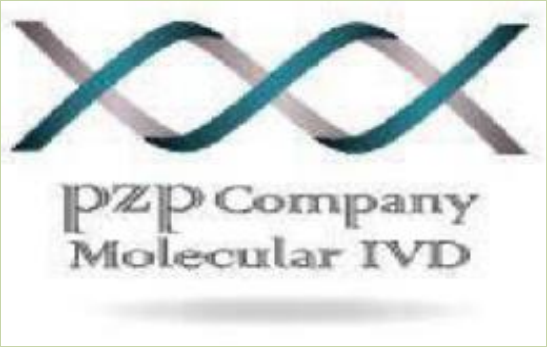

Human Samples Pure

Nucleic Acid Template Extraction Kit

Version 4

For 50 Tests

Made in Iran

Assemble in PZP Co

محتویات کیت :

۱- Proteinase K Lyophilized powder (2X)

۲- L-Buffer

۳- B-Buffer

۴- R-Buffer

۵- W-Buffer

۶- E-Buffer

۷- Column Bag (50 pcs)

۸- Collection Tube (200 pcs)

<u>موادی که جزء اجزاء کیت نیست و باید قبل از شروع استخراج تهیه شوند :</u>

- اتانول ۱۰۰٪

A آماده سازی وتنظیم حجم نمونه:

۱- داخل کیت ۲ ویال (حاوی 20 mg) پودر پروتیناز K قرار داده شده است که قبل از شروع کار باید به صورت محلول در آید. درون هر ویال 1 ml بافر E اضافه نموده و بطور کامل حل نمایید. پس از محلول سازی، محلول پروتیناز K باید در 20 °C- نگهداری شود.

۲- زمانیکه نمونه، سلولهای کشت شده یا سوابهای ترشحات واژینال در محلولهای با پایه الکل می باشند ابتدا سلولها را به صورت سوسپانسیون در آورده و مقدار کافی از سوسپانسیون را (حاوی ۱۰^۴- ۱۰^۶) درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل می ریزیم و در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید. سپس فاز رویی را بطور کامل دور ریخته و رسوب سلولی را برای استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده نمایید.

۳- همچنین زمانیکه حجم نمونه کمتر از ۲۰۰ میکرولیتر است، حجم نمونه را با بافر E به ۲۰۰ میکرولیتر برسانید.

B جدا سازی اسید نوکلئیک از خون کامل پستانداران:

توجه: بافر E را پیش از شروع کار در دمای ۷۰°C + (Hot Plate) گرم نمایید.

۱- به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل، ۲۰۰ میکرولیتر بافر B اضافه نمایید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر خون نیز اضافه نمایید. در مرحله بعد ۴۰ میکرولیتر

پروتئیناز K به مخلوط قبلی اضافه کرده و بلافاصله ورتکس (20 ثانیه) نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در Hot Plate با دمای ۷۰°C + اینکوبه نمایید.

۲- در مرحله بعد مختصرا میکروتیوب را Spin کرده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه نموده و به خوبی ورتکس (30 ثانیه) و سپس spin نمایید.

۳- یک ستون فیلتردار را درون یک تیوب collection قرار دهید و با مارکر درب ستون های نمونه های مختلف را نامگذاری نمایید.

۴- تمامی محتویات میکروتیوب در مرحله ۲ را به درون ستون انتقال دهید و در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۵- ستون را درون تیوب collection جدید قرار دهید و تیوب collection قبلی را دور بیندازید. سپس به داخل هر ستون ۵۰۰ میکرولیتر بافر R اضافه نمایید. مجددا در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۶- مجددا ستون را درون تیوب collection جدید قرار دهید و تیوب collection قبلی را دور بیندازید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر W به ستون اضافه نمایید و در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید. محتویات تیوب collection را دور ریخته و مجددا ستون را داخل آن قرار دهید. مجددا ۵۰۰ میکرولیتر بافر W

به ستون اضافه نمایید و سپس در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۷- در مرحله بعد تیوب collection قبلی را دور بیندازید و ستون را درون یک تیوب collection جدید قرار دهید و در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۸- ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار دهید. سپس ۱۵۰- ۸۰ میکرولیتر بافر E گرم شده روی فیلتر ستون اضافه نمایید. به مدت ۵ دقیقه صبر کرده و سپس در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۹- ستون را دور بیندازید. حال میکروتیوب ۱/۵ حاوی اسید نوکلئیک استخراج شده را ورتکس و سپس اسپین نمایید. حال میتوانید آن را مستقیما مورد استفاده قرار دهید یا در دمای °۲۰C – برای بررسی بعدی ذخیره نمایید.

C جدا سازی اسید نوکلئیک از سلولهای ایی تلیال یا اسمیر ، Buffy coat و سلولهای کشت شده :

توجه: بافر E را پیش از شروع کار در دمای °۷۰C + (Hot Plate) گرم نمایید.

۱- به رسوب سلولی بدست آمده طبق بخش آماده سازی (بخش A) ، ۲۰۰ میکرولیتر بافر L اضافه نمایید. در مرحله بعد ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K به مخلوط قبلی اضافه کرده و ورتکس (20 ثانیه) نمایید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در Hot Plate با دمای °۷۰C + اینکوبه نمایید.

۲- سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر B اضافه و بلافاصله ورتکس نمایید (20ثانیه). سپس به مدت ۵ دقیقه در Hot Plate با دمای ۷۰°C + اینکوبه نمایید.

۳- در مرحله بعد مختصرا میکروتیوب را Spin کرده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه نمایید و به خوبی ورتکس (30 ثانیه) و سپس spin نمایید.

۴- ادامه مراحل از شماره ۳ بخش B انجام گیرد.