tBioMag™ Circulating DNA Extraction Kit - IFU

برای استخراج ccfDNA از سرم و پلاسمای انسانی

Version 2

RUO

For research use only

REF **611300-50**

Zist Tashkhis Farda (tBioDx) Co., No. 2, 4th Dd. End, Seoul St., Tehran, Iran

سرفصل مطالب

کاربرد کیت	3
محتوای کیت	3
شرایط نگهداری	3
مواد و ابزارهایی که مصرف کننده باید تهیه کند	3
آماده سازی مواد	4
اطلاعات ایمنی	4
توصیه های عمومی	4
کار با نمونه های بیولوژیک	6
کنترل کیفی	6
مقدمه	6
اصول و روش کار	6
نکات مهم	8
پروتکل استخراج از ۱ میلی لیتر پلاسما/سرم	9
پروتکل استخراج از ۲ میلی لیتر پلاسما/سرم	11
پروتکل استخراج از ۱ میلی لیتر پلاسما/سرم (با carrier RNA)	13
پروتکل استخراج از ۲ میلی لیتر پلاسما/سرم (با carrier RNA)	15
پروتکل استخراج از ۱ میلی لیتر پلاسما/سرم (برای جداسازی قطعات بسیار کوچک DNA)	17
توصیه هایی برای جداسازی و نگهداری پلاسما	20
عملکرد کیت	21
راهنمای رفع مشکلات	22
اطلاعات سفارش	24
علائم	25

کاربرد کیت:

کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit برای استفاده در آزمایشهای بیولوژی مولکولی ساخته شده است. این کیت برای تشخیص، پیشگیری و یا درمان بیماری نیست. این محصول برای استخراج DNA آزاد از سرم و پلاسما طراحی شده است.

محتوای کیت:

***tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit (50)**	**Catalog no.: 611300-50**
نام محصول موجود در کیت	تعداد یا مقدار
tBioBead CF	1 mL
Buffer CFDL	7 mL
Buffer CFDB	100 mL
Buffer CFDW 1	100 mL
Buffer CFDW 2 (concentrated)	21 mL
Buffer CFDE	30 mL
Proteinase K	1.5 mL

شرایط نگهداری:

کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit در دمای اتاق حمل می گردد. به محض دریافت کیت، tBioBead CF را در یخچال نگهداری کنید. کلیه مواد در شرایط فوق و تا پایان تاریخ مصرف که بر روی جعبه محصول درج شده است قابل استفاده می باشند.

مواد و ابزارهایی که مصرف کننده باید تهیه کند:

برای استخراج ccfDNA از1 mL پلاسما یا سرم به مواد و ابزار زیر نیاز است:

- اتانل ۱۰۰٪
- رک مگنتیک برای جداسازی ذرات مگنت مناسب برای لوله های ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری
- ورتکس
- شیکر و یا راکر
- انکوباتور ۶۰ درجه سانتیگراد
- میکرو تیوب ۱/۵ میلی لیتری
- تیوب ۱۵ میلی لیتری

برای استخراج ccfDNA از بیش از 1 mL پلاسما یا سرم به رک مگنتیک برای جداسازی ذرات مگنت مناسب برای لوله های ۱۵ میلی لیتری نیز نیاز است.

آماده سازی مواد:

قبل از استفاده از کیت، باید ۸۴ میلی لیتر اتانل ۱۰۰٪ به بافر CFDW 2 اضافه نموده و به خوبی مخلوط نمایید.

اطلاعات ایمنی:

هنگام کار با مواد شیمیایی حتما روپوش مناسب پوشیده، از دستکش نیتریل یا وینیل استفاده کرده و عینک محافظ چشم استفاده کنید. برای اطلاعات بیشتر به برگ اطلاعات ایمنی (MSDS) مراجعه نمایید. این اطلاعات به صورت آنلاین و در صفحه محصول در www.tbiodx.com در دسترس شما قرار دارد.

احتیاط	مراقب باشید که محلولهای سفید کننده (حاوی هیپوکلریت سدیم) یا اسیدی به مخزن حاوی بافرهای CFDB و CFDW 1 اضافه نشود.

بافرهای CFDB و CFDW 1 حاوی نمکهای گوانیدین بوده و می توانند واکنش شدیدی با محلولهای حاوی هیپوکلریت سدیم بدهند.

اگر محلولهای حاوی بافرهای فوق بر روی میز کار ریخت، آن را با محلولهای تمیزکننده آزمایشگاهی و آب پاک کنید. اگر احتمال وجود عوامل عفونی در محلول ریخته شده بر روی میز کار میرود، سطح فوق را ابتدا با محلولهای حاوی دترجنت و پس از آن با آب تمیز کنید، سپس از محلول ۱٪ (v/v) هیپوکلریت سدیم برای ضد عفونی کردن سطح فوق استفاده کنید.

