



# BehPrep **Bacterial** **DNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Gram-positive  
and Gram-negative Bacterial DNA  
Based on spin Column

Cat Number: BP121

Ver: 01

- در دمای اتاق نگهداری شود
- تاریخ انقضاء: سه سال پس از تولید

|         |                                                    |
|---------|----------------------------------------------------|
| 3.....  | محتویات کیت.....                                   |
| 3.....  | شرایط پایداری و نگهداری.....                       |
| 4.....  | معرفی.....                                         |
| 4.....  | توضیحات.....                                       |
| 4.....  | حیطه کاربری.....                                   |
| 4.....  | نکات مهم.....                                      |
| 5.....  | تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند.....   |
| 6.....  | نکات ایمنی.....                                    |
| 6.....  | آماده سازی بافرها.....                             |
| 6.....  | Proteinase K.....                                  |
| 6.....  | Binding Buffer.....                                |
| 7.....  | Lysozyme.....                                      |
| 7.....  | آماده سازی نمونه ها.....                           |
| 7.....  | مایعات زیستی بدن شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر..... |
| 7.....  | نمونه سوآپ چشمی، بینی، حلق و سایر.....             |
| 8.....  | نمونه خلط (Sputum).....                            |
| 8.....  | نمونه Liquid-Based.....                            |
| 9.....  | نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage).....            |
| 9.....  | محیط کشت.....                                      |
| 9.....  | محیط کشت مایع.....                                 |
| 10..... | نمونه ادرار (Urine).....                           |
| 10..... | نمونه مدفوع (Stool).....                           |
| 11..... | فرایند (باکتری گرم منفی).....                      |
| 13..... | فرایند (باکتری گرم مثبت).....                      |
| 13..... | استخراج DNA باکتری از خون و محیط کشت خون.....      |
| 15..... | چالش ها و راه کارها.....                           |
| 18..... | کنترل کیفیت.....                                   |
| 18..... | تاریخچه ویرایش پروتکل.....                         |

## محتویات کیت

| شرایط نگهداری             | 50 واکنش BP121R050 | 10 واکنش BP121R010 | محتویات         | CAT.NO |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------|
| دمای اتاق                 | 50 pcs             | 10 pcs             | Spin Column     |        |
| دمای اتاق                 | 200 pcs            | 40 pcs             | Collection Tube |        |
| دمای اتاق                 | 27 mL              | 7 mL               | Lyso buffer     | BR153  |
| بعد از آماده سازی<br>20°C | 1 vial<br>(50 mg)  | 1 vial<br>(10 mg)  | Lysozyme        | BR155  |
| دمای اتاق                 | 12 mL              | 4 mL               | Binding Buffer  | BR154  |
| دمای اتاق                 | 30 mL              | 7 mL               | WB1 Buffer      | BR102  |
| دمای اتاق                 | 62 mL              | 13 mL              | WB2 Buffer      | BR103  |
| دمای اتاق                 | 11 mL              | 3 mL               | EB Buffer       | BR104  |
| دمای اتاق                 | 12 mL              | 4 mL               | BT Buffer       | BR110  |
| بعد از آماده سازی<br>20°C | 1 vial (20mg)      | 1 vial<br>(4 mg)   | Proteinase k    | BR105  |
| دمای اتاق                 | 2 mL               | 2 mL               | PK Buffer       | BR106  |

## شرایط پایداری و نگهداری

- ستون‌ها در کیسه‌های زیپ دار بسته بندی شده‌اند و در دمای اتاق (18–25 °C) تا پایان تاریخ انقضای کیت پایداری خواهند داشت.
- همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد.
- محلول‌ها را در دمای اتاق (18–25 °C) و یا در حمام آب 37 °C گرم کنید تا رسوبات حل شوند.
- بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشند که هیچ تأثیری در عملکرد آنها نخواهد داشت.
- درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید.
- توجه: نگهداری در دمای 8–2 °C (یخچال) یا 15–25 °C (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص DNA خواهد گذاشت.

