

DNA EXTRACTION KIT

Blood

محتویات کیت	حجم	دمای نگهداری
Lysis buffer 1	8ml	Room temperature
Lysis buffer3	8ml	Room temperature
Precipitation	10ml	Room temperature
Wash buffer	35ml	Room temperature
Elution buffer	4ml	Room temperature
hemolysis	100ml	Room temperature
Proteinas k	0.5ml	-20°C

- آنزیم پروتیناز k در دمای ۲۰- نگهداری نمایید.
- قبل از استفاده محلولها را بهم بزنید و دمای نگهداری آن ها در دمای اتاق میباشد.
- این کیت با روش های گوناگونی توانایی استخراج DNA را دارد. خود کاربر طبق شرایط موجود میتواند روش مورد نظر خود را انتخاب و از کیت استفاده نماید.
- لایزیز بافر ۳ یک محلول قوی است برای لیز بافت ای سخت و زمان بر کاربرد و اگر زمان زیادی بافت و سلول را با آن انکوبه کنیم امکان آسیب به DNA وجود دارد.

جداسازی DNA از خون تام

Protocol

- ۱۰۰ میکرولیتر خون را به ۱۵۰ میکرولیتر lysis buffer1 اضافه نموده و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید و سپس ۱۵۰ میکرولیتر lysis buffer3 به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- 10 میکرولیتر پروتئیناز k به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- ۲۵ دقیقه در دمای ۵۷ درجه انکوبه کنید و هر ۵ دقیقه ورتکس نمایید .
- ۶ میکرولیتر 2-ME اضافه نموده و ورتکس نمایید و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه نموده و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید سپس ۵ دقیقه با دور 12000rpm سانتریفیوژ نمایید.
- فاز رویی را برداشته و به میکروتیوپ جدید منتقل نمایید و به آن 200 میکرولیتر محلول precipitation به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 12000rpm و فاز رویی را دور ریخته و به رسوب درون میکروتیوپ ۷۰۰ میکرولیتر wash buffer اضافه کرده و سروته نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 7500rpm نمایید و به آرامی میکروتیوپ را تخلیه نمایید و میکروتیوپ را در دمای اتاق یا ۶۰ درجه قرار دهید تا خشک شود سپس به رسوب آن ۲۰ میکرولیتر elution buffer اضافه کرده و جذب آن را با نانودرآپ قرائت نمایید.

نکته: ورتکس در هنگام انکوباسیون نقش مهمی در لیز سلولی دارد.

نکته: در این روش از خون هایی که حداکثر ۱۴ روز در لوله حاوی EDTA در یخچال نگهداری شده است یا خون فریز شده میتوان استفاده نمود. خون هرچه تازه تر باشد میزان غلظت DNA بیشتر است.

نکته: برای حل شدن DNA در الوشن بافر بهتر است بعد از اضافه کردن الوشن بافر حدود ۲ الی ۳ دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار دهید.

جداسازی DNA از ۵۰۰ میکرولیتر خون

Protocol (1) (آنزیماتیک)

- ۵۰۰ میکرولیتر خون را درون میکروتیوپ ۲ میلی لیتر ریخته و سپس ۱ میلی لیتر همولیزانت به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید سپس ۴ دقیقه سانتریفیوژ با دور 3000rpm در ۴ درجه و فاز رویی را دور بریزید .
- سپس ۱ میلی لیتر همولیزانت دیگر اضافه نموده و ورتکس کرده و سپس ۴ دقیقه سانتریفیوژ با دور 3000rpm در ۴ درجه و فاز رویی را دور بریزید.
- 150 میکرولیتر lysis buffer1 به رسوب سلولی اضافه نموده و ۱۵ ثانیه ورتکس شدید نمایید تا رسوب حل شود و سپس ۱۵۰ میکرولیتر lysis bufferIII به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- 10 میکرولیتر پروتئیناز k به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- ۲۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه انکوبه کنید و در صورت لزوم هر ۵ دقیقه یکبار ورتکس انجام شود.
- 200 میکرولیتر محلول precipitation به آن اضافه نموده و ۵ ثانیه ورتکس نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 12000rpm و فاز رویی را دور ریخته و به رسوب درون میکروتیوپ ۷۰۰ میکرولیتر wash buffer اضافه کرده و سروته نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 7500rpm نمایید و به آرامی میکروتیوپ را تخلیه نمایید و میکروتیوپ را در دمای اتاق قرار دهید تا خشک شود سپس به رسوب آن ۵۰-۸۰ میکرولیتر elution buffer اضافه کرده و جذب آن را با نانودراپ قرائت نمایید.

