

---

# 인간 장 오가노이드 RNA 추출 및 PCR 분석 시험법

---

2025.10.31


주관연구개발기관 : 가톨릭대학교 산학협력단  
공동연구개발기관 : 연세대학교 산학협력단  
고려대학교 산학협력단  
(주) 입셀  
(주) 지놈앤컴퍼니  
(주) 세라트젠  
(주) 애임스바이오사이언스

스마트임상시험신기술개발연구사업단

- 본 지침서/안내서는 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상시험신기술개발연구사업단의 지원을 받아 수행한 「첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」 (과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었습니다.
- 본 지침서/안내서는 보건복지부, 식품의약품안전처 등 관련 기관의 제도 및 정책과 상이할 수 있으며, 어떠한 법적 구속력 및 책임을 가지지 않으므로 참고용으로만 활용하시기 바랍니다.
- 본 지침서/안내서의 내용은 현재의 과학적·기술적 근거 등을 토대로 작성되었으며, 향후 과학기술의 발전 및 관련 법규정의 개정 및 구체적인 사실관계의 변화 등에 따라 내용이 달라질 수 있습니다.
- 본 저작물에 대한 권한은 (주) 세라트젠)에 있으며, 무단으로 지침서의 내용을 수정하여 재배포하는 것을 금합니다. 또한, 본 지침서의 전부 또는 일부를 인용·활용할 경우 반드시 출처를 명시하여야 합니다.






 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> Human intestine organoid RNA extraction and PCR analysis protocol	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

**인간 장 오가노이드 RNA 추출 및 PCR 분석  
시험법**  
**Human intestine organoid  
RNA extraction and PCR analysis protocol**



	직책	서명
작성자		<i>Sign</i> <i>Date</i>
검토자		<i>Sign</i> <i>Date</i>


 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

승인자		<i>Sign</i>  <i>Date</i>
-----	--	--------------------------------

관리본

비관리본




 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

### 개정 이력

Version	개정 내용	시행일
00	최초 제정	



 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

**1 목적**

**1.1** 본 평가법은 성체줄기세포 유래에서 제작된 인간 장 오가노이드의 RNA 를 추출하고 유전자 발현을 확인하는 PCR 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**2 적용범위**

**2.1** 본 평가법은 인간 장 오가노이드를 처리하고 분석하는데 적용된다.

**3 책임과 권한**

**3.1 QC 책임자**

**3.1.1** SOP 가 올바르게 작성되었는지 검토하고, 해당 문서의 절차에 따라 시험이 진행될 수 있도록 관리하여야 한다.

**3.2 QC 담당자**

**3.2.1** 본 절차에 따라 시험을 수행할 수 있도록 한다.

**4 용어의 정의**


**4.1** 해당 사항 없음

**5 참고문헌**

**5.1** 해당 사항 없음

**6 절차**

**6.1** 기기 및 시약

 <b>표준 작업 절차서</b>  <b>인간 장 오가노이드</b>  <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b>  <b>Human intestine organoid</b>  <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	문서 번호
	개정 번호 00 ver.
	시행 일자


### 6.1.1 실험 기기

제품	Cat. No.	용도
High-Performance Pro-microcentrifuge Set, "MaXpin C-12mt" Max. 13,50	DH.WCF01350	Column 을 센트리 돌리는 기기
Multi-Mode Microplate Reader	TECAN Infinite 200 PRO	RNA 농도 측정 기기
Milli-Q® Direct Water Purification System	ZR0Q016WW	삼차 증류수
MiniAmp plus thermal cycler	A37835	cDNA 합성 기기
QuantStudio 3 Real-Time PCR System	A28566	qPCR 기기

### 6.1.2 시약 및 표준품

#### - RNA kit

제품	Cat. No.	규격	보관
RNA prep kit (RNeasy Mini Kit 250 prep) 1. RNeasy Mini Spin Columns (pink) 2. Collection Tubes (1.5 ml) 3. Collection Tubes (2 ml) 4. Buffer RLT (Lysis buffer) 5. Buffer RW1 (Wash buffer) 6. Buffer RPE (concentrate, Wash buffer) 7. RNase free water	74106	-	제조일부터 9달 이내로 사용 상온 (15-25°C)
2-Mercaptoethanol (14.3M)	63689-25ML-F	≥99.0%	4°C
Ethanol BioUltra (500ml)	51976	≥99.8%	15-25°C

 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

- cDNA 합성 시약 & qPCR

제품	Cat. No.	규격	보관
dNTP Mixture (2.5 mM)	4030	각 3.2 μmol/ 1.28 ml	-20℃
Recombinant RNase Inhibitor (RRI)	2313A	5,000 U	-20℃
Random Primer (pd (N)6)	3801	80 nmol	-20℃
1. PrimeScript Reverse Transcriptase (RTase) 2. 5X PrimeScript Buffer	2680A	10,000 U	-20℃
5-Pack TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)	ABS-4366073	-	4℃
Absolute qPCR Plate Seals	4311971	-	RT
PCR PLATE	4346907	-	RT


6.1.3 조제 시약

-70% ethanol


조성		조제 및 보관 방법
<b>99.8% Ethanol (BioUltra)</b>	70% (v/v)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 예를 들어, 10ml 70% ethanol이 필요한 경우, 99.8% Ethanol 7 mL + PW 3 mL 배합</li> <li>- <b>용시 조제</b></li> </ul>
Purified water(PW)	30% (v/v)	

**6.2 RNA extraction**

- 6.2.1 용시 조제 시약 RLT solution 과 70% ethanol 을 sample 수에 맞게 준비한다.
- 6.2.2 RNeasy Mini spin column 을 sample 수만큼 준비한다.
- 6.2.3 샘플을 꺼내 배양 미디어만 깔끔히 제거하고 RLT solution 을 넣어준다.
- 6.2.4 RLT 를 넣고 1000p 로 거품이 나지 않도록 유의하며 파이펫팅한다.

