

USER
GUIDE

EcoQprep™ Universal RNA Kit

Cat. No. K-3706



BIONEER
Innovation • Value • Discovery

© Copyright 2025 BIONEER Corporation. All rights reserved.

EcoQprep™ Universal RNA Kit

Kit for the extraction of RNA from cultured cells, blood, bacteria,
plant tissue, or animal tissue

사 용 설 명 서

K-3706



Version No.: 0 (2025-06-23)

사용 전, 사용설명서에 있는 모든 내용을 정독하시길 바랍니다.



(주)바이오니아

대전광역시 유성구 테크노2로 71

바이오니아 글로벌센터

Tel: 1588-9788

Email: sales@bioneer.co.kr

www.bioneer.co.kr

사용 목적

EcoQprep™ Universal RNA Kit는 연구용 제품으로 연구 목적으로만 사용할 수 있습니다. 사용자는 국가 및 사용 용도에 따라 권한 취득이 필요할 수 있습니다.

안전경고 및 주의사항

자극적이거나 유해한 물질을 다루는 경우 적절한 보호장비를 착용하시기 바랍니다. 실험복, 보호장갑, 보호안경 등의 사용을 적극 권장합니다. 자세한 정보는 물질안전보건자료 (MSDS)를 확인하시기 바랍니다.

보증 및 책임

모든 바이오니아 제품은 엄격한 품질 관리 공정 아래에서 완제품 시험 과정을 거칩니다. 바이오니아는 보증 기간 (제품표시) 동안 제품의 품질을 보증합니다. 바이오니아는 본 사용설명서에 제시된 사용법과 다른 방법을 사용하여 발생한 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다. 효율적인 시장보고 및 처리를 위하여 고객은 발생한 문제점을 30일 이내에 바이오니아에 상세하게 전달하여야 합니다.

ISO 9001 품질경영시스템 인증

바이오니아에서 생산되는 모든 제품은 제품 개발, 생산에서 품질 보증 및 공급업체 자격에 이르기까지 ISO 9001 규정에 의거하여 엄격한 품질관리 및 검사를 통과한 후 출하된 제품입니다.

특허

EcoQprep™과 키트는 특허 KR10-2015-0089172에 의해 보호됩니다.

상표

EcoQprep™은 바이오니아의 상표입니다.

저작권

Copyright 2025. 바이오니아. 무단전재 및 복제 금지

고지

제품, 서비스, 사양, 설명 등 제공된 모든 정보는 사전 예고 없이 절차에 따라 변경될 수 있습니다.

목차

제품 정보	1
제품 구성	1
보관법	1
제품 사양	2
주의사항.....	2
개요	3
제품 설명	3
원리.....	4
특징 및 장점	5
Magnetic Nano Beads.....	6
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack.....	7
실험 절차	10
RNA 추출 절차.....	10
시료 준비	11
시작 전 준비	12
배양 세포 또는 혈액으로부터 준비.....	13
박테리아 세포로부터 준비	15
동물 조직으로부터 준비.....	16
식물 조직 및 곰팡이로부터 준비	17
자성 입자를 이용한 RNA 추출.....	18
RNA Clean up 절차.....	22

제품 정보

제품 구성

구성품	Cat. No	K-3701 (50 rxn)*	Storage
Magnetic Nanobead-RNA (50 mg/mL)	KB-7031	6 mL x 1 ea	상온 보관 (15-25°C)
RD Buffer	KB-2120	30 mL x 1 ea	
RWMB1 Buffer	KB-3112C	25 mL x 1 ea	
RWB2 Buffer	KB-4023C	15 mL x 1 ea	
WE Buffer	KB-5016	40 mL x 1 ea	
ER Buffer	KB-6037	25 mL x 1 ea	
1.5 ml Tube	KA-1120	50 ea x 1 pack	
One-Page Protocol		1 ea	

* Mini – 50 rxn, Midi – 5 rxn

보관법

본 Kit 및 구성품은 실온(15-25°C)에서 2년 동안 보관할 수 있습니다.

제품 사양

시료 준비 및 RNA 추출 효율

Product specifications of scale

Scale	Mini	Midi
Expected RNA Yield	~ 100 µg	~ 500 µg
Minimum elution volume	50 µL	500 µL
Preparation time	~ 5 min	~ 10 min

Product details by sample type

Sample	Starting amount	RNA yield	Expected purity*
Cultured cells	10 ⁴ -10 ⁸ cells	15-20 µg	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ > 2.0, A ₂₆₀ /A ₂₃₀ > 1.7
Liver	25-50 mg	10-60 µg	
Spleen	100 mg	30-60 µg	
Plant tissues	100 mg	70-80 µg	

* Note: 시료에 따라 표에 제시된 값보다 낮을 수 있습니다.

주의사항

- RD Buffer에는 자극성이 있는 chaotropic salts가 포함되어 있으므로, 취급 시 적절한 실험 안전 수칙을 준수하고 장갑을 착용하는 것을 권장합니다.
- RNA 는 외부에서 유입될 수 있는 RNase 에 의해 쉽게 분해되므로, 모든 실험 과정은 무균 상태이면서 RNase 가 없는 조건에서 수행해야 합니다.
- RNase 가 없는 시약, 피펫 팁 및 튜브를 사용해야 하며, 이를 취급할 때에는 반드시 장갑을 착용한 후, 다루어야 합니다.

개요

제품 설명

EcoQprep™ Universal RNA Kit는 배양 세포, 혈액, 세균, 동물 그리고 식물 조직으로부터 고순도의 Universal RNA를 추출하도록 설계되었습니다. 본 키트는 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack (Cat. No. TM-1012, TM-1021, TM-1031) 및 *ExiPrep*™ 96 Lite (Cat. No. A-5250) 와 함께 Magnetic Nano Beads를 사용하여 Universal RNA를 추출합니다.

