



Please contact us,
if you have any question and need help.



T)1670-5695



www.bio-ft.com



info@bio-ft.com

Quick Guide

Beyond the PCR technology,
BIOFACT promises the progress for your research.



***Da*Bead™ Total RNA Prep Kit(Plant Tissue)**
- Leaf, Stem, Root, Seed
[For Magnetic Bead]

Total RNA Prep Kit For Plant Tissue

MEMO

Table of Contents.

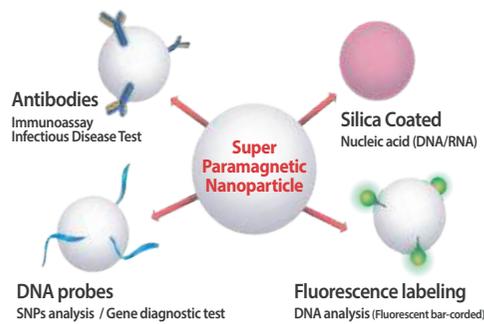
- Description 1
- Know-How 2
- Troubleshooting 3
- Various Plant Samples 4
- Preparation 4
- Protocol 5
- 주의사항 7

Total RNA Prep Kit For Plant Tissue

[Cat. No. RP703-100, RP703-200]

Description

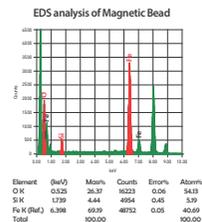
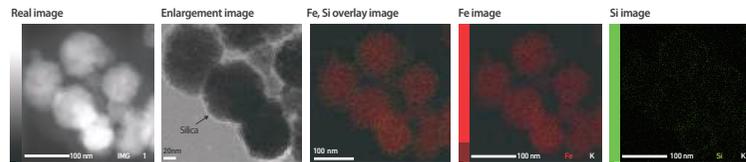
DaBead™ Magnetic Bead는 superparamagnetic nanoparticle 표면을 silica로 coating하여 핵산 정제용으로 개발된 제품입니다. Plasmid, PCR Product, Genomic DNA등 다양한 시료로부터 쉽고 빠르게 고농도의 DNA를 추출, 정제 할 수 있습니다. 일반 Column type / Solution type의 Prep Kit보다 빠르게 추출이 가능하며, 원심분리 단계를 최소화하여 간편하게 사용 할 수 있습니다. 또한, 현장 진단용 prep kit나 Automation 장비에 응용 가능합니다.



Magnetic Bead Feature

- 균일한 Bead size
- 핵산과 bead의 높은 결합력으로 적은 양의 시료도 정제 가능
- 원심분리기 사용없이 단시간에 핵산추출
- 다양한 종류의 시료, 다양한 size의 DNA size 정제에 적용 가능
- 간결한 정제 step으로 미숙련자도 사용 용이
- Bead간 응집반응 최소화
- Bead의 polymer shell로 철의 독성 노출방지

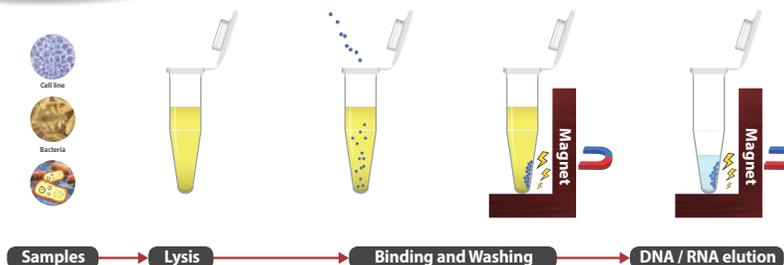
Typical SEM, TEM images of silica coated superparamagnetic nanoparticles



