بسمه تعالی

کیت استخراج DNA از بافت گیاه

محتویات کیت:

- بافر لیز A (CN: KPG-KLSA)؛ ۱ ویال ۲۰ میلی لیتری
- بافر لیز B (CN: KPG-KLSB)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری
- بافر لیز C (CN: KPG-KLSC)؛ ۱ ویال ۵ میلی لیتری
- بافر هموژنیزه کننده (CN: KPG-HBt)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری
- بافر رسوب دهنده (CN: KPG-PS)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری
- بافر شستشو (KPG-WBp)؛ ۲ ویال ۲۵ میلی لیتری
- آب مقطر DNase/RNase free (CN: KPG-DW)؛ ۱ ویال ۵ میلی لیتری
- ستون استخراج همراه با کالکشن تیوب؛ ۵۰ عدد
- کالکشن تیوب؛ ۱۰۰ عدد

دیگر موارد مورد نیاز: سمپلر ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکرولیتری متغیر، میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری

نمونه: قبل از استفاده از کیت، باید نمونه های گیاه را همگن کنید. بافت های برداشت شده باید در سریع ترین زمان ممکن به صورت تازه استفاده شوند یا در دمای یخچالی برای مدت کوتاهی نگهداری شوند. نموه را به خوبی در هاون له کنید برای له کردن نمونه هم بهتر است ابتدا نمونه در نیتروژن مایع قرار دهید سپس عمل له کردن را سریعا انجام دهید. روش های جایگزین مانند استفاده از هموژنایزر می تواند مورد توجه قرار گیرد. تکان دادن یا چرخاندن در طول انکوباسیون برای لیز ممکن است کارایی لیز را تا حد زیادی تسریع کند و در نتیجه زمان برای لیز کامل کاهش یابد. توجه داشته باشید که تازگی و اندازه ذرات نمونه برای نتایج خوب بسیار کارایی دارد. برای همگن سازی نمونه های گیاهی، نمونه های برداشت شده (۱۰۰-۲۰۰ میلی گرم) را به لوله های استریل اضافه کنید و ۵۰۰ میکرولیتر بافر هموژنیزاسیون (CN: KPG-HBp) اضافه کنید و سپس نمونه ها را همگن کنید و سپس پروتکل بعدی را دنبال کنید.

مراحل استخراج DNA

- به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز A به یک میکروتیوب DNase/RNase free اضافه نمایید.
- به میزان مناسب از نمونه (به طور مثال ۲۰۰ میکرولیتر از بافت گیاه هموژن شده) به میکروتیوب اضافه کرده و به شدت به مدت ۱۵ ثانیه بر روی وورتکس مخلوط کنید و در دمای اتاق به مدت ۱ دقیقه انکوبه کنید. زمان انکوباسیون را هرگز افزایش ندهید زیرا برای DNA مضر است.
- به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز B به یک میکروتیوب اضافه نمایید و کاملا وورتکس نمایید.
- به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز C به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت ۵ ثانیه به شدت مخلوط کنید.
- به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر رسوب دهنده سرد به میکروتیوب اضافه کرده و با دست به آرامی مخلوط نمایید. دقت نماید می توانید محلول لیز C و بافر رسوب دهنده را با هم مخلوط و در ادامه به میکروتیوب اضافه نمایید.
- ۷۵۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب را به ستون های استخراج DNA اضافه کرده و در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. دقت نمایید که طبق روش کیت مقادیر بسیار مناسبی از DNA جداسازی می شود و نباید حجم اضافی نمونه را به ستون اضافه کنید. اما درصورتیکه نمونه شما کم باشد از ستون دیگر باید برای باقیمانده استفاده کنید (در کیت ستون اضافه فراهم نشده است و باید جداگانه از شرکت کارمانیا پارس ژن تهیه کنید).
- ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کرده و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو اضافه کنید و در ادامه در دور ۸/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- عمل شستشو با بافر شستشو را تا یک مرتبه دیگر تکرار کنید
- بعد از اتمام شستشو بدون تعویض کالکشن تیوب، ستون را در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید تا باقیمانده بافر از فیلترها تخلیه شود.
- ستون را به میکروتیوب ۱/۵ استریل RNase/DNase free منتقل کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر DNase/RNase free اضافه نمایید و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. دقت کنید بهتر است دمای آب مقطر در حدود ۵۵ درجه سانتیگراد باشد تا جداسازی DNA بهتر انجام شود.
- در ادامه ستون ها را در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول به دست آمده حاوی DNA است. برای افزایش میزان DNA استخراج شده پیشنهاد میکنیم نمونه DNA استخراج شده را مجددا بر روی ستون منتقل کنید و دوباره در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

