



ARAMESH BIO GENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Bacteria DNA Isolation Kit

مقدمه:

دستیابی به لیز سلولی مناسب در باکتری‌ها حائز اهمیت بوده و با توجه به نیاز به آزمایش‌های دقیق به منظر تشخیص بیماری‌های باکتریایی مثل سل، کیت Aramesh Bio Gene Bacteria DNA Isolation، روشی سریع و کارآمدی را به منظور تخلیص DNA بر اساس تکنولوژی سیلیکا را فراهم کرده است. به طور اختصار با به کارگیری آنزیم لیزوزیم، ADLB و آنزیم P.K دیواره سلولی تخلیص DNA از نمونه‌های بیولوژیکی انجام می‌شود. سپس غیرفعال سازی کامل باکتری در دمای 95 °C انجام می‌شود. با انجام دو مرحله شستشو، آلودگی‌ها حذف شده و با افزودن بافر ADEB، DNA از ستون رها می‌شود. DNA تخلیص شده دارای معیارهای با کیفیت بالا است. DNA تخلیص شده آماده استفاده برای کاربردهای بعدی خواهد بود.

محتویات:

Solution	Description	Storage	50 preps	100 preps	Solution	Description	Storage	50 preps	100 preps
ADLB	Lysis Buffer	+16 to 25°C	12.5 ml	25 ml	G solution	DNA Binding	-20°C	500 µl	1 ml
AW1 (Ready to use)	Inhibitor Removal Buffer	+16 to 25°C	25 ml	50 ml	ADEB	Elution Buffer	+16 to 25°C	5 ml	10 ml
AW2 (Ready to use)	Washing Buffer 2	+16 to 25°C	30 ml	60 ml	Lysozyme	Bacteria DNA Isolation	-20°C	9 ml	18 ml
ABB	Binding Buffer	+16 to 25°C	9 ml	18 ml	Spin column	High pure silica membrane		50 pcs	100 pcs
Proteinase K	Sample lysis and inactivation of DNase	-20°C	1.25 ml	2.5 ml	Collection tube			150 preps	300 preps

شرایط استفاده و نگهداری:

پس از دریافت کیت، Proteinase K (PK) و G Solution و Lysozyme را در مقادیر مناسب توزیع نموده و در دمای -20°C نگهداری نمایید.

Working Solution: در یک میکروتیوب 1.5 ml، 250 µl از ADLB را با 10 µl از G Solution مخلوط و یکنواخت نمایید.

آماده سازی نمونه:

۱- سرم / پلاسما :

از آنجا که روند شناسایی در این نمونه‌ها به صورت معمول صورت نمی‌گیرد، لذا استفاده از این نمونه‌ها توصیه نمی‌شود. در صورتی که نمونه مورد استفاده، سرم / پلاسما بود، مراحل زیر را انجام دهید:

نمونه‌ها را در 17,000 xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و پس از حذف سوپرناتانت روی pellet حاصل، آنزیم لیزوزیم اضافه نمایید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

۲- خون کامل (Whole Blood (EDTA))

نمونه CBC (EDTA) را در 8,000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده، سپس باقی کوت را در میکروتیوب جمع‌آوری کرده و در 17,000 xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. پس از حذف سوپرناتانت به pellet حاصل، آنزیم لیزوزیم اضافه نمایید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

۳- CSF / ادرار

نمونه را در فالتون 15 ml ریخته و در 3,000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و پس از حذف سوپرناتانت روی pellet حاصل، آنزیم لیزوزیم اضافه نمایید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

در صورتی که تجهیزات استخراج در فالتون 15 ml موجود نیست، نمونه را در یک میکروتیوب 1.5 ml ریخته و پس از حذف سوپرناتانت مجدداً نمونه را روی pellet اضافه کرده و pellet تهیه نمایید (این عمل را تا اتمام کامل نمونه انجام دهید). پس از حذف سوپرناتانت به pellet حاصل، آنزیم لیزوزیم اضافه نمایید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

۴- مغز استخوان (Bone Marrow):

مقداری از نمونه را در 17,000 xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و اریتروسیت‌ها را از محیط حذف نمایید. سپس رسوب حاصل که شامل گلبول‌های سفید می‌باشد را در آنزیم لیزوزیم حل کنید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

۵- Sputum:

ابتدا نمونه را در NALC-NaOH خنثی نمایید و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

۶- Nasopharyngeal & Oropharyngeal Swab:

پیشنهاد می‌گردد سواب آغشته به نمونه را مستقیماً در آنزیم لیزوزیم قرار داده و ۳۰ ثانیه ورتکس نموده و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید (در صورتی که بلافاصله پس از نمونه‌گیری، سواب در آنزیم لیزوزیم قرار بگیرد، نیاز به تهیه pellet نیست).



ARAMESH BIOGENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Bacteria DNA Isolation Kit

در صورتی که سواب آغشته به نمونه در PBS قرار دارد، نمونه را در 17,000 xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمایید پس از حذف سوپرناتانت به pellet حاصل، آنزیم لیزوزیم اضافه نموده و بر اساس پروتکل ادامه فرآیند استخراج را تکمیل نمایید.

مراحل انجام استخراج:

- ۱- حتماً بافر ADEB را در 75°C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.
- ۲- 250-500 µl از نمونه خلط آغشته به NALC-NaOH را در یک میکروتیوب 1.5 ml انتقال داده و به مدت ۱۰ دقیقه در 17,000 xg سانتریفیوژ کرده، سپس سوپرناتانت را به طور کامل خارج نمایید.
- ۳- 180 µl از آنزیم Lysozyme را با Pellet سلولی مخلوط و یکنواخت نمایید و به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه نمایید (انکوباسیون در Thermoblock انجام شود).
❖ زمان انکوباسیون برای استخراج MTB، ۱ ساعت است.
- ۴- میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین کرده تا قطرات در پایین آن جمع شوند، سپس 250 µl از بافر Working Solution را به همراه 25 µl از P.K به میکروتیوب اضافه کرده و ۳۰ ثانیه ورتکس شود. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در 56°C انکوبه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).
- ۵- میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین کرده تا قطرات در پایین آن جمع شوند و به مدت ۱۵ دقیقه در 95°C انکوبه نمایید (زمان انکوباسیون بیش از ۱۵ دقیقه، سبب از بین رفتن DNA می گردد).
توجه: پس از انکوباسیون در 95°C نمونه غیر فعال می شود.
- ۶- پس از انکوباسیون، اجازه دهید تا میکروتیوب به دمای محیط برسد و به صورت مختصر اسپین نموده، سپس 175 µl از ABB را به آن اضافه کرده و ۲۰ ثانیه ورتکس نمایید.
- ۷- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
- ۸- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.
- ۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 به ترتیب در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.
- ۱۰- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 به ترتیب در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.
- ۱۱- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نمایید و در 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج گردد.
- ۱۲- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50-100 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
- ۱۳- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحاً در 80°C- نگهداری نمایید.