JED-2300 AnalysisStation

JEOL

Preparation Step



Know-How for Preparation

1. Washing Buffer(Buffer, 75% Ethanol)는 실험 시작 전 fresh하게 만들어서 사용하시기 바랍니다.
2. Lysis Buffer에는 반드시 2-mercaptoethanol(2-ME)를 첨가하여 사용해야 하며, 혼합된 Solution은 4°C에서 보관하고 일주일 이상 사용하지 않습니다.
3. RNA Elution 전에 Heat block, Dryer 등을 이용하여 EtOH을 충분히 제거합니다.
4. Seed 시료는 Lysis 단계에서 RNA Binding Enhancer 50 µl 첨가후 incubation을 진행합니다.
5. DaBead™ Magnetic Separation Stand는 Aluminum 재질로 열전도율이 높아 EtOH 건조 단계에서 dry oven에 장시간 방치하거나 dryer를 사용할 시 온도가 높아질 수 있으므로 유의합니다.
6. Elution Buffer(RNase free water) 첨가 후 elution 시 60°C, 2~5 분 incubation하면 더 높은 yield의 RNA를 회수하실 수 있습니다.
7. 완전히 제거되지 않은 Ethanol은 다음 단계 실험에 영향을 미칠 수 있으므로 Heat block (or dryer)을 이용하여 충분히 제거합니다.
8. Magnetic Bead, 100% Isopropanol, 100% Ethanol 첨가시 반드시 vortex mix하여 충분히 혼합되도록 합니다.
9. DNase I mixture반응 시 incubation 시간이 15 min을 초과하지 않도록 합니다.
10. RNase가 오염된 실험실 환경은 RNA degradation의 주된 원인이므로 실험공간의 RNase를 제거하고, autoclave된 RNase free pipette tip을 사용합니다.
11. 기타 문의사항은 (주)바이오팩트 학술서비스팀 (☎ 1670-5695)로 연락주세요.

Total RNA Prep Kit For Plant Tissue

[Cat. No. RP703-100, RP703-200]

✔ Troubleshooting

Trouble	Check List
Low Yield RNA	<p>01. Washing buffer를 만든지 오래 된 것은 아닌가요? Washing Buffer를 만든지 오래 되었을 경우 evaporation으로 인해 Ethanol의 농도가 낮아져 yield가 떨어지게 됩니다.</p> <p>02. Magnetic Bead를 첨가한 후 충분히 vortexing하셨나요? RNA가 bead에 충분히 binding 할 수 있도록 10 sec, vortexing한 후 1 min동안 incubation합니다.</p> <p>03. DNase I Incubation을 너무 오래하셨나요? DNase I Incubation 시간을 15 min 이상 진행하지 않도록 주의하십시오.</p> <p>04. Washing Step에서 magnetic bead가 loss되지 않았나요? Magnetic separation stand에 장착 후 30 초 ~ 1 분 동안 충분한 binding 시간을 갖습니다. 또한 실험 진행 중 튜브 뚜껑에 묻어있는 Magnetic bead가 소실될 수 있으므로 Magnetic separation stand에 1.5ml Tube를 장착 후 앞뒤로 inverting하여 흡착되지 않은 Magnetic bead 도 회수할 수 있도록 합니다.</p>
Purified RNA is degraded	<p>01. RNase 가 오염된 것은 아닌가요? 멸균된 일회용 RNase free 피펫 팁을 사용하고, 작업테이블에 RNA away를 사용하여 RNase를 제거하도록 하십시오.</p> <p>02. 정제된 RNA 보관온도를 확인하셨나요? 정제된 RNA는 2주 이내에 사용 시에는 -20 °C 에서 보관해야 합니다. 장기보관 (1개월 이상)의 경우 -80 °C에서 보관하는 것이 좋습니다.</p>
Genomic DNA Contamination	<p>01. 많은 양의 시료를 사용하지 않았나요? 잎, 줄기, 뿌리의 경우 (< 80 mg), 씨앗 (< 50 mg) 으로 사용하도록 하십시오. 많은 양의 시료를 사용할 경우 DNase I 처리 효율이 떨어지게 됩니다.</p>
Low Quality RNA / Inhibition of downstream enzymatic reactions	<p>01. Washing 단계 후 EtOH을 충분히 건조 하셨나요? Elution된 RNA에 EtOH이 포함되어 있을 경우 다음 단계의 실험 진행에 문제가 발생할 수 있습니다. 이를 해결하기 위해 Washing 단계 후 Heat Block (50 ~ 60 °C) 10 min 또는 상온에서 15 min 을 두어 EtOH을 완전히 건조한 후 elution 합니다.</p> <p>02. RNA의 농도가 낮은가요? Spectrophotometer를 이용하여 Purity 측정 시 농도가 낮을 경우 260/230, 260/280 ratio 측정값의 신뢰도가 떨어질 수 있습니다. 농도 측정 시 전기영동을 통해 확인하시는 것을 권장드립니다.</p>
Hard to separate the magnetic beads.	<p>01. Elution Volume이 너무 적은 것은 아닌가요? 추출된 RNA의 양이 많은 경우, 용출된 용액의 점도가 높아 Magnetic bead가 자석에 흡착되는 것을 저해하거나 RNA가 완전히 elution되지 않을 수 있습니다. Elution volume을 늘려 진행하거나 elution이 끝난 bead에 Elution Buffer를 한번 더 넣고 elution을 수행하면 회수율을 높일 수가 있습니다.</p>

