



Please contact us,
if you have any question and need help.



T)1670-5695



www.bio-ft.com



info@bio-ft.com

Quick Guide

Beyond the PCR technology,
BIOFACT promises the progress for your research.



HiGene™ Genomic DNA Prep Kit For Microorganisms - Bacterium, Yeast, Fungus

[Grinding Bead & Column Type]

☑ 제품 구성품

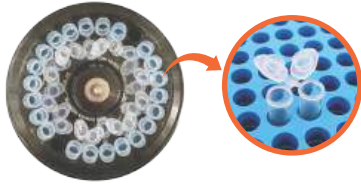
Contents	GD101-100
BL	50 mL
BMB	50 mL
BMW1(100% Ethanol 첨가하여 사용요망)	6 mL
BMW2(100% Ethanol 첨가하여 사용요망)	18 mL
BMW3(100% Ethanol 첨가하여 사용요망)	12 mL
P1(Grinding Bead)	100 ea
HelpB	25 mL
Elution Buffer	25 mL
RNase A (4 mg/mL)	1 ea
Proteinase K (20 mg/mL)	2 ea
Spin Column & Collection Tube	100 Preps(50 ea X 2 bottle)
Collection Tube	100 ea(50 ea X 2 pack)
Quick Guide	1 매

☑ Table of Contents.

• 제품 구성품	2
• Know-How	3
• Troubleshooting	4
• Preparation & Protocol	5
• 주의사항	9
• QC DATA	10

✓ Know-How for Preparation

1. Column Type Kit를 이용하여 추출할 경우 elution 시 tube의 cap이 깨지지 않도록 하는 방법



* Centrifuge 시 1.5 ml tube cap을 교차하여 꽂아주시면 cap이 깨지는 것을 최소화 할 수 있습니다.

- 적정량의 fresh한 sample로 추출하기를 권장드립니다.
- Washing Buffer(BMW1, BMW2, BMW3)는 실험시작 전 fresh하게 만들어서 사용하기 바랍니다.
- Elution Buffer 사용 전에 column을 공회전하여 EtOH을 완전히 제거합니다.
- Kit안의 Enzyme은 D.W(Buffer)로 녹인 후 -20°C에 보관합니다.
- 유효기한이 지나지 않은 제품을 사용합니다.
- 개봉한 지 오래된 Column은 실험전 HelpB™ Buffer를 이용하여 washing 합니다.
- 시료를 Lysis 시킬 때 vortexing을 장시간 처리할 경우 DNA가 degradation될 수 있으므로 주의합니다.
- BL은 주변 온도가 낮아지면 SDS로 인해 결정이 생길 수 있습니다. 이런 경우에는 전자렌지 또는 Dry oven에서 녹인 후 사용합니다.
- DNA elution 시 Elution Buffer를 50°C에서 10분정도 pre-heating 시킨 후 elution하면 효율이 높아집니다. (특히, Large DNA fragment 의 경우 효율이 현저히 높아집니다.)

✓ Application

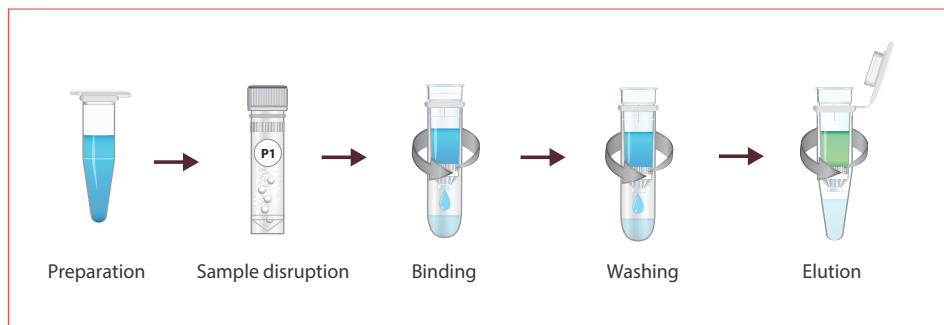
- ▶ Total DNA from microbial cultures
- ▶ Typical downstream applications : PCR, Real-Time PCR, Southern Blotting, Enzymatic Reactions

* Kits to be used for research purposes only.