توصیه های عمومی:

از آنجایی که در بسیاری از آزمایشهایی که بر روی DNA یا RNA استخراج شده از مواد بیولوژیکی انجام می شود از تکنیک PCR استفاده می شود، به کار گیری و رعایت اصول صحیح انجام آزمایش الزامی است که به برخی از آنها اشاده می شود:

۱- همیشه از دستکش های (وینیل یا نیتریل) یکبار مصرف و فاقد پودر استفاده کنید.

۲- تمام نمونه های بیولوژیکی انسانی و یا حیوانی می توانند بالقوه حاوی میکرو ارگانیسم های عفونی باشد. هنگام کار با مواد بیولوژیکی حتما عینک محافظ پوشیده و مراحل استخراج اسیدهای نوکلئیک را زیر هود لامینار کلاس ۲ انجام دهید.

۳- نمونه ی مورد آزمایش، کیت ها و محلول های آزمایش را از آلودگی میکروبی و نوکلئازها (DNAse و RNAse) محافظت کنید. نوکلئازها می توانند موجب تخریب و تجزیه الگوی واکنش (DNA یا RNA) شوند.

۴- آز آلودگی نمونه ی مورد آزمایش به DNA نمونه های دیگر (cross contamination) یا محصول PCR (carryover) محافظت کنید. برای این منظور:

- در حین کار با نمونه ی بیولوژیک، از تماس دستکش به دهانه لوله ها هنگامی که درب لوله ها باز است، یا هنگامی که درب لوله ها را باز می کنید، بپرهیزید. در صورت تماس، بلافاصله دستکش خود را تعویض کنید.
- در صورت کار بر روی چند نمونه ی بیولوژیک به طور همزمان، فاصله فیزیکی مناسب بین لوله ها بگذارید و ترجیحا درب لوله ها را به نوبت باز کرده و پس از انجام پیپتینگ درب آن را بسته و پیپتینگ نمونه ی بعدی را آغاز کنید.
- در صورتیکه باید درب لوله های نمونه در حین آزمایش باز باشند، در هنگام پیپتینگ مراقب باشید تا «ذرات معلق» (aerosol) ایجاد نکنید.
- در صورت نیاز به سانتریفیوژ، مطمئن شوید که درب لوله های آزمایش کاملا بسته هستند.
- در صورتیکه در بخشی از آزمایش، محلول داخل لوله ها باید با سر-و-ته کردن لوله ها یا ورتکس مخلوط شوند، هیچگاه درب آنها را پیش از یک سانتریفیوژ کوتاه باز نکنید.
- در صورتیکه در بخشی از آزمایش، محلول داخل لوله ها باید در دمای بالاتر از اتاق انکوبه شوند (مثلا ۶۰ درجه یا بیشتر در مراحل استخراج اسیدهای نوکلئیک)، هیچگاه درب آنها را پیش از یک سانتریفیوژ کوتاه باز نکنید.
- در هنگام کار با محلول های غلیظ (viscous)، مانند بافرهای لیز کننده و یا محلول های حاوی دترجنت، از پیپتینگ معکوس (reverse pipetting) برای انتقال محلول استفاده کنید تا از تشکیل حباب و ذرات معلق جلوگیری شود.
- هنگام کار با محلول هایی که غلظت بالایی ندارند، مراقب باشید تا در هنگام پیپتینگ (چه مکش و چه تخلیه ی نوک سمپلر)، حباب هوا و یا ذرات معلق (aerosol) ایجاد نکنید.
- پس از هر پیپتینگ محلول حاوی نمونه ی بیولوژیک یا اسید نوکلئیک، نوک سمپلر را به آرامی در ظرف مخصوص دور بیاندازید.
- هیچگاه لوله های PCR را پس از اتمام آزمایش به اتاق استخراج و یا آماده سازی محلول ها منتقل نکنید.

۴- همیشه از نوک سمپلر های فیلتر دار و یکبار مصرف عاری از نوکلئازها (DNase/RNase-Free) استفاده کنید.

۵- از رقیق کردن مواد موجود در کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit بپرهیزید چون موجب عدم کارایی کیت خواهد شد.

۶- مواد موجود در کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit را با مواد مشابه از کیت دیگر جا به جا نکنید.

۷- از تغییر دماها یا زمان های مراحل استخراج در کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit بپرهیزید زیرا موجب عدم کارایی یا کاهش عملکرد آن خواهد شد.

۸- از کیتی که تاریخ آن گذشته است استفاده نکنید.

۹- در صورتیکه حجم پلاسما یا سرم مورد آزمایش کمتر از ۱ یا ۲ میلی لیتر بود، حجم آن را با بافر CFDE و یا PBS به حجم ۱ یا ۲ میلی لیتر برسانید در غیر اینصورت، غلظت لازم برای بافر لیزکننده (CFDL) تغییر کرده و نه تنها کارایی لیز را کاهش می دهد بلکه ممکن است تخریب نوکلئازها را نیز ناکارآمد کند.

