# 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**


محتویات کیت ..... 5

شرایط پایداری و نگهداری ..... 5

معرفی ..... 6

حیطه کاربری ..... 6

نکات مهم ..... 6

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند: ..... 7

نکات ایمنی ..... 7

آماده سازی بافرها ..... 8

Proteinase K ..... 8

NA Carrier ..... 8

استخراج DNA از خون و مایعات بدن ..... 9

فرآیند ..... 9

استخراج DNA از µL 400 خون محیطی تازه ..... 11

فرآیند ..... 12

استخراج DNA از خون فریز شده ..... 12

استخراج DNA از خون خشک شده (DBS) ..... 13

فرآیند ..... 13

استخراج DNA از بافی کوت ..... 14

آماده سازی نمونه ..... 15

فرآیند ..... 15

استخراج DNA از سلول های دهانی ..... 16

آماده سازی نمونه ..... 16

فرآیند ..... 16

استخراج DNA از بزاق ..... 17
آماده سازی نمونه ..... 17
فرآیند ..... 18
استخراج DNA از سلول های کشت داده شده ..... 18
آماده سازی نمونه ..... 19
روش تریپسینه کردن ..... 19
استفاده از Cell scraper ..... 19
فرآیند ..... 20
استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون ها ..... 20
فرآیند ..... 20
استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از مدفوع ..... 22
آماده سازی نمونه ..... 23
فرآیند ..... 23
استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از نمونه سوآب چشمی، بینی و حلق ..... 24
آماده سازی نمونه ..... 24
استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based ..... 24
آماده سازی نمونه ..... 24
فرآیند ..... 25
استخراج DNA از بافت ..... 27
فرآیند ..... 27
استخراج DNA باکتری ..... 32
آماده سازی نمونه ..... 33
مایعات زیستی شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر ..... 33
فرایند (باکتری گرم منفی) ..... 34
فرایند (باکتری گرم مثبت) ..... 35

ضمیمه ها ..... 35
آماده سازی نمونه خلط (Sputum) ..... 35
آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage) ..... 36
آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی ..... 36
چالش‌ها و راه کارها ..... 37
کنترل کیفیت ..... 41
تاریخچه ویرایش پروتکل ..... 41

# محتویات کیت

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

# شرایط پایداری و نگهداری

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

همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد.

درصورت رویت رسوب حاصل از نگهداری در دمای پایین، محلول‌ها را در دمای اتاق (18–25 °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 °C (یخچال) یا 15– 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: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18–25 °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 آئروسل، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.
- عدد rpm برای سانتریفیوژهای مختلف ممکن است متفاوت باشد. جهت تبدیل دقیق عدد g به rpm، می توانید 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 توصیه‌شده 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.**

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

## NA Carrier[1]

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

1. میزان 320 µL بافر EB را به تیوب حاوی 320 µg NA Carrier لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول 1 µg/µL بدست آید. NA Carrier را کاملا 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 µL از NA Carrier فراهم کنید. (هر الیکوت برای 10 واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد.)
2. به ازای هر نمونه میزان 3 µL از NA Carrier را به 200 µL بافر HL اضافه کنید. (برای مثال اگر تعداد 10 نمونه برای استخراج DNA دارید، 30 µL از NA Carrier را به 2 mL بافر HL اضافه کنید.)
- در هنگام لایز به ازای هرنمونه فقط 500 µL بافر لایز حاوی NA Carrierنیاز دارید و مقادیر بیشتر برای جلوگیری از خطای پیپتاژ در نظر گرفته شده است.

**توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می باشند**

[1] NA Carrier = Nucleic Acid Carrier

# استخراج DNA از خون و مایعات بدن

- **نمونه خون تازه و منجمد در این روش قابل استفاده می‌باشد.**
- **قبل از شروع فرآیند، نمونه‌ی منجمد را به دمای اتاق برسانید.**
- **جهت دستیابی به نتیجه مطلوب، توصیه می‌شود از تیوب‌های حاوی ترکیبات ضدانعقاد جهت جمع آوری خون استفاده نمایید.**

## فرآیند

1. میزان 15 µL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 200 µL از نمونه را به تیوب اضافه کنید.
   - اگر حجم نمونه کمتر از 200 µL است، مقدار مناسب از محلول PBS (1x) را اضافه کنید تا حجم کل به 200 µL برسد.
   - درصورت در دسترس بودن نمونه، استفاده از حجم کمتر از 200 µL توصیه نمی شود.
2. میزان 200 µL بافر HL را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا 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. درطول 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 کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطعات مایع از درب تیوب جداشوند.
4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

5. میزان µL 500 بافرWB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x 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 µL 600بافرWB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x 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 WB2به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- 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.

9. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 mL تمیز قرار دهید. µL 70 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 x g (8000 rpm)به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

- استفاده کمتر از µL 70 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 µL 50 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 µg با کیفیت A260/280 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 DNAرا به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافرEB 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 µL 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 µg/ml <) بهینه سازی شده است.
- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت (3000–4500 Cell/µL) نیز مناسب می‌باشد.

### فرآیند

1. میزان 400 µL خون را در داخل تیوب 1.5mL بریزید و با دور 6000 x g (8000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
2. پس از سانتریفیوژ، میزان 200 µL از پلاسمای رویی را بدون برخورد نوک سر سمپلر به سطح خون جداکرده و دور بریزید.
3. میزان 15 µL پروتئیناز K و 200 µL بافر HL را به نمونه اضافه کرده و سپس ورتکس نمایید.

- توصیه می‌شود بعد از هر Pulse-Vortexing تیوب ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب ها 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 µl 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 µL خون 5 دقیقه می‌باشد.
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) 6000 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 می‌تواند کاهش بازده استخراج را به همراه داشته باشد.

7. میکروتیوب را کمی ورتکس نمایید تا رسوب مجدداً حل شود و سپس میزان 200 µL بافر PBS (1X) 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 می‌شود.

### فرآیند

1. حداقل 3 الی 5 برش باقطر 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 کاملا 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 مجددا به وسیله ورتکس کاملا 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 x g (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 µg/ml<) بهینه‌سازی شده است.
- این روش برای استخراج نمونه‌های خون کم لوکوسیت (1000–3000 Cell/µL) نیز مناسب می‌باشد.

## آماده‌سازی نمونه

برای جداسازی بافی‌کوت، 1–3 ml خون محیطی (حاوی ترکیبات ضد انعقاد) را در 2500 x 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 µl 200 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 µL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 200 µL از بافی کوت را به تیوب اضافه نمایید.
2. میزان 200 µL 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 15–10 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 دریک میکروتیوب 1.5 mL قرار دهید.

## فرآیند

1. میزان 20 µL محلول پروتئیناز K و 200 µL 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 سلول های متصل به سواب 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 می توانید 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 µL 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 µL بزاق دهان را در یک تیوب 15 mL بریزید.

توجه: حداقل 30 دقیقه قبل از جمع آوری 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 6000 x g (8000 rpm) 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 rpm) 6000 x 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 µL 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 µL پروتئیناز K را به نمونه اضافه کرده و کمی سانتریفیوژ نمایید.
2. میزان 200 µL 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 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 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 $5 \times 10^6$ 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 $5 \times 10^6$ عدد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود). تعداد مناسبی از سلول‌ها را در میکروتیوب 1.5 mL ریخته، و در 300 x 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 $5 \times 10^6$ 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 FBS 10% به فلاسک جمع آوری کنید ( حجم محیط کشت حاوی FBS 10% باید دو برابر حجم تریپسین اضافه شده باشد). سلول‌ها را پس از جمع آوری به فالکون انتقال دهید.

نکته: FBS 10% باعث غیرفعالسازی تریپسین می‌شود.

تعداد مناسب از سلول‌ها (بیش از $5 \times 10^6$ تعداد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود) را به میکروتیوب 1.5 mL انتقال دهید. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در 300 x 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 $5 \times 10^6$ تعداد سلول با عدد کروموزومی نرمال استفاده نشود) را به میکروتیوب 1.5

mL انتقال دهید. میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در 300 x 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 µL برسانید. میزان 15 µL پروتئیناز K را اضافه نمایید.
2. میزان 200 µL 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 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 قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA از خون و مایعات بدن، از مرحله 4 عمل شود.

## استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها

### فرآیند

1. میزان 15 µL 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 µL است، مقدار مناسب از محلول PBS (1X) را اضافه کنید تا حجم کل به 500 µL برسد.
- استفاده از حجم کمتر از 500 µL نمونه در این فرآیند توصیه نمی‌شود.

2. میزان 500 µL 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 µL از محلول NA Carrier را به 500 µL بافر HL اضافه نمایید.

3. میزان 600 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 قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. میزان 800 µL 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 x 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 µL بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را برروی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. میزان 600 µL بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را با سرعت (8000 rpm) 6000 x 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.
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 می توانید 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 µL 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 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

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

## آماده‌سازی 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 x g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا یک محلول شفاف حاصل شود.
3. مایع رویی را به وسیله فیلتر 0.22 µm فیلتر نمایید.

