BehPrep **High gDNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of High Concentration of Genomic DNA Based on Spin Column.

Cat Number: BP112

Ver: 04

- 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

RC buffer 6

استخراج DNA از خون 6

فرآیند آماده سازی 7

استفاده از 500 خون کامل 7

استفاده از 1mL خون کامل و مقدارهای بالاتر 7

بافی کوت 8

فرآیند استخراج 8

چالش‌ها و راه کارها 11

کنترل کیفیت 13

تاریخچه ویرایش پروتکل 14

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش (BP112R010)	50 واکنش (BP112R050)	100 واکنش (BP112R100)	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400 pcs	دمای اتاق
BR150	G1 Buffer	4mL	16 mL	32 mL	دمای اتاق
BR151	B1 Buffer	4mL	20mL	40ml	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	4 mg	20 mg	40 mg	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	2 mL	دمای اتاق
BR147	RC buffer 10x	6mL	30mL	60mL	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.

درصورت رویت رسوب حاصل از نگهداری در دمای پایین، 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 2–8 °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 BehPrep High gDNA جهت استخراج DNA در مقادیر بالا و غلظت بالا (تا مقدار 70 µg و تا غلظت 1000 ng/µl) طراحی و بهینه سازی شده است. DNA استخراج شده توسط این کیت جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot مناسب می‌باشد. با توجه به غلظت بالای DNA استخراج شده توسط این کیت، استفاده از آن جهت تست هایی مانند HLA-typing که نیازمند مقدار بالایی از DNA است، پیشنهاد می شود.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep High gDNA جهت استخراج دستی DNA ژنومیک از نمونه خون در مقادیر و غلظت بالا به روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

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 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.
- عدد rpm برای سانتریفیوژهای مختلف ممکن است متفاوت باشد. جهت تبدیل دقیق عدد g به rpm، می توانید از ماشین حساب موجود در سایت behgene.com استفاده نمایید.

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)
- فالکون 15 mL
- ورتکس
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL
- آب مقطر سترون

نکات ایمنی

- بافرهای G1 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

RC buffer

بافر RC به صورت 10X در داخل کیت قرار داده شده است. لطفاً میزان مورد نیاز را با استفاده از آب مقطر سترون به صورت 1x آماده کنید
(به ازای هر 1 mL RC buffer 10x میزان 9 mL آب مقطر استفاده کنید).
توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

استخراج DNA از خون

در این روش از خونی که بیشتر از یک هفته نگهداری شده است استفاده نکنید.
این روش جهت استخراج DNA با میزان بالا (تا 70 میکروگرم) بهینه‌سازی شده است.

این روش بر اساس نمونه های دارای شمارش لکوسیتی نرمال بهینه سازی شده است. برای نمونه های با شمارش بالاتر یا پایین تر از میزان نرمال، غلظت نمونه استخراج شده می تواند بالاتر یا پایین تر باشد.
مقادیر بیشتر از میزان توصیه شده برای نمونه اولیه باعث مهار واکنش ها و کاهش غلظت می شود.

این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت (1000–3000 Cell/µL) با استفاده از مقدار 2ml خون نیز مناسب می‌باشد.

فرآیند آماده سازی

استفاده از 500 خون کامل

1. میزان 500 µL خون کامل را درون میکروتیوب ریخته سه برابر حجم خون (1.5 ml) بافر RC buffer 1x اضافه نموده و به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.
2. میکروتیوب را با سرعت 3000 x g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید و سپس بدون جدا شدن رسوب سلولی، مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه مطابق با فرایند استخراج، عمل نمایید.

استفاده از 1 mL خون کامل و مقدارهای بالاتر

1. میزان 1 ml خون کامل را درون فالکون ریخته سه برابر حجم خون (3 ml) بافر RC buffer 1x اضافه نموده و به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.(درصورتی که از 2 mL خون استفاده می‌کنید،میزان 6 mL بافر RC 1x مورد نیاز است.)
2. فالکون را با سرعت 3000 x g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید و سپس بدون جدا شدن رسوب سلولی، مایع رویی را خارج کنید. با استفاده از سمپلر باقی مانده مایعی که بر روی رسوب سلولی مانده است را، با رسوب سلولی کاملا حل کنید و سپس محتویات را به تیوب 1.5 mL انتقال دهید. با سرعت

3000 x g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید و سپس بدون جدا شدن رسوب سلولی، مایع رویی را کاملا خارج کنید.