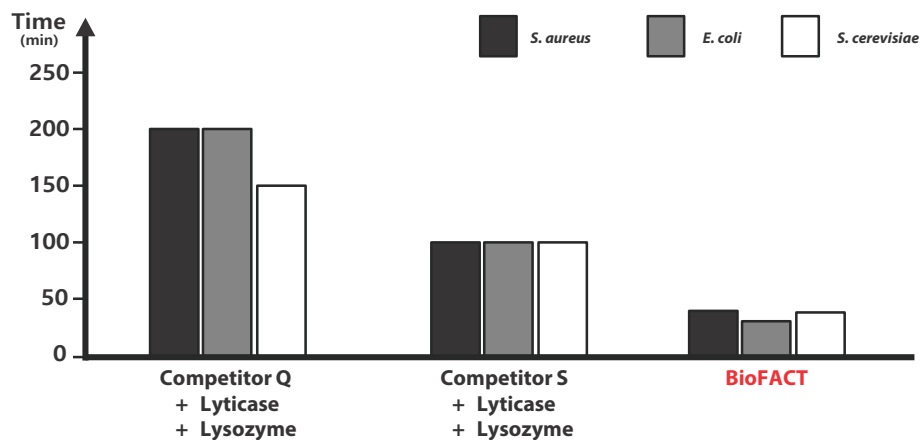
✓ Troubleshooting

Trouble	Check List
Low Yield DNA	<p>01. Washing buffer 를 만든지 오래된 것은 아닌가요? BMW1, BMW2, BMW3(+ Ethanol) 를 만든지 오래 되었을 경우 evaporation으로 인해 ethanol의 농도가 낮아져 yield가 떨어지게 됩니다. 시약을 새로 만들어 사용합니다.</p> <p>02. BMW1/ BMW2 / BMW3에 ethanol을 첨가하셨나요? BMW1 / BMW2 / BMW3 Buffer 에는 사용 전 반드시 protocol에 기재된 용량만큼 96 ~ 100% ethanol 을 첨가하셔야 합니다.</p> <p>03. BMB Buffer 첨가 후 오랜 시간 방치 하셨나요? BMB Buffer 첨가 후, 오랜 시간 동안 방치되면 genomic DNA 추출효율이 떨어질 수 있습니다. BMB Buffer 첨가 후 5분 이내에 실험하실 것을 권장합니다.</p> <p>04. Enzyme(RNase A, Proteinase K) 은 어디에 보관하셨나요? Prep에 사용되는 enzyme들의 경우, dry 상태에서는 상온 보관이 가능하지만 D.W로 녹이거나 Buffer 를 첨가한 이후에는 냉장 또는 냉동 보관하셔야 합니다. 장기간 사용하지 않을 경우, 냉동 보관을 권장드립니다. 그렇지 않을 경우 enzyme activity가 떨어져 추출효율에 영향을 줄 수 있습니다.</p> <p>05. Colume을 개봉한지 오래되었나요? Column type의 경우 column이 공기중에 오래 노출되면 시간이 흐름에 따라 산화되거나 불순물들이 흡착되어 DNA 결합을 저해합니다. 개봉한지 오래된 column은 실험 전 Help B Buffer로 washing 처리하여 사용해 보십시오.</p> <p>06. Column 사용 전 Help B Buffer 처리를 하셨나요? Help B Buffer는 column filter에 DNA가 좀 더 잘 binding될 수 있도록 도와주는 Buffer입니다. 간단한 step으로 정제효율을 높일 수 있습니다.</p>
Nicked DNA Degraded DNA	<p>01. Nuclease가 오염된 것은 아닌가요? Plasticware나 buffer에 nuclease가 오염되었는지 확인하고, plasticware는 사용 전 autoclave 하여 사용하세요.</p>
Low Quality DNA	<p>01. Washing 단계 후 공회전을 하셨나요? Elution된 DNA에 EtOH이 포함되어 있을 경우 다음 단계의 실험 진행에 문제가 발생할 수 있습니다. 이를 해결하기 위해 BMW1, BMW2, BMW3 단계 후 공회전을 2min 이상 수행한 후 elution 하면 됩니다.</p>

