

전북대학교병원 한국 인체자원은행의 신선 동결조직에 대한 정도관리

박신영¹ · 백현아¹ · 광형중¹ · 홍상현¹
박호성^{1,2} · 장규윤¹ · 문우성¹ · 강명재¹
이동근¹ · 정명자^{1,2}

¹전북대학교 의학전문대학원 병리학교실
²전북대학교병원 한국 인체자원은행

Quality Control Program for Fresh Frozen Tissue and Its Results of Chonbuk National University Hospital National Biobank of Korea

Shin Young Park¹ · Hyun Ah Baek¹ · Hyoung Jong Kwak¹ · Sang Hyun Hong¹
Ho Sung Park^{1,2} · Kyu Yun Jang¹ · Woo Sung Moon¹ · Myoung Jae Kang¹
Dong Geun Lee¹ · Myoung Ja Chung^{1,2}

¹Department of Pathology, Chonbuk National University Medical School; ²Chonbuk National University Hospital National Biobank of Korea, Jeonju, Korea

접 수 : 2009년 7월 7일
게재승인 : 2009년 11월 24일

책임저자 : 정 명 자
우 561-180 전주시 덕진구 금암동 산 2-20
전남의대 병리학교실
전화: 063-270-3072
Fax: 063-270-3135
E-mail: mjchung@chonbuk.ac.kr

*박신영과 백현아는 본 연구에 공동 제 1저자
로 논문완성에 같은 정도의 기여를 하였음.

Background : Molecular tools for tissue profiling generally require collection of fresh frozen tissues (FFT) as sources of high-quality DNA and RNA. Nowadays, researchers carry out large-scale, multi-center studies and they request inter-institutional minimal intrinsic bias, some fundamental similarities, and the same standardized and validated procedures. **Methods :** This study reports standardized quality control procedure for fresh frozen tissue of the National Biobank of Korea. **Results :** The main procedures for quality control for FFT are as follows: records related to sample collection such as labeling of samples, transport temperature, lag time from excision of tissue to freezing, and sample size were reviewed for all fresh frozen samples. The stability of RNA and DNA in fresh frozen tissue was evaluated for 3% of collected samples and purity was assessed (ratio of the absorbance at 260 and 280 nm) as was integrity (agarose gel electrophoresis). Stained hematoxylin and eosin sections were reviewed by a pathologist to confirm the diagnosis and to assess how representative the frozen sample was. **Conclusions :** We introduced that the quality-control criteria for fresh frozen tissue of the NBK. We expect that this study contributes to standardization of collection, storage, and quality control of fresh frozen tissue.

Key Words : Fresh frozen; Tissues; Quality control

사람마다 다른 특성에 따라 질병을 예방하거나 치료하는 맞춤 의학(personalized medicine)은 미래 생명공학 분야에서 가장 큰 주목을 받을 것으로 예측된다. 맞춤의학 연구는 분자 진단, 표적 치료, 맞춤 약물, 정밀 의학 등 의학 분야 전반에 걸쳐 진행되고 있는데, 이 연구에 따라 질병을 예측하고, 고위험군을 색출, 개인별 질병 위험도를 산출하며, 더 나아가 환자 후손의 질병 유형까지도 미리 알아낼 수 있는 예방의학으로의 획기적인 패러다임의 변화가 예견된다. 따라서 미래 의학의 열쇠를 맞춤의학이 쥐고 있는 만큼, 유전체 연구 및 질환 모델을 위한 검체의 확보는 매우 중요하다고 할 수 있다.

인체자원이란 인체로부터 유래한 혈액(혈청), 조직, 세포, DNA 등 환자로 부터 나오는 모든 검체와 이에 대한 임상 정보를 합해서 일컫는 말인데, 맞춤의학 연구에 있어서는 이러한 인체자원을 사용하는 연구가 필수적이라고 할 수 있다. 따라서 인체자원을 수집, 보관하여 연구용 재료로 공급하는 인체자원은행의 역할

이 강조되고 있으며, 많은 기관에서 인체자원은행을 개설하여 운영하고 있다. 그러나 아직까지 수집 체계나 보관이 표준화되어 있지 않으며, 기관의 상황에 따라 다양한 방법으로 인체자원을 수집하고 있고, 보관 방법 또한 다양하다. 이에 앞으로는 발달된 연구자원 네트워크를 통해 연구자들이 여러 기관의 검체를 모아서 연구를 수행하게 될 가능성이 높는데, 이 경우 검체는 일정 수준 이상의 품질을 유지하고 있어야 하며, 자원은행은 연구자에게 자원의 품질 관련 정보를 제공함으로써 연구자가 적절한 검체를 선택하고 연구 결과를 정확히 해석하는 데 도움을 주어야 한다. 연구자에게 자원의 품질 관련 정보를 제공하기 위해서 자원은행은 검체처리 및 보관과정과 그 과정에서 있었던 특이 사항을 기록하여야 하며, 검체의 적절성 및 안정성에 대한 정도관리를 시행해야 한다.

