شرکت تحقیقاتی و تولیدی
آرکا طب روهام

به نام خدا

دفترچه راهنما کیت

Wizard® Genomic DNA Purification Kit
Instructions for Use of Products A1120, A1123, A1125 and A1620

ترجمه شده توسط تیم کارشناسان شرکت آرکا طب روهام

آدرس:بزرگراه یادگار امام، خیابان امام خمینی، بین خیابان کارون و قصرالدشت،کوچه اله وردی، پلاک ۱۳، واحد ۱۰

تلفن: ۰۲۱۶۶۳۱۵۴۳ - ۰۲۱۶۶۳۷۹۰۲۶

موبایل و واتساپ: ۰۹۱۲۰۵۴۹۸۹۳

www.ATRMED.COM

info@atrmed.com

کیت استخراج DNA برند پرومگا آمریکا به منظور استخراج DNA ازگلبول های سفید خون ,(Sections 3.A, B and C) سلول های کشت بافت و بافت حیوان ,(Section 3.D) بافت گیاه ,(Section 3.E)، مخمر ,(Section 3.F) و باکتری های گرم مثبت ومنفی طراحی شده است. در Table 1 لیستی از بازده DNA های تخلیص شده از هر نمونه آورده شده است.

کیت استخراج DNA برند پرومگا آمریکا به طور کلی بر مبنای چهار مرحله می باشد. مرحله اول پروسه ی استخراج، شامل لیز سلول ها و هسته است. به منظور استخراج DNA از خون کامل، ابتدا با استفاده از بافر لیز کننده؛ سلول های گلبول قرمز همزمان با گلبول های سفید و هسته شان لیز می شوند. تیمار با آنزیم RNase میتواند در این مرحله انجام شود (برای برخی از نمونه ها این مرحله به صورت انتخابی است.) در مرحله بعدی، پروتئین های سلولی با رسوب دهی نمکی پاک می شوند اما مولکول سنگین DNA ژنومی در محلول رویی باقی می ماند. در آخر، DNA ژنومی جمع و متمرکز شده و توسط رسوب دهی ایزوپروپانول نمک زدایی میشود.

پس از استخراج DNA توسط این سیستم میتوان DNA را در کاربردهای متنوعی مانند امپلیفیکاسیون، هضم آنزیمی و هیبریداسیون غشایی (مانند ساترن و دات/اسلات بلات) استفاده کرد.

2. Product Components and Storage Conditions

Small-Scale Isolation (minipreps)

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	100 isolations	A1120

Each system contains sufficient reagents for 100 isolations of genomic DNA from **300µl** of whole blood samples. Includes:

- 100ml Cell Lysis Solution
- 50ml Nuclei Lysis Solution
- 25ml Protein Precipitation Solution
- 50ml DNA Rehydration Solution
- 250µl RNase A Solution

Storage Conditions: Store the Wizard® Genomic DNA Purification Kit at room temperature (15–30°C). See product label for expiration date.

Table 1. DNA Yields from Various Starting Materials.

Species and Material	Amount of Starting Material	Typical DNA Yield	RNase Treatment
Human Whole Blood			
(Yield depends on the quantity of white blood cells present)	300µl 1.0ml 10.0ml	5–15µg 25–50µg 250–500µg	Optional Optional Optional
96-well plate (Process as little as 20µl/well; see Table 2.)	50µl/well	0.2–0.7µg	Optional
Mouse Whole Blood			
EDTA (4%) treated	300µl	6µg	Optional
Heparin (4%) treated	300µl	6–7µg	Optional
96-well plate	50µl/well	0.2–0.7µg	Optional
Cell Lines			
K562 (human)	3×10^6 cells	15–30µg	Required
COS (African green monkey)	1.5×10^6 cells	10µg	Required
NIH3T3 (mouse)	2.25×10^6 cells	9.5–12.5µg	Required
PC12 (rat pheochromocytoma)	8.25×10^6 cells	6µg	Required
CHO (hamster)	$1–2 \times 10^6$ cells	6–7µg	Required
Animal Tissue			
Mouse Liver	11mg	15–20µg	Required
Mouse Tail	0.5–1.0cm of tail	10–30µg	Optional
Insects			
Sf9 cells	5×10^6 cells	16µg	Required
Plant Tissue			
Tomato Leaf	40mg	7–12µg	Required
Gram Negative Bacteria			
Escherichia coli JM109 overnight culture, $\sim 2 \times 10^9$ cells/ml	1ml 5ml	20µg 75–100µg	Required Required
Enterobacter cloacae overnight culture, $\sim 6 \times 10^9$ cells/ml	1ml 5ml	20µg 75–100µg	Required Required
Gram Positive Bacteria			
Staphylococcus epidermis overnight culture, $\sim 3.5 \times 10^8$ cells/ml	1ml	6–13µg	Required
Yeast			
Saccharomyces cerevisiae overnight culture, $\sim 1.9 \times 10^8$ cells/ml	1ml	4.5–6.5µg	Required

بازدهی DNA ژنومی بسته به تعداد سلول های موجود در خون متغیر است. این کیت برای نمونه خون فریز شده نیز کاربرد دارد اما تخلیص DNA ژنومی خون فریز شده نسبت به خون تازه بازدهی کمتری را داراست و ممکن است به مقدار محلول لیز سلولی بیشتری نیاز باشد.

آدرس:بزرگراه یادگار امام، خیابان امام خمینی، بین خیابان کارون و قصرالدشت،کوچه اله وردی، پلاک ۱۳، واحد ۱۰
تلفن: ۰۲۱۶۶۳۱۵۴۳ – ۰۲۱۶۶۳۷۹۰۲۶
موبایل و واتساپ: ۰۹۱۲۰۵۴۹۸۹۳
www.ATRMED.COM
info@atrmed.com

۳.الف) تخلیص DNA ژنومی از خون کامل (۳۰۰µl یا ۳ ml از حجم نمونه)

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود:

- ✓ میکروتیوب ۱/۵ ml استریل (برای ۳۰۰µl نمونه)
- ✓ فالکون ۱۵ml استریل (برای ۳ml نمونه)
- ✓ حمام آب، ۳۷ °C
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ۷۰%، دمای اتاق
- ✓ حمام آب، ۶۵ °C (انتخابی، برای دهیدراسیون سریع تر DNA)

۱. برای ۳۰۰µl نمونه : افزودن ۹۰۰µl از محلول لیز سلولی به میکروتیوب ۱/۵ ml استریل

برای ۳ml نمونه: افزودن ۹ml از محلول لیز سلولی به فالکون ۱۵ ml استریل

توجه: خون باید در EDTA، هپارین یا لوله ضد انعقاد سیتراته جمع آوری شود تا از منعقد شدن نمونه جلوگیری شود.

۲. به آرامی تیوب حاوی خون را میکس کنید، سپس خون را به تیوبی که حاوی محلول لیز سلولی است انتقال دهید و ۶-۵ بار سر وته کنید.

۳. به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نمونه را انکوبه کنید (۲-۳ بار در مدت زمان انکوباسیون تیوب را سروته کنید) تا گلبول های قرمز لیز شوند سپس سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲۰ ثانیه در دمای اتاق برای ۳۰۰µl نمونه انجام شود و برای ۳ml نمونه، سانتریفوژ در دور × g ۲,۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شود.

۴. سوپرناتانت (مایع رویی) را خارج کنید و دور بریزید تا آنجایی که رسوب سفید رنگ انتهای لوله آسیبی نبینند. به طور تقریبی ۱۰-۲۰µl مایع رویی در میکروتیوب ۱,۵ ml باقی می ماند (برای ۳۰۰µl نمونه) و ۵۰-۱۰۰ µl از مایع رویی در فالکون فالکون ۱۵ ml باقی خواهند ماند. اگر نمونه خون فریز شده می باشد، مراحل ۴-۱ را مجددا تکرار کنید تا رسوب سفید رنگ شود. ممکن است مقداری از DNA در نمونه فریز شده از دست برود.

توجه: مقداری گلبول قرمز یا رسوب سلولی ممکن است در رسوب گلبول های سفید مشاهده شود. اگر تنها گلبول قرمز به نظر می آید که دیده می شود، محلول لیز سلولی بیشتری قبل از خارج نمودن سوپرناتانت از رسوب سلولی اضافه کنید سپس مرحله ۴-۳ را تکرار کنید.

۵. تیوب ها را با **شدت** ورتکس کنید تا رسوب گلبول های سفید، حل شوند. (۱۰-۱۵ ثانیه)

۶. محلول لیز نوکلئیک اسید (برای ۳۰۰µl نمونه ۳۰۰µl از محلول لیز نوکلئیک اسید و برای ۳ml نمونه، ۳ml از محلول لیز نوکلئیک اسید) را به تیوب اضافه کنید و گلبول ها را حل کنید. محلول را ۶-۵ بار پیپت نموده تا گلبول های سفید لیز شوند.

- ✓ پس از پیپتینگ یک محلول بسیار ویسکوز مشاهده می شود.
- ✓ اگر کلامپ سلولی بعد از پیپتینگ مشاهده میکنید در دمای ۳۷ °C نمونه را انکوبه کنید تا این کلامپ از هم باز شود. اگر پس از گذشت یک ساعت همچنان کلامپ مشاهده می شود محلول لیز نوکلئیک اسید بیشتری اضافه کنید (برای ۳۰۰µl نمونه ۱۰۰µl از محلول لیز نوکلئیک اسید و برای ۳ml نمونه، ۱ml از محلول لیز نوکلئیک اسید) و مجددا مرحله انکوباسیون را تکرار کنید.

۷. انتخابی: آنزیم RNase را (برای ۳۰۰µl نمونه ۱/۵ µl از آنزیم RNase و برای ۳ ml نمونه، ۱۵ µl از آنزیم RNase) به لیزات نوکلئیک اسید اضافه نموده و ۵-۲ بار میکروتیوب را سر و ته کنید سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C نمونه را انکوبه کنید و پس از اتمام زمان انکوباسیون، اجازه دهید نمونه سرد شود.

۸. محلول رسوب دهی پروتئین را به میزان ۱۰۰µl برای ۳۰۰µl نمونه و ۱ ml برای ۳ ml نمونه به لیزات نوکلئیک اسید اضافه کنید سپس برای ۱۰-۲۰ ثانیه به شدت ورتکس کنید. پس از ورتکس کلامپ پروتئینی کوچکی، ممکن است مشاهده کنید.

توجه: اگرمحلول لیز نوکئیک اسید بیشتری در مرحله شش اضافه کردید، محلول رسوب دهی پروتئین را به میزان ۱۳۰µl برای ۳۰۰µl نمونه و ۱/۳ml برای ۳ ml نمونه اضافه کنید.