- فیلتراسیون در این مرحله باعث جداسازی سلول‌ها از نمونه مدفوع، و در نتیجه کاهش میزان نوکلئیک اسید سلولی در نمونه آماده‌سازی شده می‌شود.

## فرآیند

1. میزان 500 µL از نمونه فیلتر شده را درون میکروتیوب 2 mL بریزید. 15 µL پروتئیناز K را اضافه نمایید.
2. میزان 500 µL 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.

- توصیه می‌شود میزان 3 µL از محلول NA Carrier را به 500 µL بافر HL اضافه نمایید.

3. میزان 600 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 قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها، از مرحله 4 عمل شود.

**توجه:** در این فرآیند، مرحله الوشن را با استفاده از 60 µL 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 3-2 ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.
2. مطابق پروتکل تغلیظ نمونه، حجم نمونه را از 2 mL به 200 µL برسانید.

**چنانچه به کیت تغلیظ دسترسی ندارید مراحل استخراج را با حجم 500 µL از نمونه طبق فرآیند استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها انجام دهید.**

## استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based

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

### آماده سازی نمونه

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

- چنانچه در آزمایشگاه مولکولی خود سانتریفیوژ لوله فالکون موجود ندارید، به منظور تغلیظ، میزان 2 mL نمونه را در 6000 x g (8000 rpm) 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 نمونه گیری و میزان سلول های 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 می شود:

1. تیوب نمونه گیری کاملا ورتکس شود تا تمام سلول ها و بافت های 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 150µl از مایع در انتهای میکروتیوب باقی بماند تا حداقل رسوب تشکیل شده از دست نرود.

## فرآیند

1. میزان 180 µL از بافر TL را به رسوب سلولی اضافه کرده و ورتکس کنید.
2. میزان 15 µL پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملا مخلوط نمایید و به مدت 20 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل نمونه، درطول 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 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید و تنها مایع رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کنید.

3. میزان 200 µL بافر HL و میزان 300 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.

- توصیه می‌شود میزان 3 µL از محلول NA Carrier را به 200 µL 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 x 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 x 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 WB2به 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 6000 x g (8000 rpm) 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 می‌شود که بافت با استفاده از ازت و هاون پودر شده و قبل از ذوب، به تیوب منتقل گردد. این روش می‌تواند باعث بهبود روند استخراج شده و زمان لایز بافت را کاهش دهد.)

- اگر استخراج DNA را از نمونه بافت طحال انجام می‌دهید، 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 می‌کنید، 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 می‌باشد.

3. میزان 20 µL پروتئیناز K را اضافه کرده و به‌وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید و 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.

- 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 µL

(100 mg/mL) RNase A 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 µL 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 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 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 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 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 µL بافر TL استفاده می کنید، حجم اتانول را به 400 µL برسانید.

- نمونه، بافرHL 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 طورکامل 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 x 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، بافرHL 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 µL 500 بافرWB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g 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 µL 600 بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g 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 می توانید 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 فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافرWB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.

13. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. میزان µL 70 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 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- استفاده کمتر از µL 70 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 µL 50 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 µg 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 باکتری

از این روش برای استخراج ژنوم باکتری‌هایی نظیر اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، بوردتلا پرتوزیس (*Bordetella pertussis*) از نمونه سوآب 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 نمونه ها 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: (1X) PBS 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)

آنزیم لیزواستافین

## آماده‌سازی نمونه

**مایعات زیستی شامل سرم، پلاسما، CSF و سایر**

1. نمونه را در (7500 rpm) 5000 x 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 °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 $2\times10^{9}$ 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 $2\times10^{9}$ 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 µL بافر TL به همراه 20 µL 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 دمای 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 و20 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.

1. نمونه خشک شده روی اسلاید را با چند قطره بافر PBS (1X) مرطوب کنید.
2. میزان 180 µL بافر PBS را درون یک میکروتیوب 2 mL بریزید.

