

کیت استخراج پلاسمید زیست فناوری رنا

این پروتکل به منظور خالص سازی با کیفیت مطلوب DNA پلاسمید از ۵-۱۰ ml کشت شبانه باکتری اکولای در محیط کشت LB طراحی شده است. در مورد پلاسمیدهای با تعداد کپی کم باید میزان استخراج از ۱۰-۱۵ ml انجام گیرد.

نکته:

۱. تمامی مراحل در دمای اتاق انجام میگیرد.
۲. همراه با بافر RBP1 تیوپ حاوی RNase نیز تهیه شده است پس از اضافه کردن همه محتوای تیوپ RNase به بافر در یخچال نگهداری شود.
۳. معمولاً در گذر زمان مواد موجود در بافر RBP3 به شکل نامحلول مشاهده میشوند که با گرما دهی ۳۷ درجه از بین میرود. هرچند وجود مواد غیر محلول و یا رسوبی در این بافر تاثیر بر روند نتایج نخواهد داشت و محقق میتواند وجود این مواد غیر محلول را نادیده بگیرد.

مراحل کار:

۱. ۲۵۰ میکرولیتر از بافر RBP1 به پلیت باکتری (سانتریفیوژ برای رسوب گیری از کشت شبانه به مدت ۳-۵ دقیقه دور rpm ۴۵۰۰ انجام گرفت) اضافه و میکس شود. زمان انکوبه شده برای این بافر ۲ دقیقه در محیط برآورد شده است.
۲. ۳۰۰ میکرولیتر از بافر RBP2 اضافه و ۶-۴ مرتبه به آرامی اینورته شود.
- نکته: در این مرحله ورتکس انجام نمیگیرد تا از مخلوط شدن منابع وراثتی ممانعت بعمل آید.
۳. ۲۵۰ میکرولیتر از بافر RBP3 به تیوپ اضافه میشود. به محض اضافه کردن بافر مورد نظر تیوپ را ۶-۴ مرتبه به صورت آهسته اینورته (سرو ته میشود) میکنید در این مرحله میکس به شکل ابری و توده ای مشاهده میشود.
۴. تیوپ در داخل سانتریفیوژ قرار گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm 12000 سانتریفیوژ میشود.
۵. فاز رویی مرحله ۴ به وسیله سمپلر به ستون انتقال داده شود. و سپس برای ۶۰-۳۰ ثانیه سانتریفیوژ انجام گیرد. پس از سانتریفیوژ مایع جمع آوری شده در داخل تیوپ زیرین ستون دور ریخته شود.
۶. شستشوی ستون با اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر از بافر RB wp شستشو و سپس سانتریفیوژ آن به مدت ۶۰ ثانیه انجام میشود.

زیست فن آوران رنا: خ بزرگمهر، ابتدای خ ۲۲ بهمن، ساختمان نورباران طبقه اول. 03132673138-03132673139

09336700380-09336700390

www.rnabiotec.com

info@dnarna.org - www.dnarna.org



۷. محلول زیری دور ریخته و مجدداً به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ تکرار میشود.

۸. ستون به یک اپندرف ۱/۵ml استریل انتقال و سپس ۴۰-۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به مرکز ستون اضافه و پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه انکوبیشن در محیط به مدت ۱ دقیقه طبق مرحله قبل سانتریفیوژ میگردد. به منظور افزایش کیفیت میتوان آب خارج شده از ستون را دوباره به مرکز ستون منتقل کرد و سانتریفیوژ را تکرار کرد. به منظور تعیین کیفیت میتوان ۵-۳ میکرولیتر از پلاسمید استخراجی را بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز انجام داد.