

SPINeasy DNA Kit for Feces

Cat. No: 116531050 (50 preps) & 116531000 (5 preps)



퀵프로토콜 Revision 1.0 (Nov 2020)

고객 준비 제품

- ☐ 2ml microcentrifuge tube X 100 개 (샘플 kit의 경우 2ml tube X 10개)
- ☐ Bead homogenizer (예, FastPrep) 혹은 vortex (adapter 포함)
- ☐ 원심분리기 (14,000 x g 또는 maximum speed)
- ☐ Water bath or heat block (Elution buffer warming 목적)
- ☐ Absolute ethanol
- ☐ Isopropanol (35ml)

실험 전 체크

- ☐ **Binding Buffer FS** – isopropanol 35ml 을 넣고 bottle 에 표기
(샘플 kit : 매뉴얼 참고)
- ☐ **Wash Buffer FS1** – absolute ethanol 21ml 을 넣고 bottle에 표기
(샘플 kit : 매뉴얼 참고)
- ☐ **Wash Buffer FS2** – absolute ethanol 50ml 을 넣고 bottle에 표기
(샘플 kit : 매뉴얼 참고)

Lyse

- ☐ **Lysing Matrix E tube** 에 30-200 mg의 Feces 샘플 첨가
* human, mouse 와 같이 미생물 함량이 많은 샘플의 경우 30 mg 정도 충분할 수 있음.
- (옵션) ☐ **Pre-Wash Buffer 1 ml** 첨가 후 full speed 에서 40초간 vortexing. 원심분리 14,000 x g 에서 5분 진행 후 상층액 버림
* 파쇄 전 추가적인 cleaning step으로 샘플에 불순물이 많을 경우 이 과정을 통해 순도를 높여줄 수 있고, 건조된 분변 샘플의 경우 샘플을 풀어주는 역할. 샘플에 따라 불순물이 많지 않은 경우 이 과정을 생략할 수 있음.
- 샘플에 ☐ **Lysis Buffer F1 980 ul** / ☐ **Lysis Buffer F2 120 ul** / ☐ **RNase A solution 10 ul** 첨가 후 vortex로 mix
* 샘플이 얼려져 있는 경우 lysis buffer 첨가 후 1~3분간 방치
- Bead homogenizer (Bead beater)를 이용하여 샘플 파쇄 진행
* FastPrep 장비보유시 세팅조건: 속도 5.0 m/s, 시간 40초 /
* Beads Beater 미보유시 Vortex 사용 : full speed에서 10 분간 vortexing

- 원심분리 (14,000 x g, 5 min)

Purify

- 상층액을 깨끗한 2 ml microcentrifuge tube로 조심스럽게 transfer (별도 준비)
- 상층액에 ☐ **Inhibitor Removal FS 250 ul**을 첨가 후 10회 shaking
- 원심분리 (14,000 x g, 5 min)

Bind

- 상층액 900 ul 를 새 2 ml tube로 transfer (별도 준비)
- ☐ **Binding Buffer FS 900 ul** 를 transfer 된 상층액에 추가 후 mix
- Mixture 800 ul를 ☐ **Column F1 (2.0 ml collection tube에 장착된)** 로 transfer
- 원심분리 (14,000 x g, 30 sec) 후 collection tube의 용액을 비우고 tube는 재사용. 위 과정을 1회 반복 후 남은 용액은 버림

Wash

- ☐ **Wash Buffer FS1 500 ul** 를 column에 첨가 후 원심분리 (14,000 x g, 30 sec). Collection tube 용액을 비움
- ☐ **Wash Buffer FS2 500 ul** 를 첨가하여 washing 과정 두 번 더 반복
- 용액 추가 없이 원심분리 (14,000 x g, 2 min)하여 column을 완전히 건조

Dry

- Collection tube는 버리고, column을 1.5 ml collection tube에 장착
- 실온에서 air dry 5분

Elute

- 기다리는 동안 DES buffer를 55°C 로 5min heating 진행 (elution 효율 향상)
- ☐ **Pre-heated DES buffer 50ul-100 ul**를 column의 중앙에 넣고, 원심분리 (14,000 x g, 1 min) 하여 DNA elution
- Eluted DNA는 사용할 때까지 4°C 보관 (장기 보관 시 -20°C 보관)