



BehPrep **G-Plus** **DNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Genomic, Viral &
Bacterial DNA from a Vast Variety of Samples
Based on Spin Column

Cat Number: BP101R010/050/100

Ver: 08

- در دمای اتاق نگهداری شود
- تاریخ انقضاء: سه سال پس از تولید

فهرست

5	محتویات کیت
5	شرایط پایداری و نگهداری
6	معرفی
6	حیطه کاربری
6	نکات مهم
7	تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:
7	نکات ایمنی
8	آماده سازی بافرها
8	Proteinase K
8	NA Carrier
9	استخراج DNA از خون و مایعات بدن
9	فرآیند
11	استخراج DNA از 400 μ L خون محیطی تازه
12	فرآیند
12	استخراج DNA از خون فریز شده
13	استخراج DNA از خون خشک شده (DBS)
13	فرآیند
15	استخراج DNA از بافی کوت
15	آماده سازی نمونه
15	فرآیند

- 16.....استخراج DNA از سلولهای دهانی
- 16.....آماده سازی نمونه
- 16.....فرآیند
- 17.....استخراج DNA از بزاق
- 17.....آماده سازی نمونه
- 18.....فرآیند
- 18.....استخراج DNA از سلولهای کشت داده شده
- 19.....آماده سازی نمونه
- 19.....روش تریپسینه کردن
- 19.....استفاده از Cell scraper
- 20.....فرآیند
- 20.....استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون ها
- 20.....فرآیند
- 22.....استخراج DNA ویروسی از مدفوع
- 22.....آماده سازی نمونه
- 23.....فرآیند
- 23.....استخراج DNA ویروسی از نمونه سوآب چشمی، بینی و حلق
- 24.....آماده سازی نمونه
- 24.....استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based
- 24.....آماده سازی نمونه
- 25.....فرآیند
- 27.....استخراج DNA از بافت

27	فرآیند
31	استخراج DNA از بافتهای فیکس شده در پارافین و فرمالین (FFPE Tissue)
32	فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در پارافین با استفاده از Deparaffinization Solution
35	فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در پارافین با استفاده از زایلن
38	فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در فرمالین
39	استخراج DNA باکتری
40	آماده سازی نمونه
40	مایعات زیستی شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر
41	فرایند (باکتری گرم منفی)
42	فرایند (باکتری گرم مثبت)
42	ضمیمه ها
42	آماده سازی نمونه خلط (Sputum)
43	آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)
43	آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی
44	چالش ها و راه کارها
47	کنترل کیفیت
48	تاریخچه ویرایش پروتکل

محتویات کیت

شرایط نگهداری	100 واکنش (BP101R100)	50 واکنش (BP101R050)	10 واکنش (BP101R010)	محتویات	CAT.NO.
دمای اتاق	100 pcs	50 pcs	10 pcs	Spin Column	
دمای اتاق	400 pcs	200 pcs	40 pcs	Collection Tube	
دمای اتاق	51 mL	26 mL	6 mL	HL Buffer	BR107
دمای اتاق	58 mL	30 mL	7 mL	WB1 Buffer	BR102
دمای اتاق	125 mL	62 mL	13 mL	WB2 Buffer	BR103
دمای اتاق	22 mL	11 mL	3 mL	EB Buffer	BR104
دمای اتاق	24 mL	12 mL	4 mL	TL Buffer	BR108
دمای اتاق	1 vial (40mg)	1 vial (20mg)	1 vial (4mg)	Proteinase K	BR105
دمای اتاق	2 mL	2 mL	2 mL	PK Buffer	BR106
دمای اتاق	1 vial (320μg)	1 vial (320μg)	1 vial (320μg)	NA Carrier	BR112

شرایط پایداری و نگهداری

ستون‌ها در کیسه‌های زیپ دار بسته بندی شده‌اند و در دمای اتاق (18–25 °C) تا پایان تاریخ انقضای کیت پایداری خواهند داشت.

همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد. در صورت رویت رسوب حاصل از نگهداری در دمای پایین، محلول‌ها را در دمای اتاق ($18-25^{\circ}\text{C}$) و یا در حمام آب 37°C گرم کنید تا رسوبات حل شوند. بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشند که هیچ تأثیری در عملکرد آنها نخواهد داشت.

درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید. توجه: نگهداری در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ (یخچال) یا 15°C تا 25°C (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص DNA خواهد گذاشت.

معرفی

کیت استخراج Behprep G-plus DNA یک کیت جامع و کامل با بازدهی بالا و متد آسان جهت استخراج DNA انسانی، ویروسی و باکتریایی و استخراج از بافت تازه و بافت پارافینه به روش ستونی طراحی شده است.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep G-Plus DNA جهت استخراج دستی DNA از نمونه های انسانی، باکتریایی و ویروسی به روش ستونی طراحی شده است. DNA استخراج شده قابل برش توسط آنزیم های محدود کننده بوده و مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot می باشد.

نکات مهم: لطفاً قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق ($18-25^{\circ}\text{C}$) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد-ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً همگن نمایید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.

- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- بعد از هر انتقال مایع به وسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتردار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشاء ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسول، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.
- عدد rpm برای سانتریفیوژهای مختلف ممکن است متفاوت باشد. جهت تبدیل دقیق عدد g به rpm، می‌توانید از ماشین حساب موجود در سایت behgene.com استفاده نمایید.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:

- سمپلر 10-100 μL و 100-1000 μL و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای HL، TL و WB1 حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.

- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی بافرها

Proteinase K

میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.

- توجه داشته باشید آنزیم آماده شده باید در دمای 20°C - نگهداری شود.

40 mg	20 mg	4 mg	مقدار پروتئیناز K
2 mL	1 mL	200 μL	مقدار بافر PK

NA Carrier¹

توجه: NA Carrier در فرآیند استخراج DNA ویروسی کاربرد دارد.

1. میزان $320\text{ }\mu\text{L}$ بافر EB را به تیوب حاوی $320\text{ }\mu\text{g}$ NA Carrier لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ بدست آید. NA Carrier را کاملاً همگن نموده و در دمای 20°C - نگهداری نمایید.

- از تکرار چرخه انجماد/ذوب NA Carrier بیش از 3 بار پرهیز کنید.
- برای ماندگاری بهتر و استفاده طولانی مدت، 10 الیکوت $32\text{ }\mu\text{L}$ از NA Carrier فراهم کنید. (هر الیکوت برای 10 واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد).

¹ NA Carrier = Nucleic Acid Carrier

2. به ازای هر نمونه (مایعات بدن) میزان $3\ \mu\text{L}$ از NA Carrier را به $500\ \mu\text{L}$ بافر HL اضافه کنید. (برای مثال اگر تعداد 10 نمونه برای استخراج DNA دارید، $30\ \mu\text{L}$ از

NA Carrier را به $5.1\ \text{mL}$ بافر HL اضافه کنید.)

- در هنگام لایز به ازای هر نمونه فقط $500\ \mu\text{L}$ بافر لایز حاوی NA Carrier نیاز دارید و مقادیر بیشتر برای جلوگیری از خطای پیتاژ در نظر گرفته شده است. توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می باشند.

استخراج DNA از خون و مایعات بدن

- نمونه خون تازه و منجمد در این روش قابل استفاده می باشد.
- قبل از شروع فرآیند، نمونه‌ی منجمد را به دمای اتاق برسانید.
- جهت دستیابی به نتیجه مطلوب، توصیه می شود از تیوب های حاوی ترکیبات ضد انعقاد جهت جمع آوری خون استفاده نمایید.

