

PrimePrep™ Blood RNA Extraction Kit

Introduction

PrimePrep™ Blood RNA Extraction Kit는 사람, 동물의 whole blood로부터 total RNA를 추출하는 제품입니다. 본 제품은 glass fiber membrane 기술의 사용 및 효율적인 buffer system의 구성으로 고순도의 total RNA 추출이 가능합니다. 추출된 total RNA는 RT-PCR, real-time PCR 등 다양한 실험에 적용이 가능합니다.

Kit Components

Reagents	Cat. No.	KR-1000 (50 Prep.)
Spin column 1 (Blue O-ring)		50 ea
Spin column 2		50 ea
Collection tube		150 ea
Buffer BRR		200 ml x 2 bottles
Buffer BRL		40 ml
Buffer BRW1		20 ml
Buffer BRW2		11 ml
Buffer BRE		10 ml

Before you begin

- Buffer BRW1에 absolute ethanol 20 ml을 첨가한다.
- Buffer BRW2에 absolute ethanol 44 ml을 첨가한다.
- β -Mercaptoethanol (14.2 M), 70% ethanol ¹⁾, 1.5 ml microcentrifuge tube 등을 준비한다.

¹⁾ DEPC로 처리된 DW를 사용하여 70% ethanol을 만든다.

주의사항

- This product is for research use only.
- Buffer BRL and Buffer BRW1 contains strong denaturant. Be careful to avoid contacting with skin and eyes. In the case of such contact, wash immediately with plenty water.

Experimental Protocol

1. 준비된 신선한 전혈 200 μ l (1 volume)에 Buffer BRR 1 ml (5 volumes)을 1.5 ml microcentrifuge tube (tube 부피에 맞도록)에 넣는다.

· 아래의 표를 참고하여 혈액과 Buffer BRR을 넣는다.

Volume of whole blood	Volume of Buffer BRR	Centrifuge tube
200 μ l	1.0 ml	1.5 ml
500 μ l	2.5 ml	15 ml
1.0 ml	5.0 ml	
1.5 ml	7.5 ml	

2. Ice에서 10분 동안 반응 시킨다. 반응하는 동안 2회 pulse vortexing을 한다.

· Tube 바닥에 가라앉은 적혈구가 완전히 부유될 때까지 pulse vortexing을 한다.

3. 3,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심 분리한 후 micropipette을 이용하여 상층액을 제거한다.

· 원심 분리 후 pellet에 백혈구가 존재하므로 상층액을 주의하여 제거한다. 많은 양의 적혈구 (붉은색)가 남아있을 경우 step 5에서 모두 제거 한다.

4. 400 μ l의 Buffer BRR (step 1에서 사용된 혈액의 2배 부피)을 cell pellet에 넣어 주고, pulse vortexing하여 완전히 현탁 시킨다.

5. 3,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심 분리한 후 micropipette을 이용하여 상층액을 제거한다.

6. 350 μ l의 Buffer BRL과 3.5 μ l의 β -mercaptoethanol (β -ME, 14.2 M)을 pellet (백혈구)에 넣는다. 완전히 lysis될 때까지 10~15초 동안 pulse vortexing 또는 pipetting한다.

· 아래의 표를 참고하여 사용된 전혈의 부피에 따라 Buffer BRL을 사용한다.

Volume of whole blood	Volume of Buffer BRL	Volume of β -ME
~ 0.5 ml	350 μ l	3.5 μ l
0.5 ~ 1.5 ml	600 μ l	6.0 μ l

· Carry-over에 의한 오염을 방지하기 위하여 tube 안쪽에 남아있는 혼합액을 약하게 spin down하여 제거한다.

· Buffer BRL 1 ml 당 β -ME 10 μ l의 비율로 Buffer BRL와 β -ME를 시료에 넣는다.

· Buffer BRL에 침전물이 생겼을 경우 40~50 °C의 incubator에 넣어 침전물을 완전히 녹인 후 사용한다.

7. Spin column 1 (Blue O-ring)에 혼합액을 넣고, 13,000 rpm에서 2분 동안 원심 분리한다. 원심 분리 후 통과액을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube (제품에 포함되어 있지 않음)에 옮겨 담는다.
 - 백혈구가 많은 경우 혼합액의 점성이 높아지므로 spin column 1에 잔여 혼합액이 남아 있을 수 있으며, 이 경우 추가적으로 13,000 rpm에서 1~2분간 원심분리를 수행한다.
8. 사용한 Buffer BRL과 동량 (350 μ l 또는 600 μ l)의 70% ethanol을 균질화된 혼합액에 넣고, 5초간 vortexing 한다.
9. 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm, 상온에서 5초 동안 원심 분리한다.
 - Carryover에 의한 오염을 방지하기 위해 tube의 뚜껑에 묻은 반응액을 spin-down 한다.
10. 원심분리에 의해 모아진 혼합액을 2 ml collection tube가 장착된 spin column 2에 넣는다.
 - 600 μ l의 Buffer BRL을 사용하였을 경우 600 μ l씩 2회로 나누어 spin column 2에 넣고, step 10과 11을 반복 수행한다.
11. 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm, 상온에서 30초 동안 원심 분리한다. 통과액은 버리고 spin column을 같은 collection tube에 다시 장착한다.
12. 700 μ l의 Buffer BRW1을 spin column 2에 넣고 13,000 rpm, 상온에서 30초간 원심 분리한다. 통과액은 버리고 spin column을 새로운 collection tube에 장착한다.
13. 500 μ l의 Buffer BRW2를 spin column 2에 넣고 13,000 rpm, 상온에서 30초간 원심 분리한다. 통과액은 버리고 spin column을 새로운 collection tube에 장착한다.
14. 500 μ l의 Buffer BRW2를 spin column 2에 넣고 13,000 rpm, 상온에서 30초간 원심 분리한다.
15. Spin column 2를 새로운 collection tube에 장착한 후, 남아있는 Buffer BRW2를 제거하기 위해 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리한다.
 - Ethanol이 남아있을 경우 후속 시험에 영향을 줄 수 있으므로 완벽히 제거한다
16. Spin column 2를 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube (제품에 포함되어 있지 않음)에 spin column을 장착한다.
17. 30~50 μ l의 Buffer BRE를 spin column 2의 membrane에 넣고 상온에서 1분간 정치한다.
18. 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리한다.
 - 정제된 RNA는 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하고, 바로 사용하지 않을 경우에는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관한다.

* 본 제품은 silica membrane column을 이용한 total RNA 정제방식입니다. Spin column을 이용한 정제 방법을 이용할 경우 total RNA 이외에 미량의 genomic DNA가 혼입될 수 있습니다. 일반적으로 DNA 제거를 위하여 DNase I (RNase-free)을 이용할 수 있으나, 이 경우 DNA 뿐만 아니라 RNA도 일부 제거될 수 있습니다.