해 alkaline phosphatase (AP) 활성 정도를 확인함
- 핵에는 인이 많으므로 AP가 활성화됨. 전분화능줄기세포에서 미분화를 유지하고 있는 핵/세포질의 비율이 높아 염색 후에 색이 짙게 나타남

### 1. 필요한 물품

#### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)

#### 1.2. 소모품

- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4488)
- 알루미늄호일
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

#### 1.3 시약

- <Stemgent Alkaline Phosphatase Kit II> (Stemgent Cat. NO. 00-0055)
  - AP Staining Solution A

- AP Staining Solution B
- AP Staining Solution C
- 4% Paraformaldehyde
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- Mounting solution

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. <Stemgent Alkaline Phosphatase Kit II>

- ① Staining Solution A 500 $\mu$ l 와 Staining Solution B 500 $\mu$ l를 각각 15ml 원심분리용 튜브에 넣은 후 상온에서 2분간 반응
  - ※ 15ml 원심분리용 튜브는 알루미늄 호일로 감싸 빛 차단
- ② 2분간 반응 후 Staining Solution C 500 $\mu$ l를 첨가.
- ③ 위의 용액들을 잘 섞어준 후 용액의 색이 노란색으로 변색 확인
  - ※용액은 제조 후 30분 이내 사용을 원칙으로 함

### 2.2. 1X DPBS

- ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

## 3. 시험 과정

### 3.1. AP staining (35 mm 배양접시기준)

- ① 계대 후 5일간 배양한 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 제거하고 1X PBST 2 ml를 첨가하여 전후로 조심스럽게 흔들어 세척, 본 과정 2회 반복
- ② P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 제거 후 4% paraformaldehyde를 2 ml 넣고 3분 간 상온에서 정치하여 세포를 고정 (이 과정에서 세포가 마르지 않도록 조심)
- ③ P1000 마이크로피펫으로 4% paraformaldehyde를 제거하고 1X PBST 1 ml를 첨가하여 전후로 조심스럽게 흔들어 5분 간 세척, 본 과정 2회 반복
- ④ <Staining Solution> 1.5 ml를 첨가한 후 알루미늄 호일로 배양접시를 감싸 빛을 차단하여 상온에서 정치 15분 간 반응 (세포의 색이 변했는지 수시로 확인)
- ⑤ 15분 후 P1000 마이크로피펫으로 <Staining Solution>을 제거하고 1X DPBS 2 ml를 첨가하여 전후로 조심스럽게 흔들어 세척, 2회 반복함

- ⑥ 세척 후 1X DPBS 1 ml를 넣고 역상현미경으로 관찰 및 촬영
- ⑦ 촬영 후 시료는 1X DPBS 1 ml 제거, mounting medium 넣고 파라필름으로 밀봉 후 냉장 보관

#### 4. 주의사항

- AP 시약이 빛에 민감하므로 시험 진행 중 실험실 및 생물안전작업대의 빛 차단 필요
- AP의 활성은 세포의 고정 시간이 오래 경과하면 이 약해지므로 시료 확보 후 즉시 시험을 완료함

## 인간 전분화능줄기세포의 배아체 형성 시험

### Embryoid body formation

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포의 삼배엽 분화 능력을 확인하기 위해 배아체(embryoid body, EB) 형성을 확인 함
- 인간 전분화능줄기세포를 이용하여 배아체를 만들 때 사용하는 배양액은 항상 신선한 상태를 유지하여야 하며 미생물 등에 의해 오염되지 않도록 항상 주의하여야 함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 진공펌프
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (2~10  $\mu$ l)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 60 mm 배양접시 (Low-attachment) (SPL, 10060)
- 여과막 시스템 (Filter system)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4488)
- 5 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4487)
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)



- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3. 시약

- Knock-out Serum Replacement (KO-SR) (Gibco, 10828-028)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco,15240-112)
- Dispase (Gibco, 17105-041)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12) (Gibco, 11320-082)
- MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco, 11140-050)
- 2-Mercaptoethanol (Gibco, 21985-023)
- MycoZap Plus-PR (Lonza, VZA2021)

※ 시약의 준비 (APENDIX#1) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. KO-SR

- ① -20℃ 냉동고에 보관된 500 ml KO-SR은 4℃ 냉장고에서 이틀간 해동하여 병을 흔들어 균질화함
- ② 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대 내로 옮김

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.2. Antibiotic-antimycotic

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 분주, 밀봉되어 -20℃ 냉동고에 보관중인 antibiotic-antimycotic는 사용 전 37℃ 항온수조에서 10분 이상 가온하여 완전히 용해시킴

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.3. DMEM/F12

- ① 50 ml 튜브에 분주하여 4℃ 냉장 보관 중인 DMEM/F12 배지를 사용전에 꺼내 37℃ 항온수조에서 10분 이상 데운 후 70% 에탄올로 소독

※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 데움

## 2.4. NEAA

- ① 4°C 냉장고에 보관중인 NEAA는 사용 전 상온 보관
- ② 사용 후 남은 NEAA는 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 보관

## 2.5. 2-Mercaptoethanol

- ① 상온 보관중인 2-Mercaptoethanol는 사용 후 파라필름으로 밀봉하여 상온 보관

## 2.6. MycoZap Plus-PR

- ① 냉동보관 중인 MycoZap™ Plus-PR은 사용 후 파라필름으로 밀봉한 후 -20°C 냉동고에 보관

## 2.7. Dispase

- ① -20 냉동고에 보관되어 2.0 mg/ml Dispase을 37°C 항온수조에서 녹인 후 사용함
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

## 3. 시험 과정

### 3.1. 배아체 배양액 만들기

- ① 500 ml 멸균 여과병에 아래 표 1과 같이 77.5% DMEM/F12, 0.1 mM NEAA, 0.25mM antibiotic-antimycotic, 0.1 mM 2-mercaptoethanol을 넣은 후 0.22µm 여과막 시스템과 진공 펌프를 사용하여 여과
- ② 제조 날짜 및 여과 상태 등을 기재하고 파라필름으로 밀봉 후 4°C 냉장고에 보관

hEB 배양액  
YYYYMMDD

<표> 인간 전분화능줄기세포 배아체 조성

시약명	Stock 농도	시약농도	Stock 용액 사용 양
			500 ml 기준
DMEM/F12	100 %		390 ml
NEAA	10 mM	0.1 mM	5 ml
Antibiotic-antimycotic	50 mM	0.25 mM	5 ml
KO-SR			100 ml
2-Mercaptoethanol	14.3 M	0.1 mM	3.5 µl
MycoZap™ Plus-PR			500 µl

## 4. 배양액 사용시 주의점

- 인간 전분화능줄기세포 배아체 배양액은 제조 후 2주 이상 경과 시 폐기

## 5. 인간 전분화능줄기세포 배아체 형성

- ① 계대 후 6~7일간 배양중인 2개의 35 mm 배양접시 내 인간 전분화능줄기세포 (80~90% confluency 기준)를 사용하여 저부착성 (low attachment)의 60 mm 배양접시 1개의 인간 전분화능줄기세포 배아체 형성
- ② P1000 마이크로피펫을 이용하여 2개의 35 mm 배양접시 내 배양액을 제거한 후 1X DPBS 1 ml를 첨가하여 세척하고 1X DPBS를 제거, 2번 반복
- ③ P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양접시 당 dispase를 1 ml씩 처리 후 10분 간 이산화탄소배양기에서 배양
- ④ P1000 마이크로피펫을 이용하여 dispase 제거 후 배아체 배양액 2 ml를 첨가
- ⑤ 실체현미경으로 관찰하면서 P1000 마이크로피펫을 이용하여 콜로니의 가장자리 부분이 찢어지지 않고 콜로니의 형태를 유지하도록 조심스럽게 모든 콜로니를 회수
- ⑥ 회수한 콜로니는 15 ml 원심분리용 튜브에 옮기고 콜로니가 가라앉도록 생물안전 작업대에서 3분 간 방치
- ⑦ 콜로니가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 조심스럽게 배양액을 제거 후 새로운 배아체 배양액 2 ml를 넣어 콜로니 세척
- ⑧ P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양액 4 ml를 첨가한 후, 배양액과 함께 콜로니를 60 mm 배양접시로 옮김
- ⑨ 60 mm 배양접시를 이산화탄소배양기에서 배양함
- ⑩ 배아체 배양접시는 이틀에 한 번 P1000 마이크로피펫으로 5 ml의 배양액을 첨가하여 죽은 세포 부유물을 제거한 후 5 ml의 배양액을 첨가하여, 이틀 단위로 배양액을 교체하면서 최소 2주 동안 배양하여 다음 시험의 시료로 이용

## 6. 인간 전분화능줄기세포 배아체 형성 시 주의사항

- 콜로니 수거 시 콜로니의 모양이 손상될 경우 배아체 형성이 어려움
- 배아체 형성을 통해 인간 전분화능줄기세포의 자연분화 과정을 관찰하고, 특성분석 수행
- 미분화상태를 유지하고 있는 콜로니만을 배아체 형성에 사용함을 원칙으로 함

## 인간 전분화능줄기세포 해동

### Thawing of cryopreserved human pluripotent stem cells

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포 동결 및 해동은 배양, 미분화 및 전분화능의 특성 보존 등의 효율을 결정하기 때문에 안정적으로 동결 보존 및 해동할 수 있는 방법의 지정이 중요함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 원심분리기
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2 소모품

- 15 ml 원심분리용튜브 (NUNC, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

##### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4℃ 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동
- ② 37℃에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종농도 4ng/ml)를 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관

## 3. 시험 과정

- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고 37℃ 항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결세포 바이얼을 스폰지형 튜브고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 빠르게 해동함
- ② 해동된 동결바이얼 내의 세포액은 P1000 마이크로피펫으로 모두 수거하여 5 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 미리 첨가해둔 15 ml 원심분리용 튜브에 넣고 800 rpm으로 5분 간 원심분리
- ③ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 배양액을 2 ml 첨가하고 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유 시킴
- ④ 두 개의 35 mm 배양접시에 배양액 1 ml를 각각 첨가하고 세포가 표면에 고루 퍼지도록 전후좌우로 3회씩 흔들어 줌 (하나의 세포 바이얼을 두 개의 35 mm 배양접시로 나눔)
  - ※ 해동 시 필요에 따라 세포 부착을 도와주는 ROCKi 인 Y27632를 사용할 수 있음 (최종 농도 10 μM)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

## 인간 전분화능줄기세포 동결 [cell-freezing container] Cryopreservation of human pluripotent stem cells

### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포 동결 및 해동은 배양, 미분화 및 전분화능의 특성 보존 등의 효율을 결정하기 때문에 안정적으로 동결 보존 및 해동할 수 있는 방법의 지정이 중요함

### 1. 필요한 물품

#### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)  
- P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 세포동결컨테이너 (Nalgene, 5100-0001)
- 액체질소탱크

#### 1.2 소모품

- 1.5 ml 튜브 (Axygen, MCT-150-C)
- 동결바이얼 (NUNC, 368632)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- Isopropanol (MEKK, K39379234 850)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

#### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액  
※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조
- Dispase (Gibco, 17105-041)

○ Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)

※ 시약의 준비(APPENDIX#1) 참조

○ 동결액, mFreSR (Stem Cell Technol, #05854, #05855)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 세포동결컨테이너 (cell freezing container)의 사용

- ① 세포동결컨테이너는  $-70^{\circ}\text{C}$  이하의 초저온 냉동고에서 1분에  $1^{\circ}\text{C}$  씩 천천히 온도를 낮추어 주는 용기로, 인간 전분화능줄기세포 및 STO를 액체 질소탱크에 보관하기 위해 동결 처리를 한 후 완만 동결 (slow freezing) 방법을 사용하여 세포를 동결할 때 사용함
- ② 세포 동결 컨테이너 는 채움선 까지 이소프로판올을 넣어서 사용하여야 하며, 다섯 번 사용 후에는 이소프로판올을 교체해 줌

### 2.2 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ②  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종농도 4 ng/ml) 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관  
※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동

### 2.3 Dispase의 준비

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 (2.0 mg/ml)의 농도로 분주되어  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동보관중인 dispase는 필요한 양을  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 해동
- ② 해동된 dispase 튜브표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ③ 사용 후 남은 dispase은 파라필름으로 밀봉하여  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관  
※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.4 동결액 mFreSR의 준비

- ① 5 ml 또는 50 ml의 mFreSR는 -20℃에서 보관하고, 사용 직전 필요한 양을 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 가온된 데운 튜브의 표면은 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ※ mFreSR은 해동 후 재동결하지 않음

