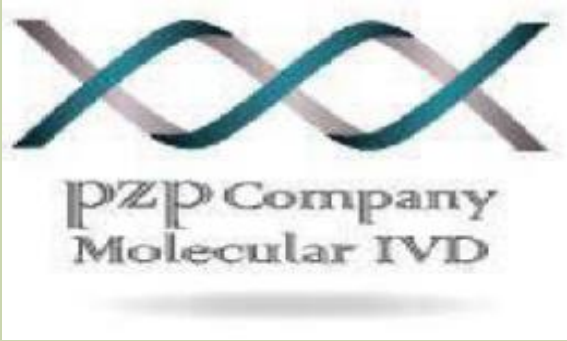

Fungi and Bacteria

Nucleic Acid Template Extraction Kit

Version 4.1

For 50 Tests

Made in Iran

Assemble in PZP Co

محتویات کیت:

۱- Proteinase K (Storage: -20°C)

۲- Lysozyme (Storage: -20°C)

۳- B-Buffer (Storage: 4°C)

۴- R-Buffer (Storage: 4°C)

۵- W-Buffer (Storage: 4°C)

۶- E-Buffer (Storage: 4°C)

۷- Column Bag (50 pcs) (Storage: 4°C)

۸- Collection Tube (200 pcs) (Storage: RT)

موادی که جزء اجزاء کیت نیست و باید قبل از شروع استخراج تهیه شوند:

- اتانول ۱۰۰٪

A آماده سازی کیت و تنظیم حجم نمونه:

۱- برای استخراج مناسب از سلولهای قارچی و باکتریایی، سلولها باید حاصل کشت تازه باشند.

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

B استخراج اسیدهای نوکلئیک از قارچها و باکتریها:

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

۱- به درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل، ۴۰ میکرولیتر بافر E اضافه نمایید. سپس یک لوپ کامل از سلولهای قارچی و یا باکتریایی تازه را به درون آن انتقال دهید.

۲- سپس ۱۰ میکرولیتر لیزوزیم (10mg/ml) به میکروتیوب مرحله قبل اضافه و ورتکس (20 ثانیه) نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C + اینکوبه نمایید.

۳- سپس ۱۵۰ میکرولیتر بافر L به میکروتیوب مرحله قبل اضافه نمایید. سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه کرده و بلافاصله ورتکس (۳۰ ثانیه) نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۶°C + اینکوبه نمایید.

۴- سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر B به میکروتیوب مرحله قبل اضافه نمایید و بلافاصله ورتکس (۲۰ ثانیه) کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰C° + اینکوبه نمایید.

۵- میکروتیوب را مختصرا spin نمایید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه و به خوبی ورتکس (۳۰ ثانیه) کرده و سپس spin نمایید.

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

۷- تمامی محتویات میکروتیوب در مرحله 5 را به درون ستون انتقال دهید و در دور 10000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۸- 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 نموده و مجددا در دور 10000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۹- مجددا ستون را درون تیوب collection جدید قرار دهید و تیوب collection قبلی را دور بیندازید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر W به ستون اضافه نموده و در دور rpm 10000 به مدت 1 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 کنید و سپس در دور 10000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۱۰- در مرحله بعد تیوب collection قبلی را دور بیندازید و ستون را درون یک تیوب collection جدید قرار دهید و در دور 14000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۱۱- ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار دهید. سپس 100- 50 میکرولیتر بافر E گرم شده روی فیلتر ستون اضافه نمایید. به مدت 5 دقیقه صبر کرده و سپس در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۱۲- 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.