

## AnEx Plasmid Midiprep DNA Purification Kit

Izolacja plazmidowego DNA o wysokiej czystości w skali midi (25-100 ml hodowli bakteryjnej). Zestaw z kolumnami jonowymiennymi.

● **kat. nr. E3790**

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



# Spis treści

|   |   |
|---|---|
| Uwagi wstępne.....  | 3 |
| Protokół.....   | 4 |
| Część I    Przygotowanie lizatu bakteryjnego.....                     | 4 |
| Część II   Wiązanie do złoża, płukanie i elucja DNA plazmidowego..... | 5 |
| Środki ostrożności.....   | 6 |

| Składniki zestawu  | 4 izolacji<br>E3790-01 | 8 izolacji<br>E3790-02 | Warunki<br>przechowywania |
|--------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Cell Res           | 30 ml                  | 60 ml                  | 15-25°C / 2-8°C           |
| RNase A (10 mg/ml) | 0.3 ml                 | 0.6 ml                 | -20°C                     |
| Lysis Blue         | 30 ml                  | 60 ml                  | 15-25°C                   |
| Neutral B2         | 30 ml                  | 60 ml                  | 15-25°C                   |
| EQ                 | 30 ml                  | 60 ml                  | 15-25°C                   |
| Wash PL            | 50 ml                  | 100 ml                 | 15-25°C                   |
| EL                 | 25 ml                  | 50 ml                  | 15-25°C                   |
| Suspension         | 5 ml                   | 10 ml                  | 15-25°C                   |
| AnEx Midi Columns  | 4                      | 8                      | 15-25°C                   |
| Protokół           | 1                      | 1                      |                           |

## Wypożyczenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Standardowe wyposażenie mikrobiologiczne do hodowli bakterii.
- Wirówka z chłodzeniem umożliwiającą wirowanie z prędkością  $\geq 20\,000 \times g$ .
- Izopropanol, alkohol etylowy 70%.
- Rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki typu corex 50 ml.

# Uwagi wstępne

**UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu.** Zestaw jest przeznaczony do izolacji wysokiej czystości DNA plazmidowego z różnych gatunków bakterii Gram-, w szczególności z rekombinowanych szczepów *Escherichia coli*. Kolumny zawierają złoża jonowymiennie. Uzyskane plazmidowe DNA jest gotowe do użycia w rutynowych zastosowaniach biologii molekularnej, takich jak PCR, sekwencjonowanie, transfekcja, transkrypcja *in vitro* i translacja oraz modyfikacje enzymatyczne.

**UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału.** Ogólna pojemność kolumny wynosi ok. 150 µg DNA plazmidowego. Rzeczywista wydajność izolacji zależy od objętości hodowli, rodzaju użytej pożywki, ilości kopii plazmidu, wielkości insertu oraz rodzaju szczepu gospodarza. Ze względu na różnice w tempie wzrostu komórek różnych szczepów bakterii, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli. Najwyższej jakości DNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej. Protokół jest zoptymalizowany pod kątem hodowli w standardowej pożywce Luria Bertani (LB) do gęstości komórek ok.  $1-5 \times 10^9$  na ml. Ogólnie masa osadu po zwirowaniu nie powinna przekraczać 3 g na 1.0 l hodowli. W przypadku zbyt dużej lepkości lizatu należy zmniejszyć ilość początkową osadu (bakterii) użytą do izolacji.

**UWAGA 3 • Uwagi dodatkowe.** Do buforu CellRes należy dodać RNazę A do końcowego stężenia 100 µg/ml (100 mg na 1 liter buforu).

**UWAGA 4 • Przechowywanie komponentów zestawu.** Po rozpakowaniu, komponenty zestawu należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem RNazy A, którą należy przechowywać w -20°C. Po dodaniu RNazy A, bufor CellRes przechowywany w temperaturze 2-8°C jest stabilny przez okres do 6 miesięcy. W wypadku krystalizacji komponentów przechowywanych buforów, roztwory należy podgrzać do 37°C, aż do całkowitego wyklarowania.

**UWAGA 5 • Dobra praktyka laboratoryjna.** Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

W wyniku procedury skutecznie usuwane są zanieczyszczenia plazmidowego DNA, takie jak: RNA, jednoniciowe DNA, enzymy/białka, endotoksyny (LPS), lipidy, barwniki, detergenty, nukleotydy, EDTA i inhibitory ligacji. Zastosowane do wypełnienia kolumny złoża jonowymiennie zostało zoptymalizowane w kierunku zwiększenia efektywności usuwania endotoksyn bakteryjnych i problematycznych inhibitorów restrykcji DNA, jak również niespecyficznych endo- i egzonukleaz. Kolorowy bufor Lysis Blue pomaga w monitorowaniu postępu lizy komórek. Bufor EQ o niskiej zawartości soli zapewnia selektywne warunki wiązania plazmidowego DNA ze złożem. Podczas przepływu grawitacyjnego zanieczyszczenia przechodzą przez kolumnę, a ślady zanieczyszczeń pozostałych na kolumnie usuwane są na etapie płukania. Wysokiej jakości plazmidowe DNA eluowane jest następnie za pomocą buforu o wysokiej zawartości soli, następnie jest odsalane i zagęszczane w wyniku wytrącania izopropanolem. Po wytrąceniu DNA jest gotowe do dalszego zastosowania. Przepływ buforów przez kolumny wypełnione złożem jonowymiennym odbywa się grawitacyjnie.