EcoQprep™ Universal RNA Kit와 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack을 함께 사용하면 원심분리 없이 추출 시간을 단축하여 사용자 편의성을 크게 향상시킬 수 있습니다. 동일한 원리로 *ExiPrep*™ 96 Lite는 최대 96개의 추출된 시료(대조군 포함)를 신속하게 처리할 수 있도록 설계되었습니다.¹ 이 과정은 페놀/클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 필요로 하지 않습니다.

본 키트를 통해 추출된 RNA는 reverse transcription PCR (RT-PCR), reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), 노던 블로팅, cDNA 합성 및 RNA 시퀀싱을 포함한 다양한 응용 분야에 사용될 수 있습니다.

원리

EcoQprep™ Universal RNA Kit 는 Magnetic Nano Beads 를 이용하여 핵산을 추출하는 키트입니다. 키트에 포함된 완충용액들은 핵산이 실리카로 코팅된 자기 나노 비드에 결합할 수 있도록 도와줍니다. 그 결과, 시료로부터 고수율 및 고순도의 핵산을 추출할 수 있습니다.

이 키트는 용해 및 결합 완충용액, 세척 완충용액, 용출 완충용액, Magnetic Nano Beads 로 구성되어 있습니다. 시료는 RNA 를 분리하기 위해 RNase 를 비활성화시키는 강력한 변성제인 Guanidine thiocyanate 를 포함한 완충용액의 존재 하에 용해되고 균질화 됩니다. 추출된 RNA 는 실리카로 코팅된 자기 나노 비드에 결합되며, 세척 과정을 통해 세포 잔해 및 기타 오염물질이 제거됩니다. 이후 고순도의 RNA 는 용출 완충용액 또는 RNase-free water 에 용출됩니다.

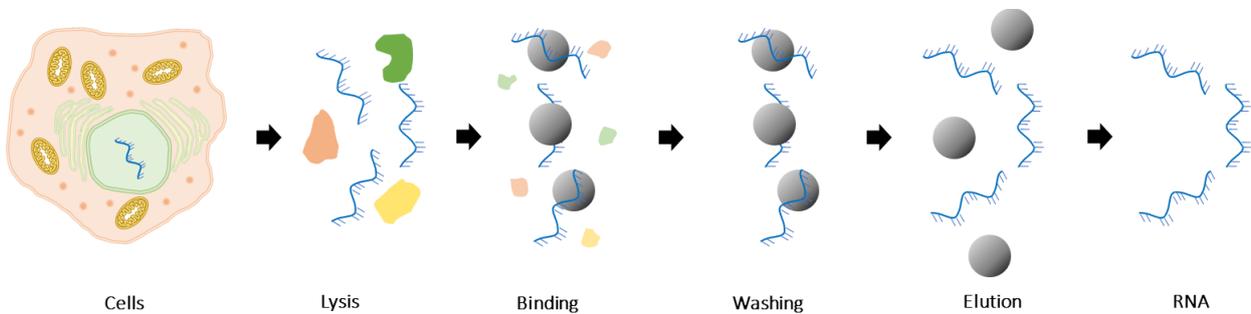


그림 1. 실리카 코팅된 Magnetic Nano Beads 를 이용한 RNA 추출.

특징 및 장점

- 포괄성: 배양된 포유류 세포, 혈액, 박테리아 세포, 동물 및 식물 조직 등 다양한 시료로부터 고품질 및 고수율의 RNA를 추출할 수 있습니다.
- 편리성: 하나의 키트로 Mini 및 Midi 규모의 추출 프로토콜을 모두 수행할 수 있습니다.
- 신속성: Magnetic Nano Beads를 사용하여 핵산을 신속하게 추출합니다. Mini는 약 5분, Midi는 약 10분 내에 완료됩니다.
- 경제성: *ExiPrep*[™] 96 Lite에 적용하여 RNA 추출을 자동화할 수 있습니다.

Magnetic Nano Beads

Magnetic Nano Beads는 기존 레진의 단점을 극복하고 정제 과정을 자동화하기 위해 개발되었습니다. Magnetic Nano Beads를 이용한 추출 원리는 표면에 코팅된 functional group에 핵산이 결합하는 것입니다. 그 후 외부 자기장을 이용하여 Magnetic Nano Beads를 분리합니다.

Magnetic Nano Beads의 제품 사양

Silica-coated Magnetic Nano Beads	
Matrix	Silica-coated Fe ₃ O ₄
Average size	200 nm
Ligand	- OH
Working Temperature	0-100°C
Storage	상온 보관

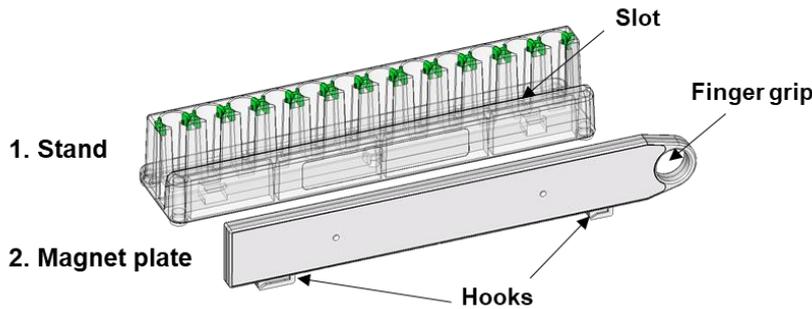
Magnetic Nano Beads의 특징 및 장점

- 신속성: 빠른 결합을 통해 한 번에 많은 양의 시료를 처리할 수 있는 자동화를 보장합니다.
- 효율성: 넓은 표면적으로 더 높은 민감도의 분석이 가능합니다.
- 특이성: 구형 구조로 비특이적 결합을 줄여 특이성을 높입니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack은 Magnetic Nano Beads를 빠르고 쉽게 분리할 수 있도록 설계되었습니다. 바이오니아는 1.5 또는 2 mL 튜브용 (Cat. No. TM-1012), 15 mL 튜브용 (Cat. No. TM-1021), 50 mL 튜브용 (Cat. No. TM-1031) 으로 다양한 크기의 Separation Rack을 제공합니다. 사용자는 필요에 따라 제품을 선택할 수 있습니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack의 구성품



