استخراج HPV DNA از LBC

آماده سازی نمونه برای استخراج DNA از نمونه های LBC

قبل از شروع استخراج DNA، ظرف حاوی LBC (حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول LBC) را به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ورتکس کنید. سپس با رعایت کامل اصول ایمنی کار با نمونه های بیولوژیک و توصیه های عمومی مذکور در صفحه ۴، مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول LBC را برداشته و به یک تیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری منتقل نمایید. پروتکل استخراج DNA را طبق مراحل صفحه ۹ شروع کنید.

استخراج HPV DNA از LBC

در این پروتکل، مراحل استخراج DNA از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه های LBC شرح داده می شود. در این پرتکل، مرحله تغلیظ سلولی و یک شستشو قبل از استخراج و خالص سازی DNA انجام می شود.

قبل از شروع

- ترموبلاک را بر روی ۹۵ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- ذرات مگنتیک E1 را به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید تابه خوبی مخلوط و یکنواخت شود.
- مقدار کافی از مخلوط بافر CB و ذرات مگنتیک E1 به شرح زیر آماده کنید:
  - مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CB به یک لوله تمیز منتقل کنید.
  - مقدار ۳۰ میکرولیتر ذرات مگنتیک E1 به بافر CB اضافه کنید. (**نکته:** حجم ذرات مگنتیک را تغییر ندهید. این ذرات همیشه در حجم ۳۰ میکرو لیتر باید استفاده شود و ارتباطی به حجم نمونه ندارد.)
  - مخلوط فوق را به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا کاملا یکنواخت شود.

پروتکل

۱- مخلوط بافر CB و ذرات مگنتیک E1 را طبق بالا صفحه قبل در یک لوله ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری تمیز آماده کنید.

۲- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از LBC را به مخلوط مرحله ۱ اضافه کنید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا به خوبی مخلوط و یکنواخت شود. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۳- لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. هر یک دقیقه، لوله ها را سرو-و-ته کنید تا محلول یکنواخت باقی بماند. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۴- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۵- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۶- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر CB به تیوب اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۷- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۸- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۹- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر CL به تیوب اضافه کنید. مقدار ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت (20mg/ml) به لوله اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۰- نمونه را در ترموبلاک (ترجیحا ترمومیکسر) با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۱- نمونه را به مدت ۵ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۲- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۱۳- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول شفاف شده را به یک لوله ی تمیز منتقل نمایید.

۱۴- می توانید DNAی استخراج شده را تا ۲ ساعت در یخچال نگهدارید. در صورتی که آزمایش بعدی با فاصله ی بیشتر از ۲ ساعت انجام می شود، DNA استخراج شده را در دمای ۲۰- ذخیره کنید.

نکته: پروتکل کیت *tBioCare*™ DNA Extraction Kit برای استخراج HPV DNA از LBC که در این کتابچه راهنما آمده، با کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit صحه گذاری شده است. برای اطلاعات بیشتر به کتابچه راهنمای کیت فوق مراجعه فرمایید.