### 3. 시험 과정

- ① 이산화탄소배양기에서 배양한 인간 전분화능줄기세포의 기존 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 제거하고 1X DPBS 1 ml를 첨가하여 한번 세척, 제거한 후 1 ml dispase (2 mg/ml)를 첨가
- ② 전후좌우로 1회 흔들어 고루 퍼지게 한 후 이산화탄소배양기에서 10분 간 배양
- ③ 세포를 dispase를 처리하는 동안 동결하고자 하는 적절한 개수의 동결바이얼을 준비하여 관련 정보를 기입

세포명 계대 수 YYYYMMDD 동결한 실험자 이름
---------------------------------------

- ④ 10분 간 반응이 끝난 세포는 생물안전작업대로 꺼내어 실체현미경으로 관찰 하면서 P1000 마이크로피펫으로 dispase를 제거
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 조심스럽게 1X DPBS 1 ml를 첨가하여 한번 세척, 제거한 후 인간 전분화능줄기세포 배양액을 2 ml 첨가
- ⑥ 실체현미경으로 관찰하면서 P1000 마이크로피펫 팁 끝을 이용하여 콜로니 가장자리를 밀어낸 후 피펫팅하여 배양접시에서 분리
- ⑦ 대략 100개의 콜로니를 분리한 후 P1000 마이크로피펫으로 100개의 콜로니를 조심스럽게 수거하여 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김
- ⑧ 생물안전작업대에서 3분 간 정치하여 자연스럽게 세포를 아래로 가라앉힘
- ⑨ 세포가 가라앉은 튜브의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 최대한 제거함
- ⑩ 세포가 들어있는 튜브에 동결액 1ml을 넣어 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ⑪ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 모두 옮김
- ⑫ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 분주한 후, 세포 동결 컨테이너에 넣고 뚜껑을 잘 닫아 초저온냉동 (-70℃)에서 24시간 동안 완만 동결
- ※ 동결된 세포는 -70℃ 초저온냉동고에서 장시간 보관하지 않음
- ⑬ 24시간 동안 완만 동결을 마친 바이얼은 세포 보관 상자에 넣어 액체질소탱크에 보관
- ⑭ 동결된 세포는 지정된 액체질소탱크에 보관하고 로그북에 세포의 정보를 기입



## 인간 전분화능줄기세포 동결 [CRF]

### Cryopreservation of human pluripotent stem cells using CRF

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포 동결 및 해동은 배양, 미분화 및 전분화능의 특성 보존 등의 효율을 결정하기 때문에 안정적으로 동결 보존 및 해동할 수 있는 방법의 지정이 중요함
- Controlled Rate Freezer (CRF)를 이용하여 동결 효율을 제고함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- CRF (Sy-lab, AT/14S-A)
- 액체질소탱크

##### 1.2 소모품

- 1.5 ml 튜브 (Axygen, MCT-150-C)
- 동결바이알 (NUNC, 368632)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

##### 1.3 시약

- 인간 전분화능줄기세포 배양액
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양액 제조법 (SOP#13) 참조
- Dispase (Gibco, 17105-041)
- Dulbeccos phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)

※ 이상은 시약 준비법(SOP#25) 참조

○ 동결액, mFreSR (Stem Cell Technol, #05854, #05855)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 국가줄기세포은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4℃ 냉장고에 보관중인 인간 전분화능줄기세포 배양액은 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 가온이 완료된 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브표면을 70% 알코올로 세척한 후 생물안전작업대로 옮겨 P10 마이크로피펫으로 배양액에 bFGF (최종농도 4 ng/ml) 첨가하여 전동피펫과 10 ml 일회용 피펫으로 5회 피펫팅하여 잘 섞어준 후 사용
- ③ 사용하고 남은 배양액은 파라필름으로 밀봉하여 4℃ 냉장고에 보관  
※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동 시 사용함.

### 2.2 Dispase의 준비

- ① 15 ml 원심분리용 튜브에 (2.0 mg/ml)의 농도로 분주되어 -20℃ 냉동보관중인 dispase는 필요한 양을 37℃ 항온수조에서 해동
- ② 해동된 dispase 튜브표면을 70% 알코올로 세척한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ③ 사용 후 남은 dispase은 파라필름으로 밀봉하여 -20℃ 냉동고에 보관  
※ 시약 준비법 (SOP#25) 참조

### 2.4 동결액 mFreSR의 준비

- ① 5 ml 또는 50 ml의 mFreSR는 -20℃에서 보관하고, 사용 직전 필요한 양을 사용 전 37℃ 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 가온된 튜브의 표면은 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용  
※ mFreSR은 해동 후 재동결하지 않음

## 3. 시험 과정

- ① 이산화탄소배양기에서 배양한 인간 전분화능줄기세포의 기존 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 제거하고 1X DPBS 1 ml를 첨가하여 한번 세척, 제거한 후 1 ml dispase (2 mg/ml)를 첨가

- ② 전후좌우로 1회 흔들어 고루 퍼지게 한 후 이산화탄소배양기에서 10분 간 배양
- ③ 세포를 dispase를 처리하는 동안 동결하고자 하는 적절한 개수의 동결바이얼을 준비하여 관련 정보를 기입

세포명 계대 수 YYYYMMDD 동결한 실험자 이름
---------------------------------------

- ④ 10분 간 반응이 끝난 세포는 생물안전작업대로 꺼내어 실체현미경으로 관찰 하면서 P1000 마이크로피펫으로 dispase를 제거
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 조심스럽게 1X DPBS 1 ml를 첨가하여 한번 세척, 제거한 후 인간 전분화능줄기세포 배양액을 2 ml 첨가
- ⑥ 실체현미경으로 관찰하면서 P1000 마이크로피펫 팁 끝을 이용하여 콜로니 가장 자리를 밀어낸 후 피펫팅하여 배양접시에서 분리
- ⑦ 대략 100개의 콜로니를 분리한 후 P1000 마이크로피펫으로 100개의 콜로니를 조심스럽게 수거하여 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김
- ⑧ 생물안전작업대에서 3분 간 정치하여 자연스럽게 세포를 아래로 가라앉힘
- ⑨ 세포가 가라앉은 튜브의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 최대한 제거함
- ⑩ 세포가 들어있는 튜브에 동결액 1ml을 넣어 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ⑪ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 모두 옮김
- ⑫ CRF 장치를 이용하여 세포를 일괄적으로 동결 처리
- ⑬ 동결된 세포는 지정된 액체질소탱크에 보관하고 로그북에 저장한 세포의 정보를 기입

## RNA 추출 및 cDNA 합성

### RNA extraction and recombination of cDNA

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포의 특성인 전분화능을 확인하기 위해 유전자 발현을 mRNA 수준에서 분석하기 위해 수행함
- RNA 시료는 microarray 등에 활용될 수 있음
- RT-PCR, real-time RT-PCR에 이용하기 위해서는 RNA를 cDNA로 합성해야함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 1.5 ml 튜브용 원심분리기 (Eppendorf, 5424R)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P2 (0.2~2  $\mu$ l)
  - P20 (2~20  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- PCR 기기 (Bio-rad, ALD1244)
- Nanodrop (Thermo scientific, ND-2000)

##### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (E-tube) (Sarstedt, sarst-72.690-pk)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, AX-TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, AX-TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, AX-TF-1000-RS)
- 일회용 장갑 (Ultra tex, MX-UT-12)
- 김와이프스 (유한 김벌리)

##### 1.3. 시약

- 100% 에탄올 (MERCK, MERK-100983-1011)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 2-Mercaptoethanol (Gibco, Gib-21985-023)
- RNase/DNase-free water (Welgene, ML019-02)

- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- RNeasy mini kit (Qiagen, 74106)

구 성
RNeasy mini spin columns (분홍색)
collection tubes (1.5 ml)
collection tubes (2 ml)
RLT 버퍼
RW1 버퍼
RPE 버퍼
RNase-free water
Handbook

- RNase-Free DNase set (Qiagen, 79254)

구 성
분말 DNase I
RDD 버퍼
RNase-free water

- RNA to cDNA EcoDry Premix (Oligo dT) (Clontech, 639543)

#### 1.4. 시약의 준비

##### 1.4.1. RNeasy mini kit (Qiagen, 74106)

- ① 세포를 녹일 때 쓰이는 <RLT 버퍼>에 2-mercaptoethanol을 첨가하여 사용함

세포 수 (dish)	<RLT 버퍼> 사용량	2-Mercaptoethanol
< 5x10 <sup>6</sup> (<60 mm)	350 $\mu$ l	3.5 $\mu$ l
5x10 <sup>6</sup> ~ 1x10 <sup>7</sup> (60~100 mm)	600 $\mu$ l	6 $\mu$ l

- 사용 직전에 섞어 쓰는 것이 바람직함
  - 시료의 수가 많을 경우, 시료의 수에 맞추어 mixture를 만들어 사용함
  - <RLT 버퍼>에 2-mercaptoethanol을 섞은 후에는 상온에서 1개월 간 보존 가능함
- ② RNeasy Mini kit을 새로이 개봉할 경우, <RPE 버퍼 55 ml>에 220 ml의 100% 에탄올을 첨가하여 준비함

##### 1.4.2. RNase-Free DNase set (Qiagen, 79254)

- ① 550  $\mu$ l의 RNase-free water를 1 ml 주사기를 이용하여 분말 DNase I이 들어있는 유리 바이얼에 주입하고, 바이얼을 위아래로 뒤집어가며 살살 녹임 (vortex 금지 : DNase I은 물리적 충격에 매우 약함)
- ② 단기 보관 : 2~8°C에서 6주 간 보관 가능함
- ③ 장기 보관 : 10  $\mu$ l씩 분주하여 -20°C에서 9개월 간 보관 가능함 (해동과 냉동을 반복하지 말 것)
- ④ 사용직전에 10  $\mu$ l DNase I과 70  $\mu$ l <RDD 버퍼>를 섞어서 사용함

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비

※ 인간 전분화능 줄기세포 계대 (SOP#15)의 “3. 시험 과정”의 ①~⑥항 까지 수행 후, 다음의 과정을 따름

- ① 배양접시에서 떼어낸 세포 콜로니를 P1000 마이크로피펫을 사용하여 인간 전분화능 줄기세포 배양액과 함께 1.5 ml 원심분리용 튜브에 옮김
- ② 1200 rpm으로 3분 간 원심분리하고 P1000 마이크로피펫을 사용하여 상층액을 모두 제거함
- ③ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 넣고 가볍게 5회 피펫팅하여 세포 콜로니를 재부유함
- ④ 1200 rpm으로 3분 간 원심분리하고 P1000 마이크로피펫을 사용하여 상층액을 모두 제거함
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 넣고 가볍게 5회 피펫팅하여 세포 콜로니를 재부유함
- ⑥ 1200 rpm으로 3분 간 원심분리하고 P1000 마이크로피펫을 사용하여 상층액을 모두 제거함
- ⑦ P200 마이크로피펫을 사용하여 미량 남아있는 상층액까지 모두 제거함

## 3. RNA 추출 시험 과정

### 3.1. 세포 용해 및 RNA 추출

- ① 수확한 세포에 2-mercaptoethanol이 첨가된 <RLT 버퍼>를 넣고 P1000 마이크로피펫을 사용하여 피펫팅하여 세포를 완전히 녹임 (-70℃에서 보관 가능함)

<표> RLT 버퍼 사용량

세포 수 (dish)	<RLT 버퍼> 사용량	2-Mercaptoethanol
< 5x10 <sup>6</sup> (<60 mm)	350 μl	3.5 μl
5x10 <sup>6</sup> ~ 1x10 <sup>7</sup> (60~100 mm)	600 μl	6 μl

- ② 70% 에탄올을 <RLT 버퍼>와 동일한 부피만큼 첨가하고 P1000 마이크로피펫을 사용하여 부드럽게 피펫팅함 (원심분리하지 말 것)
- ③ <2 ml collection tube>에 <RNeasy spin column>을 장착하고, 준비된 시료 700 μl를 column에 넣음
- ④ 10000 rpm으로 15초 간 원심분리하고 <2 ml collection tube>에 모인 용액은 버림

(시료의 양이 700  $\mu\text{l}$ 가 넘으면 두세 번에 나누어 시행)

### 3.2. DNase I 처리

- ① 350  $\mu\text{l}$  <RW1 버퍼>를 column에 넣고 10000 rpm으로 15초 간 원심분리하고 <2 ml collection tube>에 모인 용액은 버림
- ② 10  $\mu\text{l}$  DNaseI와 70  $\mu\text{l}$  <RDD 버퍼>를 섞어 (튜브를 위아래로 뒤집어 가며 섞고 살짝 원심분리) column 중앙에 넣고 상온에서 15분 간 정치함
- ③ 350  $\mu\text{l}$  <RW1 버퍼>를 column에 넣고 10000 rpm으로 15초 간 원심분리하고 <2 ml collection tube>에 모인 용액은 버림

