

HPV DNA Extraction Kit

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Pre-Lysis Buffer	10 ml	دمای محیط (15-25°C)
Virus Lysis Buffer	15 ml	
Wash Solution I	25 ml	
Wash Solution II* (concentrate)	15 ml	
Elution Buffer	4 ml	
Proteinase K Buffer	2 ml	—
Proteinase K (Lyophilized)	40 mg	
Spin Columns	50	
Collection Tubes	100	
Protocol	1	



* ۳۵ ml اتانول مطلق به بطری Wash Solution II اضافه نمایید.
* در صورت مشاهده رسوب در بافر Wash Solution I به منظور حل شدن کامل رسوب، قبل از استفاده، بافر را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه نمایید.

کیت حاضر به منظور تخلیص DNA از ویروس پاپیلوماوی انسانی (HPV) با میزان غلظت و خلوص مناسب حتی در تیتراهای پایین ویروسی طراحی شده است. این کیت قابلیت استخراج از نمونه های مختلف مانند: زگیل، ترشحات واژن، خون، پلاسما، سرم، سلول های کشت داده شده، سوپ های دهانی و سایر مایعات مخاطی را دارا می باشد.

نکات کلیدی :

- 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. برای جلوگیری از ذوب و انجام مکرر آنزیم Proteinase K را به میزان واکنش های مورد نیاز الیکوت کنید. دمای نگهداری این آنزیم پس از اضافه نمودن بافر مربوطه به پودر لیوفیلیزه، ۲-۸°C می باشد. در صورت نگهداری بلند مدت، پیشنهاد می شود در دمای ۲۰°C نگهداری شود.
- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین مرتبه به آرامی invert نمایید.

موارد مورد نیاز :

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- Water bath یا Heating block

میزان نمونه مورد نیاز :

- * ۶۰۰-۷۰۰ µl از نمونه های حاوی ویروس HPV شامل ترشحات واژن، پلاسما، 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 ۲-۸°C می باشد.
۱. ۶۰۰-۷۰۰ 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. ۴۰ µl از Proteinase K را به محتویات میکروتیوب حاوی رسوب اضافه نمایید.
۴. ۲۰۰ µl از Pre-Lysis Buffer را به میکروتیوب حاوی رسوب 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 Over night افزایش داد)
توجه: در صورتی که نمونه مورد استفاده خون، سرم و یا پلاسما می باشد، زمان انکوباسیون را به ۳۰ دقیقه کاهش دهید.
۵. ۲۰۰ µl از Virus Lysis Buffer 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: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵°C) ستون-کالکشن حاوی نمونه را 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. ۵۰۰ µl محلول Wash Solution 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. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution 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 سانتیفریوژ 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 سانتیفریوژ نمایید.

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

۱۴. ۵۰-۷۰ μl از محلول Elution Buffer 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 سانتیفریوژ نمایید.

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

راهنمای عیب یابی:

پیشنهادهات	دلایل احتمالی	ايرادات
به دمای درج شده روی لیبل تمامی اجزای کیت دقت فرمایید و هر کدام را در دمای مناسب خود نگهداری کنید.	عدم نگهداری کیت در دمای تعیین شده	مقادیر کم و یا عدم وجود اسید نوکلئیک در پایان فرایند استخراج
استفاده از Proteinase K الزامی می باشد. لذا از زمان انکوباسیون، ترکیب کامل نمونه با آنزیم و نگهداری آن در شرایط مناسب، اطمینان حاصل فرمایید. این مرحله در جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ تاثیر بسزایی دارد.	Proteinase K از فرایند حذف شده و یا بخوبی مخلوط نشده است.	
نمونه ها می بایست به سرعت مورد استفاده قرار گیرند. از vortex بیش از حد خودداری شود. Lysis و Pre-Lysis بیشتر از میزان ذکر شده در دستورالعمل استفاده نفرمایید.	DNA ویروسی تخریب شده است.	
مرحله ۱۲ را مجدداً تکرار نمایید تا محلول Wash Solution II کاملاً از محصول حذف گردد.	وجود اتانول در نمونه استخراج شده	
بدلیل اختلاف در pH، صرفاً از محلول Elution Buffer موجود در کیت استفاده نمایید.	به جای Elution Buffer از آب استفاده شده است.	کاهش عملکرد استخراج
عدم انجام مراحل شست و شو به صورت صحیح می تواند سبب عدم حذف عوامل بازدارنده PCR/RT-PCR در نمونه شود. این مرحله در میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ نیز تاثیر بسزایی دارد.	وجود مواد بازدارنده پس از استخراج	مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج مانند: PCR, RT-PCR