



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.



DaBead™ Plasmid Prep Kit
Mini / Midi / Maxi

[For Magnetic Bead]

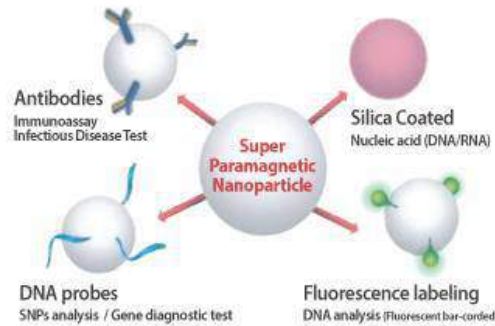
MEMO

 **Table of Contents.**

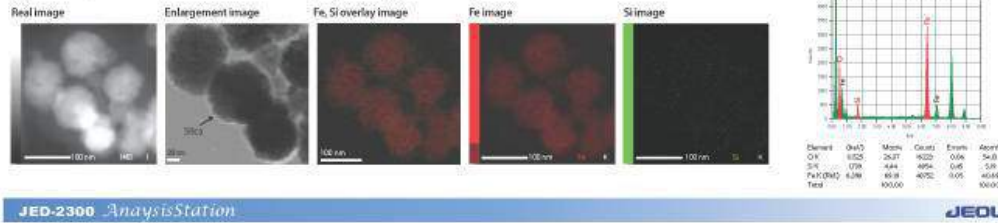
• Description	-----	1
• Know-How	-----	2
• Troubleshooting	-----	3
• Related Product	-----	4
• Plasmid Mini Prep	-----	5
• Plasmid Midi Prep	-----	7
• Plasmid Mixi Prep	-----	9
• 주의사항	-----	11

Magnetic Bead Feature

- 균일한 Bead size
- 핵산과 bead의 높은 결합력으로 적은 양의 시료도 정제 가능
- 원심분리기 사용없이 단시간에 핵산추출
- 다양한 종류의 시료, 다양한 size의 DNA 정제에 적용 가능
- 간결한 정제 step으로 미숙련자도 사용 용이
- Bead간 응집반응 최소화
- Bead의 polymer shell로 철의 독성 노출방지



