

CedExtra purification Kit (100 prep)

(From Blood, Plasma, Serum, Buffy coat, Stool, Cell culture, Tissue and FFPE)

موارد مصرف:

این کیت جهت استخراج DNA/RNA انسانی، ویروسی، باکتریایی و قارچی با خلوص بالا از نمونه خون و بافی کوت، مایعات بدن، مدفوع، سیتولوژی، کشت سلولی و انواع نمونه های بافتی طراحی شده است.

اساس و ویژگی ها:

این کیت استخراج بر پایه ستون سیلیکا می باشد. بافر لایز این کیت محتوی دترجنت، گوانیدین ایزوتیوسیانات و بافر تریس می باشد. محلول های مرحله شستشوی این کیت حاوی گوانیدین هیدروکلراید می باشد. DNA استخراج شده می تواند برای اهداف مختلف از جمله هیبریداسیون معکوس و انواع روش های مبتنی بر PCR استفاده شود.

محتوای کیت:

محتویات	مقدار	شرایط نگهداری
Lysis Buffer (LB)	22 ml	دمای اتاق 15-25 °C
Tissue Lysis Buffer (TL)	22 ml	
Binding Buffer (BB)	50 ml	
Wash Buffer1 (WB1)	40 ml	
Wash Buffer2 (WB2)	12.5 x 2 ml	
Elution Buffer (EB)	30 ml	
Column	50 x 2	4°C
Collection tube	100 x 2	
Proteinase K	2 x 1.2ml	

شرایط نگهداری:

این کیت در دمای اتاق و دور از تابش مستقیم نور آفتاب به مدت دو سال پایدار می باشد.

مواد و دستگاه های مورد نیاز:

Adjustable Volume Pipette
Biosafety cabinet
Vortex spin
Nuclease free filter tips
Desktop micro centrifuge (14,000 x g)
RNAse free sterile micro tube
Biohazard waste container
Absolut ethanol
Single-use glove

هشدار و اقدامات احتیاطی:

- این دستورالعمل برای پرسنل آموزش دیده برای انجام آزمایشات مولکولی تدوین شده است. لطفاً قبل از شروع کار، دستورالعمل با دقت خوانده شود.
- نمونه ها باید به عنوان مواد عفونی بالقوه در نظر گرفته شوند و در زیر هود لامینار آماده سازی شوند.
- به تاریخ انقضا کیت توجه شود.
- همیشه از نوک سمپلر فیلتردار استفاده شود.

احتیاط: محلول های سفید کننده یا اسیدی را مستقیماً به پسماندهای آماده سازی نمونه اضافه نکنید.

بافر LB، TL و WB1

حاوی: SDS / گوانیدین ایزوتیوسیانات.

هشدار! در صورت بلعیدن یا استنشاق ممکن است مضر باشد. باعث تحریک پوست و سوزش جدی چشم می شود و ممکن است باعث یک واکنش حساسیت پوستی شود. در صورت ادامه تحریک چشم، توصیه پزشکی را اعمال کنید. قبل از استفاده مجدد، لباس های آلوده را درآوردید و بشویید. از دستکش محافظ / لباس محافظ / محافظ چشم / محافظ صورت استفاده کنید.

جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه:

- نمونه های عفونی در محیط و ظرف انتقال مخصوص به آزمایشگاه منتقل شده و کار با ملاحظات ایمنی زیستی انجام شود.
- نمونه ها می توانند بلافاصله استخراج شوند یا بسته به ماهیت نمونه در دمای محیط، یخچال یا -۲۰ درجه نگهداری شوند.

آماده سازی محلول ها قبل از شروع کار:

۲۷ میلی لیتر اتانول به WB1 اضافه شود.

۶۵ میلی لیتر اتانول به WB2 اضافه شود.

* اتانول مطلق یا ۹۶٪

آدرس: انتهای یادگار امام، جنب مجتمع ورزشی میلاد، ساختمان قدس، واحد تولید کیت های تشخیص.

