

### مقدمه:

کیت Aramesh Bio Gene DNA AllGene Isolation به منظور استخراج سریع و آسان DNA ژنومیک، ویروسی، باکتریایی از نمونه‌های خون کامل، بافی‌کوت، کشت سلول، بافت، مایعات بدن و غیره بر اساس تکنولوژی سیلیکا طراحی شده است. به طور اختصار با استفاده از ADLB، و آنزیم P.K، تخلیص DNA از نمونه‌های بیولوژیکی 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           | Storage     | 50 preps | 100 preps | Solution        | Storage     | 50 preps  | 100 preps |
|--------------------|-------------|----------|-----------|-----------------|-------------|-----------|-----------|
| ATL                | +16 to 25°C | 10 ml    | 20 ml     | G solution      | -20°C       | 500 µl    | 1 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     | Lysozyme        | +2 to +8°C  | 2 ml      | 4 ml      |
| AW2 (Ready to use) | +16 to 25°C | 30 ml    | 60 ml     | Spin column     |             | 50 pcs    | 100 pcs   |
| ABB                | +16 to 25°C | 9 ml     | 18 ml     | Collection tube |             | 150 preps | 300 preps |
| Proteinase K       | -20°C       | 1.25 ml  | 2.5 ml    |                 |             |           |           |

### شرایط استفاده و نگهداری:

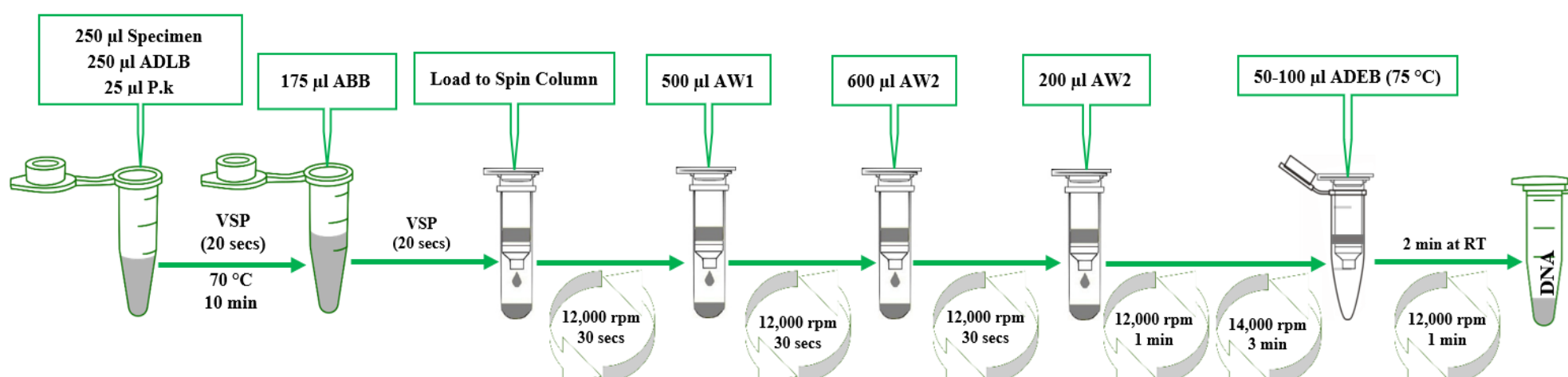
Proteinase K (PK) و G Solution و Lysozyme را در مقادیر مناسب توزیع نموده و در دمای -20°C نگهداری نمایید.

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

### مراحل انجام استخراج (خون، بافی‌کوت و ...):

- ۱- قبل از شروع تست، ویال‌های حاوی نمونه را از یخچال و یا فریزر خارج کرده تا به دمای محیط برسند و یکنواخت نمایید.
- ۲- حتماً بافر ADEB را در 75°C آنکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.
- ۳- 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید
- ۴- 250 µl از ADLB و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).
- ۵- ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می‌شود.
- ۶- در دمای 70°C به مدت ۱۰ دقیقه آنکوبه نمایید.
- ۷- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.
- ۸- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.
- ۹- 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.
- ۱۰- 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 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.
- ۱۱- 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.
- ۱۲- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.
- ۱۳- 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 آنکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.
- ۱۴- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در -20°C و یا ترجیحاً در -80°C نگهداری نمایید.

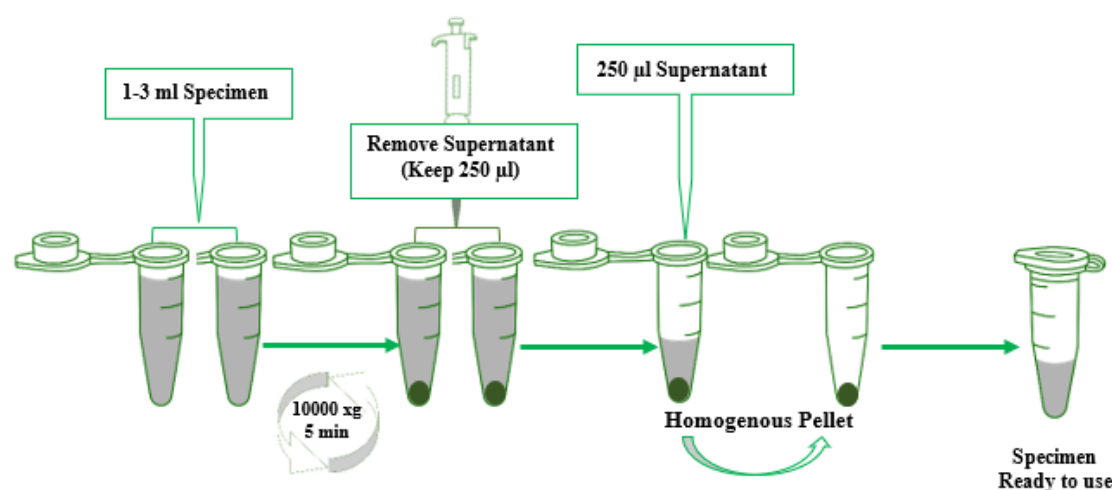
### Genomic DNA Isolation



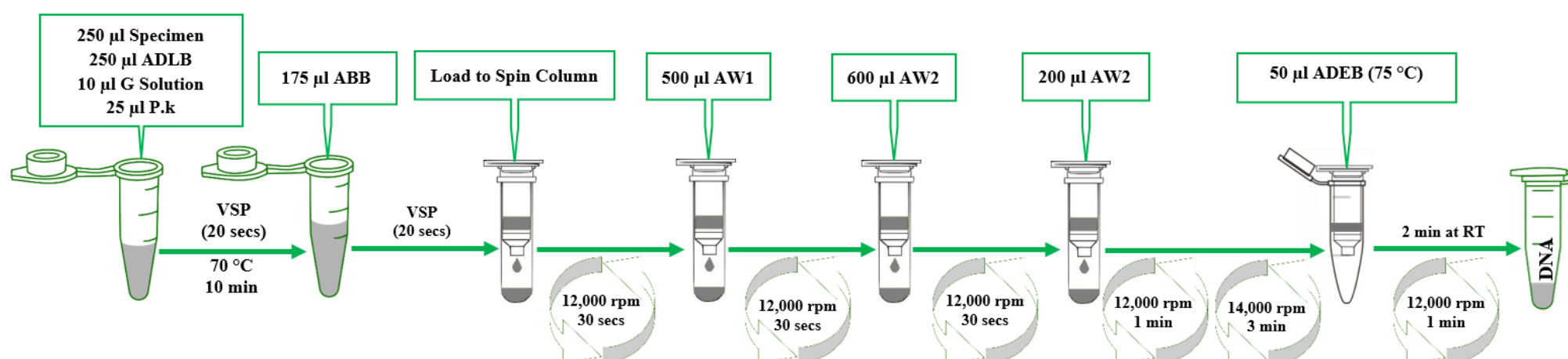
آماده سازی نمونه (مایع آمنیوتیک و مایعات با سلول نامناسب):

- ۱- مقدار 1-3 ml از نمونه را به ۲ میکروتیوب 1.5 ml منتقل نموده و به مدت ۵ دقیقه در دور 10,000 xg سانتریفیوژ نمایید.
  - ۲- پس از تشکیل pellet، مقدار 250 µl از سوپرناتانت را به همراه pellet در میکروتیوب نگهداری کرده و باقی سوپرناتانت را خارج نمایید.
- ❖ **توجه:** در صورتی که تهیه Pellet سلولی از نمونه در دو میکروتیوب انجام گرفته است، 250 µl سوپرناتانت را در یکی از میکروتیوب ها نگهداری نمایید و پس از پیپتینگ، محتویات را با Pellet سلولی میکروتیوب دیگر مخلوط نموده و سپس سانتریفیوژ نمایید.
- مراحل انجام استخراج (مایع آمنیوتیک و مایعات با سلول نامناسب):**
- ❖ قبل از شروع تست، نمونه را مطابق با مراحل فوق آماده سازی کنید.
  - ❖ حتما بافر ADEB را در 75° C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.
  - ❖ 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید.
  - ❖ 250 µl از ADLB، 10 µl از G Solution و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).
  - ❖ ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسول جلوگیری می شود.
  - ❖ در دمای 70 °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.
  - ❖ 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.
  - ❖ کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
  - ❖ 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.
  - ❖ 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 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.
  - ❖ 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.
  - ❖ کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.
  - ❖ ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
  - ❖ DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحا در 80°C- نگهداری نمایید.

### Poor pellet Specimen Preparation



### Cell line DNA Isolation





ARAMESH BIO GENE

Research  
Development  
& Production of  
Advanced Medical Diagnosis

# Quick Guide

## DNA AllGene Isolation Kit

### آماده سازی نمونه (Cell lines)

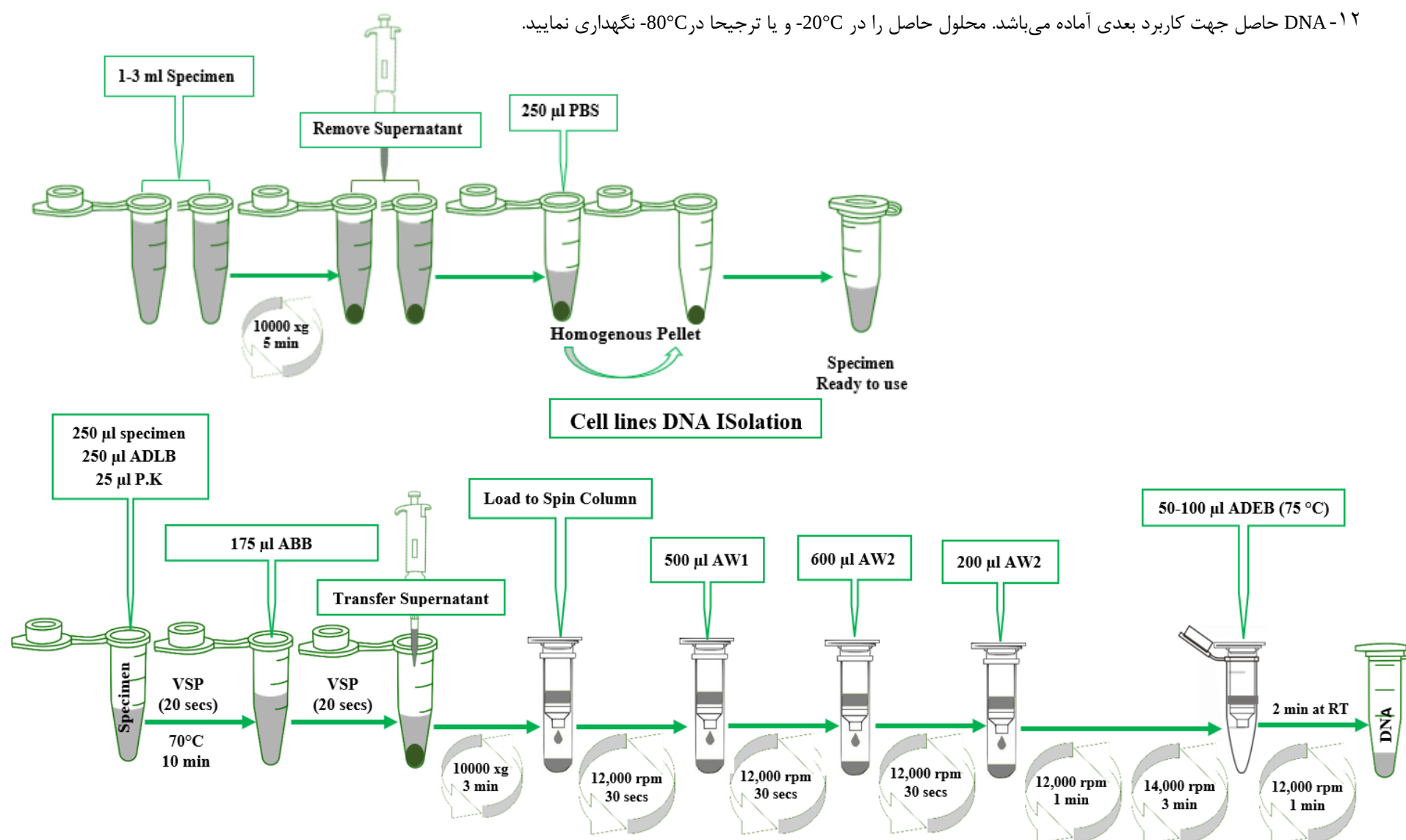
- ۱- مقدار 1-3 ml از نمونه را به ۲ میکروتیوب 1.5 ml، منتقل نموده و به مدت ۵ دقیقه در دور 10,000 xg سانتریفیوژ نمایید و سوپرناتانت را به طور کامل خارج کنید تا Pellet سلولی حاصل شود.
- ۲- با اضافه کردن 1 ml از PBS استریل، Pellet سلولی را به مدت ۳ دقیقه در 10,000 xg شستشو دهید و سوپرناتانت را به طور کامل خارج نمایید.
- توجه: در صورتی که تهیه Pellet سلولی از نمونه در دو میکروتیوب انجام گرفته است، PBS را در یکی از میکروتیوب‌ها ریخته و پس از پیپتینگ، محتویات را با Pellet سلولی میکروتیوب دیگر مخلوط نموده و سپس سانتریفیوژ نمایید.
- ۳- 250 µl از PBS استریل به نمونه اضافه نموده و Pellet سلولی را پیپت نموده تا یکنواخت شود.

### مراحل انجام استخراج (Cell lines):

- ۱- حتما بافر ADEB را در 75°C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.
- ۲- 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید
- ۳- 250 µl از ADLB و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه (250 µl) اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).
- ۴- ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می‌شود.
- ۵- در دمای 70°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.
- ۶- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید. سپس میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه در 10,000 xg سانتریفیوژ نموده و سوپرناتانت شفاف را به ستون، انتقال دهید و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
- a. در صورتی که نمونه از pellet کافی برخوردار نیست، پس از افزودن ABB به نمونه، نمونه را مستقیماً به ستون انتقال دهید.
- 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 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 دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.
- ۱۱- 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 نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.

### Cell line Specimen Preparation

۱۲- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحاً در 80°C- نگهداری نمایید.



ARAMESH BIO GENE

### استخراج DNA از بافت / بافت پاراتینه:

#### پاراتین زدایی:

- ۱- در یک هود شیمیایی، 800 µl از Xylene را به میکروتیوب حاوی برش‌های بافت پاراتینه (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 پاراتین 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 پاراتین 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 (دپاراتینه 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 پاراتینه است و یا در فرمالین نگهداری می‌شود، انکوباسیون در دمای 95° C الزامی است.  
**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 نمونه‌ها بالا است، می‌توان ADLB و ABB را از قبل با یکدیگر مخلوط نمود. رسوب تشکیل شده در هنگام ترکیب این بافرها، در واکنش‌های 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 سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ نمایید.