۹. به مدت ۳ دقیقه در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ برای ۳۰۰µl نمونه سانتریفوژ در دمای اتاق انجام دهید و برای ۳ ml نمونه سانتریفوژ در دور × g ۲,۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شود.

رسوب قهوه ای تیره پروتئین باید در انتهای تیوب تجمع پیدا کند. اگر رسوبی مشاهده نکردید به **بخش چهارم** (آخرین صفحه) دفترچه راهنما مراجعه کنید.

۱۰. برای ۳۰۰µl نمونه، سوپرناتانت را به میکروتیوب ۱/۵ ml که حاوی ۳۰۰µl ایزوپروپانول می باشد انتقال دهید. برای ۳ml نمونه، سوپرناتانت را به تیوب ۱۵ ml که حاوی ۳ ml ایزوپروپانول می باشد انتقال دهید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است در تیوب اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین ها رسوب شده جلوگیری شود.

۱۱. به آرامی تیوب را سر وته کنید. رشته های نخ مانند DNA به صورت یک توده قابل مشاهده تشکیل شود.

۱۲. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق برای ۳۰۰µl نمونه انجام شود و برای ۳ ml نمونه سانتریفوژ در دور × g ۲,۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انجام شود. در انتها یک رسوب سفید رنگ کوچک که همان DNA قابل مشاهده است.

۱۳. سوپرناتانت را دور بریزید و هم حجم نمونه اولیه اتانول ٪۷۰ که به دمای اتاق از قبل رسیده است، اضافه کنید. به آرامی تیوب را سرو ته کنید و اینکار را چند بار انجام دهید تا DNA و دیواره های تیوب با الکل شسته شود. مجددا یکبار دیگر مرحله ۱۲ را تکرار کنید.

۱۴. پس از سانتریفوژ مرحله قبل اتانول را توسط پیپتینگ به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود. سپس تیوب را بر روی یک کاغذ جاذب سر و ته کنید تا رسوب بعد از ۱۴-۱۰ دقیقه خشک شود.

۱۵. محلول هیدرات کننده DNA (به میزان ۱۰۰µl برای ۳۰۰µl نمونه و ۲۵۰µl برای ۳ml نمونه) به تیوب اضافه نموده و برای یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. هر ۱۵ دقیقه یک بار به صورت ضربه زدن به تیوب محلول را مخلوط نمایید. به طور جایگزین می توانید انکوباسیون را در دمای اتاق یا در دمای ۴ °C برای یک شب انجام دهید.

۱۶. DNA استخراج شده را در دمای ۲-۸ °C نگهداری کنید.

۳.ب) تخلیص DNA ژنومی از خون کامل (برای پلیت ۹۶ خانه ای)

این روش می تواند برای حجم نمونه های خون ۲۰µl، ۳۰ µl و ۴۰µl استفاده شود. جدول زیر:

Sample	Cell Lysis Solution (RBC Lysis)	Nuclei Lysis Solution	Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution
20µl	60µl	20µl	6.7µl	20µl	10µl
30µl	90µl	30µl	10µl	30µl	15µl
40µl	120µl	40µl	13.3µl	40µl	20µl
50µl	150µl	50µl	16.5µl	50µl	25µl

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود.

- ✓ پلیت ۹۶ خانه ای با انتهای V شکل که بتواند تا حجم ۳۰۰µl در هر چاهک را در خود جا دهد
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ٪۷۰، دمای اتاق
- ✓ درب پوشش دهنده پلیت ۹۶ خانه ای (انتخابی: برای زمانی که نمونه خون انسان است)

۱. مقدار ۱۵۰µl از محلول لیز سلولی به هر چاهک اضافه کنید.

توجه: خون باید در EDTA، هپارین یا لوله ضد انعقاد سیتراته جمع آوری شود تا از منعقد شدن نمونه جلوگیری شود.

۲. مقدار ۵۰µl از نمونه خون را به چاهک هایی که حاوی محلول لیز سلولی است انتقال دهید و ۳-۲ بار پیپت کنید.

۳. به مدت ۱۰ دقیقه پلیت را در دمای اتاق انکوبه کنید (۲ بار در مدت زمان انکوباسیون هر چاهک را پیپت کنید) تا گلبول های قرمز لیز شوند.

۴. در دور g × ۸۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق پلیت را سانتریفوژ کنید، تا سلول ها تجمع پیدا کنند.

۵. سوپرناتانت (مایع رویی) را تا آنجایی که رسوب سفید رنگ (که بعلت وجود مقدار کمی گلبول قرمز صورتی است) در انتهای پلیت آسیبی نیبند؛ خارج کنید. کج کردن پلیت به میزان °۸۰- ۵۰ درجه (بسته به میزان مایعی که در هر چاهک وجود دارد) کمک به خارج کردن بیشتر مایع رویی میکند.

۶. به مقدار ۵۰ µl محلول لیز نوکلئیک اسید را به هر چاهک اضافه نموده و ۶-۵ بار پیپت کنید تا رسوب گلبول های سفید حل و سپس لیز شوند (پس از افزودن محلول لیز نوکلئیک اسید و پیپتینگ یک محلول بسیار ویسکوز مشاهده می شود). امکان دارد رسوب DNA در این مرحله با چشم قابل مشاهده نباشد.

