
 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號：NBCT SOP-005
	標題： <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數：第 1.1 版/10 頁
		發布日期：114-12-01

本文件歷次變更紀錄：

版本	制定單位	核可日期	核可者	發布日期
1.0	中央辦公室	110-07-14	衛生福利部	110-07-20
1.1	中央辦公室	114-09-16	衛生福利部	114-12-01

目錄

一、目的.....	2
二、範圍.....	2
三、權責.....	2
四、說明.....	2
五、作業流程	
5.1 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集.....	2
5.2 冷凍組織包埋及切片染色判讀.....	3
5.3 冷凍組織RNA萃取.....	4
5.4 冷凍組織RNA品質檢測(進行水平電泳鑑定).....	7
六、出庫品質標準.....	8
七、參考文獻.....	9
八、附件	
一、冷凍組織RNA水平電泳跑膠圖和O.D值檢測範例.....	10

 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

## 一、目的

「國家級人體生物資料庫整合平台」(下稱整合平台)主要透過雲端整合國內人體生物資料庫,資料、生物檢體及其資訊(下稱整合平台檢體資料),並供全國醫學、臨床、產業及相關醫療生技研究者申請使用。為能夠達成跨機構的合作,需要建立一致性的檢體出庫品質標準和臨床資料內容。為維持檢體的良好品質,使抽取組織 RNA 操作之步驟具有一致性,以利未來進行相關研究,因此訂定此標準作業流程。

## 二、適用範圍

此作業流程適用於從新鮮冷凍組織檢體採集到萃取組織 RNA,完成品質檢測的流程。

## 三、權責

所有加入整合平台之人體生物資料庫,欲將其所收集之人體組織萃取 RNA 時,建議都依此標準作業流程辦理,或是必須達到相同品質及產出量。

## 四、說明

此作業流程可以分為四個階段,全部是採用人工作業


1. 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集
2. 冷凍組織包埋及切片染色判讀
3. 冷凍組織 RNA 萃取
4. 冷凍組織 RNA 品質檢測(進行水平電泳鑑定)

## 五、作業流程

### 5.1 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集

**材料與設備:** 冷凍小管,滅菌過尖頭小鑷子(11cm),解剖刀片,鋁箔紙,液態氮,保溫瓶,抗凍貼紙、-80°C 冰箱或液態氮桶

**步驟:** 在取得個案同意之後,先準備好欲留存組織之冷凍小管,貼上已編號之抗凍貼紙,並先用保溫瓶裝取適量之液態氮。在病理科醫師之指導下,切取病理檢查後剩餘之手術或切片取得之組織檢體,分為腫瘤組織及週

 (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

邊非腫瘤組織，放在鋁箔紙上，立即用解剖刀片切成小塊(大約 5x5x5 mm<sup>3</sup>)，用液態氮迅速冷凍，用尖頭小鑷子，放入冷凍小管(一管可以放很多塊)，保存於-80°C冰箱/液態氮桶。

#### 注意事項:

1. 由於採集新鮮組織檢體有多變數，需要配合實際狀況處理。
2. 須以足夠組織做病理診斷為優先，若剩餘組織不夠，就不留存冷凍組織。
3. 切取之腫瘤組織檢體已經很小時，就不用再切成小塊。
4. 有時開刀開得很晚，無法當日收集，若開刀房人員可以協助先冷藏於 4°C 冰箱(不可以泡福馬林)，可以隔夜再取(要註記隔夜取)，不要放棄這個檢體，新鮮檢體若快速放入冰箱冷藏，即使隔夜再取，大部分組織的 DNA 品質仍可以適用於分子生物實驗。但是用來萃取 RNA 可能就不一定理想。

