

prepIT®·L2P

샘플 0.5mL 에서 DNA를 수동으로 정제하는 실험 프로토콜

Oragene®와 ORAcollect® 수집 키트의 게놈 DNA 정제 관련 사항입니다.

추가 언어 및 프로토콜 관련 사항은 본사의 홈페이지 www.dnagenotek.com을 방문해 주십시오.

다음 단계별 프로토콜은 샘플 500µL에서 DNA를 정제하는 방법에 대한 설명입니다.

포함된 시약

- prepIT®·L2P (카탈로그 번호: PT-L2P)

장비 및 시약

- 15,000 × g에서 작업할 수 있는 마이크로 원심분리기
- 1.5mL의 microtube (예를 들어 Axygen #MCT-150-C)
- 50° C에서 공기 또는 물 인큐베이터
- 실온의 에탄올 (95%~100%)
- 실온의 에탄올 (70%)
- DNA 저장 버퍼 : TE (10mM 트리스 - 염산(Tris-HCl), 1mM의 EDTA, pH 8.0) 또는 유사한 완충액

처리 과정

정제 단계	참고
1. DNA Genotek 키트의 샘플을 뒤집으면서 몇 초 동안 부드럽게 흔들여 줌.	• 이 점성 샘플을 완전히 혼합시킴.
2. 물 인큐베이터에서 최소 1시간 동안 또는 최소 2시간 이상 공기 인큐베이터 50°C에서 샘플을 배양함. 참고: 샘플 튜브는 수조 표면에 뜰 수 있으므로 공기 인큐베이터의 사용이 바람직할 수 있다. 수조를 사용해야만 하면 튜브의 샘플 - 함유 부분이 물에 잠겨있도록 할 것.	• 이 열처리 단계는 DNA의 적절한 방출과 nuclease 의 영구적 불활성화에 필수적임. • 이 배양 단계는 샘플 수집 후 정제되기 전에 언제든지 시행할 수 있음. • 전체 샘플은 샘플 균일성을 보장하기 위해 분주 • 전에 원래 수집 관에서 배양해야 함. • 더 편리하려면 샘플을 하룻밤 동안 50°C에서 배양할 수 있음. • 일정 온도 유지가 물 인큐베이터에서보다 더 느리므로 공기 인큐베이터에서 시간이 더 걸림.
3. 혼합 샘플 500µL를 1.5mL의 마이크로 원심 분리기 튜브에 옮겨 담기.	• 나머지 샘플은 실온에서 보관하거나 냉동시킬 수 있음 (-15°C에서 -20°C까지).
4. 샘플 500µL 당PT-L2P 20µL(1/25 용량)를 마이크로 원심분리기 튜브에 첨가하고 몇 초 동안 교반하여 혼합하기.	• 불순물 및 억제제가 침전되므로 샘플 혼탁해짐.
5. 10 분간 얼음 위에서 배양함.	• 실온 배양을 대체할 수 있으나 불순물 제거에 약간 비효과적임.