کار با نمونه ی بیولوژیک

احتیاط	تمام نمونه های بیولوژیک باید به طور بالقوه مواد عفونی تلقی شوند.

کنترل کیفی:

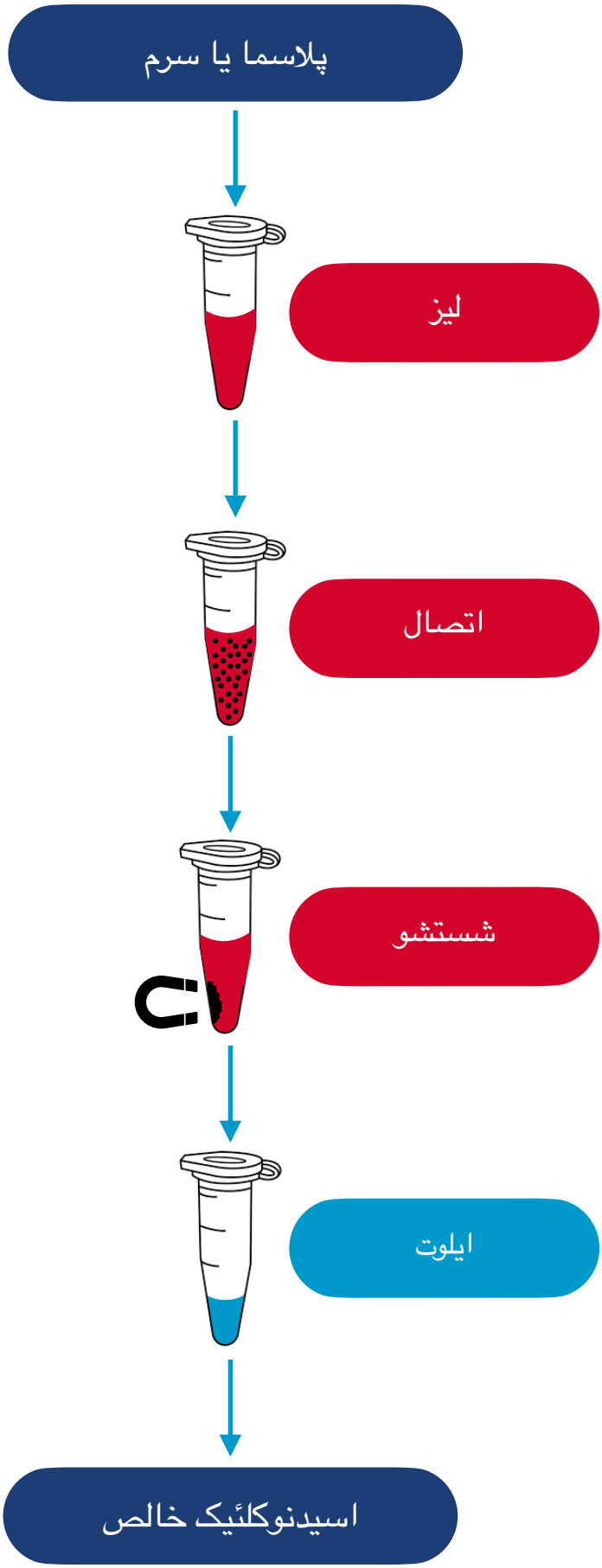
مطابق با سیستم مدیریت کیفیت (ISO) شرکت زیست تشخیص فردا، هر سری تولید (Lot) از کیت tBioMag™ Circulating DNA Extraction Kit با آزمایشهای خاص و از پیش تعریف شده مورد ارزیابی قرار می گیرند تا از کیفیت آنها اطمینان حاصل شود.

مقدمه:

قطعات DNA خارج سلولی اختصاصی تومورها در خون و DNA جنین در خون مادر معمولا به صورت قطعات کوچک زیر ۱۰۰۰ باز وجود دارند. از آنجایی که ccfDNA می تواند انعکاسی از کل تومور باشد، توجه ویژه ای به پتانسیل آن در مصارف کلینیکی را به خود جلب کرده و امروزه بسیاری از محققین و آزمایشگاه ها از «بیوپسی مایع» (Liquid biopsy) جهت شناسایی جهش ها، فیوژن ها و ... استفاده می کنند. مقدار DNAی آزاد در پلاسما، سرم و سایر مایعات بدن معمولا کم بوده و جداسازی آن یک چالش است. کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit قادر به جداسازی و خالص سازی مقادیر کم ccfDNA از سرم و پلاسما می باشد. با توجه به مقدار بسیار کم اسیدنوکلئیک آزاد در سرم و پلاسما (به طور معمول بین ۱ تا ۱۰۰ نانوگرم از ccfDNA در هر میلی لیتر سرم یا پلاسما)، این کیت امکان استخراج ccfDNA از ۱ تا ۴ میلی لیتر سرم یا پلاسما و elute کردن آن در ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر فراهم کرده که بیشترین تغلیظ ممکن را به ارمغان می آورد.