### 3.3. RNA 용리 (elution)

- ① 500  $\mu\text{l}$  <RPE 버퍼>를 column에 넣고 10000 rpm으로 15초 간 원심분리하고 <2 ml collection tube>에 모인 용액은 버림
- ② 500  $\mu\text{l}$  <RPE 버퍼>를 column에 넣고 10000 rpm으로 2분 간 원심분리하고 column만을 취함
- ③ 새로운 <2 ml collection tube>에 column을 장착하고 13000 rpm으로 1분 간 원심분리하고 column만을 취함
- ④ column을 새로운 1.5 ml 원심분리용 튜브에 장착하고 30~50  $\mu\text{l}$ 의 RNase-free water를 column 중앙에 넣음
- ⑤ 상온에서 1분 간 정치 후, 10000 rpm 으로 1분 간 원심분리 함
- ⑥ column은 버리고 1.5 ml 원심분리용 튜브에 모인 RNA 시료를 취함

### 3.4. RNA 농도 측정

#### 3.4.1. NanoDrop을 이용한 RNA 농도 측정 (사용설명서 참조)

- ① 컴퓨터 전원을 켜
- ② 바탕화면의 NanoDrop 2000 아이콘 더블 클릭함
- ③ 기기의 시료 측정대를 김와이프스를 이용하여 세척함
- ④ Nucleic Acid 버튼 클릭
  - ※ 최근에 작업한 데이터 저장 파일에 추가할 것인지 묻는 창이 열림 : No 선택함
  - ※ 기기의 정상적인 작동(파장 확인) 여부를 판단하기 위해 기기의 arm이 내려져 있는지 확인하라는 창이 열림 : arm이 내려져 있는지 확인하고 OK 선택함
- ⑤ 화면 오른쪽 상단 Type을 RNA로 설정함
- ⑥ arm을 올리고 시료 측정대 위에 1  $\mu\text{l}$ 의 음성대조군을 넣고 arm을 내림
  - ※ 음성대조군은 RNase-free water를 사용함
- ⑦ 화면 왼쪽 상단의 Blank 버튼을 클릭함
  - ※ Blank가 설정되고 나면 화면 왼쪽 상단의 Measure 버튼이 활성화됨
- ⑧ 기기의 시료 측정대를 김와이프스를 이용하여 세척함

- ⑨ 화면 오른쪽 상단 Sample ID를 시료의 이름으로 설정함
- ⑩ arm을 올리고 시료 측정대 위에 1  $\mu$ l의 시료를 넣고 arm을 내림
- ⑪ 화면 왼쪽 상단의 Measure 버튼을 클릭함
- ⑫ 데이터 저장 경로 설정 창이 열림 (최초 1회만 열림) : 저장 경로 설정
- ⑬ 화면 하단에 결과가 나타남
  - ※ 시료의 개수가 많으면 ⑨번부터 ⑫번 과정을 반복하여 수행함
  - ※ 화면 왼쪽 상단의 Export 버튼을 클릭하면 엑셀 파일로 저장하여 데이터를 가져갈 수 있음
- ⑭ 프로그램을 종료함
- ⑮ 컴퓨터 전원을 끄

### 3.4.2. RNA 품질 판정

- ① 농도 : 50 ng/ $\mu$ l 이상
- ② 순도 : 260/280 = 1.8 이상
  - ※ 위의 조건에 부합하지 않은 시료는 사용하지 않음

### 3.5. RNA 시료의 보관

- ① RNA는 -70°C 초저온 냉동고에 보관함을 기본 원칙으로 함 (-20°C 또는 -70°C에 보관 가능)
- ② 시료정보는 아래와 같이 기입함

RNA  
세포명  
YYYYMMDD  
담당자

- ③ 시료 보관 상자에 다음과 같이 표기함

RNA  
Box No. yyyy-000  
담당자

- ④ RNA 시료 장부는 다음의 사항을 기입하여 관리함

세포명	날짜	담당자	Box No.	보관장소

- ⑤ RNA는 매우 불안정하므로 cDNA를 합성하여 보관하는 것이 바람직함

## 4. cDNA 합성 시험 과정

4.1. cDNA 합성 : RNA to cDNA EcoDry Premix (Oligo dT) (Clontech, 639543) 사용



- ① 1~5 $\mu$ g의 total RNA를 20  $\mu$ l의 부피가 되도록 희석하여 준비함
- ② <EcoDry Premix 튜브> (200  $\mu$ l)에 20  $\mu$ l의 RNA를 첨가함
- ③ P20 마이크로피펫을 이용하여 피펫팅하여 Premix 분말을 녹인 후, 뚜껑을 닫음
- ④ PCR 기기를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분 간 반응시킴
- ⑤ PCR 기기를 이용하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분 간 정치함 (역전사효소를 비활성화 시키기 위한 과정임)
- ⑥ PCR 기기를 이용하여 4~10 $^{\circ}$ C로 온도를 낮춤
- ⑦ PCR기기 사용을 종료함
- ⑧ 최종 농도는 50 ng/ $\mu$ l가 되도록 RNase/DNase-free water로 희석하여 사용함

#### 4.2. cDNA시료의 보관

- ① cDNA는 -20 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에 보관 가능하지만, 은행에서는 -70 $^{\circ}$ C에 보관함
- ② 보관시 시료정보를 아래와 같이 기입함

cDNA
세포명
YYYYMMDD
담당자

- ③ 시료 보관 상자에 다음과 같이 표기함

cDNA
Box No. yyyy-000
담당자

- ④ cDNA 시료 장부는 다음의 사항을 기입하여 관리함

세포명	날짜	담당자	Box No.	보관장소

#### 5. 참고문헌

- RNeasy handbook
- Nanodrop 사용 설명서

## 비정량적 유전자 발현 조사

### Analysis for pluripotency and differentiation marker expression by semi-quantitative RT-PCR

#### □ 개 요

- RT-PCR은 배양된 인간 전분화능줄기세포의 유전자 발현을 분석하기 위해 수행함
- 인간 전분화능줄기세포는 삼배엽 분화의 특성을 유지하고 있어야 함
- 인간 전분화능줄기세포의 분화를 유도하기 위해 배아체를 형성하고 삼배엽 으로 분화가 유도되는지 확인할 필요가 있음
- 인간 전분화능줄기세포의 전분화능 유지 및 배아체 형성 후 삼배엽 분화 여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 미분화마커 및 분화 마커를 확인할 수 있음

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 200  $\mu$ l PCR 튜브용 원심분리기 (Labnet, DW41F-230V)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P2 (0.2~2  $\mu$ l)
  - P20 (2~20  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- PCR 기기 (Bio-rad, PTC-0200)
- 전자렌지 (대우, KOR-811K)
- Gel 카세트
- 500 ml 삼각플라스크 (유리)
- 메스실린더
- 저울
- 전기영동장치 (Mupid, Mupid-2 plus)
- Davinch-gel gel imaging system (코아바이오시스템, GDS-145DE)

##### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (E-tube) (Sarstedt, sarst-72.690-pk)

- 200  $\mu$ l PCR 튜브 (Takara, NJ300)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, AX-TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, AX-TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, AX-TF-1000-RS)
- 일회용 장갑 (Ultratex, MX-UT-12)
- 김와이프스 (유한 김벌리)

### 1.3. 시약

- Emeraldamp GT PCR master mix (2X premix) (TAKARA, RR310)
- RNase/DNase-free water (Welgene, ml019-02)
- Seakem® LE agarose (Lonza, 50004)
- 1X TAE buffer (Gendepot, T8050-100)
- Safe-pinky DNA gel staining solution (Gendepot, S1001-025)
- Primers (제작: Bioneer) (-20°C 보관)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

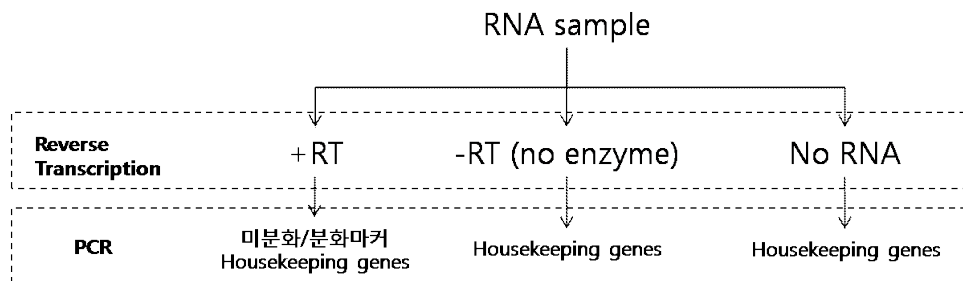
**<표> 미분화마커 유전자의 Primer 서열**

GENE	Primer Sequence	Product Size (bp)
NANOG	F: GCTTTGAAGCATCCGACTGTA R: TAAGCAGATCCATGGAGGAGG	147
POU5F1 (OCT4)	F: CTTGCTGCAAGAAGTGGGTGGAA R: CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	169
SOX2	F: GCCAGCTACAGCATGATGCAG R: GCTCTGGTAGTGCTGGGACATG	396
TDGF1	F: CGCTTCTCTTACAGTGTGATTTG R: GGTAGAGGTGCCTGAGGAAAG	420
GDF3	F: CTTACCCCCAGAAGTTCCAA R: CCCTTTCTTTGATGGCAGAC	243
GAPDH	F: CATGTTTCGTCATGGGTGTGAA R: GGACTGTGGTCATGAGTCCTT	150

<표> 분화마커유전자의 Primer 서열

GENE	Primer Sequence	Product Size (bp)
PAX6	F: GGCAACCTACGCAAGATGGC R: TGAGGGCTGTGTCTGTTCGG	496
SOX1	F: CAATGCGGGGAGGAGAAGTC R: CTCTGGACCAAACTGTGGCG	494
HNF3B	F: CTGCGCCAACATGAACTCCA R: GAGGTCCATGATCCACTGGT	200
AFP	F: AGAACCTGTCACAAGCTGTG R: GACAGCAAGCTGAGGATGTC	675
T	F: TAAGCTGGATCTTCAGGTAGC R: CATCTCATTGGTGAGCTCCCT	252
MYOG	F: CGGAGGCTATCCCCTTCTC R: GAGGCCGCGTTATGATAAAA	199
GAPDH	F: CATGTTTCGTCATGGGTGTGAA R: GGACTGTGGTCATGAGTCCTT	150

## 2. 시료의 준비



- ① No RNA 시료는 음성 대조군 (negative control)으로써 RNase/DNase-free water 로 대체 가능함.
- ② -RT (no enzyme) 시료는 RNA 추출 과정에서 genomic DNA 오염 여부를 판별하기 위한 음성 대조군이므로 RNA 추출 시 *DNaseI*를 처리하면 생략 가능함.

