SinaClon BioScience شرکت سیناکلون

Plasmid Isolation Kit
(50 mini preparations)

Cat. No.: PS8405C

Store and Shipment: RT

هشدار: حین کار همیشه از دستکش یک بار مصرف استفاده نمایید و استانداردهای ایمنی را رعایت کنید. محلول شماره **دو** دارای pH قلیایی بالا و محلول شماره **پنج** حاوی گوانیدین می‌باشد. تماس آن با پوست، تنفس یا بلع آن مضر می‌باشد.

اصول تست: **این کیت جهت استخراج DNA پلاسمیدی طراحی شده است.**

سلولهای باکتریایی E.Coli بر اساس روش قلیایی alkaline method لیز شده، انکوباسیون Lysate به همراه پتاسیم استات سبب رسوب کریستالهای نمک، DNA میزبان و سایر اجزای سلولی می‌گردد. نمکهای معدنی نیز به نحو موثری سبب افزایش دانسیته مواد رسوبی و جداسازی فازها می‌گردد. در مجاورت گوانیدین تیوسیانات DNA پلاسمیدی به طور انتخابی به ذرات سوربنت موجود متصل می‌گردد. به دنبال دو بار شستشوی متوالی درالکل در نهایت DNA پلاسمیدی خالص در محیط آبی کم نمک آزاد می‌گردد. DNA بدست آمده عمدتاً به شکل Super Coiled و فاقد DNA ژنومیک است و قابل استفاده در واکنشهای Restriction و Sequencing و Cloning و PCR می‌باشد.

پلاسمید بدست آمده طی این روش دارای غلظت تقریباً ۵-۳ میکروگرم در هر میلی لیتر از کشت پلاسمید pUC و pBluescript می‌باشد.

محتویات کیت:

۱- محلول شماره یک (بافر سوسپانسیون) ۵ میلی لیتر و حاوی ۸ = pH و EDTA و Tris-HCl .

۲-محلول شماره دو (بافر لیز کننده) ۵ میلی لیتر و حاوی ۱۲ = pH و SDS و NaOH .

۳- محلول شماره سه (استات پتاسیم) ۵ میلی لیتر و حاوی استات پتاسیم با ۵/۵ ـ ۵ = pH .

۴- محلول شماره چهار (بافر رسوب دهنده) ۱۰ میلی لیتر و حاوی املاح معدنی می‌باشد.

۵-محلول شماره پنج (بافر Binding) ۴۰ میلی لیتر و حاوی گوانیدین و سوربنت می‌باشد.

۶-محلول شماره شش (بافر Elution) در حجم ۳ میلی لیتر و حاوی Tris-HCl می‌باشد.

به استثنای محلول شماره پنج، سایر محلولها شفاف می‌باشند. محلول شماره پنج را قبل از استفاده برای هموژن شدن کامل ذرات سوربنت به آرامی تکان دهید. در صورت مشاهده کریستال در هر یک از محلولها، آن را مدتی در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

سایر محلولهای مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد:

- الکل ۵۰ یا ۷۰ درجه (جهت تهیه از آب دیونیزه یا دو بار تقطیر استریل استفاده کنید).
- Ribonuclease A (RNase A), Cat. No.: EN0531

پروتکل کوتاه:

با استفاده از سانتریفوژ (۱ min و ۵۰۰۰g) ۲ میلی لیتر رسوب سلولی را در تیوب ۲ ml تهیه کنید. باقیمانده محیط کشت را دور بریزید.

بر روی پلت سلولی

۱- ۱۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۱ اضافه کنید. و با کمک ورتکس سلولها را کاملاً هموژن کنید.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۲ اضافه کنید. تیوب را با ۵ بار وارونه کردن مخلوط کنید. ۳ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۳ اضافه کنید. تیوب را با ۵ بار وارونه کردن مخلوط کنید. سه دقیقه در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۴- ۲۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۴ اضافه کنید. تیوب را با ۵ بار وارونه کردن مخلوط کنید.۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ کنید.