✓ DNA Extraction Procedure

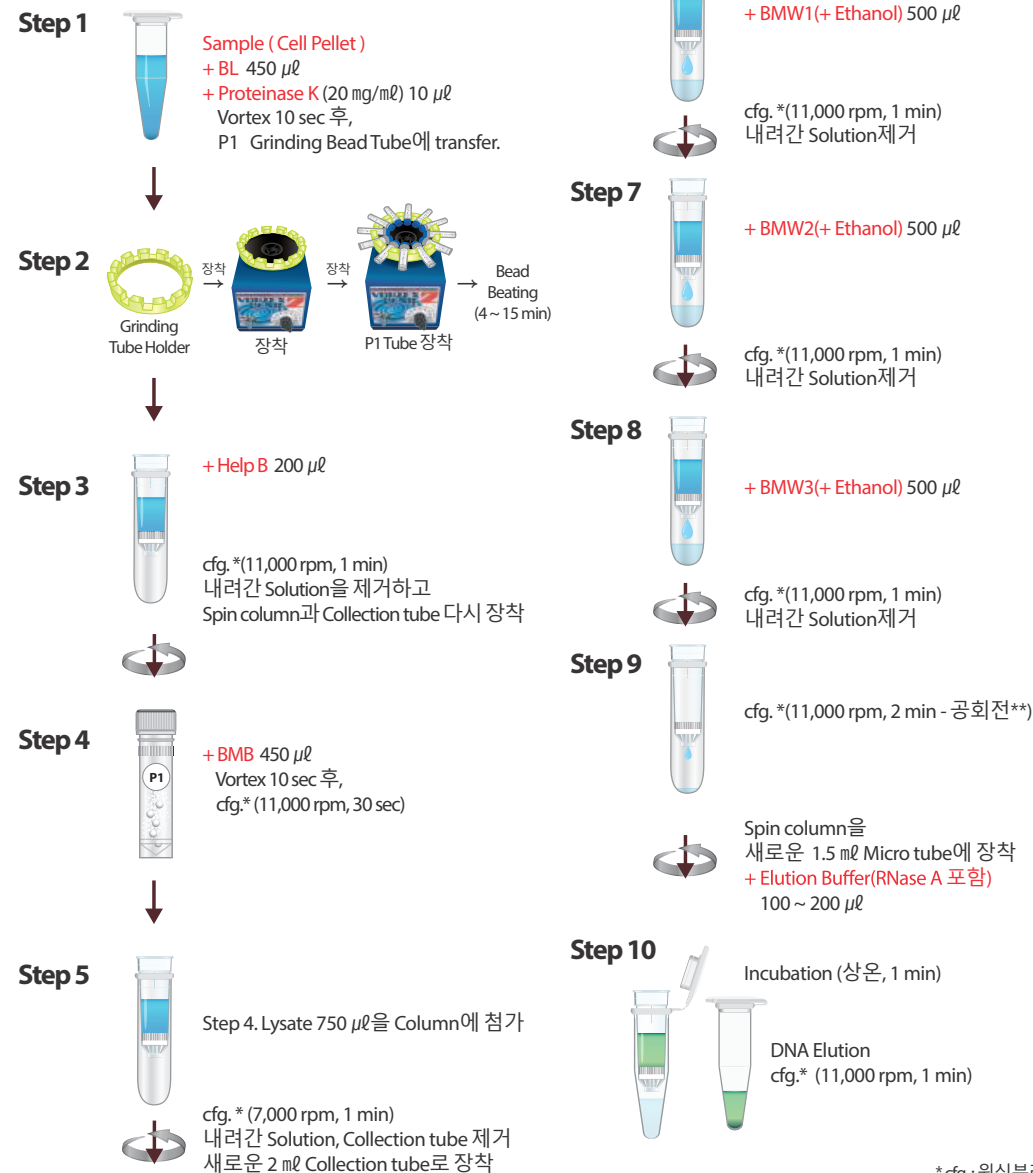


✓ Comparison of Preparation Times



The prep time of HiGene™ Genomic DNA Prep Kit for Microorganisms[Grinding Bead & Column Type] was compared with competitor products by processing *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Saccharomyces cerevisiae*. HiGene™ Genomic DNA Prep Kit shows shorter prep times in all three cases.