## 5.2 冷凍組織包埋及切片染色判讀


**設備:** -80°C 冰箱、冷凍切片機、染色機、封片機

#### 耗材:

1. 鋁箔紙模(說明:將鋁箔紙裁切成約 4 公分正方形,利用麥克筆尾端當模型,作成鋁箔紙模)
2. OCT
3. 滅菌過尖頭小鑷子(11cm)
4. 100ml 燒杯
5. 檢體紙盒(10x10 格)(需把內格紙間格抽掉,讓格子空間變成 5 x 5 格,可以放 25 個鋁箔紙模)
6. 1.5ml 微量離心管(eppendorf)
7. 保麗龍箱(裝冷凍組織與乾冰)
8. 乾冰

#### 步驟:

1. 要抽取組織 RNA 前，先備好保麗龍箱（已裝好乾冰），以及待取名單，從-80°C 冰箱將裝冷凍小管的 9x9 格檢體紙盒，取出放在保麗龍箱(已裝好乾冰)，一一取出冷凍組織塊放入各個已寫好編號之微量離心管。然後將冷凍小管一一歸位。此動作需有兩人，一人負責核對放入之已編號之微量離心管是否正確。
2. 將已裝有待取名單組織之微量離心管放置 9x9 格檢體紙盒，收在於 -80°C 冰箱待用。

 (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

3. 將鋁箔紙模側邊寫上檢體編號待用。
4. 將已裝有冷凍組織塊之微量離心管的檢體紙盒取出，放入裝有乾冰的保麗龍箱內，保持冷凍待用。
5. 在裝有乾冰的保麗龍箱內，將寫上檢體編號的鋁箔紙模放置於乾冰上，用滅菌過的鑷子從微量小管夾取組織檢體，將其最大面積朝下快速放入鋁箔紙模底部，加入 OCT 將檢體完全覆蓋。全程盡量避免組織解凍。
6. 將使用過鑷子放入裝有清水的燒杯中，之後再一起清洗滅菌。
7. 等 OCT 凍成白色，放入已改成 5x5 格之檢體紙盒。並置於-80°C 冰箱，冷凍半小時後，就可以做冷凍切片。需註記每一格子內的組織編號。
8. 由-80°C 冰箱拿出已冷凍完成之 OCT 包埋的組織檢體，撕開鋁箔紙，放入冷凍切片機中，以 4 $\mu$ m 厚度進行切片(片子須已寫好編號)，室溫風乾至少 2 小時後，進行 H&E 染色。若能風乾四小時或隔夜更佳，以防掉片。
9. 已切完玻片的 OCT 包埋的組織檢體，可用原始有標註編號的鋁箔紙重新包好，並放入已改成 5x5 格之檢體紙盒存放。
10. 請病理醫師判讀冷凍切片之腫瘤診斷和百分比，並建檔。


#### 注意事項:

1. 全程皆須注意編號是否一致。
2. OCT 包埋時，若要萃取組織 RNA，因冷凍組織不可以有解凍情形，故 OCT 較不易與冷凍組織密切接合，會比較難做冷凍切片。且做過冷凍切片的冷凍組織，其 RNA 也較容易降解(degrade)，因此要萃取組織 RNA，最好是選擇已有因萃取組織 DNA 而做過冷凍組織切片判讀的個案，才不須再做冷凍切片。

### 5.3 冷凍組織 RNA 萃取

#### 設備:

1. 桌上型微量高速冷凍離心機(ependorf refrigerated Microcentrifuge 5415 R 或同級產品)
2. 陶珠型組織均質機( MagNA Lyser instrument )
3. 超微量分光光度計( Thermo Nanodrop 2000 或同級產品)
4. -80°C 冰箱
5. 純水系統(Milli-Q® Integral)
6. 微量吸管(pipetman)( 1,000ul、200ul、10ul、2ul)
7. 化學排煙櫃(chemical hood)

 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

**試劑:**


1. TRIzol™ Reagent (PRO TECH Cat no.15596018)
2. 氯仿(chloroform)
3. 100%異丙醇(100% isopropanol)
4. 75%乙醇(75% EtOH)
5. 滅過菌的二次水(ddH<sub>2</sub>O)簡稱二次水(ddH<sub>2</sub>O)

**耗材:**

1. 1.5ml 微量離心管(Eppendorf)
2. 陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)
3. 乾冰
4. 保冰桶
5. 保麗龍箱
6. 過濾型試滴管尖頭 filter tip(1,000ul、200ul、10ul、2ul)


