

Instrukcja

Plasmid Mini AX

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji plazmidów nisko- i wysokokopijnych.
Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
010-50	50 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Specyfikacja	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
Ważne informacje	4
Protokół	4
System barwny LySee	6
Zawieszanie i liza	6
Zobojętnianie i precypitacja	6
Informacje bezpieczeństwa	7

Specyfikacja

format	midikolumna
pojemność złoza	20 µg DNA
wielkość próbki	do 10 ml hodowli bakteryjnej
objętość elucji	precypitacja

Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Kolumny Plasmid 20	50 szt.	2–8 °C
Probówki 20 ml	50 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	15–25 °C
L1 roztwór do zawieszania komórek	33 ml	2–8 °C
L2 roztwór lizujący	33 ml	15–25 °C
L3T roztwór zobojętniający	33 ml	15–25 °C
K1 roztwór równoważący	55 ml	15–25 °C
K2P roztwór płuczący	220 ml	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	70 ml	15–25 °C
PM mieszanina precypitacyjna	45 ml	15–25 °C
TE bufor	10 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- 70% etanol
- Wirówka
- Jałowe probówki o pojemności 2 ml typu Eppendorf

Opcjonalne

- Woda jałowa (wolna od nukleaz) (nr kat. 003-075, 003-25)

Ważne informacje

- Zestaw zawiera system barwny LySee, który umożliwia wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej (str. 6).
- W roztworze lizującym L2 znajduje się SDS, który precypituje w niskich temperaturach. Jeżeli roztwór lizujący L2 nie jest klarowny, należy go ogrzać w temp. 40 °C do uzyskania całkowitej klarowności.

Protokół

1. Zwirować do **10 ml** nocnej hodowli bakteryjnej.
2. Supernatant usunąć, a osad dokładnie zawiesić w **600 µl** roztworu **L1** do zawieszania komórek.

Uwaga: W trakcie zawieszania osadu bakteryjnego roztwór będzie zmieniał wygląd z całkowicie transparentnego o odcieniu ciemnoróżowym na nieprzezroczysty o odcieniu jasnoróżowym. Zawieszanie można zakończyć po całkowitym zniknięciu osadu u dołu próbówki.

Całość przenieść do próbek 2 ml (nie ma w zestawie).
3. Dodać po **600 µl** roztworu lizującego **L2** i ostrożnie wymieszać do całkowitej lizy.

Uwaga: Po dodaniu roztworu lizującego L2, należy ostrożnie mieszać zawartość próbówki, aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy kilkukrotne odwracanie próbówki. Mieszanina powinna zmieniać wygląd i zabarwienie.
4. Pozostawić na **3 min** w temp. pokojowej.

Uwaga. Po 3 min inkubacji, lizat powinien być całkowicie klarowny i jednolicie malinowy. Jeżeli nie jest, należy wymieszać lizat kilka razy i przedłużyć czas inkubacji o dalsze 3 min.
5. Dodać po **600 µl** roztworu zobojętniającego **L3T** i ostrożnie wymieszać, aż do zniknięcia malinowej barwy lizatu.

Uwaga: Po dodaniu roztworu zobojętniającego L3T, następuje gwałtowna precypitacja potasowych soli SDS oraz chromosomalnego DNA i niektórych białek. Po wymieszaniu, zawartość próbówki powinna zmienić kolor na lekko żółty. Brak śladów malinowego zabarwienia wskazuje na całkowite zobojętnienie i pomyślne zakończenie lizy alkalicznej.
6. Lizat wirować przez **5 min** przy **10 000-15 000 RPM (~12 000 x g)**.
7. Umieścić kolumnę Plasmid 20 w próbówce 20 ml (w zestawie).
8. Nanieść po **1 ml** roztworu równoważącego **K1** na kolumnę Plasmid 20. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Nanieść klarowny lizat (supernatant) na kolumnę Plasmid 20. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.
10. Nanieść po **4 ml** roztworu płuczającego **K2P** na kolumnę Plasmid 20. Poczekać, aż roztwór wypłynie

z kolumny.

