



Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

ARAMESH BIO GENE

Quick Guide

Tissue/ FFPET DNA Isolation Kit

مقدمه:

کیت Aramesh Bio Gene Tissue/ FFPET DNA Isolation Kit به منظور استخراج سریع و آسان DNA ژنومیک از بافت و بلوک پارافینه بر اساس تکنولوژی سلیکا طراحی شده است. به طور اختصار با استفاده از ATL و آنزیم P.K، تخلیص DNA ژنومیک از نمونه‌های بیولوژیکی انجام می‌شود. با انجام دو مرحله شستشو، آلودگی‌ها حذف شده و با افزودن بافر ADEB، gDNA از ستون رها می‌شود. gDNA تخلیص شده دارای معیارهای با کیفیت بالا است. gDNA تخلیص شده آماده استفاده برای کاربردهای بعدی خواهد بود.

محتویات:

Solution	Storage	50 preps	100 preps	Solution	Storage	50 preps	100 preps
ATL	+16 to 25°C	10 ml	20 ml	Proteinase K	-20°C	1.25 ml	2.5 ml
ADLB	+16 to 25°C	12.5 ml	25 ml	ADEB	+16 to 25°C	5 ml	10 ml
AW1 (Ready to use)	+16 to 25°C	25 ml	50 ml	Spin column		50 pcs	100 pcs
AW2 (Ready to use)	+16 to 25°C	30 ml	60 ml	Collection tube		150 preps	300 preps
ABB	+16 to 25°C	9 ml	18 ml				

شرایط استفاده و نگهداری:

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

پارافین زدایی:

۱- در یک هود شیمیایی، 800 µl از Xylene را به میکروتیوب حاوی برش‌های بافت پارافینه (۵ برش 5 µm) اضافه کرده و به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه نمونه را بر روی Rocker قرار دهید تا به آرامی با

یکدیگر مخلوط شوند و پارافین حل شود (در صورت عدم وجود Rocker، نمونه را به خوبی ورتکس نمایید).

۲- نمونه را به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کنید تا pellet تشکیل شود، سپس سوپرناتانت را به آرامی (Pellet از بین نرود) خارج نمایید.

۳- مراحل شستشو با Xylene (شماره ۱ و ۲) را تا زمانی که پارافین کاملاً حل شود، تکرار نمایید (ممکن است با توجه به سایز نمونه بافت، این مرحله نیاز به ۲ تا ۳ بار تکرار داشته باشد).

آبگیری از الکل:

۱- 800 µl از اتانول ۱۰۰٪ حجمی را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.

۲- 800 µl از اتانول ۷۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.

۳- 800 µl از اتانول ۵۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به طور کامل و به آرامی خارج نمایید.

۴- Pellet را در دمای 40 °C به مدت ۲۰ دقیقه قرار دهید تا کاملاً خشک شود.

مراحل انجام استخراج:

۱- قبل از شروع تست، Thermoblock را بر روی 56 °C تنظیم نمایید.

۲- مقدار مورد استفاده از بافر ADEB را به میکروتیوب استریل انتقال دهید و آن را در 75 °C انکوبه نمایید.

۳- 250 µl از ATL به همراه 25 µl از P.K را به میکروتیوب حاوی بافت (دپارافینه شده) اضافه کرده، سپس نمونه را به خوبی ورتکس نموده و در 56° C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید تا بافت کاملاً لیز شود.

توجه: زمان انکوباسیون براساس نوع و اندازه بافت متغیر است. در این موارد تا زمانی که بیشترین لیز بافت صورت بگیرد انکوباسیون به طول می‌انجامد. زمان طولانی انکوباسیون ممکن است سبب آسیب

به DNA شود، به همین منظور ۲۰ میکرولیتر P.K را به نمونه اضافه نمایید.

توجه: بهتر است انکوباسیون بر روی Thermoblock شیکردار (600 rpm) انجام شود و یا هر ۵ دقیقه، Vortex انجام شود.

۴- میکروتیوب حاوی نمونه را در 95 °C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید.

توجه: در صورتی که از یک Thermoblock به منظور انکوباسیون استفاده می‌نمایید، پس از انکوباسیون در 56 °C، نمونه را تا زمان رسیدن Thermoblock به دمای 95 °C در RT قرار دهید.

توجه: در صورتی که نمونه بافت پارافینه است و یا در فرمالین نگهداری می‌شود، انکوباسیون در دمای 95° C الزامی است.



ARAMESH BIOGENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Tissue/ FFPET DNA Isolation Kit

توجه: در صورت نگهداری نمونه در سرم فیزیولوژی و یا VTM، این مرحله انکوباسیون حذف شود.

۵- پس از رسیدن دمای نمونه به RT میکروتیوب را یک اسپین مختصر نمایید تا قطرات در پایین آن جمع شوند، سپس 250 µl از ADLB را به نمونه اضافه نموده و به خوبی ورتکس شود، در نهایت 175 µl از ABB را به نمونه اضافه کرده و به خوبی ورتکس نمایید. سپس میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین نموده تا قطرات در پایین آن جمع شوند.

• ترکیب نمونه، ADLB و ABB با یکدیگر باید سریعاً انجام شود و بلافاصله با ورتکس کردن، محلول یکسان شود.

a. در مواقعی که تعداد نمونه ها بالا است، می توان ADLB و ABB را از قبل با یکدیگر مخلوط نمود. رسوب تشکیل شده در هنگام ترکیب این بافرها، در واکنش های پایین دست بعدی، اثری ندارد.

۶- میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات در پایین آن جمع شوند. کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۷- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

۸- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 به ترتیب در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

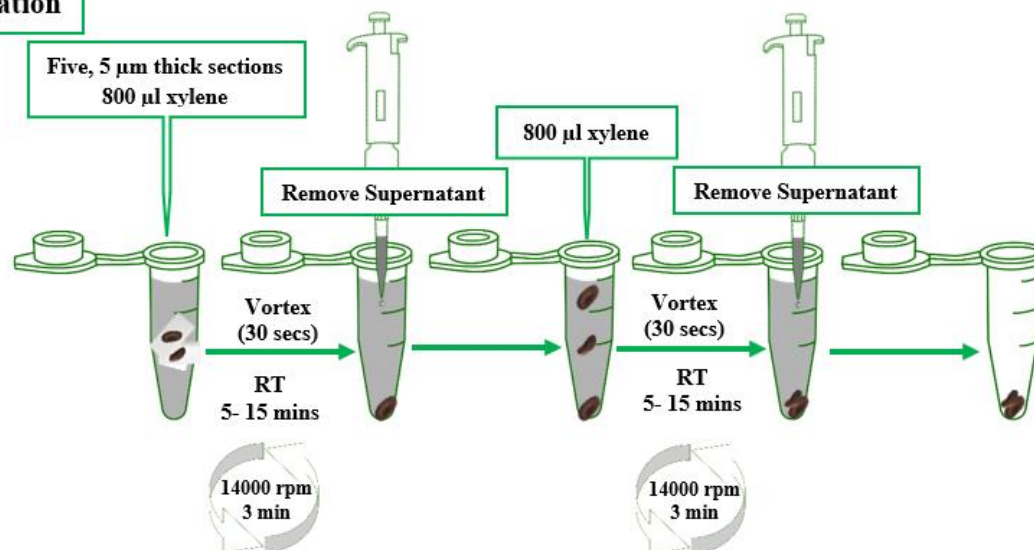
۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۱۰- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج گردد.

