



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

For Bacterium, Cultured Cell, Animal Tissue, Yeast

[For Magnetic Bead]

✓ Table of Contents.

- Description ----- 1
- Things to do before starting ----- 3
- Gram(-), Gram(+) ----- 5
- Cultured Cell ----- 7
- Animal Tissue ----- 9
- Yeast ----- 11
- Troubleshooting ----- 13

✓ Know-How for Preparation

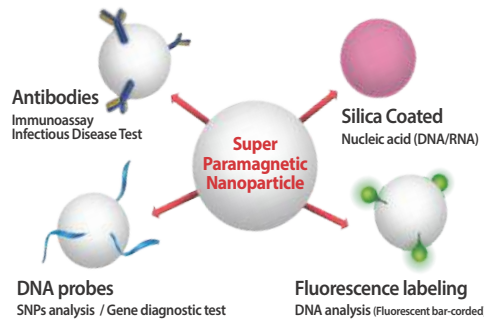
1. 실험 시작 전, Lysis Buffer에 2-Mercaptoethanol을 첨가하여 사용하시기 바랍니다.
2. Elution Buffer 첨가 전에 Dry oven, Heat block을 이용하여 Bead를 충분히 건조하여 남아있을 EtOH을 충분히 제거합니다.
3. Tissue sample의 경우 fresh한 시료를 막자사발, Grinder를 이용하여 최대한 곱게 갈아 사용하도록 합니다.
4. Dryer를 사용할 경우, 오염방지를 위해 1.5 ml tube 옆면을 heating해 주세요. Dry oven을 사용할 경우는 오염방지를 위해 aluminium foil로 감싸 건조해주세요 .
5. HiSol™ Magnetic Separation Stand는 Aluminum 재질로 열전도율이 높아 EtOH 건조 단계에서 dry oven에 장시간(20분 이상) 방치하거나 dryer를 사용할 시 온도가 높아질 수 있으므로 주의하시길 바랍니다.
6. RNase free water 첨가 후 elution 시 60°C, 2~5 분 incubation하면 더 높은 농도의 RNA를 회수하실 수 있습니다.
7. Elution volume은 RNA 농도에 따라 감소/증가하여 사용하도록 합니다. (RNA 수율이 높아 Elution 시 점성이 생기는 경우 Elution volume을 증가시켜주는 것이 좋습니다.)
8. Elution 전, 제거되지 않은 Ethanol은 다음 단계 실험에 영향을 미칠 수 있으므로 Heat block (or dryer, dry oven)을 이용하여 충분히 제거합니다.
9. 기타 문의사항은 (주)바이오팩트 학술서비스팀 (☎ 1670-5695)로 연락주세요.

Total RNA Prep Kit - Bacterium, Cultured Cell, Animal Tissue, Yeast

[Cat. No. RP701-100]

Description

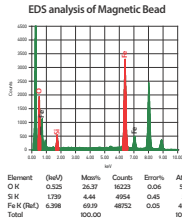
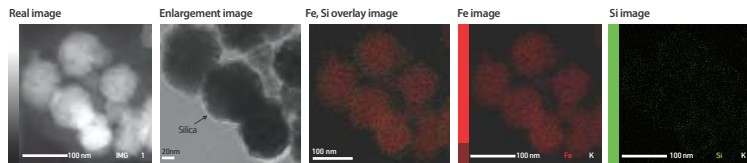
DaBead™ Magnetic Bead는 super paramagnetic nanoparticle 표면을 silica로 coating하여 핵산 정제용으로 개발된 제품입니다. 다양한 시료로부터 쉽고 빠르게 고농도의 total RNA를 추출, 정제 할 수 있습니다. 일반 Column type / Solution type의 Prep Kit보다 빠르게 추출이 가능하며, 원심분리 단계를 최소화하여 간편하게 사용 할 수 있습니다. 또한, 현장 진단용 prep kit나 Automation 장비에 응용 가능합니다.