ARAMESH BIOGENE

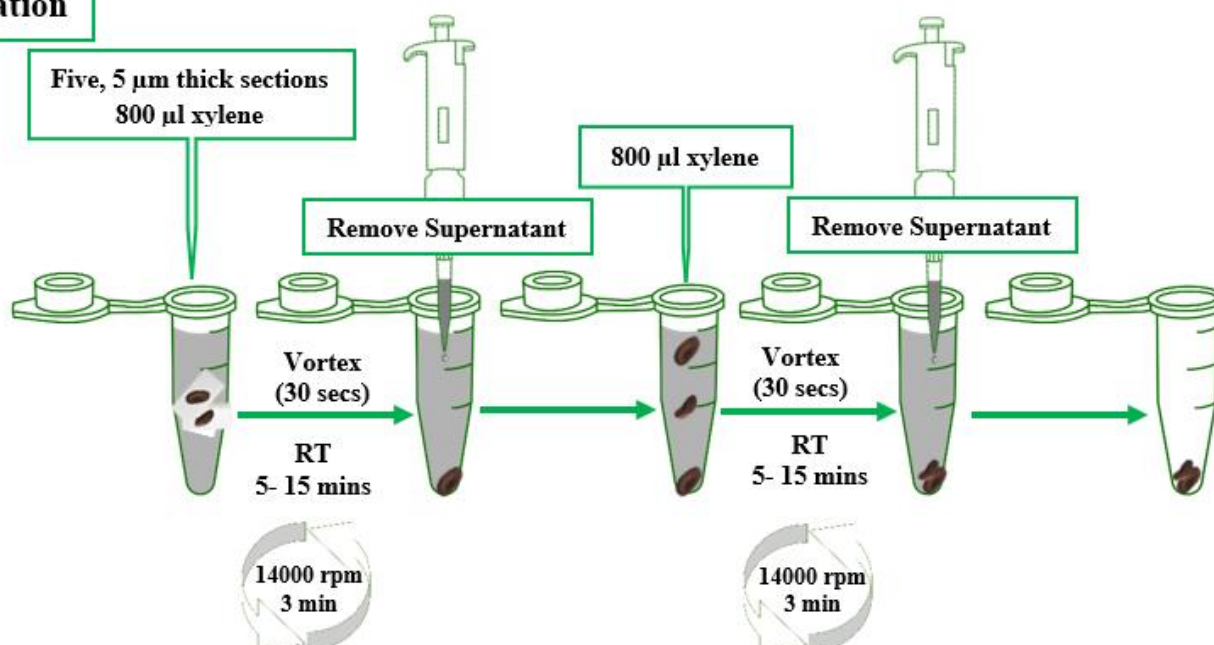
Research  
Development  
& Production of  
Advanced Medical Diagnosis