تلفن: ۰۲۱ - ۸۸۶۳۳۷۰۵ - فکس: ۰۲۱

تلفن: ۰۲۱ - ۸۸۶۳۳۷۰۵

ایمیل: Info@Darmanegar.com

وب سایت: www.Darmanegar.com

روش کار:

نمونه خون، مایعات بدن (CSF, Synovial, Pleura & Urine) مدفوع، اسپرم و سیتولوژی (پاپ اسمیر)

آماده سازی نمونه

جهت استخراج نمونه خون، ویال CBC را توسط میکسر هماتولوژی یا با چندین بار سر و ته کردن، به خوبی مخلوط نمایید.

نمونه‌های خون خشک شده بر روی کاغذ گاتری، ابتدا کاغذ نمونه را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک (NaCl 0.9%) قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. در ادامه به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کرده، کاغذ گاتری را خارج کرده و از محلول داخل تیوب جهت استخراج استفاده کنید.

در مواردی که نمونه مایعات بدن رقیق می باشد و تعداد سلول بسیار کم است، به مقدار ۱.۵ میلی لیتر از حجم نمونه را برداشته و داخل میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته و و پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی را دور ریخته و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه کرده و جهت استخراج استفاده کنید.

نمونه‌های سیتولوژی دهانه رحم Liquid-based cytology (LBC)، یا موارد مشابه مانند Self-Sampling، ظرف حاوی نمونه را به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کرده تا سلول ها از براش یا پد نمونه گیری جدا شوند، ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته و ۶۰۰ میکرولیتر به آن بافر PBS یا تریس یا سرم فیزیولوژی اضافه کنید. به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور بریزید. ۶۰۰ میکرولیتر بافر PBS به رسوب سلولی اضافه کرده، به مدت ۵ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور بریزید. ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس به رسوب اضافه کرده و جهت استخراج استفاده کنید.

به اندازه یک میلی متر مکعب نمونه مدفوع را برداشته و ۱ میلی لیتر اتانل ۹۶٪ را به آن اضافه کرده، ۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و دوباره این مرحله را تکرار کنید. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر بافر PBS یا تریس یا سرم فیزیولوژی به تیوب اضافه کرده، ۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور (بیشتر از ۱۳۰۰۰) سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و دوباره این مرحله را تکرار کنید.

محلول رویی را دور ریخته ، ۲۰۰ میکرولیتر بافر به رسوب اضافه کرده و جهت استخراج استفاده کنید.

۱- ۲۰۰ میکرولیتر محلول لایز (Lysis Buffer (LB) را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتری محتوی ۲۰۰ میکرولیتر نمونه (آماده شده طبق دستورالعمل بالا) اضافه نمایید. در ادامه ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه کرده و به مدت ۵ ثانیه ورتس و اسپین نمایید.

۲- ۲۰ دقیقه بر روی هات پلیت یا ترمومیکسر (۴۰۰ دور در دقیقه) در دمای ۵۶ درجه قرار داده، در انتها به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۳- ۴۰۰ میکرولیتر بافر (Binding Buffer (BB) به مخلوط لایز و نمونه اضافه کرده، به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۴- ۸۰۰ میکرولیتر محتوی تیوب لایز را به داخل ستون قرار گرفته در تیوب جمع آوری، انتقال داده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

*در مواردیکه به دلیل کهنه بودن نمونه خون، محلول لایز پس از سانتریفیوژ به طور کامل از ستون رد نشده باشد، مجدداً تیوب را در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

۵- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر بافر WB1 را اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

* در این مرحله لایه کاغذی ستون می‌بایست عاری از بقایای هموگلوبین شده باشد، در مواردیکه به هر دلیلی هنوز لایه کاغذی قهوه ای رنگ به نظر می‌رسد، مرحله ۵ را تکرار کنید.

۶- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر بافر WB2 را اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

۷- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۵۰ میکرولیتر بافر WB2 را اضافه نموده و مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ نمایید

۸- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به مدت ۱ دقیقه در حداکثر دور (بیشتر از ۱۳۰۰۰) ، سانتریفیوژ نمایید.

۹- ستون را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتر قرار داده و به آن ۱۰۰ میکرولیتر بافر (Elution Buffer (EB) اضافه نموده و یک دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. در ادامه به مدت ۱ دقیقه در حداکثر دور، سانتریفیوژ نمایید.

۱۰- محلول حاصله برای تمامی واکنش‌های مولکولی قابل استفاده بوده و در صورت انجام آزمایش در آینده، در دمای ۲۰ C- نگهداری گردد.

نمونه های بافتی:

۸- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر

بافر WB2 را اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ نمایید.

۹- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۵۰ میکرولیتر بافر WB2 را اضافه نموده و مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g، سانتریفیوژ نمایید.

۱۰- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به مدت ۱ دقیقه در حداکثر دور (بیشتر از ۱۳۰۰۰)، سانتریفیوژ نمایید.

۹- ستون را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتر قرار داده و به آن ۱۰۰ میکرولیتر بافر Elution Buffer (EB) اضافه نموده و یک دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. در ادامه به مدت ۱ دقیقه در حداکثر دور، سانتریفیوژ نمایید.

۱۰- محلول حاصله برای تمامی واکنش های مولکولی قابل استفاده بوده و در صورت انجام آزمایش در آینده، در دمای 20°C - نگهداری گردد.

* علاوه بر روش استاندارد (نرخ بازیابی حدود ۷۰-۹۰٪)، تغییرات دیگری برای افزایش بازده، غلظت و راحتی امکان پذیر است. برای هر کدام از مراحل زیر از بافر Elution که از قبل تا دمای ۷۰ درجه سانتیگراد گرم شده است می توانید استفاده کنید:

- **بازده بالا:** دو مرحله Elution با حجم مشخص شده در پروتکل را بصورت جداگانه انجام دهید. حدود ۹۰ تا ۱۰۰ درصد از اسید نوکلئیک متصل به رزین را می توان استحصال کرد.

- **غلظت بالا:** یک مرحله Elution را با ۴۰ لاندا انجام دهید. غلظت DNA تقریباً ۳۰ درصد بیشتر از Elution استاندارد خواهد بود.

- **بازده بالا و غلظت بالا:** نصف حجم بافر Elution را اعمال کنید، به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید و سانتریفیوژ کنید. نصف دیگر از بافر Elution را اعمال کنید، انکوبه کنید و دوباره سانتریفیوژ کنید. در این شرایط، حدود ۸۵ تا ۱۰۰ درصد از اسید نوکلئیک متصل شده در حجم Elution استاندارد با غلظت بالا بدست می آید.

توصیه می شود:

* در مورد استخراج اسید نوکلئیک ویروس هپاتیت B زمان انکوباسیون مرحله لایز را به نیم ساعت افزایش دهید.

* جهت استخراج بهینه مایکوباکتریوم ها و باکتری های گرم مثبت، قبل از شروع فرایند استخراج، (بسته به نوع آماده سازی اولیه نمونه) ۲۰ میکرولیتر از محلول Lysozyme (10 mg/mL) را به نمونه اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. استخراج این نمونه ها بر اساس پروتکل استخراج نمونه های بافتی انجام شود.

* استخراج اسید نوکلئیک نمونه های قارچی بر اساس پروتکل استخراج نمونه های بافتی انجام شود.

- در مورد نمونه های بافتی فیکس شده یک قطعه به ابعاد یک میلی متر از بافت را جدا کرده و توسط تیغ بیستوری بر روی لام شیشه ای ریز ریز کرده و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید. - در مورد بلوک های بافتی پارافینه FFPE، ۱ برش ۵ میکرونی از بافت تهیه کرده و داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار دهید. ۱ میلی لیتر زایلین را به آن اضافه کرده، ۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور سانتریفیوژ کرده و محلول روویی را دور ریخته و دوباره این مرحله را تکرار کنید. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر اتانل مطلق را به تیوب محتوی بافت اضافه کرده، ۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. به مدت ۳۰ ثانیه در حداکثر دور (بیشتر از ۱۳۰۰۰) سانتریفیوژ کرده و محلول روویی را دور ریخته و دوباره این مرحله را تکرار کنید. محلول روویی را دور ریخته، میکروتیوب را بر روی هات پلیت ۵۶ درجه قرار دهید تا اتانل باقی مانده تبخیر شود.

۱- ۲۰۰ میکرولیتر محلول لایز Tissue Lysis Buffer (TL) را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتری محتوی نمونه (آماده شده طبق دستورالعمل بالا) اضافه نمایید. در ادامه ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه کرده و به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۲- به مدت ۱ ساعت تا ۲۴ ساعت بر روی ترمومیکسر (۴۰۰ دور در دقیقه) در دمای ۵۶ درجه قرار دهید. در صورت استفاده از هات پلیت هر ۲۰ دقیقه به تناوب به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید تا بافت کاملاً هضم شود.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر محلول لایز Lysis Buffer (LB) به مخلوط لایز TL و نمونه اضافه کرده، به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۴- ۱۰ دقیقه بر روی ترمومیکسر (۴۰۰ دور در دقیقه) یا هات پلیت در دمای ۵۶ درجه قرار داده، در انتها به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۵- ۴۰۰ میکرولیتر بافر Binding Buffer (BB) به مخلوط لایز و نمونه اضافه کرده، به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۶- ۸۰۰ میکرولیتر محتوی تیوب لایز را به داخل ستون قرار گرفته در تیوب جمع آوری، انتقال داده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ نمایید.

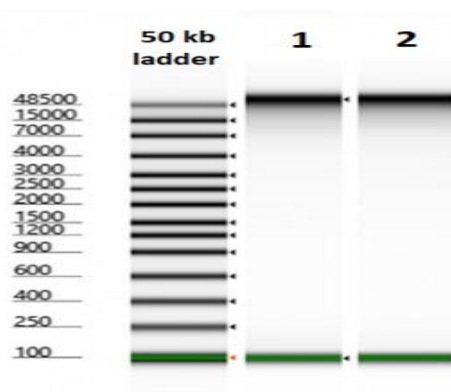
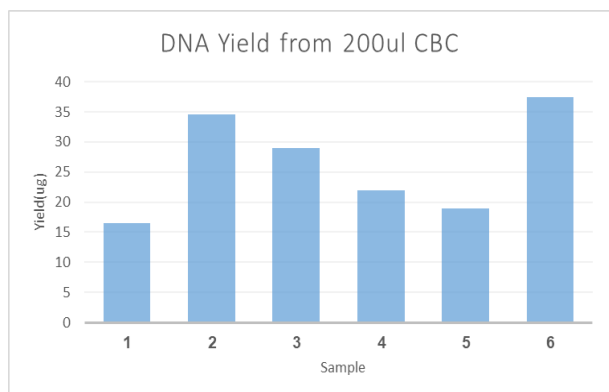
۷- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر بافر WB1 را اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