Typical SEM, TEM images of silica coated superparamagnetic nanoparticles



JED-2300 AnalysisStation

JEOL

✓ Know-How for Preparation

1. Cell culture 시 cell stock을 culture volume의 1/1000 이하로 seed 하세요.
Stock seed culture 할 경우 LB broth 200 ml 에 cell stock 100 ~ 200 μl를 seed하시고 12 ~ 16 hr, overnight culture 하세요. 16 hr 이상 culture 하지 않는 것이 좋습니다.
2. Cell culture time은 12 ~ 16 hr, OD600 Value는 1.5를 넘지않도록 하여 prep 하시길 권장합니다.
OD600 Value가 1.0을 초과할 경우 LB broth로 OD600 Value가 1.0~1.5 이하로 희석한 후 권장 cell harvest volume을 harvest하여 prep 하시길 권장합니다.
 - Mini : 1~ 3(3 ~ 5) ml
 - Midi : 20 ~ 50 (50 ~ 100) ml
 - Maxi : 50 ~ 100 (100 ~ 200) ml
3. -20°C에서 장시간 보관된 cell은 yield, purity에 좋지않은 영향을 줄 수 있습니다.
가급적 냉동 보관 후 1개월 이내의 cell을 사용하고, 실온에서 완전히 해동시킨 후 prep합니다.
4. Washing Buffer는 실험 시작 전 fresh하게 만들어서 사용하기 바랍니다.
5. MP1 Buffer에 RNase A 첨가 후 냉장보관합니다.
6. 상층액과 cell debris 분리가 잘 되지 않는 경우 4°C 냉장고 또는 Ice에 incubation하였다가 진행 합니다.
7. MP2 Buffer는 주변 온도가 낮아지면 SDS로 인해 결정이 생길 수 있습니다. 이런 경우에 water bath 또는 Dry oven에서 heating시켜 녹인 후 사용합니다.
8. Lysis 단계에서 cell이 잘 풀어지지 않는 경우 Lysis step을 3 ~ 5 min 추가로 진행합니다.
또한 vortexing 할 경우 DNA가 degradation되거나 E.coli chromosomal DNA가 함께 추출될 수 있습니다.
9. MP3 Buffer 혼합 후 최대 5분 이상 두지 않도록 합니다. 초과 시 E.coli chromosomal DNA가 함께 추출 될 수 있습니다.
10. 완전히 제거되지 않은 Ethanol은 다음 단계 실험에 영향을 미칠 수 있으므로 Heat block (or dryer, dry oven)을 이용하여 충분히 제거합니다. (Figure.1)
11. Midi / Maxi Prep 시 Resuspension, MP2, MP3 buffer 첨가 후 tube를 위아래로 inverting할 시 bead의 loss가 많아져 yield가 감소할 수 있으므로 좌우로 회전시켜 suspension합니다. (Figure.2)
12. Magnetic bead binding step 이후 모든 과정에서(Endotoxing Removal, washing step) conical tube가 stand에 부착된 상태에서 측면으로 360도 회전시켜 tube벽면의 bead를 회수하도록 합니다. (Figure.3)
13. Elution 후 plasmid DNA를 다시 한번 Magnetic Separation Stand에 장착하여 1 ~ 2 min간 binding 후 New tube에 transfer 하면 더 높은 purity의 plasmid DNA를 얻을 수 있습니다.
14. ME Buffer 첨가 후 elution 시 60°C, 2~5 분 incubation하면 더 높은 yield의 DNA를 회수하실 수 있습니다.
15. 상층액과 cell debris 분리가 잘 되지 않는 경우 4°C 냉장고 또는 Ice에 incubation하였다가 진행 합니다.
16. Genomic DNA가 지속적으로 Plasmid DNA와 같이 Prep 이 된다면 MP1, 2 혼합한 후 Chloroform 200 μl 첨가하여 다음 단계를 진행하면 pellet과 분리가 잘되어 깨끗한 Supernatant를 회수할 수 있습니다.
(※ 주의사항: 단백질층 아래의 chloroform 용액이 떨어져오지 않도록 주의요망)
17. Protocol상의 미생물 배양액은 High copy 기준이며, Low copy plasmid의 경우 앞장의 Amount used의 표를 참고하여 사용하시길 권장합니다.
18. 기타 문의사항은 (주)바이오팩트 학술서비스팀 (☎ 1670-5695)로 연락주세요.