فرآیند

1. میزان $15\ \mu\text{L}$ پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب $2\ \text{mL}$ تمیز بریزید. سپس 200 μL از نمونه را به تیوب اضافه کنید.
- اگر حجم نمونه کمتر از $200\ \mu\text{L}$ است، مقدار مناسب از محلول PBS (1x) را اضافه کنید تا حجم کل به $200\ \mu\text{L}$ برسد.
- در صورت در دسترس بودن نمونه، استفاده از حجم کمتر از $200\ \mu\text{L}$ توصیه نمی شود.
2. میزان $200\ \mu\text{L}$ بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند و به مدت 10 دقیقه در دمای $56\ ^\circ\text{C}$ انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.

3. میزان 300 μL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطعات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
5. میزان 500 μL بافر WB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
6. میزان 600 μL بافر WB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. بار دیگر مرحله 6 را تکرار نمایید.
8. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید .
- توصیه می‌شود در مرحله 8 کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) انتقال دهید.
- هرگونه انتقال بافر WB2 در این مرحله می‌تواند به‌عنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند .
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می‌توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.
9. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز قرار دهید. 70 μL از بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده است، به مرکز غشاء ستون اضافه کنید. درب

ستون را ببندید و 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس در $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

- استفاده کمتر از $70 \mu\text{L}$ بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما میزان DNA استخراج شده را اندکی کاهش می‌دهد.
- شستشوی غشاء با حجم کمتر از $50 \mu\text{L}$ بافر EB توصیه نمی‌شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می‌شود.
- میزان DNA استخراج شده به تعداد گلبول های سفید خونی بستگی دارد. به طور کلی بازده نهایی DNA استخراج شده $3-12 \mu\text{g}$ با کیفیت $A260/280 \text{ ratio}=1.8-1.9$ می‌باشد.
- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20-50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C - ذخیره نمایید.

استخراج DNA از $400 \mu\text{L}$ خون محیطی تازه

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- تیوب 2 mL

نکات:

- در این روش از خونی که بیشتر از یک هفته نگهداری شده است استفاده نکنید.
- نمونه خون تازه را حداقل یک ساعت پس از نمونه گیری، جهت استخراج استفاده نمایید.
- این روش جهت بدست آوردن DNA با غلظت بیشتر ($< 200 \mu\text{g/ml}$) بهینه سازی شده است.

- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت ($3000-4500 \text{ Cell}/\mu\text{L}$) نیز مناسب می‌باشد.

فرآیند

1. میزان $400 \mu\text{L}$ خون را در داخل تیوب 1.5mL بریزید و با دور 8000 rpm ($6000 \times g$) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
2. پس از سانتریفیوژ، میزان $200 \mu\text{L}$ از پلاسمای رویی را بدون برخورد نوک سر سمپلر به سطح خون جدا کرده و دور بریزید.
3. میزان $15 \mu\text{L}$ پروتئیناز K و $200 \mu\text{L}$ بافر HL را به نمونه اضافه کرده و سپس ورتکس نمایید.
- توصیه می‌شود بعد از هر Pulse-Vortexing تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شود.
4. میکروتیوب را به مدت 15 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 3 عمل نمایید.

استخراج DNA از خون فریز شده

- جهت استخراج DNA با استفاده از این روش، پیشنهاد می‌شود خون در حجم $500 \mu\text{L}$ یا 1 mL فریز شود.
 - راندمان استخراج DNA از خون فریز شده به دلیل لایز برخی از لوکوسیت‌ها در هنگام فریز شدن، به نسبت خون تازه می‌تواند کمتر باشد.
1. پس از خارج کردن خون از فریزر، قبل از ذوب شدن مقدار 3 برابر حجم خون، بافر RBC Lysis (Cat: BR201V100) را به خون اضافه کنید.
 2. تا زمانی که بافر روی خون یخ زده قرمز شود، میکروتیوب را تکان دهید.

3. میکروتیوب را درون شیکر دورانی در 10000–20000 rpm قرار داده تا زمانی که خون کاملاً ذوب شود. این زمان برای 500 μ L خون 5 دقیقه می باشد.
4. بعد از ذوب شدن کامل خون، میکروتیوب را کمی ورتکس کنید تا نمونه و بافر کاملاً ترکیب شوند.
5. میکروتیوب را در 8000 rpm (8000 x g) به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا رسوب تشکیل شود.
6. تا حد امکان مایع رویی را بدون آسیب به رسوب سلولی به وسیله سمپلر جدا کنید.
- توجه داشته باشید مایع تشکیل شده بر روی رسوب می تواند کاهش بازده استخراج را به همراه داشته باشد.
7. میکروتیوب را کمی ورتکس نمایید تا رسوب مجدداً حل شود و سپس میزان 200 μ L بافر (1X) PBS سرد را اضافه کنید. میکروتیوب را کمی ورتکس نمایید تا زمانی که رسوب و بافر مخلوط شوند. در ادامه مطابق فرایند استخراج DNA از خون و مایعات بدن عمل نمایید.

استخراج DNA از خون خشک شده (DBS)

* خون خشک شده یا Dry Blood Spot، که به وسیله کاغذ نمونه گیری به نام گاتری جمع آوری می شود.

فرآیند

1. حداقل 3 الی 5 برش با قطر 3 mm از خون خشک شده بر روی کاغذ گاتری (کاغذ جمع آوری نمونه خون خشک شده) را به میکروتیوب 2 mL انتقال دهید.

2. میزان 20 μL محلول پروتئیناز K و 500 μL بافر TL را به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
3. میکروتیوب را به مدت 60 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید. کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. میزان 300 μL بافر HL را اضافه نمایید و به مدت 10 دقیقه در دمای 70°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 2 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید. کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
5. میکروتیوب را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را جدا کرده و به میکروتیوب دیگر منتقل کنید. دقت شود رسوب باقی مانده از ذرات کاغذ به تیوب جدید منتقل نشود.
6. میزان 500 μL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و مجدداً به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. سپس میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب ستون جدا شود.
7. میزان 800 μL از محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در $6000 \times$ (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
8. مرحله قبل را با اضافه کردن باقیمانده مخلوط به ستون تکرار کنید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، مرحله 5، عمل نمایید.

استخراج DNA از بافی کوت

- در این روش از خونی که بیشتر از یک هفته نگهداری شده است استفاده نکنید.
- این روش جهت استخراج DNA با غلظت بیشتر ($>600 \mu\text{g/ml}$) بهینه‌سازی شده است.
- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت ($1000-3000 \text{ Cell}/\mu\text{L}$) نیز مناسب می‌باشد.

آماده‌سازی نمونه

برای جداسازی بافی‌کوت، 1-3 ml خون محیطی (حاوی ترکیبات ضد انعقاد) را در $2500 \times g$ به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ نمایید، پس از آن 3 لایه مجزا مشاهده می‌شود که به ترتیب از بالا به پایین، پلاسما، بافی‌کوت و رسوب گلبول‌های قرمز می‌باشد. ابتدا به گونه‌ای که لایه بافی‌کوت آسیبی نبیند، پلاسما را بردارید و دور بریزید. سمپلر را روی $200 \mu\text{L}$ تنظیم کنید و به آرامی بافی‌کوت را جدا کرده و به میکروتیوب 1.5 mL انتقال دهید. نمونه را در دمای 20°C - ذخیره کرده و یا مستقیماً مطابق فرآیند زیر عمل نمایید.