اصول و روش کار:

کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit شامل چهار مرحله لیز، اتصال، شستشو و ایلوت (حل کردن DNA در بافر مخصوص) می باشد. روش کار بسیار آسان و بدون نیاز به استفاده از سیستم وکیوم و پمپ است. در این کیت می توان از نمونه های متعددی به طور همزمان DNA استخراج کرد. در این کیت می توان از ۱ تا ۴ میلی لیتر پلاسما به عنوان نمونه ی آغازین آزمایش استفاده کرد.


پلاسما یا سرم
لیز
اتصال
شستشو
ایلوت
اسیدنوکلئیک خالص

قطعات آزاد DNA در محلولهای بیولوژیکی چون پلاسما و سرم معمولا به پروتئین ها متصل و یا در وزیکولهایی محصور شده اند، بنابراین برای آزاد کردن آنها به یک مرحله ی لیز موثر نیاز است که همزمان بتواند DNaseها و RNaseها را غیر فعال کند. به همین منظور مرحله ی لیز در حضور پروتئیناز K و بافر CFDL و در دمای بالا صورت میگیرد که علاوه بر آزادسازی DNA از پروتئینها، لیپیدها و وزیکولها، اثر نوکلئازها را نیز مهار میکند.

با افزودن بافر CFDB شرایط اتصال اسیدهای نوکلئیک به tBioBead CF فراهم میشود. این لیزت به رک مگنتیک منتقل می گردد تا ذرات مگنت که ccfDNA به آن متصل است را جذب کرده و شرایط شستشوی ذرات فراهم گردد. با شستشوی ذرات در شرایطی که در میدان مغناطیسی داخل رک قرار دارند، نمکها، پروتئینها و سایر مهارکننده ها شستشو و از ذرات مکنتیک جدا می شوند. و در نهایت با افزودن بافر CFDE می توان ccfDNA را از ذرات مگنت جدا و برای آزمایش های بعدی استفاده کرد. این مرحله ی ایلوت را میتوان در ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از بافر CFDE انجام داد. ایلوت کردن در ۳۰ میکرو لیتر از بافر CFDE، بیشترین حالت تغلیظ ccfDNA را به دست می دهد که در آزمایشهایی که حجم کمی از ccfDNA باید به آنها اضافه شود اهمیت پیدا می کند. در آزمایشهایی که حجم زیادی از ccfDNA لازم است، می توان مرحله ی ایلوت را در حجمهای بیشتری از بافر CFDE انجام داد. برای استفاده ی کمتر از ۲ ساعت، میتوان ایلوت را در شرایط ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد، در غیر اینصورت، باید DNA ایلوت شده را در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کرد.

مقدار ccfDNA جدا شده از نمونه های بیولوژیک معمولا کمتر از ۱ میکرو گرم بوده و بنابراین اندازه گیری آن با اسپکتروفتومتر مشکل می باشد. برای اندازه گیری مقدار ccfDNA ایلوت شده بهتر است از روش کمی اندازه گیری DNA ژنومیک انسان با real-time PCR استفاده کرد. در غیر این صورت روشهای فلوریمتری که رنگ های خاص برای اتصال به DNA را به کار می برند استفاده کنید. مقدار ccfDNA استخراج شده با استفاده از کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit در نمونه های مختلف با توجه به عوامل مختلفی چون مرحله ی بیماری متفاوت است.

در این کتابچه ی راهنما، پروتکلهای استخراج و خالص سازی ccfDNA از ۱ و ۲ میلی لیتر پلاسما و سرم تشریح شده است. برای استخراج از حجم بیشتر از ۲ میلی لیتر پلاسما یا سرم (تا ۴ میلی لیتر) به بخش پشتیبانی شرکت تماس بگیرید. از آنجایی که این پروتکلها قابلیت خودکار سازی بر روی بسیاری از دستگاه های استخراج اتوماتیک را دارند، می توانید از بخش فنی شرکت زیست تشخیص فردا در این خصوص مشاوره بگیرید.

نکات مهم:

قبل از اولین استفاده از کیت، حتما به بافر CFDW 2 به مقدار ۴۲ میلی لیتر اتانل ۱۰۰٪ اضافه نمایید و به خوبی مخلوط کنید. پس از هر بار استفاده از این بافر،از بسته بودن کامل درب آن اطمینان پیدا کنید.

پرتکل استخراج از ۱ میلی لیتر سرم/پلاسما

قبل از شروع:

- انکوباتور را بر روی ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- بافر CFDW 2 را طبق دستورالعمل آماده سازی مواد در صفحه ۴ 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- مقدار ۱ میلی لیتر بافر CFDB به نمونه اضافه کنید. نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.
۸- 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.
۹- 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.

۱۰- مقدار ۱ میلی لیتر از لیزت را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۱۱- 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.
۱۲- 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.

۱۳- 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.
۱۴- 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.
۱۵- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 1 به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
۱۶- 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.

