

1. 본 제품을 안전하게 사용하기 위한 주의 사항

본 제품을 안전하게 사용하기 위해서는 먼저 본 취급 설명서를 잘 읽어 보시기 바랍니다. 이 설명서의 내용을 충분히 이해 될 때까지 사용은 삼가 주시기 바랍니다. 또한 이 설명서는 본 제품을 지정된 목적에 사용하는 방법만 설명하고 있습니다. 본 취급 설명서에 기재되어 있지 않은 목적·방법의 사용은 삼가 주시기 바랍니다. 만일, 본 취급 설명서에 기재되어 있지 않은 목적, 방법으로 사용하는 경우 필요한 안전 대책 및 사태는 모든 작업하시는 분들의 책임입니다. 또한 동시에 사용하는 장치의 사용 설명서를 숙지 해 주시기 바랍니다.

2. 사용 목적

본 제품은 대장균과 효모 세포를 가용화하여 단백질을 추출하는 Kit 입니다. 단백질 추출액은 발현 단백질의 정제, 전기 영동 및 면역 침강, ELISA, 효소 활성 실험 등의 생화학 적, 면역학적 분석에 사용할 수 있습니다.

3. 제품 구성

구성품	용량	개수	보존
Yeast PreLysis buffer 효모 용 전처리 용액	100 mL	1 ea	실온
BactYeast Lysis buffer 대장균 용 전처리 용액	100 mL	1 ea	실온
Protease Inhibitor 프로테아제 억제제	1 mL	1 ea	냉동
DNase I DNA 분해효소	1 mL	1 ea	냉동

4. 조성

구성품	주성분
Yeast PreLysis buffer	완충액
BactYeast Lysis buffer	계면 활성제, 완충액
Protease Inhibitor	100× Aprotinin, pepstatin A, leupeptin, DMSO
DNase I	2kU/mL Deoxyribonuclease I

본 제품은 PRTR 법, 노동 안전 위생법의 규정량을 초과하거나 금지된 물질은 포함되어 있지 않습니다.

5. 보존방법

- **Yeast PreLysis buffer** (효소 전처리 용액)과 **BactYeast Lysis buffer** 는 실온 (20 ~ 30 ℃) 저장합니다. 미개봉 상태이면 사용 기간 내에는 안정합니다.

- **Protease Inhibitor** (단백질 분해 효소 억제제)와 **DNase I** (Deoxyribonuclease I : DNA 분해 효소)는 냉동 (-20 ℃) 저장합니다. 미개봉 상태이면 사용 기간 내에는 안정합니다.

6. 폐기 방법

각 시약의 폐기물은 해당 소속 기관의 폐기 방법을 준수하여 실시 하십시오.