- Stand: 미끄럼 방지 디자인으로 최대 12개의 튜브를 고정할 수 있습니다.
- Magnet plate: Stand의 slot에서 분리되며, 내부에 자석이 포함되어 있습니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack의 특징 및 장점

- 신속성: 핵산 (DNA 또는 RNA) 등을 빠르고 경제적으로 분리합니다.
- 편리성: 미끄럼 방지 설계로 튜브를 고정하여 원심분리나 파이펫 없이 rack을 뒤집는 것만으로 폐액을 간단하게 처리할 수 있습니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 사용 시 권장 사항

	<p>튜브와 Rack의 방향을 확인하십시오.</p>
	<p>Magnet plate의 앞쪽 걸쇠 부분이 Stand의 절반 이상 겹치도록 하십시오.</p>

1. Magnet plate 부착 방법

1) Magnet plate의 앞쪽 걸쇠 부분을 절반 이상 걸친 채로 Stand 위에 결합합니다.



2) Magnet plate의 손잡이를 잡고 수평을 유지하며 멈출 때까지 밀어 넣습니다. PUSH 부분을 아래로 누른 채로 밀면 더 쉽게 작동 가능합니다.

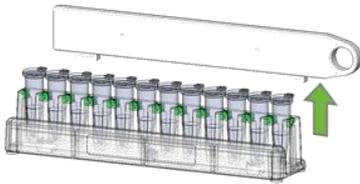


2. Magnet plate 분리 방법

1) Magnet plate 의 손잡이를 잡고, 옆으로 당깁니다.

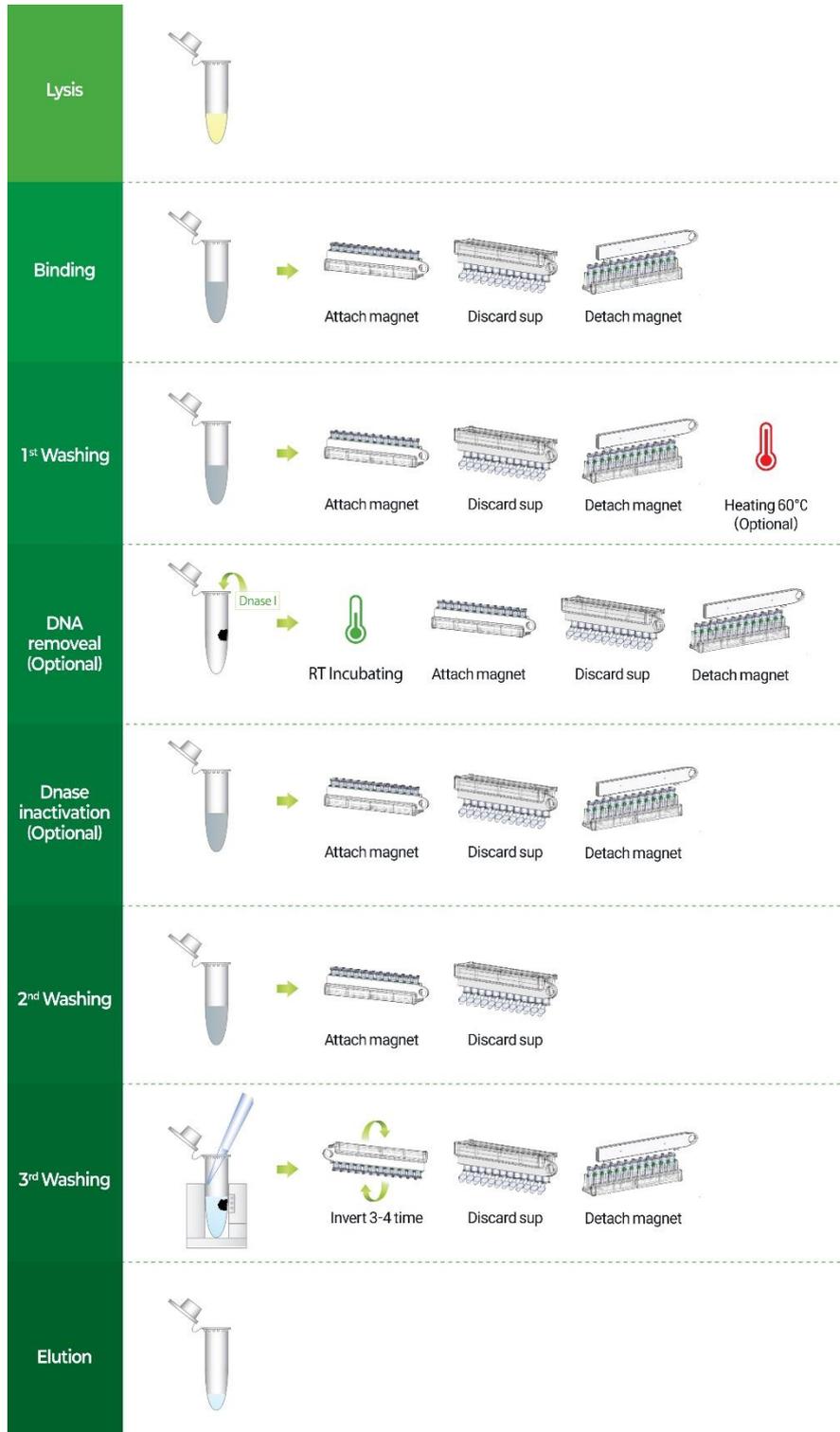


2) Magnet plate 를 위쪽으로 들어올려 분리합니다.



