Pishgaman Sanjesh
Pioneer in Detection and Innovation

PSGen
Molecular Diagnostic Kits

PsPure Plasmid Extraction Kit

محتویات کیت

محتویات	تعداد/حجم
Pre-Lysis Buffer	**1×13 ml**
Lysis Buffer	**1×13 ml**
Neutralization Buffer	**1×18 ml**
Wash Buffer	**1×30 ml**
Elution Buffer	**ml 1×6**
RNase A (Lyophilized)	**1×5 mg**
Spin Columns	**1×50 pcs**
Collection Tubes (2 ml)	**2×100 pcs**

شرایط نگهداری کیت

1.کیت را در دمای محیط (20–25 °C) و در جای خشک نگهداری کنید. از نگهداری کیت در فریزر یا یخچال جدا خودداری نمایید.

2.توصیه می‌گردد که RNase A لیوفیلیزه را پس از دریافت کیت در دمای -20°C نگهداری کنید.

3.پس از هر بار استفاده درب بطری‌ها را محکم ببندید تا از تبخیر و به هم ریختن غلظت محلول‌ها جلوگیری شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

1.سمپلر (متغیر)
2.سرسمپلرهای فیلتردار Nuclease free
3.میکروتیوب 1.5 میلی‌لیتری Nuclease free
4.سانتریفیوژ (دارای روتور برای میکروتیوب‌های 2 و 1.5 میلی‌لیتری)
5.اسپین

نکات مهم

1.هنگام انتقال به داخل و خارج از سانتریفیوژ، نمونه ها را خیلی ناگهانی تکان ندهید تا از پاشیده شدن نمونه ها جلوگیری شود.
2.بستن درب ستون را به آرامی انجام دهید تا از پاشیده شدن محلول به درون درب ستون جلوگیری شود.
3.همواره قبل و بعد از انجام فرآیند استخراج سطح زیر هود را با پنبه آغشته به الکل 70% تمیزکرده، سپس به مدت 10 دقیقه با UV پرتودهی کنید.
4. بافر شستشو آماده مصرف بوده و نیازی به اضافه کردن اتانول ندارد.

آماده‌سازی RNase A

- ابتدا ویال حاوی پودر RNase A را مدت کوتاهی اسپین کرده تا تمام پودر در ته ویال جمع شود. سپس 1 میلی‌لیتر از Pre-Lysis Buffer را به ویال اضافه کرده و کاملا حل کنید، سپس تمام محتویات ویال را به بطری حاوی Pre-Lysis Buffer انتقال دهید و کاملا تکان دهید. از این پس ویال حاوی Pre-Lysis Buffer را در 4°C نگهداری کنید.

استخراج پلاسمید

قبل از شروع کار:
- مقدار مورد نیاز از Elution Buffer را در یک میکروتیوب ریخته و در دمای 70°C قرار دهید.

5.1 میلی‌لیتر از کشت باکتریایی (overnight bacterial culture) را به یک تیوب انتقال دهید.

2.تیوب‌ها را به مدت ۱ دقیقه در 12,000 x g در دمای اتاق سانتریفیوژ نمایید سپس مایع رویی را دور بریزید. دقت کنید که رسوب سلولی دست‌نخورده باقی بماند.

3.به هر میکروتیوب 250 میکرولیتر Pre-Lysis Buffer اضافه نمایید و رسوب سلولی را با پیپتاژ کردن در آن حل کنید.

✓ از اضافه شدنRNase A به Pre-Lysis Buffer اطمینان حاصل کنید.

4.تیوب‌ها را به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

5.به هر میکروتیوب 250 میکرولیتر Lysis Buffer اضافه کنید و سپس تیوب را به آرامی 4 تا 8 مرتبه سر و ته کنید.

✓از ورتکس کردن تیوب‌ها در این مرحله خودداری کنید.

6.تیوب‌ها را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.(بیشتر از 5 دقیقه انکوبه ننمایید.)

7.به هر تیوب 350 میکرولیتر Neutralization Buffer اضافه کنید و فورا تیوب را 4 تا 8 مرتبه سر و ته کنید.

8.تیوب‌ها را به مدت 15 دقیقه روی یخ انکوبه کنید.

9.تیوب‌ها را به مدت 5 دقیقه در 17,000 x g سانتریفیوژ نمایید

10.تمام مایع شفاف رویی را به طور کامل به ستون قرار داده شده روی یک Collection Tubeمنتقل کنید. دقت شود که محلول به لبه ستون برخورد نکند.

11.ستون را به مدت 1 دقیقه در 8,000 x g (10,000 rpm) سانتریفیوژ کنید. سپس ستون را با احتیاط از تیوپ زیرین جدا کرده و کالکشن تیوب را دور بیاندازید سپس ستون را به یک کالکشن تیوب جدید منتقل کنید.

12.500 میکرولیتر از Wash Buffer را به ستون اضافه کنید و به مدت ۱ دقیقه در 10,000 x g **(**12,000 rpm**)** سانتریفیوژ نمایید. (کالکشن تیوب را دور بیاندازید و ستون را به یک کالکشن تیوب جدید منتقل کنید.)

