



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## Instrukcja

# Plasmid Mini

Zestaw do izolacji plazmidów wysokokopijnych.

numer katalogowy	wielkość
020-50	50 izolacji
020-250	250 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

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

## Specyfikacja

<b>format</b>	minikolumna
<b>pojemność złoża</b>	20 µg DNA
<b>wielkość próbki</b>	do 3 ml hodowli bakteryjnej
<b>objętość elucji</b>	od 60 µl
<b>roztwór elucyjny</b>	bufor TE, woda

## Skład

składnik	50 izolacji	250 izolacji	przechowywanie
<b>Minikolumny</b>	50 szt.	250 szt.	15-25 °C
<b>L1</b> roztwór do zawieszania komórek	11 ml	60 ml	2-8 °C
<b>L2</b> roztwór lizujący	11 ml	60 ml	15-25 °C
<b>GL3</b> roztwór zobojętniający	25 ml	125 ml	15-25 °C
<b>W</b> pierwszy roztwór płuczący	30 ml	150 ml	15-25 °C
<b>A1</b> drugi roztwór płuczący	50 ml	200 ml	15-25 °C
<b>TE</b> bufor	5 ml	16 ml	15-25 °C

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

### Niezbędne

- Wirówka
- Jałowe probówki o pojemności 1,5 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 **3 ml (1,5-3 ml)** nocnej hodowli bakteryjnej.

2. Supernatant usunąć, a osad dokładnie zawiesić w **200 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.

3. Dodać po **200 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 kilkakrotnie 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 **400 µl** roztworu zobojętniającego **GL3** i ostrożnie wymieszać, aż do zniknięcia malinowej barwy lizatu.

**Uwaga:** Po dodaniu roztworu zobojętniającego GL3, 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 **10 min** przy **10 000-15 000 RPM**.

7. Ostrożnie nanieść lizat (supernatant) na minikolumnę.

8. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.

9. Wyjąć minikolumny z próbek, wylać przesącz i ponownie umieścić minikolumny w tych samych próbkach.

10. Dodać po **500 µl** pierwszego roztworu płuczającego **W**.

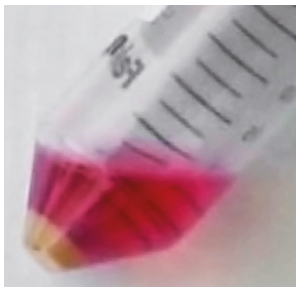
11. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
12. Wyjąć minikolumny z probówek, wylać przesącz i ponownie umieścić minikolumny w tych samych probówkach.
13. Dodać po **600 µl** drugiego roztworu płuczącego **A1**.
14. Wirować przez **2 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
15. Przenieść minikolumny do **nowych** probówek 1,5 ml (nie ma w zestawie).
16. Na złoża na dnie minikolumn nanieść po **60 µl** buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej** (nie ma w zestawie).
17. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**.
18. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
19. Usunąć minikolumny, a plazmidowe DNA przechowywać w temp. 4-8 °C do czasu dalszych analiz.

## System barwny LySee

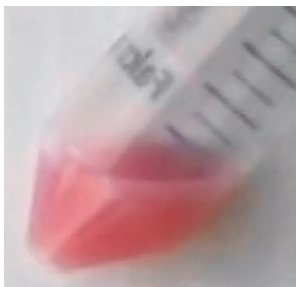
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

### Zawieszanie i liza

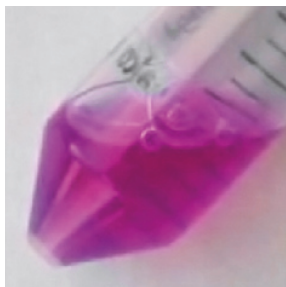
Dodanie do osadu komórek bakteryjnych przezrystego, purpurowego roztworu L1 sprawia, że osad jest łatwy do zlokalizowania (rys. 1). Podczas procesu zawieszania, mieszanina staje się mętna o jasnoróżowym odcieniu (rys. 2). Etap zawieszania jest zakończony, gdy osad komórek bakteryjnych na dnie probówki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



rys. 1



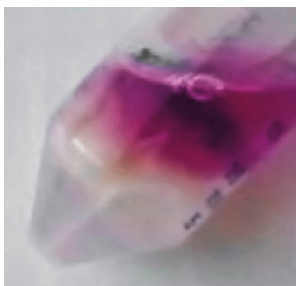
rys. 2



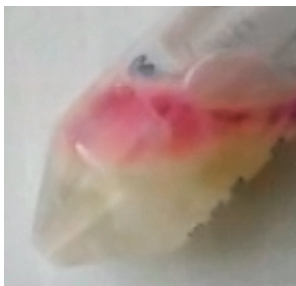
rys. 3

### Zobojętnianie i precipitacja

Dodanie do mieszaniny roztworu zobojętniającego GL3 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

---



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## A1 drugi roztwór płuczący

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.

---



**UWAGA**

## L2 roztwór lizujący

H315 Działa drażniąco na skórę.  
H319 Działa drażniąco na oczy.  
H335 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 Zatruc lub lekarzem.

---



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## GŁ3 roztwór zobojętniający

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.

---



**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

