BehPrep Fungal DNA Extraction Kit

For isolation of genomic DNA from fungal and bacterial samples.

Catalog number: BP103R010/050

ویرایش 02

- در دمای اتاق نگهداری شود.
- تاریخ انقضا: سه سال پس از تولید

آدرس: شیراز، منطقه ویژه اقتصادی، جنب میدان صادرات

کدپستی: 7341986200

وبسایت: www.behgene.com

شماره تماس: 09053633840

شماره پشتیبانی فنی: 09170093664

محتویات

Cat.No.	محتویات	10 واکنش (BR103R010)	50 واکنش (BR103R050)	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	دمای اتاق
BR109	FL Buffer	6 mL	22 mL	دمای اتاق
BR102	WB1 Buffer	7 mL	30 mL	دمای اتاق
BR103	WB2 Buffer	13 mL	62 mL	دمای اتاق
BR104	EB Buffer	3 mL	11 mL	دمای اتاق
BR110	BT Buffer	4 mL	12 mL	دمای اتاق
BR105	Proteinase K	1 vial (8 mg)	1 vial (40 mg)	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2mL	2 mL	دمای اتاق

شرایط نگهداری و پایداری

- ستون‌ها در کیسه‌های زیپ‌دار بسته‌بندی شده‌اند و در دمای اتاق (18–25°C) تا پایان تاریخ انقضا کیت پایداری خواهند داشت.
- همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آن‌ها استفاده کرد.
- محلول‌ها را در دمای (18–25°C) و یا در حمام آب 37°C گرم کنید تا رسوبات حل شوند.
- بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشندکه هیچ تاثیری در عملکرد آن‌ها نخواهد داشت.
- درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید.

توجه: نگهداری در دمای 2–8°C (یخچال) یا 25°C– تا 15°C– (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص DNA خواهد گذاشت.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep Fungal DNA جهت استخراج DNA ژنومیک قارچ‌هایی مانند گونه‌های آسپرژیلوس و کاندیدا از خون محیطی، نمونه BAL، مایع مغزی-نخاعی (CSF)، نمونه مایع چشمی، خلط و محیط کشت قارچ طراحی شده است.

این روش همچنین برای استخراج ژنوم باکتری‌هایی نظیر اشریشیا کلی (Escherichia coli)، باسیلوس سوبتیلیس (Bacillus subtilis)، بوردتلا پرتوزیس (Bordetella pertussis) از نمونه سوآب حلق و بینی، مایع مغزی-نخاعی، نمونه BAL، نمونه مایع چشمی، خلط و محیط کشت باکتریایی می‌توان استفاده کرد. این روش جهت استخراج ژنوم سایر باکتری‌ها از جمله باکتری‌های گرم مثبت و مایکوباکتریوم‌ها(Mycobacterium) که نیاز به انکوباسیون با آنزیم‌های خاص نظیر لیزوزیم یا لیزواستافین (مانند استافیلوکوک‌ها) برای لایز دیواره سلولی سخت و چند لایه خود دارند، نیز کارآمد می‌باشد.

DNA استخراج شده قابل برش توسط آنزیم‌های محدودکننده بوده و مناسب جهت سایر کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot می‌باشد.

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18-25°C) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد-ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً مخلوط کنید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت به مرکز غشای ستون، بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه نمایید.
- بعد از هر انتقال مایع به وسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتردار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشای ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسل، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند

- سمپلر µL 10–100 و µL 100–1000 و سرسمپلر (RNase, DNase–free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase–free)
- لوله فالکون 15 mL یا 50 mL
- ورتکس
- الکل ایزوپروپیل 100%
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- سانتریفیوژ فالکون
- بافر PBS (1X)
- بافر NaOH (1M)

نکات ایمنی

- بافرهای FL و WB1 حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست ممانعت کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده‌سازی بافرها

Proteinase K

میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.

مقدار پروتئیناز K	8 mg	40 mg
مقدار بافر PK	300 µL	2 mL

- توجه داشته باشید آنزیم بعد از آماده‌سازی باید در دمای 20°C– نگهداری شود.

توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

استخراج DNA ژنومیک قارچ

آماده‌سازی نمونه

- ابتدا نمونه مورد نظر را مطابق دستورالعمل زیر آماده نموده و سپس مراحل استخراج را از قسمت فرایند، ادامه دهید.

خون محیطی

1. حداقل میزان 3–5 mL خون محیطی جمع‌آوری شده در ویال‌های حاوی ترکیبات ضدانعقاد (EDTA) را به نسبت 1:5 با بافر RBC Lysis (1X) درون فالکون 50 mL یا 15 mL مخلوط کنید و به مدت 10–15 دقیقه در دمای 4°C یا روی یخ انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، لوله فالکون را چندین مرتبه سر و ته نمایید تا عمل تخریب گلبول‌های قرمز به خوبی صورت گیرد.

2. پس از تخریب گلبول‌های قرمز، محلول را به مدت 10–15 دقیقه در 300 x g سانتریفیوژ نمایید، سپس محلول رویی را دور بریزید.
توجه: در صورت وجود گلبول‌های قرمز درون رسوب، آن را در 1 واحد بافر RBC Lysis (1X) حل کرده و دوباره سانتریفیوژ نمایید.
3. رسوب به دست آمده را در 1 واحد (معادل یک میلی لیتر) بافر PBS (1X) حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید.
محلول را به خوبی ورتکس نمایید تا کاملاً همگن شود، سپس در 10000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
4. بدون آسیب به رسوب سلولی مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 300 µL بافر PBS (1X) به وسیله ورتکس حل نمایید. سپس به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید.

توجه: نمونه‌های خون کمتر از 3 mL، تا 70% و نمونه‌های خون کمتر از 2 mL، تا 90% بازده استخراج DNA ژنومیک قارچ را پایین می‌آورد.

نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)

1. حداقل میزان 10 mL از نمونه BAL را درون فالکون 50 mL یا 15 mL انتقال داده و در 300 x g به مدت 10–5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
2. . محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست‌آمده را در 1 mL بافر PBS (1X) حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید. تیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا رسوب کاملاً حل شود، سپس در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در 200 µL بافر PBS (1X) حل نمایید و به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید. از رسوب به دست آمده می‌توانید جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

توجه: نمونه‌های BAL کمتر از 10 mL، تا 70% بازده استخراج DNA ژنومیک قارچ را پایین می‌آورد.

نمونه خلط (Sputum)

1. به ازای هر میلی‌لیتر از نمونه خلط، میزان 50 µL بافر NaOH (1M) اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید تا رقیق شود.
- اگر نمونه قابل پیپت کردن نبود، مرحله بالا را مجدداً تکرار نمایید.

2. میزان 1 mL از نمونه را در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست آمده را در 1 mL بافر PBS (1X) حل نمایید و به خوبی ورتکس کنید تا یک محلول همگن حاصل شود.
4. محلول را در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

بدون آسیب به رسوب تشکیل شده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 450 µL بافر PBS (1X) حل کنید، سپس به مدت 1 دقیقه ورتکس نمایید. از محلول بدست آمده جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

محیط کشت قارچ

1. مقدار کمی از کلونی قارچ را به وسیله لوپ استریل از محیط کشت جدا کرده و در 1 mL بافر سالین 0.9% حل نمایید.
2. تیوب را با حداکثر سرعت به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
3. بدون آسیب به رسوب سلولی مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 300 µL بافر (1X) PBS به وسیله ورتکس حل نمایید. سپس به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید.

توجه: تعداد $1–5 \times 10^6$ سلول یا کنیدی حدود 20–30 µg از DNA ژنومیک قارچی بازده خواهد داشت.

مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی

اگر حجم نمونه کمتر از 400 µL باشد، میزان مناسبی از بافر (1X) PBS را به نمونه اضافه کنید تا حجم نهایی به 400 µL برسد. اگر حجم نمونه بیشتر از 400 µL باشد، نمونه را در چند تیوب 2 mL با حجم‌های 400 µL تقسیم کنید و مراحل 1–6 فرآیند استخراج DNA از قارچ را به صورت جداگانه برای هر تیوب انجام دهید. سپس محتویات همه تیوب‌ها را از فیلتر یک ستون عبور دهید و مطابق فرآیند ادامه دهید.

فرآیند

1. میزان 20–40 µL پروتئیناز K را به نمونه‌های آماده‌سازی شده اضافه نمایید.
2. تیوب‌ها را با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا محلول کاملاً همگن گردد.
3. تیوب‌ها را Short-spin کرده و در دمای 56°C به مدت 1 ساعت انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون تیوب‌ها را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex نمایید.
4. میزان 400–500 µL بافر FL را به محلول اضافه کرده و با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse-vortex نمایید.

5. تیوب‌ها را به مدت 3–1 ساعت در دمای 65°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون تیوب‌ها را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex نمایید.

6. میزان µL 400 الکل ایزوپروپیل خالص سرد را افزوده و با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse-vortex نمایید.

7. میزان µL 650 از محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و با حداکثر سرعت به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

8. مرحله قبل را با اضافه کردن باقی‌مانده محلول به ستون تکرار کنید.

- با توجه به اینکه DNA ژنومیک قارچی آئروسل می‌باشد، حتما از درپوش روتور سانتریفیوژ استفاده کنید و از انتقال بیشتر از µL 650 از محلول لایز شده به ستون جداً خودداری نمایید.
- اعمال حداکثر سرعت سانتریفیوژ تأثیری در میزان و کیفیت DNA استخراج شده نخواهد گذاشت.
- اگر محلول از غشای ستون عبور نکرد، سانتریفیوژ را با حداکثر سرعت تا زمانی که تمام محلول از غشای ستون عبور کند تکرار کنید.