۷. محلول رسوب دهی پروتئین را به مقدار ۱۶/۵ µl به هر چاهک اضافه کنید و هر چاهک را ۶ -۵ بار پیپت کنید.

۸. پلیت را در دور g × ۱,۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ کنید. رسوب قهوه ای تیره پروتئین؛ باید در انتهای چاهک تجمع پیدا کند. اگر رسوبی مشاهده نکردید به **بخش چهارم (آخرین صفحه)** دفترچه راهنما مراجعه کنید.

۹. رسوب دهی و رهیدراسیون DNA در پلیت ۹۶ خانه ای:

الف) با دقت سوپرناتانت را به چاهک تمیز که حاوی ۵۰µl ایزوپروپانول می باشد، منتقل کنید و با پیپتینگ مخلوط کنید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است درچاهک اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین های رسوب شده جلوگیری کنید. مانند مرحله ۵ کج کردن و ضربه زدن به پلیت می تواند، خروج مایع رویی را تسهیل نماید. استفاده از نوک سر سمپلر بلند برای مخلوط کردن ایزوپروپانول مناسب نمی باشد

ب) پلیت را در دور g × ۱,۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ کنید. با دقت ایزوپروپانول را با پیپت خارج نمایید.

پ) به مقدار ۱۰۰µl اتانول ٪۷۰ که به دمای اتاق رسیده است، به هر چاهک اضافه کنید.

ت) پلیت را در دور g × ۱,۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ کنید.

ج) با دقت اتانول را توسط پیپت به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود. سپس پلیت را در زاویه °۴۵- ۳۰ درجه قرار دهید و نمونه را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در معرض هوا قرار داده تا خشک شود.

چ) به هر چاهک به میزان ۲۵ µl محلول رهیدراسیون اضافه کنید. اجازه دهید یک شب در دمای اتاق یا دمای °C ۴ باقی بماند.

ح) DNA استخراج شده را در دمای °C ۸-۲ نگهداری کنید.

توجه: حجم کم DNA در انتهای چاهک V شکل را می توان به راحتی با سانتریفوژ جمع آوری کرد.

.

۳.پ) استخراج DNA ژنومی از کشت بافت و بافت حیوانی

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود:

- ✓ میکروتیوب ml ۱/۵ استریل
- ✓ فالکون ml ۱۵ استریل (برای نمونه بافت حیوانی)
- ✓ هموژنایزر کوچک (برای نمونه بافت حیوانی)
- ✓ تریپسین (فقط برای سلول ها ی کشت بافت چسبنده)
- ✓ PBS (برای سلول ها ی کشت بافت)
- ✓ نیتروژن مایع (انتخابی: مرحله **۱.ت**؛ برای سلول های کشت بافت، مرحله **۲.ب**؛ برای خرد کردن نمونه بافت حیوانی، مرحله **۳.ب**؛ به جای هموژنایزر برای نمونه دم موش)
- ✓ هاون (انتخابی: برای خرد کردن نمونه بافت حیوانی مرحله **۲.ب**؛ به جای هموژنایزر کوچک، و برای نمونه دم موش)
- ✓ حمام آب، ۹۵ °C (انتخابی: برای سلول های کشت بافت مرحله **۱.ت**؛)
- ✓ حمام آب، ۳۷ °C
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ٪۷۰، دمای اتاق
- ✓ حمام آب، ۶۵ °C (انتخابی، برای رهیدراسیون سریع تر DNA)
- ✓ 0.5M EDTA (pH 8.0) (انتخابی: برای دم موش)
- ✓ Proteinase K (20mg/ml in water) (برای دم موش)
- ✓ حمام آب، ۵۵ °C (برای دم موش)

۱. سلول های کشت بافت

الف) ابتدا سلول ها را کشت داده سپس به میکروتیوب ml ۱/۵ انتقال دهید. برای سلول های چسبنده، باید سلول ها از قبل تریپسینه شوند، سپس انتقال شوند.

ب) در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه نمونه را سانتریفوژ کنید، تا سلول ها رسوب کنند.

پ) مایع رویی را تا جایی که µl-۱۰µl ۵۰ بر روی رسوب سلولی باقی بماند دور بریزید.

ت) مقدار PBS ۲۰۰µl را به سلول ها اضافه کنید سپس باشدت میکروتیوب ورتکس نموده تا سلول ها حل شده و شستشو به خوبی انجام شود. سانتریفوژ مرحله (ب) را تکرار کنید و در انتها PBS را خارج کنید.

توجه: برای سلول هایی که در محلول لیز کننده نوکلئیک اسید به تنهایی لیز نمی شوند (مثل سلول های PC12)، باید سلول ها قبل از مرحله (ج) ابتدا فریز و دفریز شوند: ۱.شستشو سلول ها مانند مرحله (ت) ۲.فریز کردن سلول ها در نیتروژن مایع ۳.دفریز کردن سلول ها در حمام آب °C ۹۵. اینکار را تا ۴ بار مجددا تکرار کنید.

ج) مقدار ۶۰۰µl از محلول لیز کننده نوکلئیک اسید را با عمل پیپتینگ اضافه نموده تا سلول ها لیز شوند. پیپتینگ را تا جایی ادامه دهید تا دیگر هیچ کلامپ سلولی مشاهده نشود.