Figure. 1

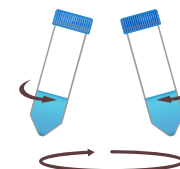


Figure. 2

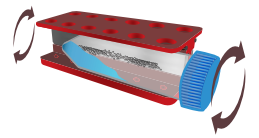


Figure. 3

✔ Troubleshooting

Trouble	Check List
Low Yield DNA	<p>01. Washing buffer를 만든지 오래 된 것은 아닌가요? MW1 buffer (80% Ethanol)를 만든지 오래 되었을 경우 evaporation으로 인해 Ethanol의 농도가 낮아져 yield가 떨어지게 됩니다. MW1 buffer를 새로 만들어 사용해 보세요.</p> <p>02. Cell culture 시간이 너무 짧은 것은 아닌가요? <i>E.coli</i>의 적정배양시간은 12~16 hr입니다. 이 시간보다 짧을 경우 Cell 양이 적어서 DNA 농도가 낮게 됩니다. (OD₆₀₀ Value 1.0~1.5, Overnight cell culture) 반면 overgrowth하는 경우에는 plasmid의 Purity, yield에 영향을 미칠 수 있습니다.</p> <p>03. Antibiotics(marker)의 activity는 확인해 보셨나요? 항생제의 활성이 상실되었을 경우 plasmid를 포함한 Cell보다 포함하지 않은 Cell이 더 많이 growth되어 DNA 가 적게 추출됩니다. 항생제의 활성 및 사용농도를 확인하십시오.</p> <p>04. Washing 시 첨가한 후 bead가 loss되지 않았나요? Conical tube가 stand에 부착된 상태에서 측면으로 360도 회전시켜 tube벽면의 bead를 회수합니다.</p> <p>05. Low copy plasmid 인가요? Plasmid가 Low copy origin일 경우, 일반적으로 추출하시는 세포양보다 더 많은 양을 cultured 하거나, 적은 양의 Elution로 elution하여 농축하십시오.</p>
Genomic DNA in the eluate	<p>01. MP2, MP3를 넣고 강하게 Mix 하셨나요? MP2(Lysis buffer), MP3(Neutralization Buffer)를 첨가한 후에는 조심스럽게 mix해야 합니다. 만약 vortexing 하거나 inverting mix를 강하게 할 경우 chromosomal DNA 조각이 elution solution에 섞여 나올 수 있습니다.</p> <p>02. Lysis time을 너무 오래 둔 것은 아닌가요? Lysis time을 3분을 초과해서는 안됩니다. MP2 buffer 첨가 후 바로 MP3를 혼합하십시오.</p> <p>03. MP1, MP2 MP3 Buffer 처리후 상층액 transfer 시 cell debris가 혼합되었나요? Cell debris내 genomic DNA가 bead에 binding하여 plasmid DNA와 함께 elution될 수 있습니다. 상층액을 옮길 때 최대한 debris/Chloroform이 섞이지 않도록 주의합니다.</p>
Eluted RNA	<p>01. RNase A를 포함한 Resuspension Buffer를 어디에 보관하셨나요? RNase A를 포함한 MP1은 냉장보관 (4 °C)을 하여야 RNase A의 activity가 보존됩니다. 새로운 MP1 Buffer는 사용 전에 RNase A의 첨가 여부를 꼭 확인하십시오.</p>
Low Quality DNA	<p>01. Washing 단계 후 EtOH을 충분히 건조 하셨나요? Elution된 DNA에 EtOH이 포함되어 있을 경우 다음 단계의 실험 진행에 문제가 발생할 수 있습니다. 이를 해결하기 위해 Washing 단계 후 Dry oven, Heat block을 이용하여 EtOH을 완전히 건조한 후 한 후 elution 하면 됩니다.</p> <p>02. OD₆₀₀ Value가 1.5 이상인가요? Overgrowth된 cell을 prep할 경우 purity, yield에 영향을 줄 수 있습니다. LB Broth로 희석하여 OD₆₀₀ value를 1.0~1.5 정도로 dilution하여 사용합니다.</p>

Trouble	Check List
Hard to separate the magnetic beads.	<p>01. DNA의 농도가 너무 높나요? DNA의 농도가 높은 경우 washing 및 Elution 시 magnetic bead가 잘 분리되지 않을 수 있습니다. 1 ~ 3 초간 vortexing 후 spin down하여 Magnetic Separation Stand에 재장착 합니다.</p> <p>02. Elution Volume이 너무 적은 것은 아닌가요? 추출된 DNA의 양이 많은 경우, Magnetic bead에 binding된 DNA가 완전히 elution되지 않을 수 있습니다. Elution volume을 늘려 진행하거나 elution이 끝난 bead에 Elution buffer를 넣고 elution 단계를 진행합니다.</p>

✔ Equipment and Reagent to Be supplied by User

- Magnetic Separation Stand
- Microcentrifuge
- Vortexer
- Heat Block
- 1.5 / 2.0 ml tube
- Pipette & Tips
- Ethanol (96 - 100%)
- Chloroform
- Option : Dryer, Dry oven

✔ Related Product

Prep Kit	Instrument
<p>DaBead™ PCR Purification Kit [Cat. No. PP755-200]</p>	<p>DaBead™ Magnetic Separation Stand (1.5/2.0 ml * 12 hole, 50 ml * 2 ea) [Cat. No. SJ1-MSS11]</p>
<p>DaBead™ Genomic DNA Prep Kit (For Gram(+), Gram(-), Cultured cell) [Cat. No. GD701-100]</p>	<p>DaBead™ Magnetic Heat Block (50 ml * 2 ea) [Cat. No. SJ1-MSS50]</p>

Plasmid Prep Kit - Mini Prep

[Cat. No. PM751-100]

✓ Preparation.

- MW1 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 64 mL** (100 prep 기준)을 넣어 사용
제공해드린 MW1을 다 사용하신 후, **80% EtOH, 10 mL당 MW1 Additive 55 µL** 첨가하여 사용
- MW2 Bottle 빈 bottle로 제공되므로, 100% Ethanol을 넣어 사용
- Kit에 포함된 RNase A (dry 상태)를 Buffer MP1에 섞어준 후에 사용하시고 4°C 에 보관

✓ Protocol.