## 3. 시험 과정

### 3.1. PCR 반응 시료 만들기

Emeraldamp GT PCR master mix (2X premix)	10 $\mu$ l
10 pmole F primer	1 $\mu$ l
10 pmole R primer	1 $\mu$ l
100 ng cDNA	A $\mu$ l
RNase/DNase-free water	(8-A) $\mu$ l
Final Reaction Volume (최종 부피)	20 $\mu$ l

- ① 얼음을 준비하고 냉동 보관 되어 있던 Emeraldamp GT PCR master mix를 꺼내어 얼음 위에서 서서히 녹임

- ② 각각의 PCR 튜브에 P10 마이크로피펫을 사용하여 Emeraldamp GT PCR master mix (2X premix)를 10  $\mu$ l 첨가
- ③ 발현을 확인하고자 하는 유전자에 해당하는 primer F와 primer R을 1  $\mu$ l씩 첨가
- ④ 100 ng의 cDNA를 넣고 최종 부피에 맞게 RNase/DNase-free water를 첨가
- ⑤ PCR 튜브의 뚜껑을 닫고 200  $\mu$ l PCR tube용 원심분리기를 이용하여 시료를 바닥에 가라앉힘

### 3.2. PCR 기기 사용

- ① PCR 기기의 전원을 켜
- ② PCR 반응 조건을 아래 표와 같이 설정함

95°C	5 min		
↓			
95°C	30 sec	┌ 25~35 Cycles	
55~60°C	30 sec		
72°C	30 sec		└
↓			
72°C	5 min		
↓			
4°C			

- ③ PCR 반응을 진행함

### 3.3. PCR 생성물 확인하기

- ① 1X TAE 버퍼에 1~1.5%가 되도록 agarose 분말을 넣고 잘 섞음
  - Gel 카세트 (큰 것 2개, 작은 것 4개를 한 번에 만들 수 있음) 전체를 사용하여 gel을 만들 경우 다음과 같이 정량하여 진행함

**<표> Agarose gel의 준비**

Gel	1X TAE	Agarose
1%	120 ml	1.2 g
1.5%	120 ml	1.8 g

- 500 ml 유리 삼각플라스크를 이용함
- ② 전자렌지에서 분말이 모두 녹을 때까지 끓여줌
- ③ 60°C 정도가 되도록 상온에서 식혀줌
- ④ Safe-pinky를 1/10000 부피만큼 넣어 잘 섞음 (gel 120 ml 기준으로 12  $\mu$ l)
- ⑤ ④의 gel 용액을 gel 카세트에 붙고 적당한 사이즈의 comb을 장착하여 상온에서 20분 이상 정치하여 굳힘 (safe-pinky는 빛에 약하므로 차광하여 굳힘)

- ⑥ 전기영동장치에 gel을 세팅하고, PCR 생성물을 loading함
- ⑦ 100 V 로 25분 전기영동함 (PCR 생성물의 크기에 따라 전기영동 시간을 조절함)
- ⑧ Davinch-gel™ gel imaging system의 문을 열고 gel 거치대 중앙에 gel을 올려놓음
- ⑨ 컴퓨터 전원을 켜
- ⑩ 컴퓨터 바탕화면의 coreimager 프로그램을 실행함
- ⑪ 'initializing the camera' 단계가 종료될 때 까지 기다림
- ⑫ Davinch-gel gel imaging system의 왼쪽 상단의 UV transilluminator 버튼을 눌러 UV 램프를 켜
- ⑬ coreimager 프로그램 하단의 ZOOM과 FOCUS를 조절하여 적합한 크기와 초점을 맞춤
- ⑭ coreimager 프로그램 오른쪽의 EXPOSURE TIME을 조절함 (auto 모드를 선택하면 자동 맞춤 가능함)
- ⑮ coreimager 프로그램 오른쪽 하단의 acquire 버튼을 클릭하여 사진을 촬영함
- ⑯ 촬영된 사진이 새로운 창으로 뜨면 사진 오른쪽의 SAVE 버튼을 누르고 저장경로를 설정함

#### 4. 시료의 보관

- cDNA는 -70℃ 초저온 냉동고에 보관함
- Emeraldamp GT PCR master mix (2X premix) (TAKARA, RR310)는 -20℃ 냉동고에 보관함
- Primer는 100 pmole이 되도록 녹여서 stock으로 보관하고, 10 pmole로 희석하여 사용하며 -20℃ 냉동고에 보관함

## 정량적 유전자 발현 조사

### Analysis for pluripotency and differentiation marker expression by real-time RT-PCR and TaqMan Probes

#### □ 개요

- real-time PCR은 유전자 발현을 mRNA 수준에서 분석하기 위해 수행함
- real-time PCR은 인간 전분화능줄기세포의 전분화능이 유지되는지 확인하기 위해 mRNA 수준에서 미분화마커의 발현을 정량
- 인간 전분화능줄기세포의 삼배엽 분화 특성을 확인하기 위해 분화를 유도하고, 발달 단계에 해당하는 분화 마커의 발현을 mRNA 수준에서 정량

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 200  $\mu$ l PCR 튜브용 원심분리기
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P2 (0.2~2  $\mu$ l)
  - P20 (2~20  $\mu$ l)
  - P200 (20~200  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- Real-time PCR 기기 (Applied Biosystems, 7500 Real-time PCR system)

##### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (E-tube)
- 200  $\mu$ l PCR 튜브
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, AX-TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, AX-TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, AX-TF-1000-RS)
- 일회용 장갑
- Kimwipes (유한 김벌리)

##### 1.3. 시약

- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)

- RNase/DNase-free water (Welgene, ml019-02)
- TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems 4369016) (4°C 보관, 실험 진행 시 얼음 위에서 작업)
- Probes (AB, product number)
  - ※ -20°C 냉동고에 보관, 실험 진행시 얼음 위에서 서서히 녹임

#### 미분화마커

GENE	TaqMan® Probe ID
NANOG	Hs02387400-g1
POU5F1(OCT4)	Hs00742896-s1
SOX2	Hs00602736-s1
TERT	Hs00162669-m1
TDGF1	Hs02339499-g1
DNMT3B	Hs00171876-m1
GABRB3	Hs00241459-m1
GDF3	Hs00220998-m1
REX1	Hs00399279-m1
GAPDH	Hs999999905-m1

#### 분화마커

GENE	TaqMan® Probe ID
ACTB	Hs999999903-m1
GAPDH	Hs03929097-g1
PAX6	Hs00240871-m1
SOX1	Hs01057642-S1
HNF3B	Hs00232764-m1
AFP	Hs00173490-m1
T	Hs00610080-m1
MYOG	Hs01072232-m1

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비

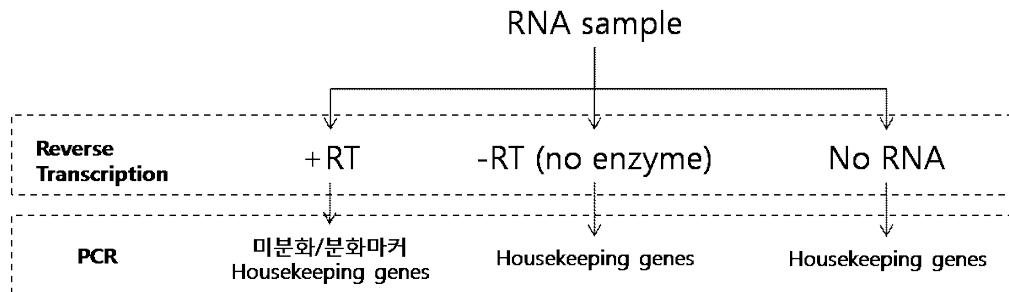
### 2.1. 시료의 준비

- ① 각각의 PCR 반응 샘플은 최소한 2배수 (duplicate), 또는 3배수(triplicate)로 준비함
- ② No RNA 시료는 음성 대조군 (negative control)으로써 RNase/DNase-free water



로 대체 가능함

- ③ -RT (no enzyme) 시료는 RNA 추출 과정에서 genomic DNA 오염 여부를 판별하기 위한 음성 대조군이므로 RNA 추출 시 DNase를 처리하면 생략 가능함



### 3. 시험 과정

#### 3.1. PCR 반응 시료 만들기

- ① 얼음을 준비하고 냉동 보관 되어 있던 TaqMan® Probe를 꺼내어 얼음 위에서 서서히 녹임
- ② 각각의 PCR 튜브에 P10 마이크로피펫을 이용하여 TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X)를 10  $\mu$ l 넣음
- ③ 발현을 확인하고자 하는 유전자에 해당하는 TaqMan Probe를 1  $\mu$ l 넣음
- ④ 100ng의 cDNA를 넣고 final reaction volume에 맞게 RNase/ DNase-free water를 첨가함
- ⑤ PCR 튜브의 뚜껑을 닫고 200  $\mu$ l PCR 튜브용 원심분리기를 이용하여 시료를 바닥에 가라앉힘.

※ PCR 튜브의 뚜껑에 어떠한 것도 적어서는 안됨

TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X)	10 $\mu$ l
TaqMan® Primer/Probe	1 $\mu$ l
100ng cDNA	A $\mu$ l
RNase/DNase-free water	(9-A) $\mu$ l
Final Reaction Volume	20 $\mu$ l

#### 3.2. realtime-PCR 기계 사용하기

- ① 7500 realtime-PCR system (AB)과 연결되어 있는 변압기의 전원을 켜
- ② 7500 realtime-PCR system (AB)과 연결되어 있는 컴퓨터의 전원을 켜
- ③ 7500 realtime-PCR system (AB)의 전원을 켜
- ④ 기기 전면 하부에 시료 거치대를 눌러 외부로 나오도록 함
- ⑤ 상하좌우 시료의 위치를 정확히 알 수 있도록 well에 맞추어 넣음
- ⑥ 거치대를 밀어 넣음
- ⑦ 7500 software v2.0.5 아이콘을 클릭함

- ⑧ 로그인 창이 뜨면 GUEST 상태에서 OK 버튼을 클릭함
- ⑨ 관리모드에 대해 묻는 창이 뜨면 'Ignore & continue startup' 버튼을 클릭함
- ⑩ 메뉴 상단에 New experiment를 클릭하고 Advanced setup을 선택함
- ⑪ 왼쪽 메뉴에 Experiment properties, Plate setup, Run method, Analysis 버튼이 생성되는데, 순서대로 진행함

### 3.3. 프로그램 사용 및 분석

#### 3.3.1. Experiment properties 단계

- ① experiment name (필수사항) : 프로토콜 및 데이터 저장을 위한 이름을 지정함
- ② 기기 선택 : 7500 (96 wells)
- ③ 모드 선택 : quantitation-comparative CT ( $\Delta\Delta CT$ )
- ④ 시료 종류 선택 : TaqMan® Reagent
- ⑤ 프로토콜 작동 법 : Standard (~2 hours to complete a run)

#### 3.3.2. Plate Setup

- ① Define Targets and Samples
  - 유전자 이름 입력
  - reporter는 FAM 선택
  - Quencher 는 NFQ-mgB 선택
- ② Define Targets and Samples (well design-96wells)
  - assign target : 96well plate를 마우스로 드래그하여 시료의 위치를 설정한 후 유전자 (target)를 선택함
  - ※ 보고자 하는 유전자는 UNKNOWN으로, 음성대조군은 NC로 설정함
  - assign sample : 96 well plate를 마우스로 드래그하여 시료의 위치를 설정한 후 sample (예: 세포주 이름)을 지정함
  - select relative quantitation setting
  - reference sample : 상대정량 시 대조군이 될 유전자를 선정함
  - endogenous control : (예) GAPDH

#### 3.3.3. Run Method

- ① reaction volume (시료의 양)정하기
- ② PCR 반응 횟수 : Number of cycle (일반적으로 40으로 정함)
- ③ 온도, 시간 등 반응 조건은 변경하지 않음
- ④ START RUN(초록색) 버튼을 클릭함
- ⑤ 저장하라는 메시지가 나오면 파일이름과 저장 경로를 설정함
- ⑥ 반응이 시작되면서 소요되는 시간이 표시됨

### 3.3.4. Analysis

- ① 반응이 끝났으면 오른쪽 상단의 analyze (초록색) 버튼을 클릭함
  - Amplification plot, Gene expression, Multicomponent plot, Raw Data plot, QC Summary, Multiple plots view 항목에서 분석된 데이터를 확인할 수 있음
  - 시료의 위치를 지정할 때처럼 마우스로 96 well을 드래그 하면서 각각의 정보를 확인 할 수도 있음
  - 3배수로 실험을 진행했을 경우에 3개의 data 중에서 값의 차이가 큰 well이 있을 경우 그 well을 우클릭하여 OMIT 설정을 하면 전체 data에서 삭제됨 (각 시료의 표준편차를 줄일 수 있음)
  - 데이터 가져오기 : 상단메뉴의 Export 버튼을 클릭함
- ※ Sample, result, raw data, multicomponent data, amplification data, gene expression data 중에 원하는 정보들을 선택한 후 데이터 파일 이름을 지정하고 저장 경로를 설정한 뒤, start export 버튼을 클릭하면 엑셀파일로 정보를 얻을 수 있음

### 4. 시료의 보관

- cDNA는  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고 또는  $-70^{\circ}\text{C}$  초저온냉동고에 보관함
- TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)는  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관함
- TaqMan Primer/Probe는 반복적으로 얼렸다 녹였다 하지 않도록 사용할 분량씩 분주하여  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관함

## 면역세포화학법을 이용한 마커 발현 조사

### Analysis for pluripotency marker expression by Immunocytochemistry

#### □ 개 요

- 면역세포화학법 (Immunocytochemistry)은 항체가 특이적으로 항원과 결합하는 성질을 이용하여 세포 내 특정 물질의 존재 여부 및 발현 위치를 확인하는 것임
- 미분화마커의 발현을 조사함으로써 인간 전분화능줄기세포의 특성 유지 여부를 판단할 수 있음
- 은행에서는 인간 전분화능줄기세포의 정해진 미분화 마커 들을 사용해 확인 과정을 진행

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 1.5 ml 튜브용 원심분리기 (Eppendorf, 5424R)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (2~10  $\mu$ l)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 왕복식진탕기 (Rocker) (Fineper, CR-95)