# ضمیمه‌ها

## آماده‌سازی نمونه خلط (Sputum)

1. مقدار 1 mL نمونه خلط و برابر با حجم آن، محلول NaOH (1M) را اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید.
2. نمونه را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا قابل پیپت کردن شود و سپس در 5000x g (7500rpm) به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. بدون آسیب به رسوب تشکیل شده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 450 µL 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 فالکون 50 mL یا 15 mL انتقال داده و در 300 x g به مدت 10–5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
2. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست‌آمده 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 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در 500 µL 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 µL 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 سوسپانسیون ها 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.<br>• زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید.<br>• انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید.<br>• برای نمونه های خون کم لکوسیت از بافی کوت استفاده کنید. |
| | لایز نامناسب نمونه | • زمان انکوباسیون با بافر TL و HL را رعایت کنید.<br>• برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید.<br>• نمونه بافت را به خوبی همگن نمایید.<br>• 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 نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید.<br>• از نمونه خون یا مایعات بدن که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید.<br>• برای جلوگیری از فعالیتDNase ، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید.<br>• نمونه گیری را تکرار کنید. |
| | محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است. | • زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید.<br>• حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید.<br>• مقدار زیادی از نمونه خون را استفاده کرده اید.<br>• 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. |
| | عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K | • مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه تازه تکرار کنید.<br>• آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود. |

| | | |
|---|---|---|
| | | • آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید.<br>• پس از اضافه کردن پروتئیناز K به نمونه فوراً عمل ورتکس را انجام دهید. |
| | استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول | • استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود. |
| | مسدود شدن غشاء ستون | • در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد.<br>• قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید.<br>• از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید.<br>• در استخراج DNA از بافی کوت، غلظت لوکوسیت¬ها در نمونه نباید بیشتر از $5x10^6$ می باشد. نمونه را با 200 µL بافر PBS (1X) رقیق نموده و فرآیند استخراج را تکرار کنید.<br>• در استخراج DNA از پلاسما، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب کرایو از چرخه انجماد-ذوب خودداری کنید.<br>• 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.<br>• |
| پایین بودن نسبت A260/A280 | آلودگی پروتئینی | • برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید.<br>• از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. |

| | | |
|---|---|---|
| | | • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر TL، HL و اتانول اطمینان حاصل نمایید.<br>• برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود.<br>• از عدم تماس غشاء ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید.<br>• بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید.<br>• از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید.<br>• کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم. به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده‌سازی باید در 20°C- نگهداری شود. |
| پایین بودن نسبت A260/A230 | آلودگی نمکی | • در حین فرآیند ستون‌ها را به آرامی جا به جا کنید.<br>• درب ستون‌ها را به آرامی باز و بسته نمایید.<br>• از انتقال حباب‌های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید.<br>• از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید. |
| قطعه قطعه شدن DNA | ورتکس پیاپی | • 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. |

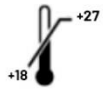
## کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت‌های (.LOT NO) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به‌ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرارگرفته‌است.

## تاریخچه ویرایش پروتکل

| شماره ویرایش | توضیحات | تاریخ |
|---|---|---|
| 00 | نسخه جدید | 1401/02 |
| 01 | 1.اعمال تغییرات در حجم ریجنت ها در برخی از فرآیندها.<br>2.اعمال تغییرات در سرعت سانتریفیوژ در برخی فرآیندها.<br>3.بروزرسانی فرآیند استخراج DNA ویروسی از نمونهLiquid-Based<br>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<br>2.تغییر در فرایند الوشن استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون¬ها<br>3.تغییر در استخراج DNA از µL400 خون محیطی تازه<br>4.تغییر در استخراج DNA از بافی¬کوت در مرحله الوشن وآماده سازی نمونه<br>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<br>2. بهبود عملکرد آنزیم پروتئیناز K<br>3. بهبود فرایند استخراج DNA باکتری از مایعات بیولوژیک | 1403/05 |

| | | |
|---|---|---|
| 07 | 1. به روزرسانی فرایند استخراج DNA از سلول های دهانی<br>2. اعمال تغییر جزئی در آماده سازی نمونه و کوتاه شدن فرآیند استخراج DNA ویروسی از Liquid-Based<br>3. به روزرسانی فرآیند استخراج DNA باکتری<br>4. 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 دستورالعمل استفاده از محصول | | احتیاط | |
| کد کالا | | شماره سری ساخت | |

**شـرکت دانـش بنیـان ویسـتا زیسـت فنـاوری بـه ژن**

آدرس: شـیراز، منطقـه ویـژه اقتصادی،فـاز دوم، جنـب میـدان صـادرات

شـماره تمـاس: 07191009596 امور مشتریان: 09912070924

کدپسـتی: 7159115468 وبسـایت: www.BehGene.com