## معرفی

کیت استخراج ستونی Behprep Bacterial DNA Extraction Kit با متد آسان و بازدهی بالا جهت خالص سازی DNA باکتری های گرم منفی، گرم مثبت و باکتری های اسید فاست (Acid Fast) طراحی شده است. این کیت شامل استخراج DNA باکتری از نمونه های زیستی بدن مانند خون، سرم، CSF، BAL، ادرار، مدفوع، Liquid Based، Sputum (خلط) و نمونه های کشت داده شده جامد و مایع می باشد. با توجه به فراوانی گونه های باکتریایی و چالش در لایز این نوع نمونه ها، بکارگیری بافر لایز قوی و آنزیم لیزوزیم مناسب در این کیت موجب عملکرد عالی این محصول در استخراج DNA از باکتری ها می شود. میزان DNA استخراج شده با توجه به نوع نمونه و مقدار آن متفاوت است اما به طور کلی بازدهی DNA باکتری استخراج شده در این کیت، از مقدار  $2 \times 10^9$  باکتری،  $5-10 \mu\text{g}$  می باشد.

## توضیحات

برخی از باکتری ها به خصوص باکتری های گرم مثبت (مانند استافیلوکوک ها) نیاز به انکوباسیون با آنزیم های خاص نظیر لیزواستافین (Cat: BR210) برای تجزیه دیواره سلولی سخت و چند لایه خود دارند. در نظر گرفتن آنزیم لیزواستافین قوی و تایم کافی انکوباسیون، باعث شده است تا استخراج DNA در این نمونه ها با بازدهی بالا انجام گیرد. (این آنزیم را می توانید به صورت جدا از شرکت ویستا به ژن خریداری کنید).

## حیطه کاربری

کیت استخراج ستونی Behprep Bacterial DNA Extraction Kit جهت استخراج دستی DNA باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

## نکات مهم : لطفاً قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد-ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً همگن نمایید.
- پروتئیناز K و لیزوزیم را قبل از استفاده ورتکس نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- بعد از هر انتقال مایع به وسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتردار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشاء ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسول، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

## تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند

- سمپلر  $100-1000\ \mu\text{L}$  و  $10-100\ \mu\text{L}$  و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب  $2\ \text{mL}$  (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک (دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $56^{\circ}\text{C}$  و  $70^{\circ}\text{C}$ )
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب  $2\ \text{mL}$

## نکات ایمنی

- بافرهای Binding، BT و WB1 حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورات عمل‌های توصیه‌شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.
- به منظور از بین بردن آلودگی‌ها، بعد از اتمام هر تست از UV فضای آزمایشگاه یا هود لامینار به مدت 20-10 دقیقه استفاده کنید.

## آماده سازی بافرها

### Proteinase K

میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.

- توجه داشته باشید آنزیم پروتئیناز k آماده شده باید در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شود.

|       |                   |                   |
|-------|-------------------|-------------------|
| 20 mg | 4 mg              | مقدار پروتئیناز K |
| 1 mL  | 200 $\mu\text{L}$ | مقدار بافر PK     |

### Binding Buffer

مقدار مناسب اتانول 100 یا 96 درصد را مطابق جدول زیر به بطری حاوی Binding Buffer اضافه کرده و پس از بستن درب بطری به مدت 20 ثانیه به خوبی مخلوط کنید. Binding Buffer آماده مصرف می‌باشد.

- توجه داشته باشید به منظور جلوگیری از رسوب بافر، آن را در دمای اتاق نگه دارید

|       |      |                      |
|-------|------|----------------------|
| 12 mL | 4 mL | مقدار Binding Buffer |
| 21 mL | 7 mL | مقدار اتانول         |

## Lysozyme

مقدار مناسب از بافر Lyso Buffer را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی لیزوزیم اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم لیزوزیم آماده مصرف می‌باشد.