۱۷- 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.
۱۸- 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.
۱۹- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر CFDW 1) تکرار کنید.
۲۰- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 2 به لوله اضافه کنید.
۲۱- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.
۲۲- 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.
۲۳- 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.
۲۴- مراحل ۲۰ تا ۲۳ را (شستشو با بافر CFDW 2) تکرار کنید.
۲۵- درب لوله را بسته و به مدت ۳۰ ثانیه از روی رک مگنتیک بردارید.
۲۶- لوله را مجددا بر روی رک مگنتیک قرار دهید و تا جذب کامل ذرات مگنتیک به جداره لوله صبر کنید.
۲۷- 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.
۲۸- درب لوله را باز گذاشته و به مدت ۲۵ دقیقه صبر کنید تا ذرات مگنتیک کاملا خشک شوند.
۲۹- 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.
۳۰- لوله را به مدت ۵ دقیقه ورتکس کنید.
۳۱- 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.
۳۲- محلول شفاف حاوی ccfDNA را به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۳۳- نمونه را در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره کنید.

پرتکل استخراج از ۲ میلی لیتر سرم/پلاسما

قبل از شروع:

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

پروتکل:

۱- مقدار ۲ میلی لیتر پلاسما یاسرم را به یک لوله ی ۱۵ میلی لیتری اضافه کنید.

نکته مهم: اگر مقدار سرم یا پلاسما کمتر از ۲ میلی لیتر است، با اضافه کردن بافر CFDE حجم آن را به ۲ میلی لیتر برسانید.

۲- مقدار ۳۰ میکرو لیتر پروتئیناز K به لوله اضافه کنید.
۳- مقدار ۱۳۵ 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 ۲۵ 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- مقدار ۲ میلی لیتر بافر CFDB به نمونه اضافه کنید. نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.
۸- مقدار ۲۰ میکرو لیتر tBioBead CF به نمونه اضافه کنید. نمونه را با سر و ته کردن لوله حداقل ۱۰ بار به خوبی مخلوط کنید.
۹- 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.

۱۰- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱۵ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۲- 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.

۱۳- مقدار ۱ میلی لیتر بافر CFDW 1 به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
۱۴- 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.

۱۵-ذرات یکنواخت شده ی tBioBead CF را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری تمیز منتقل کنید.
۱۶- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱/۵ و یا ۲ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۷- 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.
۱۸- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر CFDW 1) تکرار کنید.
۱۹- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱/۵ و یا ۲ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۲۰- 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.
۲۱- مقدار ۱ میلی 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 ۲۱ تا ۲۴ 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 ۵۰ تا ۱۰۰ 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.

برای پرتکل استخراج از ۲ میلی لیتر بیشتر سرم/پلاسما (تا ۴ میلی لیتر پلاسما/سرم) با ما تماس بگیرید

پرتکل استخراج از ۱ میلی لیتر سرم/پلاسما (با Carrier RNA)

ماده Carrier RNA در کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit موجود نیست و باید جداگانه تهیه شود. غلظت نهایی مورد نیاز برای هر نمونه حداکثر یک میکروگرم می باشد. ماده Carrier RNA باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود. از فریز و دفریز کردن این محلول بیش از سه بار خودداری نمایید. بنابراین این ماده را به مقادیر کوچکتر تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

ممکن است مقدار Carrier RNA کمتر از یک میکروگرم به ازای هر نمونه نتایج بهتری به دست دهد. به همین منظور بهتر است مقادیر کمتر از یک میکروگرم نیز آزمایش شود تا اگر نتایج بهتری در آزمایش های PCR و یا qPCR داشت، مقدار مناسب از این ماده به بافر CFDL اضافه شود.

یکی از مزایای استفاده از Carrier RNA بهبود اتصال اسید های نوکلئیک به ذرات مگنتیک پوشده شده با سیلیکا است، بخصوص در نمونه هایی که مقدار اسید نوکلئیک هدف کم و یا قطعات DNA کوچک باشد. از آنجایی که مقادیر زیادی از Carrier RNA همراه اسیدنوکلئیک هدف استخراج می شود روشهای اسکتروفتومتری برای ارزیابی مقدار اسیدهای نوکلئیک استخراج شده مناسب نیست. برای ارزیابی کمی و کیفی مقدار DNA باید از روش qPCR استفاده 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 آماده کنید.
- به مقدار حداکثر یک میکروگرم به ازای هر نمونه، carrier RNA به بافر CFDL اضافه کنید. این مخلوط همیشه باید به صورت تازه و به تعداد نمونه های مورد آزمایش آماده شود.
- 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- مقدار ۱ میلی لیتر بافر CFDB به نمونه اضافه کنید. نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.
۸- 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.
۹- 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.

۱۰- مقدار ۱ میلی لیتر از لیزت را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۱۱- 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.
۱۲- 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.
۱۳- 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.
۱۴- 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.
۱۵- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 1 به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
۱۶- 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.

۱۷- 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.

