

Tissue DNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج DNA بافت:

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
PT1 Buffer	2ml	20 ml	40 ml
PT2 Buffer	2.5ml	25 ml	50 ml
PW1 Buffer	300 µl x 2	6 ml	6 ml x 2
PW2 Buffer	350 µl	4 ml	8 ml
PE Buffer	1.5ml	10 ml	20 ml
Proteinase K	2 mg	20 mg	20 mg x 2
Spin Column	Spin Column	50 pcs	50 pcs x 2
Collection Tube	Collection Tube	50 pcs	50 pcs x 2

* آماده سازی بافر PW1 و PW2 و محلول پروتئیناز K قبل از اولین استفاده:

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
Ethanol volume for PW1 Buffer	1.7 ml x 2	34 ml	34 ml x 2
Ethanol volume for PW2 Buffer	2 ml	26 ml	52 ml
proteinase K Solution volume	100 µl	1 ml	1 ml x 2

قبل از اولین استفاده:

در کیت های ۴ عددی

- مقدار ۱/۷ میلی لیتر اتانول مطلق به محلول PW1 و ۲ میلی لیتر به محلول PW2 اضافه کنید و سپس برچسب روی ظرف ها را علامت گذاری کنید.
- قبل از اولین استفاده ویال حاوی پروتئیناز K را فیوژ کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K یا ۱۰۰ میکرولیتر از ddH₂O را به ویال حاوی پروتئیناز K اضافه کنید و سپس به آرامی ویال را ورتکس کنید تا محلول به خوبی حل گردد.

در کیت های ۵۰ عددی

- مقدار ۳۴ میلی لیتر اتانول مطلق به محلول PW1 و ۲۶ میلی لیتر به محلول PW2 اضافه کنید و سپس برچسب روی ظرف ها را علامت گذاری کنید.
- قبل از اولین استفاده ۱ میلی لیتر از محلول پروتئیناز K یا ۱ میلی لیتر از ddH₂O را به ویال حاوی پروتئیناز K اضافه کنید و سپس به آرامی ویال را ورتکس کنید تا محلول به خوبی حل گردد.

نکات مهم:

- ای. ویال پروتئیناز K را در دمای °C ۲۰ - نگهداری کنید. قبل از اولین استفاده حجم مورد نیاز محلول پروتئیناز K را به ویال پروتئیناز K اضافه کنید، سپس ورتکس کرده و مطمئن شوید که پروتئیناز K کاملاً حل شده است.
- ای. حجم مورد نیاز اتانول مطلق را در اولین استفاده به بافر PW1 و بافر PW2 اضافه کنید.
- ای. قبل از شروع استخراج، انکوباسیون یا حمام آب را تا دمای °C ۶۰ گرم کنید.
- ای. قبل از شروع استخراج، اتانول مطلق را در دمای °C ۲۰ - ذخیره کنید.

۷. قبل از شروع استخراج، در صورت مشاهده ی رسوب در محلول های PT1 و PT2 محلول ها را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

روش استخراج:

۱. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول PT1 را به میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه کنید.
 ۲. مقداری بافت را داخل فویل آلومینیومی استریل قرار داده و با تیغ استریل به قطعات ریز خرد کرده و سپس در هاون له کنید و یا بافت را داخل فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع قرار داده ، سپس داخل هاون له کنید و ۲۰-۳۰ میلی گرم به میکروتیوب حاوی محلول PT1 اضافه کنید، سپس به مدت چند ثانیه ورتکس کنید.
 ۳. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به محلول اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی ورتکس کنید، سپس مخلوط حاصله را به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای °C ۶۰ انکوبه کنید (در طی انکوباسیون، میکروتیوب هر چند دقیقه یکبار به آرامی تکان داده شود تا لیز سلولی به خوبی صورت گیرد).
 ۴. پس از مدت زمان انکوباسیون، روی محلول حاصله ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PT2 بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.(توجه کنید اگر پس از اضافه کردن محلول PT2 داخل میکروتیوب، رسوب بافت باقی ماند میکروتیوب را به مدت ۲-۵ دقیقه در دمای °C ۶۰ انکوبه کنید تا بقیه رسوبات حل شوند).
 ۵. ۳۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق روی محلول حاصله بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
 ۶. محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید و پس از آن به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
 ۷. پس از سانتریفیوژ، مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ستون را مجددا در تیوب جمع کننده قرار دهید و از محلول PW1 به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
 ۸. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PW2 را به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
 ۹. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته، ستون را مجددا در تیوب جمع کننده قرار دهید و بدون اضافه نمودن هیچ محلولی آن را با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
 ۱۰. ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید و به مقدار ۳۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PE را به آرامی به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
 ۱۱. تیوب را به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید، سپس ستون را دور انداخته و مایع جمع شده در میکروتیوب را که حاوی DNA است در دمای °C ۲۰- نگهداری کنید.
- توجه: برای حذف مقادیر احتمالی RNA ، ۴ میکرولیتر آنزیم RNase A با غلظت ۱۰ mg/ml (از اجزای کیت نمی باشد) را در مرحله ۲ قبل از اضافه کردن پروتئیناز K اضافه کنید و چند ثانیه ورتکس کرده، سپس مرحله ۲ را ادامه دهید.