

EcoQprep™ mRNA Kit

Cat. No. K-3708



EcoQprep™ mRNA Kit

Kit for the extraction of mRNA from cultured cells, plant tissue, or animal tissue

사 용 설 명 서

K-3708



Version No.: 0 (2025-08-18)

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™ mRNA 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	4
Magnetic Nano Bead-Oligo dT	5
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack	6
실험 방법	8
mRNA 추출 과정 개요	8
시료 준비(Sample Preparation)	9
시작 전 준비사항	10
Protocol I: 배양 세포에서 mRNA 분리	12
Protocol II: 동물 및 식물 조직에서 mRNA 분리	16
Protocol III: rRNA 오염 제거(Removal of rRNA Contamination)	17
Protocol IV: Magnetic Nano Bead-Oligo dT 재사용	18
문제 해결	20
부록	22
RNA 시료의 흡광도 측정(Measurement of absorbance of RNA samples)	22
참고 문헌	23
주문 정보	24
관련 제품	24
기호 설명	25

제품 정보

제품 구성

구성품	Cat. No.	용량 및 수량*	보관
MRD Buffer	KB-2151	30 mL x 1 ea	상온 보관(15-35°C). 개봉 후 냉장보관 (2-8°C).
MRW1 Buffer	KB-3141	40 mL x 1 ea	
MRW2 Buffer	KB-4051	50 mL x 1 ea	
MRW3 Buffer	KB-5111	50 mL x 1 ea	
EM Buffer	KB-6051	25 mL x 1 ea	
Magnetic Nano Bead-Oligo dT (10 mg/mL)	KB-7041	3 mL x 1 ea	
1.5 mL Tube	KA-1120	50 ea x 1 pack	
One-Page Protocol	-	1 ea	

* Mini – 50 rxn

보관법

본 Kit 및 구성품은 실온(15-35°C)에서 2년 동안 보관할 수 있습니다. 개봉 후에는 제품의 안정성을 장기간 유지하기 위하여 2-8 °C에서 보관하십시오.

제품 사양

사용 가능 시료 & RNA 추출 효율

아래 표는 시료 종류별 총 RNA 예상 수율과 순도에 대한 일반적인 참고값을 나타내며, 이 중 약 1-5%가 mRNA입니다.

제품 규격

Scale	Mini
Total RNA 기대 수율 (mRNA는 1-5%)	~ 100 µg
최소 용출 용량	15 µL
추출 시간	~ 10 min

시료 종류에 따른 RNA 추출 효율

시료	권장 사용량	Total RNA 수율 (mRNA는 1-5%)	순도*
동물 배양 세포	10 ⁴ -10 ⁸ cells	15-20 µg	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ > 2.0
동물 조직 (Liver)	25-50 mg	10-60 µg	
동물 조직 (Spleen)	100 mg	30-60 µg	
식물 조직	100 mg	70-80 µg	

* 주의: 측정값은 시료 종류에 따라 달라질 수 있습니다.

주의사항

- RNA는 취급 과정에서 유입될 수 있는 외인성 RNase에 의해 쉽게 분해되므로, 모든 과정은 멸균된 RNase-free 조건에서 수행해야 합니다.
- 취급 시 반드시 장갑을 착용하고, RNase-free 시약, 피펫 팁, 튜브를 사용해야 합니다.

개요

제품 설명

EcoQprep™ mRNA Kit 는 포유류 세포, 동물 및 식물 조직으로부터 polyadenylated mRNA 를 고순도로 선택적으로 분리·정제하도록 설계된 시약 키트입니다.

본 키트는 oligo dT 가 고정된 자성나노비드(magnetic nanobead) 를 사용하여, mRNA 의 poly(A) tail 에 특이적으로 결합시킴으로써, 전체 RNA 중 mRNA 만을 효율적으로 회수합니다. 이 과정에서 반복적인 DNase 처리 없이도 ribosomal RNA (rRNA)를 효과적으로 제거할 수 있어, qPCR 기반 유전자 발현 분석이나 transcriptome 연구에서 rRNA 로 인한 background signal 을 최소화하고 분석 정확도를 향상시킬 수 있습니다.

또한, EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 을 사용하면 원심분리 없이도 빠르고 간편하게 mRNA 를 분리할 수 있으며, ExiPrep™ 96 Lite (Cat. No. A-5250) 장비와 연계하면 최대 96개의 시료를 동시에 자동으로 처리할 수 있어 고처리량 실험에도 적합합니다.

분리된 mRNA 는 RT-PCR, RT-qPCR, cDNA 합성, 유전자 클로닝 등 다양한 분자생물학적 응용에 바로 활용 가능합니다.

원리

EcoQprep™ mRNA Kit 는 total RNA 시료에서 **polyadenylated mRNA** 만을 선택적으로 분리하기 위해 oligo-dT 가 고정된 자성 나노 비드(magnetic nanobead)를 활용합니다. 이 oligo-dT 는 mRNA 의 **poly(A) tail** 과 상보적으로 결합하여, 전체 RNA 중에서 **mRNA 만을 비드에 특이적으로 포획**합니다.

