tBioMag™ Circulating DNA Extraction Kit
Short Protocol - 1 mL Plasma/Serum
(very short fragment DNA)

پرتکل استخراج از ۱ میلی لیتر سرم/پلاسما
(برای جداسازی قطعات بسیار کوچک DNA)

برای استخراج ccfDNA از یک میلی لیتر پلاسما یا سرم در این پروتکل به ایزوپروپانل مطلق (۱۰۰٪) نیاز می باشد که در محتوای کیت نیست و باید جداگانه تهیه شود.

قبل از شروع:

- انکوباتور را بر روی ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- بافر CFDW 2 را طبق دستورالعمل آماده سازی مواد در صفحه ۴ کتابچه راهنما آماده کنید.
- تیوب حاوی tBioBead CF را قبل از استفاده شیک و یا ورتکس کنید تا به طور کامل یکنواخت شوند.

پروتکل:

۱- مقدار ۱ میلی لیتر پلاسما یاسرم را به یک لوله ی ۱۵ میلی لیتری اضافه کنید.

نکته مهم: اگر مقدار سرم یا پلاسما کمتر از ۱ میلی لیتر است، با اضافه کردن بافر CFDE حجم آن را به ۱ میلی لیتر برسانید.

۲- مقدار ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K به لوله اضافه کنید.
۳- مقدار ۶۷ میکرو لیتر از بافر CFDL اضافه کنید.
۴- با ورتکس کردن لوله در حد اکثر سرعت، محتوای آن را به خوبی مخلوط کنید.
۵- لوله را در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کنید.

نکته مهم: هر ۱۰ دقیقه یکبار لوله را ورتکس کنید و یا از انکوباتور شیکردار استفاده کنید.
۶- لوله را از انکوباتور خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

نکته مهم: این مرحله بسیار اهمیت دارد تا دمای نمونه کاهش یافته و به دمای اتاق برسد.

۷- بافر CFDB را با توجه به جدول زیر به نمونه اضافه کنید:

پروتکل ۱ میلی لیتر پلاسما	مقدار بافر CFDB	ایزوپروپانل مطلق	مقدار کل به ازای هر نمونه ی پلاسما
قطعات کوچک	1 mL	1 mL	2 mL
قطعات کوچک (بهبود عملکرد)	1.5 mL	0.5 mL	2 mL
قطعات کوچک (بهترین عملکرد)	2 mL	-	2 mL

۸- نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.
۹- مقدار ۱۰ میکرو لیتر tBioBead CF به نمونه اضافه کنید. نمونه را با سر و ته کردن لوله حداقل ۱۰ بار به خوبی مخلوط کنید.
۱۰- نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و به طور مداوم مخلوط کنید. مخلوط کردن در این مدت ۱۰ دقیقه باید یا با شیکر و یا باراکر انجام شود.

نکته مهم: به هیچ عنوان از ورتکس استفاده نکنید زیرا با تشکیل کف، موجب کاهش اثربخشی استخراج می شود. سرعت مخلوط کردن در شیکر و یا راکر باید به گونه ای تنظیم شود که ذرات مگنتیک در محلول باقی مانده و رسوب نکنند.

۱۱- مقدار ۱ میلی لیتر از لیزت را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۱۲- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۳- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
۱۴- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، باقیمانده لیزت از مرحله ۱۰ را به لوله ی ۱/۵ میلی لیتری مرحله ی قبل منتقل کنید و تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۵- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
۱۶- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 1 به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
۱۷- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.

نکته مهم: برای بهترین نتیجه، ضروری است که ذرات مگنتیک در این مرحله به خوبی یکنواخت شوند.

۱۸- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۹- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
۲۰- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر CFDW 1) تکرار کنید.
۲۱- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 2 به لوله اضافه کنید.
۲۲- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.
۲۳- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۲۴- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
۲۵- مراحل ۲۰ تا ۲۳ را (شستشو با بافر CFDW 2) تکرار کنید.

۲۶- درب لوله را بسته و به مدت ۳۰ ثانیه از روی رک مگنتیک بردارید.
۲۷- لوله را مجددا بر روی رک مگنتیک قرار دهید و تا جذب کامل ذرات مگنتیک به جداره لوله صبر کنید.
۲۸- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و باقیمانده محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
۲۹- درب لوله را باز گذاشته و به مدت ۲۵ دقیقه صبر کنید تا ذرات مگنتیک کاملا خشک شوند.
۳۰- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، مقدار ۳۰ تا ۶۰ میکرو لیتر بافر CFDE به لوله اضافه کنید. درب لوله را بسته و آن را از روی رک مگنتیک بردارید.
۳۱- لوله را به مدت ۵ دقیقه ورتکس کنید.
۳۲- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۳۳- محلول شفاف حاوی ccfDNA را به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۳۴- نمونه را در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره کنید.