

## Dyne Gel Extraction Kit Ver.2

| Cat. No. | 용량       | 농도 |
|----------|----------|----|
| DYK1170  | 50 prep  |    |
| DYK1172  | 200 prep |    |

### ◆ 제품구성

Buffer GB

Buffer NW

Buffer EB

### ◆ 보관방법

· 상온 (15~25°C)에서 1년간 보관 가능

### ◆ 제품특징

- Starting sample size : 200 mg of gel
- Column binding capacity : approx. 20 µg DNA
- Minimum elution volume : ~30 µl
- Preparation time : >25 min

### ◆ 제품설명

· Dyne Gel Extraction Kit Ver.2는 agarose gel로부터 DNA fragment를 30분 내로 정제할 수 있는 제품이다. Silica-membrane을 이용하여 pH 조정없이 40bp ~ 10kb의 DNA fragment를 정제할 수 있다. 분리된 DNA는 proteins, dye, agarose가 없으며 DNA sequencing, PCR, in vitro transcription, restriction mapping, cloning, labeling등을 포함한 다양한 실험에 이용할 수 있다.

### ◆ 표준반응조건

#### Before experiment

- 황색인 **Buffer GB**의 pH는 ≤7.5 이다.
- **Buffer NW**는 사용 전 **Absolute ethanol**을 첨가한다.
- Isopropanol(100%)는 50°C에서 예열한다.
- 모든 원심분리 단계는 13,000 rpm에서 진행한다.
- 3M sodium acetate, pH 5.0 용액이 필요할 수 있다.

본 진행방법은 70bp ~ 10kb의 DNA를 standard or low-melt agarose에서 추출하는데 맞춰져 있다. 하나의 spin column에서 400 mg까지의 agarose를 사용할 수 있다.

본 제품은 효소반응 후 DNA cleanup에도 이용할 수 있다.

본 protocol을 이용하여 DNA cleanup을 진행할 시 3 volume Buffer GB와 1 volume isopropanol을 반응액에 넣고 섞어준 다음 6번 단계부터 진행하면 된다.

1. DNA fragment를 Agarose gel로부터 절단하여 추출한다. 여분의 agarose없이 절단하여 size를 최소화한다. 짧은 handling time을 가질수록 더 좋은 DNA quality를 가질 수 있다.
2. Gel 절편을 투명 tube에 넣어 무게를 측정한다. **3 volume의 Buffer GB**를(of 1 volume gel (100 µl~100 mg))만큼 추가한다.

예) 100 mg gel + 300 µl Buffer GB.

2% 이상의 agarose를 사용할 시 6 volume의 GB Buffer 사용. Spin column 하나당 사용할 수 있는 gel의 최대량은 400mg으로 그 이상을 사용할 시 1개 이상의 spin column을 사용할 것.

3. Gel이 들어간 tube를 **60°C에서 20~25분간** 반응한다. (gel slice가 완전히 녹을 때까지 반응한다) 반응하는 동안 매 2~3분마다 vortexing하여 gel을 완전히 녹여준다. 2% 이상의 gel을 사용할 시 반응 시간을 늘린다.

4. **Gel slice를 완전히 녹이고 난 다음** 혼합액의 색이 황색인지 확인한다. (Buffer GB의 색과 유사)

만약 혼합액의 색이 orange / violet이면 3M sodium acetate, pH 5.0 용액을 10 µl 첨가한 후 섞어준다. DNA의 membrane 흡착은 ≤pH 7.5에서 가장 효율적이다. Buffer GB에는 pH indicator가 포함되어 있어 pH 7.5이하에서 황색을 띄고 높은 pH에서 orange / violet 색을 띈다. 이는 육안으로 쉽게 DNA binding에 적합한 pH를 확인하기 위함이다.

5. **(Optional)** 1 gel volume 만큼 isopropanol을 첨가한 후 vortex하여 섞어준다.

100 mg gel 사용 시 100 µl isopropanol 첨가. 본 단계에서 원심 분리 금지. 본 단계는 DNA fragment가 <200bp이거나 >5kb일 때 수율을 높이기 위해 필요하다. 200bp ~ 5kb 사이인 경우 큰 효과가 없다.

6. 혼합액을 **Binding column**으로 옮기고 **1분간 원심분리**한다. Flow-through는 버리고 binding column은 collection tube에 꽂는다.

7. **(Optional) Buffer GB 500 µl** 첨가 후 1분간 원심분리. 본 단계는 극미량의 잔여 agarose까지 전량 제거한다. 이것은 추출한 DNA를 추후 direct sequencing이나 in vitro transcription 또

는 microinjection에 이용할 때만 필요하다.

8. Washing을 위해 **Buffer NW 700  $\mu$ l**를 첨가 후 1분간 원심분리 한다.

\*만약 추출한 DNA를 blunt-end ligation 또는 direct sequencing 등의 salt sensitive application에 이용한다면 원심분리 전, Buffer NW를 추가한 후 2~5분가량 column을 세워 둔다.

9. Flow-through를 버리고 spin column을 추가적으로 1분간 원심분리 한다. 그 후 spin column을 새로운 1.5ml microcentrifuge tube에 옮긴다.

**중요:** 본 단계를 진행하기 전 flow-through를 버리지 않으면 Buffer NW의 잔여 ethanol이 완전히 제거되지 않는다.

10. **Buffer EB 50  $\mu$ l**를 binding column 중앙에 분주한 후 1분간 세워 둔 다음 1분간 원심분리하여 DNA를 elution 한다.

더 높은 농도의 DNA solution을 얻기 위해 30  $\mu$ l로 elution을 진행해도 된다. 그러나 30  $\mu$ l 보다 적은 양으로 진행할 시 수율이 감소할 수 있다. 200  $\mu$ l까지의 elution buffer를 column에 사용할 수 있지만 이는 DNA 농도를 감소시킨다. 5kb 이상의 큰 사이클을 이용할 경우, 효율을 위해 elution buffer를 60°C에서 예열한 후 이용하는 것을 권장한다.