



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Plasmid Mini AX Gravity

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji plazmidów
wysokokopijnych metodą grawitacyjną.

wersja 1020

100 izolacji

Nr kat. 015-100



Pojemność kolumny do oczyszczania plazmidowego DNA wynosi 20 µg.

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Skład zestawu

Składnik	Ilość	Temp. Przechowywania
Kolumny Micro AXB	100 szt.	+4 do +8 °C
Probówki odbieralnikowe 5 ml	100 szt.	Temp. Pok.
L1 roztwór do zawieszania	35 ml	Temp. Pok.
L2 roztwór lizujący	35 ml	Temp. Pok.
L3 roztwór zobojętniający	35 ml	Temp. Pok.
K1 roztwór równoważący	60 ml	Temp. Pok.
K2P pierwszy roztwór płuczący	70 ml	Temp. Pok.
W2 drugi roztwór płuczący	60 ml	Temp. Pok.
E bufor elucyjny	10 ml	+4 do +8 °C
N bufor zobojętniający	1 ml	Temp. Pok.
Roztwór T	400 µl	+4 do +8°C

Wyposażenie i materiały niezbędne do izolacji DNA, które nie wchodzą w skład zestawu

1. Materiał do izolacji plazmidowego DNA
2. Probówki 1,5 ml typu Eppendorf
3. Probówki PCR (opcjonalnie)
4. Mikrowirówka

UWAGA:

Przed przystąpieniem do pracy zalecamy oczyszczenie powierzchni roboczej używając produktu LabZAP™ (nr kat. 040–500)

Ilustracje zamieszczone w niniejszym protokole mają jedynie charakter poglądowy. Ich rzeczywisty wygląd, w tym kolor, może odbiegać od prezentowanych w grafice.

Firma A&A Biotechnology udziela rocznej gwarancji na niniejszy zestaw. Firma nie gwarantuje poprawnego działania zestawu do izolacji plazmidowego DNA w wypadku:

- odstępowania od dostarczonego wraz z zestawem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład zestawu
- użycia przeterminowanych lub niewłaściwie przechowywanych odczynników oraz kolumn

Protokół izolacji

1. Zwirować 1–3 ml nocnej hodowli bakteryjnej. Supernatanty usunąć, a osady dokładnie zawiesić w 300 µl roztworu L1 do zawieszania.

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.

2. Dodać po 300 µl alkalicznego roztworu lizującego L2 i po wymieszaniu przez kilkakrotne odwracanie próbówek pozostawić na 3 min w temp. pokojowej.

Po dodaniu roztworu L2 należy ostrożnie mieszać zawartość próbówki, aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA.

Po 3 min inkubacji lizat powinien być całkowicie klarowny i jednolicie fioletowy. W przeciwnym wypadku należy odwrócić lizat kilka razy i przedłużyć czas inkubacji o dalsze 3 min.

3. Dodać po 300 µl roztworu zobojętniającego L3 i wymieszać przez kilkakrotne odwracanie próbówek.

Po wymieszaniu zawartość próbówki powinna zmienić zabarwienie na lekko żółte.

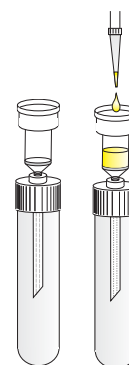
4. Całość wirować 10 min przy 10 000 RPM.

5. Podczas wirowania przygotować kolumny Micro AXB do oczyszczania DNA przez dokładne zamocowanie ich do próbówek odbieralnikowych i umieszczenie w pozycji pionowej w statywie.

Następnie nanieść na kolumny Micro AXB po 500 µl roztworu równoważącego K1.

Dobłą praktyką jest nanoszenie roztworu K1 na ściankę kolumny tak, aby uniknąć przypadkowego zablokowania przepływu kolumny przez bąbelek powietrza uwięziony pomiędzy złożem a naniesionym roztworem K1.

Kolumna jest gotowa do użytku, gdy roztwór przestanie kapać z kapilary.



- Po wirowaniu nanieść supernatanty na zrównoważone uprzednio kolumny Micro AXB.

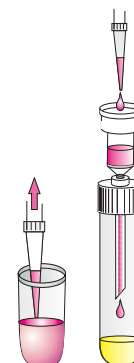
Poczekać, aż lizat przejdzie przez kolumny Micro AXB pod wpływem sił grawitacji. Zwykle trwa to **do 4 min**.

Prędkość przepływu przez kolumnę uzależniona jest od zawartości DNA w próbce.

UWAGA:

Dotyczy punktów 6.–8. protokołu izolacji.

W przypadku izolacji plazmidowego DNA z większej ilości prób (ponad 10) zalecamy odczekać do 4 min, zamiast obserwowania zachowania się poszczególnych kolumn (patrz „Uwagi” – str. 5).



W przypadku izolacji 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 (patrz „Uwagi” – str. 5).

- Nanieść na kolumny Micro AXB po **700 µl** pierwszego roztworu płuczącego **K2P**.
Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumn Micro AXB.

- Następnie dodać po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2**.
Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumn Micro AXB.

- Nanieść na kolumny Micro AXB po **40 µl** roztworu elucyjnego **E** i poczekać **2 min**.

Krok ten ma na 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.

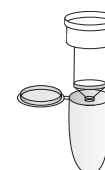
Bufer elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. +4 do +8 °C.



- Przygotować probówki elucyjne (nie ma w zestawie). Mogą to być jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf.
Dodać na ich dno po **2 µl** buforu zobojętniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA. Patrz “Informacje dodatkowe” – str. 5.

