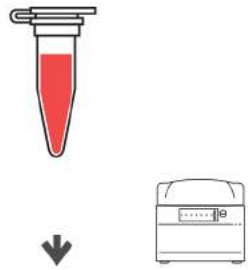
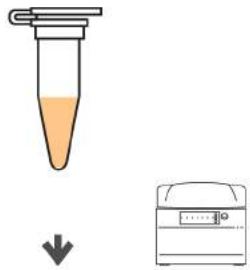
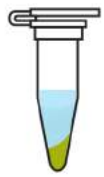
Step1:
RBC Lysis



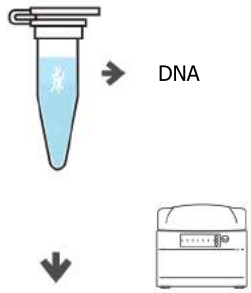
Step 2:
WBC Lysis



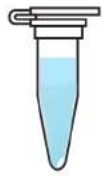
Step 3:
Protein Percipitate



Step 4:
DNA Percipitate



Step 5:
Wash



Step 6:
Rehydration

فهرست

پروتکل ۱ ..... ۲
جداسازی DNA ژنومی (Mini Prep) ۲
نکات مهم قبل از شروع کار ۲
مراحل کار ۲
پروتکل ۲ ..... ۴
جداسازی DNA ژنومی (Midi Prep) ۴
نکات مهم قبل از شروع کار ۴
مراحل کار ۴
پروتکل ۳ ..... ۶
جداسازی DNA ژنومی (Maxi Prep) ۶
نکات مهم قبل از شروع کار ۶
مراحل کار ۶
پروتکل ۴ ..... ۸
جداسازی DNA ژنومی (بافی کوت) ۸
نکات مهم قبل از شروع کار ۸
مراحل کار ۸

پروتکل ۱

جداسازی DNA ژنومی (بر پایه ی محلول)

نوع: MiniPrep

نکات مهم قبل از شروع کار

- در تمامی مراحل، سانتریفیوژ در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انجام می شود.
- در صورتی که در بافرهای ROS یا RBC Lysis Buffer یا protein precipitation solution رسوب دیده شد، حتما قبل از شروع کار آن ها را در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب کاملا حل شود.

مراحل کار

۱) ۱ میلی لیتر RBC Lysis Buffer را به ۳۰۰ میکرولیتر خون درون میکروتیوب اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید، ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲) مایع رویی را دور ریخته و به پلت (رسوب) ۱ میلی لیتر RBC Lysis Buffer مجددا اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید. ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله پلت (رسوب) کوچکی از گلبول های سفید در انتهای میکروتیوب مشاهده می شود.

۳) مایع رویی را به گونه ای دور ریخته که حدود ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی بر روی پلت (رسوب) در میکروتیوب باقی بماند (بهتر است این کار را با سمپلر ۱۰۰۰ انجام دهید). پلت (رسوب) را به مدت ۱۰ ثانیه با حداکثر سرعت ورتکس کنید و به آن ۴۰۰ میکرولیتر از ROS اضافه کرده و ۲۰ ثانیه ورتکس کنید، تا زمانی که رسوب به طور کامل حل شود.

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از protein precipitation solution به مایع درون میکروتیوب اضافه کنید، ۵ ثانیه به شدت هم بزنید(vigorously shake). ۱۵-۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و مجددا به شدت به هم بزنید و در نهایت با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله باید مایع رویی شفاف شود، اگر نشد ۳۵ میکرولیتر protein precipitation solution به میکروتیوب اضافه کنید و پس از هم زدن شدید و ورتکس، مجدداً ۲ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.

۵) مایع رویی را به میکروتیوب جدید منتقل کرده، به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده، ۲۰-۱۰ بار به سرعت میکروتیوب را اینورت (واژگون) کنید. سپس با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: مطمئن شوید که هنگام انتقال مایع رویی به میکروتیوب جدید، پلت (رسوب) پروتئین منتقل نشود.

۶) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند. ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به پلت (رسوب) اضافه کرده و با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۷) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند و به پلت (رسوب) ۵۰ میکرولیتر RRB اضافه کنید. تا زمانی که پلت (رسوب) به طور کامل حل شود، پیپتاژ کنید یا اینکه بعد از اضافه کردن RRB به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید، سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (یا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی گراد)، انکوبه کنید. پس از آن برای حل شدن DNA، مجددا ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.

۸) DNA برای کاربردهای بعدی آماده است. شما می توانید ۵-۲ میکرولیتر از آن را برای واکنش PCR استفاده کنید.

نکته: اجازه ندهید پلت (رسوب) DNA خشک شود و بلافاصله پس از دور ریختن مایع رویی، حلال را اضافه کنید.

پروتکل ۲

جداسازی DNA ژنومی (بر پایه ی محلول)

نوع: Midi Prep

نکات مهم قبل از شروع کار

- در تمامی مراحل، سانتریفیوژ در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انجام می شود.
- در صورتی که در بافرهای ROS یا RBC Lysis Buffer یا protein precipitation solution رسوب دیده شد، حتما قبل از شروع کار آن ها را در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب کاملا حل شود.