실험 절차

RNA 추출 절차



시료 준비

시료 채취 방법 및 보관과 같은 여러 요인이 수율 및 RNA 순도에 영향을 미칠 수 있습니다. 모든 검체는 냉동 보관하거나 채취 후 즉시 사용해야 합니다. 가능한 한 빨리 시료를 얼음에 보관하고 반복적인 냉동 및 해동을 피하는 것을 권장합니다.

Cultured cells (배양 세포)

RNA 추출을 위해서는 세포 수가 최소 1×10^4 이상이어야 하며, 이는 cell counter 를 통해 계산할 수 있습니다. 배양 세포는 원심분리를 통해 쉽게 수거할 수 있지만, 세포들이 지나치게 응집되어 있을 경우 RNA 추출이 어려울 수 있습니다. 이 경우, trypsin 을 사용하여 세포들을 분리하는 것이 좋습니다. 시료는 사용 전까지 얼음 위에 보관하는 것을 권장합니다.

Blood (혈액)

혈액 샘플은 즉시 사용하거나, EDTA 또는 ACDs 와 같은 항응고제가 포함된 튜브에 채취해야 합니다. 시료는 4°C 에서 수일간 보관 가능하며, -70°C 에서는 최대 1 년까지 보관할 수 있습니다. 해동 시에는 37°C 의 water bath 에서 신속하게 해동하고, 사용 전까지 얼음 위에 보관하는 것이 좋습니다. 혈액 내 적혈구(RBC)를 용해하여 백혈구로부터 RNA 를 분리하려면 RBC lysis buffer (150–160 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1–1 mM EDTA; 본 키트에 포함되지 않음)를 사용할 수 있습니다.

Bacterial cells (박테리아 세포)

박테리아 세포는 37°C 의 shaking incubator 에서 12–16 시간 동안 배양할 수 있습니다. 수확한 박테리아 세포는 즉시 사용하거나 -20°C 에서 -80°C 사이의 온도에서 보관할 경우 최적의 결과를 얻을 수 있습니다. 특히 gram-positive 박테리아의 경우, 세포벽이 다층 구조로 되어 있으므로 lysozyme 또는 lysostaphin 과 같은 추가적인 bacteriolytic agents 의 처리가 필요합니다. RNA 추출을 위해서는 RS buffer (본 키트에 포함되지 않음, 제품번호 KB-0041)를 사용할 수 있습니다.

Tissue (조직 샘플)

수확 방법과 시료의 보관 상태 등 여러 요소가 RNA 수율 및 순도에 영향을 미칠 수 있습니다. 수확한 조직은 즉시 사용하거나 냉동 보관해야 하며, 식물 조직 샘플의 경우 즉시 사용하지 않을 경우 liquid nitrogen 또는 -70~80°C 에서 보관하는 것이 권장됩니다. 반복적인 동결 및 해동은 피해야 합니다.

시작 전 준비

시작하기 전에 다음 사항을 확인하십시오.

1. RD Buffer 1 mL 당 β -mercaptoethanol (99% 순도;14.3 M) 10 μ L 을 첨가하십시오.
(최종 β -mercaptoethanol 농도: 143 mM)
2. 사용 전에 RWMB1 Buffer 및 RWB2 Buffer 에 각각 명시된 양의 에탄올 (제공되지 않음)을 첨가하십시오 (병 라벨 참조).
3. 원심력(g-force)은 다음과 같이 계산할 수 있습니다: $rcf = 1.12 \times r \times (rpm/1,000)^2$.
* **Note:** 'rcf'는 상대 원심력(g), 'r'은 회전자의 반지름(cm), 'rpm'은 분당 회전수입니다.

배양 세포 또는 혈액으로부터 준비

1. 세포 확보 (Cell harvesting)

아래의 단계 1), 2-1) 또는 2-2)에 따라 세포를 수집합니다.

1) 부유 배양 세포 (Suspension cell culture)

배양된 세포 (10^4 – 10^8 cells, Mini 스케일)를 300 × g에서 5분간 원심분리하여 펠렛으로 수집합니다. 펠렛이 흐트러지지 않도록 주의하며 상층액을 조심스럽게 제거한 후, 2단계로 진행합니다.

※ **Note:** 필요한 샘플의 양은 추출 스케일에 따라 달라질 수 있습니다.

2) 단일층 세포 배양 (Monolayer cell culture)

단일층으로 배양된 세포를 수집하는 방법에는 두 가지가 있습니다.

① 배양 접시 (Culture dish)에서 직접 세포 수집

세포 배양 배지를 완전히 제거한 후, 2단계로 진행합니다.

※ **Note:** RNA 추출을 방해하지 않도록 배양 배지를 완전히 제거해야 합니다.

② 트립신을 이용한 세포 수집

세포 배양 배지를 제거한 후, DPBS로 단일층 세포를 세척합니다.

0.1–0.25% trypsin을 세척한 단일층 세포에 첨가하여 세포를 분리시킵니다.

세포가 떨어지면 배양 배지를 첨가하여 trypsin 반응을 중지합니다.

세포를 RNase-free 튜브(제공되지 않음)에 옮기고, 300 × g로 5분간 원심분리합니다.

상층액을 조심스럽게 제거한 후, 2단계로 진행합니다.

3) 혈액 시료 (Blood sample)

① 1.5 mL 튜브에 혈액을 최소 200 μ l 준비합니다.

② RBC lysis buffer를 400 μ L * 첨가하고 얼음 위에서 10분간 반응시킵니다. 반응 중 2~3회 가볍게 뒤집거나 (Inverting) 잘 섞어 (Vortexing)줍니다.

* **Note:** 혈액과 RBC lysis buffer의 비율은 혈액 상태에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 1:2에서 1:5 범위로 적용됩니다.

③ 300 × g에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 제거합니다.

④ 다음 단계를 진행합니다.

