راهنمای کیت جداسازی Cell free DNA شرکت ژندیا

(GeneDia™Cell free DNA Isolation Kit)

#EK1050R

معرفی محصول

کیت جداسازی Cell free DNA (Cf-DNA) شرکت ژندیا، یکی از کارآمدترین کیت های ایزولاسیون اسید نوکلئیک بوده که توانایی بازیابی قطعات cf-DNA در اندازه ۵۰۰-۱۰۰ جفت باز را دارا می باشد. DNA بازیابی شده به این روش را می توان در طیف گسترده ای از کاربردهای پایین دستی شامل توالی یابی نسل بعدی (Next-generation) و qPCR مورد استفاده قرار داد.

مشخصات کیت

کیت جداسازی cf-DNA شرکت ژندیا امکان جداسازی cf-DNA از نمونه ی سرم بصورت سریع و کارآمد را فراهم می کند. این کیت دارای قابلیت جداسازی قطعات DNA از هر دو نمونه تازه و منجمد می باشد. با این حال نمونه های تازه، بازده بالاتری دارند.

اجزای کیت

ردیف	اجزای کیت	مقدار (#EK1050R)
۱	بافر Cf-DL	۱ میلی لیتر
۲	بافر Cf-Mag	۱۵ میلی لیتر

شرایط نگهداری

- کیت جداسازی cf-DNA در دمای اتاق (۲۵-۲۰) درجه سانتیگراد قابل نگهداری می باشد.
- تمامی اجزای کیت در شرایط دمایی ذکر شده تا ۱ سال پایدار است.

موارد و ابزارهای مورد نیاز

- لوله ی نمونه گیری Streck
- میکروفیوژ
- ورتکس
- سمپلر ۱۰۰ - ۱۰۰۰ میکرولیتر
- درای بلاک با محدوده دمایی ۹۹-۲۴ درجه سانتی گراد
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سرسمپلر
- اتانول ۸۰٪ (جزو محتویات کیت نمیباشد)
- رک مگنتی (پیشنهاد ما استفاده از رک های مگنتی شرکت ژندیا با نام GeneDia™ Magpure separation rack ، که کاملا سازگار با این کیت است، می باشد.)

نکات قبل از استفاده

- پیش از استفاده از پروتکل، توصیه می شود که حتما همه ابعاد پروتکل به دقت مطالعه شود.
- هنگام کار با نمونه های بیولوژیک، از آلودگی تصادفی جلوگیری کنید. آلودگی ممکن است دراثر استفاده از تجهیزات غیراستریل، رعایت نکردن اصول کار آزمایشگاهی و یا حتی حین لیبل گذاری نمونه ها رخ دهد.
- سعی کنید از نمونه ی تازه استفاده کنید چراکه میزان سل فری در سرم بیار کم می باشد.
- استفاده از نمونه های لیز شده منجر به کاهش قابل توجهی از کیفیت خروجی می گردد
- تمام مراحل در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) قابل انجام است مگر اینکه به طور خاص ذکر شده باشد.
- رعایت نکردن هر یک از موارد می تواند به صورت مستقیم در نتیجه مورد نظر تاثیرگذار باشد.

پروسه آماده سازی و جداسازی

روند آماده سازی نمونه

۱) نمونه خون جمع آوری شده در لوله های مخصوص(Streck) را به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲) **۲ میلی لیتر** از سرم را در یک میکروتیوب (جزء محتویات کیت نمی باشد) ریخته و مجددا به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۳) **۴۰۰ میکرولیتر** از مایع رویی نمونه را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید (جزء محتویات کیت نمی باشد) انتقال دهید.

روند جداسازی

۱) **۲۰ میکرولیتر** بافر **Cf-DL** را به **۴۰۰ میکرولیتر سرم** اضافه و به آرامی ورتکس کنید.

۲) به مدت **۲۰ دقیقه** در دمای **۷۲ درجه سانتیگراد** انکوبه کنید. در پایان این مرحله، نمونه شما باید کاملا ژله ای و کدر شده باشد.

۳) در این مرحله نمونه را به مدت **۱۵ دقیقه** با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۴) تمام مایع شفاف رویی را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید (جزء محتویات کیت نمی باشد) منتقل کنید.

۵) بطری بافر **Cf-Mag** را به طور کامل تکان دهید تا جایی که هیچ نانوذره ای به کف بطری نچسبیده باشد. **۳۰۰ میکرولیتر** بافر **Cf-Mag** را به مایع اضافه کرده و با دست تکان دهید تا محتویات کاملا یک دست شوند.