- 결합 단계 (Hybridization)
키트에 포함된 결합 버퍼(Binding buffer)는 mRNA 가 비드 표면의 oligo-dT 와 안정적으로 결합할 수 있도록 최적화된 조건을 제공합니다.
- 세척 단계 (Washing)
결합된 mRNA 를 제외한 genomic DNA, ribosomal RNA(rRNA), 세포 잔여물(cell debris) 등은 비드에 결합하지 않으며, 세척 버퍼를 통해 효과적으로 제거됩니다.
- 용출 단계 (Elution)
고순도로 정제된 mRNA 는 용출 버퍼 또는 RNase-free water 를 사용하여 비드로부터 분리되며, 높은 순도와 수율을 유지한 채 최종적으로 확보됩니다.

* 주의: 일부 시료 유형은 전처리 과정이 필요할 수 있습니다.

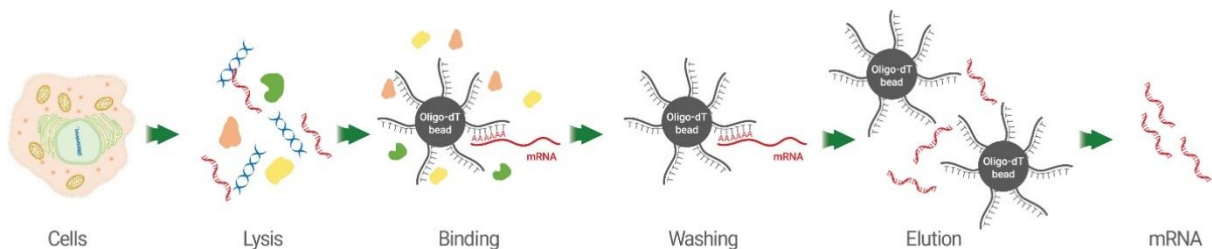


그림 1. Magnetic Nano Bead-Oligo dT 를 이용한 mRNA 정제 과정

특징 및 장점

- **고순도 및 높은 수율**: polyadenylated mRNA 를 선택적으로 분리하여 genomic DNA 와 ribosomal RNA 를 효율적으로 제거함으로써 고순도의 결과를 제공합니다.
- **신속하고 간편한 작업 흐름**: EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 을 이용하여 원심분리 없이 10분 이내에 mRNA 를 신속하게 분리할 수 있습니다.
- **넓은 시료 적용 범위**: 포유류 세포, 동물 조직, 식물 조직 등 다양한 시료 유형에서 mRNA 를 분리할 수 있습니다.
- **자동화 지원**: ExiPrep™ 96 Lite 시스템에 적용하여 동시에 96 개의 시료로부터 mRNA 를 추출할 수 있습니다.

Magnetic Nano Bead-Oligo dT

Magnetic Nano Bead 는 기존 수지(Resin) 기반 정제 방식의 한계를 개선하고, mRNA 정제 과정을 자동화·고효율화 하기 위해 개발된 소재입니다. 비드 표면에는 oligo-dT 리간드가 기능화되어 있어, mRNA 의 poly(A) tail 과 특이적으로 결합할 수 있으며, 이를 통해 선택적으로 mRNA 분리가 가능합니다.

또한, 비드의 자성 특성을 고려해 외부 자기장을 활용하여 간편하고 빠르게 분리 및 세척할 수 있어, 원심분리 없이도 고순도의 mRNA 추출이 가능합니다.

Magnetic Nano Bead-Oligo dT 의 제품 사양

Magnetic Nano Beads-Oligo dT	
매트릭스 (Matrix)	Silica-coated Fe ₃ O ₄
평균 지름	400 nm
리간드 (Ligand)	- Oligo dT
사용 가능 온도	0-100°C
보관	상온 보관(15-35°C). 개봉 후 냉장보관 (2-8°C).

Magnetic Nano Bead-Oligo dT 의 특징 및 장점

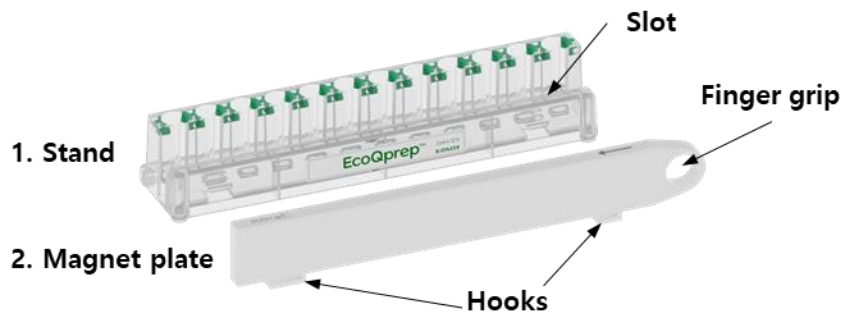
- **신속성:** 빠른 결합 속도로 고처리량 자동화를 보장합니다.
- **효율성:** 넓은 표면적으로 보다 민감한 분석이 가능합니다.
- **특이성:** 구형 구조가 비특이적 결합을 줄여 특이성을 높입니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack(제품 번호: TM-1012)은 Magnetic Nano Bead 를 신속하고 효율적으로 분리할 수 있도록 정밀 설계된 장치입니다.