7. 본 제품 이외에 필요한 것

- 증류수, 필요에 따라 DTT 등
- 마이크로 원심 튜브
- Vortex mixer
- 원심 분리기

8. 사용상의 주의

- 본 제품은 냉장 수송에서 제공합니다. 입하 후 즉시 개봉하여 각각의 시약에 적합한 온도에서 보관하십시오.
- **Protease Inhibitor**는 DMSO를 함유하고 있기 때문에 저온에서 동결 할 수 있습니다. 실온에서 완전히 해동 후 사용하십시오.
- **Protease Inhibitor**는 필요에 따라 첨가량의 증감 또는 AEBSF 과 Bestatin 등의 억제제를 추가하십시오.
- **Yeast PreLysis buffer**는 효모의 전처리 전용입니다. **Yeast PreLysis buffer**는 약 알칼리 용액이므로 대장균에 사용하면 대장균이 용해 될 수 있습니다.
- 본 제품은 각종 대장균 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 가용화에 최적화되어 있습니다. 또한 효모 단백질 추출 효율을 올릴 경우에는 실험에 지장이 없으면 **Yeast PreLysis buffer**에 10mM DTT (5 ~ 50mM)을 첨가하거나 **BactYeast Lysis buffer**의 반응 시간을 30 ~ 60 분으로 연장 하십시오.
- 분열 효모 (*Schizosaccharomyces pombe*) 및 기타 효모 세포를 가용화 할 때, 조건의 변경이 필요할 수 있습니다. 특히 분열 효모 (*Schizosaccharomyces pombe*)을 가용화 할 때, **Yeast PreLysis buffer**에 10mM DTT (5 ~ 50 mM)를 첨가하거나 **BactYeast Lysis buffer**의 반응 시간을 30 ~ 60 분으로 연장하여 35 ~ 60 ℃로 승온하면 단백질 추출 효율이 좋아집니다. 위 방법이 실험에 영향을 미치는 경우, 혹은 단백질 추출 효율을 더욱 높이려면 glass beads (Φ0.5mm) 등을 사용하십시오.
- 동결 보존 세포를 사용하는 경우, 세포를 동결하기 전에 증류수로 세척한 후, 원심분리로 증류수를 제거한 세포를 -80 ℃에 보관하십시오.
- 본 키트는 EDTA와 DTT를 첨가하여 사용할 수 있습니다. 또한 Lysozyme과 Zymolyase 등의 효소 활성을 저해하지 않기 때문에 필요 시 첨가하여 사용할 수 있습니다.

- Reporter gene assay 등으로 사용되는 luciferase와 β -galactosidase 등의 효소 활성은 거의 억제하지 않습니다. 추출액을 그대로 활성 측정에 사용할 수 있습니다.

9. 사용방법

I. 대장균의 가용화

1. 대장균을 5 ~ 10mL의 배지에서 A600 = 0.5 ~ 1.0가 될 때까지 배양합니다. (균체량 50 ~ 100mg).
2. 대장균을 2,000xg에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거합니다.
3. 균체에 증류수 5 mL을 첨가, 혼합하여 세척한 후, 2,000xg에서 5분간 원심 분리합니다.
4. 아래 표에 따라 **Protease Inhibitor** 와 **DNase I** 을 혼합합니다. 혼합 후 용액은 사용시까지 실온에 방치합니다.

(1 샘플 : 50 ~ 100mg)	1 샘플당 필요량	Protease Inhibitor (청색 뚜껑)	DNase I (적색 뚜껑)
BactYeast Lysis buffer	0.5 mL	5 μ L	5 μ L

※ 균체량 50 ~ 100mg 당 0.5mL의 시약을 준비합니다. 균체의 양에 따라 시약량은 증감하십시오. **Protease Inhibitor** 와 **DNase I** 혼합 후 시약은 재사용할 수 없습니다.

5. 상등액을 버리고 vortexing 하여 pellet을 완전히 풀어줍니다.
6. 4번에서 제작한 **BactYeast Lysis buffer** (0.5mL / sample)을 균체에 첨가 후 5초 이상 vortexing 합니다.
※ 세포 덩어리가 완전히 사라질 때까지 혼합하십시오.
7. 실온에서 10분간 반응합니다.
※ 세포가 침전할 때 1~2분마다 2-3회 정도 inverting 하십시오.
8. 세포 용해액을 10,000xg에서 5분 (4°C) 원심분리합니다.
9. 상등액을 회수합니다 (대장균 추출 단백질).
※ 원심 상층에는 가용성 단백질이 회수됩니다. 불용성 단백질을 추출할 때 원심 분리에 8M 우레아 함유 완충액 또는 6M 구아니딘 염산염 함유 완충액 등을 첨가하여 용해 단백질을 추출하십시오.

II. 효모 세포의 가용화

1. 효모 세포를 5 ~ 10mL의 배지에서 A600 = 0.5 ~ 1.0가 될 때까지 배양합니다. (균체량 50 ~ 100mg)
2. 효모 세포를 2,000xg에서 5분간 원심 분리합니다.
3. 상등액을 버리고 세포에 증류수 5 mL 첨가하여 혼합하여 세척한 후, 다시 2,000xg에서 5초 동안 원심 분리합니다.
4. 아래 표에 따라 **Protease Inhibitor** 와 **DNase I** 을 혼합합니다.