دفتر فروش و تولید: کیلومتر ۲۴ جاده مخصوص کرج، گرمدره، نبش خیابان تاجبخش، مجتمع زیست دارویی آریوژن
کدپستی:۳۱۶۴۸۱۹۷۱۱ تلفن:۶-۶۴۸۵-۰۲۶ ۳۶۱۰ ۶۴۸۵، ۰۲۶ ۳۶۱۰ ۷۲۴۰-۴۳ فکس:۰۲۶ ۳۶۱۰ ۶۴۸۷

Sale office and production facility: Tajbakhsh St. 24th Km Karaj Makhsous Rd, AryoGen Biopharma Complex. Karaj, Iran
Post code: 3164819711 Tel: +98 (0)26 3610 6485-6,+98 (0) 26 3610 7240-43, Fax: +98(0)26 3610 6487
Email:order@sinaclon.com www.sinaclon.com

۵- ۴۰۰ میکرولیتر از فاز آبی را وارد یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری کنید، ۸۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۵ به آن اضافه کنید، ۳ ثانیه ورتکس کنید و سپس به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری کنید. مجدداً ۳ ثانیه ورتکس و ۱۰ ثانیه ۵۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

۶- محلول رویی را با وارونه کردن تیوب خالی کنید.

۷- یک میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد اضافه کنید و ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس و سپس در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ کنید.

۸- با وارونه کردن تیوب محتویات آن را خارج کنید. مرحله ۷ را مجددا تکرار کنید.

۹ – تیوب را بصورت وارونه به مدت یک دقیقه بر روی دستمال کاغذی قرار دهید.

۱۰- با استفاده از Speed Vac طی سه دقیقه یا با استفاده از حرارت ۴۵ درجه تیوب را کاملاً خشک کنید.

۱۱- با افزودن ۳۰ میکرولیتر محلول شماره ۶ مجدداً پلت را Resuspend نمائید، تیوب را به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد قرار دهید، یک دقیقه در ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ کنید و سپس ۲۵ میکرولیتر از مایع بالایی را به آرامی بردارید.

راهنمای استفاده و اصول استخراج پلاسمید:

کشت و تهیه پلت سلولی

کشت سلول های حاوی پلاسمید را تا دستیابی به $OD_{260}=2$ ۲ یا بالاتر (حداکثر تا ۵) ادامه دهید.

حداقل ۴ میلی لیتر از محیط کشت حاوی سلول را در ۵۰۰۰g به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ کنید. با وارونه کردن تیوب مایع رویی را کاملا دور ریخته، سپس تیوب را بصورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار دهید یا با استفاده از سمپلر مایع رویی را کاملا تخلیه نماید. در صورت نیاز و جهت اطمینان از تخلیه کامل سانتریفوژ را مجددا تکرار نمایید.

به یاد داشته باشید در تمامی مراحل سانتریفوژ جهت تیوبها در سانتریفوژ یکسان باشد. در تیوبهای cap snape می‌توان از جهت لولا کمک گرفت به طوری که انتهای آن رو به بیرون باشد و در صورت استفاده از تیوبهای در پیچ دار با مارکر علامت گذاری کنید.

۱- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شماره یک یا Suspension Buffer به پلت باکتری اضافه کنید و کاملا ورتکس کنید. ورتکس را تا هنگامی که سوسپانسیون کاملا هموژن و یکنواخت گردد ادامه دهید. حین ورتکس انتهای تیوب را نگاه کنید، در صورت وجود هر گونه کلامپ یا توده سلولی به ورتکس ادامه دهید، جهت تسریع در کار می‌توانید دو تیوب را همزمان ورتکس کنید. وجود هر گونه توده سلولی در این مرحله سبب در امان ماندن سلولها از لیز سلولی در مرحله بعدی می‌گردد.

جهت حذف RNA در طی مرحله بعدی یا لیز سلولی می‌توان RNase A را در این مرحله و در غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به تیوب حاوی محلول شماره یک اضافه نمود. RNase A در شرایط بسیار قلیایی نیز پایدار است. در این کیت مرحله حذف RNA اختیاری است.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده یا محلول شماره ۲، Lysis buffer به تیوب اضافه کنید. تیوب را ۵ بار وارونه کنید و سپس مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید (در صورت مشاهده کریستال، محلول شماره ۲ را مدتی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید).

