Super DNA Extraction Kit

(Blood /Serum/Cell /CSF/ Bacterial /Tissue /Plant/Viral)

Content version: October 2023

Store the kit at: +25°C.

www.anacelltec.com

anacelltech@gmail.com

Tel: 09003414111

Contents

Components	25 preps	50 preps	100 preps	Storage Temperature
Lysis buffer 1	10ml	20 ml	40 ml	Room Temperature
Lysis buffer 2	8ml	15 ml	30 ml	Room Temperature
Precipitation	10ml	10 ml	20 ml	Room Temperature
Wash buffer A	15ml	30 ml	60 ml	Room Temperature
Wash buffer B	25ml	50 ml	100 ml	Room Temperature
Elution buffer	3ml	3 ml	6 ml	Room Temperature
Proteinase k (Lyophilized)	5mg	10 mg	20 mg	Room Temperature
Glycerol	0.5 ml	1 ml	1ml	Room Temperature
Spin column	25 N	50 N	100 N	Room Temperature

آماده‌سازی پیش از مصرف

آماده‌سازی پروتئیناز k

۱. کیت ۲۵ تستی: ابتدا 125µl از elution buffer را به ویال پروتئیناز k لیوفیلیزه اضافه و به خوبی حل کنید، سپس 125µl از گلیسرول به آن اضافه کنید. در نهایت ورتکس کنید. محلول نهایی را در دمای -20°C نگهداری کنید.

۲. کیت ۵۰ تستی: ابتدا 250µl از elution buffer را به ویال پروتئیناز k لیوفیلیزه اضافه و به خوبی حل کنید، سپس 250µl از گلیسرول به آن اضافه کنید. در نهایت ورتکس کنید. محلول نهایی را در دمای -20°C نگهداری کنید.

۳. کیت ۱۰۰ تستی: ابتدا 500µl از elution buffer را به ویال پروتئیناز k لیوفیلیزه اضافه و به خوبی حل کنید، سپس 500 µl از گلیسرول به آن اضافه کنید. در نهایت ورتکس کنید. محلول نهایی را در دمای -20°C نگهداری کنید.

نکات:

- این کیت توانایی استخراج DNA از نمونه‌های خون تازه و فریز شده، سلول، مایع آمنیون، CSF، سرم، ویروس، باکتری، بافت را دارد.
- جهت استخراج DNA از نمونه باکتری بهتر است حدود 2-1 میلیارد باکتری یا 3- 2 کلونی باکتری را برداشته و به 300 µl آب استریل درون میکروتیوب اضافه نمایید. سپس 20 µl آنزیم لیزوزیم با غلظت 20 mg/ml به آن اضافه کرده و به خوبی ورتکس کنید. به مدت 15 min در دمای 25°C روی شیکر انکوبه کرده و هر ۵ دقیقه ورتکس کنید. (برای باکتری‌های گرم مثبت این زمان می‌تواند حتی تا چندین ساعت افزایش یابد. همچنین بهتر است از از آنزیم لیزواستافین جهت از بین بردن دیواره‌ی باکتری‌های گرم مثبت استفاده شود).
- زمان انکوباسیون در دمای 57 °C برای نمونه بافتی باید حداقل 30 min باشد. در صورت هضم نشدن بافت می‌توان تا یک ساعت یا بیشتر انکوباسیون را ادامه داد و در آخر در صورت وجود بافت هضم نشده آن را جداسازی کرده و بقیه مراحل استخراج را طی نمود.
- مقدار بافت مورد استفاده حدود 25-50 mg می‌باشد. بعد از اضافه کردن Lysis buffer، بافت را با پنس به خوبی له و هموژن کنید.

