کیت استخراج DNA ژنومی (۱۰۰)

(از خون)

مورد استفاده:

این کیت قادر به استخراج DNA ژنومی با خلوص بالا از نمونه‌های حاوی EDTA، مایعات انسانی و حیوانی می-باشد.

اساس و ویژگی‌ها:

این کیت استخراج بر پایه ستون سیلیکا می‌باشد. بافر لایز این کیت محتوی دترجنت، گواندین ایزوتیوسیانات و بافر می‌باشد. محلول‌های مرحله شستشوی این کیت حاوی گوانیدین هیدروکلراید و بافر می‌باشد. DNA استخراج شده می‌تواند برای اهداف مختلف از جمله هیبریداسیون معکوس و انواع روش‌های مبتنی بر PCR استفاده شود.

محتوای کیت:

محتویات	مقدار	شرایط نگهداری
Lysis Buffer (LB)	22 ml	دمای اتاق ۱۵-۲۵°C
Proteinase K (pk)	1.2x2ml	
Binding Buffer (BB)	30 ml	
Wash Buffer1 (WB1)	40 ml	
Wash Buffer2 (WB2)	15x2 ml	
Elution Buffer (EB)	30 ml	
Column	50x2	
Collection tube	100x2	

شرایط نگهداری:

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

مواد و دستگاه های مورد نیاز:

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

Genomic DNA Extraction Kit (100)
(From Blood)

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.
- نمونه‌ها 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: محلول‌های سفید کننده یا اسیدی را مستقیماً به پسماندهای آماده سازی نمونه اضافه نکنید.

بافر LB و WB۱

حاوی: هیدروکلراید/ ایزوتیوسیانات گوانیدین.

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

جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه:

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

آماده سازی محلول‌ها قبل از شروع کار:

۲۷ میلی لیتر اتانول به WB۱ اضافه شود.
۶۵ میلی لیتر اتانول به WB۲ اضافه شود.

آدرس: انتهای یادگارامام، جنب مجتمع ورزشی میلاد، پادگان جی، ساختمان قدس، واحد تولید کیت‌های تشخیص.
تلفن : ۰۲۱-۸۸۳۵۲۳۷۵ **فکس:** ۸۸۶۳۳۷۰۵ – ۰۲۱
وب سایت : www.Darmannegar.com **ایمیل :** Info@Darmannegar.com

روش کار:

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

- 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 پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی را دور ریخته و به رسوب حاصله ۲۰۰ لاندا آب مقطر اضافه کرده و جهت استخراج استفاده می‌کنیم.

- جهت نمونه‌های خون خشک شده بر روی کاغذ صافی، ابتدا کاغذ نمونه را داخل تیوپ ۱۰۵ میلی لیتری حاوی ۲۵۰ لاندا سرم فیزیولوژیک (NaCl ۰،۹٪) قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار می‌دهیم در ادامه به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کرده، کاغذ صافی را خارج کرده و از محلول داخل تیوپ جهت استخراج استفاده می‌کنیم.

۱- ۲۰۰ میکرولیتر محلول لایز را داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتری محتوی ۲۰۰ میکرولیتر نمونه بیمار (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- ۲۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه قرار داده، سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۳- ۲۵۰ میکرولیتر بافر BB به مخلوط لایز و نمونه اضافه کرده، به مدت ۵ ثانیه ورتکس و اسپین نمایید.

۴- ۶۲۰ میکرولیتر محتوی تیوب لایز را به داخل ستون قرار گرفته در تیوپ جمع آوری، انتقال داده و به مدت ۱ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

*در مواردیکه به دلیل کهنه بودن نمونه خون، محلول لایز پس از سانتریفیوژ به طور کامل از ستون رد نشده باشد، مجددا تیوپ 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 WB۱ را اضافه نموده و به مدت ۱دقیقه در دور g 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 WB۲ را اضافه نموده و به مدت ۱دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

۷- ستون را داخل تیوب جمع آوری جدید قرار داده و به آن ۶۵۰ میکرولیتر باقر WB۲ را اضافه نموده و مدت ۱ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ نمایید.

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

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

*حجم الوشن بافر براساس نیاز از ۳۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر قابل تغییر است.

۱۰- محلول حاصله برای تمامی واکنش‌های مولکولی قابل استفاده بوده و در صورت انجام آزمایش در آینده، در دمای ۷۰- نگهداری گردد.

کنترل کیفیت

مطابق با سیستم مدیریت کیفیت جامع هلدینگ سدار، هر سری کیت استخراج Cedbio بر اساس استانداردهای تعیین شده، جهت اطمینان از تولید محصول با کیفیت، مورد بررسی دقیق آزمایشگاهی با نمونه‌های کنترل و مقایسه با کیت‌های تراز اول جهانی قرار می‌گیرد.

تصویر علائم هشدار و نگهداری:

هشدار / خطر بالقوه

احتیاط / حساسیت زا و التهاب آور

۱. Smith, K., Diggle, M. A., & Clarke, S. C. (2003). *Comparison of Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of Bacterial Genomic DNA from Whole-Blood Samples. Journal of Clinical Microbiology, 41(6), 2440–2443.* doi:10.1128/jcm.41.6.2440-2443.2003

۲. Brevnov, M. G., Pawar, H. S., Mundt, J., Calandro, L. M., Furtado, M. R., & Shewale, J. G. (2009). *Developmental Validation of the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit for Extraction of Genomic DNA from Biological Samples. Journal of Forensic Sciences, 54(3), 599–607.* doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01013.x

۳. Naue, J., Sänger, T., Hoefsloot, H. C. J., Lutz-Bonengel, S., Kloosterman, A. D., & Verschure, P. J. (2018). *Proof of concept study of age-dependent DNA methylation markers across different tissues by massive parallel sequencing. Forensic Science International: Genetics, 36, 152–159.* doi:10.1016/j.fsigen.2018.07.007

٤. Sidstedt, M., Hedman, J., Romsos, E. L., Waitara, L., Wadsö, L., Steffen, C. R., … Rådström, P. (2018). *Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(10), 2569–2583.* doi:10.1007/s00216-018-0931-z.

آدرس: انتهای یادگارامام، جنب مجتمع ورزشی میلاد، پادگان جی، ساختمان قدس، واحد تولید کیت‌های تشخیص.

تلفن : ۰۲۱-۸۸۳۵۲۳۷۵ **فکس:** ۸۸۶۳۳۷۰۵ – ۰۲۱

وب سایت : www.Darmannegar.com **ایمیل :** Info@Darmannegar.com