مراحل کار

۱) ۶ میلی لیتر RBC Lysis Buffer را به ۲ میلی لیتر خون درون تیوب اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید، ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور ۴۰۰۰rpm (۲۰۰۰ g) به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲) مایع رویی را دور ریخته و به پلت (رسوب) ۲ میلی لیتر RBC Lysis Buffer مجددا اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید، ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور ۴۰۰۰ rpm (۲۰۰۰ g) به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله پلت (رسوب) کوچکی از گلبول های سفید در انتهای تیوب مشاهده می شود.

۳) مایع رویی را دور بریزید. پلت (رسوب) را به مدت ۱۰ ثانیه با حداکثر سرعت ورتکس کنید و به آن ۱۲۵۰ میکرولیتر ROS اضافه کرده و ۲۰ ثانیه ورتکس کنید، تا زمانی که رسوب به طور کامل حل شود.

۴) ۵۰۰ میکرولیتر از protein precipitation solution به مایع درون تیوب اضافه کنید، ۵ ثانیه به شدت هم بزنید(vigorously shake). ۱۵-۲۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و مجددا به شدت به هم بزنید و در نهایت با دور ۴۰۰۰ rpm (۲۰۰۰ g) به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله باید مایع رویی شفاف شود. اگر مایع رویی شفاف نبود، مجدداً ۵۰ میکرولیتر protein precipitation solution به تیوب اضافه کنید و پس از هم زدن شدید و ورتکس ، ۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm (۲۰۰۰ g) سانتریفیوژ کنید.

۵) مایع رویی را به تیوب جدید منتقل کرده، به آن ۳ میلی لیتر اتانول مطلق اضــافه کنید. ۵ بار به آرامی اینورت (واژگون) کرده و تیوب را به مدت ۲ دقیقه در یخچال و یا فریزر انکوبه کنید.

نکته: مطمئن شوید که هنگام انتقال مایع رویی به تیوب جدید، پلت (رسوب) پروتئین منتقل نشود.

۶) پلت (ر سوب) DNA را با ا ستفاده از سمپلر ۱۰۰۰ که روی ۱۰۰ تنظیم شده ا ست بردارید و وارد میکروتیوب کنید. ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به پلت (رسوب) اضافه کرده و با دور rpm ۱۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۷) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند و به پلت (رسوب) ۲۰۰ میکرولیتر RRB اضافه کنید. تا زمانی که پلت (رسوب) به طور کامل حل شود، پیپتاژ کنید یا اینکه بعد از اضافه کردن RRB به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. ســپس ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه ســانتی گراد (یا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، ۲۵ درجه ســانتی گراد)، انکوبه کنید. پس از آن برای حل شدن DNA، مجددا ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.

۸) DNA برای کاربردهای بعدی آماده است، شما می توانید ۵-۲ میکرولیتر از آن را برای واکنش PCR استفاده کنید.

نکته: اجازه ندهید پلت (رسوب) DNA خشک شود و بلافاصله پس از دور ریختن مایع رویی، حلال را اضافه کنید.

پروتکل ۳

جداسازی DNA ژنومی (بر پایه ی محلول)

نوع: Maxi Prep

نکات مهم قبل از شروع کار

- در تمامی مراحل، سانتریفیوژ در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انجام می شود.
- در صورتی که در بافرهای ROS یا RBC Lysis Buffer یا protein precipitation solution رسوب دیده شد، حتما قبل از شروع کار آن ها را در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب کاملا حل شود.

مراحل کار

۱) ۲۰ میلی لیتر RBC Lysis Buffer را به ۵ میلی لیتر خون درون تیوب اضافه کرده، ۵ بار اینورت (واژگون) کنید. سپس ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید. با دور ۴۵۰۰ rpm (۳۲۰۰ g) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲) مایع رویی را دور ریخته و به پلت (رسوب) ۴ میلی لیتر RBC Lysis Buffer مجددا اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید.۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور ۴۵۰۰ rpm (۳۲۰۰ g) به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله پلت (رسوب) کوچکی از گلبول های سفید در انتهای میکروتیوب مشاهده می شود.

۳) مایع رویی را دور بریزید. پلت (رسوب) را به مدت ۲۰ ثانیه با حداکثر سرعت ورتکس کنید و به آن ۲۵۰۰ میکرولیتر از ROS اضافه کرده و ۶۰-۲۰ ثانیه ورتکس کنید، تا زمانی که رسوب به طور کامل حل شود. سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۴) ۱ میلی لیتر protein precipitation solution به مایع درون تیوب اضافه کنید، ۱۰ ثانیه به شدت هم بزنید (vigorously shake). ۱۵-۲۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و مجددا به شدت به هم بزنید و در نهایت با دور ۴۵۰۰ rpm (۳۲۰۰ g) به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله باید مایع رویی شفاف شود. اگر مایع رویی شفاف نبود، ۵۰ میکرولیتر protein precipitation solution به تیوب اضافه کنید و پس از هم زدن شدید و ورتکس مجدد ۲ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm (۳۲۰۰ g) سانتریفیوژ کنید.