전북대학교병원의 인체자원은행은 12개 한국 인체자원은행 단위 은행 중 하나로 한국인에게 흔히 발생하는 위암, 간암, 대장

암, 유방암, 폐암 등의 암종을 위주로 혈액 및 조직자원을 수집하고 있다. 한국 인체자원은행은 양질의 인체자원을 수집, 공급하기 위해 표준화된 방법으로 자원을 수집, 보관하고 있는데, 본 연구에서는 조직자원의 수집과 보관단계에서 이루어지고 있는 정도관리 내용을 소개하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구는 자원은행의 정도관리 내용 중 조직 채취 및 처리 단계, 조직 보관 단계, 신선 동결조직의 안정성 및 적절성에 관한 표준 사용지침을 설명하고 전북대학교병원 인체자원은행에서 2008년 9월에서 2009년 3월까지 수집한 신선 동결조직 319예에 대한 정도관리 결과를 분석한 내용을 다루었다.

이 연구에는 대장암 117예, 위암 49예, 유방암 68예, 간암 32예, 폐암 25예, 갑상선암 20예와 기타 8예의 신선 동결조직이 포함되었는데, 자원은행에 수집되는 모든 검체는 채취 전에 환자로부터 검체 기증에 대한 동의를 받고, 검체기증동의서와 유전자검사동의서를 작성한 환자에 한하여 검체를 수집하였다. 신선 동결조직에 관한 정도관리는 3단계로 나뉘어지는데, 첫째는 조직의 채취 및 처리 단계이고 둘째는 보관, 셋째는 보관된 조직의 안정성 및 적절성 관리 단계이다.

조직 채취 및 처리 단계의 정도관리

조직의 채취 및 처리 단계에서는 이와 관련된 내용을 자세히 기록하는 것을 표준 사용지침으로 하고 있다. 이때 기록해야 되는 내용은 혈관 결찰 시간, 장기 적출 시간, 조직 채취 시작 시간, 급속 동결 처리 시작 시간, 저장 시간, 운반 상자의 온도, 조직 처리 방법, 첨가제 사용 유무, 분주된 검체의 수, 담당자 서명, 기타 특이 사항 등이다(Table 1). 또한 이와 관련된 정도관리 는 모든 검체에 대해서 기록이 이루어졌는지를 확인하고, 모든 기록이 완전한 경우에 적합으로 판정한다.

조직 보관 단계의 정도관리

조직 보관 단계에서는 전날 보관한 검체의 5%에서 용기의 상태, 보관 위치, 라벨의 부착 상태를 점검하고 이를 기록하는 것을 표준지침으로 하고 있으며 정도관리에서는 주기적인 점검 후 기록이 완전한지를 검토한다. 이때 기록된 인체자원의 위치와

실제 인체자원의 위치가 일치하는지, 라벨의 부착 상태가 양호한지, 라벨의 육안 확인이 가능하고 바코드 리더를 통해 라벨 확인이 가능한지를 기록하고 이들 기록이 완전할 경우 적합으로 판정한다.

DNA, RNA 안정성 평가의 정도관리

DNA, RNA 안정성 평가는 동결된 조직의 DNA와 RNA가 향후 분자 연구에 적합한 정도의 질을 유지하고 있는지를 평가하기 위함이다. DNA와 RNA의 안정성 평가에 대한 표준지침 평가는 1년에 2회 시행하는 것으로 되어 있으며, 수집된 신선 동결조직 중 3-5%를 무작위로 선정하여 DNA와 RNA를 추출한 후 정량 분석과 완전성 분석을 한다. DNA와 RNA 추출은 인체 자원은행이 소속된 기관 연구실의 프로토콜을 따르거나, 상업용 extraction kit를 사용하는 경우 제조사의 프로토콜을 따른다. 정량 분석 판정은 추출된 DNA와 RNA 검체를 spectrophotometer를 이용하여 260 nm, 280 nm 파장에서 흡수율(A_{260} , A_{280})을 측정 후, A_{260}/A_{280} 비의 측정을 통해 이루어진다. 판정은 A_{260}/A_{280} 비가 1.8 이상에서 2.0 사이일 경우 '우수', 1.6 이상에서 1.8 미만일 경우 '적합', 1.6 미만일 경우 '부적합'으로 판정한다.

완전성의 평가는 DNA의 경우 agarose gel 전기영동에서 뚜렷한 고분자량 밴드가 관찰되는지를 확인하고, 이것이 관찰되면 적합으로 판정한다. RNA의 완전성은 agarose gel 전기영동법과 bioanalyzer를 이용한 RNA integrity number (RIN) 값 측정의 두 가지 방법 중 하나를 선택하여 시행한다. Agarose gel 전기영동법에서는 28s, 18s ribosomal RNA 밴드가 뚜렷하게 관찰되며, 28s와 18s 밴드의 비가 2:1일 때 적합으로 판정한다. Bioanalyzer를 이용한 경우 RIN 값이 7 이상이면 우수, 4 이상 7 미만이면 양호, 그리고 4 미만이면 부적합으로 판정한다.