چ) مرحله چهارم، در ادامه مرحله **۳.ب؛**

۲. بافت حیوانی (کبد و مغز موش)

الف) مقدار ۶۰۰µl از محلول لیز کننده نوکلئیک اسید را به فالکون ۱۵ ml اضافه نمایید و فالکون را در یخ بگذارید تا سرد شود.

ب) ۱۰-۲۰mg از بافت تازه یا دفریز شده را به محلول لیز کننده نوکلئیک اسید سرد اضافه کنید و به مدت ۱۰ ثانیه از هموژنایزر کوچک استفاده کنید. سپس لیزات را به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال دهید.

بعنوان جایگزین می توانید بافت را در نیتروژن مایع و با استفاده از هاون خرد کنید (هاون باید از قبل در نیتروژن مایع سرد شود). بعد از خرد شدن صبر کنید تا نیتروژن مایع بخار شود سپس به طور تقریبی ۱۰-۲۰mg از بافت را به محلول لیز کننده نوکلئیک اسید سرد اضافه کنید.

پ) به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C لیزات را انکوبه کنید.

ت) مرحله چهارم، در ادامه مرحله **۳.ب؛**

۳. بافت حیوانی (دم موش)

الف) برای هر نمونه به میزان ۱۲۰µl از 0.5M EDTA solution (pH 8.0) به ۵۰۰µl محلول لیز کننده نوکلئیک اسید در میکروتیوب اضافه کنید و میکروتیوب را در یخ بگذارید تا سرد شود.

توجه: محلول پس از سرد شدن حالت ابر مانند پیدا میکند.

ب) به میکروتیوب ۱/۵ ml به اندازه ۰/۱-۵cm از دم موش تازه یا دفریز شده اضافه کنید.

توجه: ممکن است بافت دم با استفاده از نیتروژن مایع و هاون به صورت پودر تبدیل شود (هاون باید از قبل در نیتروژن مایع سرد شود). می توانید این پودر را به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال دهید.

پ) محلول تهیه شده از مرحله (الف) را به میکروتیوب اضافه کنید.

ت) مقدار ۱۷/۵µl از 20mg/ml Proteinase K را به میکروتیوب اضافه کنید.

ج) در دمای ۵۵°C نمونه را به مدت یک شب با انکوباتور شیکردار، انکوبه کنید. بعنوان جایگزین می توانید، به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵°C با انکوباتور شیکردار، انکوبه کنید؛ و هر یک ساعت یک بار نمونه را ورتکس نمایید. در آخر از هضم بافت دم حتما اطمینان حاصل کنید.

۴. **انتخابی برای بافت دم موش:** مقدار ۳ µl از محلول RNase را به لیزات نوکلئیک اسید اضافه کنید؛ سپس نمونه را ۵-۲ سر و ته کنید تا مخلوط شود و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید پس از اتمام زمان انکوباسیون، اجازه دهید نمونه به مدت ۵ دقیقه به دمای اتاق برسد، سپس مرحله بعد را انجام دهید.

۵. در دمای اتاق، به میزان ۲۰۰ µl محلول رسوب دهی پروتئین را اضافه کنید سپس با شدت نمونه را به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس کنید. برای مدت زمان ۵ دقیقه نمونه را درون یخ قرار دهید تا سرد شود.

۶. در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه نمونه را سانتریفوژ کنید تا پروتئین ها به صورت رسوب سفید در انتها قرار بگیرند.

۷. با دقت سوپرناتانت را که حاوی DNA می باشد به میکروتیوب ۱/۵ ml تمیز که دارای ۶۰۰µl ایزوپروپانول است، انتقال دهید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است درمیکروتیوب اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین ها رسوب شده جلوگیری شود.

۸. به آرامی میکروتیوب را سر وته کنید رشته های نخ مانند DNA به صورت یک توده قابل مشاهده تشکیل شود.

۹. نمونه را در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ کنید. در انتها یک رسوب سفید رنگ کوچک که همان DNA استخراج شده است؛ قابل مشاهده می باشد. به آرامی مایع رویی را دور بریزید.

۱۰. به مقدار ۶۰۰µl، اتانول ٪۷۰ را که به دمای اتاق از قبل رسیده است به رسوب DNA اضافه کنید. به آرامی میکروتیوب را سرو ته کنید و اینکار را چند بار انجام دهید تا DNA و دیواره های میکروتیوب با الکل شسته شود سپس در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ را انجام دهید.

۱۱. پس از سانتریفوژ مرحله قبل، اتانول را توسط پیپت به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود.

۱۲. سپس میکروتیوب را بر روی یک کاغذ جاذب سر و ته کنید تا رسوب بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه خشک شود.

۱۳. محلول رهیدرات کننده DNA را به میزان ۱۰۰µl به میکروتیوب اضافه نموده و برای یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. هر ۱۵ دقیقه یک بار به صورت ضربه زدن به میکروتیوب محلول را مخلوط نمایید. به طور جایگزین می توانید انکوباسیون را در دمای اتاق یا دمای ۴ °C به صورت شبانه انجام دهید.

۱۴. DNA استخراج شده را در دمای ۸-۲ °C نگهداری کنید.

۳.ت) استخراج DNA ژنومی از بافت گیاه

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود:

- ✓ میکروتیوب ml ۱٫۵ استریل
- ✓ نیتروژن مایع
- ✓ میکرو سانتریفوژ
- ✓ هاون
- ✓ حمام آب، ۶۵ °C
- ✓ حمام آب، ۳۷ °C
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ٪۷۰، دمای اتاق

۱. بافت برگ را در نیتروژن مایع و با استفاده از هاون خرد کنید تا کاملا پودر شود (هاون باید از قبل در نیتروژن مایع سرد شود). بعد از خرد شدن صبر کنید تا نیتروژن مایع بخار شود سپس به طور تقریبی ۴۰mg از بافت برگ را به میکروتیوبml ۱/۵ انتقال دهید.

۲. مقدار ۶۰۰µl از محلول لیز کننده نوکلئیک اسید را به میکروتیوب اضافه کنید سپس ۱-۳ ثانیه ورتکس کنید تا بافت مرطوب شود.

۳. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵°C نمونه را انکوبه کنید.

۴. مقدار ۳ µl محلول RNase را به لیزات سلولی اضافه کنید سپس نمونه را ۵-۲ بار سر و ته کنید تا مخلوط شود سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C نمونه را انکوبه کنید. پس از اتمام انکوباسیون، اجازه دهید به مدت ۵ دقیقه نمونه به دمای اتاق برسد، سپس مرحله بعد را انجام دهید.

۵. به مقدار ۲۰۰ µl در دمای اتاق، محلول رسوب دهی پروتئین را اضافه کنید سپس با شدت نمونه را به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس کنید.

۶. به مدت ۳ دقیقه در دور g × ۱۶,۰۰۰-۱۳,۰۰۰ میکروتیوب را سانتریفوژ کنید تا پروتئین ها به صورت رسوبی محکم در انتها قرار بگیرند.

۷. با دقت سوپرناتانت را که حاوی DNA می باشد؛ به میکروتیوب ml ۱/۵ دارای ۶۰۰µl ایزوپروپانول، انتقال دهید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است درمیکروتیوب اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین های رسوب شده، جلوگیری شود.

۸. به آرامی میکروتیوب را سر وته کنید. رشته های نخ مانند DNA به صورت یک توده قابل مشاهده تشکیل میشود.

۹. نمونه را در دور g × ۱۶,۰۰۰-۱۳.۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق، سانتریفوژ کنید. در انتها یک رسوب سفید رنگ کوچک که همان DNA است، قابل مشاهده می باشد. به آرامی مایع رویی را دور بریزید.

۱۰. به مقدار ۶۰۰µl، اتانول ٪۷۰ که به دمای اتاق از قبل رسیده است؛ به رسوب DNA اضافه کنید. به آرامی میکروتیوب را سرو ته کنید و اینکار را چند بار انجام دهید تا DNA و دیواره های میکروتیوب با الکل شسته شود سپس در دور g × ۱۶,۰۰۰-۱۳,۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ کنید.

۱۱. پس از سانتریفوژ مرحله قبل اتانول را توسط پیپت به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود.

۱۲. مکیرو تیوب را بر روی یک کاغذ جاذب سر و ته کنید تا رسوب بعد از ۱۵ دقیقه خشک شود.

۱۳. محلول رهیدرات کننده DNA را به میزان ۱۰۰µl به میکروتیوب اضافه نموده و برای یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. هر ۱۵ دقیقه یک بار به صورت ضربه زدن به میکروتیوب محلول را مخلوط نمایید. به طور جایگزین می توانید انکوباسیون را در دمای اتاق یا دمای ۴ °C به صورت شبانه انجام دهیدو

۱۴. DNA استخراج شده را در دمای ۲-۸ °C نگهداری کنید

۳.ج) استخراج DNA ژنومی از مخمر

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود:

- ✓ میکروتیوب ۱,۵ ml استریل
- ✓ YPD broth
- ✓ 50mM EDTA (pH 8.0)
- ✓ Lyticase (75 units/µl)
- ✓ حمام آب، ۳۷ °C
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ۷۰٪، دمای اتاق
- ✓ حمام آب، ۶۵ °C

۱. اضافه کردن ۱ml از محیط کشت YPD broth که مخمر در آن ۲۰ ساعت رشد داشته، به میکروتیوب ۱,۵ ml
۲. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند. سوپرناتانت را خارج کنید.
۳. حل کردن سلول ها در ۲۹۳µl از EDTA 50mM
۴. اضافه کردن ۷/۵µl آنزیم lyticase به نمونه و به آرامی ۴ بار پیپت کنید.
۵. به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C نمونه را نکوبه کنید تا دیواره سلول ها هضم شوند سپس اجازه دهید به مدت ۵ دقیقه تا به دمای اتاق برسد .
۶. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند. سوپرناتانت را خارج کنید.
۷. میزان ۳۰۰µl از محلول لیز کننده نوکلئیک اسید به میکروتیوب اضافه کنید . و به آرامی پیپت کنید تا رسوب سلولی مخلوط شود.
۸. به میزان ۱۰۰ µl محلول رسوب دهی پروتئین را اضافه کنید.
۹. اجازه دهید نمونه بر روی یخ تا ۵ دقیقه سرد شود
۱۰. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند
۱۱. با دقت سوپرناتانت را که حاوی DNA می باشد به میکروتیوب ۱,۵ ml تمیز دارای ۳۰۰µl ایزوپروپانول انتقال دهید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است درمیکروتیوب اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین ها رسوب شده جلوگیری شود.

۱۲. به آرامی تیوب را سر وته کنید رشته های نخ مانند DNA به صورت یک توده قابل مشاهده تشکیل شود.
۱۳. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انجام شود . در انتها یک رسوب سفید رنگ کوچک که همان DNA است قابل مشاهده می باشد و به آرامی مایع رویی را دور بریزید.

۱۴. به میزان ۳۰۰µl، اتانول ٪۷۰ که به دمای اتاق از قبل رسیده است به رسوب DNA اضافه کنید. به آرامی تیوب را سرو ته کنید و اینکار را چند بار انجام دهید تا DNA و دیواره های تیوب با الکل شسته شود

۱۵. در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ راانجام دهید.

۱۶. پس از سانتریفوژ مرحله قبل اتانول را توسط پیپت به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود. سپس تیوب را بر روی یک کاغذ جاذب سر و ته کنید تا رسوب بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه خشک شود

۱۷. محلول هیدرات کننده DNA را به میزان ۵۰µl به تیوب اضافه نموده

۱۸. مقدار ۱/۵ µl محلول RNase را به DNA استخراج شده اضافه کنید. برای ۱ ثانیه نمونه را ورتکس کنید سپس برای ۵ ثانیه سانتریفوژ کوتهای انجام دهید تا مایع در انتها تجمع پیدا کند سپس به مدت -۱۵ دقیقه در دمای °C ۳۷ انکوبه کنید

۱۹. و برای یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. هر ۱۵ دقیقه یک بار به صورت ضربه زدن به تیوب محلول را مخلوط نمایید. به طور جایگزین می توانید انکوباسیون را در دمای اتاق یا دمای °C ۴ به صورت یک شب انجام دهید

۲۰. DNA استخراج شده را در دمای °C ۸-۲ نگهداری کنید

۳.د) استخراج DNA ژنومی از باکتری گرم مثبت و باکتری گرم منفی

موادی که باید توسط مصرف کننده تهیه شود:

- ✓ میکروتیوب ۱,۵ ml
- ✓ حمام آب، ۸۰ °C
- ✓ حمام آب، ۳۷ °C
- ✓ ایزوپروپانول، دمای اتاق
- ✓ اتانول ۷۰٪، دمای اتاق
- ✓ حمام آب، ۶۵ °C
- ✓ 50mM EDTA (pH 8.0)
- ✓ lysozyme 10mg/ml (برای باکتری گرم منفی)
- ✓ lysostaphin 10mg/ml (برای باکتری گرم مثبت)

۱. اضافه کردن ۱ml از محیط کشت که باکتری یک شب درآن رشد داشته، به میکروتیوب ۱,۵ ml
۲. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند. سوپرناتانت را خارج کنید. برایباکتری گرم مثبت به مرحله سوم مرجعه کنید و برای باکتری گرم منفی مستقیم به مرحله ششم مراجعهکنید.
۳. حل کردن سلول ها در ۴۸۰µl از EDTA 50mM
۴. ۱۲۰µl آنزیم لیتیک و هضم کننده به رسوب سلولی اضافه کنید و به آرامی چند بار پیپت کنید.

توجه: برای گونه هایی خاص از استافیلوکوکوس مخلوطی از دو آنزیم lysozyme 10mg/ml به مقدار ۶۰µl و lysostaphin 10mg/ml به مقدار ۶۰µl برای لیز دیواره سلولی نیاز است. اگرچه بیشتر سویه های باکتری های گرم مثبت (مانند: باسیلوس سوبتیلیس، میکروکوکوس لوتئوس، نوکاردیا اوتیدیس کاویاروم، رودوکوکوس رودوکروس و برویباکتریوم آلبیدیوم) با آنزیم لیزوزیم به تنهایی لیز می شوند.

۵. در دمای ۳۷°C به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه نمونه را انکوبه کنید. سپس سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند. و سوپرناتانت را خارج کنید.
۶. میزان ۶۰۰µl از محلول لیز کننده نوکلئیک اسید به میکروتیوب اضافه کنید . و به آرامی پیپت کنید تا رسوب سلولی مخلوط شود.
۷. به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰°C نمونه را انکوبه کنید تا سلول ها لیز شوند؛ سپس بگذارید تا نمونه به دمای اتاق برسد
۸. مقدار ۳µl محلول RNase را به لیزات سلولی اضافه کنید. سپس تیوب را ۵-۲ بار سروته کنید.
۹. به مدت ۶۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C نمونه را انکوبه کنید و صبر کنید تا نمونه به دمای اتاق برسد
۱۰. به میزان ۲۰۰ µl محلول رسوب دهی پروتئین را اضافه کنید سپس برای ۲۰ ثانیه نمونه را ورتکس کنید تا محلول رسوب دهی پروتئین با لیزات سلولی مخلوط شود
۱۱. به مدت ۵ دقیقه نمونه را روی یخ قرار دهید

۱۲. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه تا سلول ها رسوب کنند

۱۳. با دقت سوپرناتانت را که حاوی DNA می باشد به میکروتیوب ۱,۵ ml تمیز دارای ۶۰۰µl ایزوپروپانول (دمای اتاق) انتقال دهید.

توجه: مقداری از سوپرناتانت ممکن است درمیکروتیوب اولیه که حاوی رسوب پروتئین بود، باقی بماند. این سوپرناتانت باقیمانده را استفاده نکنید تا از آلوده شدن DNA به پروتئین ها رسوب شده جلوگیری شود.