رفع مشکلات احتمالی

مشکل مشاهده شده	علل احتمالی	توصیه	
بازده و خلوص پایین اسید نوکلئیک	ذخیره کیت در شرایط نامناسب	کیت را پس از تحویل در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.	
	ذخیره بافرها یا دیگر معرف ها در شرایط نامناسب	تمام بافرها را در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. جهت حفظ pH، پایداری و ممانعت از آلودگی پس از هر بار استفاده، درب تمام بطری های معرف ها را محکم ببندید. معرف های کیت را در دمای توصیه شده در دستورالعمل نگهداری کنید.	
	اتانل به بافر شستشوی ۱ و ۲ اضافه نشده است.	قبل از استفاده، اتانول مطلق را به بافرها اضافه نمایید. پس از افزودن اتانول، بافرها را خوب مخلوط کرده و در محل مناسب (۱۵ تا ۲۵) درجه سانتی گراد نگهداری نمایید. روی ویال Wash Buffer 1,2 برچسب یا علامت بزنید (برای نشان دادن اینکه آیا اتانل اضافه شده است یا نه).	
	معرف ها و نمونه ها کاملاً مخلوط نشده اند.	پس از افزودن هر معرف، محتوی تیوب را کاملاً مخلوط کنید.	
	نمونه خون منجمد پس از ذوب به درستی مخلوط نشده است.	خون یخ زده را در دمای اتاق ذوب کرده و با معکوس کردن لوله به آرامی خون را مخلوط کنید.	
	لیز ناقص	۲۰ لاند پروتیناز K مجدداً به نمونه اضافه کرده و ورتکس کنید. تا لیز کامل صبر کنید. (حداکثر تا ۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه)	
	Binding Buffer به مخلوط لیز اضافه نشده است.	قبل از افزودن مخلوط لیز به ستون سیلیکا، مخلوط لیز را به طور کامل با Binding Buffer مخلوط کنید.	
	شستشوی ناکافی	پس از مرحله Wash Buffer 2 ستون را دوباره با ۶۰۰ لاند اتانل مطلق یا ۹۶٪ شستشو دهید.	
	مواد ژل مانند در الوشن	نمونه خون کهنه است.	مواد ژل مانند را با سانتریفیوژ بردارید. توصیه می شود از خون تازه استفاده کنید. از NaOH ۸ میلی مولار به عنوان بافر شستشو استفاده کنید.
	بازیابی کم اسیدهای نوکلئیک به علت Elution Buffer	از معرف غیر بهینه برای Elution استفاده شده است. برای Elution بهینه PH قلیایی مورد نیاز است.	از آب مقطر برای شستشوی اسیدهای نوکلئیک از ستون استخراج استفاده نکنید. از Elution Buffer کیت استفاده شود.
شستشوی ناقص توسط Elution Buffer		مرحله آگیری (۷) انجام نشده است. مرحله آگیری تکرار شود. از Elution Buffer سرد استفاده نشود.	
		Elution Buffer حداقل به مدت ۱ دقیقه انکوبه شود. انکوباسیون تا ۵ دقیقه تاثیر بیشتری می تواند داشته باشد. ترجیحاً از Elution Buffer گرم (۷۰ درجه سانتیگراد) استفاده شود.	
عملکرد ضعیف ستون استخراج	شرایط نگهداری نامناسب، ستون دچار شده است.	۱۰۰ لاند محلول سود NaOH ۳ مولار را داخل ستون استخراج ریخته و به مدت ۱ دقیقه در دور 10000g سانتریفیوژ نمایید. ۱۰۰ لاند آب مقطر به ستون استخراج ریخته و به مدت ۱ دقیقه در دور 10000g سانتریفیوژ نمایید. پس از این تیمار، ستون تا ۶ ساعت پایدار است، بعد از این زمان قابل استفاده نیست.	
عملکرد ضعیف در نمونه بافت	هضم ناقص توسط پروتیناز K	بافت را به قطعات کوچک برش دهید.	
		آماده سازی بافت بر طبق پروتکل انجام شود.	
		زمان انکوباسیون با پروتیناز K به یکی از دو روش افزایش دهید: - بافت را با پروتیناز K در طول شب انکوبه کنید. در این بازه حداقل ۳ بار ورتکس نمایید. - به مدت ۳ تا ۴ ساعت با (۳۰ میکرولیتر) پروتیناز K انکوبه کرده، سپس (۲۰ میکرولیتر) پروتیناز K اضافه کنید و ۱ تا ۲ ساعت دیگر انکوبه کنید.	

کنترل کیفیت

جهت ارزیابی کیفیت استخراج، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه های خون (CBC) حاوی تعداد متفاوت سلول سفید، توسط کیت استخراج Cedbio مورد بررسی عملکردی قرار گرفته است. جهت تعیین مقدار و خلوص DNA از نمونه های سلولی از اسپکتروفتومتری (OD) و جهت ارزیابی کیفیت اسید نوکلئیک با استفاده از Long Range PCR با محصول ۵۰ کیلو باز انجام شده است.



تصویر علائم هشدار و نگهداری:

	For in vitro diagnostic use		See instructions for use
	Manufacturer		Temperature limits: ... °C to ...°C
	Lot number		Expiry date
	Harmful		Corrosive

منابع:

1. Mandal, G., Das, S., & Padmanabhan, S. (2018). Development of a membrane-based method for isolation of genomic DNA from human blood. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 29(2), 46.
2. AL-SHUHAIB, S. A., & BAQUR, M. (2017). A universal, rapid, and inexpensive method for genomic DNA isolation from the whole blood of mammals and birds. *Journal of genetics*, 96(1), 171-176.
3. Koshy, L., Anju, A. L., Harikrishnan, S., Kutty, V. R., Jissa, V. T., Kurikesu, . (2017). Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Molecular biology reports*, 44(1), 97-108.
4. Chacon Cortes, D. F., & Griffiths, L. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2014(2), 1-9.