BehPrep **Genomic DNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Genomic DNA

Based On Spin Column

Cat Number: BP102

Ver: 05

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

فهرست

محتویات کیت 3

شرایط پایداری و نگهداری 3

معرفی 4

حیطه کاربری 4

نکات مهم 4

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند 5

نکات ایمنی 5

آماده سازی بافرها 6

Proteinase K 6

استخراج DNA از خون و مایعات بدن 6

فرآیند 6

استخراج DNA از µL 400 خون محیطی تازه 8

فرآیند 9

استخراج DNA از خون فریز شده 9

استخراج DNA از بافی کوت 10

آماده سازی نمونه 11

فرآیند 11

استخراج DNA از سلول های دهانی 11

آماده سازی نمونه 12

فرآیند 12

چالش‌ها و راه کارها 15

کنترل کیفیت 17

تاریخچه ویرایش پروتکل 18

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش (BP102R010)	50 واکنش (BP102R050)	100 واکنش (BP102R100)	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400 pcs	دمای اتاق
BR111	GLB Buffer	3 mL	11 mL	22 mL	دمای اتاق
BR102	WB1 Buffer	7 mL	30 mL	58 mL	دمای اتاق
BR103	WB2 Buffer	13 mL	62 mL	125 mL	دمای اتاق
BR104	EB Buffer	3 mL	11 mL	22 mL	دمای اتاق
BR105	Proteinase K	1 vial (4 mg)	1 vial (20 mg)	1 vial (40 mg)	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	2 mL	دمای اتاق

شرایط پایداری و نگهداری

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

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

معرفی

کیت استخراج BehpPrep Genomic DNA با بازدهی بالا جهت استخراج DNA ژنومیک از نمونه های خون محیطی، مایعات بدن، خون فریز شده، بافی کوت و سلول های دهانی به روش ستونی طراحی شده است. DNA استخراج شده قابل برش توسط آنزیم‌های محدود کننده بوده و مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot می‌باشد.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep Genomic DNA جهت استخراج دستی DNA ژنومیک از نمونه خون و مایعات بدن به روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (25–18 °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 همگن نمایید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء 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 غشاء 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 10–100 µL و 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای GLB 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 خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه‌شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی 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.

- **توجه داشته باشید آنزیم آماده شده باید در دمای 20 °C– نگهداری شود.**

مقدار پروتئیناز K	4 mg	20 mg	40 mg
مقدار بافر PK	200 µL	1 ml	2 ml

- **توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.**

استخراج DNA از خون و مایعات بدن

- نمونه خون تازه و منجمد در این روش قابل استفاده می‌باشد.
- قبل از شروع فرآیند، نمونه منجمد را به دمای اتاق برسانید.
- جهت دستیابی به نتیجه‌ی مطلوب، توصیه می‌شود از تیوب‌های حاوی ترکیبات ضدانعقاد جهت جمع‌آوری خون استفاده نمایید.

فرآیند

1. میزان 15 µL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 200 µL از نمونه را به درون تیوب اضافه نمایید.
   اگر حجم نمونه کمتر از 200 µL است، مقدار مناسب از محلول PBS (1X) را اضافه کنید تا حجم کل به 200 µL برسد.
   نکته: در صورت در دسترس بودن نمونه، استفاده از حجم کمتر از 200 µL توصیه نمی‌شود.

2. میزان µL 200 بافر GLB را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند و به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.
3. میزان µL 300 اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
5. میزان µL 500 بافر WB1 را اضافه کرده و در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
6. میزان µL 600 بافر WB2 را اضافه کرده و در 6,000 x g (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. بار دیگر مرحله 6 را تکرار نمایید.
8. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

- توصیه می‌شود در مرحله 8 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 بعنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق بازگذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.

9. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز قرار دهید. 70µL از بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده‌است، به مرکز غشای ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

- استفاده کمتر از 70 µL بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما میزان DNA استخراج شده را اندکی کاهش می‌دهد.
- شستشوی غشاء با حجم کمتر از 50 µL بافر EB توصیه نمی‌شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می‌شود.
- میزان DNA استخراج شده به تعداد گلبول‌های سفید خونی بستگی دارد. به طور کلی بازده نهایی DNA استخراج شده 3–12 µg با کیفیت A260/280 ratio=1.8–1.9 می‌باشد.
- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB تا بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- در مرحله الوشن، انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C– ذخیره نمایید.

استخراج DNA از 400 µL خون محیطی تازه

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- تیوب 2 mL

نکات:

- در این روش از خونی که بیشتر از یک هفته نگهداری شده است استفاده نکنید.
- نمونه خون تازه را حداقل یک ساعت پس از نمونه گیری، جهت استخراج استفاده نمایید.

- این روش جهت بدست آوردن DNA با غلظت بیشتر (<200 µg/ml)بهینه‌سازی شده است.
- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت (3000–4500 Cell/µL) نیز مناسب می‌باشد.