# Quick Guide

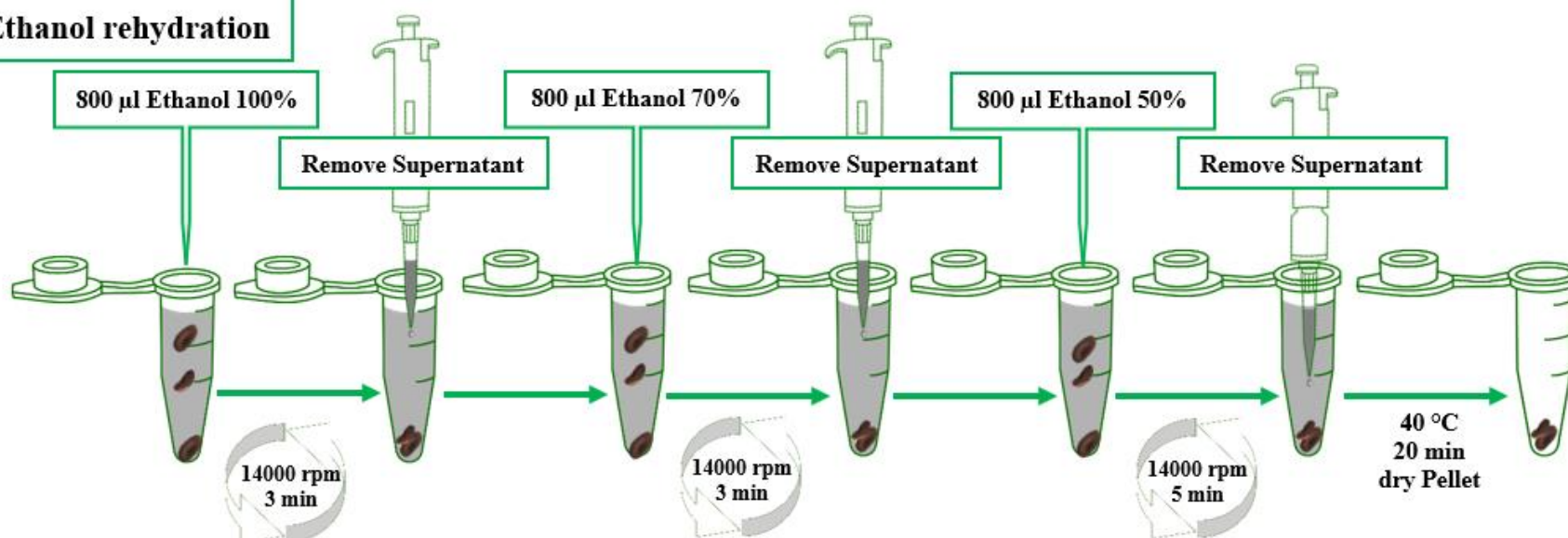
## DNA AllGene Isolation Kit

۱۲- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده است. محلول حاصل را در  $-20^{\circ}\text{C}$  و یا ترجیحا در  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری نمایید.