✓ Work Flow



*cfg.: 원심분리
**공회전: Column에 아무것도 넣지않고 원심분리(EtOH제거)

✓ Preparation.

1. BMW1 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 54 mL** (100 Prep 기준)을 넣어 사용합니다.
2. BMW2 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 42 mL** (100 Prep 기준)을 넣어 사용합니다.
3. BMW3 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 48 mL** (100 Prep 기준)을 넣어 사용합니다.
4. Kit에 포함된 Enzyme(freezing dry 상태)은 D.W에 녹여 사용하시고 4°C(or -20°C)에 보관합니다.
5. Sample
 - 16 ~ 24 시간 이상 배양된 cultured cells 1 ~ 2 mL씩 1.5 mL Micro tube에 넣고 13,000 rpm, 1 min 동안 원심분리 후 media를 제거한 후 사용합니다. (장기간 사용하지 않을 경우, -70°C에 보관합니다.)

✓ Protocol.

Cell Lysis

- 1 : Harvested Cell + **BL 450 µL** + **Proteinase K** (20 mg/mL) **10 µL** 혼합
→ Vortexing(10sec)하여 cell을 풀어주어 grinding bead tube(P1)로 transfer
- 2 : P1 tube를 HiGene™ Grinding Bead Holder(Cat. No. GBH-012)에 고정 한 후
Vortex mixer(Genie 2)에 장착하여 최대 속도에서 vortexing을 4 min ~ 15 min 동안 수행*

* Gram Negative Bacterium (ex. *E.coli*, *Salmonella* 등) : 4 min
 * Gram Positive Bacterium (ex. *S.aureus*, *Listera* 등) : 12 min
 * Yeast : 12 min * Filamentous Fungus : 15 min
 (샘플에 따라 최적속도 및 최적시간이 달라질 수 있습니다.)

Column Preparation

- 3 : Spin column을 2 mL Collection tube에 장착 → **Help B Buffer 200 µL** 첨가 → cfg.(11,000 rpm, 1 min)
→ 내려간 Solution 제거 → Spin column 다시 장착

Column Binding

- 4 : Step 2. P1 tube에 **BMB 450 µL** 첨가 → Vortexing(10 sec) → cfg.(11,000 rpm, 30 sec)
- 5 : Step 4. **Lysate 750 µL** 를 Spin Column에 첨가 → cfg. (7,000 rpm, 1 min)
내려간 Solution은 Collection tube와 함께 제거
Spin column을 새로운 2 mL Collection tube에 장착

✓ Protocol.

Column Washing & Dry

- 6 : Spin column에 **BMW1** (+ Ethanol) **500 µL** 첨가 후 cfg.(11,000 rpm, 1 min)
내려간 Solution 제거 → Spin column 다시 장착
- 7 : Spin column에 **BMW2** (+ Ethanol) **500 µL** 첨가 후 cfg.(11,000 rpm, 1 min)
내려간 Solution 제거 → Spin column 다시 장착
- 8 : Spin column에 **BMW3** (+ Ethanol) **500 µL** 첨가 후 cfg.(11,000 rpm, 1 min)
내려간 Solution 제거 → Spin column 다시 장착
- 9 : cfg. (11,000 rpm, 2 min - 공회전*) → Collection tube 제거
Spin column을 새로운 1.5 mL Micro tube에 장착
※ 공회전* : Ethanol을 완전히 제거하기 위해 시약이 제거된 Spin Column을 2 min 이상 원심분리 수행