3. در ادامه مطابق با فرایند استخراج، عمل نمایید.

بافی کوت

نکته: با توجه به اینکه میزان سلول جداشده از بافی کوت وابسته به نحوه برداشت آن می باشد، می تواند متفاوت باشد و امکان جداسازی تمام سلول های موجود در لایه بافی کوت وجود ندارد به این دلیل غلظت به دست آمده در نمونه های بافی کوت عموما کمتر از نمونه خون مستقیم است از این رو پیشنهاد می شود در صورت امکان از نمونه خون مستقیم استفاده شود.

1. مقدار 2–10 mL خون را با سرعت 3000 x g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس با استفاده از سمپلر 500 µL از لایه بافی کوت را جدا کنید و به میکروتیوب منتقل کنید.
2. مقدار 3 برابر حجم بافی کوت (1.5 ml) از بافر RC Buffer1x را به نمونه بافی کوت اضافه کرده و ورتکس نمایید. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا ظاهر محلول از کدر به شفاف تبدیل شود.
3. نمونه بافی کوت لایز شده را به مدت 3 دقیقه در 3000 x g سانتریفیوژ کنید تا رسوب سلولی تشکیل شود. سپس مایع رویی را دور بریزید.
4. در ادامه مطابق با فرایند استخراج، عمل نمایید

فرآیند استخراج

1. میزان 15 µL پروتئیناز K و 300 µl بافر G1 را به تیوب نمونه اضافه کنید و به پیپتاژ کردن کاملاً مخلوط نمایید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

2. میکروتیوب را 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 350 µL بافر B1 را به نمونه اضافه کنید و به مدت 10 ثانیه بطور آهسته پیپتاژ 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 (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
5. میزان 500 µL بافر WB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g 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 600 µL بافر WB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g 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 7 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. میزان 70–140µL 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.
- میزان DNA استخراج شده به تعداد گلبول‌های سفید خونی بستگی دارد. به طور کلی بازده نهایی DNA استخراج شده 20–50 µg از هر 1 ml خون با کیفیت A260/280 ratio = 1.8 – 1.9 می‌باشد.
- به طور کلی 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 حتما باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید. • برای نمونه های خون کم لکوسیت از بافی کوت استفاده کنید.
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون با بافر G1 را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید.
	نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	• از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. • از نمونه خون یا که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزرقرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. • برای جلوگیری از فعالیتDNase ، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. • نمونه گیری را تکرار کنید.
	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 را 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.
	عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	• مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه تازه 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 عمل ورتکس را انجام دهید.
	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. • 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. •
	آلودگی پروتئینی پایین بودن نسبت A260/A280	• 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 B1 اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود. • از عدم تماس غشاء 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.. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم. به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K

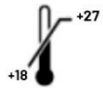
		بعد از آماده‌سازی باید در 20°C- نگهداری شود.
پایین بودن نسبت A260/A230	آلودگی نمکی	• در حین فرآیند ستون‌ها را به آرامی جا به جا کنید. • درب ستون‌ها را به آرامی باز و بسته نمایید. • از انتقال حباب‌های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. • از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.
قطعه قطعه شدن DNA	ورتکس پیاپی	• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با بافر B1، 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	1402/08
01	• افزایش عملکرد پروتئیناز K و افزایش حجم PK buffer	1403/04
02	• تغییر حجم نمونه خون به 500µL	1403/06
03	• تغییر و بهینه سازی زمان انکوباسیون در مراحل فرآیند استخراج • تغییر و بهینه سازی فرآیند آماده سازی بافی کوت • تغییر و بهینه سازی در چالش ها و راهکارها	1403/08
04	• 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