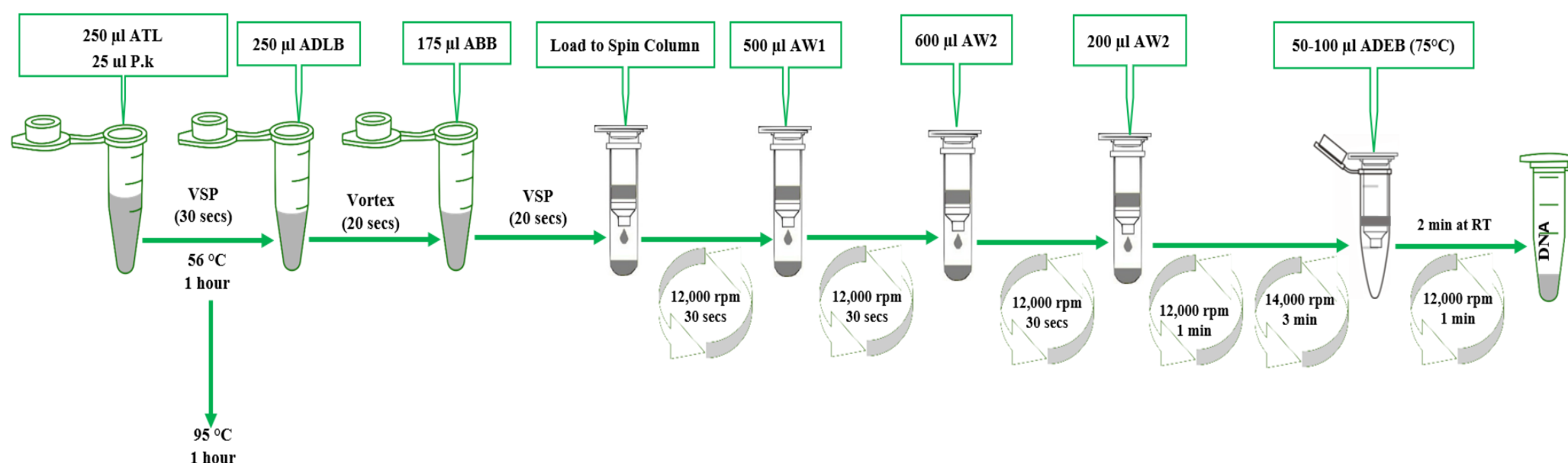
### Tissue deparaffinization



### Ethanol rehydration



### Tissue DNA Isolation





ARAMESH BIOGENE

Research  
Development  
& Production of  
Advanced Medical Diagnosis

# Quick Guide

## DNA AllGene Isolation Kit

مراحل انجام استخراج DNA ویروسی (سرم، پلاسما، مایعات بدن...):

۳- قبل از شروع تست، ویال‌های حاوی نمونه را از یخچال و یا فریزر خارج کرده تا به دمای محیط برسند و یکنواخت نمایید.

۴- حتماً بافر ADEB را در 75°C آنکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.

۵- 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید

۶- 250 µl از ADLB، 10 µl از G Solution و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).

۷- ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آنروسل جلوگیری می‌شود.

۸- در دمای 70 °C به مدت ۱۰ دقیقه آنکوبه نمایید.

۹- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.

۱۰- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۱- 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.

۱۲- 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 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

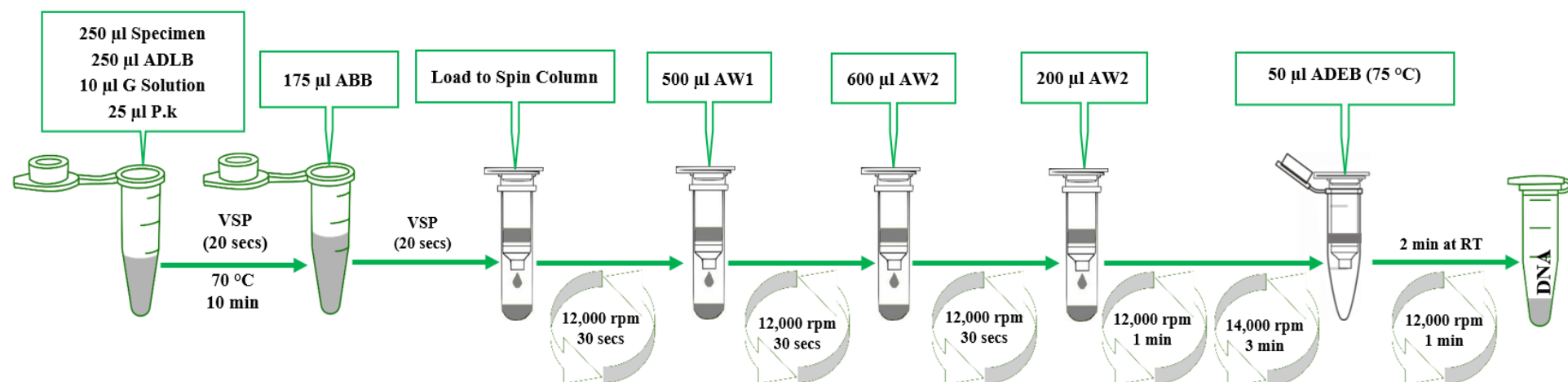
۱۳- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۱۴- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.

۱۵- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۶- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحاً در 80°C- نگهداری نمایید.

### Viral DNA Isolation



استخراج DNA باکتری:

آماده سازی نمونه:

۱- سرم/ پلاسما :

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

نمونه ها 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 بافی کوت را در میکروتیوب جمع آوری 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 اریتروسیت ها را از محیط حذف نمایید. سپس رسوب حاصل که شامل گلبول های سفید می باشد 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 می گردد 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 نمونه گیری، سواب در آنزیم لیزوزیم قرار بگیرد، نیاز به تهیه pellet نیست).

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 سانتریفوژ 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.



ARAMESH BIO GENE

Research  
Development  
& Production of  
Advanced Medical Diagnosis

# Quick Guide

## DNA AllGene Isolation Kit

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 می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحاً در 80°C- نگهداری نمایید.