Cell Lysis & Precipitation

- 미생물 배양액 (2 ~ 5 mL) → cfg (10,000 rpm, 1 ~ 2 min) → media 제거
MP1 (containing RNase A) 250 µL 첨가 → Pellet 현탁
- MP2 250 µL** 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
MP3 350 µL 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
cfg (10,000 rpm, 3~5 min)

※ Option : Cell debris가 잘 분리되지 않을 경우 MP3 Buffer 처리 전 Chloroform 200 µL 첨가 → 4~6회 Pellet Inverting (Vortex 사용금지)

Magnetic Bead Binding

- Step 2의 상층액을 1.5 mL 새로운 tube에 옮긴 후 **Magnetic bead 100 µL** 첨가 → 10회 이상 Inverting
- 1.5 mL tube를 Magnetic separation stand에 장착 (30 sec ~ 1 min간 binding)
→ Stand에 tube가 장착된 상태로 5회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead 회수
→ 1 min 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거.

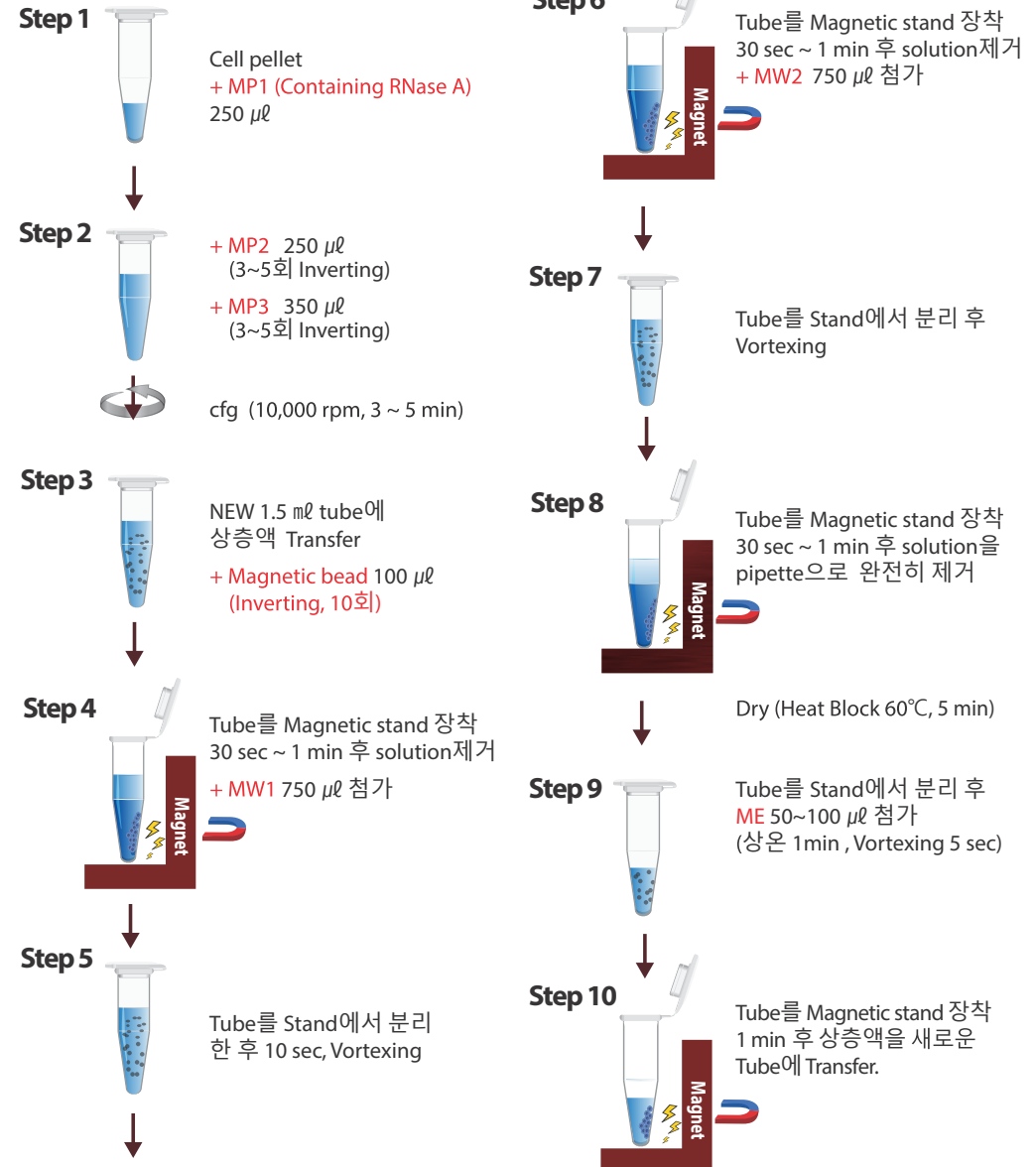
Magnetic Bead Washing & Dry

- MW1 (80% Ethanol) 750 µL** 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 제거
- MW2 (100% Ethanol) 750 µL** 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 을 Pipette으로 완전히 제거
→ 건조(Dry oven (60 °C) 10 min / Heat Block (60 °C) 5 min / Dryer 3 min)
※ Dryer를 사용할 경우, Contamination방지를 위해 1.5 mL tube 앞면을 heating해주세요.
Dry oven에 건조 시 오염 방지를 위해 aluminium foil을 덮어 건조해 주세요.

DNA Elution

- Stand에서 1.5 mL tube를 분리 후 Buffer **ME**를 **50 ~ 100 µL** 첨가
