

DNA/RNA Extraction Kit

Plant, Soil, Insect

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Lysis Buffer	25 ml	دمای محیط (15-25°C)
Wash Solution I	25 ml	
Wash Solution II* (concentrate)	10 ml	
Elution Buffer	5 ml	
Columns	50 pcs	
Collection Tubes	100 pcs	
Protocol	1	



Viragene®
Cell Discovery Solutions

* ۴۰ 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 استخراج DNA و RNA با خلوص و غلظت مناسب از نمونه های زیر را با غلظت و خلوص مناسب در کمترین زمان ممکن دارا می باشد:

- نمونه های متنوع گیاهان
- میکروارگانیسم های مختلف موجود در خاک مانند باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها
- بافت های متنوع حشرات

نکات کلیدی:

- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.

موارد مورد نیاز:

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- Heating Block یا Water Bath
- β -mercaptoethanol
- ایزوپروپانول
- هاون
- نیتروژن مایع
- آنزیم RNase A با غلظت ۱۰ mg/ml (در صورت نیاز به DNA ژنومیک خالص، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)
- آنزیم DNase I (در صورت نیاز به RNA خالص، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)
- سانتریفیوژ یخچال دار
- آنزیم Lysozyme با غلظت ۵۰ mg/ml (جهت استخراج باکتری گرم مثبت از خاک، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)

Plant DNA/RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

- نمونه تازه : ۲۰-۱۰۰ mg

دستورالعمل:

- به ازای هر نمونه، ۱۰۰ μ l از محلول Lysis Buffer را با ۱۰۰ μ l β -mercaptoethanol در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل بخوبی مخلوط نموده و در دمای ۶۵°C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.
- ۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع بصورت پودر در آورده و همگن نمایید، سپس به میکروتیوب حاوی مخلوط Lysis Buffer و β -mercaptoethanol (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید. (جهت جلوگیری از تخریب اسید نوکلئیک، این مرحله را با سرعت و بدون وقفه انجام دهید).
- توجه: در صورت عدم دسترسی به نیتروژن مایع، می توانید با کوبیدن نمونه و یا با استفاده از تیغ، نمونه ها را به قطعات کوچک تر و همگن تبدیل کنید. توجه داشته باشید این مرحله در بازدهی کیت تاثیرگذار خواهد بود.
- ۲. میکروتیوب را به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید و در دمای ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان ۳ الی ۴ بار Spin و Vortex نمایید.
- ۳. میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C، سانتریفیوژ نمایید.
- ۴. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
- ۵. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Soil DNA/RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

خاک تازه و مرطوب : ۲۵-۵۰ mg

دستورالعمل:

- به ازای هر نمونه، ۱۰۰ الی ۵۰۰ از محلول Lysis Buffer را با ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ β -mercaptoethanol در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل بخوبی مخلوط نموده و در دمای 65°C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.
- ۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع بصورت پودر در آورده و همگن نمایید سپس به میکروتیوب حاوی مخلوط Lysis و β -mercaptoethanol (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید. (جهت جلوگیری از تخریب اسید نوکلئیک، این مرحله را با سرعت و بدون وقفه انجام دهید.)
توجه: در صورت استخراج باکتری گرم مثبت از نمونه خاک، ۲۵ الی ۲۰۰ از آنزیم Lysozyme با غلظت ۵۰ mg/ml را به میکروتیوب اضافه نمایید و ۶۰ دقیقه در دمای 37°C انکوبه کنید. در مدت زمان انکوباسیون هر ۱۰ دقیقه میکروتیوب را Vortex و Spin نمایید.
- ۲. میکروتیوب را به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید و در دمای 65°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
- ۳. میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای 4°C ، سانتریفیوژ نمایید.
- ۴. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
- ۵. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Insect DNA/RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

● نمونه تازه : ۱۰-۳۰ mg

● نمونه خشک یا لیوفلیزه : ۱۵-۲۵ mg

دستورالعمل:

- به ازای هر نمونه، ۱۰۰ الی ۵۰۰ از محلول Lysis Buffer را با ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ β -mercaptoethanol در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل بخوبی مخلوط نموده و در دمای 65°C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.
- ۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع بصورت پودر در آورده و همگن نمایید سپس به میکروتیوب حاوی مخلوط Lysis و β -mercaptoethanol (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید. (جهت جلوگیری از تخریب اسید نوکلئیک، این مرحله را با سرعت و بدون وقفه انجام دهید.)
توجه: در صورت عدم دسترسی به نیتروژن مایع، می توانید با کوبیدن نمونه و یا با استفاده از تیغ، نمونه ها را به قطعات کوچک تر و همگن تبدیل کنید. توجه داشته باشید این مرحله در بازدهی کیت تاثیرگذار خواهد بود.
- ۲. میکروتیوب را به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید و در دمای 65°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
- ۳. میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای 4°C ، سانتریفیوژ نمایید.
- ۴. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
- ۵. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Washing Protocol

۱. ۵۰۰ ایزوپروپانول به میکروتیوب حاوی سوپرناتانت اضافه و به خوبی پیتپاژ نمایید تا مخلوطی همگن به دست آید.
۲. 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.
۳. ستون-کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. سپس محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید. در صورتی که حجم نمونه بیش از ۷۰۰ µl باشد، محتویات را مجدداً داخل همان ستون ریخته و سانتریفیوژ نمایید تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.
۴. 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 ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۵. 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 ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۶. مرحله ۵ را مجدداً تکرار نمایید.
۷. ستون-کالکشن خالی را به مدت ۲ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۸. کالکشن را دور بیاندازید و ستون را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۹. ۵۰ µl از محلول Elution Buffer 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.

در صورت نیاز به RNA خالص از آنزیم DNase طبق مراحل ذکر شده در پروتکل آنزیم، استفاده شود.
در صورت نیاز به DNA ژنومیک خالص از آنزیم RNase A طبق مراحل ذکر شده در پروتکل آنزیم، استفاده شود.

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

راهنمای عیب یابی:

ایرادات	دلایل احتمالی	پیشنهادهای
عدم مشاهده نتیجه یا غلظت کم DNA/RNA	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.
	میزان بالای نمونه اولیه	مقادیر بالای نمونه می تواند موجب لیز سلولی ناکافی، انسداد ستون و متعاقباً کاهش بازده استخراج گردد. مقادیر را طبق دستورالعمل استفاده نمایید.
	عدم استفاده از نمونه تازه یا نمونه با شرایط نگهداری نامناسب	نمونه باید تازه و یا شرایط نگهداری آن به درستی رعایت شده باشد.
	هضم نامناسب نمونه اولیه	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. گیاهان با متابولیت ثانویه مراحل لیز سخت تری دارند که حتماً باید به صورت همگن لیز شوند. گیاهانی که طولانی مدت نگهداری شده اند حتماً باید شرایط دمایی نگهداری آن (۸۰ °C-) رعایت شود.
خلوص کم RNA/DNA	انسداد ستون استخراج	قبل از اضافه نمودن ایزوپروپانول (مرحله ۴) سوپرناتانت باید فاقد توده سلولی باشد. استفاده از مقادیر بالای نمونه منجر به ناکارآمدی لیز سلولی و در نتیجه کاهش خلوص DNA/RNA خواهد شد.
	مقادیر نامناسب 260/230 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 ۱۱ را مجدداً تکرار کنید.
مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج PCR، RT-PCR مانند:	وجود باقی مانده اتانول در نمونه استخراج شده	مرحله ۷ را مجدداً تکرار نمایید تا محلول Wash Solution II کاملاً از محصول حذف گردد.
کاهش عملکرد استخراج	به جای Elution Buffer از آب استفاده شده است.	بدلیل اختلاف در pH، صرفاً از محلول Elution Buffer موجود در کیت استفاده نمایید.