در این مرحله pH بسیار قلیایی محلول لیز کننده و SDS سبب لیز سلولهای باکتری و دناتوراسیون پروتئینهای غشایی می‌گردد. DNA نیز دناتوره و تک زنجیره‌ای می‌گردد. DNA باکتریایی به علت طویلتر بودن به قطعات سلولی متصل شده و DNA پلاسمیدی نیز به یکدیگر متصل می‌گردند. در صورت افزودن RNase A تمامی RNA موجود نیز حذف می‌گردد. در این مرحله جهت اجتناب از شکستگی DNA ژنومیک از ورتکس استفاده نکنید. افزایش زمان بیش از ۳ دقیقه نیز سبب مقاومت نسبی پلاسمید به آنزیم های برشی می‌گردد.

۳- ۱۰۰میکرولیتر از محلول شماره سه یا Potassium acetate اضافه کنید، پنج بار تیوب را وارونه کنید و ۳ دقیقه تیوب در حرارت اتاق نگهداری کنید. pH اسیدی محلول شماره سه سبب خنثی سازی محلول شده، در این حالت تمامی DNA های موجود تمایل به renature شدن دارد اما پلاسمید به آسانی ساختمان دو زنجیره‌ای خود را باز یافته و reform می‌گردد، از سوی دیگر استات پتاسیم و SDS سبب ایجاد رسوب پتاسیم دودسیل سولفات به همراه DNA میزبان و سایر اجزا سلولی می‌گردد.

۴- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شماره چهار یا Co- Precipitation اضافه کنید. تیوب را ۵ بار وارونه کنید ۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

رسوب پتاسیم دودسیل سولفات و DNA میزبان تمایل به شناور ماندن در محلول داشته و حتی سانتریفوژ طولانی مدت و با سرعت زیاد نیز در جدا سازی فازها کاملا موفق نیست. در مرحله ۴ و جهت افزایش دانسیته مواد رسوبی از نمک مکمل دیگری استفاده شده است که سبب تشکیل کریستالهای سنگین املاح معدنی و تسریع رسوب DNA ژنومیک و باقیمانده‌های سلولی می‌گردد. پس از سانتریفوژ فاز آبی کاملا جدا شده و حاوی پلاسمید باکتریایی می‌باشد.

دفتر فروش و تولید: کیلومتر ۲۴ جاده مخصوص کرج، گرمدره، نبش خیابان تاجبخش، مجتمع زیست دارویی آریوژن
کدپستی:۳۱۶۴۸۱۹۷۱۱ تلفن:۶-۶۴۸۵-۰۲۶ ۳۶۱۰، ۰۲۶ ۳۶۱۰ ۷۲۴۰-۴۳ فکس:۰۲۶ ۳۶۱۰ ۶۴۸۷

Sale office and production facility: Tajbakhsh St. 24th Km Karaj Makhsous Rd, AryoGen Biopharma Complex. Karaj, Iran
Post code: 3164819711 Tel: +98 (0)26 3610 6485-6,+98 (0) 26 3610 7240-43, Fax: +98(0)26 3610 6487
Email:order@sinaclon.com www.sinaclon.com

۵- بدون تماس نوک سمپلر با پلت سفید رنگ انتهایی ۴۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و درون یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری بریزید. ۸۰۰ میکرولیتر از محلول شماره پنج به آن اضافه کنید. ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس کنید، ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید و مجددا ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس کنید و ۱۰ ثانیه در ۵۰۰۰g سانتریفوژ کنید (محلول شماره پنج را قبل از استفاده کاملا هموژن کنید).

با توجه به آنکه DNA در شرایط نمکی بیش از ۲ مولار تمایل به اتصال به ذرات سوربنت دارد، طی این مرحله DNA پلاسمیدی به آسانی به دانه‌های سوربنت موجود متصل می‌گردد وتنها یک micro spin کوتاه جهت رسوب آن کافی است.

