

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 wchodzi 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	minikolumna
pojemność złoza	20 µg DNA
wielkość próbki	do 3 ml hodowli bakteryjnej
objętość elucji	od 60 µl
roztwór elucyjny	bufor TE, woda

Skład

składnik	50 izolacji	250 izolacji	przechowywanie
Minikolumny	50 szt.	250 szt.	15–25 °C
L1 roztwór do zawieszania komórek	11 ml	60 ml	2–8 °C
L2 roztwór lizujący	11 ml	60 ml	15–25 °C
GL3 roztwór zobojętniający	25 ml	125 ml	15–25 °C
W pierwszy roztwór płuczący	30 ml	150 ml	15–25 °C
A1 drugi roztwór płuczący	50 ml	200 ml	15–25 °C
TE bufor	5 ml	20 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**.

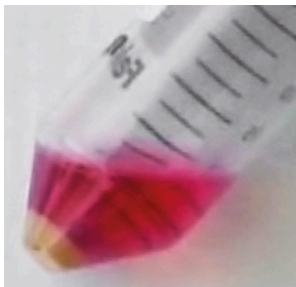
11. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
12. Wyjąć minikolumny z probówek, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić minikolumny w tych samych probówkach.
13. Dodać po **600 µl** drugiego roztworu płuczającego **A1**.
14. Wirować przez **2 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
15. Przenieść minikolumny 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

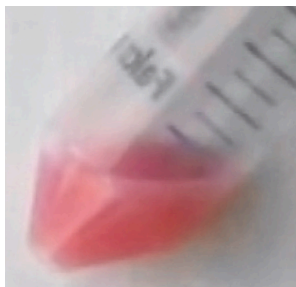
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precypitacja niepożądanych składników komórkowych.

Zawieszanie i liza

Dodanie do osadu komórek bakteryjnych przejrzystego, 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 jednnorodnie przejrzysty malinowy wygląd (rys. 3).



rys. 1



rys. 2



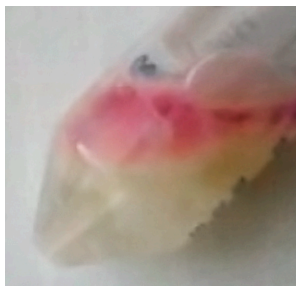
rys. 3

Zobojętnianie i precypitacja

Dodanie do mieszaniny roztworu zobojętniającego GL3 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



NIEBEZPIECZEŃSTWO

A1 drugi roztwór płukający

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.

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

GL3 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

wersja 2025-1