동결조직 채취부위 적절성 판정의 정도관리

동결조직의 채취부위 적절성 판정은 조직을 종양과 정상으로 나누어서 동결된 조직이 종양과 정상 부위에 어느 정도 적합한지를 조직학적으로 확인하는 단계이다. 이때 적절성 판정은 수집된 동결조직의 모든 예에서 시행되어야 하며, 신선 동결조직을 채취한 부위와 단면을 공유(mirror image)하는 조직으로 동결절편이나 파라핀 블록을 제작하고 이를 이용하여 헤마톡실린-에오진 염색을 한 후 병리의사가 적절성을 판정하는 것을 원칙으로 한다.

Table 1. Record of tissue collection, processing, and storage

Biobank number	Collection				Processing		Storage				Others
	Sample type	Time of arterial ligation	Time of excision by operator	Method of transport	Time of freezing	Method of freezing	Time of storage	Size of aliquots	Number Of vials	Verification of repository	

적절성 판정에 이용되는 평가 항목 및 평가 기준은 종양 조직의 경우 종양의 포함 여부(부정확하거나 포함되어 있지 않으면 부적합), 포함된 종양의 양(50% 미만이면 부적합), 조직의 오염 여부(타 조직으로 오염되지 않으면 우수), 괴사 정도(전체 슬라이드 중 괴사가 50% 이상이면 부적합), 세포 외 점액소의 양(전체 슬라이드 중 점액소의 양이 50% 이상이면 부적합), 간질 내 염증반응, 간질 내 섬유화, 병리 진단지와 진단 일치 여부(불일치 시 부적합) 등이다.

정상 조직의 경우는 종양 세포의 존재 여부(종양 세포 존재 시 부적합), 간질 내 염증 반응, 간질 내 섬유화, 세포 화생(cellular metaplasia), 세포 이형성 여부(이형성 존재 시 부적합)의 항목을 평가한다(Tables 2, 3). 적절성 판정 항목 및 기준은 한국 인체 자원 관리운영지침 표준화연구의 결과보고서를 참조하였다.¹

결 과

전북대학교병원 인체자원은행의 정도관리 현황

전북대학교병원 인체자원은행에서는 상기 기술된 표준 사용 지침에 따라 조직자원에 대한 정도관리를 시행하고 있는데, 그 과정 및 결과를 간략하게 살펴보면 검체수집 과정에는 수집 단계에서 이루어져야 하는 기록을 모두 하는 것을 원칙으로 하고 있다(Table 1). 특히, 지연시간(적출에서 저장까지 걸리는 시간)은 향후 연구자가 실험 후 결과를 해석하는 데 영향을 줄 수 있는 중요한 인자로 정확한 기록이 필요한 부분이다. 조사 결과 지연 시간은 평균 15분이었고, 10분 이내는 70예(21.9%), 20분 이내는 225예(70.5%), 30분 이내는 22예(6.9%), 30분 이상 소요

Table 2. Checklist of fresh frozen tissue sampling accuracy

Biobank number			Date		
Sample type	<input type="checkbox"/> Frozen tissue <input type="checkbox"/> Paraffin-embedded tissue		Pathologic diagnosis		
Sampling accuracy of the tumor tissue	Presence of tumor	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate	Sampling accuracy of the normal	Presence of tumor	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
	Presence of tumor	%		Stromal inflammation	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
	Presence of contamination	<input type="checkbox"/> Yes (%) <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate		Stromal fibrosis	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
	Percent of necrosis	<input type="checkbox"/> Yes (%) <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate		Metaplasia	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
	Percent of ECM	<input type="checkbox"/> Yes (%) <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate		Dysplasia	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
	Others (fibrosis, inflammation)			Presence of contamination	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Indeterminate
				Others	
Decision of sampling accuracy			Pathologist sign		

ECM, extracellular mucin.

Table 3. A standard for judging fresh frozen tissue sampling accuracy

	List	Criteria of decision
Sampling accuracy of the frozen tumor tissue	Percent of tumor	Inadequate: tumor volume < 50%
	Presence of contamination	Inadequate: presence of contamination
	Percent of necrosis	Inadequate: necrosis volume ≥ 50%
	Percent of ECM	Inadequate: ECM ≥ 50%
	Stromal inflammation	Record the percent of stromal inflammation
	Stromal fibrosis	Record the percent of stromal fibrosis
Sampling accuracy of the frozen normal tissue	Presence of tumor	Inadequate: presence of tumor
	Stromal inflammation	Record the percent of stromal inflammation
	Stromal fibrosis	Record the percent of stromal fibrosis
	Cellular metaplasia	Record the percent of metaplasia
	Cellular dysplasia	Inadequate: presence of dysplasia

ECM, extracellular mucin.

된 경우는 2예(0.6%)였으며, 40분 이상 소요된 경우는 없었다.