- Przenieść kolumny Micro AXB do przygotowanych probówek elucyjnych.

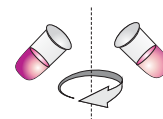


12. Eluować DNA przez naniesienie na złożę kolumn Micro AXB po 40 µl roztworu elucyjnego E.

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. +4 do +8 °C.



13. Całość wirować przez 30–60 s przy 5000 RPM.



14. Usunąć kolumny Micro AXB i zamknąć próbki elucyjne. Przechowywać plazmidowe DNA w temp. +4 °C do +8 °C.

Informacje dodatkowe

- **Zobojętnianie próbek DNA.** Bufor elucyjny E jest silnie alkaiczny 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 próbki elucyjnej (punkt 10. protokołu izolacji).

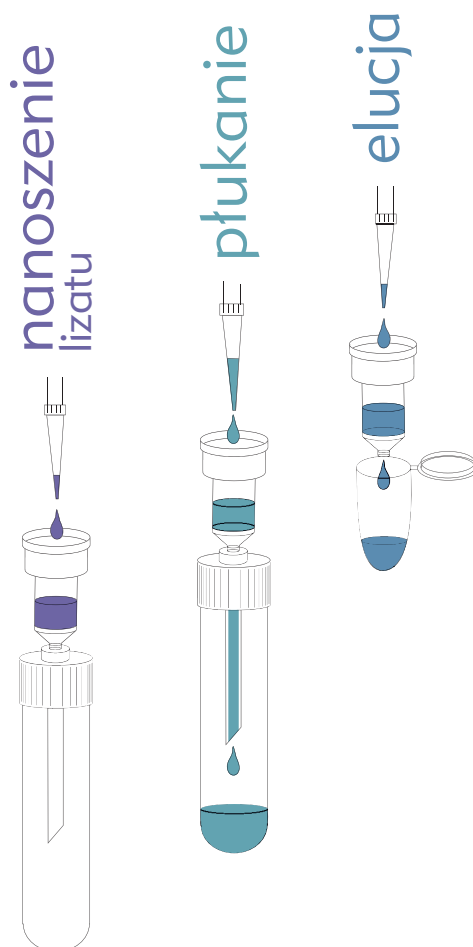
W trakcie elucji, zawieszona w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Po dodaniu buforu zobojętniającego N – DNA będzie zawieszona w roztworze 10 mM Tris pH 8,5. Tak przygotowane plazmidowe DNA może zostać bezpośrednio użyte do dalszych aplikacji, m.in. reakcji sekwencjonowania, PCR, klonowania.

Jeżeli bufor zobojętniający N nie został dodany w punkcie 10. protokołu, to można dodać go po zakończonej izolacji – przed zamrożeniem próbek DNA.

Uwagi

Problem	Przyczyna	Rozwiązanie
Wolny przepływ próbki przez kolumnę	Bardzo duża ilość DNA w próbce	Kolumnę można odwirować po umieszczeniu jej uprzednio w próbówce typu Eppendorf. Przy kolejnej izolacji należy zmniejszyć o połowę ilość próbki badanej.
Pęcherzyki powietrza w drenie próbki odbieralnikowej	Niedokładne zamocowanie kolumny na próbówce odbieralnikowej	Zalecamy “dokręcenie” kolumny. Uwięzione w drenie pęcherzyki powietrza można usunąć poprzez uniesienie próbki z kolumną na 1–2 cm i opuszczenie jej.

Technologia Gravity flow



Produkty oparte na technologii Gravity flow

Nazwa	Ilość	Materiał	Nr. kat
Genomic Micro AX Blood Gravity	100 izolacji	Krew	101-100
Genomic Micro AX Swab Gravity	100 izolacji	Wymazy	105-100
Genomic Micro AX Swab Gravity Plus	100 izolacji + wymazówki	Wymazy	105-100P
Genomic Micro AX Bacteria Gravity	100 izolacji	Bakterie	102-100
Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity	100 izolacji	Bakterie G+	102-100M
Genomic Micro AX Tissue Gravity	100 izolacji	Tkanki	104-100
Genomic Micro AX Plant Gravity	100 izolacji	Rośliny	103-100
Bead-Beat Micro AX Gravity	20 izolacji	Trudne próby	106-20
	100 izolacji	Trudne próby	106-100

Test funkcjonalności buforu elucyjnego E

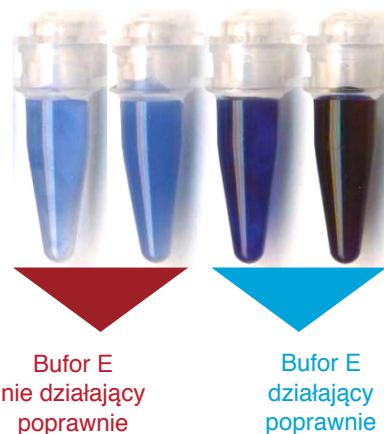
Bufor elucyjny E ma kluczowy wpływ na wydajność elucji DNA. Jego prawidłowe działanie można sprawdzić za pomocą roztworu T wchodzącego w skład zestawu.

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

Protokół

1. Przenieść **20 μ l** buforu **E** do nowej probówki PCR
2. Dodać po **2 μ l** roztworu **T**. Całość wymieszać
3. Począkać **2 min**
4. Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem obok przedstawiającym kolory referencyjne



Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

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.