

FFPE DNA Extraction Kit

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Lysis Buffer	15 ml	2-8 °C
Deparaffinization Solution	150 ml	
Wash Solution I	25 ml	
Wash Solution II	10 ml	دمای محیط (15-25°C)
Elution Buffer	1.5 ml	
Proteinase K Buffer	2 ml	
Proteinase K Powder	40 mg	
Spin Columns	50	—
Protocol	1	



* 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.

* 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.

* قبل از شروع فرآیند استخراج ۴۰ میلی لیتر اتانول مطلق را به بافر Wash Solution II اضافه نمایید.

* قبل از شروع فرآیند استخراج Lysis Buffer را در دمای اتاق قرار داده تا به دمای اتاق برسد.

کیفیت حاضر قابلیت استخراج DNA ژنومی از نمونه بافت پارافینه با غلظت و خلوص مناسب را دارا می باشد.

نکات کلیدی جهت بالابردن بازدهی فرایند استخراج :

- قبل از استفاده، مقدار مورد نیاز از Elution Buffer (به ازای هر واکنش ۱۵۰ ال ۳۰۰) در دمای ۶۵°C انکوبه نمایید.
- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.
- قبل از شروع فرایند استخراج مقدار لازم از بافر Deparaffinization Solution را جهت پارافین زدایی بافت در دمای ۹۵°C انکوبه نمایید.

موارد مورد نیاز :

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- Water Bath یا Heating Block
- هاون و نیتروژن مایع

FFPE DNA Extraction kit

میزان نمونه مورد نیاز:

نمونه بافت پارافینه: حداکثر ۵ قطعه به ضخامت ۵-۱۰ میکرومتر

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. قبل از شروع فرایند استخراج مقدار لازم از بافر Deparaffinization Solution را جهت پارافین زدایی بافت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. ۱. نمونه بافت پارافینه را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل اضافه نمایید.

۲. ۱۰۰ ال ۱۵۰ ال ۱ ml از بافر Deparaffinization Solution انکوبه شده در دمای ۹۵ °C را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل حاوی نمونه اضافه کرده، Spin و Vortex نمایید و به مدت ۵ دقیقه بر روی Heating Block در دمای ۹۵ °C انکوبه نمایید. پس از گذشت زمان انکوباسیون میکروتیوب را مجدداً Spin و Vortex نمایید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

۳. مرحله ۲ را سه مرتبه تکرار نمایید. بهتر است در هر مرحله میکروتیوب را تعویض نمایید و بافت را به میکروتیوب جدید منتقل کرده. (اطمینان حاصل نمایید که محلول کاملاً شفاف شده است).

۴. 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 ۱۰ تا ۱۲ میلی گرم 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

۵. ۱۰۰ ال ۳۰۰ ال ۱ ml از Lysis Buffer را به میکروتیوب اضافه نمایید و ۴ ال ۵ بار Vortex نمایید.

۶. μ l ۴۰ آنزیم Proteinase K اضافه نموده و میکروتیوب را به خوبی ۲ الی ۳ بار Pulse-Vortex نمایید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۱۵ دقیقه، میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید. (در صورت حل نشدن بافت، می توان زمان انکوباسیون را افزایش داد).

۷. سپس میکروتیوب های حاوی نمونه را به مدت ۱ ساعت در دمای 95°C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۳۰ دقیقه، میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید.

۸. پس از سرد شدن نمونه هم حجم نمونه اتانول مطلق اضافه نموده و به خوبی پیپتاژ نمایید تا مخلوط کاملاً همگن شود.

۹. 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 ($15-25^{\circ}\text{C}$) انکوبه نمایید

۱۰. ستون - 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.

۱۱. μ l ۵۰۰ محلول I Wash Solution 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.

۱۲. μ l ۵۰۰ محلول II Wash Solution 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.

۱۳. مرحله ۱۲ را مجدداً تکرار نمایید.

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

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

۱۲. μ l ۳۰۰ از محلول Elution Buffer (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 37°C انکوبه نمایید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

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	عدم مشاهده نتیجه یا بازدهی کم DNA
قبل از استفاده از محلول Wash Solution II، به آن اتانول مطلق اضافه شود و پس از افزودن به خوبی ترکیب و در دمای محیط نگهداری شود.	اتانول مطلق به محلول Wash Solution II اضافه نشده است.	
پس از اضافه نمودن هر محلول، آن را به خوبی با نمونه اولیه ترکیب نمایید.	مواد و نمونه به خوبی با هم ترکیب نشده اند.	
از آنجایی که سرعت و میزان خرد و همگن کردن نمونه در بازده استخراج تأثیر بسزایی دارد، از انجام این مرحله اطمینان حاصل فرمایید تا از ایجاد توده سلولی جلوگیری بعمل آید.	تخریب نامناسب نمونه بافت	
از آنجایی که حذف شدن کامل پارافین از نمونه ها اهمیت دارد. مراحل پارافین زدایی را تا شفاف شدن کامل محلول رویی نمونه ها ادامه دهید.	دپارافینه نشدن کامل نمونه	خلوص کم DNA
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.	مقادیر نامناسب A260/230 در نانودراپ	
استفاده از Proteinase K در میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ تأثیر بسزایی دارد. لذا از زمان انکوباسیون، ترکیب کامل نمونه با آنزیم و نگهداری آن در شرایط مناسب اطمینان حاصل فرمایید.	مقادیر نامناسب A260/280 در نانودراپ	مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج مانند: PCR, RT-PCR
اطمینان حاصل کنید که مراحل شستشو به خوبی انجام گرفته است. غشای ستون پس از انجام آخرین مرحله شستشو و قبل از اضافه کردن Elution Buffer باید به خوبی خشک گردد.	وجود باقی مانده اتانول در نمونه استخراج شده	
به دلیل 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