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

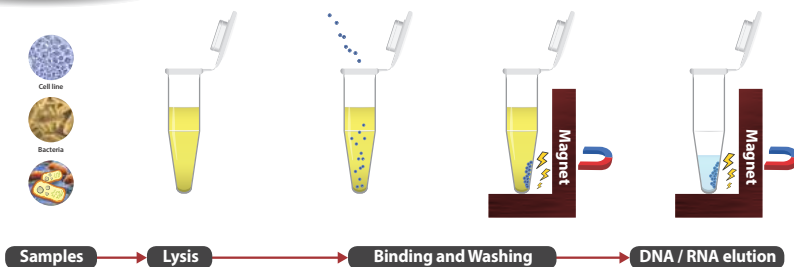
Typical SEM, TEM images of silica coated superparamagnetic nanoparticles



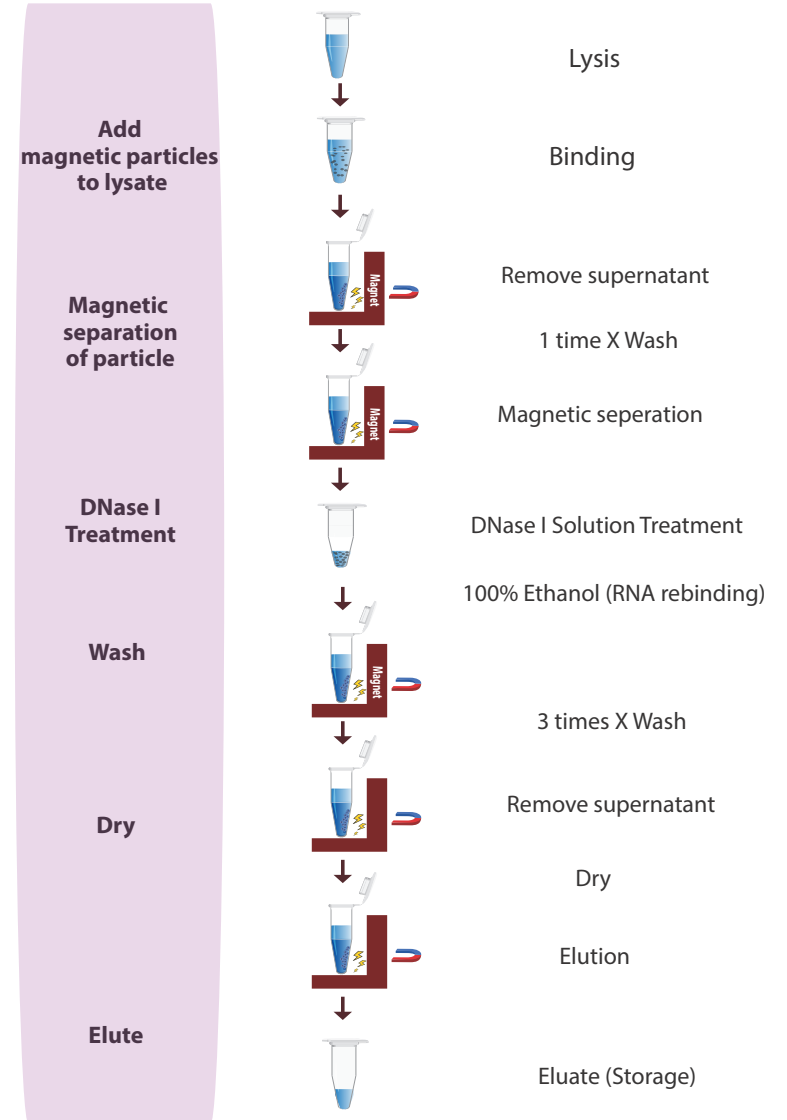
JED-2300 AnalysisStation

JEOL

Preparation Step



DaBead™ Total RNA Prep Kit Procedure



✓ Things to do before starting

1. Lysis Buffer는 반드시 2-mercaptoethanol(2-ME)를 첨가하여 사용해야 하며, 혼합된 Lysis Buffer/2-ME Solution은 4°C에서 보관하고 일주일 이상 사용하지 않도록 합니다.
* 혼합 비율 : 3.5µl 2-ME / 350 µl Lysis Buffer
실험 전, (prep 수 + 1 or 2)을 첨가비율에 곱하여 혼합하여 사용하는 것을 권장합니다.
2. DNase I Solution 준비
실험 전 reaction 양 만큼 만들어 사용하도록 합니다.
< 1 reaction 기준 : DNase I 2 µl + 10X DNase I Buffer 10 µl + RNase free water 88 µl = 100 µl >
3. Washing Buffer-1 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol, 75ml** 을 첨가하여 사용하시길 바랍니다.
4. Washing Buffer-2 Bottle은 빈 bottle로 제공되므로 100% Ethanol을 넣어 사용하세요.

✓ Kit Contents

DaBead™ Total RNA Prep Kit For Bacterium, Cultured cell, Animal Tissue, Yeast	
Number of samples	100 prep
Lysis Buffer	40 ml
Washing Buffer-1	2 x 25 ml
Washing Buffer-2	Empty bottle (provided)
Magnetic Bead	3 x 1.1 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	550 µl
Lyticase (2.5Unit/ml)	250 µl
Lyticase Resuspension Buffer	1 ml
Lysozyme (100 mg/ml)	550 µl
RNase Free Water	25 ml
DNase I	220 µl
10X DNase I Buffer	1.1 ml
Quick Guide	1 ea

MEMO

Total RNA Prep Kit - Bacterium(Gram(+), Gram(-))

◆ Bacterium

[Cat. No. RP701-100]

✓ Protocol.

[Cell Lysis & Magnetic Bead Binding]

1: 시료 준비.

- 균주 특성에 맞게 배양된 세포를 사용하며, 1 prep 당 1×10^8 cells/ml 이하로 사용하시길 권장합니다.
- 과잉배양된 세포를 prep할 경우 RNA 추출효율에 영향을 줄 수 있으므로 적정량(1×10^8 cells/ml 이하)을 희석 및 나누어 사용하시길 바랍니다.

2: 배양된 **bacteria cell (up to 1×10^8 cells)**를 1.5ml tube에 옮겨 **10,000 rpm**에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거합니다.

3: Cell pellet에 **100 μ l RNase free water**와 **5 μ l Lysozyme (100mg/ml)**를 넣고 10초간 vortexing 하여 pellet을 풀어줍니다.

4: 상온(RT)에서 **incubation** 합니다. (**Gram(-): 5mins, Gram(+): 1hr**)

5: **Lysis Buffer(+2-ME) 350 μ l**를 넣고 vortexing하여 혼합해줍니다.

(Note) Lysis Buffer에 2-ME를 꼭 넣어 사용하시길 바랍니다. ("Things to do before starting"를 참고하세요)

6: 5의 혼합액을 **5분간 상온 방치**합니다.

7: **4°C**에서 **5분간 14,000rpm**로 원심분리합니다. 상층액은 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

8: **Magnetic Bead 30 μ l**를 첨가하고 10초간 vortexing 하여 혼합합니다.
혼합액은 1분간 incubation 해주세요.

9: **100% Ethanol 250 μ l**를 첨가하여 혼합합니다.

10: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

11: Tube에 **Washing Buffer-1 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

(Note) 남아 있는 EtOH은 다음 step의 반응을 방해하므로, EtOH을 완전히 제거하여 진행하시길 바랍니다.

[DNase I Treatment]

12: **DNase I Solution 100 μ l**를 첨가합니다. 10초간 vortexing하여 혼합 후, **10분간 상온 방치**합니다.

(DNase I Treatment Step) 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]

13: Tube에 **100% Ethanol 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

[Magnetic Bead Washing & Dry]

14: Tube에 **Washing Buffer-1 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

15: **Step 14**을 한번 더 반복하여 washing 해줍니다.

16: Tube에 **Washing Buffer-2 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution을 **완전히 제거**합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

17: **Heat Block(60°C)**에서 10 분간 incubation하여 Bead를 건조합니다.

(Option) Dryer를 사용할 경우, 냉풍으로 사용하고 Contamination방지를 위해 1.5 ml tube 옆면을 씻어 주세요.

[RNA Elution]

18: Stand에서 1.5ml tube를 분리 후 **RNase free water 100 ~ 200 μ l** 첨가합니다.
Vortexing 또는 tapping을 통해 bead를 풀어줍니다.

19: Tube를 **60°C**에서 **2분간 incubation** 합니다.

20: **15초간 vortexing** 합니다.

21: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
Eluted RNA를 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

Total RNA Prep Kit - Cultured Cell

◆ Cultured Cell

[Cat. No. RP701-100]

✓ Protocol.

[Cell Lysis & Magnetic Bead Binding]

1: 시료 준비.