→ Incubation (상온, 1 min), Vortexing (5 sec) or Tapping
→ Magnetic bead를 stand에 장착 후 1 min 뒤 eluted plasmid를 새로운 1.5 mL tube에 옮김
→ Agarose Gel에 전기영동하여 농도 확인 → 4 °C 또는 -20 °C에서 보관

✓ Work Flow



Plasmid Prep Kit - Midi Prep

[Cat. No. PM751-100]

Preparation.

- MW1 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 64 mL** (100 prep 기준)을 넣어 사용
제공해드린 MW1을 다 사용하신 후, 80% EtOH, 10 mL당 MW1 Additive 55 µL 첨가하여 사용
- MW2 Bottle 빈 bottle로 제공되므로, 100% Ethanol을 넣어 사용
- Kit에 포함된 RNase A (dry 상태)를 Buffer MP1에 섞어준 후에 사용하시고 4°C 에 보관

Protocol.

Cell Lysis & Precipitation

- 미생물 배양액 (20 ~ 100 mL) → cfg (5,000 rpm, 15 min) → media 제거
MP1 (containing RNase A) 2.5 mL 첨가 → Pellet 현탁
- MP2 2.5 mL 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
MP3 3.5 mL 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
cfg (10,000 rpm, 3~5 min)
※ Option : Cell debris가 잘 분리되지 않을 경우 MP3 Buffer 처리 전 Chloroform 2 mL 첨가
→ 4 ~ 6회 Pellet Inverting (Vortex 사용금지)

Magnetic Bead Binding

- Step 2의 상층액을 새로운 50 mL tube에 옮긴 후 **Magnetic bead 1 mL** 첨가 → 10회 이상 Inverting
- 50 mL tube를 Magnetic separation stand에 장착 (1 min간 binding)
→ Stand에 tube가 장착된 상태로 5회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead 회수
→ 1 min 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거.

