



کیت استخراج نوکلئیک اسید خون

بر پایه ستون سیلیکا

SimEX Blood DNA Extraction Kit

Cat. No: SBL15-2005

معرفی کیت :

کیت استخراج DNA خون انسانی Simbiolab برای استخراج DNA ژنومی با خلوص بالا از نمونه‌های خون تازه یا منجمد که با ضدانعقاد EDTA یا سترات تثبیت شده‌اند، طراحی شده است. روش استخراج در این محصول مبتنی بر فناوری هضم آنزیمی، نمک‌های آبدوست و غشای سیلیکا است. روش کار این محصول شامل لیز سلولی کارآمد، بهینه‌سازی شرایط اتصال DNA ژنومی به غشای سیلیکا، شست‌وشوی دو مرحله‌ای غشای سیلیکا برای حذف آلودگی‌ها از جمله نمک‌ها، متابولیت‌ها، نوکلئازها، کاتیون‌های دو ظرفیتی و پروتئین‌ها و در نهایت آزادسازی DNA ژنومی از غشای سیلیکا می‌باشد. DNA تخلیص شده برای طیف گسترده‌ای از تکنیک‌های مختلف بیولوژی مولکولی از جمله PCR، هضم آنزیمی، تعیین ژنوتایپ و انواع هیبریدیزاسیون همچون Southern blotting مناسب است. مواد تشکیل‌دهنده این کیت فاقد ترکیبات فنولی بوده و در نتیجه نگرانی‌های زیستی ناشی از پسماندهای کیت کمتر از روش‌های مبتنی بر ترکیبات فنولی است.

مواد و وسایل مورد نیاز فرایند استخراج که در کیت تعبیه نشده است:

✓	اتانول ۹۶-۱۰۰٪	✓	سمپلر ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر
✓	میکروفیوژ	✓	نوکل سمپلر فیلتردار ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر
✓	هات پلیت	✓	سمپلر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر
✓	شیکر	✓	نوکل سمپلر فیلتردار ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر
✓	سانتریفیوژ با حداکثر دور 13000 rpm	✓	میکروتیوب 1.5 ml

محتویات کیت :

اجزا	عنوان برچسب	مقادیر در کیت ۵۰ تستی	مقادیر در کیت ۱۰۰ تستی
بافر لیزکننده	SBL	11 ml	22 ml
بافر شستشو شماره ۱	SBW1	25 ml	50 ml
بافر شستشو شماره ۲	SBW2	52 ml	52 ml × 2
بافر آزاد سازی	SBE	10 ml	20 ml
پروتئیناز K	Proteinase K	20 mg	20 mg × 2
بافر حلال پروتئیناز K	PKDB	1 ml	1 ml × 2
ستون استخراج	Spin columns	50 pieces	100 pieces
Collection tube	Collection tube	100 pieces	200 pieces
راهنمای کاربری	User manual	1	1

نکات مهم قبل از شروع کار:

- قبل از اولین استفاده، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول PKDB را به تیوب پروتئیناز K اضافه کنید تا یک محلول ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر بسازید. محلول حاصل را پس از چندین مرتبه پیپتاژ و اطمینان از حل شدن کامل پروتئیناز K، در فریزر 20°C- نگهداری کنید.
- برای افزایش غلظت DNA استخراج شده، محلول SBE را تا رسیدن به دمای 60°C روی هات پلیت یا حمام آب گرم قرار دهید.
- نکته: دقت شود که حجم اتانول مورد نیاز برای محلول شستشوی SBW1 و SBW2 افزوده شده است.

نحوه استفاده از کیت:

الف) لیز سلولها

۱. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه کنید.
 ۲. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیز SBL را به این میکروتیوب اضافه کنید.
 ۳. ۲۰۰ میکرولیتر نمونه (خون کامل، بافی کوت) را به مخلوط بالا اضافه کنید و با ورتکس کامل مخلوط کنید.
- دقت کنید که نمونه مورد استفاده به طور کامل یکنواخت باشد و به هیچ وجه حاوی لخته نباشد.
 - به منظور جمع کردن قطرات نمونه در داخل میکروتیوب، نمونه را بطور مختصر اسپین کنید.
 - ۴. نمونه ها را به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در حمام آب گرم یا هات پلیت با دمای 60°C انکوبه کنید.
 - به منظور بدست آوردن نتایج بهتر پیشنهاد می شود در طی انکوباسیون نمونه ها را هر ۱۰ دقیقه یکبار ورتکس کنید.