فرآیند

1. میزان $15 \mu\text{L}$ پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس $200 \mu\text{L}$ از بافی‌کوت را به تیوب اضافه نمایید.
2. میزان $200 \mu\text{L}$ بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند و به مدت 20 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن از مرحله 3 عمل نمایید

استخراج DNA از سلول‌های دهانی

آماده‌سازی نمونه

1. برای نمونه‌گیری، سوآب را به سطح مخاط دهان کشیده و 10-15 بار تکرار کنید. توجه داشته باشید فرد باید حداقل 30 دقیقه قبل از جمع‌آوری نمونه از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن پرهیز کند.
2. سر سوآب را به وسیله دست یا قیچی جدا کرده و آن را در یک میکروتیوب 1.5 mL قرار دهید.

فرآیند

1. میزان 20 μ L محلول پروتئیناز K و 200 μ L بافر TL را به نمونه اضافه نمایید. بلافاصله به مدت 15 ثانیه به وسیله ورتکس شدید مخلوط نمایید. (ورتکس باید به صورتی انجام شود که سلول‌های متصل به سوآب به داخل بافر آزاد شود)
 - برای اطمینان از مرحله لایز مؤثر، بلافاصله بعد از اضافه کردن بافر TL، نمونه و بافر را کاملاً Vortex کنید.
2. میکروتیوب را به مدت 30 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
 - زمان انکوباسیون را جهت لایز بهتر و غلظت بیشتر می‌توانید تا 1 ساعت ادامه دهید.
3. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ نمایید.
4. با احتیاط محلول رویی را درون یک میکروتیوب 2 mL جدید بریزید.
 - مراقب باشید رسوب تشکیل شده همراه با محلول رویی به میکروتیوب انتقال داده نشود. چنانچه این مرحله به درستی انجام نگیرد، کیفیت DNA استخراج شده را تحت تأثیر قرار خواهد داد.
5. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از بافت، از مرحله 6 عمل نمایید.

استخراج DNA از بزاق

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش:

- تیوب 1.5 mL
- سانتریفیوژ یخچالدار (در صورت امکان)
- ترموبلاک شیکردار (در صورت امکان)

آماده‌سازی نمونه

- در این روش می‌توانید استخراج DNA را از بیش از $500\ \mu\text{L}$ بزاق دهان انجام دهید.
- مراحل آماده‌سازی نمونه و فرآیند استخراج (تا افزودن بافر HL) را بر روی یخ انجام دهید.
- توجه داشته باشید به دلیل وجود تعداد زیاد سلول‌های مرده در بزاق، امکان مشاهده DNA تخریب شده در این روش وجود دارد.
- 1. میزان $500\ \mu\text{L}$ بزاق دهان را در یک تیوب 15 mL بریزید.
- توجه: حداقل 30 دقیقه قبل از جمع‌آوری نمونه بزاق، دهان را به وسیله آب کاملاً شستشو داده و از خوردن، آشامیدن، کشیدن سیگار و جویدن آدامس خودداری نمایید.
- 2. میزان 1 mL محلول PBS (1X) سرد را به تیوب حاوی نمونه بزاق اضافه کرده و ورتکس نمایید تا کاملاً مخلوط شود. نمونه را به میکروتیوب 1.5 mL انتقال دهید.
- 3. میکروتیوب را در $8000\ \text{rpm}$ ($6000 \times g$) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. توصیه می‌شود در این مرحله از سانتریفیوژ یخچالدار استفاده کنید و دمای سانتریفیوژ را در 4°C تنظیم نمایید.
- 4. مایع رویی را بدون آسیب به رسوب دور بریزید. رسوب را با 1 mL محلول PBS (1X) سرد مخلوط نمایید و کمی ورتکس کنید.
- 5. میکروتیوب را در $8000\ \text{rpm}$ ($6000 \times g$) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- توصیه می‌شود در این مرحله از سانتریفیوژ یخچالدار استفاده کنید و دمای سانتریفیوژ را در 4°C تنظیم نمایید.
- 6. حدوداً میزان $200\ \mu\text{L}$ محلول PBS را در میکروتیوب باقی گذارید و مایع رویی را جدا کرده و دور بریزید.
- 7. کمی ورتکس نمایید تا رسوب تشکیل شده دوباره حل شود.

فرآیند

1. میزان $15\ \mu\text{L}$ پروتئیناز K را به نمونه اضافه کرده و کمی سانتریفیوژ نمایید.
2. میزان $200\ \mu\text{L}$ بافر HL را اضافه نمایید. کمی سانتریفیوژ کنید (Short Spin) و به مدت حداقل 30 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید.
3. میزان $300\ \mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه-Pulse vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 4 عمل نمایید.
- توصیه می‌شود در این مرحله از ترموبلاک شیکردار استفاده نمایید.

استخراج DNA از سلول‌های کشت داده شده

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- PBS (1X)
- و با توجه به روش انتخاب شده یکی از موارد زیر نیز مورد نیاز می‌باشد:
- میکروسانتریفیوژ
- تریپسین و محیط کشت
- Cell scraper
- توجه: بیش از 5×10^6 عدد سلول (با عدد کروموزومی نرمال) استفاده نشود.

آماده‌سازی نمونه

سلول‌ها را مطابق یکی از روش‌های زیر جدا کنید:

روش اول) سلول‌های کشت شده در محیط کشت مایع: تعداد سلول‌ها را تعیین نمایید (بیش از 5×10^6 عدد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود). تعداد مناسبی از سلول‌ها را در میکروتیوب 1.5 mL ریخته، و در $300 \times g$ به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. با احتیاط و بدون آسیب رساندن به رسوب سلولی، مایع رویی را جدا کرده و دور بریزید.

روش دوم) کشت سلولی تک لایه: در کشت سلولی تک لایه، می‌توان سلول‌ها را با استفاده از تریپسین یا Cell scraper از فلاسک کشت سلولی جدا کرد (بیش از 5×10^6 سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود).

روش تریپسینه کردن

تعداد سلول‌ها را تعیین نمایید. محیط کشت را خالی کرده و سلول‌ها را با استفاده از PBS (1X) شستشو دهید. PBS را خالی کرده، و تریپسین 0.25%–0.10% را اضافه نمایید و در دمای 37°C انکوبه نمایید. بعد از اینکه سلول‌ها از فلاسک کشت جدا شدند، آنها را با اضافه کردن مقدار مناسب محیط کشت حاوی 10% FBS به فلاسک جمع‌آوری کنید (حجم محیط کشت حاوی 10% FBS باید دو برابر حجم تریپسین اضافه شده باشد). سلول‌ها را پس از جمع‌آوری به فالكون انتقال دهید.

نکته: 10% FBS باعث غیرفعالسازی تریپسین می‌شود.

تعداد مناسب از سلول‌ها (بیش از 5×10^6 تعداد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود) را به میکروتیوب 1.5 mL انتقال دهید. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در $300 \times g$ سانتریفیوژ نمایید. با احتیاط و بدون آسیب رساندن به رسوب سلولی، مایع رویی را جدا کرده و دور بریزید.