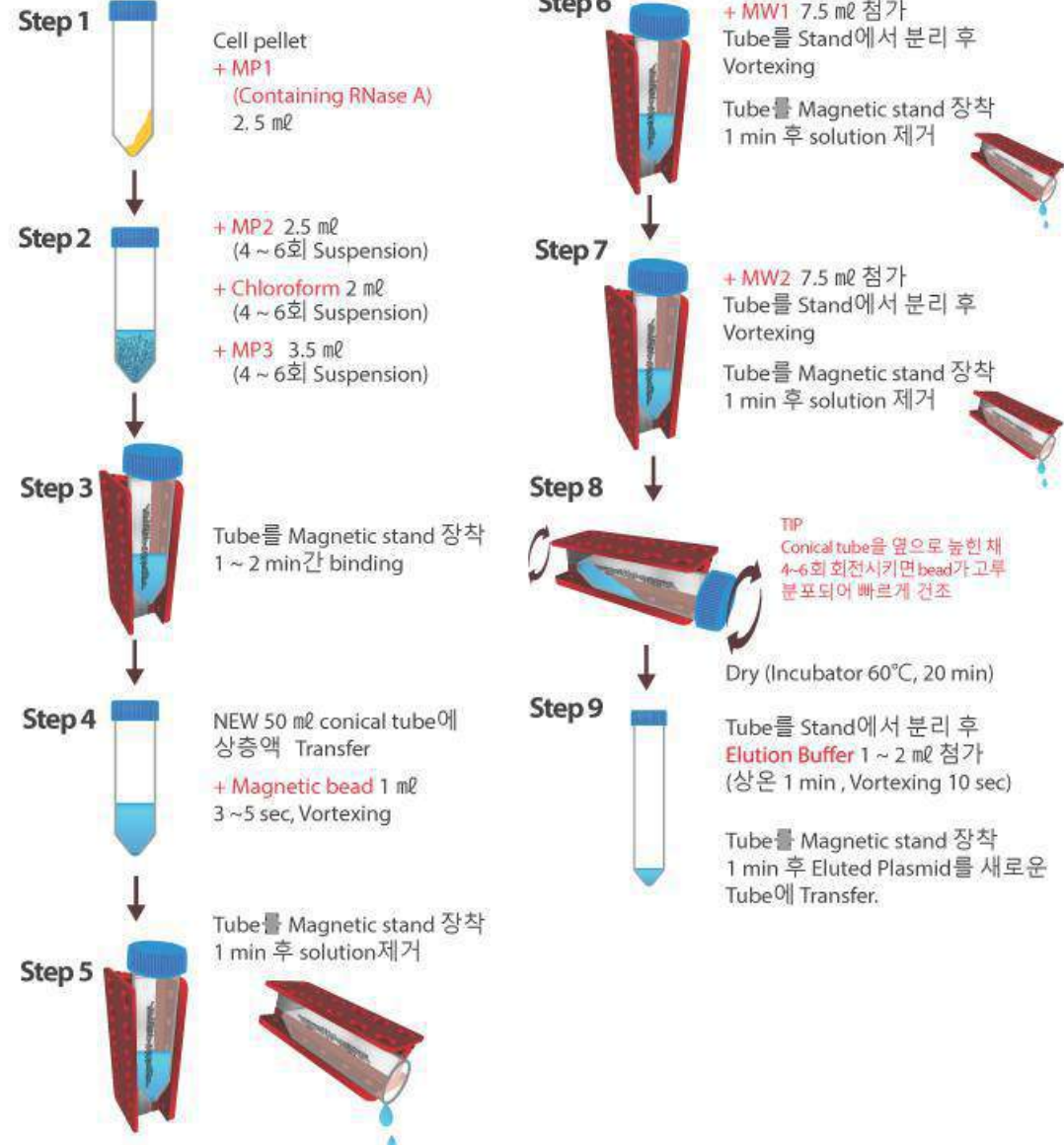
Magnetic Bead Washing & Dry

- MW1 (80% Ethanol) 7.5 mL 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 제거
- MW2 (100% Ethanol) 7.5 mL 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 을 Pipette으로 완전히 제거
→ 건조(Dry oven (60°C) 10 min / Heat Block (60°C) 5 min / Dryer 3 min)
※ Dryer를 사용할 경우, Contamination방지를 위해 50 mL tube 옆면을 heating해주세요.
Dry oven에 건조 시 오염 방지를 위해 aluminium foil을 덮어 건조해 주세요.

DNA Elution

- Stand에서 50 mL tube를 분리 후 Buffer ME를 2 mL 첨가
→ Incubation (상온, 1 min), Vortexing (5 sec) or Tapping
→ Magnetic bead를 stand에 장착 후 1 min 뒤 eluted plasmid를 새로운 15 mL tube에 옮김
→ Agarose Gel에 전기영동하여 농도 확인 → 4°C 또는 -20°C에서 보관

Work Flow



Plasmid Prep Kit - Maxi Prep

[Cat. No. PM751-100]

✓ Preparation.