혈관 결찰시간의 기록은 수술 중 주요 동맥을 결찰한 시간으로 연구자에게 정확히 허혈성 손상에 대한 정보를 제공하기 위해서 기록하는 것으로 되어 있다. 그러나 위, 간의엽절제술(lobectomy), 폐, 갑상샘 수술과 같이 주요 동맥을 가지고 있는 장기의 경우에는 혈관 결찰시간 기록에 어려움이 없으나, 여러 개의 작은 혈관에서 혈액 공급을 받는 대장, 유방, 간의 췌기 절제(wedge resection)의 경우에는 혈관 결찰시간의 기록에 어려움이 있고, 이에 대한 정의 및 합의도 아직 이루어지지 않은 상태이다. 본 연구기간에 전북대학교병원 인체자원은행의 혈관 결찰시간 기록은 이루어지지 않았으며, 현재는 주요 동맥 결찰에 대한 정보를 얻을 수 있는 위, 간의엽절제술(lobectomy), 폐, 갑상샘 수술의 경우에 한하여 혈관 결찰시간을 기록하고 있다.

채취 과정을 살펴보면 수술실에서 적출된 검체는 아이스박스에 담겨 육안검색실로 옮겨지는데, 이때 아이스박스에는 미리 얼음을 넣어두어 박스 내 온도가 4°C를 유지하도록 한다. 병리 의사는 검체를 육안검색한 후 진단에 영향을 미치지 않는 범위에서 종양 조직과 정상 조직을 채취, 자원은행 직원에게 준다. 그러면 자원은행 직원은 조직을 0.2 cm³ (한 변의 길이, 6 mm) 크기로 각각 5개씩 잘라 미리 냉각된 이소펜탄(isopentane)을 넣어둔 용기에 넣어 액체 질소로 급속 동결시키고, 바코드(barcode)로 라벨 후 질소 탱크에 저장한다.

신선 동결조직의 DNA, RNA 안정성 평가를 위해 DNA 추출은 신선 동결조직을 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣은 후 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였고, RNA의 추출은 RNeasy protect mini kit (QIAGEN)를 사용하였다. 안정성 평가는 수집된 검체의 약 3% (9예)에서 시행되었는데, 검사에 이용된 검체는 암종 조직, 즉 대장암 4예, 위암 3예, 폐암 1예, 유방암 1예였다. 또 추출된 DNA와 RNA에서 정량 분석을 위해 자동화 장비인 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 A_{260}/A_{280} 비를 측정하였다. DNA 정량 분석의 경우 9예 모두 A_{260}/A_{280} 비가 1.8 이상으로 우수 판정을 받았고, RNA의 경우 8예에서 우수, 1예에서 적합 판정을 받았다(Fig. 1A). 완전성 분석은 DNA의 agarose gel 전기영동에서 9예 모두 뚜렷한 고분자량 밴드가 관찰되어 완전성에서 적합 판정을 받았다(Fig. 1B). RNA의 agarose gel 전기영동에서는 9예에서 모두 28s와 18s ribosomal RNA 밴드가 관찰되었으나, 28s와 18s의 비는 6예에서 약 2:1로 관찰되었고, 3예에서는 28s와 18s 밴드의 크기가 비슷하여 1:1에 가까웠다(Fig. 1C). 또한 부적합 판정을 받은 3예는 동일 번호의 다른 vial에서 재검을 시행한 결과, 적합 판정을 받았다.

신선 동결조직의 채취부위 적절성 판정 결과는 종양 조직의 경우 88.3%에서 적합 판정을 받았고, 종양이 50% 미만, 괴사가 50% 이상, 세포 외 점액소의 양이 50% 이상으로 부적합 판정을 받은 것이 각각 9.0%, 1.2%, 1.2%였다(Fig. 2). 그리고 정상 조직에서 부적합 판정을 받은 예는 없었다.

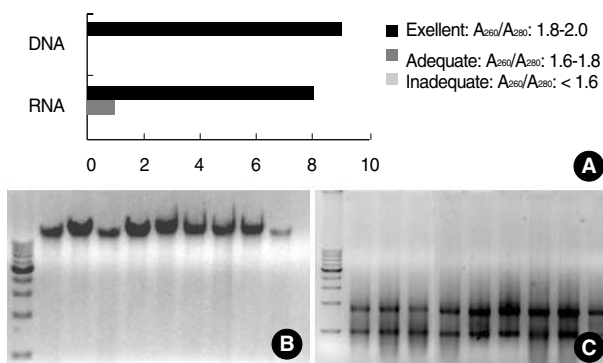


Fig. 1. Purity and integrity of fresh frozen specimen. (A) Purity of DNA and RNA according to the ratio of the absorbances at 260 and 280 nm. All DNA samples are judged to be excellent. For RNA, 8 cases are excellent and 1 case is adequate. (B,C) Analysis of DNA and RNA integrity in fresh frozen samples using agarose gel electrophoresis. DNA, clear high molecular bands are observed (B). RNA, 28S and 18S ribosomal RNA bands are shown (C).