**步驟:(全程需在化學排煙櫃裡進行)**

1. 準備 1 管陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)及 2 管 1.5ml 微量離心管(Eppendorf)，分別在蓋子及側邊寫上編號。
2. 用 1,000ul 微量吸管(pipetman)吸取 1 ml Trizol 加入已寫好編號的陶珠型微量離心管中，放置於裝有碎冰的保冰桶裡。
3. 從 -80°C 冰箱取出裝有冷凍組織(已確認腫瘤診斷和百分比)的微量離心管，並放置於裝有乾冰的保麗龍箱內。
4. 冷凍組織不可解凍，迅速倒入裝有 Trizol 陶珠型微量離心管中，Trizol 一定要蓋過組織。上下搖晃，放置於裝有碎冰的保冰桶裡。
5. 將陶珠型微量離心管放入陶珠型組織均質機，以 6,500 rpm 40 秒，打碎組織，最多打到五次。  
注意：如有需進行一次以上的打碎，則每完成一次就要放置在裝有碎冰的保冰桶裡降溫 2-3 分鐘後，再進行下一次。
6. 用 1,000ul 微量吸管吸取陶珠型微量離心管中的全部組織均質液，至第 1 支新的微量離心管，室溫靜置 5 分鐘。
7. 加入 200 ul 氯仿(chloroform)，上下搖晃 15 秒，室溫靜置 2 分鐘。
8. 放入已預冷的桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)中，12,000 xg 離心，15 分鐘。
9. 取上清液並移至第 2 管新的微量離心管中。

 (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

**注意：**上清液只要吸約八成即可，不可吸到下層沉澱物。

10. 加入 500 ul 100%異丙醇(100% isopropanol)，上下倒置均勻，室溫靜置 15 分鐘。
11. 再次放入已預冷的桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)中，12,000 xg，離心 10 分鐘。
12. 倒掉 100%異丙醇，留下片狀沉澱物(pellet)。
13. 再次放入已預冷的桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)中，12,000 xg 離心 30 秒，再用 200ul 微量吸管將殘留的 100% 異丙醇(100% isopropanol)吸乾淨。
14. 加入 1 ml 75%乙醇於 1.5ml 微量離心管。
15. 放入已預冷的桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)，7,500 xg 離心 5 分鐘。
16. 倒掉 75%乙醇，留下片狀沉澱物(pellet)。
17. 放入已預冷的桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)中，7,500 xg 離心 30 秒，再用 200ul 微量吸管將殘留的 75% 乙醇吸乾淨，空氣中乾燥(air dry) 3 - 5 分鐘。
18. 依據片狀沉澱物(pellet)大小加入 2~3 倍體積之滅過菌的二次水(ddH<sub>2</sub>O)回溶片狀沉澱物 3 分鐘後，放在裝有碎冰的保冰桶裡。  
 說明：因每個個案檢體抽取出來的片狀沉澱物(pellet)大小會有所差異，若片狀沉澱物(pellet)小到看不見，請以 10ul 的滅過菌的二次水(ddH<sub>2</sub>O)回溶；若片狀沉澱物(pellet)大小約 1~2mm 厚度，請加入 50-100ul 的滅過菌的二次水(ddH<sub>2</sub>O)回溶。
19. 待片狀沉澱物全部溶解後，輕輕拍 1.5 ml 微量離心管底部，讓管內 RNA 混合均勻。放入桌上型微量高速冷凍離心機(4°C)中，7,500 xg，離心 30 秒後，迅速將 1.5 ml 微量離心管放在裝有碎冰的保冰桶裡，用 2ul 微量吸管吸取 1.2ul，利用超微量分光光度計(Nanodrop)測量 RNA 濃度和 O.D 值: 260/280，260/230。理想的 260/280 值，應介於 1.8-2.0。(如附件一、B 圖)。
20. 將已測完濃度的組織 RNA 檢體，取出約 1µg~2µg 要跑電泳的檢體量分裝到另一管 1.5 ml 微量離心管，放在裝有碎冰的保冰桶裡，置於 4°C 冰箱中待製膠完成後跑電泳(若隔天才能跑電泳則須放置於-20°C 冰箱)。其餘組織 RNA 檢體以 10ug 分裝成數管，按照檢體編號順序放入檢體紙盒(9x9 孔)(紙盒上蓋、側邊註記檢體編號及檢體別)，盡快放於-80°C 冰箱保存。