- توجه داشته باشید آنزیم لیزوزیم آماده شده باید در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شود.

|       |             |                  |
|-------|-------------|------------------|
| 50 mg | 10 mg       | مقدار لیزوزیم    |
| 1mL   | 200 $\mu$ L | مقدار LysoBuffer |

سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

## آماده سازی نمونه ها

### مایعات زیستی بدن شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر

1. میزان 1 mL نمونه را در  $5000 \times g$  (7500rpm) به مدت 5 دقیقه رسوب دهید.
2. سپس مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

### نمونه سوآپ چشمی، بینی، حلق و سایر

1. نمونه جمع‌آوری شده را در 2 mL بافر فسفات سالین حاوی ترکیبات ضد قارچ قرار دهید و سپس نمونه را به مدت 2 تا 3 ساعت در دمای اتاق ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) انکوبه نمایید.
2. نمونه را به وسیله سانتریفیوژ با حداکثر سرعت، رسوب دهید. سپس مایع رویی را خارج کنید.

3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

### نمونه خلط (Sputum)

1. مقدار 1 mL نمونه خلط و برابر با حجم آن، محلول (1M) NaOH را اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید.
2. نمونه را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا قابل پپیت کردن شود و سپس در (7500rpm)  $5000 \times g$  به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. مایع رویی را خارج کنید.
4. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

### نمونه Liquid-Based

1. جهت تغلیظ نمونه میزان 1-5 mL از نمونه را در (7500rpm)  $5000 \times g$  به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کرده، مایع رویی را کاملاً خارج کنید به صورتی که فقط رسوب سلولی باقی بماند.
  - چنانچه در آزمایشگاه مولکولی خود سانتریفیوژ لوله فالكون موجود ندارید به منظور تغلیظ، میزان 2 mL نمونه را در میکروتیوب در دور (7500rpm)  $5000 \times g$  سانتریفیوژ نمایید. در صورت کافی نبودن رسوب تشکیل شده، این فرآیند را تکرار کنید.
  - از آنجایی که غلظت و کیفیت نهایی DNA استخراج شده وابسته به نحوه نمونه گیری و میزان سلول های موجود در نمونه Liquid-based می باشد، نیاز است میزان رسوب سلولی قابل توجهی پیش از شروع فرایند استخراج تشکیل شود.
2. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.



## نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)

1. حداقل میزان 10 mL از نمونه BAL را درون فالكون 50 mL يا 15 mL انتقال داده و در  $g \times 300$  به مدت 10-5 دقيقه سانتریفیوژ نمایید.
  2. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست آمده را در 1 mL بافر (1X) PBS حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید. تیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا رسوب کاملاً حل شود، سپس در  $g \times 10,000$  به مدت 5 دقيقه سانتریفیوژ کنید.
  3. مایع رویی را خارج کنید.
  4. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.
- توجه:** نمونه‌های BAL کمتر از 10 mL، تا 70% بازده استخراج DNA باکتریایی را پایین می‌آورد.

## محیط کشت

1. مقدار  $2 \times 10^9$  باکتری را به وسیله لوپ از محیط کشت جدا کرده در 200  $\mu$ L بافر (1X) PBS حل کنید.
2. میکروتیوب را در بالاترین سرعت به مدت 1 دقيقه سانتریفیوژ کنید.
3. سپس مایع رویی را بدون برهم خوردن رسوب سلولی خارج کنید.
4. و در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

## محیط کشت مایع

1. میزان 1 mL از محیط کشت باکتریایی (مقدار  $2 \times 10^9$  باکتری) را به درون میکروتیوب 2 mL انتقال دهید و در بالاترین سرعت به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ نمایید.
2. سپس مایع رویی را خارج کنید.

3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

### نمونه ادرار (Urine)

1. مقدار 2-1 mL نمونه ادرار را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید و در دور 5000x g (7500rpm) به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
2. سپس مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

### نمونه مدفوع (Stool)

1. مقدار 50 mg نمونه مدفوع را با 500 µl بافر PBS (1X) کاملاً مخلوط کنید و ورتکس کنید.
2. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
3. میکروتیوب را در دور 5000x g (7500rpm) به مدت 15 ثانیه سانتریفیوژ کنید. (رسوبات جامد مدفوع در این مرحله حذف می شوند)
4. بدون خارج کردن رسوب جامد، مایع رویی را به یک میکروتیوب 2 mL جدید منتقل کنید.
5. میکروتیوب را در دور 5000x g (7500rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
6. مایع رویی را خارج کنید.
7. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