(1 샘플당 : 50 ~ 100mg)	필요량	Protease Inhibitor (청색 뚜껑)	DNase I (적색 뚜껑)	DTT (비첨부)
Yeast PreLysis buffer	0.5 mL	-	-	0~50mM
BactYeast Lysis buffer	0.5 mL	5 μ L	5 μ L	

혼합 후 용액은 사용시까지 실온에서 방치합니다.

※ 세포량 50 ~ 100mg 당 각 0.5mL의 시약을 준비합니다. 세포 양에 따라 시약량은 증감하십시오. **Protease Inhibitor**와 **DNase I** 혼합 후 시약은 재고할 수 없습니다.

※ DTT는 본 키트에 포함되어 있지 않습니다. DTT의 첨가에 의해 단백질의 추출 효율이 향상됩니다.

5. 상등액을 버리고 vortexing 하여 pellet을 완전히 풀어줍니다.
6. 4번에서 제작한 **Yeast PreLysis buffer** (0.5mL / sample)을 세포에 첨가하여 vortexing 합니다.
※ 실험에 지장이 없는 경우에는 DTT를 5 ~ 50mM 첨가하면 단백질 추출 효율이 올라갑니다.
※ 세포 덩어리가 완전히 사라질 때까지 혼합하십시오.
※ **Yeast PreLysis buffer**는 약 알칼리 용액입니다. 드물게 세포벽 단백질의 분석에 영향을 줄 수 있으므로 주의하시기 바랍니다.
※ 효율은 약간 떨어지지만, **Yeast PreLysis buffer**를 사용하지 않고 효모 단백질을 추출할 수 있습니다. 사용하지 않는 경우는 6~8 단계를 생략하십시오.
7. 실온에서 5분간 배양합니다.
8. 세포 용해액을 10,000xg에서 5초 (4°C) 원심 분리합니다.
9. 상등액을 버리고 vortexing 하여 pellet을 완전히 풀어줍니다.
※ 원심분리 후 상등액은 종이 타월 등을 사용하여 완전히 제거하십시오. **Yeast PreLysis buffer**는 약 알칼리 용액이기 때문에 상등액이 다량 남아있는 경우 다음 과정의 pH에 영향을 줍니다.
10. 세포에 4번에서 제작한 **BactYeast Lysis buffer** (0.5mL / sample)을 첨가하여 5초 이상 vortexing 합니다.
※ 세포 덩어리가 완전히 사라질 때까지 혼합하십시오.
11. 실온에서 10분간 반응합니다.
※ 세포가 침전할 때 1~2분마다 2-3회 정도 inverting 하십시오.
※ 배양 시간을 30~60분으로 연장하면 추출 효율을 높일 수 있습니다.
12. 세포 용해액을 10,000xg에서 5분 (4°C) 원심 분리합니다.
13. 원심 상층액을 회수합니다 (효모 추출 단백질).
※ 원심 상층에는 가용성 단백질이 회수됩니다.
※ 추출 효율이 현저하게 나쁜 경우에는 glass beads (ϕ 0.5mm)를 사용하십시오.

10. 기타

※ 실험 조작은 동일한 프로토콜에서도 약간의 핸들링의 차이에 의해서 결과가 크게 다를 수 있으니 주의 바랍니다.

<http://www.attokorea.co.kr/>



アト一株式会社

主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ

- DNA分析装置
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器

■本 社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
 ◆技術サービス
 ■技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 センター

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
 開発/生産/販売/サービス

Tel (03) 5827-4861 (代表) Fax (03) 5827-6647
 Tel (03) 5827-4873 (代表) Fax (03) 5827-4874
 Tel (03) 5818-7560 (代表) Fax (03) 5818-7563