

SPINeasy DNA Kit

for **Tissue & Bacteria** (Lysing Matrix 포함제품)



Cat. No: 116532050 (50 preps) & 116532005 (5 preps)

퀵 프로토콜 Revision 2.0 (Jun 2022)

고객 준비 제품

- 1.5ml microcentrifuge tube (elution 용, 샘플 수량만큼 준비)
- Bead homogenizer (예, FastPrep), 없을 경우 vortex (adapter 포함)
- 원심분리기 (14,000 x g 또는 maximum speed)
- Absolute ethanol
- Heat blot 또는 water bath to 55°C (옵션)
- 샘플이 **Gram positive bacteria** 경우: **lysozyme** 필요 (뒷면 참조)

실험 전 체크

- Wash Buffer GD2**- absolute ethanol 50ml 을 넣고 bottle 에 표기 (샘플 kit의 경우 5ml)

Lyse

1. 뒷장의 Sample type 별 **Lysing Matrix A**- Sample preparation 방법을 확인 바랍니다.
2. FastPrep® 장비 (Bead homogenizer)를 이용하여 샘플파쇄 진행
 - **FastPrep** 장비보유시 세팅 조건: 속도 4.0 m/s, 시간 15 sec
 - **Beads Beater** 미보유시 Vortex (Max. speed) 사용: **Tissue & Bacteria** – 20 mins / **Blood & Cultured cells** – 10mins
3. 원심분리 (14,000 x g, 10 min)

Bind

4. 상층액 750ul를 Column GD/collection tube 로 옮김
5. 원심분리 (14,000 x g, 1 min) 후 collection tube의 용액을 비우고 tube는 재사용

Wash

6. **Wash Buffer GD1** 500ul 를 column에 첨가
7. 원심분리 (14,000 x g, 1 min) 후 collection tube의 용액을 비우고 tube는 재사용
8. **Wash Buffer GD2** 750ul 를 column에 첨가 후 실온에서 1분간 반응
9. 원심분리 (14,000 x g, 1 min) 후 collection tube의 용액을 비우고 tube는 재사용
10. 용액 추가 없이 추가로 원심분리 (14,000 x g, 1 min)하여 column을 완전히 건조
11. (옵션) column을 완전히 건조 시키기 위해 55°C에서 3-5분간 반응

Elute

12. Collection tube는 버리고, column을 깨끗한 1.5ml microcentrifuge tube에 장착
13. **Elution Buffer GD** 100 ul를 column의 중앙에 넣고, 실온에서 1분간 반응
 - DNA 함량이 낮은 샘플의 경우 elution volume을 50ul까지 줄일 수 있음
14. 원심분리 (8,000 x g, 1-2 mins)
15. Eluted genomic DNA는 4°C (단기보관) 또는 -20°C (장기보관) 보관

Sample type 별 Lysing Matrix A- Sample preparation 방법

샘플 타입	Starting amount	Lysis Buffer GD	실험방법
Animal tissue	≤ 30 mg (≤ 10 mg for spleen)	1 ml	Tissue 를 작은 조각으로 자른 후 Lysing Matrix A tube에 넣고, Lysis Buffer GD 1 ml 첨가
Blood (non-nucleated)	100 ul-200 ul	최종 용량이 1 ml이 되도록 첨가	Lysis Buffer GD 를 최종 용량이 1 ml이 되도록 첨가, 잘 섞은 후 Lysing Matrix A tube로 옮김.
Blood (nucleated)	10 ul	최종 용량이 1 ml이 되도록 첨가	Lysis Buffer GD 를 최종 용량이 1 ml이 되도록 첨가, 잘 섞은 후 Lysing Matrix A tube로 옮김.
Cultured cell pellet	1X 10 ⁶ cells (최대 5X 10 ⁶ cells)	1 ml	Cell pellet을 Lysis Buffer GD 1 ml에 풀어준 후 Lysing Matrix A tube로 옮김
Cultured cells in 100 ul PBS	1X 10 ⁶ cells (최대 5X 10 ⁶ cells)	900 ul	Lysis Buffer GD 를 최종 용량이 1ml 이 되도록 첨가, 잘 섞은 후 Lysing Matrix A tube로 옮김
Gram-negative bacteria	Overnight culture 3ml~9ml로 부터의 pellets	1 ml	Cell pellet을 Lysis Buffer GD 1 ml에 풀어준 후 Lysing Matrix A tube로 옮김
Gram-positive bacteria	Overnight culture 3ml~9ml로 부터의 pellets	전처리 후 800 ul	아래와 같이 pre-treatment 진행 후 Lysis Buffer GD 를 800 ul 를 첨가, 잘 섞은 후 Lysing Matrix A tube 로 옮김

Pre-treatment of Gram-positive bacteria

- 20 mg/ml lysozyme 준비** : Gram-positive bacteria pre-treatment buffer로 제조 (lysozyme 별도구매 / Lysozyme 첨가 후 4°C 보관)
- Bacteria pellet을 gram-positive bacteria pre-treatment buffer 200 ul에 풀어 줌
- 37°C에서 30분간 반응
- Lysis Buffer GD** 800 ul 첨가, 잘 섞은 후 lysing Matrix A tube로 옮기고, Quick-start protocol 2번부터 진행



FastPrep®bead homogenizer에 대한 정보를 보시려면 QR 코드를 스캔하세요.