##### 1.2. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (MCT-150-X)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 김와이프스(유한김벌리)

- 알루미늄 호일
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3. 시약

- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Cellgro, 21-040-CV)
- Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, A7906)
- 4% Paraformaldehyde (WAKO, WAKO163-20145)
- Triton X-100 (Sigma, T8787)
- Mounting solution (Vector, H-1400)
- 4'6-Diamidino-2-phenylindole, hydrochloride (DAPI) (Thermo, 62248) : 4°C 냉장고 보관
- 항체

1차 항체	제조사	Cat No.	origin	희석 조건	permeabiliz-ation 조건	보관 온도
OCT3/4	Santa Cruz	sc-9081	Rabbit	1:200	Yes, 10분	4°C
SSEA4	Millipore	MAB4304	Mouse	1:200	No	4°C
TRA-1-60	Millipore	MAB4360	Mouse	1:200	Yes, 5분	4°C
TRA-1-81	Millipore	MAB4381	Mouse	1:200	Yes, 5분	4°C

2차 항체	제조사	Cat No.	origin	희석 조건	형광	보관 온도
anti-mouse IgG(H+L)	Vector Lab	TI-2000	horse	1:500	Texas Red	4°C
anti-rabbit IgG(H+L)	Vector Lab	TI-2000	goat	1:500	Texas Red	4°C
anti-mouse IgG(H+L)	Vector Lab.	FI-2000	horse	1:500	Fluorescein	4°C
anti-rat IgG(H+L)	Vector Lab	FI-4000	rabbit	1:500	Fluorescein	4°C

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. 1% BSA-PBS

- ① 4°C 냉장고에 보관중인 BSA 0.5 g을 50 ml 원심분리용 튜브에 담은 후 1x PBS 50 ml를 첨가하고 혼합
  - ※ 혼합 과정에서 거품이 많이 생기지 않도록 주의함

1% BSA-PBS  
YYYYMMDD

## 2.2. 0.2% Triton X-100-PBS (PBST)

- ① 상온에서 보관중인 Triton X-100 100  $\mu$ l를 50 ml 원심분리용 튜브에 담은 후 1x PBS 50 ml 첨가하고 혼합

※ Triton X-100이 굉장히 점성이 높아 100  $\mu$ l 정량을 잘 맞춰야함

0.2% Triton X-100-PBS  
YYYYMMDD

## 2.3. 4% Paraformaldehyde

- ① 4°C 냉장고에 보관중인 4% paraformaldehyde는 사용 전 50 ml 원심분리용 튜브에 50 ml씩 분주
- ② 분주 후 파라필름으로 밀봉 후 4°C 냉장고에 보관

4% Paraformaldehyde  
YYYYMMDD

## 2.4. 항체 준비

- ① 항체는 사용 전 얼음 위에서 작업
- ② 1% BSA-PBS 용액을 이용해 각각 항체들의 희석 조건에 따라 희석함
- ③ 희석한 항체는 사용 전 4°C 냉장고에서 보관

## 3. 시험 과정

※ 계대 후 4~5일 째 배양중인 인간 전분화능줄기세포 사용

- ① P1000 마이크로피펫으로 배양중인 세포의 배양액을 모두 제거하고, 1 ml 1X DPBS를 첨가하여 세포를 전후좌우로 조심스럽게 소독한 후 DPBS 제거
- ② P1000 마이크로피펫으로 35 mm 배양접시 1개 당 2 ml의 4% paraformaldehyde를 넣고 가볍게 흔들어 고루 펼친 다음 상온에서 20분 간 정치함
- ③ P1000 마이크로피펫으로 4% paraformaldehyde를 제거한 후 1 ml PBS를 첨가하여 세포를 전후좌우로 조심스럽게 2번 세척함
- ④ P1000 마이크로피펫으로 PBS를 제거한 후 세포막을 통한 항체 침투를 용이하게 하기 위해 PBST 용액을 35 mm 배양접시 1개 당 2 ml 첨가 후 상온에서 10분 간 정치 함
- ⑤ P1000 마이크로피펫으로 PBST 용액을 제거한 후 1 ml 1X PBS를 첨가하여 세포를 전후좌우로 조심스럽게 5분 간 씩 3번 세척함
- ⑥ P1000 마이크로피펫으로 1X PBS를 제거한 후 항체의 비특이적 반응을 방지하기

위하여 1% BSA-PBS 용액을 35 mm 배양접시 1개 당 2 ml 첨가 후 상온에서 30분 간 정치 함

- ⑦ P1000 마이크로피펫으로 1% BSA-PBS 용액 2 ml을 제거한 후 1X PBS를 첨가하여 세포를 전후좌우로 조심스럽게 5분 간 씩 3번 세척함
- ⑧ P1000 마이크로피펫으로 1X PBS를 제거한 후 희석한 1차 항체를 35 mm 배양접시 1개 당 500  $\mu$ l 넣어 왕복식 진탕기 위에서 상온 1시간 동안 반응 (또는 4°C 냉장고에서 18~34시간 정치 가능)
- ⑨ P1000 마이크로피펫으로 1차 항체를 제거하고 1X PBS를 1 ml 첨가하여 1X PBS로 왕복식 진탕기 위에서 5분 진탕하고 PBS를 제거 위 과정을 3회 반복 세척
- ⑩ 실험실의 조명을 끄고 알루미늄 호일로 차광을 준비함 (이후의 모든 과정은 차광된 상태를 유지해야 함)
- ⑪ 희석 후 준비해 둔 2차 항체를 P1000 마이크로피펫으로 35 mm 배양접시 1개 당 500  $\mu$ l를 첨가한 후 왕복식 진탕기 위에서 상온 1시간 동안 반응
- ⑫ P1000 마이크로피펫으로 2차 항체 희석액을 제거하고 P1000 마이크로피펫으로 1 ml의 1X PBS를 첨가한 후 왕복식 진탕기 위에서 상온 15분 진탕하여 세척하고 PBS 제거 위 과정을 3회 반복함
- ⑬ 1% BSA-PBS 용액을 사용하여 DAPI를 0.1  $\mu$ g/ml이 되도록 희석하여 준비함
- ⑭ 준비한 DAPI 희석액을 P200 마이크로피펫으로 35 mm 배양접시 1개 당 200  $\mu$ l씩 첨가하고 2분 간 왕복식 진탕기 위에서 상온 반응시킴
- ⑮ P1000 마이크로피펫으로 DAPI 희석액을 제거하고 1 ml의 1X PBS를 첨가하여 부드럽게 전후좌우로 흔들어 세척하고 PBS 제거한 후 위의 과정을 3회 반복
- ⑯ P1000 마이크로피펫으로 300  $\mu$ l의 mounting solution을 넣어줌
- ⑰ 형광현미경 촬영

※ Texas Red : 빨강색, Fluorescein : 연두색

## 인간 전분화능줄기세포의 기형종 형성시험

### Teratoma formation assay for human pluripotent stem cells

#### □ 개 요

- 기형종이란 여러 종류의 세포와 조직들로 이루어진 종양의 일종임
- 기형종은 피부세포, 근육세포, 신경세포 등 다양한 세포와 조직들로 이루어져 있고 같은 종류의 세포나 조직에서도 각각의 세포가 분화된 정도까지 다름
- 줄기세포를 면역력이 결핍된 생쥐에 이식하여 기형종 형성 유도함으로써 줄기세포가 다분화능이 있는지를 확인하는 증거로 활용 됨
- 이 표준운영지침서는 줄기세포의 다분화능을 평가하기 위한 기형종 형성시험법을 규정하는데 목적이 있음
- ※ 동물실험은 질병관리본부 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회규정에 따라 수행

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P200 (200~1000  $\mu$ l)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 동물배양시설 및 장비

- 질병관리본부 실험동물실
- 동물배양시설(케이지, 깔집, 급이기, 급수기, 선반)
- 이산화탄소 가스
- 이산화탄소 가스 챔버

##### 1.3. 소모품

- 1.5 ml 원심분리용 튜브 (MCT-150-X)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)



- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4488)
- 5 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4487)
- 혈구계수기 (Hematocytometer)
- 1 ml 주사기 (23G, BD, 305501)

#### 1.4 시약

- mTeSR-1 media (Stem Cell Technol, 05850)
- BD Matrigel Matrix (BD, 10010-023)
- Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- Trypsin-EDTA (Gibco, 25200-056)
- Formaldehyde, 37% solution in water (Sigma, 252549)

## 2. 시약의 준비 및 보관

### 2.1. Matrigel의 준비

- ① -20℃ 냉동고에 보관된 matrigel은 사용 하루 전에 4℃ 냉장고로 옮겨 해동시킴
  - ② 해동된 matrigel을 생물안전대에서 개봉한 후 P1000 마이크로피펫으로 10회 피펫팅하여 균질화하고, 즉시 멸균 처리된 1.5ml 원심분리용 튜브에 필요량만큼 나누어 담아 적절히 정보를 표기한 후 사용 전까지 -20℃ 냉동고에 보관
  - ③ 피펫, 팁, 튜브, 주사기 등도 미리 차가운 상태로 준비하여 matrigel이 실험 조작 중 경화되는 것을 방지
  - ④ Matrigel은 냉동과 해동을 반복하지 않도록 주의해야 함
- ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

### 2.2. 전분화능줄기세포의 투여 준비

#### 2.2.1 전분화능줄기세포 준비

- ① 기형종 시험에 사용할 전분화능줄기세포는 matrigel 코팅된 배양접시에서 feeder-free 상태로 1주 이상 배양하여 적응시킴
- ② 배양접시에 약 70-80%로 증식하게 되면 P1000 마이크로피펫으로 배지를 제거한 후 2ml의 1x DPBS를 첨가하여 손으로 조심스럽게 상하좌우로 흔들어 세척하고, DPBS를 제거
- ③ P1000 마이크로피펫으로 1 ml의 Accutase를 배양접시에 첨가하고 37℃ 이산화탄소 배양기에서 7분 간 배양
- ④ 배양된 세포 배양접시에 P1000 마이크로피펫으로 전분화능줄기세포 배양액 2 ml을 첨가한 후 피펫팅하여 배양접시로부터 세포를 재부유시킴

- ⑤ 세포 부유액을 15 ml 튜브로 옮기고 20°C에서 5분 간 1000 rpm으로 원심분리
- ⑥ 상층의 배양액을 조심스럽게 제거
- ⑦ 냉장 보관된 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 1ml 첨가하여 세포를 재부유 (10회) 시킴
- ⑧ 튜브를 얼음에 담아 보관

### 2.2.2 세포 계수 및 준비

- ① 혈구계수기로 세포 수를 세어  $4 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 전분화능줄기세포 배양액으로 희석하여 세포가 고르게 퍼지도록 피펫팅한 후, 다시 얼음에 보관
- ② 실험동물 마리 당  $1 \times 10^6$  세포가 투여될 수 있도록  $2 \times 10^7$  cells/ml의 세포 부유액 500  $\mu$ l을 각 튜브에 담아 얼음에 보관
- ③ 분주된 세포 부유액에 동량의 matrigel 500  $\mu$ l을 얼음 위에서 섞은 다음 피펫팅하여 고르게 섞이도록 함
  - ※ 주의 : 이때 matrigel이 용액상태가 아닌 gel상으로 굳어 있는지 반드시 확인, 주의하여야 함
- ④ 미리 라벨링한 1 ml 주사기에 (23G) matrigel과 세포 부유액의 혼합액을 0.25 ml 씩 충전함
- ⑤ 충전한 주사기는 보호캡을 씌워 얼음을 담아둔 보온용기 (예, 스티로폼 박스)에 수평으로 넣어 실험동물에 주입할 때까지 차갑게 보관

## 2.3 시험동물

### 2.3.1 시험동물의 준비

- 시험동물의 종류: NOD.CB17-Prkdcscid/NCrCrl (NOD-SCID)
- 주령: 4주령에 구입
- 성별: 수컷
- 구입처: ORIENT BIO 등

### 2.3.2 검역 및 순화

- 4주령 마우스의 외관검사를 실시하고 전자저울로 체중을 측정한 후 6~ 7일간 순화 기간을 두어 매일 1회 일반증상 관찰을 실시
- 입수 시 마우스의 꼬리에 적색 유성펜으로 개체 표시를 하였으며 군 분리 시에는 청색 유성펜으로 개체 표시
- 실험군 분리는 체중 및 일반증상에 이상이 없는 동물 중에서 선별하여 수컷 각 4군, 즉, 대조군, 저용량군, 중용량군, 고용량군으로 각각 5마리씩 군 분리