DNA Elution

- 10 : **Elution Buffer 100 ~ 200 µL** 첨가
※ Elution 진행하실 때 Elution Buffer : RNase A(4 mg/mL) = 100 : 1 비율로 혼합하여 사용하십시오.
→ Incubation (상온, 1 min) → cfg. (11,000 rpm, 1 min) → Spin column 제거
→ Agarose Gel에 전기영동하여 농도 확인 → 4°C 또는 -20°C에서 보관

Table 1. BioFACT™ Grinding Bead Tube를 이용한 샘플별 파쇄시간

Sample Material	Grinding Bead Tube	Disruption Time
Gram-Negative Bacterium e.g., <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	BioFACT™ P1 tube	4 min
Gram-Positive Bacterium e.g., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	BioFACT™ P1 tube	12 min
Yeast e.g., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (50 mg ~ 250 mg 사용할 경우 : 15 min ~ 20 min)	BioFACT™ P1 tube	12 min
Filamentous fungus e.g., <i>Aspergillus spec.</i> , <i>Alternaria brassicae</i>	BioFACT™ P1 tube	15 min

주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항



- 제품의 유효기간은 구입일로부터 **1년 6개월**이다.
- 설명서에 나온 지침에 따라 제품을 사용하였을 경우에만 제품의 품질을 보증한다.
- 실험자의 잘못된 사용이나 부주의로 인해 문제가 발생하였을 경우에는 교환이 되지 않는다.

안전경고 및 응급조치 요령



- 눈, 호흡기, 피부 접촉을 피할 것.
- 눈에 들어갔을 때 : 흐르는 물로 눈을 씻을 것.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 피부에 접촉했을 때 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 장갑 착용 후 사용할 것.

사용자 유의사항

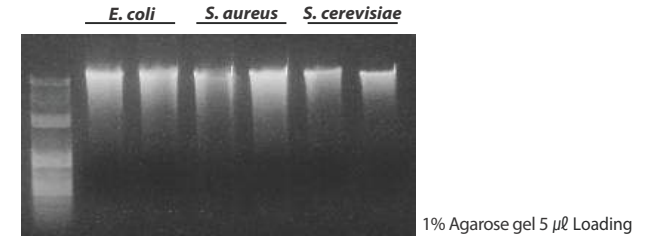


- 유효기한이 지난 제품의 사용을 금지한다.
- RNase A / Proteinase K 는 1차 사용 후 냉동(냉장)보관하며 사용하도록 한다.
- 냉동 제품을 자주 얼리고 녹이는 과정을 반복할 경우, 활성이 저하될 수 있으므로 주의한다. 필요한 경우, 일정량을 분주하여 보관, 사용하도록 한다.
- 조직은 정해진 순서에 따라 정확히 하여야 하며, 키트는 개봉 후 즉시 사용한다.
- 분리된 검체 DNA /RNA 상태에 따라 상이한 결과를 보일 수 있다.
- 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의한다.

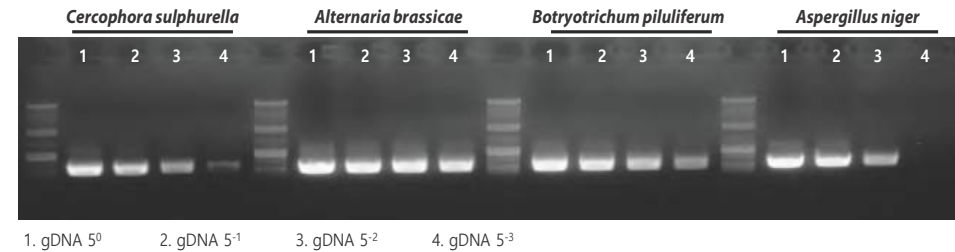


QC DATA

1. HiGene™ Genomic DNA Prep Kit for Microorganisms 제품을 이용한 gDNA 추출 결과



2. Fungi로부터 gDNA 추출 후 PCR 결과 [ITS 1/ ITS4 Primer Set]



3. Fungi로부터 gDNA 추출 후 미생물 동정 Sequencing 결과 [ITS 1/ ITS4 Primer Set]