۱۴. به آرامی تیوب را سر وته کنید رشته های نخ مانند DNA به صورت یک توده قابل مشاهده تشکیل شود.

۱۵. سانتریفوژ در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه انجام شود . در انتها یک رسوب سفید رنگ کوچک که همان DNA است قابل مشاهده می باشد و به آرامی مایع رویی را دور بریزید.

۱۶. به میزان ۶۰۰µl، اتانول ٪۷۰ که به دمای اتاق از قبل رسیده است به رسوب DNA اضافه کنید. به آرامی تیوب را سرو ته کنید و اینکار را چند بار انجام دهید تا DNA و دیواره های تیوب با الکل شسته شود.

۱۷. در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ راانجام دهید.

۱۸. پس از سانتریفوژ اتانول را توسط پیپت به آرامی خارج کنید. این مرحله بسیار حساس است زیرا رسوب DNA شل می باشد و به آسانی ممکن است وارد نوک سر سمپلر شود. سپس تیوب را بر روی یک کاغذ جاذب سر و ته کنید تا رسوب بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه خشک شود

۱۹. محلول هیدرات کننده DNA را به میزان ۱۰۰µl به تیوب اضافه نموده و برای یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. هر ۱۵ دقیقه یک بار به صورت ضربه زدن به تیوب محلول را مخلوط نمایید. به طور جایگزین می توانید انکوباسیون را در دمای اتاق یا دمای ۴ °C به صورت یک شب انجام دهید

۲۰. DNA استخراج شده را در دمای ۸-۲ °C نگهداری کنید

شرکت تحقیقاتی و تولیدی
آرکا طب روهام

مشکلات و راه حل استخراج DNA که ممکن است در حین کار مواجه شوید:

تفسیر	علامت
تیوب نمونه به صورت نامناسب نگهداری شده است؛ و خون به طور کامل مخلوط نشده است یا تیوب مناسبی برای نگهداری خون استفاده نشده است. خون لخته شده را دور ریخته و نمونه جدید را در تیوب حاوی EDTA، هپارین یا لوله ضد انعقاد سیتراته جمع آوری شود تا از منعقد شدن نمونه جلوگیری شود.	وجود لخته های خون در نمونه های خون
ممکن است خود نمونه خون دارای گلبول های کمی بوده باشد. نمون جدیدی را امتحان کنید رسوب گلبول های سفید به طور کامل در Step 5 of Section 3.A or B. حل نشده است. رسوب گلبول های سفید حتما باید با شدت ورتکش شود نمونه خون بسیار قدیمی است. بهترین بازدهی برای نمونه جدید خون است. نمونه خونی که بیشتر از پنج روز در دمای ۲°C-۸ نگهداری شده است بازدهی استخراج را کاهش میدهد. رسوب DNA در مرحله رسوب دهی با ایزوپروپانول از دست رفته است. در این مرحله باید دقت کافی را داشته باشید تا رسوب از دست نرود	استخراج DNA با بازدهی و مقدارکم
جمع آوری و نگهداری نامناسب نمونه خون	DNA دگرده شده (با طول ۵۰> باز)
کشت دادن باکتری در زمان بیشتر باعث تجمع بالای سلول های باکتری در محیط کشت می شود که در زمان تیمار با لیزوزستافین به راحتی دیواره سلولیشان لیز می شود. استخراج دیگری را با محیط کشت سالم و مناسب امتحان کنید.	استخراج DNA با بازدهی و مقدارکم در باکتری گرم مثبت
نمونه قبل از افزودن محلول رسوب دهی پروتئین به دمای اتاق نرسیده بود. حداقل مدت زمان ۵ دقیقه برای سرد شدن نمونه و رسیدن به دمای اتاق در نظر بگیرید (می توانید در یخ هم قرار دهید تا زودتر به دمای اتاق برسد).۲۰ ثانیه ورتکس کنید سپس در دور g × ۱۳,۰۰۰-۱۶,۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ راانجام دهید(دور g × ۲۰۰۰ برای نمونه خون ۳ ml) و ادامه پروتکل را انجام دهید.	عدم تشکیل رسوب پروتئینی

آدرس:بزرگراه یادگار امام، خیابان امام خمینی، بین خیابان کارون و قصرالدشت،کوچه اله وردی، پلاک ۱۳، واحد ۱۰

تلفن: ۰۲۱۶۶۳۱۵۴۳ - ۰۲۱۶۶۳۷۹۰۲۶

موبایل و واتساپ: ۰۹۱۲۰۵۴۹۸۹۳

www.ATRMED.COM

info@atrmed.com

محلول رسوب دهی پروتئین به طور کامل با لیزات نوکلئیک اسید مخلوط نشده است.	
نمونه ها بیشتر از حد معمول خشک شده اند. مجدد به DNA محلول رهیدرات کننده اضافه کنید و یک ساعت در دمای ۶۵°C انکوبه کنید سپس در دمای اتاق یا ۴°C قرار دهید. هرگز یک شب در دمای ۶۵°C DNA را قرار ندهید نمونه با محلول رهیدرات کننیده به خوبی مخلوط نشده. به یاد داشته باشید به صورت دوره ای در مرحله رهیدرات کننده نمونه را مخلوط کنید	حل شدن رسوب DNA به سختی