

GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA o wysokiej czystości z bakterii (1.0-3 ml hodowli)

● **kat. nr. E3500**

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodnikow 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23



Spis treści

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	2
Uwagi wstępne.....	3
Protokół.....	3
Środki ostrożności.....	5

Składniki zestawu	50 izolacji E3500-01	150 izolacji E3500-02	Warunki przechowywania
Buffer PL	1.8 ml	5.4 ml	15-25°C
Cell R *	15ml	45 ml	2-8°C
Lysis Blue	15 ml	45 ml	15-25°C
Neutral B	21 ml	63 ml	15-25°C
Wash PLX1	30 ml	90 ml	15-25°C
Wash PLX2	39 ml	117 ml	15-25°C
Elution	6 ml	18 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	50 szt.	3 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	

* Bufor CellR zawiera RNazę A (100 µg/ml).

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Mikrowirówka, rękawiczki, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml, pipety.

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw jest przeznaczony do izolacji wysokiej czystości plazmidowego DNA z bakterii gram ujemnych, w tym rekombinowanych szczepów *Escherichia coli*. Najwyższej jakości DNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej. Ze względu na różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych gatunków/szczepów bakterii, należy empirycznie ustalić optymalną liczbę komórek na jedną izolację. Ogólnie masa bakteryjna po osadzeniu hodowli przez wirowanie nie powinna przekraczać 50 mg, a objętość hodowli przypadająca na jedną izolację nie powinna przekraczać 3.0 ml.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Maksymalna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 700 µl. W wypadku zapchania kolumny lizatem bakteryjnym należy zmniejszyć objętość hodowli na izolację.

UWAGA 3 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw do oczyszczania DNA należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem buforu Cell R (zawierającego RNazę A), który należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. W wypadku krystalizacji komponentów przechowywanych buforów, roztwory należy podgrzać do 37°C, aż do całkowitego wyklarowania.

UWAGA 4 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszelkie roztwory z zestawu należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

UWAGA 5 • Elution jest buforem o niskiej zawartości soli, w składzie nie zawiera chelatorów jonów metali (np. EDTA), które mogą hamować reakcje enzymatyczne. DNA rozpuszczone w buforze Elution może być wykorzystane do trawienia enzymami restrykcyjnymi, kinazowania, ligacji, sekwencjonowania metodą Sangera lub NGS itd. DNA można też wyciągnąć z kolumnki z użyciem Tris-HCl, wody lub TE.

Protokół

1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer PL** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu (punkt 7) na minikolumnę.
 - Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer PL centralnie na powierzchnię membran zapewnia całkowite nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.
 - Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.
2. Zwirować 1.0-3 ml nocnej (11-14 h) hodowli bakteryjnej przy 12 000 x g przez 2 minuty w probówce typu Eppendorf.
 - Rekomendowane szczepy *Escherichia coli* do propagacji plazmidowego DNA posiadają genotyp *endA*⁻, m.in.: DH5a, DH1, JM103-109, XL1-Blue, MM294 i C600. Stosując szczepy mające genotyp *endA*⁺ m.in.: BL21, RR1, DH11S, JM101, HB101, TG1 i TB1 otrzymuje się plazmidowe DNA niższej jakości.

3. Dokładnie zawiesić osad bakteryjny w 250 µl buforu do zawieszania **Cell R**.
4. Dodać 250 µl niebieskiego buforu lizującego **Lysis Blue**. Powoli mieszać zawartość, poprzez ostrożne kilkukrotne odwracanie próbówki, aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny.
 - *Alkaliczny roztwór Lysis Blue zawiera SDS, który może precipitować podczas przechowywania przy temperaturze otoczenia poniżej 20°C. W takim wypadku należy podgrzać bufor do 37°C, aż do wyklarowania roztworu.*
 - *Zbyt intensywne mieszanie zawiesiny komórek z buforem lizującym powoduje nieodwracalną denaturację części plazmidowego DNA oraz zanieczyszczenie plazmidu fragmentami chromosomalnego DNA.*
5. Dodać 350 µl buforu **Neutral B**. Dokładnie i powoli mieszać zawartość próbówki poprzez kilkukrotne odwracanie, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny.
6. Wirować w mikrowirówce przez 7 min z prędkością 12 000 x g.
7. Przenieść maksymalnie 700 µl klarownego supernatantu do **kolumny wiążącej**, umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
8. Przenieść pozostałość supernatantu (jeżeli pozostał) do tej samej **kolumny wiążącej**. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.
9. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash PLX1** i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
10. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
11. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash PLX2** i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
12. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.
13. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
14. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50-100 µl buforu **Elution**.
 - *Dodanie buforu eluującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.*
 - *Do elucji większych plazmidów (powyżej 6 kbp) zwiększoną wydajność uzyskuje się stosując bufor elucyjny podgrzany do 80°C.*

o Do elucji DNA zaleca się użycie buforu Elution, który sporządzono na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego. Bufor Elution pozwala na uzyskanie najwyższej wydajności elucji oraz nie interferuje z późniejszym sekwencjonowaniem DNA, ligacją, trawieniem enzymami restrykcyjnymi oraz innymi aplikacjami biologii molekularnej.

o Możliwe jest zmniejszenie objętości elucyjnej poniżej 50 µl (graniczna objętość 20 µl), powoduje to jednak stopniowe obniżenie wydajności odzysku DNA.

15. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.

o W przypadku dużych plazmidów (powyżej 6 kbp) zalecamy przedłużenie czasu inkubacji do 10 min.

16. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

17. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Środki ostrożności

Lysis Blue



Uwaga

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P302+P352 W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

P332+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Wash PLX2



Niebezpieczeństwo

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.



Wash PLX1



Uwaga

H226 Łatwopalna ciecz i pary.
H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.



P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

Buffer PL



Niebezpieczeństwo

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P260 Nie wdychać par/rozpylonej cieczy.

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 lekarzem.

Neutral B



Uwaga

H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.



H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P333+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P302+P352 W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

○ **GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit pozwala na szybkie uzyskanie plazmidowego DNA o bardzo wysokiej czystości z różnorodnych gatunków bakterii, w tym rekombinowanych szczepów *Escherichia coli*.**

Z surowego lizatu bakteryjnego efektywnie usuwane są zanieczyszczenia takie jak: genomowe DNA, RNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, związki buforowe, sole. Komponenty GeneMatrix użyte do konstrukcji zestawu Plasmid Miniprep zostały zoptymalizowane pod kątem usuwania uciążliwych inhibitorów restrykcji DNA oraz niespecyficznego endo- i egzonukleaz z lizatu bakteryjnego. Zabarwiony bufor lizujący ułatwia śledzenie dokładności wymieszania zawiesiny bakterii z buforem, postępu uwalniania zawartości komórek oraz jednoczesną pracę z wieloma próbkami.

Dodanie specjalnego buforu wytwarza warunki do selektywnego wiązania DNA do membran. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

○ **GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO_2 . W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufor wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W efekcie przekazujemy w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złóż i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych

kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technikach biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, defosforylacji/fosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, translacji *in vitro*, otrzymywania cDNA, hybrydyzacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURx sp. z o.o.



EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodnikow 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