✔ Equipment and Reagent to Be supplied by User

- Magnetic Separation Stand
- Vortex Mixer
- Heat Block
- 1.5 / 2.0 ml tube / mortar
- Pipette & Tips
- Ethanol(100%)
- Isopropanol(100%)
- Option : Dryer, Dry oven

✔ Various Plant Samples

Plant Samples	
• Lettuce	• Broccoli
• Lettuce seed	• pak choy
• Canola leaves	• Shepherd's purse leaves
• Canola stem	• Shepherd's purse root
• Sesame leaves	• Lxeris root
• Sesame seed	• Green Onion leaves

✔ Preparation.

1. Lysis Buffer는 반드시 2-mercaptoethanol(2-ME)를 첨가하여 사용해야 하며, 혼합된 Lysis Buffer/2-ME 은 일주일 이상 사용하지 않도록 함 (첨가비율: 2-ME, 10 µl / 1 ml 실험 전 혼합하여 사용하는 것을 권장)
2. Washing Buffer 1, Bottle에는 반드시 100% Ethanol을 90 ml (50 prep 기준)을 넣어 사용
3. Washing Buffer 2, Bottle에는 반드시 100% Ethanol을 넣어 사용
4. Sample
 - Plant Tissue (Leaf, Stem, Root)는 Fresh 한 상태의 시료 < 80 mg 사용
 - Seed sample 은 < 50 mg 사용
 - 막자사발에서 Liquid nitrogen으로 Fresh-Frozen tissues를 최대한 곱게 갈아주며, RNA 분해를 최소화하기 위해 샘플을 차갑게 유지하고 신속하게 다음 작업 수행

Total RNA Prep Kit For Plant Tissue

[Cat. No. RP703-100, RP703-200]

✓ Protocol.

Cell Lysis & Magnetic Bead Binding

※Seed Sample

- 1: Sample (< 80, 50 mg) + Lysis Buffer 500 μ l 첨가 (+ RNA Binding Enhancer 50 μ l 첨가) → Vortex (10 sec)
→ Incubation (60°C, 10 min)
- 2: 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4°C)
→ 상층액을 1.5 ml 새로운 tube에 옮긴 후 Magnetic bead 20 μ l 첨가
- 3: 100% Isopropanol 500 μ l 첨가 후 vortex (10 sec)
→ 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착 (30 sec ~ 1 min간 binding)
→ Stand에 tube가 장착된 상태로 5회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead 회수
→ 1 min 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거 (Pipetting하여 제거 권장)

DNase I Treatment

- 4: Washing Buffer-1(75% Ethanol) 800 μ l 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 제거
- 5: DNase I Solution 100 μ l 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Incubation (RT, 10 min)

※ DNase I Solution 제조 방법

(DNase I 2 μ l + 10X DNase I Buffer 10 μ l + RNase free water 88 μ l = 100 μ l)

Rebinding to Magnetic Bead

- 6: 100% EtOH 500 μ l 첨가 후 vortex (10 sec)
→ 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착 (30 sec ~ 1 min간 binding)
→ Stand에 tube가 장착된 상태로 5회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead 회수
→ 1 min 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거 (Pipetting하여 제거 권장)

Magnetic Bead Washing & Dry

- 7: Washing Buffer-1(75% Ethanol) 800 μ l 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 제거 (동일한 방법으로 한번 더 진행, 총 2회)
- 8: Washing Buffer-2(100% Ethanol) 800 μ l 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 을 Pipette으로 완전히 제거
- 9: 건조 (Heat Block (50 ~ 60°C) 10 min / 상온 15 min)
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Pipette으로 완전히 제거
※ Dryer를 사용할 경우, 냉풍으로 사용하고 Contamination방지를 위해 1.5 ml tube 옆면을 씻어 주세요.