### 2.3.3 사육 환경

- 사육 상자는 260Wx350Dx210H mm 의 스테인리스 철망 사육 상자를 사용하였으며

온도는 19.0 ~ 25.0°C로 유지

- 습도는 30 ~ 70%를 유지하였으며 명암주기는 매일 오전 7시부터 오후7시까지 조명 시간을 나누어 주었고 조도는 150 ~ 300 Lux를 유지
- 사육 상자는 시험기간, 시험명, 시험책임자명을 기재한 label을 첨부
- 모든 실험동물은 실험동물용 고품사료 (Samtako. Co)와 음수를 자유 급여함

※ 동물실험은 질병관리본부 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회규정에 따라 수행

### 3. 시험 과정

#### 3.1 마우스에 줄기세포 투여

- ① 단독배양 된 줄기세포 100  $\mu$ l ( $10^6 \sim 10^7$  cells/ml)를 5주령의 수컷 마우스의 등쪽 피부를 견인하여 실험동물이 움직이지 못하게 고정한 후 주입
- ② 얼음 위에 보관된 주사기를 꺼내어 피하에 주사기로 주입함
- ③ 주입 시 주사기를 실온에 오래 노출시키지 않도록 주의
- ④ 주입을 완료한 후에는 주입된 액이 밖으로 새어나오지 않도록 주사기 침이 들어간 피부 부위를 손가락으로 비벼줌

### 4. 판정

#### 4.1 실험동물의 관리

- ① 세포를 주입한 실험동물은 매주 1회 임상증상을 관찰함
- ② 매주 1회 주사부위에 종괴형성 유무를 관찰하고, 종괴가 형성되면 종괴의 높이x길이x폭을 측정
- ③ 일정크기 (약 8-12주, 약 1.5  $\text{cm}^3$ )가 되면, 동일한 방법으로 마취 및 절개하여 종괴를 적출
- ④ 동물실험 윤리규정에 따라 이산화탄소 가스를 사용하여 안락사를 진행
- ⑤ 기형종 조직은 10% formaldehyde으로 고정한 후, 6  $\mu$ m 절편을 만들어 H&E 염색을 실시하여 관찰
- ⑤ 적출된 종괴로 부터 여러 가지 세포로 분화되었는지를 확인하기 위하여 조직병리학적 평가를 수행

#### 4.2 일반증상관찰

- 일반증상 관찰은 4주간 모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고 1일 2회 사망동물의 유무를 확인함

#### 4.3 기형종의 세포조직학적 검토

- 면역결핍마우스를 이용하여 형성시킨 기형종에 대한 세포조직학적 검사 시 인간 전분화능줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽 유래 다양한 조직의 형태를 갖추는

지 확인

- 필요에 따라 전문 분석 기관에 시료를 의뢰

### 5. 결과 보고

시험일자: 20__년__월__일 ~ 20__년__월__일			
결과 보고: 20__년__월__일			
시료명	삼배엽 형성		
	외배엽	중배엽	내배엽

## ABO 유전자형 분석

### ABO genotype assay

#### □ 개 요

- ABO 유전자 분석은 개체 식별이 가능한 유전자 형의 일종
- 혈액 내의 적혈구 표면 항원과 혈액 내의 항원으로 A형, B형, O형, AB형의 4가지 형태로 나타남
- 인간 전분화능줄기세포의 개체 식별을 위해 수행
- 혈액형을 결정하는 유전자의 9번 염색체 (9q34)의 약 18~20 kb에 존재하는 1,062개 cDNA 7개의 exon으로 결정되며, A형과 B형 allele는 297, 526, 703, 796, 803, 903의 염기서열 차이로 결정이 되며, O형은 A형 allele와 cDNA 염기배열의 순서는 동일하나 exon 6의 261번째 염기인 Guanine (G)가 결손으로 stop codon이 나타나 A 전이효소의 기능이 상실된 단백질을 표현하게 됨
- 상기의 유전자의 차이에 따라 PCR 방법으로 유전자형 검사
- 은행은 인간 전분화능줄기세포의 혈액형을 전문 분석 기관에 위탁하여 검사

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 마이크로피펫 (Micropipette)  
- P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)

- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시험 과정

- ※ 전문기관 위탁 분석 시, 질병관리본부 내 용역계약체결 절차에 따라 분석 기관 선정
- ※ 분석 기관이 지정하는 방식에 따라 시료 준비 및 분석실시하고 분석 및 판독 결과를 확인

### 2.1. 시료의 준비

- ① 인간 전분화능줄기세포를 계대 배양 또는 해동한 후 35 mm 배양접시에 파종하여 이산화탄소배양기에서 6일 동안 배양
  - ※ 인간 전분화능줄기세포 배양 (SOP#14) 참조
- ② P1000 마이크로피펫을 이용하여 배양액 1 ml과 함께 인간 전분화능줄기세포 콜로니를 수거한 후 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮김
  - ※ 콜로니 수거 방법은 인간 전분화능줄기세포 계대 (SOP#15) 참조
- ③ 시료가 포함된 튜브를 분석 전문 기관에 위탁하여 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

### 2.2. 검사 방법

- ① 인간 전분화능줄기세포의 genomic DNA (Qiagen, DNA micro kit를 추출, 정량한 후 ABO 유전자형을 증폭하여 분석
  - ※ 줄기세포주 특성분석 전문기관 위탁 절차 (APPENDIX#5) 참조

## 3. 결과 보고

- 결과 예시 : AO, AA, BO, BB, AB, OO로 나타냄

## 줄기세포주의 유전체 분석 [CNV]

### Copy number variation (CNV) analysis in human pluripotent stem cells

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포는 계대 배양과 보관 혹은 역분화줄기세포주의 리프로그래밍 과정에서 유전적인 변이가 발생할 수 있음
- CNV는 개인 간에 나타나는 일반적인 형태의 유전적 변이이며 인종에 따라 다양한 변이가 보고되고 있으며, 특정한 유전자의 변이는 질병 감수성과 관련성이 높은 것으로 보고되어 있음

#### 1. 목적 (Purpose)

은행에 기탁되는 줄기세포주의 유전적 안정성을 확인하고, 이들 세포의 배양 및 보관 관리 과정에서 안정성 유지를 확인하여 품질 보증된 세포주를 공급하기 위하여 유전체정보의 검증이 필요함

#### 2. 적용범위(Scope)

- 2.1. 줄기세포주 banking 단계별 샘플로부터 오믹스 데이터를 수집하고, 종합적으로 분석함으로써 banking된 줄기세포주의 유전자 발현 양상 확인 및 통합 정보 기초 자료로 활용할 수 있음
- 2.2. banking 줄기세포주의 CNV 분석을 위해 Whole Exome Sequencing, aCGH, SNP chip 실험 방법을 이용하여 줄기세포주의 CNV를 확인

#### 3. 프로세스 흐름도(Process Map)

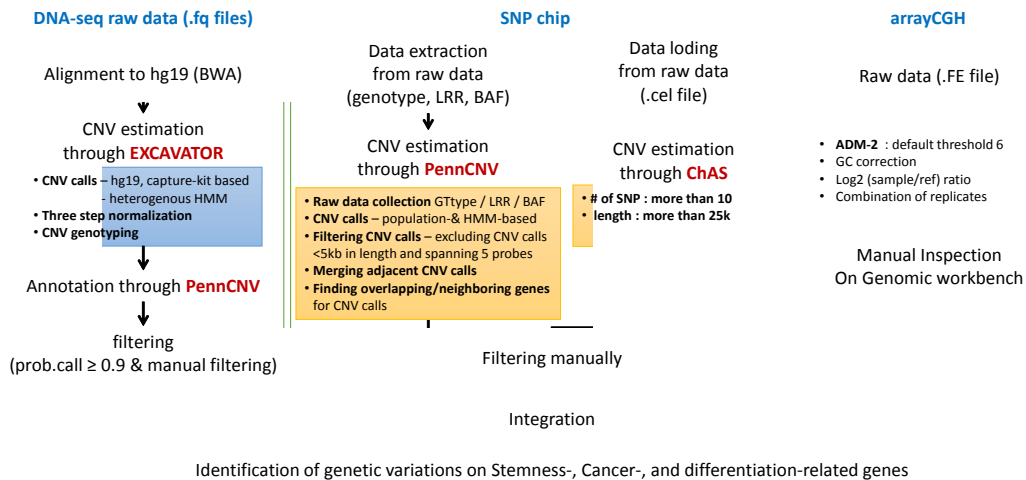
Whole Exome Sequencing, SNP chip, aCGH의 CNV분석 흐름도는 다음과 같음

#### 4. 절차(Procedures)

CNV 분석을 위해 각각의 분석법에 대해 다음과 같이 분석을 수행함.

##### 4.1 Whole Exome Sequencing 수행으로 raw data를 생산함

- ① Fastq 파일에 대한 quality control을 수행하기 위해 FastQC (v.0.10.1) software를 이용하여 paired-end 방식으로 생산된 각 read에 대하여 base quality, read quality, GC content, insert size 및 contamination 여부를 검사하고 낮은 품질의 데이터는 분석에서 제외함
- ② QC를 통과한 read는 BWA (v0.7.10) software를 사용하여 human reference genome (hg19)에 매핑을 수행함



- ③ Duplication bias를 줄이기 위해 picard 를 사용하여 duplicated reads를 제거함
- ④ BAM 파일로부터 EXCAVATOR를 사용하여 mapping quality 20이상인 read를 대상으로 CNV calling을 수행함
- ⑤ CNV calling을 3-step normalization 과정을 통해 수행되며, case-control 간의 CNV를 확인하기 위해 somatic mode에서 분석을 진행함
- ⑥ CNV annotation을 위해 pennCNV를 이용함
- ⑦ 비교대상 간의 CNV 리스트를 추출하고, 이에 대한 visualization을 통해 시각적으로 확인함

#### 4.2 SNP chip (Affymetrix Cytoscan HD) 데이터로부터 다음과 같이 CNV 분석을 수행함

- ① Affymetrix Cytoscan HD chip으로 데이터 생산 후, raw data (.CEL file)를 ChAS 에 업로드함
- ② Data의 quality control (QC)를 위해 snpQC, mapd, waviness Sd 등을 확인함
- ③ Calling된 CNV에 대해 다음과 같은 조건으로 1차 필터링을 수행함
  - 1) marker count : 10 이상
  - 2) size : 25 kbp 이상
- ④ Calling 된 CNV에 대해 CN number state, weighted log2 ratio, Allele difference, LOH, genotype calls 값들을 이용하여 manual filtering을 수행하여 false-positive call을 제외함.
- ⑤ 분석이 수행된 CNV segment 및 Whole genome view 등을 .hcyp file 및 .jpg file로 저장함

#### 4.3 SNP chip (illumina Omni2.5-Exome chip) 데이터로부터 다음과 같이 CNV 분석을 수행함

- ① Illumina Genome Studio v.7.0 에서 각 샘플 당 GType, LRR, BAF 값을 추출 함
- ② HumanOmni25 exome v1.3. population report로부터 pfb file을 생성함 (compile\_pfb.pl)
- ③ Illumina Genome Studio에서 추출한 데이터를 각 샘플별로 분리하여 다시 저장함
- ④ SNP chip의 각 SNP에 대한 signal value를 기반으로 CNV calling을 수행함 (detect\_cnv.pl)



- ⑤ False positive를 줄이기 위해, SNP수 5개 이하이면서 사이즈가 5kb이하인 경우는 필터링 함 (filter\_cnv.pl)
- ⑥ 인접한 CNV call을 combine 하기 위해, fraction option을 사용하여 한 region으로 병합함 (Clean\_cnv.pl)
- ⑦ Exon 부분에 있는 CNV 및 annotation을 수행함 (scan\_region.pl).
- ⑧ Exonic region이 아닌 부분은 제외하여 다시 저장함 (fgrep command 사용)
- ⑨ jpg file로 시각화 함 (visualize\_cnv.pl)
- ⑩ Bed file을 생성하여 UCSC Genome Browser의 public data와 비교 분석함 (visualize\_cnv.pl)
- ⑪ 생성된 jpg file로부터 false positive인 calling은 manually 제외함

#### 4.4 aCGH 데이터로부터 다음과 같이 CNV 분석을 수행함

- ① aCGH raw data를 Agilent Genomic Workbench에 업로드함
- ② aCGH를 수행한 design file도 함께 준비하여 업로드 한 후, raw data 업로드 함
- ③ 다음과 같은 조건에서 CNV calling을 수행함
- ④ False positive 제거를 위하여 calling된 CNV에 대해 manually 필터링 함
- ⑤ 확인된 CNV region에 대해서는 그림으로 저장함

