

Total DNA Extraction Kit

Mammalian Blood, Mammalian Tissue, HPV, Insect, saliva
Bacteria, Stool, Sperm, CSF, Amniotic Fluid, plasma,
Cultured Cells

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Vira Lyse I	20 ml	دمای محیط (15-25°C)
Vira Lyse II	10 ml	
Vira Binding	10 ml	
Vira Wash I	25 ml	
Vira Wash II* (Concentrate)	10 ml	
Vira El	5 ml	
Proteinase K Buffer	2 ml	
Proteinase K (Lyophilized)	40 mg	
Columns	50 pcs	
Collection Tubes	100 pcs	
Protocol	1	



* ۴۰ ml اتانول مطلق به بطری Vira Wash II اضافه نمایید.

* در صورت مشاهده رسوب در بافر Vira Wash I به منظور حل شدن کامل رسوب، قبل از استفاده، بافر را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه نمایید.

* قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲-۸ °C می باشد.

کیفیت حاضر قابلیت استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های زیر را با غلظت و خلوص مناسب در کمترین زمان ممکن دارا می‌باشد:

- نمونه متنوع بافت پستانداران همچون کبد، طحال، ریه و بافت‌های چربی
- نمونه‌های حاوی ویروس HPV شامل زگیل، ترشحات واژن، پلاسما، سرم، سلول‌های کشت داده شده، سواپ‌های دهانی و سایر مایعات مخاطی
- نمونه تازه و یا منجمد خون کامل که حاوی ضدانقادهایی چون EDTA یا سیترات می‌باشد.
- نمونه باکتری گرم منفی و گرم مثبت
- میکروارگانیسم‌های مختلف موجود در انواع متفاوت نمونه‌های مدفوع
- سلول‌های اسپرم از مایع منی
- مایع مغزی نخاعی
- مایع آمنیوتیک
- سلول‌های کشت داده شده
- بزاق دهان
- پلاسما

نکات کلیدی :

- آنزیم Proteinase K را به میزان واکنش‌های مورد نیاز الیکوت کنید. دمای نگهداری این آنزیم پس از اضافه نمودن بافر مربوطه به پودر لیوفیلیزه، ۲-۸ °C می باشد.
- قبل از استفاده، مقدار مورد نیاز از محلول Vira El به ازای هر واکنش در دمای ۶۵ °C انکوبه شود.
- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری‌های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.

موارد مورد نیاز :

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- آنزیم RNase A با غلظت ۱۰ mg/ml (در صورت نیاز به DNA ژنومیک خالص، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)
- Heating Block یا Water Bath
- ایزوپروپانول
- هاون و نیتروژن مایع (جهت استخراج از نمونه بافت)
- آنزیم Lysozyme با غلظت ۵۰ mg/ml (جهت استخراج از باکتری گرم مثبت، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)
- محلول PBS 1x (جهت استخراج از باکتری گرم منفی و گرم مثبت، سلول‌های کشت داده شده و مایع آمنیوتیک، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)

Mammalian Tissue DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

بافت جانوری (کبد موش، شش، قلب، طحال، ...) : ۲۵-۵۰ mg

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲-۸ °C می باشد.

۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع به صورت پودر در آورده و همگن نمایید، سپس در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
توجه: در صورت عدم دسترسی به نیتروژن مایع، می‌توانید با کوبیدن بافت و یا با استفاده از تیغ، بافت‌ها را به قطعات کوچک‌تر و همگن تبدیل کنید. توجه داشته باشید این مرحله در بازدهی کیفیت تأثیرگذار می‌باشد.

۲. ۱۰۰ μl از Vira Lyse I را به میکروتیوب اضافه نمایید و ۴ الی ۵ بار Vortex نمایید.

۳. ۱۴۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه نموده و به خوبی ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin نمایید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۶ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۱۰ دقیقه، میکروتیوب را Vortex و Spin نمایید. (در صورت حل نشدن بافت، می توان زمان انکوباسیون را افزایش داد).

۴. ۱۰۰ μl از محلول Vira Bind به میکروتیوب اضافه و به سرعت Vortex نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ °C انکوبه نمایید. در مدت زمان مذکور ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin کنید.

۵. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول به میکروتیوب اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود. سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۶. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.

توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.

۷. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. مرحله ۹ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۱. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۲. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۳. ۱۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

HPV DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

* ۶۰۰-۷۰۰ μl از نمونه های حاوی ویروس HPV شامل ترشحات واژن، پلاسم، سرم، سوپ های دهانی و سایر مایعات مخاطی.

