



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## *Instrukcja*

# Plasmid Mini AX

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

<b>numer katalogowy</b>	<b>wielkość</b>
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

<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>	20 µg DNA
<b>wielkość próbki</b>	do 10 ml hodowli bakteryjnej
<b>objętość elucji</b>	precypitacja

## Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Kolumny <b>Plasmid 20</b>	50 szt.	2-8 °C
<b>Probówki 20 ml</b>	50 szt.	15-25 °C
<b>Probówki 2 ml</b>	50 szt.	15-25 °C
<b>L1</b> roztwór do zawieszania komórek	33 ml	2-8 °C
<b>L2</b> roztwór lizujący	33 ml	15-25 °C
<b>L3T</b> roztwór zobojętniający	33 ml	15-25 °C
<b>K1</b> roztwór równoważący	55 ml	15-25 °C
<b>K2P</b> roztwór płuczący	220 ml	15-25 °C
<b>K3</b> roztwór elucyjny	70 ml	15-25 °C
<b>PM</b> mieszanina precypitacyjna	45 ml	15-25 °C
<b>TE</b> 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. Mieszanka 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 płuczącego **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).

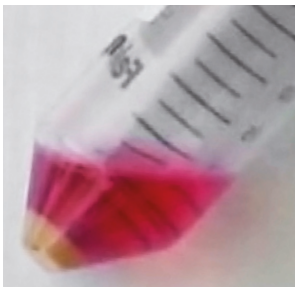
21. Plazmidowe DNA przechowywać w temp. 4-8 °C do czasu dalszych analiz.

## System barwny LySee

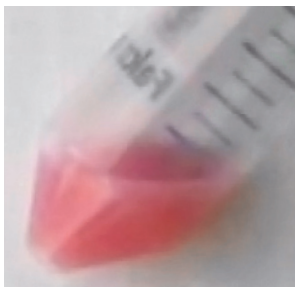
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

### 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 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



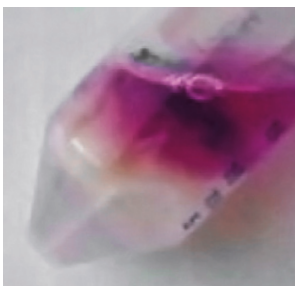
rys. 2



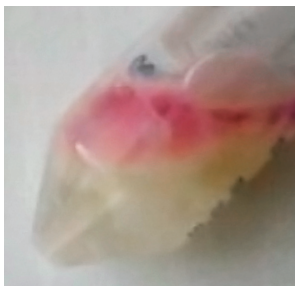
rys. 3

### Zobojętnianie i precipitacja

Dodanie do mieszaniny roztworu zobojętniającego 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 zubożający

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.



**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.



**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.



**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

