

Instrukcja

Plasmid Midi AX Endotoxin-Free

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

numer katalogowy	wielkość
092EF-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 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	midikolumna
pojemność złoża	200 µg DNA
wielkość próbki	do 100 ml hodowli bakteryjnej
objętość elucji	precypitacja

Skład

składnik	ilość	nr kat.	przechowywanie
Kolumny Plasmid 200	10 szt.	K-P200-10	2–8 °C
Probówki 50 ml	2 x 5 szt.	K-F50-5	15–25 °C
Wkłady filtrujące	2 x 5 szt.	K-WF50-5	15–25 °C
Kolumna równoważąca	1 szt.	K-CW50-1	15–25 °C
LPS-out roztwór do usuwania endotoksyn	15 ml	K-LPS-15	15–25 °C
L1 roztwór do zawieszania komórek	55 ml	K-L1-55	2–8 °C
L2 roztwór lizujący	55 ml	K-L2-55	15–25 °C
L3 roztwór zobojętniający	55 ml	K-L3-55	15–25 °C
K2P roztwór płuczący	220 ml	K-K2P-220	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	90 ml	K-K3-90	15–25 °C
TE bufor	16 ml	K-TE-16	15–25 °C
Wzmocniacz precypitacji	350 µl	K-WZM-035	15–25 °C
Izopropanol	60 ml	K-IZO-60	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.

Uwaga: Po dodaniu roztworu lizującego L2, należy ostrożnie mieszać zawartość próbówki, aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy kilkakrotne odwracanie próbówki. Mieszanie powinno 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. Do przefiltrowanego lizatu dodać po **1,2 ml** roztworu **LPS-out**. Wymieszać i pozostawić w lodzie na **30 min**.

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

9. Nanieść lizat (z punktu 7) na kolumnę Plasmid 200. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.

10. Nanieść po **20 ml** roztworu płuczającego **K2P** na kolumnę Plasmid 200. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.

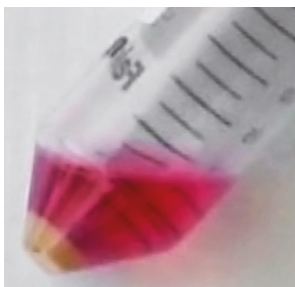
11. Przenieść kolumnę Plasmid 200 do **nowej** probówki **50 ml** (nie ma w zestawie).
12. Nanieść po **6 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Plasmid 200. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.
13. Przełać eluat do **nowej** probówki **15 ml** (nie ma w zestawie).
14. Dodać po **25 µl wzmacniacza precypitacji** i **5 ml izopropanolu**.
Uwaga: W sytuacjach, w których nie ma konieczności lub nie jest pożądane dodanie wzmacniacza precypitacji (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

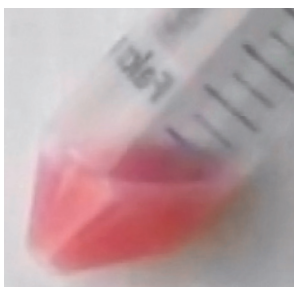
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

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 probówki całkowicie zniknie. Po dodaniu roztworu lizującego L2 i inkubacji lizat staje się malinowy. Liza komórek jest zakończona, gdy roztwór osiągnie jednordomie przejrzysty malinowy wygląd (rys. 3).



rys. 1



rys. 2



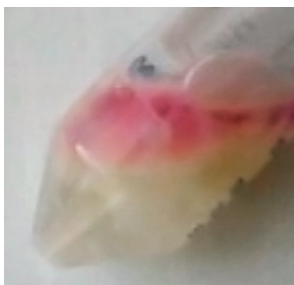
rys. 3

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



NIEBEZPIECZEŃSTWO

LPS-out roztwór do usuwania endotoksyn

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H318 Powoduje poważne uszkodzenia oczu
 H335 Może powodować podrażnienia dróg oddechowych.
 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.
 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

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

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