## فرایند (باکتری گرم منفی)

1. به رسوب باکتریایی میزان 200  $\mu\text{L}$  بافر BT به همراه 20  $\mu\text{L}$  پروتئیناز K اضافه کنید. به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
2. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در دمای  $56^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
3. سپس میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 2 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
4. میزان 550  $\mu\text{L}$  بافر Binding آماده شده را به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
5. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و در (8000 rpm)  $6000 \times g$  به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
6. میزان 500  $\mu\text{L}$  بافر WB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm)  $6000 \times g$  به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. میزان 600  $\mu\text{L}$  بافر WB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm)  $6000 \times g$  به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
8. بار دیگر مرحله 7 را تکرار نمایید.
9. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
- توصیه می‌شود در مرحله 8 کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) انتقال دهید.

- هرگونه انتقال بافر WB2 در این مرحله می‌تواند به عنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می‌توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.

10. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز قرار دهید. 70  $\mu$ L از بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده است، به مرکز غشاء ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس در (8000 x g rpm) 6000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

- استفاده کمتر از 70  $\mu$ L بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما میزان DNA استخراج شده را کمی کاهش می‌دهد.
  - شستشوی غشاء با حجم کمتر از 50  $\mu$ L بافر EB توصیه نمی‌شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می‌شود.
  - به طور کلی بازده نهایی DNA استخراج شده 5-15  $\mu$ g با کیفیت A260/280 ratio=1.8-1.9 می‌باشد.
  - به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
  - انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
  - اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20-50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C- ذخیره نمایید.

## فرایند (باکتری گرم مثبت)

1. به رسوب باکتریایی میزان 500  $\mu\text{L}$  بافر Lyso Buffer و 20  $\mu\text{L}$  آنزیم لیزوزیم 50 mg/ml اضافه کنید. و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند.
2. محلول را حداقل به مدت 1 ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
3. محلول را به مدت 3 دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفیوژ کنید و سپس مایع رویی را خارج کنید.
4. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از باکتری گرم منفی، از مرحله 1 عمل نمایید.

## استخراج DNA باکتری از خون و محیط کشت خون

### باکتری گرم منفی

1. میزان 100  $\mu\text{L}$  خون و یا محیط کشت خون را درون یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز بریزید.
2. میزان 100  $\mu\text{L}$  بافر BT به همراه 20  $\mu\text{L}$  پروتئیناز K اضافه کنید. به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
3. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در  $56^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
4. سپس میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 2 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

5. میزان  $450\ \mu\text{L}$  بافر Binding آماده شده را به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
6. در ادامه مطابق با پروتکل فرایند باکتری گرم منفی، از مرحله 5 عمل نمایید.

### باکتری گرم مثبت

1. میزان  $100\ \mu\text{L}$  خون و یا محیط کشت خون را درون یک میکروتیوب  $1.5\ \text{mL}$  تمیز بریزید.
2. میزان  $100\ \mu\text{L}$  بافر Lyso Buffer و  $20\ \mu\text{L}$  آنزیم لیزوزیم  $50\ \text{mg/ml}$  را به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند.
3. محلول را به مدت 30 دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
4. میزان  $100\ \mu\text{L}$  بافر BT به همراه  $20\ \mu\text{L}$  پروتئیناز K را به میکروتیوب اضافه کنید. به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
5. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در  $56^\circ\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
6. سپس میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای  $70^\circ\text{C}$  انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 2 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
7. میزان  $450\ \mu\text{L}$  بافر Binding آماده شده را به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
8. در ادامه مطابق با پروتکل فرایند باکتری گرم منفی، از مرحله 5 عمل نمایید.

