BehPrep **Amniotic Fluid DNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of DNA From Low Cell Number Samples
Based on Spin Column

Cat Number: BP124

Ver: 02

- 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 5

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند 5

نکات ایمنی 6

آماده سازی بافرها 6

Proteinase K 6

Binding Buffer 6

فرایند 7

روش ستونی 7

روش رسوبی 9

آماده سازی نمونه سلول های دهانی 11

فرایند 11

چالش‌ها و راه کارها 12

کنترل کیفیت 14

تاریخچه ویرایش پروتکل 15

محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	10 واکنش BP124R010	50 واکنش BP124R050	100 واکنش BP124R100	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400pcs	دمای اتاق
BR156	AF Buffer	3 mL	12 mL	24 mL	دمای اتاق
BR157	PR Buffer	2 mL	7 mL	14 mL	دمای اتاق
BR154	Binding Buffer	4 mL	12 mL	24 mL	دمای اتاق
BR102	WB1 Buffer	7 mL	30 mL	58 mL	دمای اتاق
BR103	WB2 Buffer	13 mL	45 mL	75 mL	دمای اتاق
BR104	EB Buffer	3 mL	11 mL	22 mL	دمای اتاق
BR105	Proteinase k	1 vial (8 mg)	1 vial (40mg)	2 vial (40mg)	بعد از آماده سازی 20°C_
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	2*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 آن ها 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 آن ها 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 ستونی BehPrep Amniotic Fluid DNA Extraction Kit با بازدهی بالا جهت خالص سازی DNA از نمونه های کم سلول مانند مایع آمنیوتیک ،CSF و سلول های دهانی (Buccal Cell) طراحی شده است. در این کیت استخراج DNA با دو روش ستونی و رسوبی انجام می گیرد. با توجه به کم سلول بودن این نوع نمونه ها و چالش در میزان غلظت جهت انجام تست های مربوطه، بکارگیری بافر لایز قوی و متد مناسب در این کیت موجب عملکرد عالی این محصول در استخراج DNA از این نمونه ها شده است. میزان DNA استخراج شده با توجه به نوع نمونه و مقدار آن متفاوت است اما به طور کلی بازدهی DNA استخراج شده توسط این کیت از 1–5mL نمونه 1–5 µg می باشد. DNA استخراج شده توسط این کیت جهت استفاده در توالی یابی، PCR ، qPCR، array–SNP and array–CGH و دیگر تست های مولکولی کاربرد دارد.

حیطه کاربری

کیت استخراج ستونی Behprep Amniotic Fluid DNA Extraction جهت استخراج دستی DNA از نمونه هایی با مقدار سلول کم(10^3–10^6 / ml سلول)، 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.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند

- سمپلر 10–100 µL و 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase–free)
- میکروتیوب 2 mL (RNase, DNase–free)
- ورتکس
- اتانول 70% (بصورت سرد در استخراج رسوبی استفاده شود)
- اتانول 100%
- ایزوپروپانول (بصورت سرد در استخراج رسوبی استفاده شود)
- ترموبلاک (دمای 56 °C ، 60°C, 70° C)
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای Binding، AF 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 پروتئیناز k آماده شده باید در دمای 20 °C– نگهداری شود.**

مقدار پروتئیناز K	4 mg	40 mg	2*40 mg
مقدار بافر PK	400µl	2 mL	2*2mL

Binding Buffer

مقدار مناسب اتانول 100 یا 96 درصد را مطابق جدول زیر به بطری حاوی Binding Buffer اضافه کرده و پس از بستن درب بطری به مدت 20 ثانیه به خوبی مخلوط کنید. Binding Buffer آماده مصرف می‌باشد.

(توجه داشته باشید به منظور جلوگیری از رسوب بافر، آن را در دمای اتاق نگه دارید)

مقدار Binding Buffer	4 mL	12 mL	24 mL
مقدار اتانول	7 mL	21 mL	42 mL

سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

فرایند

روش ستونی

1. میزان 1 تا 5 mL از نمونه (CSF، مایع آمنیوتیک یا 50000–150000 سلول از مایع آمنیوتیک کشت داده شده در حالت سوسپانسیون) را درون یک میکروتیوب یا فالکن تمیز بریزید.
   - **توجه:** بازدهی از مایع آمنیوتیک با توجه به هفته بارداری متفاوت است.
2. میکروتیوب را در دور 13000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط و بدون برهم خوردن رسوب سلولی مایع رویی را دور بریزید.
   - در صورت در دسترس بودن مقادیر بیشتر نمونه اولیه می توانید مرحله 1 و2 را در جهت افزایش بازدهی تکرار کنید.
3. میزان 40 µL پروتئیناز K و 200 µL بافر AF را به رسوب اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه نمایید. درطول زمان انکوباسیون، تیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.
   - در صورت زیاد بودن میزان سلول از نمونه، جهت لایز بهتر و افزایش غلظت می توانید زمان انکوباسیون را تا 1 ساعت افزایش دهید.
5. میزان 500 µL بافر Binding Buffer را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطعات مایع از درب تیوب جداشوند.
6. 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.

7. میزان µL 500 بافرWB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) g x 6000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
8. میزان µL 600بافرWB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) g x 6000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
9. 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 .

- هرگونه انتقال بافر WB2 در این مرحله می‌تواند به‌عنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند .
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2به 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. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز قرار دهید. میزان µL 30–20 از بافر EB را که از قبل در دمای 60 °C گرم شده است، به مرکز غشا ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و 10 دقیقه در دمای 60°C انکوبه نمایید. سپس در13000rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
11. **به منظور افزایش بازده استخراج DNA، می توان محلول الوشن جمع آوری شده را مجددا روی همان ستون اضافه کرده و تحت همان شرایط الوشن سانتریفیوژ نمایید.**

- میزان DNA استخراج شده از مایع آمنیوتیک به نمونه و هفته بارداری بستگی دارد. به طور کلی بازده نهایی DNA استخراج شده µg 5–1 با کیفیت A260/280 ratio=1.8–1.9 می‌باشد.