9. میزان µL 500 بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و آن را در (13000 rpm) 10,000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
10. میزان µL 600 بافر WB2 را بدون تماس با دیواره ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در 10,000 x g (13000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درکالکشن تیوب جدید قرار دهید.

11. بار دیگر مرحله 10 را تکرار نمایید.

12. ستون را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشا کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

- توصیه می‌شود قبل از این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) انتقال دهید.
- هرگونه انتقال بافر WB2 در این مرحله، می‌تواند به‌عنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.

13. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در تیوب 1.5 mL (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. میزان 50 µL بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده است، به مرکز غشای ستون اضافه کنید. ستون را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB بیشتر از 20 دقیقه (یا به صورت Over-night) قبل از سانتریفیوژ کردن به طور کلی می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- اگر انکوباسیون با بافر EB را به صورت Over-night انجام می‌دهید، جهت جلوگیری از تبخیر بافر EB درب تیوب را کاملاً به وسیله پارافیلم بپوشانید.
- در مرحله الوشن انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش بازده استخراج DNA را به همراه دارد.
- استفاده کمتر از 50 µL بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما میزان DNA استخراج شده را اندکی کاهش می‌دهد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C- ذخیره نمایید.

استخراج DNA ژنومیک باکتری

مواد اختصاصی مورد نیاز در این روش

- برای نمونه‌های سوآپ: بافر PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ.
- برای باکتری‌های گرم مثبت: محلول لیزوزیم 20 mg/mL یا لیزواستافین 200 µL/mL.

آماده‌سازی نمونه

نمونه‌های سوآپ

1. بعد از نمونه‌گیری به وسیله سوآپ، آن را درون 2 mL بافر PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ قرار دهید و به خوبی تکان دهید. نمونه را به مدت 3–2 ساعت در دمای اتاق (25°C–18) انکوبه نمایید.
2. محلول را به تیوب 2 mL انتقال داده و در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. مایع رویی را بدون آسیب به رسوب سلولی دور بریزید و رسوب را در 180 µL بافر BT حل نمایید.

محیط کشت مایع

1. میزان 1 mL از کشت باکتریایی را درون میکروتیوب 2 mL ریخته و در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
2. مایع رویی را بدون آسیب به رسوب سلولی دور بریزید و رسوب را در 180 µL بافر BT حل نمایید.

محیط کشت جامد

باکتری را به‌وسیله لوپ از محیط کشت جدا کرده و در 180 µL بافر BT حل نمایید.

فرآیند

1. میزان 20 µL پروتئیناز K را به نمونه‌های آماده‌سازی شده اضافه نمایید.
2. تیوب‌ها را با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse–vortex نمایید تا محلول کاملاً همگن گردد.
4. تیوب‌ها را Short–spin کرده و در دمای 56°C به مدت 3–1 ساعت انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون تیوب‌ها را چندین 5 در فواصل زمانی مختلف Pulse–vortex نمایید.
5. میزان 400 µL بافر FL را به محلول اضافه کرده و با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse–vortex نمایید.
6. تیوب‌ها را به مدت 1 ساعت در دمای 65°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون تیوب‌ها را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse–vortex نمایید.

7. میزان 400 µL الکل ایزوپروپیل خالص سرد را افزوده و با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه Pulse-vortex نمایید.
8. مطابق پروتکل استخراج DNA از قارچ، از مرحله 7 عمل نمایید.

استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت

1. باکتری را به مدت 10 دقیقه در (7500 rpm) 5000 x g سانتریفیوژ کنید تا رسوب تشکیل شود.
2. رسوب باکتریایی را در 180 µL محلول آنزیمی مناسب حاوی لیزوزیم 20 mg/mL یا لیزواستافین 200 µL/mL حل کنید.
3. محلول را حداقل به مدت 30 دقیقه در دمای 37°C انکوبه نمایید.
4. میزان 20 µL پروتئیناز K و 400 µL بافر FL را به نمونه آماده‌سازی شده اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید.
5. محلول را به مدت 3-1 ساعت در دمای 56°C و سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 85°C انکوبه نمایید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از قارچ، از مرحله 6 عمل نمایید.

- توجه داشته باشید افزایش زمان انکوباسیون در دمای 85°C باعث تجزیه DNA خواهد شد.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نسخه جدید	1401/02
01	1. اضافه کردن نحوه آماده‌سازی نمونه از خلط. 2. اعمال تغییر در حجم ریجنت‌ها و دور سانتریفیوژ در برخی فرآیندها.	1401/05
02	1.تغییر کت نامبر ستون و کالکشن	1402/06
03	1. افزایش wb1	1404/07

شرکت دانش بنیان ویستا زیست فناوری به ژن

آدرس: شیراز، منطقه ویژه اقتصادی،فاز دوم، جنب میدان صادرات

شماره تماس: 07191009596 امور مشتریان: 09912070924

کدپستی: 7159115468 وبسایت: www.BehGene.com