2. 용해 및 균질화 (Lysis & homogenization)

1단계에서 얻은 세포 펠렛을 RD Buffer 500 μ L(Mini) / 5 mL(Midi)에 잘 섞어 (vortexing) 완전히 재현탁(resuspension)합니다.

※ **Note:** 시료를 완전히 재현탁해야 용해 효율이 극대화됩니다.

3. RNA 침전 (RNA precipitation)

무수 에탄올 (absolute ethanol)[†] 300 μ L(Mini) / 3 mL(Midi) (제공되지 않음)을 첨가하고, 즉시 피펫팅하여 혼합합니다.

[†] 특정 세포주에서 RNA를 정제할 경우, 에탄올 첨가 후 침전물이 보일 수 있습니다. 이는 실험 과정에 영향을 주지 않습니다.

4. 18페이지의 “자성입자를 이용한 RNA 추출 단계”를 진행합니다.

박테리아 세포로부터 준비

1. 세포 확보 (Cell harvesting)

- 1) 박테리아 배양액의 부피(1배)를 계산하여 깨끗한 1.5 ml 튜브에 넣습니다.
- 2) 1단계의 박테리아 배양액에 RS Buffer를 0.5배 부피만큼 첨가합니다. 잘 섞어 (vortexing) 5초간 짧게 혼합한 후, 실온에서 5분간 반응시킵니다.
- 3) 7,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포 펠렛을 만듭니다. 상층액을 조심스럽게 제거합니다.
- 4) 2단계로 진행합니다.

2. 용해 및 균질화 (Lysis & homogenization)

- 1단계에서 얻은 박테리아 펠렛을 RD Buffer 500 μ L(Mini) / 5 mL(Midi)에 잘 섞어 (vortexing) 완전히 재현탁(resuspension)합니다.
- ※ **Note:** 시료를 완전히 재현탁해야 용해 효율이 극대화됩니다.

3. RNA 침전 (RNA precipitation)

- 무수 에탄올 (absolute ethanol)[†] 300 μ L(Mini) / 3 mL(Midi) (제공되지 않음)을 첨가하고, 즉시 피펫팅하여 혼합합니다.
- [†] 특정 세포주에서 RNA를 정제할 경우, 에탄올 첨가 후 침전물이 보일 수 있습니다. 이는 실험 과정에 영향을 주지 않습니다.

4. 18페이지의 “자성입자를 이용한 RNA 추출 단계”를 진행합니다.

동물 조직으로부터 준비

1. 용해 및 균질화 (Lysis & homogenization)

1) 신선하거나 해동한 동물 조직 시료 20–30 mg(Mini)* / 최대 1000 mg(Midi)을 절구 및 막자(pestle) 또는 조직 균질기(homogenizer)를 이용해 마쇄 또는 균질화한 후, 적절한 튜브에 옮깁니다.

※Note: 필요한 시료의 양은 추출 규모에 따라 달라질 수 있습니다.

2) 시료에 RD Buffer 500 µL(Mini) / 5 mL(Midi)를 첨가하고 잘 섞어 (vortexing) 충분히 혼합합니다.

3) 최대 속도로 3분간 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 새로운 1.5 ml 튜브(Mini) 또는 50 ml 튜브(Midi)에 피펫으로 옮깁니다.

2. RNA 침전 (RNA precipitation)

무수 에탄올 (absolute ethanol)[†] 300 µL(Mini) / 3 mL(Midi) (제공되지 않음)을 첨가하고, 즉시 피펫팅하여 혼합합니다.

[†] 특정 세포주에서 RNA를 정제할 경우, 에탄올 첨가 후 침전물이 보일 수 있습니다. 이는 실험 과정에 영향을 주지 않습니다.

3. 18페이지의 “자성입자를 이용한 RNA 추출 단계”를 진행합니다.

식물 조직 및 곰팡이로부터 준비

1. 용해 및 균질화 (Lysis & homogenization)

1) 식물 또는 곰팡이 시료 ≤ 100 mg(Mini)* / 최대 1000 mg(Midi)을 액체 질소[†]와 함께 절구 및 막자(pestle)를 이용해 곱게 마쇄한 후, 적절한 크기의 튜브에 옮깁니다.

※**Note:** 필요한 시료의 양은 추출 규모에 따라 달라질 수 있습니다. 시료가 해동되지 않도록 주의하십시오.

2) 시료에 RD Buffer 500 μ L(Mini) / 5 mL(Midi)를 첨가하고 잘 섞어 (vortexing) 충분히 혼합합니다.

3) 60°C에서 1-3분간 반응시킵니다. 이 짧은 가열 과정은 조직을 보다 효과적으로 파쇄하는데 도움이 됩니다.

4) 최대 속도로 2분간 원심분리한 후, 상층액을 적절한 크기의 튜브에 옮깁니다.

2. RNA 침전 (RNA precipitation)

무수 에탄올 (absolute ethanol)[†] 300 μ L(Mini) / 3 mL(Midi) (제공되지 않음)을 첨가하고, 즉시 피펫팅하여 혼합합니다.

3. 18페이지의 “자성입자를 이용한 RNA 추출 단계”를 진행합니다.

자성 입자를 이용한 RNA 추출

1. RNA 포집

- 1) Magnetic Nano Bead 100 μ L (Mini) / 1 mL (Midi)를 각 튜브에 첨가하고 비드가 완전히 재현탁 될 때까지 잘 섞어 (vortexing) 줍니다.
- 2) EcoQprep™ Magnetic Separation Rack의 Stand에 Magnet plate를 장착한 다음 비드가 자석에 모두 붙을 때까지 Rack을 3-4회 inverting 합니다.



그림 2. Magnet plate 장착 방법. Stand의 장착부에 Magnet plate를 화살표 방향으로 밀어 결합합니다.