- 배양된 세포는 counting 하여 적절한 양의 세포(2×10^6 cells/mL 이하 사용 권장)를 사용하시길 바랍니다.
- 남아있는 medium의 경우 RNA 추출효율을 감소시키므로 PBS washing과 pipette을 이용하여 medium을 최대한 제거하고 실험하시길 바랍니다.
- 시료는 ice에 보관하여 실험을 진행하시길 바랍니다.

2: Lysis Buffer(+2-ME) 350 μ L 를 넣고 vortexing하여 혼합해줍니다.

(Note) Lysis Buffer에 2-ME를 꼭 넣어 사용하시길 바랍니다. ("Things to do before starting"를 참고하세요)

3: 3의 혼합액을 10분간 상온 방치합니다.

4: Magnetic Bead 30 μ L 를 첨가하고 10초간 vortexing 하여 혼합합니다.

혼합액은 1분간 incubation 해주세요.

5: 100% Ethanol 250 μ L 를 첨가하여 혼합합니다.

6: 1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

7: Tube에 Washing Buffer-1 800 μ L 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

(Note) 남아 있는 EtOH은 다음 step의 반응을 방해하므로, EtOH을 완전히 제거하여 진행하시길 바랍니다.

[DNase I Treatment]

8: DNase I Solution 100 μ L 를 첨가합니다. 10초간 vortexing하여 혼합 후, 10분간 상온 방치합니다.

(DNase I Treatment Step) 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]

9: Tube에 100% Ethanol 800 μ L 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

[Magnetic Bead Washing & Dry]

10: Tube에 Washing Buffer-1 800 μ L 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

11: Step 10을 한번 더 반복하여 washing 해줍니다.

12: Tube에 Washing Buffer-2 800 μ L 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution을 완전히 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

13: Heat Block(60°C)에서 10 분간 incubation하여 Bead를 건조합니다.

(Option) Dryer를 사용할 경우, 냉풍으로 사용하고 Contamination방지를 위해 1.5 mL tube 옆면을 씻어 주세요.

[RNA Elution]

14: Stand에서 1.5mL tube를 분리 후 RNase free water 100 ~ 200 μ L 첨가합니다.

Vortexing 또는 tapping을 통해 bead를 풀어줍니다.

15: Tube를 60°C에서 2분간 incubation 합니다.

16: 15초간 vortexing 합니다.

17: 1.5mL tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

Eluted RNA를 새로운 1.5mL tube로 옮겨줍니다.

 Animal Tissue

 Protocol.

[Cell Lysis & Magnetic Bead Binding]

1: Sample Preparation.

- 막자사발을 이용한 분쇄
 - ① fresh-frozen tissue를 사발에 넣고 액체질소로 급속냉동시킨 후, 막자로 충분히 분쇄한다.
 - ② 분쇄된 tissue는 무게를 측정하여 tube에 옮긴다. (30mg 이하 권장)
 - ③ Samples은 냉동상태로 보관하며, DNA degradation을 최소화하기 위해 다음 step으로 빠르게 진행합니다.

2: Sample이 담긴 tube에 **Lysis Buffer(+2-ME) 350 μ l**과 **Proteinase K(20mg/ml) 5 μ l**를 첨가한 후 충분히 혼합해줍니다. (Vortexing 최소 1분)

(Note) Lysis Buffer에 2-ME를 꼭 넣어 사용하시길 바랍니다. (“Things to do before starting”를 참고하세요)

3: **상온(RT)**에서 **10분간 incubation** 합니다.
조직이 단단한 경우는 60°C에서 10분간 incubation 합니다.

4: **4°C**에서 **5분간 14,000rpm**로 원심분리합니다. 상층액은 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

5: **Magnetic Bead 30 μ l**를 첨가하고 10초간 vortexing 하여 혼합합니다.
혼합액은 1분간 incubation 해주세요.

6: **100% Ethanol 250 μ l**를 첨가하여 혼합합니다.

7: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

8: Tube에 **Washing Buffer-1 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)
(Note) 남아 있는 EtOH은 다음 step의 반응을 방해하므로, EtOH을 완전히 제거하여 진행하시길 바랍니다.