## چالش‌ها و راه کارها

| مشاهدات                       | دلایل محتمل                                        | راه کارها                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| غلظت پایین DNA<br>استخراج شده | کافی نبودن نمونه                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>با مقدار بیشتر نمونه تست را دوباره تکرار کنید.</li> <li>بافر الوشن حتما باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود.</li> <li>زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید.</li> <li>انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید.</li> </ul>                                                                                                  |
|                               | لایز نامناسب نمونه                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>زمان انکوباسیون را رعایت کنید.</li> <li>برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید.</li> <li>اگر نمونه به خوبی لایز نشده است زمان انکوباسیون با بافر BT را افزایش دهید و یا بصورت Overnight انکوبه نمایید.</li> </ul>                                                                        |
|                               | محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است. | <ul style="list-style-type: none"> <li>زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید.</li> <li>حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید.</li> <li>مقدار زیادی از نمونه استفاده کرده اید.</li> <li>قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.</li> </ul>                                                 |
|                               | عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه جدید تکرار کنید.</li> <li>آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود.</li> <li>آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید.</li> <li>پس از اضافه کردن پروتئیناز K به نمونه فوراً آن را پیپتاژ کنید.</li> </ul> |
|                               | استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول              | <ul style="list-style-type: none"> <li>استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                               | مسدود شدن غشاء ستون                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید.</li> <li>• از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید.</li> <li>• قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |                                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند، بافرها را به دمای اتاق برسانید.</li> <li>• از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید.</li> <li>• از مخلوط شدن نمونه ها با بافر Binding,BT و اتانول اطمینان حاصل نمایید.</li> <li>• برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می شود.</li> <li>• از عدم تماس غشای ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید.</li> <li>• بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید.</li> <li>• از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید.</li> <li>• کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم.</li> <li>• به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده سازی باید در <math>-20^{\circ}\text{C}</math> نگهداری شود.</li> </ul> | <p>آلودگی پروتئینی</p> | <p>پایین بودن نسبت<br/>A260/A280</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• در حین فرآیند ستون ها را به آرامی جا به جاکنید.</li> <li>• درب ستون ها را به آرامی باز و بسته نمایید.</li> <li>• از انتقال حباب های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <p>آلودگی نمکی</p>     | <p>پایین بودن نسبت<br/>A260/A230</p> |



|                                                                                                                                                                                                                                                     |                    |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.</li> </ul>                                                                                                                                                |                    |                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• بعد از اتمام هر آزمایش، هود آزمایش و تمام دستگاه های استفاده شده را با 10% bleach ضدعفونی کنید.</li> <li>• محیط آزمایش حتما دارای فیلتراسیون مناسب و کافی باشد.</li> </ul>                                 | آلودگی فضای آزمایش |                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با binding buffer، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید.</li> <li>• از نمونه نگهداری شده با مدت زمان زیاد استفاده نکنید.</li> </ul> | ورتكس پیایی        | قطعه قطعه شدن DNA |

## کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت‌های (LOT NO.) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به‌ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرار گرفته‌است.

## تاریخچه ویرایش پروتکل

| شماره ویرایش | توضیحات        | تاریخ   |
|--------------|----------------|---------|
| 00           | نسخه جدید      |         |
| 01           | افزایش حجم WB1 | 1404/07 |

| نماد                                                                                | مفهوم                         | نماد                                                                                | مفهوم                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|   | کاربرد تشخیصی                 |   | محدودیت دمایی                   |
|  | اطلاعات کارخانه               |  | تعداد تست                       |
|  | تاریخ تولید                   |  | تاریخ انقضا                     |
|  | از تابش نور دور نگه داشته شود |  | مخاطرات زیستی                   |
|  | احتیاط                        |  | جای دستورالعمل استفاده از محصول |
|  | شماره سری ساخت                |  | کد کس                           |

## **شرکت دانش بنیان ویستا زیست فناوری به ژن**

آدرس: شیراز، منطقه ویژه اقتصادی، فاز دوم، جنب میدان صادرات

شماره تماس: 09053633840 شماره پشتیبانی فنی: 09170093664

کدپستی: 7159115468 وبسایت: [www.BehGene.com](http://www.BehGene.com)



**BEHGENE**