فرآیند

1. میزان 400µL خون را در داخل تیوب 1.5 ml بریزید و با دور (8000 rpm) 6000 x g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
2. پس از سانتریفیوژ، میزان 200 µL از پلاسمای رویی را بدون برخورد نوک سرسمپلر به سطح خون جدا کرده و دور بریزید.
3. میزان 15 µL پروتئیناز K و 200 µL بافر GLB را به نمونه اضافه کرده و سپس ورتکس نمایید.
   - توصیه می‌شود بعداز هر Pulse–Vortexing تیوب هارا اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب ها جدا شود.
4. میکروتیوب را به مدت 15 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse–vortex کنید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 3 عمل نمایید.

استخراج DNA از خون فریز شده

- جهت استخراج DNA با استفاده از این روش، پیشنهاد می‌شود خون در حجم 500 µl یا 1ml فریز شود.
- راندمان استخراج DNA از خون فریز شده به دلیل لایز برخی از لوکوسیت‌ها در هنگام فریز شدن، به نسبت خون تازه می‌تواند کمتر باشد.

1. پس از خارج کردن خون از فریزر، قبل از ذوب شدن مقدار 3 برابر حجم خون، بافر(RBC Lysis (cat: BR201V100 را به خون اضافه کنید.
2. تا زمانی که بافر روی خون یخ زده قرمز شود، میکروتیوب را تکان دهید.
3. میکروتیوب را درون شیکر دورانی در 10–20 rpm قرار داده تا زمانی که خون کاملاً ذوب شود. این زمان برای 500 µL خون 5 دقیقه می‌باشد.
4. بعد از ذوب شدن کامل خون، میکروتیوب را کمی ورتکس کنید تا نمونه و بافر کاملاً ترکیب شوند.
5. میکروتیوب را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا رسوب تشکیل شود.
6. تا حد امکان مایع رویی را بدون آسیب به رسوب سلولی به وسیله سمپلر جدا کنید.
- توجه داشته باشید مایع تشکیل شده بر روی رسوب می‌تواند کاهش بازده استخراج را به همراه داشته باشد.
7. میکروتیوب را کمی ورتکس نمایید تا رسوب مجدداً حل شود و سپس میزان 200 µL بافر PBS سرد را اضافه کنید. میکروتیوب را کمی ورتکس نمایید تا زمانی که رسوب و بافر مخلوط شوند. در ادامه مطابق فرایند استخراج DNA از خون ومایعات بدن عمل نمایید.

استخراج DNA از بافی‌کوت

- در این روش از خونی که بیشتر از یک هفته نگهداری شده است استفاده نکنید.
- این روش جهت استخراج DNA با غلظت بیشتر (600µg/ml<) بهینه‌سازی شده است.
- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت (1000–3000 Cell/µL) نیز مناسب می‌باشد.

آماده‌سازی نمونه

برای جداسازی بافی‌کوت، میزان 1–3 ml خون محیطی (حاوی ترکیبات ضد انعقاد) را در 2500 x g به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ نمایید، پس از آن 3 لایه مجزا مشاهده می‌شود که به ترتیب از بالا به پایین، پلاسما، بافی‌کوت و رسوب گلبول‌های قرمز می‌باشد.

ابتدا به گونه‌ای که لایه بافی‌کوت آسیبی نبیند، پلاسما را بردارید و دور بریزید . سمپلر را روی 200 µl تنظیم کنید و به آرامی بافی‌کوت را جدا کرده و به میکروتیوب 1.5 ml انتقال دهید. نمونه را در دمای 20°C– ذخیره کرده و یا مستقیماً مطابق فرآیند زیر عمل نمایید.

فرآیند

1. میزان 15 µL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 200 µL از بافی کوت را به تیوب اضافه نمایید.
2. میزان 200 µL بافر GLB را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse–vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند و به مدت 20 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse–vortex کنید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن از مرحله 3 عمل نمایید

استخراج DNA از سلول‌های دهانی

- توجه داشته باشید به دلیل استفاده بیشتر از بافر GLB در این فرآیند، آماده‌سازی را برای تعداد نمونه‌های کمتری انجام دهید.
- برای نمونه‌گیری، سوآب را محکم به سطح داخلی گونه کشیده (6 بار)، و اجازه دهید سوآب حداقل 2 ساعت خشک شود. توجه داشته باشید فرد باید حداقل 30 دقیقه قبل ازجمع‌آوری نمونه از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن پرهیز کند.

آماده‌سازی نمونه

بدنه سوآب را به وسیله دست یا قیچی جدا کرده و آن را دریک میکروتیوب 2 mL قرار دهید. میزان 400 µL محلول PBS را به نمونه اضافه نمایید.

نکته: تخلیص همزمان RNA و DNA هنگامی که هر دو مولکول درنمونه وجود داشته باشند، امکان پذیر می‌باشد. مولکول RNA ممکن است به عنوان مهارکننده در واکنش‌های آنزیمی عمل نماید اما در فرآیند PCR اختلال ایجاد نمی‌کند. اگر DNA فاقد RNA مورد نیاز است، میزان 4 µL محلول RNase A (100 mg/mL) را قبل از افزودن بافر GLB، به نمونه اضافه نمایید.