۱۸- 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.
۱۹- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر CFDW 1) تکرار کنید.
۲۰- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر CFDW 2 به لوله اضافه کنید.
۲۱- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.
۲۲- 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.
۲۳- 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.
۲۴- مراحل ۲۰ تا ۲۳ را (شستشو با بافر CFDW 2) تکرار کنید.
۲۵- درب لوله را بسته و به مدت ۳۰ ثانیه از روی رک مگنتیک بردارید.
۲۶- لوله را مجددا بر روی رک مگنتیک قرار دهید و تا جذب کامل ذرات مگنتیک به جداره لوله صبر کنید.
۲۷- 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.
۲۸- درب لوله را باز گذاشته و به مدت ۲۵ دقیقه صبر کنید تا ذرات مگنتیک کاملا خشک شوند.
۲۹- 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.
۳۰- لوله را به مدت ۵ دقیقه ورتکس کنید.
۳۱- 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.
۳۲- محلول شفاف حاوی ccfDNA را به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
۳۳- نمونه را در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره کنید.

پرتکل استخراج از ۲ میلی لیتر سرم/پلاسما (با Carrier RNA)

قبل از شروع:

- انکوباتور را بر روی ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- بافر CFDW 2 را طبق دستورالعمل آماده سازی مواد در صفحه ۴ آماده کنید.
- به مقدار حداکثر یک میکروگرم به ازای هر نمونه، carrier RNA به بافر CFDL اضافه کنید. این مخلوط همیشه باید به صورت تازه و به تعداد نمونه های مورد آزمایش آماده شود.
- تیوب حاوی tBioBead CF را قبل از استفاده شیک و یا ورتکس کنید تا به طور کامل یکنواخت شوند.

پروتکل:

۱- مقدار ۲ میلی لیتر پلاسما یاسرم را به یک لوله ی ۱۵ میلی لیتری اضافه کنید.

نکته مهم: اگر مقدار سرم یا پلاسما کمتر از ۲ میلی لیتر است، با اضافه کردن بافر CFDE حجم آن را به ۲ میلی لیتر برسانید.

۲- مقدار ۳۰ میکرو لیتر پروتئیناز K به لوله اضافه کنید.
۳- مقدار ۱۳۵ 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 ۲۵ 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- مقدار ۲ میلی لیتر بافر CFDB به نمونه اضافه کنید. نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.
۸- مقدار ۲۰ میکرو لیتر tBioBead CF به نمونه اضافه کنید. نمونه را با سر و ته کردن لوله حداقل ۱۰ بار به خوبی مخلوط کنید.
۹- 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.

۱۰- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱۵ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۲- 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.
۱۳- مقدار ۱ میلی لیتر بافر CFDW 1 به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
۱۴- 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.

۱۵-ذرات یکنواخت شده ی tBioBead CF را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری تمیز منتقل کنید.
۱۶- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱/۵ و یا ۲ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.
۱۷- 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.
۱۸- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر CFDW 1) تکرار کنید.
۱۹- لوله را بر روی رک مگنتیک مناسب لوله های ۱/۵ و یا ۲ میلی لیتری قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملا شفاف شود، صبر کنید.

۲۰- 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.
۲۱- مقدار ۱ میلی 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 ۲۱ تا ۲۴ 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 ۵۰ تا ۱۰۰ 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.

برای پرتکل استخراج از ۲ میلی لیتر بیشتر سرم/پلاسما (تا ۴ میلی لیتر پلاسما/سرم) با ما تماس بگیرید

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 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.

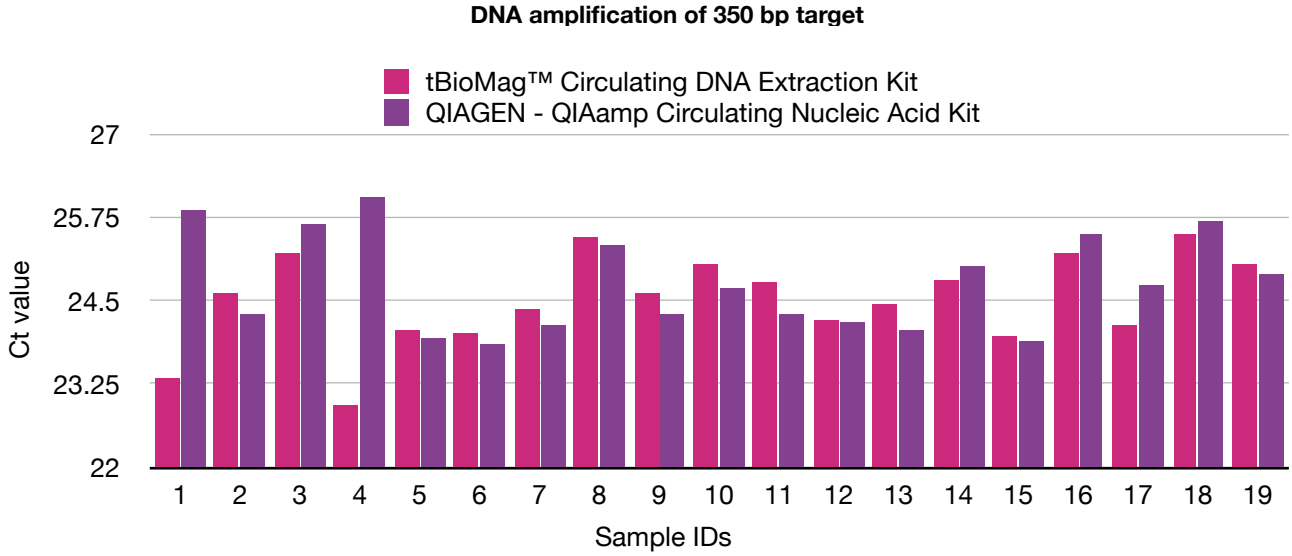
توصیه هایی برای جداسازی و نگهداری پلاسما