	<b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<p style="text-align: center;"> <b>인간 장 오가노이드</b>  <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b>  <b>Human intestine organoid</b>  <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b> </p>		개정 번호 00 ver.
		시행 일자

- 6.2.5 NOTE: Sample 마다 팁을 바꿔준다.
- 6.2.6 각 well 에 70% ethanol 을 넣어준다.
- 6.2.7 RLT 와 ethanol 이 잘 섞이도록 파이펫팅 후 well 에 있는 solution 을 전 부 각 sample 에 해당하는 RNeasy Mini Spin Columns 에 넣고 12,000rpm 30 초 centrifuge 한다.
- 6.2.8 NOTE1: Sample 마다 팁을 바꿔준다.
- 6.2.9 NOTE2: 이후에 진행하는 센트리 과정은 다 같은 12,000rpm 조건에서 진행한다.
- 6.2.10 걸러진 용액을 버리고 RW1 버퍼를 700 ul 넣은 후 centrifuge 30 초 돌린다.
- 6.2.11 걸러진 용액 버리고 RPE 버퍼를 500ul 추가하고 centrifuge 30 초 돌린다.
- 6.2.12 걸러진 용액 버리고 RPE 버퍼를 500ul 다시 추가하고 centrifuge 30 초 돌린다.
- 6.2.13 걸러진 용액 버리고 빈 column 채로 centrifuge 1 분 돌린다.
- 6.2.14 Column 윗 부분을 새로운 collection tube (2ml)로 옮기고 추가로 2 분 Centrifuge 돌린다.
- 6.2.15 NOTE: 돌리는 동안 Collection tube (1.5ml)를 sample 수만큼 준비한다.
- 6.2.16 Collection tube (1.5ml)에 spin column 의 윗부분만 넣고 column 아래 부분은 버려준다.
- 6.2.17 Kit 에 있는 RNase free water 30 ul 넣는다.
- 6.2.18 5 분 동안 상온에서 incubation 후에 2 분 동안 centrifuge 돌린다.
- 6.2.19 centrifuge 후에 collection tube(1.5 ml)에 모인 물을 다시 column membrane 에 넣어주고 2 분 incubation 후 centrifuge 2 분 돌린다.

 <b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>	개정 번호 00 ver.
	시행 일자

6.2.20 센트리가 끝나면 Collection tube(1.5 ml)에 모인 물을 PCR tube 로 옮긴다.

6.2.21 Plate reader 기기로 RNA 양을 측정한다.

### 6.3 cDNA 합성

6.3.1 모든 sample의 RNA 농도를 맞추기 위해 농도 측정 결과를 바탕으로 필요한 RNA양과 물(RNase free water)양을 계산한다.

6.3.2 dNTP 와 Random primer 1:1 로 pre-mix 만들어서 2 ul 씩 넣어준다.

6.3.3 10p 파이펫으로 잘 섞이게 파이펫팅 후 센트리 다운시킨다.

6.3.4 MiniAmp plus thermal cycler 에 넣고 첫번째 합성 프로그램에 맞게 돌린다.

6.3.5 반응을 시키는 동안 2 번째 pre-mix 를 만들어둔다.

6.3.6 첫번째 반응이 끝나서 4°C가 되면 만들어 둔 2 번째 pre-mix 10ul 씩 넣고 섞고 2 번째 반응을 시킨다.


### 6.4 qRT-PCR

6.4.1 Sample cDNA 준비한다.

*NOTE: 얼려져 있다면 얼음위에 rack 두고 천천히 녹인 후 파이펫팅으로 섞고 사용한다.*

6.4.2 96 well PCR plate 에 sample 과 primer 를 어떻게 배치할지 미리 계획한다.

6.4.3 사용할 Primer 를 준비한다.

	<b>표준 작업 절차서</b>	문서 번호
<b>인간 장 오가노이드</b> <b>RNA 추출 및 PCR 분석 시험법</b> <b>Human intestine organoid</b> <b>RNA extraction and PCR analysis protocol</b>		개정 번호 00 ver.
		시행 일자

- 6.4.4 PCR plate 를 얼음 위에 두고 cDNA 를 각 well 벽면에 2 ul 씩 넣는다.
- 6.4.5 Primer pre-mix 를 준비한다.
- 6.4.6 PCR plate 를 180도 돌려서 cDNA와 닿지 않게 반대쪽 벽면에 Primer pre-mix 18ul 씩 넣는다.
- 6.5 centrifuge (1248R)에 PCR plate 넣고 1000rpm 4°C에 30초 정도 돌려 동시에 cDNA와 primer가 섞이도록 센트리 다운시킨다.
- 6.6 qPCR 기계에 넣고 분석을 시작한다.
- 6.7 분석이 끝나면 결과를 확인하여 유전자 발현양을 계산한다.

---

**발행기관**            주식회사 세라트젠  
**발행일**                2025년 10월 31일  
**발행인**                박영섭  
**편집위원장**         민창기  
**편집위원**            한승훈, 박성수, 박영섭, 최지혜  
**감수위원**            분과위원회 위원 중 검토 의견서를 제출한 위원(희망자에 한함)

**문의처**                (우편번호) 서울특별시 마포구 마포대로 137 KPX빌딩 6층  
                              전화번호 : 02-398-5082  
                              이메일 : scrc@konect.or.kr

본 지침서/안내서는 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상시험신기술개발연구사업단의 지원을 받아 수행한 「과제명 첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」(과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었음을 밝힙니다.