BIONEER 는 1.5 mL 및 2 mL 튜브용(제품 번호: TM-1012), 15 mL 튜브용(제품 번호: TM-1021), 50 mL 튜브용(제품 번호: TM-1031) 등 다양한 규격의 랙을 제공하여, 사용 목적과 시료 용량에 최적화된 선택이 가능합니다.

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 의 구성



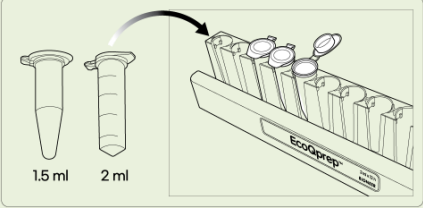
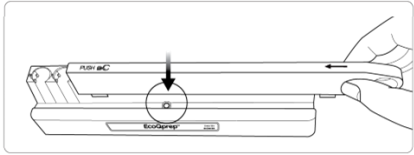
- 스탠드(Stand): 미끄럼 방지 디자인으로 최대 12개의 튜브를 고정 가능
- 자석 플레이트(Magnet plate): 스탠드의 슬롯으로부터 분리 가능, 자석 내장

EcoQprep™ Magnetic Separation Rack의 특징 및 장점

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

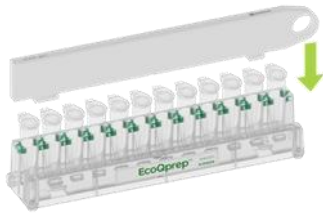
EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 사용법

사용 시 주의사항

	튜브와 랙의 방향을 확인하십시오.
	자석 플레이트의 앞쪽 걸쇠 부분이 스탠드의 절반 이상 겹치도록 하십시오.

1. 자석 플레이트 부착 방법

- ① 자석 플레이트의 앞쪽 걸쇠 부분을 절반 이상 걸친 채로 스탠드위에 결합합니다.



- ② 자석 플레이트의 손잡이를 잡고 수평을 유지하며 멈출 때까지 밀어 넣습니다. PUSH 부분을 아래로 누른 채로 밀면 더 쉽게 작동 가능합니다.

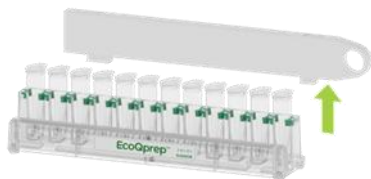


2. 자석 플레이트 분리 방법

- ① 자석 플레이트의 손잡이를 잡고, 옆으로 당깁니다.