RNA Elution

- 10: Stand에서 1.5ml tube를 분리 후 RNase free water를 100 ~ 200 μ l 첨가
→ Vortexing (5 sec) or Tapping → Incubation (60°C, 2 min) → Vortexing (5 sec)
→ Magnetic bead를 stand에 장착 후 1 min 뒤 eluted RNA를 새로운 1.5ml tube에 옮김
→ Agarose Gel에 전기영동하여 농도 확인 → 4°C 또는 -80°C에서 보관

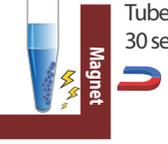
✓ Work Flow

Step 1  Sample (< 80(50) mg)
+ Lysis Buffer 500 μ l
(+ RNA Binding Buffer 50 μ l)
Vortexing, 10 sec
Incubation (60°C, 10 min)

Step 2  cfg (14,000 rpm, 5 min, 4°C)

Step 3  NEW 1.5 ml tube에 상층액 Transfer
+ Magnetic Bead 20 μ l
Vortexing, 10 sec
Incubation (RT, 1 min)

Step 4  + 100% Isopropanol 500 μ l
Vortexing, 10 sec

Step 5  Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 solution 제거

Step 5  + Washing Buffer-1 800 μ l
Tube를 Stand에서 분리
한 후 10 sec, Vortexing

Step 5  Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 solution 제거

Step 6  + DNase I Solution 100 μ l
Tube를 Stand에서 분리
한 후 10 sec, Vortexing
Incubation (RT, 10 min)

Step 7  + 100% EtOH 800 μ l
Tube를 Stand에서 분리
한 후 10 sec, Vortexing
Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 solution 제거

Step 9  + Washing Buffer-1 800 μ l
Tube를 Stand에서 분리
한 후 10 sec, Vortexing
Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 solution 제거
x 2회

Step 10  + Washing Buffer-2 800 μ l
Tube를 Stand에서 분리
한 후 10 sec, Vortexing
Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 solution 제거
pipette으로 완전히 제거

Step 10  Dry (Heat Block 50~60°C, 10 min)

Step 11  Tube를 Stand에서 분리 후
RNase free water 100 ~ 200 μ l
(60°C 2 min, Vortexing 10 sec)
Tube를 Magnetic stand 장착
30 sec ~ 1 min 후 Eluted RNA를
새로운 Tube에 Transfer

Eluted RNA

☑ 주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항



- 제품의 유효기간은 구입일로부터 **1년 6개월**이다.
- 설명서에 나온 지침에 따라 제품을 사용하였을 경우에만 제품의 품질을 보증한다.
- 실험자의 잘못된 사용이나 부주의로 인해 문제가 발생하였을 경우에는 교환이 되지 않는다.

안전경고 및 응급조치 요령



- 눈, 호흡기, 피부 접촉을 피한다.
- 눈에 들어갔을 때 : 흐르는 물로 눈을 씻을 것.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것
- 피부에 접촉했을 때 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 장갑 착용 후 사용할 것.
- Magnetic Separation Stand를 dry oven이나 dryer에 장시간 노출할 경우 화상 주의

사용자 유의사항



- 유효기한이 지난 제품의 사용을 금지한다.
- Proteinase K / Lysozyme / Lyticase / RNase A는 1차 사용 후 냉동(냉장)보관하며 사용하도록 한다.
- 냉동 제품을 자주 열리고 녹이는 과정을 반복할 경우, 활성이 저하될 수 있으므로 주의한다. 필요한 경우, 일정량을 분주하여 보관, 사용하도록 한다.
- 조직은 정해진 순서에 따라 정확히 하여야 하며, 키트는 개봉 후 즉시 사용한다.
- 분리된 검체 DNA /RNA 상태에 따라 상이한 결과를 보일 수 있다.
- 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의한다.



MEMO