[DNase I Treatment]

9: **DNase I Solution 100 μ l**를 첨가합니다. 10초간 vortexing하여 혼합 후, **10분간 상온 방치**합니다.
(DNase I Treatment Step) 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]

10: Tube에 **100% Ethanol 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

[Magnetic Bead Washing & Dry]

11: Tube에 **Washing Buffer-1 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

12: **Step 11**을 한번 더 반복하여 washing 해줍니다.

13: Tube에 **Washing Buffer-2 800 μ l**를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution을 **완전히 제거**합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

14: **Heat Block**(60°C)에서 10 분간 incubation하여 Bead를 건조합니다.
(Option) Dryer를 사용할 경우, 냉풍으로 사용하고 Contamination방지를 위해 1.5 ml tube 옆면을 씻어 주세요.

[RNA Elution]

15: Stand에서 1.5ml tube를 분리 후 **RNase free water 100 ~ 200 μ l** 첨가합니다.
Vortexing 또는 tapping을 통해 bead를 풀어줍니다.

16: Tube를 **60°C**에서 **2분간 incubation** 합니다.

17: **15초간 vortexing** 합니다.

18: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
Eluted RNA를 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

Total RNA Prep Kit - Yeast

◆ Yeast

[Cat. No. RP701-100]

✓ Protocol.

[Cell Lysis & Magnetic Bead Binding]

1: 시료 준비.

- 균주 특성에 맞게 배양된 세포를 사용하며, 1 prep 당 1×10^8 cells/ml 이하로 사용하시길 권장합니다.
- 과잉배양된 세포를 prep할 경우 RNA 추출효율에 영향을 줄 수 있으므로 적정량(1×10^8 cells/ml 이하)을 희석 및 나누어 사용하시길 바랍니다.

2: 배양된 yeast cell (up to 1×10^8 cells)를 1.5ml tube에 옮겨 10,000 rpm 에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거합니다.

3: Cell pellet에 100 μ l RNase free water와 1 μ l Lyticase (2.5unit/ml) 를 넣고 10초간 vortexing 하여 pellet 을 풀어줍니다.

4: 30°C에서 30분간 incubation 합니다.

5: Lysis Buffer(+2-ME) 350 μ l 를 넣고 vortexing하여 혼합해줍니다.

(Note) Lysis Buffer에 2-ME를 꼭 넣어 사용하시길 바랍니다. ("Things to do before starting"를 참고하세요)

6: 5의 혼합액을 10분간 상온 방치합니다.

7: 4°C에서 5분간 14,000rpm로 원심분리합니다. 상층액은 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

8: Magnetic Bead 30 μ l 를 첨가하고 10초간 vortexing 하여 혼합합니다.
혼합액은 1분간 incubation 해주세요.

9: 100% Ethanol 250 μ l 를 첨가하여 혼합합니다.

10: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

11: Tube에 Washing Buffer-1 800 μ l 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.
1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.
Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.
1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

(Note) 남아 있는 EtOH은 다음 step의 반응을 방해하므로, EtOH을 완전히 제거하여 진행하시길 바랍니다.

[DNase I Treatment]

12: DNase I Solution 100 μ l 를 첨가합니다. 10초간 vortexing하여 혼합 후, 10분간 상온 방치합니다.

(DNase I Treatment Step) 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]

13: Tube에 100% Ethanol 800 μ l 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

[Magnetic Bead Washing & Dry]

14: Tube에 Washing Buffer-1 800 μ l 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거합니다.

15: Step 14을 한번 더 반복하여 washing 해줍니다.

16: Tube에 Washing Buffer-2 800 μ l 를 첨가하고 1분간 vortexing하여 혼합해줍니다.

1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

1분 후 stand에 장착된 상태로 solution을 완전히 제거합니다. (Pipetting하여 제거 권장)

17: Heat Block(60°C)에서 10분간 incubation하여 Bead를 건조합니다.

(Option) Dryer를 사용할 경우, 냉풍으로 사용하고 Contamination방지를 위해 1.5 ml tube 옆면을 씻어 주세요.

[RNA Elution]

18: Stand에서 1.5ml tube를 분리 후 RNase free water 100 ~ 200 μ l 첨가합니다.

Vortexing 또는 tapping을 통해 bead를 풀어줍니다.

19: Tube를 60°C에서 2분간 incubation 합니다.

20: 15초간 vortexing 합니다.