استفاده از Cell scraper

سلول‌ها را از فلاسک کشت سلول جدا کنید. تعداد مناسب از سلول‌ها (بیش از 5×10^6 تعداد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود) را به میکروتیوب 1.5

mL انتقال دهید. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در $300 \times g$ سانتریفیوژ نمایید. با احتیاط و بدون آسیب رساندن به رسوب سلولی، مایع رویی را جدا کرده و دور بریزید.

فرآیند

1. رسوب سلولی را در محلول PBS (1X) حل نمایید و حجم نهایی را به $200 \mu\text{L}$ برسانید. میزان $15 \mu\text{L}$ پروتئیناز K را اضافه نمایید.
2. میزان $200 \mu\text{L}$ بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید.
3. میزان $300 \mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 4 عمل شود.

استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها

فرآیند

1. میزان $15 \mu\text{L}$ پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب تمیز 2 mL بریزید. سپس 500 μL از نمونه را به درون تیوب اضافه نمایید.
- اگر حجم نمونه کمتر از $500 \mu\text{L}$ است، مقدار مناسب از محلول PBS (1X) را اضافه کنید تا حجم کل به $500 \mu\text{L}$ برسد.
- استفاده از حجم کمتر از $500 \mu\text{L}$ نمونه در این فرآیند توصیه نمی‌شود.
2. میزان $500 \mu\text{L}$ بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه

نمایید. در طول زمان انکوباسیون تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-Vortex کنید

- توصیه می‌شود میزان $3\ \mu\text{L}$ از محلول NA Carrier را به $500\ \mu\text{L}$ بافر HL اضافه نمایید.
- 3. میزان $600\ \mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
- 4. میزان $800\ \mu\text{L}$ از محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- 5. مرحله قبل را با اضافه کردن باقیمانده مخلوط به ستون تکرار کنید.
- 6. میزان $500\ \mu\text{L}$ بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- 7. میزان $600\ \mu\text{L}$ بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را با سرعت $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- 8. توصیه می‌شود در این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می‌توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.

9. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 60 μ L بافر EB ازپیش گرم شده در دمای 60°C را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- استفاده کمتر از 60 μ L بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می شود اما میزان DNA استخراج شده را اندکی کاهش خواهد داد.
- شستشوی غشاء با حجم کمتر از 50 μ L بافر EB توصیه نمی شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می شود.
- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20-50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C- ذخیره نمایید.

استخراج DNA ویروسی از مدفوع

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- محلول سالین 0.9% (Saline Solution)
- فیلتر 0.22 μ m

آماده سازی نمونه

1. میزان 0.5-1.0 mL از نمونه مدفوع را در حداکثر 5 mL محلول سالین 0.9% (حداکثر رقت 1:10) حل نمایید.

2. محلول را در $4000 \times g$ به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا یک محلول شفاف حاصل شود.
3. مایع رویی را به وسیله فیلتر $0.22 \mu m$ فیلتر نمایید.
- فیلتراسیون در این مرحله باعث جداسازی سلول‌ها از نمونه مدفوع، و در نتیجه کاهش میزان DNA سلولی در نمونه آماده‌سازی شده می‌شود.

فرآیند

1. میزان $500 \mu L$ از نمونه فیلتر شده را درون میکروتیوب 2 mL بریزید. $15 \mu L$ پروتئیناز K را اضافه نمایید.
 2. میزان $500 \mu L$ بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای $56^\circ C$ انکوبه نمایید.
 - توصیه می‌شود میزان $3 \mu L$ از محلول NA Carrier را به $500 \mu L$ بافر HL اضافه نمایید.
 3. میزان $600 \mu L$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها، از مرحله 4 عمل شود.
- توجه:** در این فرآیند، مرحله الوشن را با استفاده از $60 \mu L$ بافر EB انجام دهید.

استخراج DNA ویروسی از نمونه سوآب چشمی، بینی و حلق

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ

آماده‌سازی نمونه

1. بعد از نمونه‌گیری به وسیله سوآب، آن را درون 2 mL بافر فسفات سالین حاوی ترکیبات ضد قارچ و ضد باکتری قرار دهید و به مدت 2-3 ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.
2. مطابق پروتکل تغلیظ نمونه، حجم نمونه را از 2 mL به 200 μ L برسانید. چنانچه به کیت تغلیظ دسترسی ندارید مراحل استخراج را با حجم 500 μ L از نمونه طبق فرآیند استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها انجام دهید.

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based

- این فرآیند دارای حساسیت بالا جهت استخراج DNA ویروس HPV می‌باشد.

آماده‌سازی نمونه

جهت تغلیظ نمونه میزان 1-5 mL نمونه را در 4500 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده، مایع رویی را کاملاً خارج کنید. به صورتی که فقط رسوب سلولی باقی بماند.

- چنانچه در آزمایشگاه مولکولی خود سانتریفیوژ لوله فالكون موجود ندارید، به منظور تغلیظ، میزان 2 mL نمونه را در (8000 rpm) $6000 \times g$ سانتریفیوژ نمایید. در صورت کافی نبودن رسوب تشکیل شده، این فرایند را تکرار کنید.
 - از آنجایی که غلظت و کیفیت نهایی DNA استخراج شده وابسته به نحوه نمونه‌گیری و میزان سلول‌های موجود در نمونه Liquid-Based می‌باشد، لازم است میزان رسوب سلولی قابل توجهی پیش از شروع فرایند استخراج تشکیل شود.
- نکته:** اگر نمونه شفاف و بدون رسوب باشد پیشنهاد می‌شود:
1. تیوب نمونه‌گیری کاملاً ورتکس شود تا تمام سلول‌ها و بافت‌های متصل به سایتوبراش از آن جدا شود.

2. حداکثر میزان نمونه اولیه استفاده شود.
3. حداکثر سرعت (10000 rpm) و زمان (15 دقیقه) را جهت سانتریفیوژ استفاده کنید.
4. نحوه خارج کردن مایع رویی به صورتی باشد که حداقل 150 μ L از مایع در انتهای میکروتیوب باقی بماند تا حداقل رسوب تشکیل شده از دست نرود.

فرآیند

1. میزان 180 μ L از بافر TL را به رسوب سلولی اضافه کرده و ورتکس کنید.
2. میزان 15 μ L پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید و به مدت 20 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل نمونه، در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
- استفاده از پروتئیناز K در این مرحله ضروری می باشد.
- نکته:** در صورتی که تکه های بافتی لایز نشده و یا ذرات پلاستیکی مربوط به سایتوبراش در محیط لایز باقی مانده است، میتوانید میکروتیوب را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید و تنها مایع رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کنید.
3. میزان 200 μ L بافر HL و میزان 300 μ L اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.
- توصیه می شود در صورت شفاف بودن و عدم رسوب نمونه، میزان 3 μ L از محلول NA Carrier را به 200 μ L بافر HL اضافه نمایید.
4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک

دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

5. میزان 500 μL بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در 8000 rpm ($6000 \times g$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

6. میزان 600 μL بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در 8000 rpm ($6000 \times g$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

7. توصیه می شود در این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. 8. انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می کند.

9. برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید

10. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 60 μL بافر EB از پیش گرم شده در دمای 60°C را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در 8000 rpm ($6000 \times g$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.

- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20-50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C - ذخیره نمایید.

استخراج DNA از بافت

فرآیند

1. مقدار 25 mg از بافت را آماده کرده و وزن آن را به طور دقیق تعیین نمایید. نمونه را روی یک اسلاید میکروسکوپی تمیز قرار دهید و با استفاده از یک تیغ استریل، بافت را قطعه قطعه نمایید تا کاملاً همگن شود. سپس آن را به میکروتیوب 2 mL تمیز انتقال دهید. (در صورت دسترسی به ازت مایع و هاون پیشنهاد می شود که بافت با استفاده از ازت و هاون پودر شده و قبل از ذوب، به تیوب منتقل گردد. این روش می تواند باعث بهبود روند استخراج شده و زمان لایز بافت را کاهش دهد.)
- اگر استخراج DNA را از نمونه بافت طحال انجام می دهید، بیش از 10 mg از نمونه استفاده نشود. 1 mg از بافت حدوداً میزان 0.2-1.2 μg از DNA بازده خواهد داشت.
2. نمونه بافت را بعد از همگن کردن، با 180 μL بافر TL ترکیب نمایید.
- اگر بیشتر از 25 mg از نمونه بافت استفاده می کنید، حجم بافر TL را به همان نسبت افزایش دهید. به طور مثال برای میزان 30-50 mg بافت از 360 μL بافر TL استفاده نمایید.
- توجه داشته باشید انجام مرحله همگن سازی به منظور هضم کامل نمونه بافت ضروری می باشد.
3. میزان 20 μL پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید و به مدت 1-3 ساعت در دمای 56°C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل

نمونه، در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

- استفاده از ترموبلاک شیکر در این مرحله توصیه می‌شود.
 - استفاده از پروتئیناز K در این مرحله ضروری می‌باشد.
 - زمان لایز با توجه به نوع بافت مورد استفاده ممکن است بیش از 3 ساعت (تازمانی که بافت لایز شود) به طول بیانجامد.
 - انکوباسیون به منظور لایز بافت می‌تواند به صورت Overnight نیز انجام پذیرد.
- توجه:** تخلیص همزمان RNA و DNA در بافت‌هایی مانند کبد و کلیه که حجم بالایی از رونویسی RNA در آنها رخ میدهد، امکان پذیر می‌باشد. RNA ممکن است به عنوان مهارکننده در واکنش‌های آنزیمی عمل نماید اما در فرآیند PCR اختلال ایجاد نمی‌کند. اگر DNA فاقد RNA مورد نیاز است میزان $4 \mu\text{L}$ RNase A (100 mg/mL) را اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex انجام دهید و 2 دقیقه در دمای 37°C انکوبه نمایید.
4. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ نمایید.
5. با احتیاط محلول رویی را درون یک میکروتیوب 2 mL جدید بریزید.
- مراقب باشید رسوب تشکیل شده همراه با محلول رویی به میکروتیوب انتقال داده نشود. چنانچه این مرحله به درستی انجام نگیرد، کیفیت DNA استخراج شده را تحت تأثیر قرار خواهد داد.
6. میزان $200 \mu\text{L}$ بافر HL را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex کنید. سپس میکروتیوب را 10 دقیقه در دمای 70°C انکوبه نمایید.
- توجه داشته باشید اگر در مرحله 2 حجم بیشتری از بافر TL را استفاده کرده‌اید، حجم بافر HL را نیز به همان نسبت افزایش دهید. به طور مثال اگر از $360 \mu\text{L}$ بافر TL استفاده می‌کنید، میزان بافر HL را به $400 \mu\text{L}$ برسانید.
 - نمونه و بافر HL را به طور کامل مخلوط نمایید تا یک محلول همگن حاصل شود.

- در بسیاری از موارد امکان تشکیل رسوب سفید رنگ در نتیجه افزودن بافر HL و به دنبال انکوباسیون در دمای 70°C وجود دارد. این رسوب در روند این فرآیند و کاربردهای مولکولی بعد از استخراج DNA اختلال ایجاد نمی‌کند.
- 7. میزان 300 μ L اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex کنید. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
- توجه داشته باشید اگر در مرحله 2 حجم بیشتری از بافر TL را استفاده کرده اید، حجم اتانول را نیز به همان نسبت افزایش دهید. به طور مثال اگر از 360 μ L بافر TL استفاده می‌کنید، حجم اتانول را به 400 μ L برسانید.
- نمونه، بافر HL و اتانول را به طور کامل مخلوط نمایید تا یک محلول همگن حاصل شود.
- در این مرحله امکان تشکیل کلاف سفید رنگ در نتیجه افزودن اتانول وجود دارد که باید به طور کامل به ستون انتقال داده شود.
- به یاد داشته باشید استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول ممکن است باعث کاهش بازده در فرآیند استخراج شود.
- 8. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را، بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید، و در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- توجه داشته باشید کلاف سفید رنگ تشکیل شده در مرحله 7 باید به طور کامل همراه با محلول به ستون انتقال داده شود.
- اعمال حداکثر سرعت سانتریفیوژ تأثیری در میزان و کیفیت DNA استخراج شده نخواهد داشت.
- اگر محلول از غشای ستون عبور نکرد، حداکثر سرعت سانتریفیوژ را تا زمانی که تمام محلول از غشای ستون عبور کند اعمال کنید.

- چنانچه از نمونه، بافر HL و اتانول به میزان بیشتری استفاده کرده‌اید، ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید، سپس مرحله 8 را تکرار کنید تا تمام نمونه از ستون عبور کند.
- 9. میزان $500\ \mu\text{L}$ بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و آن را در $6000 \times g$ ($8000\ \text{rpm}$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- 10. میزان $600\ \mu\text{L}$ بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در $6000 \times g$ ($8000\ \text{rpm}$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- 11. بار دیگر مرحله 10 را تکرار نمایید.
- 12. ستون را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می‌توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.
- توصیه می‌شود قبل از این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) انتقال دهید.
- هرگونه انتقال بافر WB2 در این مرحله، می‌تواند بعنوان بازدارنده در فرایندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- 13. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب $1.5\ \text{mL}$ جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. میزان $70\ \mu\text{L}$ بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده است، به مرکز غشای ستون اضافه کنید. ستون

را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 g X به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- استفاده کمتر از 70 μ L بافر EB باعث افزایش قابل توجه غلظت DNA در مایع عبوری می‌شود، اما میزان DNA استخراج شده را کمی کاهش می‌دهد.
- شستشوی غشاء با حجم کمتر از 50 μ L بافر EB توصیه نمی‌شود، زیرا باعث کاهش قابل توجه میزان DNA استخراج شده می‌شود.
- میزان DNA استخراج شده به حجم و نوع بافت مورد استفاده بستگی دارد. به طور کلی میزان نهایی DNA استخراج شده از 25 mg بافت، 10–30 μ g با کیفیت A260/280 ratio=1.8–1.9 خواهد بود.
- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد.
- DNA استخراج شده را در دمای 20°C- ذخیره نمایید.

استخراج DNA از بافت‌های فیکس شده در پارافین و فرمالین (FFPE Tissue)

- DNA استخراج شده با توجه به نوع، سن بافت و کیفیت مواد مورد استفاده در تثبیت بافت، دارای اندازه‌های متفاوت است.

- استفاده از تثبیت کننده‌هایی نظیر اسمیم تتراکسید (Osmium tetroxide) که باعث Cross-linking می‌شود، توصیه نمی‌شود؛ زیرا این مواد، استخراج DNA از بافت‌های تثبیت شده را دشوار می‌سازد.
- زمان لازم به سائز و سن بافت مورد استفاده بستگی دارد؛ بنابراین کاهش میزان DNA استخراج شده از بافت FFPE نسبت به بافت تازه، طبیعی می‌باشد.
- تخلیص همزمان RNA و DNA در بافت‌هایی مانند کبد و کلیه که حجم بالایی از رونویسی RNA در آنها رخ می‌دهد، امکان پذیر می‌باشد. RNA ممکن است به عنوان مهارکننده در واکنش‌های آنزیمی عمل نماید اما در فرآیند PCR اختلال ایجاد نمی‌کند. اگر DNA فاقد RNA مورد نیاز است، از محلول RNase A استفاده نمایید.

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش

- برای بافت‌های تثبیت شده در پارافین:
 1. زایلین (Xylene)
 2. Deparaffinization Solution (Cat: BR209)
 - برای بافت‌های تثبیت شده در فرمالین: PBS (1X)
- نکته:** این کیت با استفاده از محلول Deparaffinization بهینه سازی شده است و پیشنهاد می‌گردد در هنگام استفاده از این کیت، جهت مرحله دپارافینه کردن از محلول Deparaffinization به ژن (Cat:BR209) استفاده گردد. بدیهی است که استفاده از زایلین نیز به عنوان یک روش مرجع، با این کیت سازگار است اگرچه به علت سمیت بالا، کمتر پیشنهاد می‌گردد.

فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در پارافین با استفاده از

Deparaffinization Solution

1. میزان 10-30 mg از بافت تثبیت شده در پارافین را در یک میکروتیوب 1.5 mL قرار دهید. (جهت دوفازی شدن محلول و جداسازی لایه زیرین استفاده از میکروتیوب 1.5 mL توصیه می‌شود).

- توصیه می‌شود بافت مورد نظر توسط دستگاه میکروتوم برش داده شود.
(معادل 3-10 برش به ضخامت 5-10 μm ، با توجه به نوع و حجم بافت)
- 2. میزان 400 μL بافر Deparaffinization solution را اضافه کرده و ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند، و به مدت 5 دقیقه در دمای 80°C انکوبه کنید.
(در این زمان دو بار ورتکس نمایید).
- 3. میزان 180 μL بافر TL را اضافه کرده و ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند. سپس به مدت 15 ثانیه در 10000 x گ ر سانتریفیوژ کنید. (در این مرحله دو لایه تشکیل می‌شود).
- 4. میزان 20 μL پروتئیناز K با احتیاط و بدون برهم خوردن لایه‌ها، به لایه زیرین اضافه کنید. این کار بصورت pipetting جهت هموژنایز شدن کامل پروتئیناز در لایه زیرین صورت می‌گیرد.
- 5. میکروتیوب را به مدت 1-3 ساعت در دمای 56°C انکوبه کنید. در این مرحله تیوب را به آرامی تکان دهید و از ورتکس دادن اجتناب کنید تا ترتیب لایه‌ها حفظ شود. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).
- 6. سپس به مدت 1 ساعت در دمای 90°C انکوبه کنید. در این مرحله تیوب را به آرامی تکان دهید و از ورتکس دادن اجتناب کنید تا ترتیب لایه‌ها حفظ شود. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).
- **نکته:** چنانچه از بافت‌هایی که بیشتر از 3 سال از زمان پارافینه کردن و نگهداری آن‌ها می‌گذرد استفاده می‌کنید، این مرحله انکوباسیون را به مدت 4 ساعت در دمای 85°C انجام دهید.

7. میکروتیوب را به مدت 1 دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ کنید. با احتیاط و بدون کشیدن رسوبی از بافت های که لایز نشده اند (در صورت تشکیل)، مایع شفاف زیرین را جدا کنید و به میکروتیوب جدید منتقل کنید.
8. میزان $200 \mu\text{L}$ بافر HL را به نمونه اضافه کنید و به مدت 10 ثانیه Pulse-vortex ورتکس نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
9. سپس میزان $350 \mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 10 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
- در این مرحله امکان تشکیل کلاف سفید رنگ در نتیجه افزودن اتانول وجود دارد که باید به طور کامل به ستون انتقال داده شود.
 - به یاد داشته باشید استفاده از سایر الکل ها به جای اتانول ممکن است باعث کاهش بازده در فرآیند استخراج شود.
10. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را، بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید، و در 8000 rpm ($8000 \times g$) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- توجه داشته باشید کلاف سفید رنگ تشکیل شده در مرحله 9 (در صورت تشکیل) باید به طور کامل همراه با محلول به ستون انتقال داده شود.
 - اعمال حداکثر سرعت سانتریفیوژ تأثیری در میزان و کیفیت DNA استخراج شده نخواهد داشت.
 - اگر محلول از غشای ستون عبور نکرد، حداکثر سرعت سانتریفیوژ را تا زمانی که تمام محلول از غشای ستون عبور کند اعمال کنید.
11. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از بافت، از مرحله 9 عمل نمایید.

فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در پارافین با استفاده از زایلین

1. میزان 10–30 mg از بافت تثبیت شده در پارافین را در یک میکروتیوب 2 mL قرار دهید.
توصیه می‌شود میزان بافت مورد نظر توسط دستگاه میکروتوم برش داده شود.
(معادل 3–10 برش به ضخامت 5–10 μm ، با توجه به نوع و حجم بافت).
2. میزان 1 mL زایلین را اضافه کرده و ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند.
میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند، و به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید.
3. میکروتیوب را با حداکثر سرعت در دمای اتاق (18–25°C) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
4. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به رسوب، مایع رویی را به وسیله پیپت جدا کرده و دور بریزید.
5. توصیه می‌شود جهت نتیجه بهتر، مراحل 2–4 را به منظور حذف کامل پارافین تکرار کنید.
 - کیفیت پارافین به کار رفته در تثبیت بافت و زایلین مورد استفاده در مراحل قبل، در حذف کامل پارافین حائز اهمیت می‌باشد.
6. میزان 1 mL اتانول 100% را به رسوب اضافه کرده و به آرامی ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند.
7. میکروتیوب را با حداکثر سرعت در دمای اتاق (15–25°C) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
8. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به رسوب، مایع رویی را به وسیله پیپت جدا کرده و دور بریزید.
9. توصیه می‌شود جهت نتیجه بهتر، مراحل 6–8 را تکرار کنید.

10. درب میکروتیوب را باز گذاشته و آن را به مدت 20-15 دقیقه در دمای 37°C انکوبه نمایید تا اتانول باقیمانده کاملاً تبخیر شده و رسوب خشک شود.

توجه: انتقال اتانول از این مرحله، کاهش راندمان استخراج DNA را به همراه دارد، لذا از تبخیر کامل اتانول اطمینان حاصل نمایید.

11. میزان $180\ \mu\text{L}$ بافر TL را به رسوب اضافه کنید. سپس میزان $20\ \mu\text{L}$ پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

12. میکروتیوب را به مدت 3-1 ساعت در دمای 56°C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل نمونه، در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).

- استفاده از ترموبلاک شیکر در این مرحله توصیه می‌شود.
- استفاده از پروتئیناز K در این مرحله ضروری می‌باشد.
- زمان لایز با توجه به نوع بافت مورد استفاده ممکن است بیش از 3 ساعت (تازمانی که بافت لایز شود) به طول بیانجامد.
- انکوباسیون به منظور لایز بافت می‌تواند به صورت Overnight نیز انجام پذیرد.
- توجه: تخلیص همزمان RNA و DNA در بافت‌هایی مانند کبد و کلیه که حجم بالایی از رونویسی RNA در آنها رخ می‌دهد، امکان پذیر می‌باشد. RNA ممکن است به عنوان مهارکننده در واکنش‌های آنزیمی عمل نماید اما در فرآیند PCR اختلال ایجاد نمی‌کند. اگر DNA فاقد RNA، مورد نیاز است میزان $4\ \mu\text{L}$ از RNase A ($100\ \text{mg/mL}$) را اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex انجام دهید و 2 دقیقه در دمای 37°C انکوبه نمایید.

13. سپس به مدت 1 ساعت در دمای 90°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید. (

عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).

- نکته: چنانچه از بافت هایی که بیشتر از 3 سال از زمان پارافینه کردن و نگهداری آن ها میگذرد استفاده می کنید، این مرحله انکوباسیون را به مدت 4 ساعت در دمای °C 85 انجام دهید.

14. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ نمایید.

15. با احتیاط محلول رویی را درون یک میکروتیوب 2 ml جدید بریزید.

مراقب باشید رسوب تشکیل شده همراه با محلول رویی به میکروتیوب انتقال داده نشود. چنانچه این مرحله به درستی انجام نگیرد، کیفیت DNA استخراج شده را تحت تأثیر قرار خواهد داد.

16. میزان 200 µL بافر HL را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex کنید. سپس میکروتیوب را 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

- توجه داشته باشید اگر در مرحله 11 حجم بیشتری از بافر TL را استفاده کرده‌اید، حجم بافر HL را نیز به همان نسبت افزایش دهید. به طور مثال اگر از 360 µL بافر TL استفاده می‌کنید، میزان بافر HL را به 400 µL برسانید.

- نمونه و بافر HL را به طور کامل مخلوط نمایید تا یک محلول همگن حاصل شود.

- در بسیاری از موارد امکان تشکیل رسوب سفید رنگ در نتیجه افزودن بافر HL وجود دارد. این رسوب در روند این فرآیند و کاربردهای مولکولی بعد از استخراج DNA اختلال ایجاد نمی‌کند.

17. میزان 350 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex کنید. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

- توجه داشته باشید اگر در مرحله 11 حجم بیشتری از بافر TL را استفاده کرده اید، حجم اتانول را نیز به همان نسبت افزایش دهید. به طور مثال اگر از $360\ \mu\text{L}$ بافر TL استفاده می کنید، حجم اتانول را به $500\ \mu\text{L}$ برسانید.
 - نمونه، بافر HL و اتانول را به طور کامل مخلوط نمایید تا یک محلول همگن حاصل شود.
 - در این مرحله امکان تشکیل کلاف سفید رنگ در نتیجه افزودن اتانول وجود دارد که باید به طور کامل به ستون انتقال داده شود.
 - به یاد داشته باشید استفاده از سایر الکل ها به جای اتانول ممکن است باعث کاهش بازده در فرآیند استخراج شود.
18. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را، بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید، و در $(8000\ \text{rpm})$ $6000 \times g$ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
- توجه داشته باشید کلاف سفید رنگ تشکیل شده در مرحله 17 باید به طور کامل همراه با محلول به ستون انتقال داده شود.
 - اعمال حداکثر سرعت سانتریفیوژ تأثیری در میزان و کیفیت DNA استخراج شده نخواهد داشت.
 - اگر محلول از غشای ستون عبور نکرد، حداکثر سرعت سانتریفیوژ را تا زمانی که تمام محلول از غشای ستون عبور کند اعمال کنید.
 - چنانچه از نمونه، بافر HL و اتانول به میزان بیشتری استفاده کرده اید، ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید، سپس مرحله 18 را تکرار کنید تا تمام نمونه از ستون عبور کند.
19. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از بافت، از مرحله 9 عمل نمایید.

فرآیند استخراج DNA از بافت فیکس شده در فرمالین

1. میزان $10\text{--}30\text{mg}$ از بافت تثبیت شده در فرمالین را در یک میکروتیوب $2\ \text{mL}$ قرار دهید.
2. میزان $1\ \text{mL}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 10 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس اتانول را خارج کرده و میزان $1\ \text{mL}$ اتانول 70% اضافه

کنید و بعد از 10 دقیقه انکوباسیون در دمای محیط همین روند را با اتانول 50% نیز انجام دهید. این مرحله جهت هیدراته کردن بافت انجام می گیرد.

3. میکروتیوب را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به بافت، مایع رویی (supernatant) را به وسیله پیپت جدا کرده و دور بریزید.
4. میزان 1 mL آب مقطر را به رسوب اضافه کرده و ورتکس کنید. میکروتیوب را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به بافت، مایع رویی (supernatant) را بطور کامل جدا کرده و دور بریزید.
5. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از بافت‌های فیکس شده درپارافین با استفاده از زایلن، از مرحله 11 عمل نمایید.

استخراج DNA باکتری

از این روش برای استخراج ژنوم باکتری‌هایی نظیر اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، بوردتلا پرتوزیس (*Bordetella pertussis*) از نمونه سواب حلق و بینی، بورلیا بورگدورفری (*Borrelia burgdorferi*) از مایع مغزی نخایی، لژیونلا نموفیلا (*Legionella pneumophila*) در تست تشخیصی Bronchoalveolar Lavage می‌توان استفاده کرد. برای استخراج ژنوم سایر باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم مثبت و اسیدفاست (Acid Fast) که دارای دیواره سلولی ضخیم‌تر برای لایز می‌باشند، می‌توانید از کیت تخصصی Behprep Bacterial DNA Extraction (BP121) استفاده کنید.

نکته: برخی از باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوک-ها) نیاز به انکوباسیون با آنزیم‌های خاص نظیر لیزواستافین برای تجزیه دیواره سلولی سخت و چند لایه خود دارند. در نظر گرفتن آنزیم لیزواستافین قوی و تایم کافی انکوباسیون، باعث شده است تا استخراج DNA در این نمونه‌ها با بازدهی

بالا انجام گیرد. (در صورت نیاز، این آنزیم را می توانید به صورت جداگانه خریداری کنید).

مواد اختصاصی مورد نیاز در این روش

- برای نمونه‌های سوآب: PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ
- برای باکتری‌های گرم مثبت و اسیدفاست (Acid Fast) آنزیم لیزوزیم 50 mg/mL (Cat:BR155) (تهیه از ویستا به ژن)
- Lyso Buffer (Cat: BR153) (تهیه از ویستا به ژن)
- و آنزیم لیزواستافین

آماده‌سازی نمونه

مایعات زیستی شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر

1. نمونه را در (7500 rpm) $5000 \times g$ به مدت 5 دقیقه رسوب دهید.
2. سپس مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

نمونه سوآب چشمی، بینی، حلق و سایر

1. نمونه جمع‌آوری شده را در 2 mL بافر فسفات سالین حاوی ترکیبات ضد قارچ قرار دهید و سپس نمونه را به مدت 2 تا 3 ساعت در دمای اتاق ($18-25^{\circ}\text{C}$) انکوبه نمایید.
2. نمونه را به وسیله سانتریفیوژ با حداکثر سرعت، رسوب دهید. سپس مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

محیط کشت

1. میزان 2×10^9 باکتری را به وسیله لوپ از محیط کشت جدا کرده و در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

محیط کشت مایع

1. میزان 1 mL از محیط کشت باکتریایی (مقدار 2×10^9 باکتری) را به درون میکروتیوب 2 mL انتقال دهید و در 13000 rpm به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ نمایید.
2. سپس مایع رویی را خارج کنید.
3. در ادامه با توجه به نوع گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری، از فرایند مربوطه آن، عمل نمایید.

