



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

Plasmid Maxi AX Sil

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

numer katalogowy	wielkość
093-02S	2 izolacje

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	maxikolumna
pojemność złoża	1 mg DNA
wielkość próbki	do 500 ml hodowli bakteryjnej
objętość elucji	precypitacja

Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Kolumny Maxi AX Sil 1000	2 szt.	15–25 °C
Probówki 50 ml	6 szt.	15–25 °C
Strzykawki do filtracji	2 szt.	15–25 °C
L1 roztwór do zawieszania komórek	45 ml	2–8 °C
L2 roztwór lizujący	45 ml	15–25 °C
L3 roztwór zobojętniający	45 ml	15–25 °C
K1 Sil roztwór równoważący	55 ml	15–25 °C
K2 Sil roztwór płuczący	130 ml	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	55 ml	15–25 °C
TE bufor	5 ml	15–25 °C
Izopropanol	50 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- 70% etanol
- Wirówka
- Zlewki laboratoryjne

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 od **200 ml do 500 ml** nocnej hodowli bakteryjnej.

Uwaga: Ilość hodowli bakteryjnej zależy od kopijności plazmidu, pamiętając, że pojemność kolumny Maxi AX Sil wynosi 1 mg.

2. Supernatant usunąć, a osad dokładnie zawiesić w **20 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 probówki.

3. Przenieść po **10 ml** zawiesiny do dwóch **probówek 50 ml** (w zestawie).

4. Dodać po **10 ml** roztworu lizującego **L2** do każdej z probówek i ostrożnie wymieszać aż do całkowitej lizy.

Uwaga: Po dodaniu roztworu lizującego L2, należy ostrożnie mieszać zawartość probówki, aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy sześciokrotne odwracanie probówki. Mieszanina powinna zmieniać wygląd i zabarwienie.

5. 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.

6. Do każdej z probówek dodać po **10 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 probówki powinna zmienić zabarwienie na lekko żółte. Brak śladów malinowego zabarwienia wskazuje na całkowite zobojętnienie i pomyślne zakończenie lizy alkalicznej.

7. Zostawić w lodzie na **15 min**.

8. Wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

9. Przygotować kolumnę Maxi AX Sil 1000 przez umieszczenie jej w górnym otworze statywu. Pod kolumnę postawić zlewkę do odbioru roztworów wypływających z kolumny.

Zrównoważyć kolumnę Maxi AX Sil 1000 przez naniesienie na złoże kolumny po **25 ml** roztworu równoważącego **K1 Sil**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.

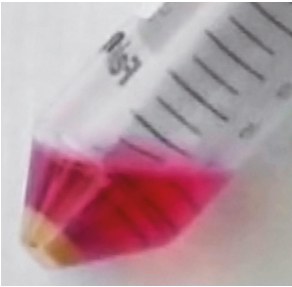
10. Wyjąć tłok ze strzykawki do filtracji i przelać do niej supernatanty z obydwu probówek (z punktu 8.) wraz z pływającą w nich niewielką ilością precipitatu.
11. Włożyć tłok do strzykawki i przefiltrować lizat bezpośrednio do zrównoważonej kolumny Maxi AXSil 1000. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
12. Nanieść na kolumnę Maxi AXSil 1000 po **30 ml** roztworu płuczącego **K2 Sil**. 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.
13. Nanieść na kolumnę Maxi AXSil 1000 po **30 ml** roztworu płuczącego **K2 Sil**. 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.
14. Usunąć zlewkę znajdującą się pod kolumną Maxi AXSil 1000, a pod wylot kolumny podstawić **nową** probówkę 50 ml (w zestawie).
15. Nanieść po **25 ml** roztworu elucyjnego **K3**. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny do probówki.
16. Usunąć kolumnę ze statywu. Do eluatu będącego w probówce dodać po **20 ml izopropanolu**.
17. Probówkę zakręcić, wymieszać i wirować przez **20 min** przy **11 000 x g**.
18. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć osadu plazmidowego DNA.
Uwaga. W trakcie zlewania supernatantu bardzo łatwo wylać osad plazmidowego DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do czystej probówki, tak aby można było go odzyskać.
19. Dodać po **2 ml 70% etanolu** (nie ma w zestawie). Lekko zamieszać i wirować przez **3 min** przy **11 000 x g**.
20. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć osadu plazmidowego DNA.
Uwaga. W trakcie zlewania supernatantu bardzo łatwo wylać osad plazmidowego DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do czystej probówki, tak aby można było go odzyskać.
21. Osad plazmidowego DNA suszyć przez **10 min** w **temp. pokojowej** przez odwrócenie probówki.
22. Rozpuścić osad DNA w **0,2-1 ml** buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej** (nie ma w zestawie). Plazmidowe DNA przechowywać w temp. 4-8 °C do czasu dalszych analiz.

System barwny LySee

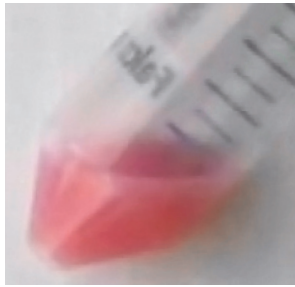
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precypitacja niepożądanych składników komórkowych.

Zawieszanie i liza

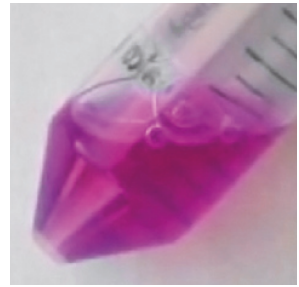
Dodanie do osadu komórek bakteryjnych przezroczystego, purpurowego roztworu L1 sprawia, że osad jest łatwy do zlokalizowania (rys. 1). Podczas procesu zawieszania, mieszanina staje się mętna o jasnoróżowym odcieniu (rys. 2). Etap zawieszania jest zakończony, gdy osad komórek bakteryjnych na dnie próbówki 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



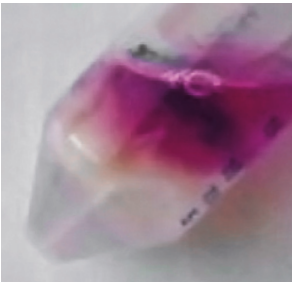
rys. 2



rys. 3

Zobojętnianie i precypitacja

Dodanie do mieszaniny roztworu zobojętniającego L3 powoduje gwałtowną precypitację 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 Zatruc 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

K1 Sil roztwór równoważący

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

K2 Sil 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.



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