- 3) EcoQprep™ Magnetic Separation Rack을 완전히 뒤집어 상층액을 버립니다. 상층액을 모두 제거하기 위해 Rack을 뒤집은 상태로 튜브 입구를 종이 타월에 살짝 쳐서 흡수시키거나, 파이펫을 사용할 수도 있습니다.

*Note: 비드 분리 방식을 위해 Rack을 뒤집었을 때, 과도한 힘을 가하여 비드가 떨어지지 않도록 주의하십시오.

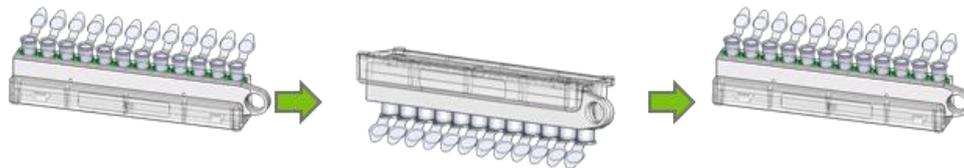


그림 3. 상층액 제거 방법. 상층액 제거 시 용액이 옆으로 쏟아지지 않도록 완전히 뒤집어줍니다.

- 4) EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 Magnet plate의 손잡이를 당겨 분리합니다.



그림 4. Magnet plate 분리 방법. Magnet plate를 화살표 반대 방향으로 당겨 분리합니다.

2. 1st washing

1) RWMB1 Buffer 700 μ L (Mini) / 7 mL (Midi)를 첨가합니다. 비드가 완전히 재현탁될 때까지 vortexing하여 혼합합니다.

2) 상층액 제거를 위해 1-2)부터 1-4) 단계를 반복합니다.

※**Note:** 자석 플레이트를 Rack에서 분리하지 마십시오.

3) (선택 사항) DNA 제거 과정(DNA Removal)을 수행하려면 아래 절차를 따르십시오.

① 튜브를 열어 60°C에서 최소 5분간 비드를 완전히 건조시킵니다.

② DNase I (제공되지 않음) 50 Units/rxn과 DNase 반응 버퍼 (제공되지 않음)를 첨가합니다. 피펫팅으로 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 반응시킵니다.

③ EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에 튜브를 넣고, 자석 플레이트가 부착된 상태에서 랙을 부드럽게 3~4회 뒤집어 비드가 자석에 단단히 붙도록 합니다.

④ 튜브를 랙에서 분리하지 않은 상태로 상층액을 조심스럽게 제거하고, 남아 있는 상층액은 종이 타월로 닦아내 완전히 제거합니다.

⑤ RWMB1 Buffer 700 μ L(Mini) / 7 mL(Midi)를 첨가하고, 비드가 완전히 재현탁될 때까지 잘 섞어 (vortexing) 혼합합니다.

⑥ 상층액을 제거하는 1-2)부터 1-4) 단계 과정을 반복합니다.

※**Note:** 자석 플레이트를 Rack에서 분리하지 마십시오.

3. 2nd washing

1) RWB2 Buffer 700 μ L (Mini) / 7 mL (Midi)를 첨가합니다. 비드가 완전히 재현탁될 때까지 vortexing하여 혼합합니다.

2) 상층액 제거를 위해 1-2)부터 1-4) 단계를 반복합니다.

***Note:** Rack에서 Magnetic plate를 분리하지 마십시오.

4. 3rd washing

아래의 1) 세척(Washing) 또는 2) 건조(Drying) 방법 중 하나를 선택하여 잔류 에탄올을 제거합니다.

1) 비드 세척 (Washing Beads)

① EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 튜브를 분리하지 않은 상태로, WE Buffer 700 μ l(Mini) / 7 ml(Midi)를 비드 반대편에 조심스럽게 첨가합니다.

② 튜브 뚜껑을 닫고 랙을 두 번 뒤집어(invert) 샘플에서 에탄올을 제거합니다.

③ 상층액을 조심스럽게 제거하고, 남은 상층액은 종이 타월로 닦아내 완전히 제거합니다.

④ EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 자석 플레이트를 분리합니다.

***Note:** WE Buffer를 비드 위에 직접 피펫하거나, 튜브를 흔들거나 (**vortexing**) 심하게 흔들면 비드에서 핵산이 떨어져 RNA 수율이 감소할 수 있습니다.



그림 5. 3rd washing 방법.

2) 비드 건조 (Drying Beads)

① 80% 에탄올 700 μ l(Mini) / 7 mL(Midi)를 첨가하고, **잘 섞어 (vortexing)** 혼합한 뒤, **1-2) ~ 1-4)** 단계를 반복하여 상층액을 제거합니다.

② 튜브를 열어 60°C에서 최소 5분간 완전히 건조시킵니다.

③ 남아 있는 상층액은 피펫으로 제거합니다.

5. Elution

1) ER Buffer 50-100 μ l (Mini) / 500-1000 μ l (Midi)를 첨가하고 잘 섞어주거나 (vortexing), 피펫하여 재현탁합니다.

2) 60°C에서 최소 1분 동안 가열한 후 충분히 잘 섞어줍니다. (vortexing)

