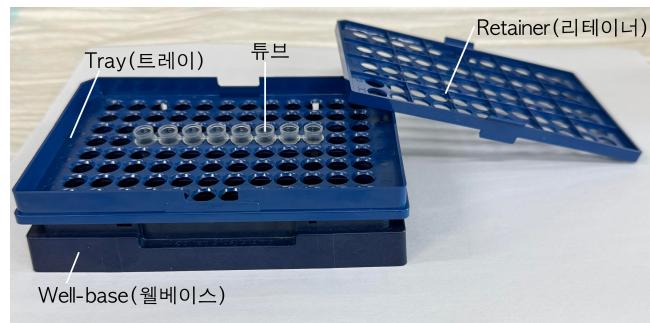


## QuantStudio 1 Real-Time PCR System 주의사항

해당 장비는 정성적 분석(qualitative analysis), 정량적 분석(quantitative analysis), 복합 분석(multiplex analysis), 원스텝 PCR(one-step PCR) 등 다양한 분석을 수행할 수 있는 고성능 장비입니다. 그러나 장비의 주요 도입 목적은 정량적 분석을 통해 유전자 발현을 확인하는 데 있으며, 따라서 장비 사용은 정량적 PCR(qPCR)로 제한합니다. 다른 용도로 활용하고자 할 경우 반드시 전임 조교와 사전에 협의하여 사용해야 합니다.

1. 고가 장비이므로 사용 전에 충분한 설명을 듣고 실습을 이수합니다. 교육 담당자는 사용자와 최소 3회 이상 같이 실습을 진행합니다.
2. 장비 예약은 QuantStudio1 Real-Time PCR Sysyem 예약 프로그램을 사용하여 예약을 완료합니다. 장비는 하루 최대 5회까지 사용할 수 있습니다.
3. 일반적인 qPCR의 반응 시간은 2시간을 초과하지 않으므로, 각 실험당 반응 시간을 2시간으로 제한합니다. 반응이 완료된 후에는 장비에 최소 30분 이상의 휴식시간을 제공합니다.
4. 장비의 전원을 먼저 키고 부팅이 완료된 후 컴퓨터를 작동시킵니다. 반응의 우선순위는 장비에 있으며, 소프트웨어에서 장비를 인식하지 못할 경우 기기의 전원을 껐다가 다시 켜주세요.
5. 플라스틱 제품(튜브 및 플레이트)은 반드시 Applied Biosystems사의 정품을 사용 합니다(플레이트: 4316813; 4306737; 4326659, 필름: 4360954; 4311971 8-튜브/캡: 4316567; 4323032).
6. 튜브 사용 시에는 96-well base(웰베이스, 남색)와 96-well tray/retainer set(트레이/리테이너, 파란색)를 아래의 지침에 따라 사용합니다.



- 1) 웰베이스와 트레이/리테이너를 결합합니다.
- 2) 트레이/리테이너에서 리테이너를 분리합니다.
- 3) 트레이에 반응할 튜브를 배치하고, PCR 반응액을 첨가합니다.
- 4) 반응물 준비가 완료되면, 튜브를 볼텍스 및 원심분리하고 다시 트레이에 위치시킵니다.
- 5) 트레이만 장비에 로드하고 반응을 시작합니다.

\* 96-well tray/retainer set을 사용하지 않을 경우, 히트커버가 오염됩니다. 또한, 히트커버와 히트블락 간에 유격이 발생하여 오류가 발생할 가능성이 있습니다.

7. 튜브와 플레이트에는 필기구(네임펜, 매직)를 사용하여 직접 마킹하지 않습니다. 또한, 캡과 플레이트 필름은 기기에 넣기 전에 알코올류로 깨끗하게 닦아줍니다. 이를 준수하지 않을 경우 LED 램프 및 히트커버가 오염되어 결과의 편차가 발생합니다.  
\* 이러한 오염은 장비를 분해하여 청소해야 하며, 이 작업은 엔지니어만 수행할 수 있습니다.  
\* 본 장비는 형광염료(SYBR, ROX, TaqMan)를 캡에서 읽어들입니다.

8. 기기 작동전에 샘플을 로드하는 문(drawer)이 확실하게 닫혀있는지 반드시 확인하세요. 장비 인터페이스에 drawer의 개폐여부가 출력되므로 쉽게 확인이 가능합니다.

9. 발생하는 오류는 즉각적으로 전임 조교에게 보고하여 후속 조치가 이루어질 수 있게 합니다.

10. 장비 작동 중 발생한 오류와 실험 결과와의 관계.

**상황 1. 반응 시작 → 심각한 오류 발생 → 반응 중단 → 결과 파일 생성 불가능**

- 이 경우에는 기기가 작동을 멈추며, 결과 파일 생성이 불가능합니다.
- 즉시 전임 조교 또는 담당자에게 보고해야합니다.

**상황 2. 반응 시작 → 실험 진행과 상관없는 오류 → 반응 계속 → 결과 파일 생성**

• 빛을 읽어들이는 과정(detection/collection)의 문제가 아니므로 반응은 계속 진행되며 결과 파일도 생성됩니다. 즉, 이 오류들은 실험 결과에 영향을 주지 않습니다.

• 결과값이 내가 원하는 값이 아니라면, 장비 오류로 인한 문제라고 단정 짓기보다는 아래의 경우를 생각해 보세요.

Q. amplification plot에서 내가 입력한 사이클이 전부 검출되었으며 sigmoid pattern을 보이는가?

A. 아니라면 template 퀄리티 저하, 저품질 taq사용, 또는 반응액 제조 실수 가능성을 시사

Q. melt curve plot은 하나의 피크를 보이는가?

A. 2종 혹은 다종 피크라면 PCR 조건 이상 또는 부정확한 프라이머 디자인, 단일 피크지만 높낮이의 편차가 심할 경우는 파이펫 조작 미숙을 의미

Q. QC summary를 통해 무슨 문제인지 판별이 가능한가?

A. 휴먼에러(파이펫 조작 미숙)인지 필터이상인지 판별이 가능

11. 히트블락은 실험 전후로 확인하여 오염상태를 확인하고 주기적으로 지침에 따라 청소합니다.

\* **히트블락의 오염은 실험편차의 가장 큰 원인입니다. 항상 히트블락을 깨끗하게 유지하세요.**

12. 장비를 옮길때는 반드시 Ship Prep Mode를 작동한 후에 수행하세요(센서 및 램프축 유지).

13. 장비의 기본 점검 및 보정(calibration)은 2년에 한번씩 이루어 집니다. 보정 알림이 발생한 경우와 오염/오류로 인한 보정이 필요한 경우 전임 조교에게 보고합니다.

### **장비의 편차 문제**

일반적으로 qPCR 실험은 3배수(triplicate)로 진행합니다. 간혹, 특정 위치에서 Ct값의 편차가 크다고 불편을 호소하는 경우가 있는데, 아래사항을 확인하여 기기 문제로 판단되면 담당자에게 기기 보정을 요청하세요.

- 1) 같은 template를 사용하여 housekeeping gene을 증폭할 때도 특정 위치에서 편차가 심한가?
- 2) 증상이 같은 연구실 구성원과 다른 실험자들에게도 발생하는가?(두 조건이 모두 해당되어야 함)
- 3) 실험을 6배수(sextuple)로 늘려서 진행해도 편차가 여전히 심한가?