Uwaga: Należy obserwować czy roztwór w całości przeszedł przez kolumnę. Gdy roztwór przestanie kapać, należy przejść do kolejnego punktu.

11. Nanieść po **200 µl** roztworu elucyjnego **K3** bezpośrednio na membranę Kolumny Plasmid 20. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.

Uwaga: Krok ten ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, gdyż martwa objętość kolumny wynosi 200 µl.

12. Przenieść kolumnę Plasmid 20 do **nowej** probówki **2 ml** (w zestawie).

Uwaga: Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w probówce.

13. Nanieść po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Plasmid 20. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę Plasmid 20.

14. **Uwaga:** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać przez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.

15. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM (~10 000 x g)**.

16. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu plazmidowego DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu bardzo łatwo wylać osad plazmidowego DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.

17. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie). Lekko zamieszać i wirować przez **5 min** przy **10 000 RPM (~10 000 x g)**.

18. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu plazmidowego DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu bardzo łatwo wylać osad plazmidowego DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.

19. Odwrócić probówkę z osadem plazmidowego DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga: Jeżeli na ściankach probówki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.

20. Rozpuścić osad DNA w **50-150 µl** buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej** (nie ma w zestawie).

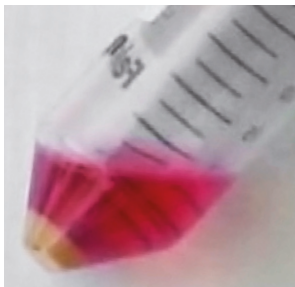
21. Plazmidowe DNA przechowywać w temp. 4-8 °C do czasu dalszych analiz.

System barwny LySee

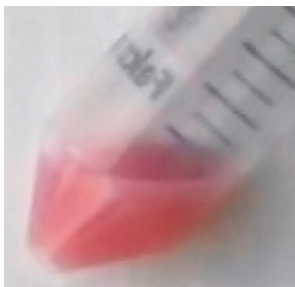
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

Zawieszanie i liza

Dodanie do osadu komórek bakteryjnych przezrystego, purpurowego roztworu L1 sprawia, że osad jest łatwy do zlokalizowania (rys. 1). Podczas procesu zawieszania, mieszanina staje się mętna o jasnoróżowym odcieniu (rys. 2). Etap zawieszania jest zakończony, gdy osad komórek bakteryjnych na dnie próbówki całkowicie zniknie. Po dodaniu roztworu lizującego L2 i inkubacji lizat staje się malinowy. Liza komórek jest zakończona, gdy roztwór osiągnie jednordomie przejrzysty malinowy wygląd (rys. 3).



rys. 1



rys. 2



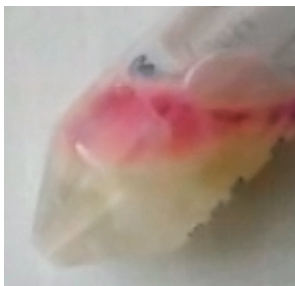
rys. 3

Zobojętnianie i precipitacja

Dodanie do mieszaniny roztworu zobojętniającego L3 powoduje gwałtowną precipitację potasowych soli SDS, chromosomalnego DNA i niektórych białek (rys. 4). Po wymieszaniu mieszanina staje się lekko żółta (rys. 5). Brak śladów malinowego zabarwienia wskazuje na całkowite zobojętnienie i pomyślne zakończenie lizy alkalicznej (rys. 6).



rys. 4



rys. 5



rys. 6

Informacje bezpieczeństwa



UWAGA

L2 roztwór lizujący

H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatrucń lub lekarzem.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

L3T roztwór zubożniający

H315 Działa drażniąco na skórę.
 H318 Powoduje poważne uszkodzenia oczu.
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P280 Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



UWAGA

K1 roztwór równoważny

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

PM mieszanina precypitacyjna

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

