



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## *Instrukcja*

# Plasmid Midi AX

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

<b>numer katalogowy</b>	<b>wielkość</b>
092-10	10 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 wchodzi 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>	midikolumna
<b>pojemność złoża</b>	200 µg DNA
<b>wielkość próbki</b>	do 100 ml hodowli bakteryjnej
<b>objętość elucji</b>	precypitacja

## Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Kolumny <b>Plasmid 200</b>	10 szt.	2–8 °C
<b>Probówki 50 ml</b>	10 szt.	15–25 °C
<b>Wkłady filtrujące</b>	10 szt.	15–25 °C
<b>Kolumna równoważąca</b>	1 szt.	15–25 °C
<b>L1</b> roztwór do zawieszania komórek	55 ml	2–8 °C
<b>L2</b> roztwór lizujący	55 ml	15–25 °C
<b>L3</b> roztwór zobojętniający	55 ml	15–25 °C
<b>K2P</b> roztwór płuczący	220 ml	15–25 °C
<b>K3</b> roztwór elucyjny	90 ml	15–25 °C
<b>TE</b> bufor	16 ml	15–25 °C
<b>Wzmacniacz precypitacji</b>	350 µl	15–25 °C
<b>Izopropanol</b>	60 ml	15–25 °C

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

### Niezbędne

- 70% etanol
- Wirówka
- Jałowe probówki o pojemności 15 ml i 50 ml typu Falcon

### 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 **100 ml** nocnej hodowli bakteryjnej.

2. Supernatant usunąć, a osad dokładnie zawiesić w **5 ml** 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 **5 ml** 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 **5 min** w temp. pokojowej.

**Uwaga:** Po 5 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 **5 ml** roztworu zobojętniającego **L3** i ostrożnie wymieszać, aż do zniknięcia malinowej barwy lizatu.

**Uwaga:** Po dodaniu roztworu zobojętniającego L3, 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 przelać do wkładu filtrującego umieszczonego w próbówce 50 ml. Probówkę z wkładem zakręcić i wirować przez **5 min** przy **1500 x g**.

7. Umieścić kolumnę Plasmid 200 w próbówce 50 ml (w zestawie).

8. Nanieść klarowny lizat na kolumnę Plasmid 200. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.

9. Nanieść po **20 ml** roztworu płuczającego **K2P** na kolumnę Plasmid 200. 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.

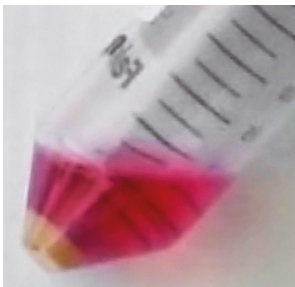
11. Przenieść kolumnę Plasmid 200 do **nowej** probówki **50 ml** (nie ma w zestawie).
12. Nanieść po **6 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Plasmid 200. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.
13. Przebrać eluat do **nowej** probówki **15 ml** (nie ma w zestawie).
14. Dodać po **25 µl wzmacniacza precipitacji** i **5 ml izopropanolu**.  
**Uwaga:** W sytuacjach, w których nie ma konieczności lub nie jest pożądane dodanie wzmacniacza precipitacji (np. bardzo czuła transfekcja), należy dodać jedynie po 5 ml izopropanolu. Nie wpłynie to na obniżenie efektywności izolacji.
15. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **11 000 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 **2 ml 70% etanolu** (nie ma w zestawie). Lekko zamieszać i wirować przez **3 min** przy **11 000 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 przez **10 min** w **temp. pokojowej**.
20. Rozpuścić osad DNA w **0,2-1 ml** 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

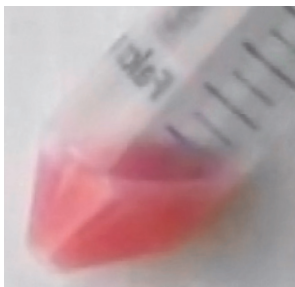
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

### 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 jednorodnie przejrzysty malinowy wygląd (rys. 3).



rys. 1



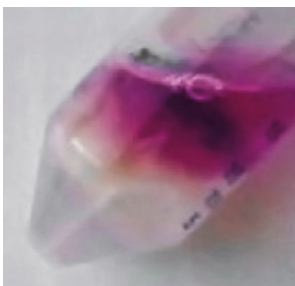
rys. 2



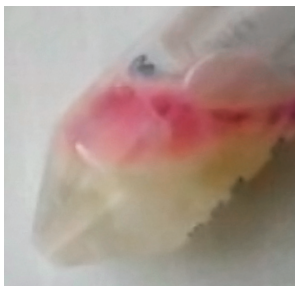
rys. 3

### 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**

## 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**

## Izopropanol

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