فرایند (باکتری گرم منفی)

1. به رسوب باکتریایی میزان 200 μ L بافر TL به همراه 20 μ L پروتئیناز K اضافه کنید. به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
2. میکروتیوب را به مدت 20 دقیقه در 56°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 3 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.
3. سپس میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در 70°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 2 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

4. میزان 200 μL بافر HL را به همراه 300 μL اتانول 100% به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

5. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 4 عمل نمایید.

فرایند (باکتری گرم مثبت)

1. به رسوب باکتریایی میزان 500 μL بافر Lyso Buffer و 20 μL آنزیم لیزوزیم 50 mg/ml اضافه کنید. و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند.

2. محلول را حداقل به مدت 1 ساعت در دمای 37°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را چندین مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

3. محلول را به مدت 3 دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفیوژ کنید و سپس مایع رویی را خارج کنید.

4. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از باکتری گرم منفی، از مرحله 1 عمل نمایید.

ضمیمه‌ها

آماده‌سازی نمونه خلط (Sputum)

1. مقدار 1 mL نمونه خلط و برابر با حجم آن، محلول (1M) NaOH را اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید.

2. نمونه را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا قابل پپیت کردن شود و سپس در (7500rpm) $5000\times g$ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

3. بدون آسیب به رسوب تشکیل شده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در $450\ \mu\text{L}$ محلول PBS (1X) حل کنید، سپس به مدت 1 دقیقه ورتکس نمایید. از محلول بدست آمده جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)

1. حداقل میزان 10 mL از نمونه BAL را درون فالكون 50 mL یا 15 mL انتقال داده و در $300 \times g$ به مدت 5-10 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
 2. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست آمده را در 1 mL بافر PBS (1X) حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید. تیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا رسوب کاملاً حل شود، سپس در $10,000 \times g$ به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
 3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در $500\ \mu\text{L}$ بافر PBS (1X) حل نمایید و به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید. از رسوب به دست آمده می‌توانید جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.
- توجه:** نمونه‌های BAL کمتر از 10 mL، تا 70% بازده استخراج DNA ژنومیک را پایین می‌آورد.

آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی

- اگر حجم نمونه بیشتر از $500\ \mu\text{L}$ باشد، نمونه را در چند تیوب 2 mL با حجم‌های برابر تقسیم کنید و در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها عمل نمایید.
- نسبت حجم بافر HL، اتانول و نمونه در این فرآیند 1:1:1 می‌باشد. (حجم بافر HL و اتانول برابر با حجم نمونه ی اولیه می‌باشد.)
 - محتویات تیوب‌ها را در چند مرحله از یک ستون عبور دهید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین DNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• بافر الوشن حتما باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای °C 60 انجام دهید. • برای نمونه های خون کم لکوسیت از بافی کوت استفاده کنید.
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون با بافر HL و TL را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید. • نمونه بافت را به خوبی همگن نمایید. • نمونه بافت را به برش های کوچکتری تبدیل کنید. • اگر بافت به خوبی لایز نشده است زمان انکوباسیون با بافر TL را افزایش دهید و یا بصورت Overnight انکوبه نمایید
	نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	• از نمونه ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. • از نمونه خون یا مایعات بدن که مدت زیادی در دمای اتاق، درون

بخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. • برای جلوگیری از فعالیت DNase، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. • نمونه‌گیری را تکرار کنید.		
• زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید. • حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید. • مقدار زیادی از نمونه خون را استفاده کرده‌اید. • در استخراج DNA از بافت، قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.	محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است.	
• مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه تازه تکرار کنید. • آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C - نگهداری شود. • آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید. • پس از اضافه کردن پروتئیناز K به نمونه فوراً عمل ورتکس را انجام دهید.	عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	
• استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.	استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول	
• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد.	مسدود شدن غشاء ستون	

• قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید. • در استخراج DNA از بافی کوت، غلظت لوکوسیت-ها در نمونه نباید بیشتر از 5×10^6 می باشد. نمونه را با $200 \mu\text{L}$ بافر (1X) PBS رقیق نموده و فرآیند استخراج را تکرار کنید. • در استخراج DNA از پلاسما، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب کرایو از چرخه انجماد-ذوب خودداری کنید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید. •		
• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر TL، HL و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می شود. • از عدم تماس غشاء ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید.	آلودگی پروتئینی	پایین بودن نسبت A260/A280

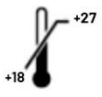
• بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید. • از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم. به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده سازی باید در 20°C - نگهداری شود.		
• در حین فرآیند ستون ها را به آرامی جا به جا کنید. • درب ستون ها را به آرامی باز و بسته نمایید. • از انتقال حباب های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. • از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.	آلودگی نمکی	پایین بودن نسبت A260/A230
• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با اتانول، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید.	ورتكس پیایی	قطعه قطعه شدن DNA

کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت های (LOT NO.) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به زن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرار گرفته است.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نسخه جدید	1401/02
01	1. اعمال تغییرات در حجم ریجنت ها در برخی از فرآیندها. 2. اعمال تغییرات در سرعت سانتریفیوژ در برخی فرآیندها. 3. بروزرسانی فرآیند استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based. 4. اضافه شدن نحوه آماده سازی نمونه از خلط در قسمت ضمیمه ها.	1401/04
02	1. اعمال تغییرات در حجم نمونه خون استفاده شده در فرآیندها 2. تغییر در فرایند الوشن استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون-ها 3. تغییر در استخراج DNA از 400µL خون محیطی تازه 4. تغییر در استخراج DNA از بافی-کوت در مرحله الوشن و آماده سازی نمونه 5. اضافه شدن آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی در قسمت ضمیمه ها	1402/04
03	تغییر در کت نامبر ستون و کالکشن	1402/05
04	تغییر در حجم محتویات کیت (HL Buffer)	1402/06
05	بهبود فرایند استخراج از بافت	1403/02
06	1. افزایش حجم PK Buffer 2. بهبود عملکرد آنزیم پروتئیناز K 3. بهبود فرایند استخراج DNA باکتری از مایعات بیولوژیک	1403/05
07	1. به روزرسانی فرایند استخراج DNA از سلول های دهانی 2. اعمال تغییر جزئی در آماده سازی نمونه و کوتاه شدن فرآیند استخراج DNA 3. ویروسی از Liquid-Based 4. به روزرسانی فرآیند استخراج DNA باکتری تغییر در آماده سازی نمونه خلط و BAL	1403/07
08	1. افزایش حجم WB1	1404/07

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دمایی		کاربرد تشخیصی	
تعداد تست		اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستور العمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا		شماره سری ساخت	

شرکت دانش بنیان ویستا زیست فناوری به ژن

آدرس: شیراز، منطقه ویژه اقتصادی، فاز دوم، جنب میدان صادرات

شماره تماس: 09053633840 شماره پشتیبانی فنی: 09170093664

کدپستی: 7159115468 وبسایت: www.BehGene.com