۵. نمونه‌ها را به منظور جمع آوری قطرات بدنه میکروتیوب به صورت مختصر اسپین کنید.
۶. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶-۱۰۰٪ به نمونه اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه پیپتاژ نمایید تا کاملاً یکنواخت شود.

- ورتکس در این مرحله می‌تواند کمیت و کیفیت DNA را کاهش دهد

۷. نمونه‌ها را به منظور جمع آوری قطرات بدنه میکروتیوب به صورت مختصر اسپین کنید
۸. به تعداد نمونه، ستون بر روی کالکشن تیوب قرار دهید. سپس به آرامی محلول لیز سلولی بدست آمده از مرحله ۶ را به ستون مربوط به هر نمونه انتقال دهید و به مدت ۱ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید و سپس ستون را به کالکشن جدید منتقل کنید.

- اگر در داخل محلول لخته‌ای مشاهده شد به هیچ عنوان نمونه را به ستون منتقل نکنید.
- اگر محلول به طور کامل از ستون عبور نکرد، دوباره با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید تا محلول لیز شده کاملاً از ستون عبور کند.

ب) از بین بردن آلودگی‌ها

۹. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر SBW1 را به ستون اضافه کنید. ستون را به مدت ۱ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید. ستون را به یک کالکشن جدید منتقل کنید
۱۰. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر SBW2 را به ستون اضافه کنید. ستون را به مدت ۱ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید.

- اختیاری: مرحله ۱۰ را تکرار کنید.

نکته: در صورتیکه قصد دارید مرحله ۱۰ را دو بار تکرار کنید، در هر مرحله ۵۰۰ میکرولیتر بافر SBW2 به ستون اضافه کنید.

۱۱. محتویات کالکشن تیوب را تخلیه کرده و ستون را به کالکشن تیوب برگردانید و به منظور حذف کامل اتانول به مدت ۲ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید.
نکته مهم: این مرحله برای حذف کامل اتانول از ستون بسیار ضرورت دارد، باقی ماندن اتانول روی ستون می‌تواند باعث کاهش راندمان استخراج و همینطور اختلال در واکنش‌های بعدی شود.

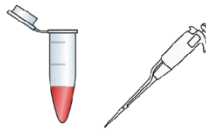
پ) آزاد سازی DNA ژنومی

۱۲. ستون را به یک میکروتیوب 1.5 ml استریل منتقل کرده و مقدار ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول SBE (که به دمای 60°C رسانیده شده است) به مرکز ممبران ستون اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

- دقت کنید که محلول به مرکز فیلتر اضافه شود، همچنین از تماس نوک سمپلر به فیلتر اجتناب نمایید.

۱۳. ستون را به مدت ۱ تا ۲ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۱۴. ستون را دور انداخته و میکروتیوب 1.5 ml حاوی ژنوم استخراج شده را جهت واکنش بعدی استفاده کنید و یا برای ذخیره سازی به فریزر -20°C منتقل نمایید.

۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K
۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (SBL)
۲۰۰ میکرولیتر نمونه



۱۰ ثانیه ورتکس
انکوبه در دمای 60°C به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه

افزودن ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ یا مطلق،
انتقال به ستون حاوی فیلتر



سانتریفیوژ 13000rpm به مدت یک دقیقه

دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube
افزودن ۵۰۰ میکرولیتر محلول SBW1



سانتریفیوژ 13000rpm به مدت یک دقیقه

دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube
افزودن ۷۰۰ میکرولیتر محلول SBW۲



سانتریفیوژ 13000rpm به مدت یک دقیقه

دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube
سانتریفیوژ ستون خالی با بالاترین سرعت به مدت ۲ دقیقه



انتقال ستون حاوی فیلتر به میکروتیوب ۱.۵ میلی لیتر جدید
افزودن ۱۰۰ یا ۲۰۰ میکرولیتر بافر آزاد سازی (SBE) گرم شده به مرکز ستون



سانتریفیوژ 13000rpm به مدت یک دقیقه

ذخیره محلول جمع آوری شده در -20°C