#### 4.5 (Optional) WES, aCGH, SNP chip 으로부터 calling된 CNV에 대해 integration을 수행함

- 4.6 미분화관련 유전자, 분화관련 유전자 및 암 관련 유전자와의 연관성을 분석함 (첨부)
- 4.7 Pathogenic CNV를 확인하기 위해 CNV region안에 질병 관련 유전자의 여부를 확인함 (OMIM, <http://dgv.tcag.ca>)
- 4.8 Recurrent한 CNV인지 확인함
- 4.9 발굴된 CNV는 결과로 보고함

### 5. 관련 프로그램(Related Program)

- 5.1 FastQC (v.0.10.1) : Quality Control (QC) of Raw data (fastq file)
- 5.2 BWA (v 0.7.10) : alignment to hg19 reference
- 5.3 EXCAVATOR : CNV calling from WES data
- 5.4 ChAS : CNV calling from Affymetrix SNP chip data
- 5.4 PennCNV : CNV calling from SNP chip data
- 5.5 Illumina Genome Studio 7.0 : CNV calling from Illumina SNP chip data
- 5.6 Agilent Genomic Workbench : CNV calling from aCGH data

### 6. 참고문헌(Reference)

- 6.1 Magi A et al., EXCAVATOR : detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. Genome Biol., 2013; 14(10):R120
- 6.2 Wang K et al., PennCNV:an integrated hidden Markov model designed for



## Xeno-free 세포 배양 접시의 준비

### Preparation of xeno-free culture plates

#### □ 개 요

- 인간 전분화능줄기세포의 임상 적용에는 배양 과정의 안전성을 확보하기 위하여 동물성분이 배제된 배양액 사용이 권장됨
- 임상 적용에 적합한 인간 전분화능줄기세포의 배양을 위한 matrix, 배양액 및 동결액이 개발되고 있으나 최적화된 품질 등을 개선되어야 하며, 은행은 최근 개발된 방법을 조사하여 우수한 절차를 수립을 목표로 함
- 배양액은 항상 신선한 상태를 유지하여야 하며, 미생물 또는 이물질 등에 의해 오염되지 않도록 항상 주의
- 이에 따라 배양액은 필요한 만큼 제조하여 분주해서 사용하고, 사용 후 남은 분주 배양액은 다시 사용하지 않음

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 전동피펫 (Drummond, 4-000-201)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P10 (1~10  $\mu\text{l}$ )
  - P200 (20~200  $\mu\text{l}$ )
  - P1000 (200~1000  $\mu\text{l}$ )

##### 1.2. 소모품

- 35 mm 배양접시 (NUNC, 153066)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, 4488)
- 15 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P10 (Axygen, TF-300-RS)
- 마이크로피펫 팁 P200 (Axygen, TF-200-RS)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)

### 1.3. 시약

- TeSR-E8 Kit for hESC/hiPSC Maintenance (Stem Cell Technol, ST05940)
- Vitronectin (VTN-N) Recombinant Human (Gibco, A14700)
- rLaminin-521 (Human) (Corning, BD-354222)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)

※ 시약의 준비(APPENDIX#1) 참조

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. Vitronectin, rLaminin-521 matrix의 준비

- ① Vitronectin, rLaminin-521은 -80℃에 보관하고 사용 하루 전 4℃로 옮겨 해동

## 3. 시험 과정

- ① Matrix는 종류에 따라 최종 사용 농도가 다르므로 DPBS로 희석하여 사용
  - Vitronectin : 35 mm 배양접시 한 개당 10  $\mu\text{l}$  (5 $\mu\text{g}$ )의 Vitronectin을 DPBS 1 ml에 섞어서 사용
    - \* 35 mm 배양접시의 넓이 = 약 10 $\text{cm}^2$ (9.62 $\text{cm}^2$ ), 따라서 5 $\mu\text{g}/10\text{cm}^2 = 0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$
  - rLaminin-521 : 35 mm 배양접시 한 개당 100  $\mu\text{l}$  (10 $\mu\text{g}$ )의 rLaminin-521을 DPBS 1 ml에 섞어서 사용
    - \* 35mm 배양접시의 넓이 = 약 10 $\text{cm}^2$ (9.62 $\text{cm}^2$ ), 따라서 10 $\mu\text{g}/10\text{cm}^2 = 1\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- ② Matrix를 섞을 때 강한 파이펫팅은 matrix가 손상되지 않도록 약하게 파이펫팅하거나 튜브를 위 아래로 가볍게 회전시켜 섞음
- ③ 희석된 matrix 용액 35 mm 배양접시에 1 ml씩 넣고 상온에서 최소 한 시간 정치시켜 배양접시 표면을 코팅
- ④ Matrix로 코팅한 배양접시는 한 시간 후 matrix용액을 P1000 피펫을 이용하여 제거하고 TeSR-E8 배지를 이용하여 한 번 헹굼
- ⑤ 35mm 배양접시 당 2 ml의 TeSR-E8 배지를 넣어 사용

## 4. 사용 시 주의점

- Matrix 코팅은 배양접시를 사용하기 직전에 실시하여 바로 사용하고 장기간 보관하거나 사용하지 않음

## 인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 배양액 제조

### Preparation of xeno-free stem cell culture media

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포의 임상 적용에는 배양 과정의 안전성을 확보하기 위하여 동물성분이 배제된 배양액 사용이 권장됨
- 임상 적용에 적합한 인간 전분화능줄기세포의 배양을 위한 matrix, 배양액 및 동결액이 개발되고 있으나 품질의 최적화 등이 개선되어야 하며, 은행은 최근 개발된 방법을 조사하여 우수한 절차를 수립을 목표로 함
- 배양액은 항상 신선한 상태를 유지하여야 하며, 미생물 또는 이물질 등에 의해 오염되지 않도록 항상 주의
- 이에 따라 배양액은 필요한 만큼 제조하여 분주해서 사용하고, 사용 후 남은 분주 배양액은 다시 사용하지 않음

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 37°C 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 전동피펫 (Eppendorf)

##### 1.2. 소모품

- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 10 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4488)
- 50 ml 일회용 피펫 (Corning, CT-4490)
- 50 ml 원심분리용 튜브 (SPL, 50050)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

### 1.3. 시약

- TeSR-E8 Kit for hESC/hiPSC Maintenance (Stem Cell Technol, ST05940)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임  
※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. TeSR-E8 Kit

- ① TeSR-E8 Kit의 구성  
- 500 ml의 배양액 (냉장보관)와 supplement (4°C 보관)으로 구성
- ② 배양액을 만들기 하루 전 냉동 보관된 supplement를 냉장고로 옮겨 해동

## 3. 시험 과정

### 3.1. Xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액 준비 (TeSR-E8)

- ① 500 ml TeSR-E8 배양액이 들어있는 병에 해동한 supplement를 넣어 섞어 혼합
- ② 잘 섞은 후 50 ml 튜브에 50 ml씩 분주하여 배지명과 제조 날짜를 기입하고 파라필름으로 밀봉하여 4°C 냉장고에 보관

TeSR-E8 + Sup  
YYYYMMDD

## 4. 사용 시 주의점

- 배양액은 제조 후 2주가 넘으면 사용하지 않고 폐기

## 인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 계대 배양

### Xeno-free subculture of human pluripotent stem cells

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포의 임상 적용에는 배양 과정의 안전성을 확보하기 위하여 동물성분이 배제된 배양액 사용이 권장됨
- 임상 적용에 적합한 인간 전분화능줄기세포의 배양을 위한 matrix, 배양액 및 동결액이 개발되고 있으나 품질의 최적화 등이 개선되어야 하며, 은행은 최근 개발된 방법을 조사하여 우수한 절차 수립을 목표로 함
- 배양액은 항상 신선한 상태를 유지하여야 하며, 미생물 또는 이물질 등에 의해 오염되지 않도록 항상 주의
- 이에 따라 배양액은 필요한 만큼 제조하여 분주해서 사용하고, 사용 후 남은 분주 배양액은 다시 사용하지 않음

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1. 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)

##### 1.2. 소모품

- 24 cm Scraper (TPP, 99002)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용 장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 유성사인펜

##### 1.3 시약

- Xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액 (TeSR-E8)
  - ※ TeSR-E8 제조 (SOP#102) 참조
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco, 14190-250)
- 0.5 M EDTA, pH8.0 (Invitrogen, 15575-038)
- Gentle cell dissociation reagent (Stem Cell Technol, 07174)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1. TeSR-E8 배양액

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4°C에서 보관중인 TeSR-E8 배양액은 사용 전 37°C 항온기에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ② 37°C에서 데운 인간 전분화능줄기세포 배양액은 튜브 표면을 70 % 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮김

### 2.2. Xeno-free matrix 배양접시

- ① 필요한 만큼 xeno-free matrix 배양접시 준비
  - ※ Xeno-free matrix 배양접시의 준비 (SOP#101) 참조
  - ※ 35 mm 배양접시 당 희석된 matrix 용액 1 ml

### 2.3. Cell dissociation 용액의 준비

- ① 0.5 mM EDTA, pH8.0
  - 10  $\mu$ l의 0.5 M EDTA 용액을 DPBS 10 ml로 희석하여 최종 농도 0.5 mM의 EDTA 준비
- ② Gentle cell dissociation reagent
  - 시판되고 있는 용액을 그대로 사용하면 되고 35 mm 배양접시 기준 1 ml 사용

## 3. 시험 과정

3.1. 인간 전분화능줄기세포는 배양 후 7일 뒤 계대를 원칙으로 하며, 본 과정은 35 mm 배양접시에서 배양 중인 전분화능줄기세포를 기준으로 작성하였음

※ 계대할 인간 전분화능줄기세포는 35 mm 배양접시 기준에서 세포 밀도 (confluency)가 80 % 수준을 유지

- ① 이산화탄소배양기에서 배양 중인 35 mm 배양접시를 생물안전작업대 안으로 옮김
- ② 실체현미경을 이용해 콜로니를 관찰하면서 P1000 마이크로피펫으로 배양액 제거
- ③ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 손으로 전후좌우로 조심스럽



게 흔들어 부착된 세포의 표면을 세척 후 1X DPBS 제거

- ④ 사용한 Xeno-free matrix에 맞춰 cell dissociation 용액을 첨가 한 후 이산화탄소배양기에 정치, 현미경 관찰하면서 적정한 시간동안 반응
  - 0.5 mM EDTA : 37°C 5 분
  - Gentle cell dissociation reagent :
    - \* Vitronectin, 상온 6-12 분, Corning matigel, 상온 6~8 분
- ⑤ 정치 후 P1000 마이크로피펫으로 cell dissociation 용액을 제거하고, 1 ml의 xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액을 배양접시에 첨가한 후 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 세척하고 배양액 제거
- ⑥ 세척 후 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 1 ml 첨가한 후 실체현미경으로 관찰하면서 스크래퍼를 이용하여 접시 표면을 긁어 부착되어 있는 세포를 배양접시에서 분리
- ⑦ 배양접시에서 떨어진 세포를 P1000 마이크로피펫으로 xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액과 함께 15 ml 원심분리용 튜브에 옮김
- ⑧ 생물안전작업대에서 약 3 분 간 정치하여 세포 덩어리가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거
- ⑨ P1000 마이크로피펫으로 인간 전분화능줄기세포 배양액을 2 ml 첨가하고, 10회 피펫팅하여 세포 덩어리를 잘게 쪼갬
- ⑩ 미리 코팅 해둔 35 mm xeno-free 배양접시에서 코팅용액을 제거하고 P1000 마이크로피펫으로 1 ml의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 첨가, 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 세척하고 배양액 제거
- ⑪ 배양접시에서 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 제거한 후 각 2 ml xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액을 첨가
  - ※ 35 mm 배양접시 기준으로 80% 밀도로 배양된 세포를 희석배수 1:20 으로 계대
- ⑫ 세포 부유액을 배양접시에 넣어 배양접시를 이산화탄소배양기로 옮겨 손으로 전후좌우로 각 10회 조심스럽게 흔들어 부유액을 고르게 펼침
- ⑬ 계대 시 필요에 따라 세포 부착을 도와주는 ROCKi 인 Y27632를 사용할 수 있음 (최종 농도 10  $\mu$ M)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조

#### 4. 주의점

- 인간 전분화능줄기세포 계대 배양에 사용되는 모든 배양액과 시약은 사용 전 30분 동안 항온수조 안에서 정치하여 가온 후 사용
- 계대 배양과정에서 세포의 분화가 보이면 바로 제거, 미분화 상태의 세포만을 계대에 이용
- 모든 계대 배양 작업은 생물안전작업대 내에 있는 실체현미경 위에서 실시함