21: 1.5ml tube를 Magnetic separation stand에 장착하여 1분간 방치합니다.

Stand에 tube가 장착된 상태로 3-4회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead를 회수합니다.

Eluted RNA를 새로운 1.5ml tube로 옮겨줍니다.

Total RNA Prep Kit - Bacterium, Cultured Cell, Animal Tissue, Yeast

[Cat. No. RP701-100]

✔ Troubleshooting

Trouble	Check List
Low RNA Yield	<p>01. Washing buffer-1를 만든지 오래 된 것은 아닌가요? Washing Buffer(75% Ethanol)를 만든지 오래 되었을 경우 evaporation으로 인해 Ethanol의 농도가 낮아져 yield가 떨어지게 됩니다. Washing Buffer를 새로 만들어 사용해 보세요.</p> <p>02. Washing Buffer-1에 Ethanol을 첨가 하셨나요? Washing Buffer에는 사용 전 반드시 Protocol에 기재된 용량만큼 96 - 100% Ethanol을 첨가하셔야 합니다.</p> <p>03. Binding Buffer / Magnetic Bead 첨가한 후 충분히 Inverting하셨나요? RNA pellet이 뭉칠 수 있도록, RNA가 magnetic bead에 충분히 binding 할 수 있도록 충분히 vortex 하여야 합니다.</p> <p>04. Washing Step에서 magnetic bead가 loss되지 않았나요? Magnetic Bead가 magnetic separation stand에 완전히 부착되도록 stand에 장착 후 30 sec ~ 1 min 정도 충분한 binding 시간을 갖습니다. 또한 실험 진행 중 bead가 tube cap부분에 부착하여 loss 될 수 있으므로 magnetic separation stand에 장착 후 stand채로 앞뒤로 inverting하여 stand에 장착되지 않은 bead도 회수할 수 있도록 합니다.</p> <p>05. Enzyme(Lysozyme, Lyticase, Proteinase K)은 어디에 보관하셨나요? Prep에 사용되는 enzyme들의 경우, dry 상태에서는 상온 보관이 가능하지만 D.W로 녹이거나, Buffer를 첨가한 이후에는 냉장 또는 냉동 보관하셔야 합니다. 그렇지 않을 경우 enzyme activity가 떨어져 prep yield에 영향을 줄 수 있습니다. 장기간 보관 시, 냉동보관을 권장드립니다.</p> <p>06. Proteinase K, Lysozyme, Lyticase 첨가 후 Incubation은 충분히 하셨나요? Dry되어 있는 enzyme은 D.W에 녹인 후 냉장(냉동)보관하여 사용하며, 사용 시 protocol에 기재된 반응 온도와 시간을 지키도록 합니다.</p>
Nicked RNA Degraded RNA	<p>01. Nuclease가 오염된 것은 아닌가요? Plasticware나 buffer에 nuclease가 오염되었는지 확인하고, plasticware는 사용 전 autoclave 하여 사용하세요.</p>
Low RNA Quality	<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 Dry oven, Dryer, Heat Block을 이용하여 EtOH을 완전히 건조한 후 한 후 elution하면 됩니다.</p>

✔ Troubleshooting

Trouble	Check List
Hard to separate the magnetic beads.	<p>01. RNA의 농도가 너무 높나요? RNA의 농도가 높은 경우 washing 및 Elution 시 magnetic bead가 잘 분리되지 않을 수 있습니다. 1 ~ 3 초간 vortexing 후 spin down하여 Magnetic Separation Stand에 재장착 합니다.</p> <p>02. Elution Volume이 너무 적은 것은 아닌가요? 추출된 RNA의 양이 많은 경우, Magnetic bead에 binding된 RNA가 완전히 elution되지 않을 수 있습니다. Elution volume을 늘려 진행하거나 elution이 끝난 bead에 RNase free water를 넣고 elution 단계를 진행합니다.</p>

✔ Equipment and Reagent to Be supplied by User

- Magnetic Separation Stand
- Vortexer
- Heat Block or Water Bath
- Micro Centrifuge
- 1.5 / 2.0 ml tube
- Pipette & Tips
- Ethanol (96 - 100%)
- Isopropanol (96 - 100%)
- 2-Mercaptoethanol(2-ME)
- Option : Dryer, Dry oven