نکته: در صورت وجود آلودگی نمونه DNA به پروتئین میتوان بعد از مرحله لیز با آنزیم پروتئیناز 200 k میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه کرده و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید و سپس ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و در نهایت فاز رویی رو برداشته و به ۲۰۰ میکرولیتر محلول precipitation درون میکروتیوپ ۱,۵ ml اضافه کرده و ورتکس نمایید و مابقی مراحل رو طبق پروتکل ادامه دهید.

نکته: بعد از انجام لیز با آنزیم پروتئیناز k و انکوباسیون ۱۵ دقیقه در دمای ۵۷ درجه ، در صورت تمایل برای لیز بهتر ۵ میکرولیتر 2me اضافه نموده و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید.

نکته: برای حل شدن DNA در الوشن بافر بهتر است بعد از اضافه کردن الوشن بافر حدود ۲ الی ۳ دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار دهید.

جداسازی DNA از حجم بالای خون

Protocol (1) (آنزیماتیک)

- ۳-۲ میلی لیتر خون را درون فالتون ریخته و سپس دو برابر حجم خون به آن اضافه آب استریل اضافه نموده و ورتکس نمایید سپس ۴ دقیقه سانتریفیوژ با دور 2500rpm در ۴ درجه یا دمای اتاق (در ۴ درجه بهتر است) و فاز رویی را دور بریزید.
- سپس به همان حجم دوباره آب استریل اضافه نموده و ورتکس کرده و سپس ۴ دقیقه سانتریفیوژ با دور 2500rpm در ۴ درجه و فاز رویی را دور بریزید.
- ۱۵۰ میکرولیتر lysis buffer 1 به رسوب سلولی اضافه نموده و پیپتینگ نموده و به یک میکروتیوپ ۱/۵ منتقل کرده سپس ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید و سپس ۱۵۰ میکرولیتر lysis buffer III به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- 10 میکرولیتر پروتئیناز k به آن اضافه نموده و ورتکس نمایید.
- ۲۵ دقیقه در دمای ۵۷ درجه انکوبه کنید و در صورت لزوم هر ۵ دقیقه یکبار ورتکس ملایم انجام شود.
- ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه کنید و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید و 5 دقیقه سانتریفیوژ با دور 12000rpm سپس فاز رویی را برداشته و به یک میکروتیوپ جدید منتقل نمایید.
- 200 میکرولیتر محلول precipitation به آن اضافه نموده و ۵ ثانیه ورتکس نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 12000rpm و فاز رویی را دور ریخته و به رسوب درون میکروتیوپ ۷۰۰ میکرولیتر wash buffer اضافه کرده و سروته نمایید.
- ۳ دقیقه سانتریفیوژ با دور 7500rpm نمایید و به آرامی میکروتیوپ را تخلیه نمایید و میکروتیوپ را در دمای اتاق یا ۶۰ درجه قرار دهید تا خشک شود سپس به رسوب آن ۵۰-۸۰ میکرولیتر elution buffer اضافه کرده و جذب آن را با نانودرآپ قرائت نمایید.

نکته : در این روش میتوان از خونی که حداکثر ۳۰ روز درون لوله حاوی EDTA در یخچال نگهداری شده و یا خون فریز شده استفاده نمود.

نکته: برای حل شدن DNA در الوشن بافر بهتر است بعد از اضافه کردن الوشن بافر حدود ۲ الی ۳ دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار دهید.