



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

Plasmid Mini AX Gravity

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji plazmidów wysokokopijnych metodą grawitacyjną.

numer katalogowy	wielkość
015-100	100 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	7
Zawieszanie i liza	7
Zobojętnianie i precypitacja	7
Problem z prędkością przepływu lizatu	8
Zobojętnianie próbek DNA	8
Test funkcjonalności buforu E	8
Technologia Gravity flow	9
Informacje bezpieczeństwa	10

Specyfikacja

format	minikolumna
pojemność złoża	20 µg DNA
wielkość próbki	do 3 ml hodowli bakteryjnej
objętość elucji	od 120 µl
roztwór elucyjny	bufor E

Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Kolumny Micro AXB	100 szt.	2-8 °C
Probówki odbieralnikowe 5 ml	100 szt.	15-25 °C
L1 roztwór do zawieszania komórek	35 ml	2-8 °C
L2 roztwór lizujący	35 ml	15-25 °C
L3 roztwór zobojętniający	35 ml	15-25 °C
K1 roztwór równoważący	60 ml	15-25 °C
K2P pierwszy roztwór płuczący	70 ml	15-25 °C
W2 drugie roztwór płuczący	60 ml	15-25 °C
E bufor elucyjny (nie zawiera EDTA)	10 ml	2-8 °C
N bufor zobojętniający	1 ml	15-25 °C
T roztwór	400 µl	15-25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Wirówka
- Jałowe probówki o pojemności 5 ml typu Falcon
- Jałowe probówki o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf

Opcjonalne

- Statyw Gravity flow (nr kat. 008-1)

Ważne informacje

- Zestaw zawiera system barwny LySee, który umożliwia wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej (str. 7).
- 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 1-3 ml nocnej hodowli bakteryjnej.

2. Supernatant usunąć, a osad dokładnie zawiesić w 300 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 300 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 300 µl 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 wirować przez 10 min przy 10 000 RPM.

7. Podczas wirowania przygotować kolumny Micro AXB przez dokładne zamocowanie ich do próbek odbieralnikowych 5 ml i umieszczenie w pozycji pionowej w statywie.



Zdjęcie poglądowe:

umieszczenie kolumn i próbek odbieralnikowych w statywie Gravity flow.

8. Nanieść po **500 µl** roztworu równoważącego **K1** na kolumnę Micro AXB.
Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

Dobrą praktyką jest nanoszenie roztworu K1 na ściankę kolumny tak, aby uniknąć przypadkowego zablokowania przepływu kolumny przez bąbelkę powietrza uwięziony między złożem a naniesionym roztworem K1. Kolumna jest gotowa do użytku, gdy roztwór przestanie kapać z kapilary.

9. Po wirowaniu pobrać klarowny supernatant i nanieść go na zrównoważoną kolumnę Micro AXB.

Poczekać, aż lizat przejdzie przez kolumnę Micro AXB pod wpływem sił grawitacji.
Zwykle trwa to do **4 min**.

Prędkość przepływu przez kolumnę uzależniona jest od zawartości DNA w próbce. Im więcej DNA, tym wolniejsza prędkość przepływu.

Rozwiązywanie problemów z prędkością przepływu lizatu - str. 8.

Uwaga: dotyczy punktów 9-11 protokołu izolacji

- W przypadku izolacji plazmidowego DNA z mniejszej ilości prób (do 10) należy obserwować czy lizat w całości przeszedł przez kolumnę. Gdy roztwór przestanie kapać z kapilary, należy przejść do kolejnego punktu protokołu izolacji.
- W przypadku izolacji plazmidowego DNA z większej ilości prób (ponad 10) zalecamy odczekanie do 4 min, zamiast obserwacji procesu w poszczególnych kolumnach.

10. Nanieść po **700 µl** pierwszego roztworu płuczącego **K2P** na kolumnę **Micro AXB**.
Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

11. Nanieść po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2** na kolumnę **Micro AXB**.
Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

12. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 8.

Nanieść po **40 µl** buforu elucyjnego E na kolumnę **Micro AXB**.
Zostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.

Krok ten ma celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, ponieważ martwa objętość kolumny wynosi około 40 µl.

Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem. Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. od 2-8 °C.

13. Przygotować próbki elucyjne - mogą to być 1,5 ml próbki typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
Nanieść na dno próbek po **2 µl** buforu zubożniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 8.

14. Przenieść kolumny Micro AXB do przygotowanych próbek elucyjnych.

15. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 8.

Nanieść po **40 µl** buforu elucyjnego E na kolumnę **Micro AXB**.

Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem. Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. od 2-8 °C.

16. Wirować przez **30-60 s** przy **5000 RPM**.

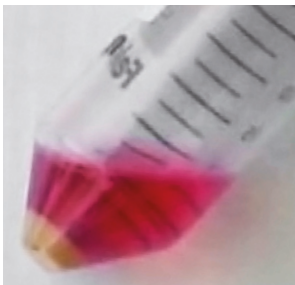
17. Usunąć kolumnę Micro AXB, zamknąć probówkę elucyjną. Przechowywać DNA do czasu dalszych analiz.

System barwny LySee

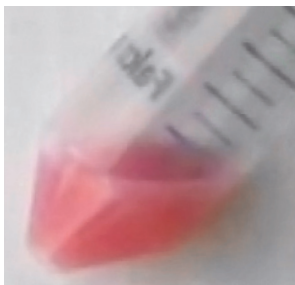
System barwny LySee umożliwia łatwą i wygodną kontrolę etapów lizy alkalicznej. Dzięki kontroli wizualnej, możliwe jest wyeliminowanie ewentualnych błędów, takich jak: niecałkowite zawieszenie komórek, nieefektywna liza komórek, niepełna precipitacja niepożądanych składników komórkowych.

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



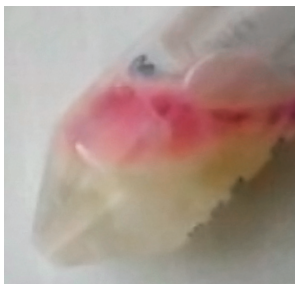
rys. 3

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

Problem z prędkością przepływu lizatu

problem	przyczyna	rozwiązanie
wolny przepływ próbki przez kolumnę Micro AXB	bardzo duża ilość DNA w próbce	- kolumnę Micro AXB umieścić w probówce typu Eppendorf i odwirować. - przy kolejnej izolacji należy zmniejszyć ilość badanej próbki o połowę.
pęcherzyki powietrza w drenie probówki odbieralnikowej	niedokładne zamocowanie kolumny Micro AXD na probówce odbieralnikowej	- "dokręcenie" kolumny Micro AXB. - pęcherzyki powietrza można usunąć przez uniesienie probówki z kolumną Micro AXD na 1-2 cm i jej opuszczenie.

Zobojętnianie próbek DNA

Bufor elucyjny E jest silnie alkaliczny i po zamrożeniu może powodować degradację DNA. Z tego powodu konieczne jest stosowanie buforu zobojętniającego N. Z naszej praktyki laboratoryjnej wynika, że najwygodniej jest dodać bufor zobojętniający N przed elucją DNA, do pustej probówki elucyjnej.

W trakcie elucji, zawieszony w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Będzie zawieszony w roztworze 10 mM Tris pH 8,5.

Jeżeli bufor zobojętniający N nie został dodany przed elucją DNA, to można dodać go po zakończonej izolacji - przed zamrożeniem próbek DNA.

Test funkcjonalności buforu E

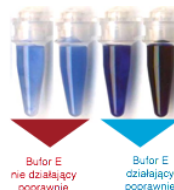
Bufor elucyjny E ma kluczowy wpływ na wydajność elucji DNA. Jego prawidłowe działanie można sprawdzić za pomocą roztworu T wchodzącego w skład zestawu.

Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

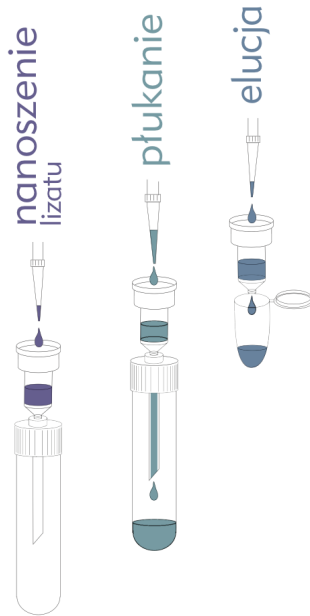
- Bufor E nie był używany przez min. 2 miesiące.
- Bufor E był przechowywany w temp. pokojowej przez min. 2 tygodnie.
- Fiolka zawierająca bufor E nie została szczelnie zamknięta po użyciu.

Test funkcjonalności:

Przenieść 20 µl buforu E do probówki PCR; dodać po 2 µl roztworu T; całość wymieszać, poczekać 2 min. Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem przedstawiającym kolory referencyjne.



Technologia Gravity flow



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.



UWAGA

K1 roztwór równoważący

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. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

E bufor elucyjny

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
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.
P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



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