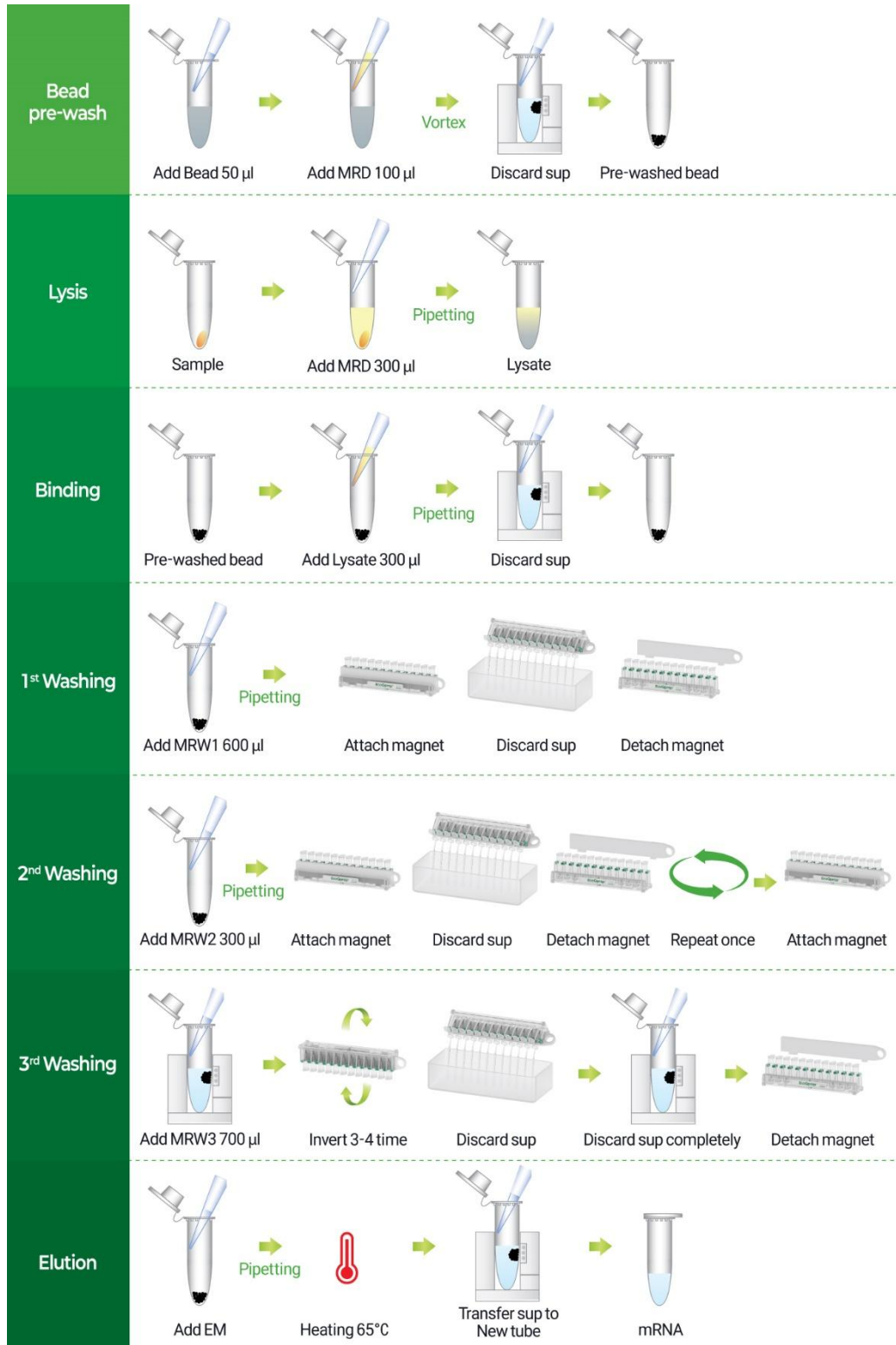


- ② 자석 플레이트를 위쪽으로 들어올려 분리합니다.



실험 방법

mRNA 추출 과정 개요



시료 준비(Sample Preparation)

mRNA의 수율과 순도는 시료의 채취 방법과 보관 상태 등에 크게 영향을 받습니다. 모든 시료는 채취 후 즉시 사용하거나 냉동 보관해야 하며, 가능한 한 빠르게 얼음 위에 올려두고 반복적인 동결·해동은 피하는 것이 좋습니다.

- **배양 세포(Cultured cells)**

mRNA 추출을 위해서는 세포 수가 최소 1×10^4 개 이상이어야 하며, 이는 세포 계수기를 사용하여 산출합니다. 배양 세포는 원심분리를 통해 쉽게 회수할 수 있습니다. 그러나 세포가 과도하게 뭉쳐 있는 경우 mRNA 추출이 어려울 수 있으므로, 이 경우 트립신(Trypsin)을 사용하여 세포를 서로 분리할 수 있습니다. 시료는 사용 전까지 얼음 위에서 보관하는 것이 권장됩니다.

- **조직(Tissues)**

mRNA의 수율과 순도는 조직의 채취 방법과 보관 상태에 따라 달라집니다. 신선하게 채취한 시료는 즉시 사용하거나 냉동 보관해야 하며, 식물 조직 시료를 즉시 사용하지 않을 경우 액화질소 또는 $-70 \sim -80^\circ\text{C}$ 에서 보관하는 것이 좋습니다. 반복적인 동결·해동은 반드시 피해야 합니다.

사용 전 준비사항

실험을 진행하기 전에 다음 사항을 준비하십시오.

1. MRD Buffer 준비

MRD Buffer 1 mL 당 β-mercaptoethanol(순도 99%, Molecular grade, 14.3 M) 1 μL 를 첨가합니다.
(최종 농도: 14.3 mM) MRD Buffer 는 산화 방지 효과를 극대화하기 위해 실험 직전에 신선하게
조제하는 것이 바람직하며, 장기간 보관은 권장하지 않습니다.

2. Magnetic Nano Bead-Oligo dT 사전 세척 (결합 효율 향상)

Magnetic Nano Bead-Oligo dT 는 결합 효율을 높이기 위해 사용 전에 세척하는 것을 권장합니다.

- 1) 자석 플레이트를 분리한 상태에서, EcoQprep™ Magnetic Separation Rack 에 새 1.5 mL
마이크로원심분리 튜브를 장착합니다.
- 2) 각 튜브에 필요한 양의 비드(예: 반응당 50 μL)를 분주합니다.
- 3) 각 튜브에 MRD Buffer 100 μL 를 넣고, 짧게 vortex 하여 혼합합니다.
- 4) 랙에 자석 플레이트를 장착한 뒤 비드가 분리되도록 기다린 후, 피펫을 사용하여
상등액(Supernatant)을 조심스럽게 제거합니다.
- 5) 세척된 비드는 이제 mRNA 분리 과정의 결합 단계에 사용할 준비가 완료되었습니다.

3. 원심분리 시 g-force 계산: $rcf = 1.12 \times r \times (rpm/1,000)^2$

참고: rcf 는 상대 원심력(g), r 은 로터 반경(cm), rpm 은 원심분리 속도(분당 회전수)입니다.