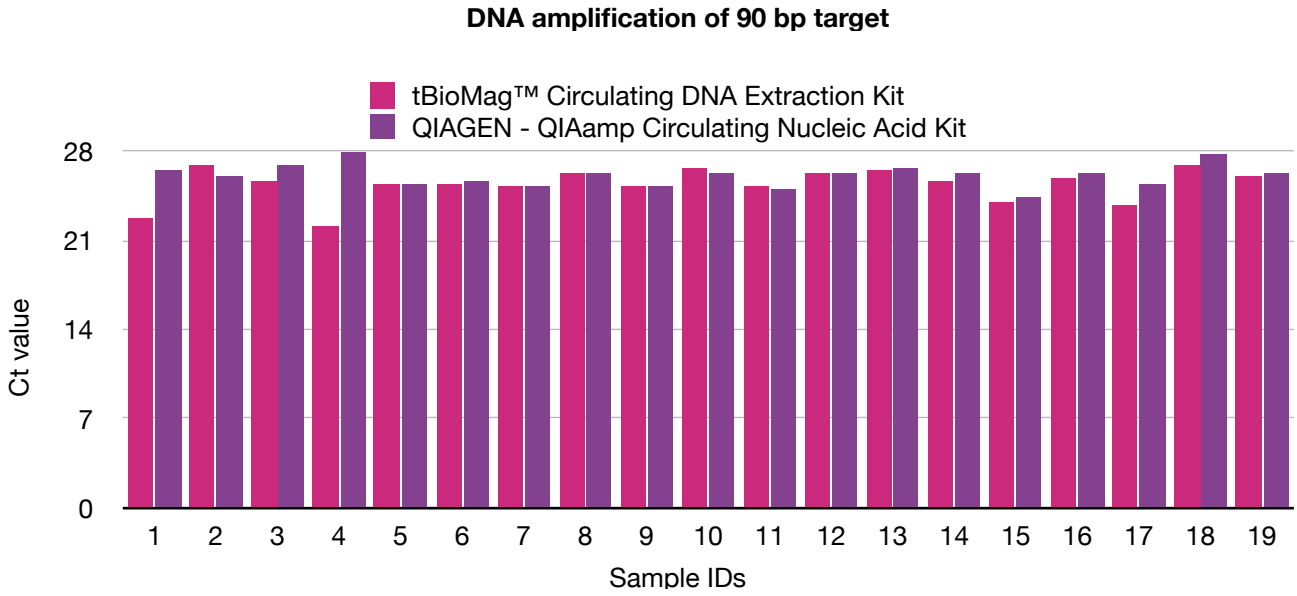
برای استخراج و خالص سازی ccfDNA از پلاسما می توانید از پروتکل زیر استفاده کنید:

۱- لوله ی حاوی ۱۰ میلی لیتر خون تام رادر سانتریفیوژ swing-out قرار دهید.
۲- نمونه ی خون را به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۰۰۰g و یا ۳۵۰۰rpm و در مای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید.
۳- بدون بر هم زدن Buffy coat، پلاسما را (حدود ۴ تا ۵ میلی لیتر) با پیپت بردارید و به یک لوله ی ۱۵ میلی لیتری تمیز منتقل کنید.
۴- لوله ی حاوی پلاسما را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰g تا ۱۸۰۰۰g (در روتور با زاویه ثابت) و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید.
۵- پلاسما را بدون تماس با رسوب ته لوله، به یک لوله ی تمیز منتقل کنید.
۶- اگر پلاسما در همان روز برای استخراج ccfDNA استفاده می شود، میتوانید آن را در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه دارید، در غیر این صورت پلاسمار ا در دمای ۲۰- و یا ۸۰- درجه سانتیگراد ذخیره کنید.
۷- برای آزمایشهای بعدی، پلاسما را در دمای اتاق دفریز کنید. در صورت بروز cryoprecipitation، این مراحل را انجام دهید:
الف- لوله ی حاوی پلاسما را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰g تا ۱۸۰۰۰g (در روتور با زاویه ثابت) و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید.
ب- پلاسما را بدون تماس با رسوب ته لوله، به یک لوله ی تمیز منتقل و مراحل استخراج را شروع کنید.