* بافت زگیل: ۱۰-۲۵ mg

* سلول های کشت داده شده: تا ۱۰^۶ x ۵ سلول

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰ °C می باشد.

۱. ۱۰۰-۷۰۰ μl از نمونه مورد نظر را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) سانتریفیوژ کرده و شکل گیری رسوب را بررسی نمایید، سپس سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب را نگه دارید.

۳. ۱۴۰ μl از Proteinase K را به محتویات میکروتیوب حاوی رسوب انتقال دهید.

۴. ۱۰۰ μl از Vira Lyse I را به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید. سپس در دمای ۵۶ °C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۵ دقیقه میکروتیوب را invert نمایید. (در صورت حل نشدن بافت، می توان زمان انکوباسیون را به صورت Overnight افزایش داد).

توجه: در صورتی که نمونه مورد استفاده خون، سرم و یا پلاسم می باشد، زمان انکوباسیون را به ۳۰ دقیقه کاهش دهید.

۵. ۱۰۰ μl از Vira Lyse II را به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید. سپس ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید.

۶. ۲۵۰ μl اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه نموده و پیپتاژ نمایید.

۷. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون استخراج انتقال دهید.

توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.

۸. ستون و کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۹. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۱. مرحله ۱۰ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۲. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۳. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۴. ۱۰۰-۷۰ μl از محلول Vira El را به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

Mammalian Blood DNA Extraction kit

نحوه آماده سازی نمونه خون:

در صورتی که نمونه منجمد باشد، قبل از آغاز فرایند استخراج، نمونه را در بن ماری در دمای 37°C به آرامی ذوب کنید و سپس برای استفاده بر روی یخ قرار دهید.

میزان نمونه مورد نیاز:

نمونه خون پستانداران: ۲۰۰ μl

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ می باشد.

۱. ۲۰۰ μl نمونه تازه را به یک میکروتیوب ۱.۵ ml استریل اضافه نمایید.

۲. ۲۰۰ μl از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۳. ۴۰۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه نموده و میکروتیوب را ۱۵ ثانیه Pulse-Vortex نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۴. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه نموده و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را ۲ الی ۳ بار Vortex و Spin نمایید.

۵. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط ($15-25^{\circ}\text{C}$) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۶. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۷. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. مرحله ۸ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۰. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۱. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱.۵ ml استریل قرار دهید.

۱۲. ۱۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای 65°C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای 20°C - نگهداری کنید.

Gram Negative Bacteria DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

10^8 الی 10^9 سلول باکتری گرم منفی کشت داده شده (۵ ml)

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ می باشد.

۱. پس از کشت باکتری گرم منفی مورد نظر به صورت Overnight، آن را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.

۲. سوپرناتانت را دور بریزید و به رسوب حاصل، ۱۵۰ μl محلول PBS 1x اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.

۳. ۲۰۰ μl از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۴. ۴۰۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را هر ۵ الی ۱۰ دقیقه Vortex و Spin نمایید.

۵. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۶. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط ($15-25^{\circ}\text{C}$) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۷. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. ۱۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. مرحله ۹ را مجدداً تکرار نمایید.
۱۱. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۱۲. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۳. ۱۰۰-۵۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
- * اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C - نگهداری کنید.

Gram Positive Bacteria DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

۱۰^۸ الی ۱۰^۹ اسلول باکتری گرم مثبت کشت داده شده (۵ml)

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰ °C می باشد.

۱. پس از کشت باکتری گرم مثبت مورد نظر به صورت Overnight، آن را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.
۲. سوپرناتانت را دور بریزید و به رسوب حاصل، ۲۰۰ μl محلول PBS 1x اضافه و به خوبی پیتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.
۳. ۲۵ μl آنزیم Lysozyme (با غلظت ۵۰ mg/ml) را به میکروتیوب اضافه کنید و حداقل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را هر ۵ الی ۱۰ دقیقه Spin و Vortex نمایید.
۴. ۲۰۰ μl محلول Vira Lyse ۱ اضافه و به خوبی پیتاژ، Spin و Vortex نمایید.
۵. ۴۰ μl آنزیم Proteinase K به میکروتیوب اضافه و آن را Spin و Vortex کنید. سپس در دمای ۵۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۲ الی ۳ دقیقه میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید.
۶. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه و به خوبی پیتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۲ الی ۳ بار Spin و Vortex نمایید.
۷. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.
- توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.
۸. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.
۹. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash ۱ را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۱۰. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۱۱. مرحله ۱۰ را مجدداً تکرار نمایید.
۱۲. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۱۳. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۴. ۱۰۰-۵۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
- * اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C - نگهداری کنید.

Stool DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

نمونه مدفوع : ۱۰۰ mg

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰ °C می باشد.

۱. ۱۰۰ mg نمونه را به یک میکروتیوب ۲ ml استریل انتقال داده و آن را به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار دهید.
۲. ۴۰۰ μl از Vira Lyse ۱ اضافه نموده و بخوبی مخلوط نمایید.
- توجه: در صورت نیاز به استخراج DNA از باکتری گرم مثبت از نمونه مدفوع، ۲۵ μl از آنزیم لیزوزیم با غلظت ۵۰ mg/ml را به میکروتیوب اضافه نمایید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه نمایید. در زمان انکوباسیون، هر ۱۰ دقیقه میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید.
۳. ۲۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه و Spin و Vortex نمایید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۶ °C انکوبه نمایید. در طول مدت زمان انکوباسیون، هر ۱۵ دقیقه میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید.
۴. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) سانتریفیوژ نمایید.

۵. سوپرناتانت را به آرامی و با دقت به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل جدید منتقل نمایید. اطمینان حاصل کنید که رسوب ایجاد شده به داخل سوپرناتانت منتقل نشود.

۶. ۲۰۰ μl از محلول Vira Bind به آن افزوده و به خوبی مخلوط نمایید.

۷. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه نموده و به خوبی پیپتاژ نمایید.

۸. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون، پیپت نمایید.

توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید.

۹. ستون-کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید و سپس محتویات داخل کالکشن را دور بیانداژید. در صورتی که حجم نمونه بیش از ۷۰۰ μl باشد، محتویات را مجدداً داخل ستون ریخته و سانتریفیوژ نمایید تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.

۱۰. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۱. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۲. مرحله ۱۱ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۳. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۳ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ نمایید.

۱۴. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۵. ۱۰۰-۵۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

Sperm DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

نمونه اسپرم : ۱۰۰-۵۰۰ μl

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۸ °C می باشد.

۱. ۱۰۰-۵۰۰ μl از نمونه را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. ۳۰۰ μl از محلول Vira Lyse I را به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۱۰ ثانیه Vortex کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط (۲۵-۱۵ °C) با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.

۳. سوپرناتانت را به آرامی و با دقت جدا نمایید و دور بریزید. به منظور جلوگیری از ترکیب سوپرناتانت و رسوب، اجازه دهید مقداری از سوپرناتانت (حدود ۱۰۰ μl) روی رسوب باقی بماند.

۴. رسوب باقی مانده را به مدت ۱۰ ثانیه Vortex کنید.

۵. ۲۰۰ μl از محلول Vira Lyse II را به میکروتیوب اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. سپس Spinning Vortex نمایید.

۶. ۴۰۰ μl از آنزیم Proteinase K را به میکروتیوب اضافه نموده و به خوبی Vortex نمایید. سپس آن را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۶ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۵ الی ۱۰ دقیقه میکروتیوب را invert و Spin نمایید.

۷. مجدداً ۲۰۰ μl از محلول Vira Lyse II را اضافه نموده و به خوبی آن را Vortex نمایید.

توجه: جهت بازدهی بهتر، در این مرحله ۱۰۰ ایزوپروپانول اضافه نمایید و به خوبی پیپتاژ کنید. (اختیاری)

۸. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۳۰ ثانیه در دمای محیط ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۹. ستون-کالکشن را به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را تخلیه کرده و مجدداً ستون را داخل همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۱. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۲. مرحله ۱۱ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۳. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۴. کالکشن را دور انداخته و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۵. ۱۰۰-۴۰۰ μl از Vira El را به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

Cultured Cells DNA Extraction kit

میزان نمونه مورد نیاز:

سلول های کشت داده شده چسبنده و غیر چسبنده (به شکل سوسپانسیون) از رده های مختلف سلولی: 10^4 الی 10^6 سلول

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای $20-28^{\circ}\text{C}$ می باشد.

* در صورت استفاده از سلول های چسبنده، لازم است در ابتدا با استفاده از Trypsin-EDTA آنها را به شکل سوسپانسیون درآورید.

۱. سوسپانسیون حاوی سلول های کشت داده شده را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید. سپس سوپرناتانت را با احتیاط دور بریزید.

۲. ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۳. ۴۰۰ الی ۴۰۰۰ آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Spinning و Vortex کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۴. ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ ایزوپروپانول اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۵. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط ($15-25^{\circ}\text{C}$) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۶. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۷. ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید.

محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید.

محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. مرحله ۸ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۰. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۱. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۲. ۱۰۰ الی ۵۰۰ از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای 65°C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای $20-25^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید.

CSF DNA Extraction kit

میزان نمونه مورد نیاز:

مایع مغزی نخاعی: ۵۰۰ الی ۱۰۰۰

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای $20-28^{\circ}\text{C}$ می باشد.

۱. ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ از نمونه را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۳. ۴۰۰ الی ۴۰۰۰ آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Spinning و Vortex کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۴. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط ($15-25^{\circ}\text{C}$) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۵. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۶. ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید.

محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۷. ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید.

محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۸. مرحله ۷ را مجدداً تکرار نمایید.

۹. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۰. کالکشن را دور بیانداژید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۱. ۱۰۰ الی ۵۰۰ از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای 65°C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای $20-25^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید.

Amniotic Fluid DNA Extraction kit

میزان نمونه مورد نیاز:

مایع آمنیوتیک: ۲-۸ ml (حاوی حداقل تعداد ۱۰^۶ سلول)

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰-۲۸ °C می باشد.

۱. ۲-۸ ml (حداقل تعداد ۱۰^۶ سلول) مایع آمنیوتیک را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.

۲. سوپرناتانت را با احتیاط دور بریزید و به رسوب حاصل، ۱۵۰ μl محلول PBS 1x اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.

۳. ۲۰۰ μl از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۴. ۴۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۵. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۶. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۷. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. مرحله ۸ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۰. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۱. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۲. ۱۰-۵۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰-۲۸ °C نگهداری کنید.

Saliva DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

نمونه بزاق دهان: ۰/۵-۱۰ ml

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰-۲۸ °C می باشد.

۱. ۰/۵-۱۰ ml از نمونه ی مورد نظر را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) سانتریفیوژ کرده و شکل گیری رسوب را بررسی نمایید، سپس سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب را نگه دارید.

۳. ۲۰۰ μl از Vira Binding را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۴. ۴۰ μl آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۵. ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۶. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۷. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۸. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. مرحله ۹ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۱. ستون - کالکشن خالی را به مدت دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۲. کالکشن را دور بیاورید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۳. اِلم ۵۰-۱۰۰ از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای °C ۶۵ انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای °C ۲۰- نگهداری کنید.

Plasma DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

پلاسما: اِلم ۵۰۰

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای °C ۲۸ می باشد.

۱. اِلم ۵۰۰ از نمونه را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. اِلم ۲۰۰ از Vira Bind را به میکروتیوب اضافه نموده و پس از پیپتاژ کافی به مدت ۱۰ ثانیه Vortex نمایید.

۳. اِلم ۱۴۰ آنزیم Proteinase K اضافه نموده و ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Spinning و Vortex کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۵۶ انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.

۴. اِلم ۱۰۰ ایزوپروپانول اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۵. محتویات میکروتیوب حاوی نمونه را به آرامی به ستون-کالکشن انتقال دهید.

توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (°C ۲۵-۱۵) ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.

۶. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۷. اِلم ۵۰۰ محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۸. اِلم ۵۰۰ محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۹. مرحله ۸ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۰. ستون - کالکشن خالی را به مدت دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۱. کالکشن را دور بیاورید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۲. اِلم ۵۰-۱۰۰ از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای °C ۶۵ انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای °C ۲۰- نگهداری کنید.

Insect DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

- نمونه تازه : ۳۰-۱۰ mg
- نمونه خشک یا لیوفیلیزه : ۲۵-۱۵ mg

دستورالعمل:

توجه: قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای °C ۲۸ می باشد.

۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع به صورت پودر در آورده و همگن نمایید، سپس در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

توجه: در صورت عدم دسترسی به نیتروژن مایع، می توانید با کوبیدن بافت و یا با استفاده از تیغ، بافت ها را به قطعات کوچک تر و همگن تبدیل کنید. توجه داشته باشید این مرحله در بازدهی کیت تاثیر گذار می باشد.

۲. اِلم ۲۰۰ از Vira Lyse I را به میکروتیوب اضافه نمایید و ۴ الی ۵ بار Vortex نمایید.

۳. اِلم ۱۴۰ آنزیم Proteinase K اضافه نموده و به خوبی ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin نمایید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای °C ۵۶ انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۱۰ دقیقه، میکروتیوب را Vortex و Spin نمایید. (در صورت حل نشدن بافت، می توان زمان انکوباسیون را افزایش داد).

۴. اِلم ۲۰۰ از محلول Vira Bind به میکروتیوب اضافه و به سرعت Vortex نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در °C ۷۰ انکوبه نمایید. در مدت زمان مذکور ۲ الی ۳ بار میکروتیوب را Vortex و Spin کنید.

۵. اِلم ۱۰۰ ایزوپروپانول به میکروتیوب اضافه و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود، سپس آن را به مدت ۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید.

۶. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.

توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (°C ۲۵-۱۵) انکوبه نمایید.

۷. ستون - کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتیفریوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.
۸. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتیفریوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۹. ۵۰۰ μl محلول Vira Wash II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتیفریوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۱۰. مرحله ۹ را مجدداً تکرار نمایید.
۱۱. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتیفریوژ نمایید.
۱۲. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۳. ۱۰۰ μl از محلول Vira El (که در ابتدا در دمای ۶۵ °C انکوبه نموده اید) به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتیفریوژ نمایید.
* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

راهنمای عیب یابی:

ایرادات	دلایل احتمالی	پیشنهادهای
عدم مشاهده نتیجه یا بازدهی کم DNA	عدم نگهداری کیت در دمای تعیین شده	به دمای درج شده روی لیبل تمامی اجزای کیت دقت فرمایید و هر کدام را در دمای مناسب خود نگهداری کنید.
	اتانول مطلق به محلول Vira Wash II اضافه نشده است.	قبل از استفاده از محلول Vira Wash II، به آن اتانول مطلق اضافه شود و پس از افزودن به خوبی ترکیب و در دمای محیط نگهداری شود.
	مواد و نمونه به خوبی با هم ترکیب نشده اند.	پس از اضافه نمودن هر محلول، آن را به خوبی با نمونه اولیه ترکیب نمایید.
	تعداد پایین گلبول های سفید خون	نمونه خون برخی افراد حاوی تعداد کمتری از سلول های هسته دار می باشد و این مسئله بازده استخراج را تحت تاثیر قرار می دهد، لذا پیشنهاد می شود مقدار نمونه را افزایش دهید و فرایند استخراج را تکرار نمایید.
	تخریب نامناسب نمونه بافت	از آنجایی که سرعت و میزان خرد و همگن کردن نمونه در بازده استخراج تاثیر بسزایی دارد، از انجام این مرحله اطمینان حاصل فرمایید تا از ایجاد توده سلولی جلوگیری بعمل آید.
	تعداد کم باکتری	استخراج از نمونه هایی که حاوی تعداد کم باکتری هستند، دارای غلظت و بازده پایینی می باشد، مقدار نمونه را طبق دستورالعمل استفاده نمایید. در صورت استفاده از مقادیر بیشتر نمونه، به همان میزان محلول های کیت را افزایش دهید.
	تعداد پایین سلول اسپرم در نمونه	برخی از نمونه ها حاوی تعداد کمتری سلول می باشند و این موضوع باعث پایین آمدن بازده استخراج میگردد. پیشنهاد می شود مقدار نمونه را افزایش دهید و یا از نمونه جدید استفاده نمایید.
خلوص کم DNA	اختلاط دو فاز سوپرناتانت و رسوب	سوپرناتانت باید فاقد هرگونه توده سلولی باشد. در انتقال آن دقت کافی را بعمل آورید.
	مقادیر نامناسب A260/230 در نانودراپ	از انجام صحیح مراحل شستشو اطمینان حاصل کنید. مراقب باشید که ستون پس از شستشو با محلول داخل کالکشن تماس پیدا نکند. در صورت رخداد، مرحله شست و شوی ستون-کالکشن خالی را مجدداً تکرار نمایید.
مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج PCR، RT-PCR مانند:	وجود باقی مانده اتانول در نمونه استخراج شده	استفاده از Proteinase K در میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ تاثیر بسزایی دارد. لذا از زمان انکوباسیون، ترکیب کامل نمونه با آنزیم و نگهداری آن در شرایط مناسب اطمینان حاصل فرمایید.
	کاهش عملکرد استخراج	اطمینان حاصل کنید که مراحل شستشو به خوبی انجام گرفته است. غشای ستون استخراج پس از انجام آخرین مرحله شستشو و قبل از اضافه کردن VE باید به خوبی خشک گردد.
کاهش عملکرد استخراج	به جای Vira El از آب استفاده شده است.	بدلیل اختلاف در pH، صرفاً از محلول Vira El موجود در کیت استفاده نمایید.