۵) مایع رویی را به تیوب جدید منتقل کرده، به آن ۵ میلی لیتر اتانول مطلق اضافه کرده، ۵ بار به آرامی اینورت (واژگون) کنید. تیوب را به مدت ۲ دقیقه در یخچال و یا فریزر انکوبه کنید.

نکته: مطمئن شوید که هنگام انتقال مایع رویی به تیوب جدید، پلت (رسوب) پروتئین منتقل نشود.

۶) پلت (رسوب) DNA را با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ که روی ۱۰۰ تنظیم شده است بردارید و به میکروتیوب منتقل کنید. ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به پلت (رسوب) اضافه کرده و با دور rpm ۱۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۷) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند و به پلت (رسوب) ۵۰۰ میکرولیتر RRB اضافه کنید. تا زمانی که پلت (رسوب) به طور کامل حل شود، پیپتاژ کنید یا اینکه بعد از اضافه کردن RRB به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید، سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (یا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی گراد)، انکوبه کنید. پس از آن برای حل شدن DNA، مجددا ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.

۸) DNA برای کاربردهای بعدی آماده است، شما می توانید ۵-۲ میکرولیتر از آن را برای واکنش PCR استفاده کنید.

نکته: اجازه ندهید پلت (رسوب) DNA خشک شود و بلافاصله پس از دور ریختن مایع رویی، حلال را اضافه کنید.

پروتکل ۴

جداسازی DNA ژنومی (بر پایه ی محلول)

نوع نمونه: بافی کوت

نکات مهم قبل از شروع کار

- در تمامی مراحل، سانتریفیوژ در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انجام می شود.
- در صورتی که در بافرهای ROS یا RBC Lysis Buffer یا protein precipitation solution رسوب دیده شد، حتما قبل از شروع کار آن ها را در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب کاملا حل شود.

مراحل کار

۱) ۱ میلی لیتر RBC Lysis Buffer را به ۳۰۰ میکرولیتر بافی کوت درون میکروتیوب اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید، ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲) مایع رویی را دور ریخته و به پلت (رسوب) ۱ میلی لیتر RBC Lysis Buffer مجددا اضافه کرده ۵ بار اینورت (واژگون) کنید. ۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و سپس با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله پلت (رسوب) کوچکی از گلبول های سفید در انتهای میکروتیوب مشاهده می شود.

۳) مایع رویی را به گونه ای دور ریخته که حدود ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی بر روی پلت (رسوب) در میکروتیوب باقی بماند (بهتر است این کار را با سمپلر ۱۰۰۰ انجام دهید). پلت (رسوب) را به مدت ۱۰ ثانیه با حداکثر سرعت ورتکس کنید.

۴) به آن ۴۰۰ میکرولیتر از ROS و ۲۰ میکرولیتر RJ-Protease یا Proteinase K (Cat No. EB983018, EB983121) اضافه کرده و ۳۰ ثانیه ورتکس کنید، سپس در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه انکوبه کنید، برای مخلوط شدن نمونه، در مدت انکوبه هر ۵ دقیقه یکبار پالس ورتکس کنید، یا آنرا در thermomixer یا حمام آب گرم شیکر دار قرار دهید.

۵) ۲۰۰ میکرولیتر از protein precipitation solution به مایع درون میکروتیوب اضافه کنید، ۱۰ ثانیه به شدت هم بزنید(vigorously shake). ۱۵-۱۰ ثانیه با سرعت بالا ورتکس کنید و مجددا به شدت به هم بزنید و در نهایت با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: در این مرحله باید مایع رویی شفاف شود، اگر نشد ۳۵ میکرولیتر protein precipitation solution به میکروتیوب اضافه کنید و پس از هم زدن شدید و ورتکس، مجدداً ۲ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.

۶) مایع رویی را به میکروتیوب جدید منتقل کرده، به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده، ۲۰-۱۰ بار به سرعت میکروتیوب را اینورت (واژگون) کنید. سپس با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

نکته: مطمئن شوید که هنگام انتقال مایع رویی به میکروتیوب جدید، پلت (رسوب) پروتئین منتقل نشود.

۷) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند. ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به پلت (رسوب) اضافه کرده و با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۸) مایع رویی را به طور کامل دور ریخته طوری که فقط پلت (رسوب) DNA باقی بماند و به پلت (رسوب) ۵۰ میکرولیتر RRB اضافه کنید. تا زمانی که پلت (رسوب) به طور کامل حل شود، پیپتاژ کنید یا اینکه بعد از اضافه کردن RRB به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید، سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (یا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی گراد)، انکوبه کنید. پس از آن برای حل شدن DNA، مجددا ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.

۹) DNA برای کاربردهای بعدی آماده است. شما می توانید ۵-۲ میکرولیتر از آن را برای واکنش PCR استفاده کنید.

نکته: اجازه ندهید پلت (رسوب) DNA خشک شود و بلافاصله پس از دور ریختن مایع رویی، حلال را اضافه کنید.