고 찰

전북대학교병원 인체자원은행에서는 암 환자의 조직과 혈액을 환자의 임상병리학적 자료정보와 함께 수집, 보관하고 있으며 혈액은 혈장, 혈청, 연막으로 수집하고 조직자원은 신선 동결조직과 파라핀포매 조직으로 나누어 보관, 관리하고 있다. 본 연구는 한국 인체자원은행의 조직자원에 대한 정도관리 표준 사용지침을 알리고, 전북대학교병원 인체자원은행에서 2008년 9월부터 2009년 3월까지 수집한 신선 동결조직 319예의 정도관리 결과를 분석하고자 시행되었다.

조직의 채취 및 처리 단계의 정도관리는 비교적 자세한 기록을 요구하고 있는데, 이는 향후 연구자가 검체를 선택하거나 연구 결과를 평가할 때 검체의 수집 과정에 있어서 발생하는 영향을 파악하고 정확한 연구 결과를 도출하기 위해 필요한 중요한 사항이다. 따라서 조직의 채취 및 처리 단계의 기록은 완전하게 이루어져야 하며, 이상이 있었던 내용은 반드시 연구자에게 알려야 한다. 지연시간(검체가 수술로 적출된 후 동결되기까지 걸리는 시간)은 Tuba Frost의 표준 사용지침에는 30분 이내로, MD Anderson Cancer Center의 지침서에는 10분 이내로 되어 있다.^{2,3} 하지만 RNA의 파괴와 관련된 검체의 동결에 걸리는 시간에 대한 기준은 명확하지 않은 실정이다. Dash 등⁴은 실온에서 1시간의 지연 시간이 있었던 조직에서 9,000개의 유전자 중 0.6% 이내에서 변화가 관찰된다고 하였다. 또한 Micke 등⁵은 편도 조직을 상온에서 16시간 방치하여도 RNA의 의미있는 파괴는 관찰되지 않았다고 보고하였다.

본원 인체자원은행의 표준 사용지침에는 장기 적출 후 동결까지 걸리는 시간이 30분 이내인데, 이번 조사 결과 지연 시간은 평균 15분이었고, 99.4%에서 30분 이내에 검체 처리가 완료되