- MW1 Bottle에는 반드시 **100% Ethanol 64 mL** (100 prep 기준)을 넣어 사용
제공해드린 MW1을 다 사용하신 후, 80% EtOH, 10 mL당 MW1 Additive 55 µL 첨가하여 사용
- MW2 Bottle 빈 bottle로 제공되므로, 100% Ethanol을 넣어 사용
- Kit에 포함된 RNase A (dry 상태)를 Buffer MP1에 섞어준 후에 사용하시고 4°C 에 보관

✓ Protocol.

Cell Lysis & Precipitation

- 미생물 배양액 (100 ~ 300 mL) → cfg (5,000 rpm, 15 min) → media 제거
MP1 (containing RNase A) 5 mL 첨가 → Pellet 현탁
- MP2 5 mL** 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
MP3 7 mL 첨가 → 3 ~ 5회 Inverting (Vortex 금지)
cfg (10,000 rpm, 3~5 min)

※ Option : Cell debris가 잘 분리되지 않을 경우 MP3 Buffer 처리 전 Chloroform 4 mL 첨가
→ 4~6회 Pellet Inverting (Vortex 사용금지)

Magnetic Bead Binding

- Step 2의 상층액을 새로운 50 mL tube에 옮긴 후 **Magnetic bead 2 mL** 첨가 → 10회 이상 Inverting
- 50 mL tube를 Magnetic separation stand에 장착 (1 min간 binding)
→ Stand에 tube가 장착된 상태로 5회 앞뒤로 inverting하여 tube cap의 bead 회수
→ 1 min 후 stand에 장착된 상태로 solution 제거.