 (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

#### 5.4 冷凍組織 RNA 品質檢測(進行水平電泳鑑定)

##### 設備:

1. 高感度照膠系統(SYNGENE In Genius 3 或同等級產品)
2. 微波爐
3. 迷你電泳槽 (Mini Gel Migration Through)
4. 微量電子天平(JADEVER SKY300 或同級產品)
5. 桌上型水平震盪器

##### 試劑:

1. UltraPure™ TAE Buffer, 10X (Thermo Cat no.15558042)
2. 瓊脂凝膠粉末 Agarose-Molecular Biology Grade(Invitrogen Cat no.75510-019)
3. 溴化乙錠(EtBr)


##### 耗材:

1. 秤藥紙(12x12 cm)
2. 藥勺
3. 保鮮膜
4. 500ml 滅過菌的三角錐型瓶
5. 1,000ml 滅過菌的血清瓶
6. 量筒(50ml 及 1L)

##### 步驟:

###### 一、製作瓊脂凝膠(1.5% gel)

1. 配製 1X TAE Buffer:以 1L 量筒將 100ml UltraPure™ TAE Buffer(10X)倒入 1L 血清瓶中，再加入 900ml 的二次水(ddH<sub>2</sub>O)，上下搖晃，混合均勻，存放於室溫。
2. 以 50ml 的量筒將 40ml 的 1X TAE Buffer 倒入已滅菌的三角錐型瓶裡。
3. 秤藥紙放置微量電子天平秤中歸零，以藥勺舀取瓊脂凝膠粉末(Agarose) 0.6 g，倒入裝有 1X TAE Buffer 的三角錐型瓶混合。
4. 將三角錐型瓶蓋上保鮮膜，以 filter tip 將保鮮膜戳多個小洞，放進微波爐，微波 30 秒，然後加以搖晃均勻。此步驟需要重覆至瓊脂凝膠粉末(Agarose)完全溶解於 1X TAE Buffer 中，呈現完全透明才行。(至少重覆三次)。
5. 將裝有混合均勻的瓊脂凝膠溶液從微波爐取出，放置桌上型水平震盪器，3-5 分鐘。

 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

6. 用 2ul 微量吸管吸取 2 ul EtBr 加入三角錐型瓶中，混合均勻。
7. 倒入製膠台，約齒梳的一半即可，冷卻 1 小時凝固成瓊脂凝膠(gel)。

## 二、進行水平電泳

1. 將凝固的瓊脂凝膠的放入迷你電泳槽中，並倒入 450ml TAE Buffer (1X)。
2. 將 1.2μg RNA 與 2ul 6X Loading dye 混合，再加入滅過菌的二次水(ddH<sub>2</sub>O)使總體積為 10ul。
3. 用 10ul 微量吸管將上述混和均勻液體全部注入迷你電泳槽中瓊脂凝膠的 well 裡。
4. 以電壓 85 伏特(電流 500 mA)進行水平電泳 35 分鐘
5. 將瓊脂凝膠(gel)從迷你電泳槽中取出，至高感度照膠系統系統確認 18S 與 28S 橫紋條帶。存檔並列印拍照保存 (如附件一、A 圖)。

## 六、出庫品質標準

整合平台出庫之組織 RNA 應提供下列資訊:


1. 腫瘤成分(須經病理醫師判讀確認)
  - 腫瘤組織: 其原始組織檢體之腫瘤成分(tumor %) 以>50%為原則，越高越好。
  - 腫瘤周遭之非腫瘤組織: 需確認無腫瘤細胞污染。