۶- با وارونه کردن تیوب محتویات آن را کاملا خالی کنید.

۷- یک میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد به آن اضافه کنید، ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس کنید، در g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ کنید.

در این مرحله اتانول ۷۰ درصد نیز قابل استفاده می‌باشد، کاهش غلظت الکل بطور انتخابی سبب خروج RNA از دانه‌های سوربنت می‌گردد. غلظت پائین تر از ۴۰ درصد سبب افت قابل توجهی در محصول می‌شود.

۸- محتویات تیوب را کاملاً خالی کنید، مرحله (۷) را مجدداً تکرار کنید

۹- تیوب را بصورت وارونه به مدت ۱ دقیقه بر روی دستمال کاغذی قرار دهید.

۱۰- با استفاده از Speed vac طی ۳ دقیقه یا در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد تیوب را کاملاً خشک کنید.

باقی ماندن مقدار کمی اتانول در محصول سبب مهار واکنشهای آنزیمی و خارج شدن DNA و Loading از چاهکهای ژل می‌شود.

۱۱- ۳۰ میکرولیتر محلول شماره شش به تیوب اضافه کنید ۵-۳ ثانیه ورتکس کنید. تیوب را با در بسته به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد قرار دهید. درصورت استفاده از حرارت ۶۵ درجه سانتی گراد ۳ دقیقه زمان کافی است.

در این مرحله DNA پلاسمیدی در آب مقطر یا محلولی با غلظت نمکی پائین بلافاصله از ذرات سوربنت جدا شده و وارد محلول می‌گردد.

تیوب را به مدت یک دقیقه در g ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ کنید و ۲۵ میکرولیتر از محلول بالایی را بردارید و در تیوب جدیدی بریزید. از تماس نوک سمپلر با ذرات سوربنت اجتناب کنید

بهتر است ابتدا تمامی فازهای آبی بدست آمده را در یک تیوب جمع آوری کنید و مجدداً سانتریفوژ نمائید و درصورت حضور ذرات سوربنت فاز آبی را به تیوب جدید دیگری منتقل کنید. ذرات سوربنت در محصول نهائی سبب مهار واکنشهای آنزیمی می‌گردد.

کیفیت و میزان DNA پلاسمیدی بدست آمده:

غلظت DNA پلاسمیدی طی این روش تقریباً ۵-۳ میکروگرم در هر میلی لیتر از محیط کشت در مورد پلاسمیدهای pUC و pBluescript می‌باشد.

کنترل کیفی:

- طی ۱۲ ساعت انکوباسیون DNA پلاسمیدی در حضور یون منیزیم و در ۳۷ درجه سانتی گراد فعالیت نوکلئازی مشاهده نشد.
- با استفاده از آنزیم های مورد نظر (RE) DNA پلاسمیدی طی یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد برش داده شد.
- DNA پلاسمیدی در شرایط متعارف PCR به عنوان Template اضافه گردید و در حضور پرایمرهای اختصاصی فرآورده مورد نظر برروی ژل الکتروفورز مشاهده گردید.

دفتر فروش و تولید: کیلومتر ۲۴ جاده مخصوص کرج، گرمدره، نبش خیابان تاجبخش، مجتمع زیست دارویی آریوژن
کدپستی:۳۱۶۴۸۱۹۷۱۱ تلفن:۶-۶۴۸۵-۰۲۶ ۳۶۱۰، ۰۲۶ ۳۶۱۰ ۷۲۴۰-۴۳ فکس:۰۲۶ ۳۶۱۰ ۶۴۸۷

Sale office and production facility: Tajbakhsh St. 24th Km Karaj Makhsous Rd, AryoGen Biopharma Complex. Karaj, Iran
Post code: 3164819711 Tel: +98 (0)26 3610 6485-6,+98 (0) 26 3610 7240-43, Fax: +98(0)26 3610 6487
Email:order@sinaclon.com www.sinaclon.com