اطلاعات عملکرد وکارایی

برای ارزیابی عملکرد و کارایی کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit، تعداد ۱۹ نمونه پلاسما از افراد سالم، باردار و بدون علامت تهیه و در استخراج ccfDNA از پلاسما با کیت QIAamp DNA Circulating NA Kit شرکت QIAGEN مورد مقایسه قرار گرفت. استخراج ccfDNA با استفاده از پرتکل استخراج ۲ میلی لیتر پلاسما/سرم از هر دو کیت انجام شد. برای ارزیابی مقدار و کیفیت ccfDNA استخراج شده از کیتهای فوق، مقدار DNA ژنومی انسان در یک آزمایش کمی qPCR که در آن دو ناحیه ژنومیک انسان با اندازه کوچک (۹۰ باز) و یک قطعه بزرگ (۳۵۰ باز) تکثیر می شوند مورد آزمایش قرار گرفت تا توانایی کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit در استخراج و خالص سازی قطعات کوچک DNA موجود در پلاسما/سرم ارزیابی شود. نتایج این آزمایش در نمودارهای زیر، تایید کننده ی عملکرد بسیار نزدیک دو کیت فوق می باشد:





راهنمای حل مشکلات

لطفا از اطلاعات جدول زیر برای رفع مشکلات احتمالی استفاده کنید. برای دریافت پشتیبانی بیشتر لطفا به آدرس https://www.tbiodx.com/ticketing مراجعه کنید.

مشکلات احتمالی و راه حل ها

مشکل	علت	راه حل
مقدار کم DNA استخراج شده	عدم یکنواخت سازی کامل tBioBead CF	ذرات tBioBead CF را قبل از استفاده با ورتکس کردن کاملا یکنواخت کنید
	اتصال غیر موثر DNA به tBioBead CF	مطمئن شوید که نمونه ی پلاسما به دمای اتاق رسیده باشد
	اتصال غیر موثر DNA به tBioBead CF	مطمئن شوید که هر نمونه در زمان انکوباسیون اتصال به ذرات مگنتیک، به خوبی مخلوط می شوند
	از دست دادن ذرات tBioBead CF در حین آزمایش	مراقب باشید که در جریان پیپت کردن محلول شفاف، نوک سمپلر به ذرات مگنتیک برخورد نکند
	باقیماندن DNA بر روی tBioBead CF	حجم ایلوت را افزایش دهید و قبل از جدا سازی،به خوبی مخلوط کنید
	از دست دادن DNA	مطمئن شوید که اتانل ۱۰۰٪ به بافر CFDW 2 اضافه شده است
	آلودگی به اتانل	ذرات tBioBead CF را قبل از ایلوت کردن DNA، به مدت ۲۵ دقیقه خشک کنید
ذرات tBioBead CF به طور کامل شفاف نمی شوند	کوتاه بودن زمان باقیماندن لوله بر روی رک مگنتیک	زمان باقیماندن لوله بر روی رک مگنتیک را افزایش دهید
استخراج همزمان DNA با وزن ملکولی بالا	مراحل شستشو با CFDW 1 کامل نبوده	مراحل شستشو با بافر CFDW 1 را طبق دستورالعمل کیت انجام دهید. در صورت نیاز حجم بافر CFDW 1 را افزایش دهید
مشکل در آزمایشهای پس از استخراج	آلودگی با نمکها	استفاده از بافر CFDW 2 باید در دمای اتاق انجام شود

اطلاعات سفارش

جهت سفارش کیت *tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit به آدرس www.tbiodx.com و یا با شماره تلفن ۰۲۱-۸۸۲۱۸۱۲۰ و ۰۲۱-۸۸۰۶۰۳۳۶ از روزهای شنبه تا چهارشنبه بین ساعت ۸ صبح تا ۴:۳۰ دقیقه بعد از ظهر تماس بگیرید.

شماره کاتالوگ	محصول
611300-50	*tBioMag™* Circulating DNA Extraction Kit (50)
MagRack-1.5-2	*tBioRack*™ - 1.5/2.0 mL
MagRack-15	*tBioRack*™ - 15 mL

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, (QIAGEN Group), tBioDx™, ExtendScreen™, tBioCare™, tBioMag™, tBioSpin™ (Zist Tashkhis Farda - tBioDx Co.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

علائم

لیست علائمی که ممکن است بر روی لیبل و یا جعبه محصول باشد:

Tests Per Kit

Research Use Only

In Vitro Diagnostic Use Only

Catalogue Number

Lot Number (Batch Code)

Global Trade Item Number

Temperature Limitations (Storage Temperature)

Use By (Expiration Date)

Attention

Consult Instructions for Use

Date of Manufacture

Manufacturer