다양한 시료로부터 mRNA 분리

mRNA 분리 과정 및 시료, 시약 사용량

과정	사용 시료, 시약	권장 사용량
시료 준비	Cultured cells	~ 1 x 10 ⁶ cells
	Animal tissues	~ 10 mg
	Plant tissue	~ 20 mg
용해 (Lysis)	MRD Buffer (mixed with β-mercaptoethanol)	300 μL
결합 (Binding)	Magnetic Nano Bead-Oligo dT	50 μL
세척 (Washing)	MRW1 Buffer	600 μL
	MRW2 Buffer	300 μL * 2
	MRW3 Buffer	700 μL
용출 (Elution)	EA Buffer	15 – 20 μL

Protocol I : 배양 세포에서 mRNA 분리

1. 세포 수확(Cell harvesting)

1) 아래 A 또는 B 방법에 따라 세포를 수확합니다.

A. 부유 배양 세포(Suspension cell culture)

배양 세포($\sim 1 \times 10^6$ 개)를 $300 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 펠릿을 형성합니다. 펠릿이 흐트러지지 않도록 주의하면서 상등액을 제거합니다.

B. 부착 배양 세포(Monolayer cell culture)

부착 배양된 세포를 수확하는 방법은 두 가지가 있습니다.

① 배양 접시에서 직접 수확

세포 배양 배지를 완전히 제거합니다.

* **주의:** mRNA 추출 저해를 방지하기 위해 배양 배지를 완전히 제거해야 합니다.

② 트립신(Trypsin)을 이용한 수확

세포 배양 배지를 제거한 뒤 DPBS로 세포 단층을 세척합니다. 세척된 세포 단층에 0.1-0.25% 트립신을 첨가하여 세포를 분리시킵니다. 세포가 분리되면 배양 배지를 첨가하여 반응을 중지합니다. 세포를 RNase-free 튜브(미제공)에 옮긴 뒤, $300 \times g$ 에서 5분간 원심분리합니다. 이후 상등액을 조심스럽게 제거합니다.

2. 용해(Lysis)

1) 세포 펠릿에 β -mercaptoethanol이 미리 혼합된 MRD Buffer 300 μ L를 첨가하고, 피펫팅으로 충분히 혼합합니다.

* **주의:** MRD Buffer는 사용 직전에 1 mL당 β -mercaptoethanol 1 μ L를 첨가하여 신선하게 조제하는 것이 좋습니다.

3. 결합(Binding)

1) 세척 완료된 Magnetic Nano Bead-Oligo dT 용액 50 μ L를 준비합니다.

* **주의:** 비드는 실험 전에 반드시 세척하십시오 (자세한 내용은 10페이지 참조).

2) 위 용해(Lysis)과정에서 얻은 전체 용해액(Lysate)을 세척된 비드가 담긴 튜브에 넣고, 피펫팅하여 비드가 완전히 재현탁(Resuspend)될 때까지 충분히 혼합합니다.

* **(선택 사항):** 실온에서 로테이터를 사용해 5분간 반응시켜 mRNA의 poly(A) tail이 비드에 결합되도록 하면 수율을 높일 수 있습니다. 효율이 낮을 경우, 3-3) 단계에서 얻은 비결합 용해액(Unbound lysate)을 보관해 두었다가 재결합(Re-binding) 단계에 사용하여 수율을 높일 수 있습니다.

3) 튜브를 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에 장착한 뒤, 스탠드에 자석 플레이트를 부착하고 랙을 3-4회 가볍게 뒤집어 비드가 자석에 단단히 붙도록 합니다.



그림 2. 자석 플레이트 부착 방법

4) 피펫을 사용하여 비결합 용해액을 완전히 제거하고, 재결합을 위해 보관하거나 폐기합니다.

* **주의:** 세척 효율을 높이고 고순도의 mRNA를 얻기 위해 잔여 용액을 반드시 완전히 제거해야 합니다.

5) EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 자석 플레이트를 분리합니다.



그림 3. 자석 플레이트 분리 방법

4. 1차 세척(1st Washing)

- 1) MRW1 Buffer 600 μ L를 넣고, 비드가 완전히 재현탁될 때까지 피펫팅하여 혼합합니다.
 - 2) 튜브를 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에 장착한 뒤, 스탠드에 자석 플레이트를 부착하고 랙을 3-4회 가볍게 뒤집어 비드가 자석에 단단히 붙도록 합니다.
 - 3) 튜브를 랙에서 제거하지 않은 상태에서 상등액을 조심스럽게 제거합니다. 피펫을 사용해 남은 버퍼도 완전히 제거합니다.
- * **주의:** 상등액을 버릴 때 물리적 충격을 피하십시오. 튜브 뚜껑이 열린 채 너무 강하게 흔들면 비드가 손실될 수 있습니다.
 - * **주의:** 상등액을 제거할 때는 랙을 튜브가 열린 방향으로 기울여 액체가 랙 위로 흘러내리지 않도록 하십시오.



그림 4. 상등액 제거 방법.

- 4) 자석 플레이트를 분리합니다.

5. 2차 세척(2nd Washing)

- 1) MRW2 Buffer 300 μ L를 넣고, 비드가 완전히 재현탁될 때까지 피펫팅하여 혼합합니다.
 - 2) 4-2)에서 4-3) 과정을 반복하여 상등액을 제거합니다. 피펫을 사용해 남은 버퍼를 완전히 제거합니다.
 - 3) 자석 플레이트를 분리합니다.
 - 4) 5-1)에서 5-2) 단계를 한 번 더 반복하여 추가 세척을 수행합니다.
- * **주의:** 마지막 상등액을 제거한 뒤에는 자석 플레이트를 분리하지 마십시오.

6. 3차 세척(3rd Washing; Rinse)

- 1) MRW3 Buffer 700 μ L를 비드가 있는 반대쪽 벽면으로 조심스럽게 흘려 넣습니다. 이때 튜브 내 비드는 반드시 자석 플레이트에 의해 붙어 있어야 합니다.

* **주의:** MRW3 Buffer를 비드 위에 직접 분주, Vortexing, 튜브를 강하게 흔들기, 튜브 tapping 등의 행위를 하지 마십시오. 물리적인 충격으로 인해 핵산이 비드에서 분리되어 mRNA 수율을 감소시킬 수 있습니다.

- 2) 자석이 부착된 랙을 3-4회 조심스럽게 뒤집습니다.
- 3) 피펫을 이용해 조심스럽게 상등액을 제거하거나 튜브의 뚜껑을 연 채로 조심스럽게 뒤집어 폐액 용기에 MRW3 Buffer를 버립니다.



그림 5. 3차 세척 과정 (Rinse)

- 4) 자석 플레이트를 분리합니다.

7. 용출(Elution)

- 1) 각 튜브에 EM Buffer 15-20 μ L를 첨가하고, 피펫팅으로 재현탁합니다.
- 2) 65°C에서 최소 2분간 반응시킨 뒤, 가볍게 tapping합니다.

- 3) 자석 플레이트를 부착한 후, mRNA가 포함된 상등액을 새로운 RNase-free 튜브로 조심스럽게 옮깁니다.

* **주의:** mRNA가 비드에 다시 결합하여 수율이 감소하는 것을 방지하기 위해, 용출 직후 즉시 새로운 튜브로 옮긴 후 보관하십시오.

- 4) 사용된 비드는 폐기하지 마십시오. 3-4) 단계에서 보관해 둔 비결합 용해액을 사용하여 동일한 비드로 재결합(Re-binding)할 수 있습니다.
- 5) rRNA 오염 제거 방법은 17페이지, Magnetic Nano Bead-Oligo dT 재사용 방법은 18 페이지를 참조하십시오.

Protocol II: 동물 및 식물 조직에서 mRNA 분리

1. 용해 및 균질화(Lysis & Homogenization)

1) 시료 준비(Sample Preparation)

A. 동물 조직(Animal tissue): 신선한 동물 조직 또는 동결보관한 동물 조직을 MRD Buffer (조직 10 mg당 $\geq 300 \mu\text{L}$, β -mercaptoethanol이 미리 혼합됨)에 넣고, 호모게나이저를 사용하여 균질화합니다.

B. 식물 조직(Plant tissue): 신선한 식물 조직 또는 동결보관한 식물 조직을 액화질소로 급속 냉각한 후, 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 분쇄합니다. 액화질소가 완전히 증발하면, 조직이 해동되기 전에 MRD Buffer(조직 20 mg당 $\geq 300 \mu\text{L}$, β -mercaptoethanol이 미리 혼합됨)를 즉시 첨가하고, 피펫팅으로 충분히 혼합합니다.

* **주의:** MRD Buffer는 사용 직전에 1 mL당 β -mercaptoethanol 1 μL 를 첨가하여 신선하게 조제하십시오. 시료 준비 과정에서 해동되지 않도록 주의하며, 분쇄 또는 균질화는 가능한 한 신속하게 수행하고 반복적인 동결-해동은 피해야 합니다.

2) 최대 속도로 3분간 원심분리한 뒤, 상등액을 새로운 튜브로 조심스럽게 옮깁니다.

3) 이후 상등액으로부터 mRNA 분리과정은 **Protocol I: 배양 세포에서 mRNA 분리**의 3단계 *결합(Binding)* 과정(p.13 참조)에 따라 진행합니다.

Protocol III: rRNA 오염 제거(Removal of rRNA Contamination)

본 프로토콜은 1차로 분리·용출된 mRNA를 Magnetic Nano Bead-Oligo dT에 다시 결합시켜, 잔존하는 비특이적 RNA 오염물을 제거함으로써 mRNA의 순도를 더욱 향상시키는 정제 과정입니다.

1. 재결합 준비(Preparation for Rebinding)

- 1) 용출된 mRNA를 즉시 새로운 RNase-free 튜브로 옮기고, 분해를 최소화하기 위해 얼음 위에 보관합니다.
- 2) 사용한 비드는 재결합 단계에 사용할 수 있도록 원래 튜브에 그대로 둡니다.

2. 비드 세척(Bead Washing)

- 1) MRW2 Buffer 200 μ L를 첨가하고, 피펫팅으로 비드를 충분히 재현탁합니다.
- 2) 튜브를 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에 올리고, 자석 플레이트를 스탠드에 부착한 뒤, 랙을 3-4회 부드럽게 뒤집어 비드가 자석에 단단히 결합되도록 합니다.
- 3) 튜브를 랙에서 제거하지 않은 상태에서 상등액을 조심스럽게 제거합니다.
- 4) EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 자석 플레이트를 분리합니다.
- 5) 위 2단계(비드 세척)를 한 번 더 반복합니다.