說明:因為每種檢體性質不同，有些難以取得者，可以調降腫瘤成分。另外，若為了研究腫瘤微環境狀態(microenvironment)，申請者也可能對腫瘤成分要求不同，可以配合申請者之要求，來調整腫瘤成分高低。

2. 水平電泳跑膠圖有無 18S 及 28S 兩個 bands 的存在
  - 組織 RNA 有 18S 及 28S 兩個 bands 存在，代表 RNA 品質佳，才合乎出庫條件。

說明: 因為每種檢體性質不同，有些難以取得者，檢體十分寶貴，或是少數申請人的研究方法不會因為 RNA 是否有 18S 及 28S 兩個 bands 而受影響者，還是可以出庫，所以 RNA 品質不夠理想時，也不要丟棄。


3. 組織 RNA 之 optical density (O.D)值也應提供給申請者參考
  - 260/280 比值，理想的檢體，應介於 1.6-2.0 之間
  - 260/230 比值，不重要，可以不用提供

 (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題: <b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁 發布日期: 114-12-01

說明：260/280 比值，建議最好能落在 1.8~2.0 之間，此區間核酸純度高；若比值<1.6 或比值>2.0，則建議重新萃取組織 RNA。

## 七、參考文獻:

1. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem. 1987;162:156-159.
2. Sambrook, J., Fritsch, R. F., and Maniatis, R. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
3. RNA Extraction Procedure:  
<http://www.bio-protech.com.tw/upload/20181115042308.pdf>

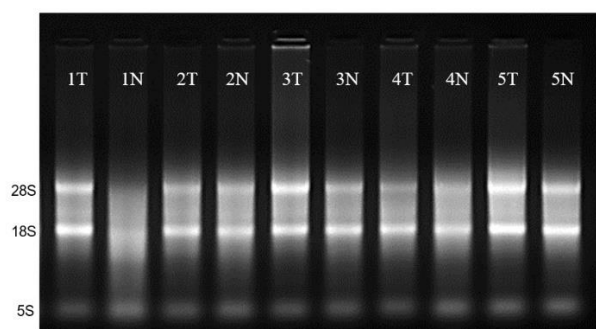
 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	<b>國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序</b>	編號: NBCT SOP-005
	標題:	版本/總頁數: 第 1.1 版/10 頁
	<b>整合平台新鮮冷凍組織檢體 RNA 萃取流程</b>	發布日期: 114-12-01

## 八、附件

附件一、冷凍組織 RNA 水平電泳跑膠圖和 O.D 值檢測範例

### A 圖

冷凍組織RNA品質檢測 水平電泳跑膠圖



### B 圖

冷凍組織RNA品質檢測 O.D. 值

	ng/uL	260/280	260/230	Volume (ul)	Yield(ug)	備註	QC
1 T	1812.3	1.98	1.87	100	181.2		X
1 N	1997.4	2.01	2.06	130	259.7	無18S	X
2 T	1917.8	2	1.98	120	230.1		5.4
2 N	1805.1	1.99	1.46	150	270.8		3.6
3 T	2136.1	1.97	1.97	120	256.3		7.7
3 N	1804	1.99	1.87	120	216.5		5.4
4 T	1368.8	1.93	2.24	70	95.8	28S弱	X
4 N	2419.4	2.02	1.93	150	362.9		X
5 T	2198.7	1.99	1.97	170	373.8		7.5
5 N	1782.1	2	1.94	120	213.9		4.3

說明:

- 1N 在跑膠圖沒有 18S, 28S bands, 但 O.D. 值很好, 因此 O.D. 值在 RNA 較不可靠。
- 其他檢體都有 18S, 28S 兩條 bands, 已可符合一般 RNA 的研究需求。
- 2N 的 260/230 值雖然較差, 但跑膠圖理想, 顯示 260/230 不重要。
- 現在也有檢測 RIN 值 (RNA Integrity Index) 來做 QC (Quality check), 那是為了進階的基因檢測需求。Human tissue RNA 能夠 RIN=5 就很好了, 4 應該也可以用。