۶) میکروتیوب حاوی محتویات را به مدت **۱۵ دقیقه** در **دمای اتاق** انکوبه کنید.

۷) به مدت **۳ دقیقه** میکروتیوب را بر روی رک مگنتی قرار داده و اجازه دهید تمامی مگنت ها به طور کامل در سمت مگنت جمع شده و مایع از حالت کدر و قهوه ای به حالت شفاف تغییر پیدا کند.

۸) در همین حین، زمانی که میکروتیوب بر روی **رک مگنتی** قرار دارد، آهسته و بدون برخورد سرسمپلر به مگنت های جمع شده، مایع شفاف شده را با سمپلر برداشته و دور بریزید.

۹) همانطور که میکروتیوب روی رک مگنتی قرار دارد، **۱ میلی لیتر اتانول ۸۰٪** (جزو محتویات کیت نمی باشد) را بر روی مگنت ها بریزید.

۱۰) میکروتیوب را از روی رک مگنتی برداشته و به آهستگی و با چندین ضربه به انتهای میکروتیوب مگنت ها را از هم باز کنید.

۱۱) پس از باز شدن کامل مگنت ها مجدد به مدت **۳ دقیقه** میکروتیوب را بر روی **رک مگنتی** قرار دهید.

۱۲) روی رک مگنتی، آهسته و بدون برخورد سرسمپلر به مگنت ها، مایع رویی را برداشته و دور بریزید. اجازه دهید اتانول باقی‌مانده در میکروتیوب درباز بر روی رک مگنتی در دمای اتاق (RT) تبخیر شود.

***نکته**: به دلیل باز بودن درب میکروتیوب در مرحله تبخیر اتانول، شرایط میکروتیوب را به گونه ای مدیریت کنید که میزان گردش هوا و به دنبال آن آلودگی به حداقل رسیده باشد.*

۱۳) بر روی رک مگنتی، **۵۰ میکرولیتر** آب دیونیزه **۹۰ درجه سانتیگراد (ddH2O)** به میکروتیوب اضافه کنید.

۱۴) میکروتیوب را از روی رک مگنتی برداشته و با ضربه زدن به انتهای میکروتیوب مگنت ها را مجدد از هم باز کنید.

۱۵) به مدت **۵ دقیقه** میکروتیوب را در دمای **۹۰ درجه سانتیگراد** انکوبه کنید.

۱۶) میکروتیوب را به مدت **۵ دقیقه** بر روی **رک مگنتی** قرار دهید تا مایع کاملا شفاف شود.

۱۷) مایع شفاف شده را به سمپلر برداشته و به داخل یک میکروتیوب جدید تمیز منتقل کنید. این مایع حاوی cf-DNA جداسازی شده می باشد.

نگهداری بلند مدت نمونه DNA

cf-DNA جداسازی شده میتواند به صورت مستقیم مورد استفاده قرار گرفته و یا برای ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد ذخیره شود. پیشنهاد می شود نمونه ها جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شوند.

راهنمای کیت جداسازی Cell free DNA شرکت ژندیا

(GeneDia™Cell free DNA Isolation Kit)

#EK1050R

عیب یابی

عیب	علت	راه حل
مقدار کم DNA جداسازی شده (Low DNA yield)	محلول سازی ناقص	دمای انکوباتور را چک کنید و مطمئن شوید ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتیگراد به درستی رعایت شده باشد.
	استفاده نامناسب از بافر ها در یکی از مراحل	قبل از شروع تست ابتدا کل منوال را مطالعه کرده و مطمئن شوید که از بافر به مقدار صحیح در مرحله مناسب استفاده شده است.
عملکرد ضعیف DNA در مرحله PCR	DNA تجزیه شده	از DNA تازه جداسازی شده استفاده کنید.
		در صورت نیاز مهار کننده DNase به نمونه اضافه کرده و مطمئن شوید هیچ نوکلئازی در نمونه وجود ندارد.
		مطمئن شوید که بافر ها در دما و مکان مناسب نگهداری شوند.
ژله ای نشدن نمونه در مرحله ۲ جداسازی	عدم کالیبر بودن درای بلاک	از کالیبر بودن درای بلاک قبل از شروع مراحل جداسازی اطمینان حاصل کنید.