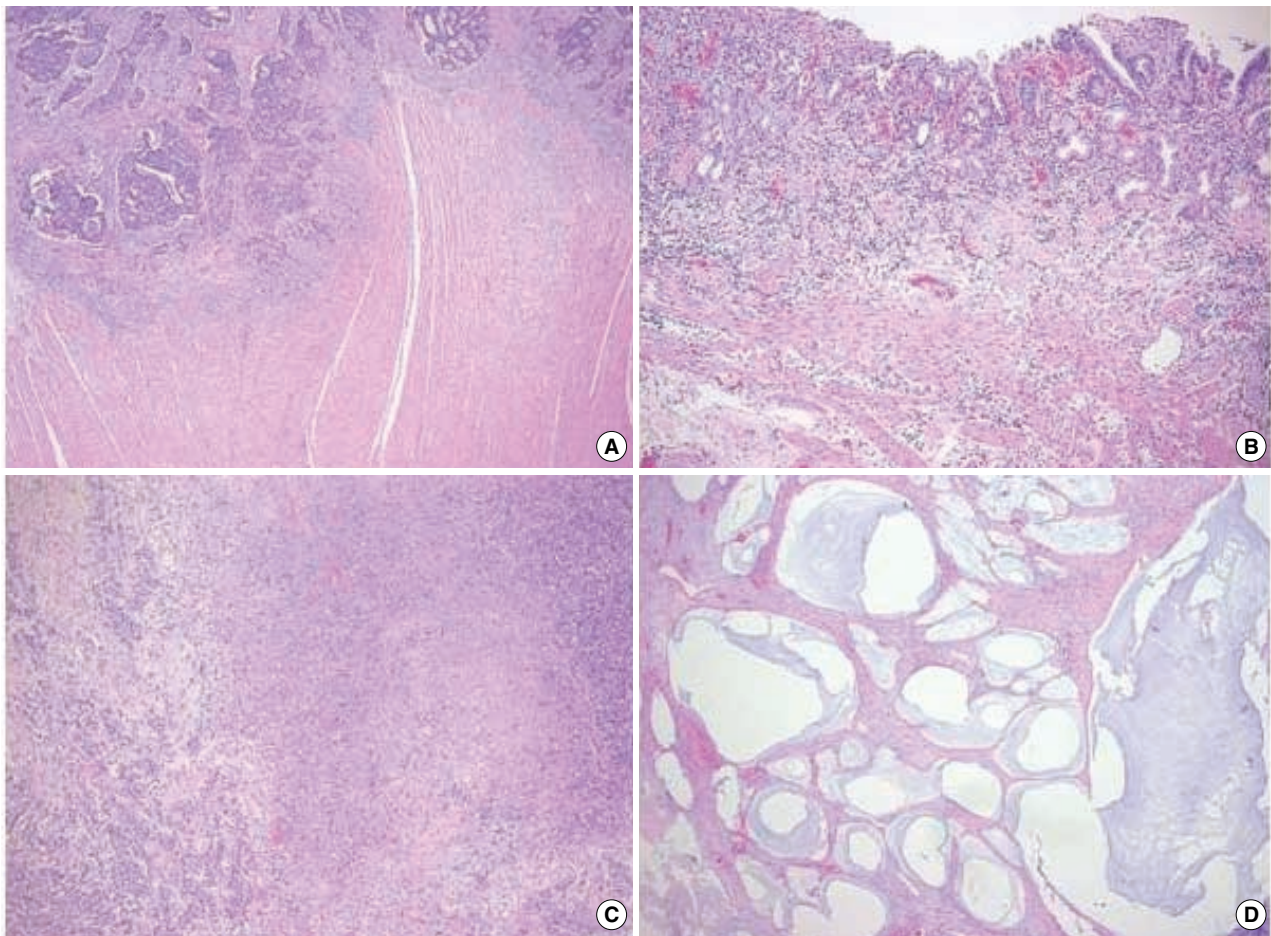


Fig. 2. An example of inadequate tissue sampling. Samples are less than 50% tumor components including an excessive portion of muscle (A) or submucosa (B). The samples are inadequate because more than 50% is occupied by necrosis (C) or mucin material (D).

었다. 그리고 검체의 수집 과정의 기록은 완전하였다. 이렇듯 비교적 짧은 시간 안에 검체처리가 이루어질 수 있었던 이유는 병원 OCS 프로그램을 통해 당일 수술 환자 중 자원은행에 검체 의뢰가 결정된 환자를 미리 확인하고 준비한 점과 수술실에서 검체 적출 10분 전에 자원은행으로 연락해 종양 적출 전에 자원은행 직원이 수술실에 대기하고 있었던 점 때문인 것으로 생각된다.

DNA와 RNA, 단백질을 추출하기 위해 지금까지 알려진 가장 좋은 검체처리 방법은 검체를 급속 동결시켜 -180°C 에서 보관하는 것이다. 본 인체자원은행에서는 조직을 0.2 cm^3 크기로 급속 동결시켜 질소 탱크(-180°C)에 보관하고 있다. 특히 RNA는 불안정한 생체 분자로 내부 또는 외부의 핵산 분해효소와 열, pH 등에 의해 쉽게 파괴되며, 그로 인해 유전자 발현이 영향을 받게 된다.^{6,7} 현재 검체의 채취, 동결에 걸리는 시간, 저장 방법, 저장 기간 등이 RNA와 DNA의 안정성과 관련이 있으며, 조직 검체는 급속 동결시켜 -140°C 이하로 보관하는 것이 가장 이상적인 방법으로 알려져 있다.^{5,8} 특히 영하 80°C 에서 보관하더라도 세포 대사가 완전히 차단되지 않는다고 알려져 있으며, 반복되는 동결

과 해동은 검체의 질을 저하시키기 때문에 피해야 된다.⁹

채취된 신선 동결조직의 정도관리는 DNA와 RNA의 안정성과 조직의 적절성 판정으로 나뉜다. 정도관리 검체의 양은 Tuba Frost에 따르면 첫해에는 검체의 2%에서 시행하고 특별한 문제가 없으면 다음 해에는 새롭게 수집된 검체의 1%에서 정도관리를 할 것을 제안하고 있다.² 본원에서는 인체자원 수집 첫해에 동결 조직의 DNA와 RNA 안정성에 대한 정도관리를 수집된 검체의 3%에서 시행하였다. A_{260}/A_{280} 비가 낮을수록 단백질에 의한 오염이 높은 것으로 평가되는데 이번 정도관리에서는 DNA와 RNA의 정량 검사의 경우 모두 적합 판정을 받았다. DNA의 완전성 평가는 전기영동법을 이용하였고 모두 적합 판정을 받았다. DNA의 완전성을 평가하는 방법에는 전기영동법 외에 Southern analysis, gene-specific polymerase chain reaction (PCR), multiple gene-specific PCR, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR 등이 있다.¹⁰

전기영동법으로 DNA의 분절화(fragmentation) 관찰은 일반적으로 사용되는 DNA 완전성 평가 방법이며 다른 방법에 비해 비용이 저렴하다는 장점이 있다. 그러나 교차 결합이나 nick 등

의 PCR과 연관된 정보들은 알 수 없다는 단점이 있다.¹⁰ 분자 진단에 있어서는 예후적 DNA marker의 규명 등에 PCR이 널리 쓰이고 있는데, PCR에 부적합한 검체에 의한 연구 실패와 검체의 고갈을 줄이기 위해, 채취된 검체의 DNA가 PCR에 적합한가에 대한 정보를 RAPD-PCR 등의 검사를 통해 알아볼 수도 있다.