정제 단계	참고
6. 15,000 × g에서 5분간 실온에서 원심분리기로 분리함.	<ul style="list-style-type: none"> 원심분리기에 더 오래 넣고 분리하면(15분 넘게) 최종 DNA 용액의 혼탁도(최고 A₃₂₀까지)가 감소하는 장점이 있을 수 있음.
7. Pipette tip를 이용하여 맑은 상층액을 새로운 마이크로 원심분리기 튜브에 옮겨 담음. 불순물을 함유한 과립구를 폐기할 것.	<ul style="list-style-type: none"> 침전물에는 혼탁한 불순물이 포함되어 있음. 우연히 교란이 발생하는 경우, 튜브를 다시 원심분리기로 분리해야 함.
8. 상층액 500μL에 실온의 95%에서 100%의 에탄올 600μL을 첨가함. 뒤집으면서 부드럽게 10번 섞어줌.	<ul style="list-style-type: none"> 에탄올로 혼합하는 동안, DNA가 침전됨. 이는 샘플의 DNA 양에 따라 DNA 점유의 응고 또는 미세 침전물로 나타날 수 있음. 응고되지 않더라도 다음 단계에 따라 DNA가 조심스럽게 복구됨.
9. DNA가 완전히 침전되도록 샘플을 실온에 10분간 세워둠.	<ul style="list-style-type: none"> 불순물이 DNA와 함께 침전할 수 있으므로, -20°C에서 배양하는 것은 좋지 않음.
10. 지정된 방향으로 원심분리기에 튜브를 넣음. 15,000 × g에서 5분간 실온에서 원심분리기로 분리함.	<ul style="list-style-type: none"> 예를 들어 각 튜브는 그 마개의 힌지 부분이 로우터의 중심에서 바깥쪽을 향하도록 마이크로 원심분리기에 놓음. 원심 분리 후 과립구가 (심지어 쉽게 볼 수 없도록 너무 작지만) 힌지 아래의 튜브 끝에 위치하게 될 수 있음.
11. Pipette tip로 상층액을 조심하여 제거하고 폐기함. DNA 과립구를 방해하지 않도록 주의할 것.	<ul style="list-style-type: none"> 침전물에는 DNA가 포함되어 있음. 과립구의 손실은 DNA의 손실임. 침전물이 상부 벽에 있는 튜브를 회전시키면 아래 벽을 따라 pipette tip를 안전하게 이동하고 상층액을 모두 제거할 수 있음. 상층액에는 불순물이 함유되어 있을 수 있으며 가능한 한 완전히 제거해야 함. 침전물을 너무 건조하게 하면 DNA의 용해를 더 어렵게 할 수 있음.
12. 에탄올 세척 : 70% 에탄올 250μL를 조심스럽게 첨가함. 1분간 실온에 세워 둠. 과립구를 방해하지 않고 에탄올을 완전히 제거할 것.	<ul style="list-style-type: none"> 샘플에서 에탄올을 모두 제거하는 것이 중요함. 에탄올의 이월이 분석 결과에 영향을 미칠 수 있음. DNA 침전물을 교란하지 않도록 주의할 것. DNA 침전물은 작을 수 있음. 침전물을 분리해야 15,000 × g에서 5분간 샘플을 원심 분리기에서 분리함. 70% 에탄올을 제거한 후 튜브의 펄스-회전으로 잔류 에탄올을 제거할 수 있음.

정제 단계	참고
13. TE 용액 100 μ L를 첨가하여 DNA 침전물을 용해함 (1쪽 참조). 5 초 이상 세게 흔들어 교반시켜 줌.	<ul style="list-style-type: none"> 고농도 DNA를 원한다면 TE 50μL를 사용해야 함. 참고: 많은 양의 고분자량 DNA를 완전히 용해시키는 속도는 느려질 수 있습니다. DNA의 불완전 용해는 DNA 농도 추정 부정확성과 PCR과 같은 다운 스트림 애플리케이션 실패의 원인이 됨.
14. DNA (침전물 및 채취한 조직)의 충분한 수분 보충을 위해 세게 흔들어 교반한 다음 실온에서 하룻밤 배양시키거나 50°C에서 1시간 동안 가끔 세게 흔들어 교반해 줌.	<ul style="list-style-type: none"> DNA의 불완전 재용해는 DNA 농도 추정 부정확성, PCR 과 같은 다운 스트림 애플리케이션 실패의 원인이 됨.
15. 수분이 충분히 보충된 DNA 저장의 옵션: a) TE에서, 분리하여 -20°C에서 장기 저장하는 것이 좋음, 또는 b) TE에서 4°C로 2개월까지 저장.	<ul style="list-style-type: none"> TE에서 정제된 DNA를 냉동시키면 DNA가 침전됨. 냉동 정제된 DNA 샘플을 해동할 때 14단계에서 논의된 바와 같이 용해에 유의할 것.

DNA 의 정량

형광 염료 방법

형광 염료를 사용하는 분석 실험은 DNA 샘플에서 이중 가닥 DNA (dsDNA)의 양을 정량화하는데 260nm에서의 흡광도 보다 더 정확합니다. RNA 오염으로 인한 간섭이 적으므로 dsDNA를 정량화하는데 SYBR[®] Green I 또는 PicoGreen[®]과 같은 형광 염료를 사용하는 것이 좋습니다. SYBR[®] Green I을 사용하는 저렴한 프로토콜이 PD-PR-075 및 DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader¹에 설명되어 있습니다. 구매 가능한 Invitrogen's Quant-iT[™] PicoGreen dsDNA Assay Kit (카탈로그 번호 Q- 33130)로 대체하여 사용할 수 있습니다. 각 프로토콜마다 TE 솔루션으로 1:50 희석되고 정제된 DNA 및 5 μ L을 정량 분석에 사용하는 것이 좋습니다.

흡광도 방법

흡광도로 DNA의 양을 선택하려면 정제된 샘플을 RNase로 먼저 처리하여 오염 RNase를 분해하고 DNA의 에탄올 침전으로 RNA 조각을 제거하는 것이 좋습니다. 자세한 프로토콜은 PD-PR-040, RNA removal by double-RNase digestion²에 설명되어 있습니다. 구강 샘플에서 채취한 DNA에는 일반적으로 혈액 샘플에서 채취한 것보다 훨씬 많은 RNA가 포함되어 있음에 유의하십시오. 알코올 침전된 DNA는 흡광도를 읽기 전에 완전히 용해됩니다.

변환율: 260nm에서 흡광도1.0는 순수한 dsDNA의 50ng/ μ L (50 μ g/mL)의 농도에 해당합니다.

흡광도 값이 분광 광도계의 선형 범위 내에 있는지 확인하십시오. 선형 범위를 벗어나는 샘플은 다시 희석하고 다시 측정하십시오. 자세한 정보는 기기의 설명서를 참조하십시오.

방법:

1. TE 90 μ L (1/10 희석)로 정제되고 RNase 처리된 DNA의 10 μ L 분량 희석한다. 위 아래로 피펫하면서 부드럽게 섞어 준다. 거품이 사라질 때까지 기다린다.
2. 참조값으로 TE를 사용한다.
3. 320nm, 280nm 그리고 260nm에서 흡광도를 측정한다.
4. A₂₈₀와 A₂₆₀ 값에서 320nm (A₃₂₀)의 흡광도를 빼서 그 수정된 A₂₈₀와 A₂₆₀ 값을 계산한다.
5. DNA 농도 ng/ μ L = 수정된 A₂₆₀ \times 10 (희석 계수) \times 50 (환산 계수).
6. A₂₆₀/A₂₈₀ 비율: 수정된 A₂₆₀를 수정된 A₂₈₀로 나누기.

예시

1. 측정된 가정 A₃₂₀= 0.025, A₂₈₀= 0.175 및 A₂₆₀= 0.295
2. 원액 샘플의 DNA 농도:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [희석 계수] \times 50 [변환 계수]
 $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
 $= 0.270 \times 10 \times 50$
 $= 135\text{ng}/\mu\text{L}$ 또는 $135\mu\text{g}/\text{mL}$
3. 수정된 A₂₆₀/A₂₈₀ 비율:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.296 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

참고 문헌

- 1 DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

월요일-금요일까지 기술 지원 제공 (9시-17시 EST):

- 무료 전화 번호 (북미): 1.866.813.6354, option 6
- 기타 국가: 613.723.5757, option 6
- 이메일: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA 및 ORAcollect®-DNA는 미국에서 살 수 없습니다.

Oragene®-DISCOVER는 연구용에 한하며 진단 과정에 사용할 수 없습니다.

DNA Genotek 제품의 일부는 일부 국가에서 살 수 없는 경우가 있습니다.

*Oragene, prepliT 및 ORAcollect는 DNA Genotek Inc.의 등록 상표임. 모든 상호 및 명칭은 소유자에 지적 소유권이 있음.

DNA Genotek의 모든 프로토콜, 백서 및 애플리케이션 정보는 본사 홈페이지 www.dnagenotek.com의 지원 섹션에서 보실 수 있습니다.