عیب یابی (Troublshooting):

کیت حاظر به میزان زیادی کنترل کیفی شده و احتمال برخورد با مشکل بسیار پایین می باشد. با این وجود در مواردی ممکن است در استفاده از این کیت با مشکلاتی مواجه شوید. برای حل این موارد به جدول زیر مراجعه کنید:

مشکل ایجاد شده	علل احتمالی ایجاد مشکل	نحوه برطرف کردن مشکل
میزان DNA استخراج شده کم می باشد.	نمونه حاوی مقادیر مناسب از سلول در زمان نمونه برداری نیست	✓ استفاده از مقادیر بیشتر نمونه ✓ اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر آب مقطر DNase/RNase free به جای ۴۰ میکرولیتر
	استفاده از کیت تاریخ مصرف گذشته	✓ محتویات کیت تا یک سال پس از تاریخ انقضای ذکر شده نیز قابل استفاده هستند به جز محلول لیز بنابراین در زمان ذکر شده مصرف شوند.
	استفاده از میکروتیوب های حاوی DNase	✓ از میکروتیب های DNase/RNase free شرکت کارمانیا پارس ژن استفاده نمایید
	استفاده از مقادیر کمتر محلول های لیز	✓ دقیقا طبق پروتوکول کیت استخراج انجام شود.
	استفاده از ستون هایی غیر از ستون های موجود در کیت	✓ دقیقا از مواد کیت استفاده نمایید.
با وجود مقادیر مناسب DNA تست PCR به خوبی انجام نمی شود.	وجود مهار کننده ها در DNA استخراج شده	✓ مرحله شستشو به خوبی انجام شود و از تغییر دور و زمان سانتریفیوژ اجتناب کنید.

احتیاط لازم برای کار با کیت و محتویات آن

- محلول لیز موجود در کیت دارای Ph بازی و اسیدی شدید می باشند. از طرفی مواد به کار رفته در این محلول ها در برخی موارد ممکن است برای سیست اعصاب محرک باشند. بنابراین در زمان کار با این محلول ها حتما از دستکش استفاده شود و در صورت تماس با پوست با مقادیر زیادآب شستشو گردد. در زمان تماس با چشم، با مقادیر زیادآب شستشو گردد و درصورت عدم بهبودی به مراکز درمانی مراجعه گردد.
- باقی مواد موجود در کیت ایمن و فاقد خاصیت آسیب زایی به بافت انسان می باشند.

http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

In the name of God

DNA extraction kit from Plants

Kit components:

- Lyse buffer A (CN: KPG-KLSA): 1 vial 20 mL
- Lyse buffer B (CN: KPG-KLSB): 1 vial 25 mL
- Lyse buffer C (CN: KPG-KLSC): 1 vial 5 mL
- Homogenizing buffer (CN: KPG-HBt): 1 vial 25 mL
- Percipitation buffer (CN: KPG-PS): 1 vial 25 mL
- Washing buffer (CN: KPG-WBp): 1 vial 25 mL
- DNase/RNase free water (CN: KPG-DW): 1 vial 5 mL
- High purity column: 50 preps
- Collection tubes: 100 preps

Other material that are not provided by this kit:

- Samplers and 1/5mLmicrotubes

Sample: Before using the kit, you need homogenize the Plant samples. Harvested tissues should be used freshly or stored at very low temperature as quickly as possible. Grinding in mortal and pestle under liquid nitrogen is a good method for homogenizing the sample, but alternative methods, such as a homogenizer or a bead-beater, can be employed in case by case for efficient disruption. Shaking or vortex during incubation for lysis may greatly accelerate the efficiency of lysis, resulting in reduced time for complete lysis. Note that the freshness and the particle size of disrupted sample is the key for good result and that the frozen sample should be kept on ice until use. To homogenize the plant samples, add the harvested samples (100-200 mg) to the sterile tubes and add 500 µL Homogenize buffer (CN: KPG-HBp) and then homogenize the samples and then follow the next protocol.

Protocole:

- Add 500 microliters of lysis buffer A to a DNase/RNase free microtube.
- Add the appropriate amount of the sample (for example, 200 microliters of homogenized plant tissue) to the microtube and mix vigorously for 15 seconds on the vortex and incubate at room temperature for 1 minutes. Do not increase the incubation time, because it is harmful for DNA.
- Add 500 microliters of lysis buffer B to the microtube. And vortex for completely.
- Add 100 µL of Lysis Buffer C to the microtube and mix vigorously for 5 seconds.
- Add 500 microliters of cold precipitating buffer to the microtube and mix gently by hand. Pay attention, you can mix lysis solution C and precipitation buffer together and then add it to the microtube.
- Add 750 µL of the contents of the microtube to the DNA extraction columns and centrifuge at 12.000 RPM for 1 minute. Make sure that according to the kit method, very good amounts of DNA are separated and you should not add extra sample volume to the column. But if your sample is small, you should use another column for the remainder (an additional column is not provided in the kit and you have to get it separately from Karmania Pars Gene Company).
- Transfer the column to a new collection tube and add 500 µL of washing buffer and then centrifuge at 8.000 RPM for 1 minute.
- Repeat the washing process with the washing buffer one more time.
- After finishing the wash without changing the collection tube, centrifuge the column at 12/000 RPM for 1 minute to drain the remaining buffer from the filters.
- Transfer the column to a sterile RNase/DNase free 1/5 microtube and add 100 microliters of DNase/RNase free distilled water and incubate for 2 minutes at room temperature. Make sure that the temperature of the distilled water is around 55 °C for better DNA separation.
- Next, centrifuge the columns at 12/000 RPM for 1 minute. The resulting solution contains DNA. To increase the amount of extracted DNA, we suggest transferring the extracted DNA sample to the column and centrifuging again at 12.000 RPM for 1 minute.

Karmania Pars Gene

Troubleshooting:

- The current kit is highly quality controlled and the probability of encountering a problem is very low. However, in some cases, you may encounter problems using this kit. Refer to the following table to solve these issues:

Problem	Reasons	Solving
Low Yeild	Low cell count in the sample	✓ Use more samples
		✓ Add 30 µL DNase/RNase free water
	Using an expired kit	✓ Althopugh the components of the kits has more than 1 year stability, lysis buffer A and B had 6 months stability.
	Using the material contaminated with DNase	✓ Use the DNase/RNase free materials, You can prepare them from Karmania Pras Gene Company
	Using low amounts of lysis buffer	✓ Please follow the protocole
	Using column from other source	✓ Please use the column from Karmania Pars Gene Company
DNA is not appropriate for PCR	Presence of PCR inhibitor	✓ Do not change the washing step and centrifuge conditions

Safety:

The lysing solution in the kit has a very alkaline and acidic pH. On the other hand, the substances used in these solutions may in some cases be stimulating for the nervous system. Therefore, when working with these solutions, be sure to use gloves and in case of contact with the skin, wash with large amounts of water. In case of contact with the eyes, wash with large amounts of water and if there is no improvement, refer to medical centers.

KPG
Karmania Pars Gene