پروتکل ۱: استخراج DNA از خون، سرم، سلول، CSF، باکتری، ویروس

Step 1 **Lysis**	✓ 300µl نمونه خون یا رسوب سلول را به یک میکروتیوب 1.5 ml منتقل کنید. (در صورتی که حجم نمونه کمتر از این مقدار بود، آن را با PBS به حجم 200µl برسانید). ✓ 400µl از Lysis Buffer 1 و 10µl از Proteinase k را به میکروتیوب اضافه کنید. 10 sec ورتکس کرده و اسپین نمایید. **نکته: عمل ورتکس در این مرحله در لیز و افزایش خلوص DNA بسیار مهم است.** ✓ به مدت 15 min در دمای 57°C انکوبه کنید.
Step 2 **Nucleic Acid Binding**	✓ 140µl از بافر Precipitation اضافه کرده و سپس به مدت 15 sec کاملا مخلوط نمایید. **نکته: به علت احتمال تخریب DNA از ورتکس شدید خودداری کنید.** ✓ محلول داخل میکروتیوب را به ستون (Spin Column) منتقل کرده و به مدت 45 sec با دور 12000rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ کالکشن تیوب را به همراه محتویاتش دور انداخته و ستون را به یک کالکشن جدید منتقل کنید.
Step 3 **Wash**	✓ 600µl از Wash Buffer A را به ستون اضافه کرده و به مدت 45 sec با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ کالکشن تیوب را تخلیه کرده، ستون را به داخل کالکشن تیوب بازگردانید. 500µl از Wash Buffer B را به ستون اضافه کرده و به مدت 45 sec با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ دوباره کالکشن تیوب را تخلیه کرده، ستون را به داخل کالکشن تیوب بازگردانید. برای بار دوم 500µl از Wash Buffer B به ستون اضافه کرده و به مدت 3 min با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
Step 4 **Nucleic Acid Elution**	✓ کالکشن تیوب را به آرامی دور انداخته (مواظب باشید محلول در درون کالکشن تیوپ هنگام اوت کردن به ستون برخورد نکند) و ستون را درون یک میکروتیوب 1.5 ml استریل قرار دهید. ✓ سپس 50µl از Elution Buffer را به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت 2 min در دمای اتاق (یا برای جداسازی بهتر 3-5 min در دمای 65°C) قرار دهید. سپس به مدت 1 min با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید.

پروتکل ۲: استخراج DNA از بافت جانوری

Step 1 **Lysis**	✓ 300µl از Lysis Buffer 2 را به بافت یا پاپ اسمیر اضافه کنید. سپس با هموژنایزر یا یک پنس تا می توانید بافت را هموژن کنید. ✓ 10µl از Proteinase K به میکروتیوب اضافه کرده و 5-10 sec ورتکس و اسپین نمایید. نکته: **عمل ورتکس در این مرحله در لیز و افزایش خلوص DNA بسیار مهم است.** ✓ سپس میکروتیوب را به مدت 1-1.5h ساعت در دمای 57°C انکوبه کرده و هر 30min میکروتیوب را به آرامی سر و ته کنید. ✓ پس از آن به میکروتیوب 300µl از Lysis Buffer 1 اضافه کنید و سپس ورتکس کنید و به مدت 10min دیگر در دمای 57°C انکوبه کنید.(در صورت وجود بافت اضافه و هضم نشده آن را با پنس جدا نمایید).
Step 2 **Nucleic Acid Binding**	✓ 200µl از بافر Precipitation اضافه کرده و سپس به مدت 15 sec کاملا مخلوط نمایید. محلول داخل میکروتیوب را به ستون (Spin Column) منتقل کرده و به مدت 45 sec با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ کالکشن تیوب را به همراه محتویاتش دور انداخته و ستون را به یک کالکشن جدید منتقل کنید.
Step 3 **Wash**	✓ 500µl از Wash Buffer A را به ستون اضافه کرده و به مدت 45 sec با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ کالکشن تیوب را تخلیه کرده، ستون را به داخل کالکشن تیوب بازگردانید. 500µl از Wash Buffer B را به ستون اضافه کرده و به مدت 45 sec با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید. ✓ دوباره کالکشن تیوب را تخلیه کرده، ستون را به داخل کالکشن تیوب بازگردانید. برای بار دوم 500µl از Wash Buffer B به ستون اضافه کرده و به مدت 3 min با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
Step 4 **Nucleic Acid Elution**	✓ کالکشن تیوب را به آرامی دور انداخته (مواظب باشید محلول در درون کالکشن تیوپ هنگام اوت کردن به ستون برخورد نکند) و ستون را درون یک میکروتیوب 1.5 ml استریل قرار دهید. ✓ سپس 50µl از Elution Buffer را به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت 2 min در دمای اتاق (یا برای جداسازی بهتر 3-5 min در دمای 65°C) قرار دهید. سپس به مدت 1 min با دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید.