

Dyne Plasmid Prep Kit Ver.2

Cat. No.	용량	농도
DYK1150	50 preps	-
DYK1152	200 preps	-

◆ 제품구성

Buffer S1 (Cell resuspension buffer, + RNase A)

Buffer S2 (Cell lysis buffer)

Buffer S3 (Neutralization buffer)

Buffer PW (Wash buffer 1)

Buffer AW (Wash buffer 2)

Buffer EB (Elution buffer)

***Absolute ethanol(96~100%)를 Buffer AW에 아래와 같이 첨가한다.**

- DYK1150 : 12ml Buffer AW + 48ml Ethanol

- DYK1152 : 25ml Buffer AW + 100ml Ethanol

***Absolute Isopropanol을 Buffer PW에 아래와 같이 첨가한다.**

- DYK1150 : 21ml Buffer PW + 9ml Isopropanol

- DYK1152 : 84ml Buffer PW + 36ml Isopropanol

◆ 보관온도

· 상온에서 1년간 보관 가능하다.

*** RNase A가 첨가된 Buffer S1의 경우 2~8°C에서 보관**

· 낮은 온도(<15°C)에서 보관 시, Buffer S2가 SDS에 의해 침전될 수 있다. 이 경우 사용 전 37°C에서 완전히 녹인 후 사용한다.

◆ 제품설명

· Dyne Plasmid Prep kit Ver.2는 alkaline lysis 방법에 이어 glass filter membrane에 plasmid DNA를 결합하는 방식을 이용한다. Alkaline 처리 및 centrifuge 후 plasmid DNA는 상등액에 남아있고, bacterial chromosome, proteins, cell debris 등은 침전된다. 그 후 상등액을 filter membrane을 통과하면 plasmid DNA만 선택적으로 결합한다. 결합된 plasmid DNA는 세척 후 low salt buffer를 이용하여 elute한다. 추출된 plasmid DNA는 다양한 추가적인 downstream 실험에 즉시 이용할 수 있다.

◆ 제품특징

- Starting material : Bacterial suspension (high copy plasmid : 1~5 ml / low copy plasmid 5~10 ml)
- Binding capacity : approx. 40 µg plasmid DNA
- Mim. Elution volume : 30 µl
- Recovery : >95%

◆ Protocol

Before starting

- Absolute ethanol (96~100%)를 Buffer AW에 첨가한다.
- Absolute isopropanol을 Buffer PW에 첨가한다.
- Buffer AW, PW의 침전을 확인한다. 침전이 있을 시 water bath에서 56°C, 1시간동안 침전물을 용해시킨다.

· Buffer S2를 낮은 온도에서 보관할 시 침전을 야기할 수 있다. 이 경우 사용 전 37°C에서 침전물을 용해시킨 후 사용한다.

1. O/N 배양한 bacterial cells 1~10 ml을 4,000 rpm에서 10분 혹은 8,000 rpm에서 2분간 원심분리 후 상등액을 버린다.

2. **Buffer S1, 250 µl**를 첨가한 후 vortex하여 섞어준다. Resuspension 후 잔여 cell이 관측되지 않는지 확인한다.

3. **Buffer S2, 250 µl**를 첨가한 후 4~6회 invert하여 섞어준다. 3분간 상온에서 반응시킨다. (genomicDNA의 절단을 방지하기 위해 vortex 금지)

4. **Buffer S3 350 µl**를 첨가한 후 4~6회 invert하여 섞어준다.

5. 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 상등액 750 µl를 column으로 옮긴다.

6. 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 나온 용액을 버린다.

7. **(Optional)** Buffer PW 500 µl를 첨가 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 나온 용액을 버린다. 본 단계는 BL21, JM series, HB101 등의 *endA** strain의 nuclease activity를 제거하거나 높은 carbohydrate content를 갖거나 높은 nuclease activity를 가지는 WT strain을 이용할 때도 필수적이다.

단, **XL-10이나 DH5α를 이용할 시 본 단계를 수행하지 않는다.**

8. **buffer AW 750 μ l**를 추가한 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 다음 down된 용액은 버린다.

9. membrane 건조를 위해 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한다.

10. Column을 새 tube로 옮기고 **Buffer EB 50 μ l**를 첨가한 다음 상온에서 2분간 반응시킨다. DNA의 확실한 elution을 위해 Buffer EB/DW를 column의 중앙에 떨어뜨린다.

높은 농도의 DNA solution을 얻기 위해 30 μ l로 elution을 진행해도 된다. 30 μ l 보다 적은 양으로 elution을 할 시 수율이 급격히 낮아질 수 있다. 200 μ l까지의 elution buffer를 사용하여도 되지만 이는 DNA 농도를 낮출 수 있다. 10kb 이상의 큰 plasmid는 60°C에서 예열된 Buffer EB를 사용해야 적절한 elution 결과를 얻을 수 있다.

11. 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 모은 plasmid DNA를 즉시 이용하거나 -20°C에서 보관할 수 있다. 장기간 보관시 Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.8)을 이용한 후 -20°C이하에서 보관하는 것을 권장한다.