فرآیند

1. میزان 20 µL محلول پروتئیناز K و 400 µL بافر GLB را به نمونه اضافه نمایید. بلافاصله به مدت 15 ثانیه با ورتکس شدید مخلوط نمایید.
   - برای اطمینان از مرحله لایز مؤثر، بلافاصله بعد از اضافه کردن بافر GLB، نمونه و بافر را کاملاً مخلوط کنید.
   - پروتئیناز K را مستقیماً به بافر GLB اضافه نکنید.
2. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
3. میزان 600 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید، و مجدداً به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. سپس میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب ستون جدا شوند.
4. میزان 750 µL از محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
5. مرحله قبل را با اضافه کردن باقیمانده مخلوط به ستون تکرار کنید.

6. میزان 500 µL بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. میزان 600 µL بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را با سرعت 6,000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
8. مرحله 7 را تکرار کنید.
9. توصیه می‌شود در این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.

10. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 70 µL بافر EB را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- شستشوی غشای ستون با حجم کمتر از 70 µL بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما ممکن است میزان DNA استخراج شده را اندکی کاهش دهد.
- شستشوی غشاء با حجم کمتر از 50 µL بافر EB توصیه نمی‌شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می‌شود.

- به طور کلی میزان نهایی DNA استخراج شده از یک سوآب حاوی سلول‌های بوکال، 0.5–3.5 µg در 100 µL بافر (3–23 ng/µL) با کیفیت A260/280 ratio=1.7–1.9 خواهد بود.
- به‌طورکلی افرایش زمان انکوباسیون با بافر EB تا بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- در مرحله الوشن، انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C– ذخیره نمایید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین DNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• بافر الوشن حتماً باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای60°C انجام دهید. • برای نمونه های خون کم لکوسیت از بافی کوت استفاده کنید.
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون با بافر GLB را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید.
	محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است.	• زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید. • حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید. • مقدار زیادی از نمونه خون استفاده کرده اید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.
	نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	• از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. • از نمونه خون یا مایعات بدن که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. • برای جلوگیری از فعالیت DNase، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. • نمونه‌گیری را تکرار کنید.
	عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	• مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه جدید تکرار کنید.

		• آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود. • آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید. • پس از اضافه کردن پروتئیناز K به نمونه فوراً آن را پیپتاژ کنید.
	استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول	• استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.
	مسدود شدن غشاء ستون	• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد. • قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید. • در استخراج DNA از بافی کوت، غلظت لوکوسیت‌ها در نمونه نباید بیشتر از $5x10^6$/200 µL باشد. نمونه را با PBS رقیق نموده و فرآیند استخراج را تکرار کنید. • در استخراج DNA از پلاسما، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب کرایو از چرخه انجماد-ذوب خودداری کنید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.
پایین بودن نسبت A260/A280	آلودگی پروتئینی	• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند، بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر GLB و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می شود.

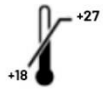
		• از عدم تماس غشای ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید. • بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید. • از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم. • به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده سازی باید در 20°C- نگهداری شود.
پایین بودن نسبت A260/A230	آلودگی نمکی	• در حین فرآیند ستون‌ها را به آرامی جا به جا کنید. • درب ستون‌ها را به آرامی باز و بسته نمایید. • از انتقال حباب‌های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. • از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.
قطعه قطعه شدن DNA	ورتکس پیاپی	• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با اتانول، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید.

کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت‌های (LOT NO.) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به‌ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرارگرفته‌است.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نسخه جدید	1401/02
01	1.اعمال تغییرات در حجم ریجنت‌ها در مرحله لایز 2.اعمال تغییرات در سرعت سانتریفیوژ در مرحله واش دوم	1401/04
02	1. اعمال تغییرات در حجم نمونه خون استفاده شده در فرآیندها 2. تغییر در استخراج DNA از 400 µL خون محیطی تازه 3. تغییر در استخراج DNA از بافی‌کوت در مرحله الوشن و آماده سازی نمونه	1402/04
03	1. تغییر در کت نامبر ستون 2. تغییر در حجم نمونه های مورد استفاده در فرایند و آماده سازی نمونه	1402/5
04	1. افزایش عملکرد پروتئیناز K و افزایش حجم PK BUFFER	1403/04
05	1.افزایش حجم WB1	1404/07

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دمایی		کاربرد تشخیصی	
تعداد تست		اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستورالعمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا		شماره سری ساخت	

شـرکت دانـش بنیـان ویسـتا زیسـت فنـاوری بـه ژن

آدرس: شـیراز، منطقـه ویـژه اقتصادی،فـاز دوم، جنـب میـدان صـادرات

شـماره تمـاس: 07191009596 امور مشتریان: 09912070924

کدپسـتی: 7159115468 وبسـایت: www.BehGene.com