3. mRNA 재결합(Re-binding of mRNA)

- 1) 용출된 mRNA에 MRD Buffer를 4배 부피가 되도록 첨가하여 희석합니다.

* 주의: MRD Buffer는 사용 직전에 1 mL당 β -mercaptoethanol 1 μ L를 첨가하여 신선하게 조제하십시오.
- 2) 희석된 mRNA 용액을 2단계에서 세척한 비드에 첨가합니다.
- 3) 상등액 제거는 2-2) ~ 2-3) 단계를 반복하여 수행합니다.
- 4) 이후 세척과정은 **Protocol I : 배양 세포에서 mRNA 분리의 4단계 1차 세척(1st Washing)** 과정(p.14 참조)에 따라 진행합니다.

Protocol IV: Magnetic Nano Bead-Oligo dT 재사용

Magnetic Nano Bead-Oligo dT는 mRNA 용출 후 동일 시료에서 최대 4회까지 안정적으로 재사용할 수 있으며, 이는 oligo-dT에 결합되어 잔류하는 mRNA를 효율적으로 제거함으로써 가능합니다. 단, 재사용 과정에서 mRNA 결합력이나 용출 효율이 저하되는 경우에는 추가 사용을 중단하는 것이 권장됩니다.

1. 잔여 mRNA 제거(Removal of residual mRNA)

- 1) 비드 펠릿을 재현탁하기 위해 아래 용액 중 하나를 100 µL 첨가합니다.
 - A. EM Buffer
 - B. RNase-free water
 - C. 강력한 용출이 필요한 경우, 8 M Urea, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.01% Tween 20을 포함하는 용액을 준비합니다.
- * 주의: 이 용액은 매 실험 시 신선하게 준비하는 것을 권장합니다.
- 2) 75°C에서 3-5분간 반응시켜 mRNA를 비드로부터 분리합니다.
- 3) Vortex 또는 피펫팅으로 충분히 혼합합니다.
- 4) 튜브를 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에 올리고, 자석 플레이트를 스탠드에 부착한 뒤 랙을 3-4회 부드럽게 뒤집어 비드가 자석에 단단히 결합되도록 합니다.
- 5) 튜브를 랙에서 제거하지 않은 상태에서 상등액을 조심스럽게 제거합니다.
- 6) 자석 플레이트를 EcoQprep™ Magnetic Separation Rack에서 분리합니다.

2. 세척(Washing)

- 1) 1-1) 단계에서 사용한 동일 용액 200 µL를 첨가하고, Vortex하여 비드를 충분히 재현탁합니다.
- 2) 1-4)~1-6) 단계를 반복하여 상등액을 제거합니다.
- 3) 동일 용액으로 한 번 더 세척을 반복합니다.
- 4) MRD Buffer 100 µL를 사용하여 두 번 세척하며, 각 세척 시 Vortex하여 재현탁한 뒤 1-4)~1-6) 단계와 동일하게 상등액을 제거합니다.
- * 주의: MRD Buffer는 사용 직전 1 mL당 β-mercaptoethanol 1 µL를 첨가하여 신선하게 조제합니다.

3. 보관(Storage)

- 1) 사용 전 보관 시, 비드를 EM Buffer에 담아 보관합니다. 안정성을 높이기 위해 0.05% Tween 20을 첨가할 수 있습니다.
- 2) 재사용한 bead는 세균의 번식을 방지하기 위해 RNase-free 환경에서 2 - 8°C로 냉장 보관하는 것을 권장합니다.

문제 해결

원인	해결 방법
mRNA 수율 저하 (Low mRNA yield)	• 버퍼 또는 기타 시약의 효능 저하: 시약이 효능을 저하시킬 수 있는 조건에 노출되었을 수 있음. 시약은 개봉 전 실온(15-35°C)에서 보관하며, 개봉 후에는 2-8°C에서 보관하는 것을 권장합니다. 사용 후에는 모든 시약 병을 단단히 밀봉하여 pH와 안정성을 유지하고 오염을 방지해야 합니다.
	• 시료의 과다 사용: mRNA 분리에 과도한 양의 시료를 사용했을 수 있음. RNA를 효율적으로 추출하기 위해서는 적정량의 시료를 사용해야 합니다. 시료 양이 과도하여 용해(Lysis)가 불완전할 경우, MRD Buffer를 추가하여 용해 효율을 높일 수 있습니다. 또한, 비드 부피를 100 µL로 증가시키면 결합 효율을 향상시킬 수 있습니다.
	배지 제거 불충분: 세포 배양 배지가 완전히 제거되지 않았을 수 있음. 잔여 배지는 RNA 추출을 저해할 수 있으므로 가능한 한 완전히 제거해야 함.
	용해 단계에서 불충분한 용해: 용해 단계에서 시료가 충분히 용해되지 않으면 mRNA 수율이 낮아질 수 있습니다. 용해 단계에서 튜브를 충분히 흔들거나 피펫팅하여 혼합하고, 조직 시료의 경우 균질화 단계를 반복하는 것을 권장합니다.
	결합 단계에서 불충분한 mRNA 혼성화 (Hybridization): 수율이 낮은 경우, 시료 용해 후 용해액과 비드를 5분 이상 반응시키고 회전 혼합하여 충분히 접촉하는 것을 권장합니다..
	• 재결합을 통한 효율 향상: mRNA 수율을 높이기 위해, 남아 있는 비결합 용해액(Unbound lysate)을 사용한 비드와 다시 반응시켜 mRNA 분리 프로토콜의 결합 과정을 반복할 수 있습니다. • 불완전한 용출: 용출 단계에서 반응 시간을 늘려 최대 5분까지 진행하면 용출효율을 높일 수 있습니다. 또한, 용출 과정에서 Magnetic Nano Bead-Oligo dT가 용출액에 완전히 부유 상태가 되도록 해야 합니다.