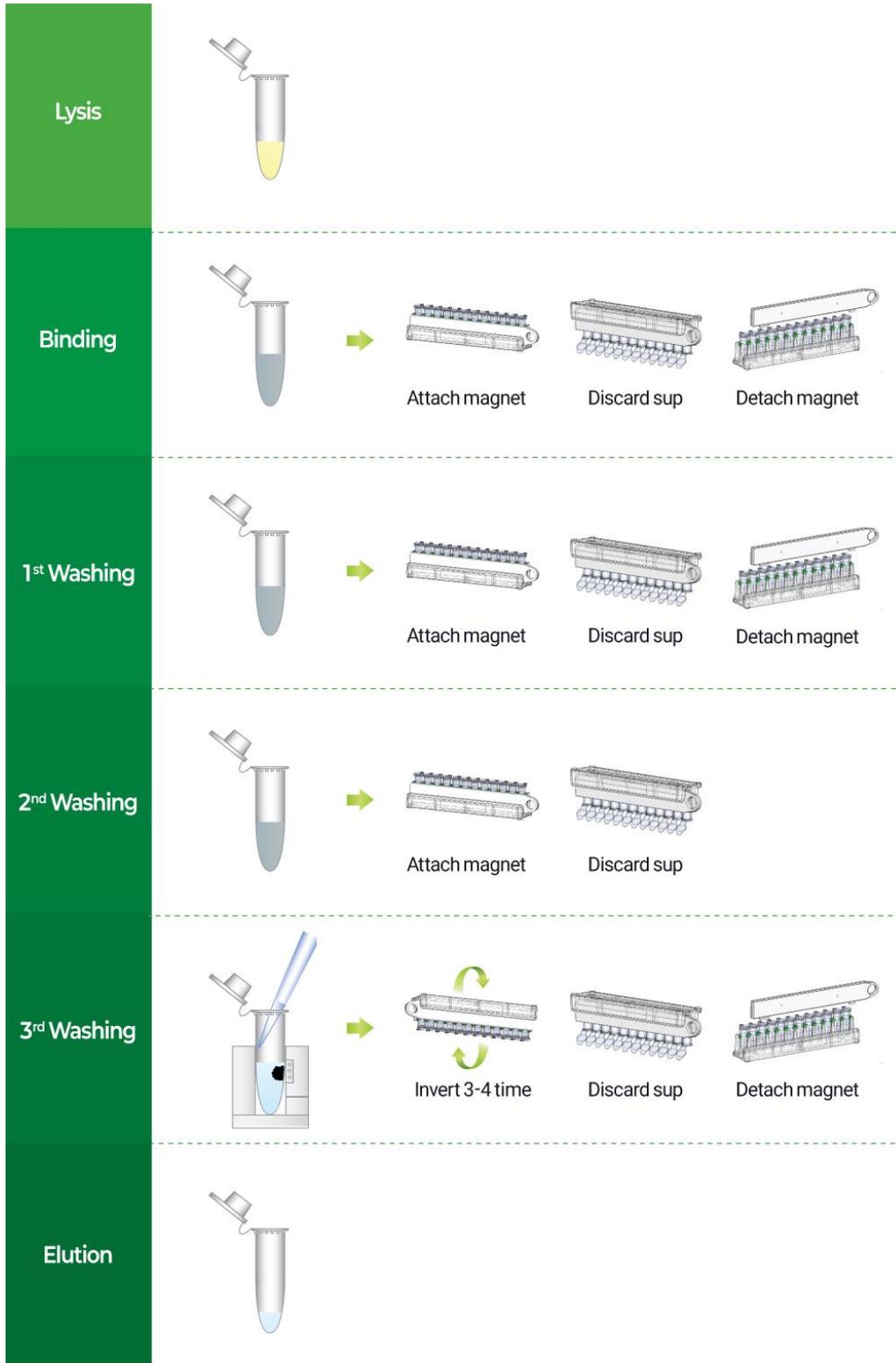
3) Magnet plate를 장착하고 RNA를 포함한 상층액을 새 튜브로 옮깁니다.

***Note:** 비드를 재사용하지 마십시오.

RNA Extraction from Sample

단계	Buffer	Mini	Midi
시료	펠릿 조직	~ 1 x 10 ⁶ < 100 mg	~ 1 x 10 ⁸ < 1000 mg
용해	RD Buffer	500 µL	5.0 mL
침전	무수 에탄올 (제공되지 않음)	300 µL	3.0 mL
포집	Magnetic Nano Bead- RNA (50 mg/mL)	100 µL	1.0 mL
1 st Washing	RWMB1 Buffer	700 µL	7.0 mL
2 nd Washing	RWB2 Buffer	700 µL	7.0 mL
3 rd Washing	WE Buffer	700 µL	7.0 mL
Elution	ER Buffer	50-100 µL	500-1000 µL
Tube type		1.5 or 2 mL tube	15 mL tube

RNA Clean up 절차



RNA Clean up

RNA Clean up은 시료로부터 핵산을 추출한 후 불순물을 제거하고, PCR이나 RNA 시퀀싱 등 순수한 RNA가 요구되는 실험의 정확도를 높이기 위해 수행됩니다.

1. 시료 준비 (Sample preparing)

1) DNA가 제거된 RNA가 필요한 경우, 각 튜브에 RNase-free DNase (제공되지 않음)와 DNase 반응 버퍼 (제공되지 않음)를 첨가하고, RNase-free water로 부피를 100 μ L(Mini) / 1000 μ L(Midi)까지 조절합니다. 실온에서 15분간 반응시킵니다.

2) 용출된 RNA 또는 효소 반응물을 아래에 지정된 깨끗한 튜브로 옮깁니다

- ① (Mini) 용출액을 1.5 mL 또는 2 mL 튜브로 옮깁니다.
- ② (Midi) 용출액을 15 mL 튜브로 옮깁니다.

3) RD Buffer 100 μ L (Mini) / 1000 μ L (Midi)를 첨가하고, 피펫팅으로 잘 혼합합니다

2. RNA 침전 (RNA precipitation)

무수 에탄올 (absolute ethanol) 200 μ L (Mini) / 2 mL (Midi)를 첨가하고, 즉시 피펫팅하여 혼합합니다.

3. 18페이지의 “자성입자를 이용한 RNA 추출 단계”를 진행합니다.