또한 RNA의 완전성을 평가하는 방법에는 agarose gel 전기영동 방법과 Bioanalyzer를 이용하여 RIN을 측정하는 방법이 있다. RIN의 측정은 capillary electrophoresis (Bioanalyzer)를 통해 이루어지며, RNA 완전성이 1-10까지 숫자로 표시되어 RNA 완전성을 평가하는 객관적인 방법으로 평가되고 있으나, 이에 높은 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다. 본 정도관리에서는 agarose gel 전기영동을 이용하였는데 모든 예에서 28S와 18S 밴드가 잘 관찰되었고, 9예 중 6예에서는 28s와 18s 밴드의 비가 약 2:1이었으나, 3예에서는 28s와 18s 밴드의 크기가 서로 비슷하여 그 비가 1:1정도로 RNA 완전성에서 부적합으로 판정하였다. 그러나 부적합 판정을 받은 3예에 대해 동일 번호의 다른 vial에서 재검을 시행한 결과 적합 판정을 받아 검체 자체의 문제보다는 실험자의 경험 부족에 의한 오류로 판정되었다.

이전 연구에서는 각 장기 별로 rRNA 비와 RIN 값의 편차가 큼이 보고되었는데,^{7,11} RNA 완전성 평가에서 28s와 18s 밴드의 비의 경우 장기 별로 1.2에서 1.95까지 다양한 결과를 보였으며, RNA 완전성은 간이나 심장 등에 비해 위장관계 조직에서 낮은 값을 보였다. 이러한 차이에 대해서는 조직이 단단한지 여부, 지방 조직의 함유 여부, RNase 효소의 활성화 차이 등이 관련되어 있다고 설명하고 있다.¹¹ Palmar와 Prediger⁷는 rRNA의 비가 낮더라도 여러 연구에 사용될 수 있으며, rRNA비가 1.0보다 클 때 대부분의 엄격한 연구에 적절하게 사용 가능하다고 주장하였다. Dumur 등¹²은 microarray 유전자 발현 분석에 관련된 연구를 위해서는 rRNA 비가 1.4 이상인 경우를 적합한 검체로 결정하였다.

신선 동결조직의 채취부위 적절성 판정은 채취된 모든 예에서 이루어지는데, 동결조직은 주로 RNA와 DNA, 단백질 추출에 이용되므로 정상이나 종양에서 채취된 조직이 채취부위의 특징을 잘 반영하는지, 오염은 없는지 등 동결된 검체의 적절성에 대한 평가를 검체 이용 전에 반드시 시행하여야 한다. 이에 대한 평가 방법은 신선 동결조직을 채취한 후, 채취한 조직과 인접하는 면의 조직(mirror image)을 파라핀으로 포매하여 슬라이드로 만들고, 광학현미경으로 관찰하여 적절성을 평가한다. 본 정도관리에서 신선 동결조직의 적절성 판정 결과 종양 조직의 경우 88.3%에서 적합 판정을 받았고 종양이 50% 미만, 괴사가 50% 이상, 세포 외 점액소의 양이 50% 이상으로 부적합 판정을 받은 것이 각각 9.0%, 1.2%, 1.2%였다. 그러나 정상 조직에서 부적합 판정을 받은 예는 없었다.

또한 종양의 양이 50% 미만으로 부적합 판정을 받은 예의 대부분은 위장관 종양으로 종양이 점막에만 국한되어 점막하층이 많이 채취된 경우나 진행성 종양에서 근층의 채취가 많이 되어

상대적으로 종양의 양이 적어진 경우가 대부분이었다. 이는 검체 채취 초기에 발생한 것으로 숙련된 육안검색을 통해 개선이 가능할 것으로 생각된다. 또한 종양의 가장자리에서 조직을 채취함으로써 종양 중심의 경화성 또는 괴사 부분을 피할 수 있다고 생각할 수 있다. 그러나 채취된 조직에 종양 주변의 비종양성 간질 성분이 많이 포함되어 부적합 판정을 받을 위험성이 있으므로 조심스러운 검체채취가 요구된다. 그리고 채취된 검체에 포함된 종양이 적거나 다른 조직에 의한 오염, 괴사, 세포 외 점액소의 양이 많아 부적합 판정을 받은 조직일지라도 laser capture microdissection 등의 방법을 사용하여 연구자가 선택적으로 종양 세포를 얻을 수 있다. 따라서 연구자와 검체채취의 판정 결과를 상의하여 분량을 할 수 있으므로 슬라이드 판독 시 정확하고 자세한 기술을 통해 연구자에 도움이 되도록 해야 한다.