روش رسوبی

1. میزان 1 تا 5 mL از نمونه (CSF، مایع آمنیوتیک و یا 50000–150000 سلول از مایع آمنیوتیک کشت داده شده در حالت سوسپانسیون) را درون یک میکروتیوب یا فالکن تمیز بریزید.

توجه: بازدهی استخراج از مایع آمنیوتیک با توجه به هفته بارداری متفاوت است.

2. میکروتیوب را در دور rpm13000 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط و بدون برهم خوردن رسوب سلولی مایع رویی را دور بریزید.

- در صورت در دسترس بودن مقادیر بیشتر نمونه اولیه پیشنهاد می شود مرحله 1 و2 را در جهت افزایش بازدهی تکرار کنید.

3. میزان µL 20 پروتئیناز K و µL 200 بافر AF را به رسوب اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse–vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه نمایید. درطول زمان انکوباسیون، تیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse–vortex کنید.

- در صورت زیاد بودن میزان سلول از نمونه، جهت لایز بهتر و افزایش غلظت می توانید زمان انکوباسیون را تا 1 ساعت افزایش دهید.

5. میزان µL 100 بافر PR Buffer را به میکروتیوب اضافه کنید به مدت 20 ثانیه Pulse–vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند سپس به مدت 10 دقیقه بر روی یخ انکوبه کنید.
6. میکروتیوب را در دور rpm13000به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید. در این مرحله با احتیاط و بدون کشیدن رسوب تشکیل شده مایع رویی را جدا کنید و به میکروتیوب تمیز دیگر منتقل کنید.

7. میزان µL 500 بافر ایزوپروپانول (سرد) را به نمونه (مایع جدا شده) اضافه کنید و تیوب را به آرامی چندین بار سر و ته کنید. تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را در دور rpm 14000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. مایع درون میکروتیوب را به آرامی دور بریزید.
8. میزان µL 300 اتانول 70% (سرد) را به میکروتیوب اضافه کنید و تیوب را به آرامی چندین بار سر و ته کنید تا کاملا مخلوط شوند. . میکروتیوب را در دور rpm 14000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. (در این مرحله رسوب کوچکی از DNA قابل مشاهده است. خارج کردن مایع رویی را به گونه ای انجام دهید که رسوب جدا نشود.)
9. مرحله 8 را دوباره تکرار نمایید. در این مرحله سعی کنید که بدون آسیب به رسوب DNA تمام مایع رویی را خالی کنید.
10. میکروتیوب به مدت 10 تا 15 دقیقه با درب باز در دمای محیط انکوبه کنید تا اتانول به طور کامل تبخیر شود.
11. میزان µL 30 از بافر EB را که از قبل در دمای °C 60 گرم شده است را به میکروتیوب اضافه کنید و 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. به مدت 10 دقیقه در دمای °C 60 قرار دهید. درطول زمان انکوباسیون، تیوب را چندین مرتبه Pulse-vortex نمایید.

غلظت و خلوص DNA استخراج شده (OD 260/280, 260/230) را با استفاده از دستگاه نانودراپ یا اسپکتروفتومتر سنجش نمایید.

- DNA استخراج شده را در دمای °C 20- ذخیره نمایید.

آماده سازی نمونه سلول های دهانی

1. برای نمونه‌گیری، سوآب را به سطح مخاط دهان کشیده و 15–10 بار تکرار کنید. توجه داشته باشید فرد باید حداقل 30 دقیقه قبل از جمع‌آوری نمونه از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن پرهیز کند.
2. سر سوآب را به وسیله دست یا قیچی جدا کرده و آن را دریک میکروتیوب mL 1.5 قرار دهید.

فرایند

1. میزان µL 20 محلول پروتئیناز K و µL 200 بافر AF را به نمونه اضافه نمایید. بلافاصله به مدت 15 ثانیه به وسیله ورتکس شدید مخلوط نمایید. (ورتکس باید به صورتی انجام شود که سلول های متصل به سوآب به داخل بافر آزاد شود)
2. میکروتیوب را به مدت 30 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه نمایید. درطول زمان انکوباسیون، تیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.

- در صورت زیاد بودن میزان سلول از نمونه، جهت لایز بهتر و افزایش غلظت می توانید زمان انکوباسیون را تا 1 ساعت افزایش دهید.

3. سپس میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 70 °C انکوبه نمایید.
4. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در 13000 Rpm سانتریفیوژ کنید. با احتیاط محلول رویی را درون یک میکروتیوب mL 2 جدید بریزید.
5. در ادامه مطابق با روش ستونی، از مرحله 5 ادامه دهید.
6. توجه کنید میزان EB استفاده شده در این تست **70µl** می باشد.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین DNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• با مقدار بیشتر نمونه تست را دوباره تکرار کنید. • بافر الوشن حتما باید به تمام نقاطی که احتمالا DNA رسوب کرده است تماس پیدا کند. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید.
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون 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 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 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.
	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. • 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 و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن 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.

		• 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. • اتانول 70% حتما باید به تمام نقاطی که احتمالا DNA رسوب کرده است تماس پیدا کند.
قطعه قطعه شدن DNA	ورتکس پیاپی	• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با binding buffer ، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید. • از نمونه نگهداری شده با مدت زمان زیاد استفاده نکنید.

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	
01	افزایش حجم WB1	1404/07
02	1. حذف یک مرحله از WB2 2. افزایش مقدار پروتئیناز K 3. تغییر فرمولاسیون در بافر	1405/01

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