## 인간 전분화능줄기세포의 Xeno-free 동결 [Cell-freezing container] Xeno-free cryopreservation of human pluripotent stem cells [Cell-freezing container]

### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포의 임상 적용에는 배양 과정의 안전성을 확보하기 위하여 동물성분이 배제된 배양액 사용이 권장됨
- 임상 적용에 적합한 인간 전분화능줄기세포의 배양을 위한 matrix, 배양액 및 동결액이 개발되고 있으나 품질의 최적화 등이 개선되어야 하여, 은행은 최근 개발된 방법을 조사하여 우수한 절차 수립을 목표로 함
- 인간 전분화능줄기세포 동결 및 해동은 배양, 미분화 및 전분화능의 특성 보존 등의 효율을 결정하기 때문에 안정적으로 동결 보존 및 해동할 수 있는 방법의 지정이 중요함

### 1. 필요한 물품

#### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 세포동결컨테이너 (cell freezing container) (Nalgene, 5100-0001)
- 액체질소탱크

#### 1.2 소모품

- 동결바이얼 (NUNC, 368632)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

- 24 cm Scraper (TPP, 99002)

### 1.3 시약

- TeSR-E8 배양액
  - ※ TeSR-E8 배양액 제조 (SOP#102) 참조
- 0.5M EDTA, pH 8.0 (Gibco, AM9260G)
- 동결액, STEM-CELLBANKER GMP Grade (Amsbio, 11897) 또는 mFreSR (Stem Cell Technol, #05854, #05855)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임  
※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 세포동결컨테이너의 사용

- ① 세포 동결 컨테이너는  $-70^{\circ}\text{C}$  이하의 초저온 냉동고에서 1분에  $1^{\circ}\text{C}$  씩 천천히 온도를 낮추어 주는 용기로, 인간 전분화능줄기세포 및 STO를 액체질소탱크에 보관하기 위해 동결 처리를 한 후 완만 동결 (slow freezing) 방법을 사용하여 세포를 동결할 때 사용함
- ② 세포동결컨테이너 는 채움선 까지 이소프로판올을 넣어서 사용하여야 하며, 다섯 번 사용 후에는 이소프로판올을 교체해 줌

### 2.2 TeSR-E8 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관중인 TeSR-E8 배양액은 사용 전  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
- ②  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 데운 TeSR-E8 배양액은 튜브표면을 70% 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
  - ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동 시 사용함.

### 2.3 Cell dissociation 용액의 준비

- ① 0.5 mM EDTA, pH8.0
  - 10  $\mu\text{l}$ 의 0.5 M EDTA 용액을 DPBS 10 ml으로 희석하여 최종 농도 0.5 mM의 EDTA 준비
  - 35 mm 배양접시 기준 1 ml 사용

### 3. 시험 과정

- ① 동결하고자 하는 적절한 개수의 동결바이얼을 준비하여 관련 정보를 기입

세포명 계대 수 YYYYMMDD 동결한 실험자 이름
---------------------------------------

- ② 이산화탄소배양기에서 배양중인 35 mm 배양접시를 생물안전작업대 안으로 옮김
- ③ 실체현미경을 이용해 콜로니를 관찰하며 P1000 마이크로피펫으로 배양액 제거
- ④ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 부착된 세포의 표면을 세척 후 1X DPBS 제거
- ⑤ 세포를 배양중인 xeno-free matrix에 맞춰 cell dissociation 용액을 첨가 한 후 이산화탄소배양기에 정치
- 0.5 mM EDTA : 37°C 5분
- ⑥ 정치 후 P1000 마이크로피펫으로 cell dissociation 용액을 제거하고, 1 ml의 TeSR-E8 배양액을 배양접시에 첨가한 후 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 세척하고 배양액 제거
- ⑦ 세척 후 TeSR-E8 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 1 ml 첨가한 후 실체현미경으로 관찰하면서 스크레퍼를 이용하여 접시 표면을 긁어 세포를 배양접시에서 분리
- ⑧ 배양접시에서 떨어진 세포를 P1000 마이크로피펫으로 xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액과 함께 15 ml 원심분리용 튜브에 옮김
- ⑨ 생물안전작업대에서 약 3분 간 정치하여 세포 덩어리가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거
- ⑩ 세포가 가라앉은 튜브의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 최대한 제거하고 1 ml의 동결액을 넣어 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ⑪ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 분주한 후, 세포 동결 컨테이너에 넣고 뚜껑을 잘 닫아 초저온냉동 (-70°C)에서 24시간 동안 완만 동결
- ※ 동결된 세포는 -70°C 초저온냉동고에서 장시간 보관하지 않음**
- ⑫ 24시간 동안 완만 동결을 마친 바이얼은 세포 보관 상자에 넣어 액체질소탱크에 보관
- ⑬ 지정된 액체질소탱크에 보관하고 로그북에 동결 저장한 세포의 정보를 기입

## 인간 전분화능줄기세포 Xeno-free 동결 [CRF]

### Xeno-free Cryopreservation of human pluripotent stem cells [CRF]

#### □ 개요

- 인간 전분화능줄기세포는 액체질소탱크 내에서 오래도록 보관할 수 있어야 함
- 인간 전분화능줄기세포의 미분화를 잘 유지하고 소실 없이 보관하기 위해 정해진 동결방법을 정하고 사용해야함
- Controlled Rate Freezer (CRF)를 이용하여 동결 효율을 제고함

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 실체현미경 (Olympus optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)
- 액체질소탱크
- Controlled Rate Freezer (CRF)

##### 1.2 소모품

- 동결용바이알 (NUNC, 368632)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)
- 스크레퍼

##### 1.3 시약

- TeSR-E8 배양액
  - ※ TeSR-E8 배양액 제조법 (SOP#102) 참조

- 0.5M EDTA, pH 8.0 (Gibco, AM9260G)
- 동결액 STEM-CELLBANKER GMP Grade (amsbio, cat 11897) 또는 mFreSR (Stem Cell Technol, #05854, #05855)

※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 국가줄기세포은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임

※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 인간 전분화능줄기세포 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주되어 4°C 냉장고에 보관중인 TeSR-E8 배양액은 사용 전 37°C 항온수조에 넣어 30분 간 정치하여 가온함
  - ② 가온이 완료된 TeSR-E8 배양액은 튜브표면을 70% 알코올로 세척한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용
- ※ 항온수조안에 멸균수가 담긴 멸균 비커를 넣어 해동 시 사용함.

### 2.2. Cell dissociation 용액의 준비

- ① 0.5 mM EDTA, pH8.0
  - 10  $\mu$ l의 0.5 M EDTA 용액을 DPBS 10 ml으로 희석하여 최종 농도 0.5 mM의 EDTA 준비
  - 35mm 배양접시 기준 1 ml 사용

## 3. 시험 과정

- ① 동결하고자 하는 적절한 개수의 동결바이얼을 준비하여 관련 정보를 기입

세포명  
계대 수  
YYYYMMDD  
동결한 실험자 이름

- ② 이산화탄소배양기에서 배양중인 35 mm 배양접시를 생물안전작업대 안으로 옮김
- ③ 실체현미경을 이용해 콜로니를 관찰하며 P1000 마이크로피펫으로 배양액 제거
- ④ P1000 마이크로피펫으로 1X DPBS 1 ml를 첨가하고 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 부착된 세포의 표면을 세척 후 1X DPBS 제거
- ⑤ 세포를 배양중인 xeno-free matrix에 맞춰 cell dissociation 용액을 첨가 한 후 이산화탄소배양기에 정치
  - 0.5 mM EDTA : 37°C 5분

- ⑥ 정치 후 P1000 마이크로피펫으로 cell dissociation 용액을 제거하고, 1 ml의 TeSR-E8 배양액을 배양접시에 첨가한 후 손으로 전후좌우로 조심스럽게 흔들어 세척하고 배양액 제거
- ⑦ 세척 후 TeSR-E8 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 1 ml 첨가한 후 실체현미경으로 관찰하면서 스크레퍼를 이용하여 접시 표면을 긁어 세포를 배양접시에서 분리
- ⑧ 배양접시에서 떨어진 세포를 P1000 마이크로피펫으로 xeno-free 인간 전분화능줄기세포 배양액과 함께 15 ml 원심분리용 튜브에 옮김
- ⑨ 생물안전작업대에서 약 3분 간 정치하여 세포 덩어리가 가라앉으면 P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거
- ⑩ 세포가 가라앉은 튜브의 인간 전분화능줄기세포 배양액을 P1000 마이크로피펫으로 최대한 제거하고 1 ml의 동결액을 넣어 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유시킴
- ⑪ P1000 마이크로피펫으로 세포 부유액을 동결바이얼 당 1 ml 씩 모두 옮김
- ⑫ CRF 장치를 이용하여 세포를 일괄적으로 동결 처리
- ⑬ 동결된 세포는 지정된 액체질소탱크에 보관하고 로그북에 저장한 세포의 정보를 기입

## Xeno-free 배양을 위한 인간 전분화능줄기세포 해동

### Thawing of cryopreserved human pluripotent stem cells for xeno-free culture

#### □ 개 요

- 액체질소탱크 내에 보관한 인간 전분화능줄기세포를 해동 후 생존율, 성장 및 전분화능 등의 기본 특성을 소실 없이 유지하기 위하여 최적화된 해동방법을 사용하여 힘

#### 1. 필요한 물품

##### 1.1 장비

- 생물안전작업대 (Labconco, US/34309)
- 이산화탄소배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Forma Scientific, US/3111)
- 원심분리기
- 실체현미경 (Olympus Optical Optical, JP/SZ61TR)
- 항온수조 (Wisebath, WB-11)
- 마이크로피펫 (Micropipette)
  - P1000 (200~1000  $\mu$ l)

##### 1.2 소모품

- 15 ml 원심분리용튜브 (NUNC, 50015)
- 마이크로피펫 팁 P1000 (Axygen, TF-1000-RS)
- 70% 에탄올 (DAE JUNG, 4123-4410)
- 일회용장갑 (Ultratex, UF)
- 파라필름 (American National Can, 54956)

##### 1.3 시약

- TeSR-E8 배양액
  - ※ TeSR-E8 배양액 제조 참조 (SOP#102)



- ※ 본 표준운영지침에 기술된 장비 및 소모품은 은행이 줄기세포 관리 과정에 사용하는 제품임
- ※ 장비 및 소모품은 동일 기능의 다른 제품으로 대체될 수 있으며, 다른 제품으로 대체 시 기능적 동등성에 대한 검증 혹은 다음에 기술된 시험 과정 등의 내용에 변경이 필요할 수 있음

## 2. 시료의 준비 및 보관

### 2.1 TeSR-E8 배양액의 준비

- ① 50 ml 원심분리용 튜브에 분주해 4 °C 냉장고에 보관중인 TeSR-E8 배양액을 70 % 알코올로 소독한 후 생물안전작업대로 옮겨 사용

## 3. 시험 과정

- ① 멸균한 200 ml 비이커에 100 ml의 멸균증류수를 넣고 37°C 항온수조에 30분 간 두어 데운 후 동결세포 바이얼을 스폰지형 튜브고정기에 꽂아 비이커 내 증류수에 넣고 2분 30초 이내에 빠르게 해동함
- ② 바이얼을 항온수조에서 꺼낸 후 바이얼 표면의 물기를 제거한 후, 70% 알코올을 분무한 후 멸균한 킴와이프스를 이용하여 물기 제거
- ③ 해동된 바이얼 내 줄기세포를 포함한 용액은 P1000 마이크로피펫으로 모두 수거하여 5 ml의 TeSR-E8 배양액을 미리 첨가해둔 15 ml 원심분리용 튜브에 넣고 800 rpm으로 5분 간 원심분리
- ④ P1000 마이크로피펫으로 상층액을 제거 후 배양액을 3 ml 첨가하고 가볍게 3회 피펫팅하여 재부유 시킴
- ⑤ 세 개의 35 mm xeno-free 세포 배양접시에 배양액 1 ml를 각각 첨가하고 세포가 표면에 고루 퍼지도록 전후좌우로 3회씩 흔들어 줌 (하나의 동결세포 바이얼을 세 개의 35 mm 배양접시로 나눔)
  - ※ xeno-free 세포 배양 접시의 준비는 SOP#101 참조
  - ※ 해동 시 필요에 따라 세포 부착을 도와주는 ROCKi 인 Y27632를 사용할 수 있음 (최종 농도 10  $\mu$ M)
  - ※ 시약의 준비 (APPENDIX#1) 참조