또한 이번 정도관리를 수행하면서 동결조직의 적절성에 관한 판정방법을 수정할 필요가 있다고 생각하였다. 신선 동결조직의 적절성 판정과정에서 한 vial에 수집되는 동결조직은 한 면의 길이가 5-6 mm이며 파라핀 절편은 2 cm 정도로 하나의 파라핀 절편에는 2-3개 vial에 해당되는 부위를 포함하게 된다. 하지만 각 vial에 있는 동결조직에 해당하는 파라핀 절편 부위가 확인되지 않아 지금까지는 각 vial에 있는 동결조직의 적절성 판정이 정확하게 이루어지지 않았으므로, 각 vial의 적절성 판정을 위해 각 vial에 있는 조직에 대응하는 파라핀 절편의 부위를 확인할 수 있도록 세분화된 방법으로 검체를 처리할 필요가 있었다. 따라서 파라핀 블록용 조직의 한쪽 끝 단면에 잉크를 칠한 뒤, 잉크가 칠해진 부분에 해당하는 동결조직 부위를 vial 1번으로 라

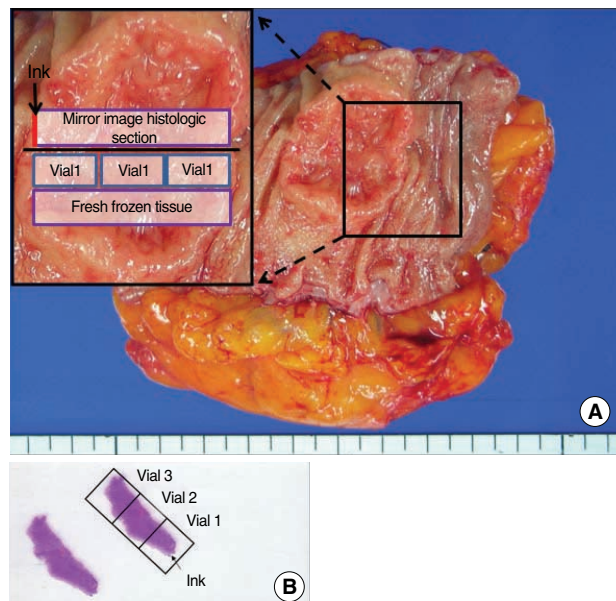


Fig. 3. (A) After sampling, mirror image tissues are obtained for the paraffin block section. (B) A hematoxylin-eosin stained section of a tumor specimen. Tumor tissue sections are cut into 5 mm slices in a regular sequence starting from the side of smeared with ink.

벨하고 연속적으로 번호를 부여하는 방법을 도입하여 각 vial에 있는 동결조직의 적절성을 정확히 판정할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 3).

한편 검체의 품질에 대한 신뢰는 인체자원의 분량을 늘리고 의학연구 발전에 기여하게 될 것으로 생각된다. 따라서 검체의 수집 및 보관 단계를 자세히 기술하고 이 과정 중에 발생한 특이 사항을 기록하는 것은 향후 연구 결과를 해석하는 데 중요한 기준이 되는 명백한 사실이다. 양질의 자원 수집을 위하여 전북 대학교병원 인체자원은행에서는 몇 가지 필수적인 정도관리를 시행하고 있으며, 채취 단계에서는 지연 시간, 동결 방법, 검체 보관 조건, 검체의 크기 등의 자세한 기록을 하고 있다. 또한 검체의 안정성 평가를 위해 채취된 동결조직의 3%에서 DNA와 RNA의 농도(A_{260}/A_{280} 비)와 완전성 분석(agarose gel 전기영동)을 시행하고 있으며, 수집된 동결조직의 적절성 판정을 위해서는 수집된 전체 검체에 대해 동결조직을 채취한 부위와 단면을 공유(mirror image)하는 조직으로 파라핀 블록을 제작하고, 이를 이용하여 헤마톡실린-에오진 염색을 한 후 적절성을 판정하고 있다.

참고문헌

1. Choi C. Development of standard operation manual for national biobank of Korea. Report No. 2008-E00353-00. Seoul: Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2008.
2. Mager SR, Oomen MH, Morente MM, *et al.* Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer* 2007; 43: 828-34.
3. Mishra A, Pandey A, Shaw R. Initiating tumor banking for translational research: MD Anderson and Liverpool experience. *Indian J Cancer* 2007; 44: 17-24.
4. Dash A, Maine IP, Varambally S, Shen R, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Changes in differential gene expression because of warm ischemia time of radical prostatectomy specimens. *Am J Pathol* 2002; 161: 1743-8.
5. Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, *et al.* Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest* 2006; 86: 202-11.
6. Muyal JP, Muyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol* 2009; 4: 9.
7. Palmar M, Prediger E. Assessing RNA quality. Austin: Applied Biosystems; 2003 [cited 2004 Jan 1]. Available from: <http://www.ambion.com/techlib/tn/111/8>.
8. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161: 1961-71.
9. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). Best practices for repositories I: collection, storage, and retrieval of human biological materials for research. *Cell Preserv Technol* 2005; 3: 5-48.
10. Siwoski A, Ishkanian A, Garnis C, Zhang L, Rosin M, Lam WL. An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. *Mod Pathol* 2002; 15: 889-92.
11. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 126-39.
12. Dumur CI, Nasim S, Best AM, *et al.* Evaluation of quality-control criteria for microarray gene expression analysis. *Clin Chem* 2004; 50: 1994-2002.