문제 해결

문제점	원인 및 해결 방법
낮은 RNA 수율	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer 또는 기타 시약은 보관 조건에 따라 효율이 감소될 수 있습니다. 모든 시약은 제품을 받으신 즉시 실온 (15-25°C)에서 보관하십시오. pH 및 안정성을 유지하고 오염을 방지하기 위해 사용 후에는 모든 시약 병을 항상 닫아서 보관하십시오. • RNA 추출에 사용된 시작 시료의 양이 과도했을 수 있습니다. 효율적인 RNA 추출을 위해 적절한 양의 시작 시료를 사용해야 합니다. • Elution가 불완전하게 진행되었을 수 있습니다. Elution단계에서 가열 시간을 3분까지 연장하여 수율을 높이십시오. 가열하는 동안 Magnetic Nano Beads가 Elution Buffer에 완전히 풀어진 상태인지 확인하십시오. • Lysis 단계에서 충분히 섞거나 vortexing 하지 않으면 DNA 수율이 낮아질 수 있습니다. Lysis 중 가열 과정에서 충분히 흔들거나 잘 섞으십시오. (vortexing) • 세포 배양액이 완전히 제거되지 않았을 수 있습니다. 세포 배양액은 가능한 한 완전히 제거해야 합니다. 배양액이 남아 있으면 RNA 추출을 저해할 수 있습니다.
낮은 RNA 순도	<ul style="list-style-type: none"> • Washing 단계에서 Magnetic nano Beads의 불완전한 현탁으로 인해 염이 남아있을 수 있습니다. Washing 단계에서 비드가 완전히 풀어진 상태인지 확인하십시오.
분해된 RNA	<ul style="list-style-type: none"> • RNase 오염이 있을 수 있습니다. 공기 중 RNase 오염을 방지하기 위해 클린벤치 내에서 히트건 또는 드라이어를 사용하십시오. RNase-free 피펫팁을 사용하고 장갑은 자주 교체하십시오. • 시료가 부적절하게 보관되었을 수 있습니다 배양 세포 시료 및 RD Buffer로 용해한 시료는 -80°C에서 보관해야 합니다. • 반복적인 냉동 및 해동으로 인해 RNA가 분해되었을 수 있습니다. RNA 분해를 방지하려면 반복적인 냉동과 해동을 피하십시오.
Agarose gel 로딩 시 샘플이 떠오르는 현상	<ul style="list-style-type: none"> • 샘플에 에탄올이 남아있을 수 있습니다. 로딩 시 샘플이 떠오르는 현상은 잔류 에탄올로 인해 발생합니다. 3rd washing 단계를 올바르게 수행하십시오.

부록

Formamide 를 이용한 RNA 의 장기 보관

1. RNA 펠렛을 포름아마이드(deionized formamide)에 용해합니다.
2. 최종 농도가 0.2 M 가 되도록 염화나트륨을 첨가한 후, 에탄올을 4 배 부피만큼 추가하여 포름아마이드로부터 RNA 를 침전시킵니다.
3. 실온에서 10 분간 반응시킵니다.
4. 실온에서 12,000 rpm 으로 5 분간 원심분리합니다.

RNA 시료의 흡광도 측정

A_{260}/A_{280} 비율은 핵산의 순도를 판단하는 일반적인 기준입니다. 순수한 RNA 의 경우 일반적으로 A_{260}/A_{280} 비율이 2.0 이상입니다. 단, 핵산의 이 파장에서의 흡광도는 매질의 이온 강도(ionic strength) 및 pH 에 따라 달라질 수 있습니다. 특히 이온 강도나 pH 가 증가하면 280 nm 에서의 흡광도가 감소하게 되며, 이로 인해 A_{260}/A_{280} 비율이 변동될 수 있습니다. 스펙트로포토미터 분석을 위해 RNA 를 DEPC 처리 멸균 증류수로 희석할 것을 권장합니다.

1. 총 RNA 시료의 부피를 측정합니다.
2. 총 RNA 시료 1 μL 를 1.5 mL 튜브에 옮깁니다.
3. DEPC 처리 멸균 증류수 999 μL 를 첨가하고 피펫팅으로 혼합합니다.
4. DEPC 처리 멸균 증류수를 기준(blank)으로 사용하여 A_{260} 및 A_{280} 값을 측정합니다.
5. RNA 수율(Yield)을 다음과 같이 계산합니다:
 - 1) 1 A_{260} 단위의 RNA = 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - 2) Total A_{260} = (희석된 시료의 A_{260}) \times (희석 배수)
 - 3) 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = Total A_{260} \times 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - 4) 수율 (μg) = 총 시료 부피 \times 농도
6. A_{260}/A_{280} 비율을 계산합니다.
순수한 RNA 는 일반적으로 $A_{260}/A_{280} > 2.0$ 의 값을 나타냅니다.

참고 문헌

Bonham, M. J., & Danielpour, D. (1996). Improved purification and yields of RNA by RNeasy®. *Biotechniques*, 21(1), 57-60.

Coombs, N.J., Gough, A.C., and Primrose J.N. (1999) Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 27(16), e12.

Reno, C., Marchuk, L., Sciore, P., Frank, C.B., and Hart, D.A. (1997) Rapid isolation of total RNA from small samples of hypocellular, dense connective tissues. *Biotechniques*, 22(6), 1082-1086.

주문 정보

제품명	Cat. No.
EcoQprep™ Universal RNA Kit	K-3706

관련 제품

제품명	Cat. No.
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack (2 mL)	TM-1012
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack (15 mL)	TM-1021
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack (50 mL)	TM-1031

기호 설명

 Batch Code	 Consult Instructions For Use	 Research Use Only	 Caution
 Do not Re-use	 Contains Sufficient for <n> tests	 Temperature Limitation	 Manufacturer
 Catalog Number	 Use-by Date		

BIONEER Global Center

Address 71, Techno 2-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34013, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Daedeok Center

Address 8-11, Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER R&D Center

Address Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Inc. - USA Branch

Address 155 Filbert St. Suite 216 Oakland, CA 94607, USA
E-mail order.usa@bioneer.us.com
Web us.bioneer.com

Bioneer Biotech GmbH - European Branch

Address Ludwig-Erhard-Strasse 30-34, 65760 Eschborn, Germany
E-mail euinfo@bioneer.com
Web www.bioneer.com