	• mRNA의 비드 재결합: 용출 후 비드와 mRNA 용출액을 즉시 분리하지 않으면 mRNA가 다시 비드에 결합하여 수율이 감소할 수 있습니다. 이를 방지하기 위해 용출 직후 즉시 mRNA 용출액을 분리해야 합니다.
mRNA 분해 (Degraded mRNA)	• RNase 오염 가능성: 공기 중 RNase 오염을 방지하기 위해 클린벤치에서 열풍기(Heat gun)나 드라이어를 사용하여 작업 공간을 처리합니다. RNase-free 피펫 팁을 사용하고, 장갑은 자주 교체해야 합니다. • 부적절한 시료 보관: 배양 세포 시료와 조직 시료는 반드시 -80°C에서 보관해야 합니다. • 반복적인 동결·해동: RNA는 반복적인 동결·해동 과정에서 쉽게 분해되므로 이를 피해야 합니다.
DNA 오염 (Contaminated with DNA)	• 시료 용해액 또는 세척 버퍼의 불완전 제거: 자성 분리 과정에서 모든 용해액과 세척 버퍼를 완전히 제거해야 합니다. • 세척 불충분: mRNA가 결합된 비드가 각 세척 단계에서 완전히 재현탁되도록 해야 합니다.

부록

RNA 시료의 흡광도 측정(Measurement of absorbance of RNA samples)

A_{260}/A_{280} 비율은 핵산의 순도를 평가하는 데 일반적으로 사용되는 지표이며, 순수한 RNA의 경우 일반적으로 2.0보다 큰 값을 보입니다. 다만, 이 파장에서의 핵산 흡광도는 용액의 이온 강도와 pH에 따라 변할 수 있습니다. 특히 이온 강도나 pH가 증가하면 280 nm에서의 흡광도가 감소하여 A_{260}/A_{280} 비율이 변동될 수 있습니다. 분광광도 분석 시에는 RNA를 DEPC-DW로 희석하여 사용하는 것을 권장합니다.

1. RNA 시료의 부피를 측정합니다.
2. RNA 시료 1 μL 를 1.5 mL 튜브에 옮깁니다.
3. DEPC-DW 999 μL 를 첨가하고, 피펫팅으로 혼합합니다.
4. DEPC-DW를 기준(Blank)으로 하여 A_{260} 과 A_{280} 을 측정합니다.
5. RNA 수율은 다음과 같이 계산합니다.
 $1 A_{260} \text{ unit of RNA} = 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$
 $\text{Total } A_{260} = (A_{260} \text{ of diluted sample}) \times (\text{dilution factor})$
 $\text{Concentration } (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{total } A_{260}) \times (40 \mu\text{g}/\mu\text{L})$
 $\text{Yield } (\mu\text{g}) = (\text{total sample volume}) \times (\text{concentration})$
6. A_{260}/A_{280} 비율을 계산합니다. 순수한 RNA는 일반적으로 A_{260}/A_{280} 비율이 2.0보다 큰 값을 갖습니다.

참고 문헌

Bauer, M., Polzin, S., & Patzelt, D. (2004). Extraction of mRNA from degraded forensic sample material after different storage conditions. *Forensic Science International*, 139(2–3), 137–143.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.10.029>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Isolation of poly(A)+ RNA using magnetic oligo(dT) beads. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(10), pdb.prot100479. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100479>

Hornes, E., & Korsnes, L. (1990). Magnetic DNA hybridization properties of oligonucleotide probes attached to superparamagnetic beads and their use in the isolation of poly(A) mRNA from eukaryotic cells. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6339–6345. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6339>

Schmid, M., & Speiseder, T. (2007). Fast mRNA isolation from cells and tissues using magnetic beads. *Biotechniques*, 43(2), 229–232. <https://doi.org/10.2144/000112499>

주문 정보

제품명		Cat. No.
EcoQprep™ mRNA Kit	50 reactions	K-3708

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

 배치 번호	 사용설명서 참조	 연구용 시약 전용	 주의
 재사용 금지	 시험(n회) 분량 포함	 보관 온도 제한	 제조원
 제품 번호	 사용 기한		

BIONEER Corporation - HQ

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

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 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.com
Web us.bioneer.com

BIONEER Corp. - European Branch

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