# Protokół

## Część I Przygotowanie lizatu bakteryjnego

1. Zwirować odpowiednią objętość nocnej (11-14 h) hodowli bakteryjnej z prędkością 5 000 x g przez 10 min w 4°C. Wylać supernatant i dokładnie zebrać pozostałość pożywki.
  - o Użyć maksymalnie do 25 ml hodowli z plazmidami wysokokopijnymi lub do 100 ml hodowli z plazmidami niskokopijnymi (Uwaga 2 strona 3).
  - o Rekomendowane szczepy *Escherichia coli* do propagacji plazmidowego DNA posiadają genotyp *endA*<sup>-</sup>, m.in.: DH5a, DH1, JM103-109, XL1-Blue, MM294 i C600. Stosując szczepy mające genotyp *endA*<sup>+</sup> m.in.: BL21, RR1, DH11S, JM101, HB101, TG1 i TB1 otrzymuje się plazmidowe DNA niższej jakości.
2. Dodać 5 ml buforu **CellRes** i dokładnie zawiesić osad.
  - o Upewnić się czy do buforu CellRes została dodana RNaza A (Uwaga 3 strona 3).
3. Dodać 5 ml niebieskiego buforu lizującego **Lysis Blue**. Powoli mieszać zawartość poprzez ostrożne, kilkukrotne odwracanie probówki, aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 5 min.
  - o 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.
  - o Zbyt intensywne mieszanie zawiesiny komórek z buforem lizującym powoduje nieodwracalną denaturację części plazmidowego DNA oraz zanieczyszczenie fragmentami chromosomalnego DNA.
4. Dodać 5 ml buforu **Neutral B2**. Dokładnie i powoli mieszać zawartość probówki poprzez kilkukrotne odwracanie, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny. Zostawić w 4°C na 15 min.
5. Zwirować z prędkością 20 000 x g przez 30 min w 4°C. Ostrożnie zebrać supernatant zawierający DNA plazmidowe uważając aby nie pobrać osadu.
6. Ponownie zwirować supernatant z prędkością 20 000 x g przez 15 min w 4°C. Ostrożnie zebrać supernatant zawierający DNA plazmidowe uważając aby nie pobrać osadu.
  - o Drugi etap wirowania powinien być przeprowadzony w przypadku gdy w lizacie widoczne są pływające pozostałości, aby uniknąć naniesienia zawieszonych cząstek na kolumnę. Jeśli supernatant jest klarowny należy pominąć ten krok.

## Część II Wiązanie do złoża, płukanie i elucja DNA plazmidowego

1. Zrównoważyć kolumnę poprzez naniesienie 5 ml buforu **EQ**. Należy pozwolić aby bufor wypłynął całkowicie z kolumny w wyniku siły grawitacji.
2. Nanieść klarowny lizat, otrzymany w punkcie 6, na kolumnę i poczekać aż całkowicie wypłynie.
3. Płukać kolumnę nanosząc 10 ml buforu **Wash PL**.
4. Przenieść kolumnę do nowej probówki 50 ml (nie ma w zestawie). Nanieść 5 ml buforu elucyjnego **EL**. Zachować eluat.
5. Wytrącić DNA dodając 3.5 ml (0.7 objętości) izopropanolu. Wymieszać dokładnie i zwirować z prędkością 15 000 x g przez 30 min w 4°C.
6. Ostrożnie zlać supernatant. Przepłukać osad za pomocą 2 ml 70% etanolu i zwirować z prędkością 15 000 x g przez 10 min.
7. Ostrożnie i dokładnie usunąć supernatant bez naruszenia osadu. Wysuszyć osad i zawiesić w odpowiedniej objętości (0.3–1 ml) buforu **Suspension** (10mM Tris pH 8.5).

# 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.

## Neutral B2



### Uwaga

**H315** Działa drażniąco na skórę.

**H319** Działa drażniąco na oczy.

**P261** Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

**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.

## EQ / Wash PL / EL



### Uwaga

**H226** 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.



**P233** Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.

**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.

**P303+P361+P353** W przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody (lub prysznicem).

- **AnEx Plasmid Midiprep DNA Purification Kit jest przeznaczony do izolacji wysokiej czystości plazmidowego DNA z różnych gatunków bakterii Gram–, w tym rekombinowanych szczepów *Escherichia coli*.**

W wyniku procedury skutecznie są usuwane zanieczyszczenia plazmidowego DNA, takie jak: RNA, jednoniciowe DNA, enzymy/białka, lipidy, barwniki, detergenty, nukleotydy, EDTA i inhibitory ligacji. Zastosowane do wypełnienia kolumny złożo jonowymienne zostało zoptymalizowane w kierunku zwiększenia efektywności usuwania problematycznych inhibitorów restrykcji DNA, jak również niespecyficznych endo- i egzonukleaz. Kolorowy bufor Lysis Blue pomaga w monitorowaniu

postępu lizy komórek. Bufor EQ o niskiej zawartości soli zapewnia selektywne warunki wiązania plazmidowego DNA ze złożem. Podczas przepływu grawitacyjnego zanieczyszczenia przechodzą przez kolumnę, a ślady zanieczyszczeń pozostałych na kolumnie usuwane są na etapie płukania. Wysokiej jakości plazmidowe DNA eluowane jest następnie za pomocą buforu o wysokiej zawartości soli. Po wytrąceniu DNA jest gotowe do dalszego zastosowania.



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