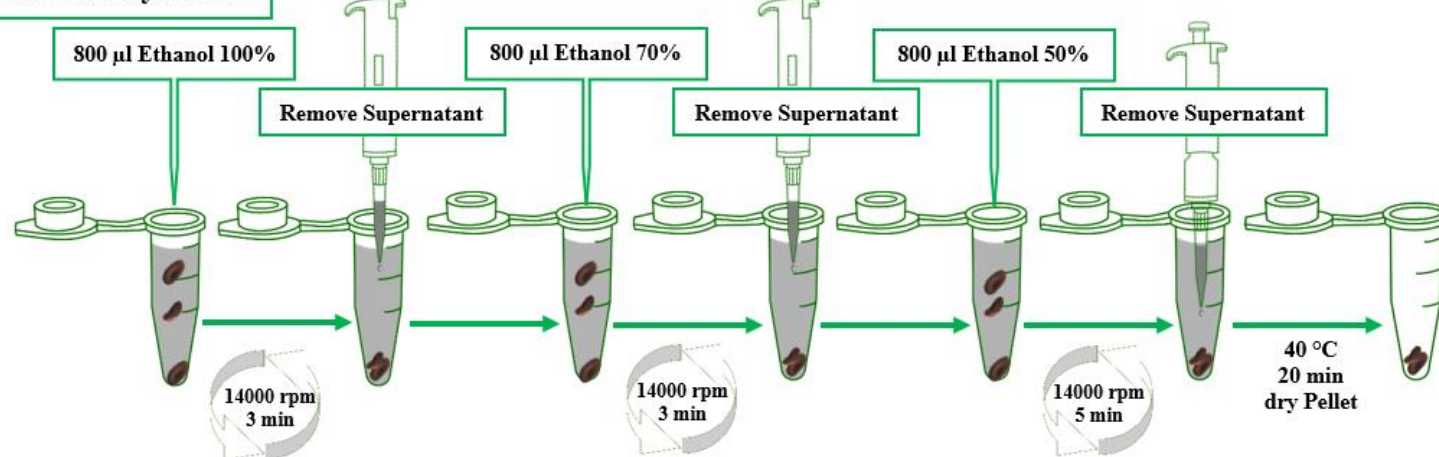
۱۱- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر ADEB را به مرکز ستون اضافه کرده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۲- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده است. محلول حاصل را در ۲۰°C و یا ترجیحاً در ۸۰°C نگهداری نمایید.

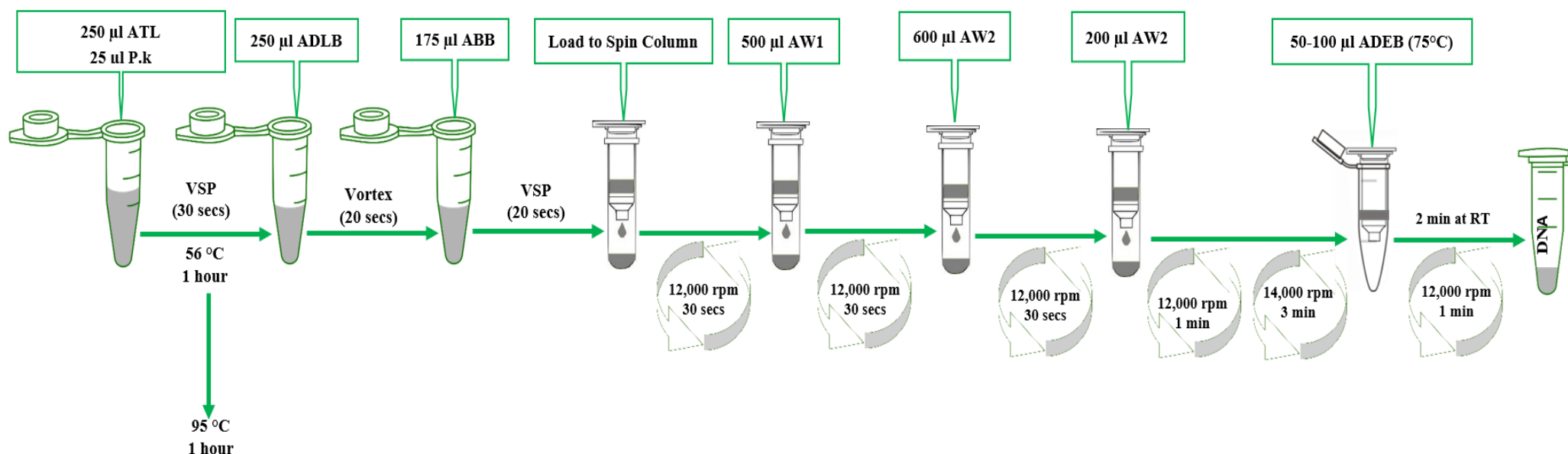
Tissue deparaffinization



Ethanol rehydration



Tissue DNA Isolation



ARAMESH BIOGENE