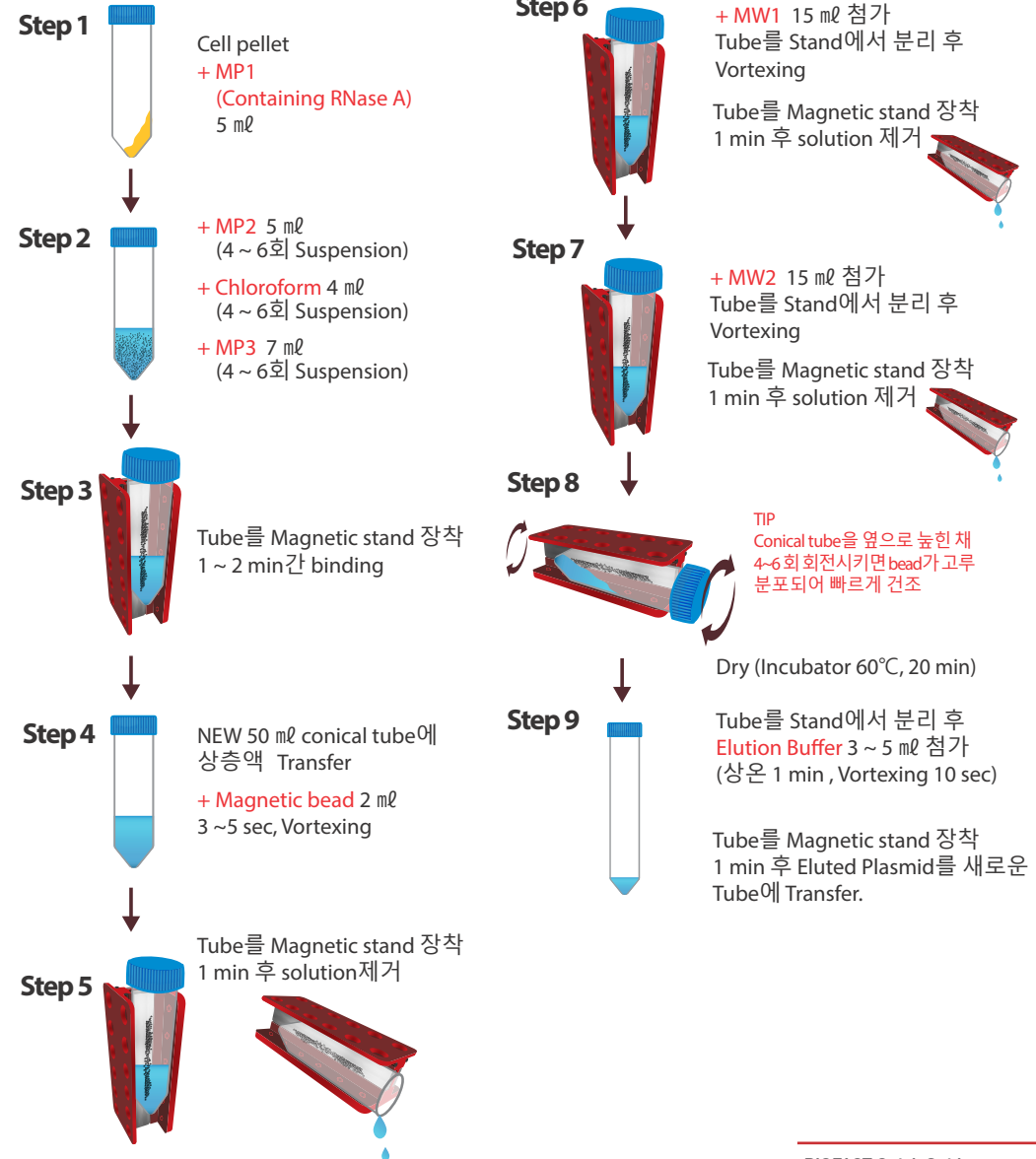
Magnetic Bead Washing & Dry

- MW1 (80% Ethanol) 15 mL** 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 제거
- MW2 (100% Ethanol) 15 mL** 첨가 → Stand에서 tube를 분리 후 10 sec간 Vortexing
→ Stand에 다시 장착 후 30 sec ~ 1 min 뒤 Solution 을 Pipette으로 완전히 제거
→ 건조(Dry oven (60 °C) 10 min / Heat Block (60 °C) 5 min / Dryer 3 min)
※ Dryer를 사용할 경우, Contamination방지를 위해 50 mL tube 옆면을 heating해주세요.
Dry oven에 건조 시 오염 방지를 위해 aluminium foil을 덮어 건조해 주세요.

DNA Elution

- Stand에서 50 mL tube를 분리 후 Buffer **ME**를 3 ~ 5 mL 첨가
→ Incubation (상온, 1 min), Vortexing (5 sec) or Tapping
→ Magnetic bead를 stand에 장착 후 1 min 뒤 eluted plasmid를 새로운 15 mL tube에 옮김
→ Agarose Gel에 전기영동하여 농도 확인 → 4 °C 또는 -20 °C에서 보관

✓ Work Flow



☑ 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 피한다.
- 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.
- Magnetic Separation Stand를 dry oven이나 heat gun에 장시간 노출할 경우 화상 주의

사용자 유의사항



- 유효기한이 지난 제품의 사용을 금지한다.
- Proteinase K / Lysozyme / Lyticase / RNase A는 1차 사용 후 냉동(냉장)보관하며 사용하도록 한다.
- 냉동 제품을 자주 열리고 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.



☑ Origins fo replication and copy numbers of various plasmids

Plasmid	Copy number	Classification	Origin of Replication
pUC vectors	500 ~ 700	High Copy	pMB1
pBluescript Vectors	300 ~ 500	High Copy	ColE1
pGEM Vectors	300 ~ 400	High Copy	pMB1
pTZ Vectors	> 1000	High Copy	pMB1
pBR322 and derivatives	15 ~ 20	Low Copy	pMB1
pACYC and derivatives	10 ~ 12	Low Copy	p15A
pSC101 and derivatives	~ 5	Very Low Copy	pSC101
pMK16 and derivatives	> 15	Low Copy	ColE1
pRK353 and derivatives	~ 15	Low Copy	R6K

☑ Amount used

	Mini	Midi	Maxi
Cell harvest	1 ~ 3 ml	20 ~ 50 ml	50 ~ 100 ml
(Low Copy)	(3 ~ 5 ml)	(50 ~ 100 ml)	(100 ~ 200 ml)
MP1	250 µl	2.5 ml	5 ml
MP2	250 µl	2.5 ml	5 ml
Chloroform	200 µl	2 ml	4 ml
MP3	350 µl	3.5 ml	7 ml
Magnetic bead	100 µl	1 ml	2 ml
MW1	750 µl	7.5 ml	15 ml
MW2	750 µl	7.5 ml	15 ml
ME	50~100 µl	1 ~ 2 ml	3 ~ 5 ml