ارزیابی نتایج

به طور کلی در هر میلی لیتر از پلاسما ۱۰۰-۱ نانوگرم cf-DNA وجود داشته و اندازه گیری میزان جذب (به عنوان مثال نانودراپ) ممکن است به اندازه کافی برای تعیین دقیق مقدار cf-DNA حساس نباشد. در عوض، ما استفاده از Qubit Assays را پیشنهاد می کنیم

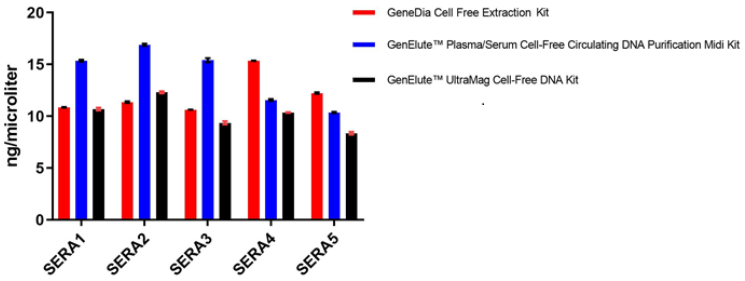
مدل پیشنهادی برای انجام تست PCR

با توجه به ماهیت اسیدهای نوکلئیک به دست آمده از سرم، باید در طراحی پرایمرها دقت شود. cf-DNA معمولاً اندازه کوچکی داشته (۱۷۰ bp) و درنتیجه پرایمرهای PCR باید به گونه ای طراحی شوند که آمپلیکون های ۱۵۰ جفت بازی و یا کمتر تولید کنند.

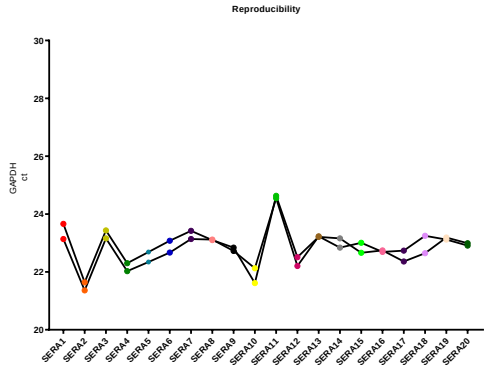
همچنین با توجه به غلظت کم cf-DNA در سرم افراد سالم، ممکن است در برخی موارد به ۴۰ چرخه تقویتی (amplification cycles) نیاز باشد.

ویژگی های عملکردی

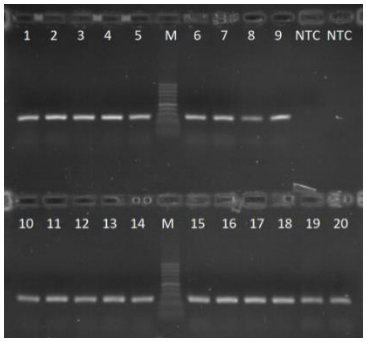
غلظت و تکرارپذیری DNA برای کیت جداسازی cf-DNA مورد ارزیابی قرار گرفته و به طور کلی نتایج نشان دهنده بازدهی بالا و تکرارپذیری قابل توجه کیت می باشند.



شکل۱. میانگین غلظت DNA (ng/µL) جداسازی شده با روش های مختلف و اندازه گیری شده به وسیله ی فلورومتری. در این شکل میزان بازده ی بالای مقدار DNA جداسازی شده به وسیله ی کیت جداسازی cf-DNA نشان داده شده است.



شکل۲. C(t) های تکرارپذیر به دست آمده به وسیله ی کیت جداسازی cf-DNA برای ۲۰ نمونه سرم متفاوت متعلق به افراد سالم



شکل۳. الکتروفورز ۲۰ نمونه ی کنترلی بر روی ژل آگارز ۱.۵ درصد. تمامی محصولات به اندازه 280bp می باشند. هر یک از اعداد موجود در ردیف متناسب با شماره نمونه ها از ۱ تا ۲۰ بوده، NTC نمونه کنترل منفی و M نشانگر 100bp می باشد.

	Manufacturer	تولید کننده
	Use-by Date	تاریخ انقضاء
	Date of Manufacture	تاریخ تولید
	Temperature Limit	محدوده دما
LOT	Batch Code	شماره سری ساخت
REF	Catalogue Number	شماره کاتالوگ
IVD	In vitro diagnostic	برای استفاده آزمایشگاهی
	Instruction For Use	دستورالعمل برای استفاده
Σ n	Sufficient for number of (n) samples	تعداد (n) آزمون کافی

GeneDia

آدرس ایمیل: GeneDialifescience@gmail.com

تلفن: ۰۲۱۲۲۲۴۰۹۹۸

آدرس: ایران، تهران، تهران، بلوار کاوه، خیابان بهار جنوبی، بن بست تقوی، پلاک ۱۴، طبقه منفی