13.جهت حذف کامل باقیمانده Wash Buffer ، ستون را 2 دقیقه در 17,000 x g (13,000 rpm)سانتریفیوژ کنید.

14.کالکشن تیوب را دور انداخته و سپس ستون را به یک میکروتیوب 1.5 میلی‌لیتری استریل انتقال دهید.

15.60 میکرولیتر از Elution Buffer را دقیقا در مرکز ستون بریزید. درب ستون را بسته و آن را به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید، سپس ستون را به مدت 1 دقیقه در در 10,000 x g (12,000 rpm) سانتریفیوژ نمایید. محلول زیر ستون حاوی پلاسمید و قابل استفاده برای کاربردهای بعدی است.

✓پلاسمید استخراج شده به طور مستقیم جهت تمامی فرآیندهای پایین دستی قابل استفاده می‌باشد و یا اینکه می‌توان آن را برای نگهداری کوتاه مدت در دمای 2تا 8 درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی مدت در دمای 20- درجه سانتی‌گراد قرار داد.

نکات عملی در خصوص رفع مشکلات احتمالی

مشکل	علت احتمالی	پیشنهاد
غلظت پایین پلاسمید استخراج شده	تعداد بالای سلول‌ها در نمونه	باکتری ها باید به مدت ۱۶ تا ۲۱ ساعت در محیط کشت مناسب حاوی آنتی بیوتیک رشد کنند. در صورت استفاده از محیط های کشت غنی مانند تریفیک براث و یا **XY T2** حجم محیط ورودی را کاهش دهید، زیرا این محیط های کشت از غلظت سلولی بالاتری نسبت محیط **LB** برخوردار هستند.
	پلاسمید با کپی‌نامبر پایین	یکی از این خصوصیات مهم کپی‌نامبر پلاسمید است. برخی پلاسمیدها کپی نامبر پایینی دارند،کپی نامبر پلاسمید خود را قبل از استخراج چک کنید. پلاسمیدهای با کپی نامبر پایین ممکن است بازده ای حدود ۰.۵ میکروگرم در هر ۵ میلی لیتر محیط کشت داشته باشند.

		در صورت استفاده از پلاسمید با کپی نامبر پایین از حجم ورودی بیشتری استفاده نمایید.
	رسوب باکتری به خوبی در **Pre-Lysis Buffer** حل نشده است.	رسوب سلولی باکتری ها را کاملا در **Pre-Lysis Buffer** حل کنید.
	تشکیل رسوب در **Lysis Buffer**	**Lysis Buffer** را در حمام آب با دمای **37** درجه سانتی گراد قرار دهید تا حل شود.
	RNA به طور کامل تجزیه نشده است.	- مقادیر بالای **RNA** در اتصال پلاسمید به ستون تداخل ایجاد می کند. - از اضافه شدن **RNase A** به محلول **Pre-Lysis Buffer** اطمینان حاصل کنید. - در صورتی که بیش از یکسال از اضافه کردن **RNase A** به محلول **Pre-Lysis Buffer** می گذرد ممکن است فعالیت **RNase A** کاهش یافته باشد بنابراین مجددا به آن **RNase A** اضافه کنید

		- محلول **Pre-Lysis Buffer** حاوی **RNase** را در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
آلودگی با **DNA** کروموزومی	ورتکس یا مخلوط کردن شدید نمونه بعد از اضافه کردن **Neutralization Buffer**	بعد از اضافه کردن **Neutralization Buffer** از ورتکس کردن محلول جدا خودداری نمایید.
مشاهده اسمیر	زمان لیز طولانی	افزایش زمان لیز در **Lysis Buffer** موجب آلودگی با **DNA** کروموزومی می گردد بنابراین زمان لیز در **Lysis Buffer** از **5** دقیقه بیشتر نشود.
	مخلوط کردن شدید در محلول **Lysis Buffer**	هرگونه ورتکس کردن یا مخلوط کردن شدید نمونه بعد از اضافه کردن **Lysis Buffer** موجب دناتوراسیون برگشت ناپذیر پلاسمید می شود. بنابراین از ورتکس کردن نمونه خودداری کنید.
آلودگی با **RNA**	افزوده نشدن **RNase** به محلول **Pre-Lysis Buffer** یا قدیمی شدن آن	از اضافه شدن **RNase A** به محلول **Pre-Lysis Buffer** اطمینان حاصل کنید.

		محلول **Pre-Lysis Buffer** حاوی **RNase** را در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورتی که بیش از یکسال از اضافه کردن **RNase A** به **Pre-Lysis Buffer** می گذرد ممکن است فعالیت **RNase A** کاهش یافته باشد بنابراین مجددا به آن **RNase A** اضافه کنید.
	تعداد زیاد سلول‌ها در نمونه	حجم نمونه ورودی را کاهش دهید. تعداد زیاد سلول ها از تجزیه **RNA** توسط آنزیم **RNase A** جلوگیری می نماید
شناور شدن **DNA** حین لود روی ژل آگارز	باقی ماندن بافر شستشو در ستون و وارد شدن آن در **Elution Buffer**	مراحل شستشو و سانتریفیوژکردن را دقیقاً مطابق آنچه‌در راهنمای‌کاربری آمده است انجام دهید.