Nama Gene Azma

پروتکل استخراج DNA از بافت

نکات مهم:

- بافرها و محلول های موجود در این کیت حاوی مواد مضر هستند و هنگام کار با آنها حتماً از دستکش و روپوش آزمایشگاهی استفاده نمایید.
- به مواد دور ریختنی این کیت به هیچ عنوان محلول های اسیدی یا آب ژاول اضافه ننمایید.
- در صورتی که در طی نگهداری کیت بویژه در دماهای پایین در بعضی از بافرها رسوبی دیده شود، با انکوباسیون ظرف مربوطه در دمای 60°C، رسوبات را حل کنید.
- ویال حاوی پروتئیناز K را در دمای 20°C- نگهداری کنید.
- به محلولهای شست و شوی یک و دو (Wash Buffer I & II) به ترتیب 20ml و 40ml اتانول خالص اضافه نمایید.
- دستگاه ترموبلاک یا بن ماری را روی دمای 55°C تنظیم نمایید.
- اطمینان حاصل کنید که به محلول های شست و شو اتانول اضافه کرده‌اید.

1- بافت (تا 15mg) را با استفاده از یک تیغ تمیز به قطعات کوچک تقسیم کنید و آن را داخل میکروتیوب 1.5ml قرار دهید.

2- به میکروتیوب حاوی نمونه به ترتیب 200µl از محلول **Lysis Buffer** و 10µl **پروتئیناز K** اضافه نمایید. میکروتیوب را ورتکس کرده و پس از اسپین مختصر در دمای 55°C قرار دهید (میزان انکوباسیون برحسب نوع بافت از ۲ ساعت تا یک شبانه روز متغیر است و تا هضم کامل بافت ادامه می‌یابد).
*در صورت نیاز مقدار 3µl آنزیم RNase A به عصاره بافتی اضافه نمایید و ۱۰ دقیقه در دمای 55ºC قرار دهید.

3- ترموبلاک را روی 70ºC تنظیم نمایید و مقداری از **Elution Buffer** را در این دما قرار دهید و در انتها از این بافر گرم برای جداسازی DNA از ستون استفاده نمایید.

4- بعد از هضم کامل بافت، به عصاره بافتی حاصل، 200µl از محلول **Binding Buffer** و 10µl **پروتئیناز K** اضافه نمایید. میکروتیوب را ورتکس و اسپین مختصر نموده و برای مدت ۱۵ دقیقه در 70°C قرار دهید.

5- به میکروتیوب حاوی عصاره بافتی 200µl اتانول خالص اضافه کرده و پس از ورتکس و اسپین مختصر، کل محلول را به ستون‌های استخراج DNA اضافه نمایید.

6- نمونه‌ها را با دور 10000 rpm برای مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

7- لوله جمع‌آوری کننده را دور انداخته و ستون استخراج را روی یک لوله جمع‌آوری کننده دیگر قرار دهید.

8- به ستون 500µl محلول **Wash Buffer I** اضافه نمایید. مشابه مرحله قبل در 10000 rpm برای یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

9- لوله جمع‌آوری کننده را دور انداخته و 500µl محلول **Wash Buffer II** به هر ستون اضافه نمایید. لوله‌ها را در 10000 rpm برای یک دقیقه سانتریفوژ نمایید. سپس برای ۲ تا ۳ دقیقه دیگر در دور بالا (14000 rpm) سانتریفیوژ نمایید.

10- لوله جمع‌آوری کننده را دور انداخته و ستون را داخل میکروتیوب 1.5ml قرار دهید. با دقت 50-100µl از محلول **Elution Buffer** گرم را به وسط ستون اضافه نمایید.

11- در ستون ها را بسته و برای ۲ تا ۵ دقیقه در دمای 70°C قرار دهید و سپس به مدت یک دقیقه در دور 12000 rpm سانتریفیوژ نمایید.

12- DNA حاصل را می توانید در دمای 20°C- نگهداری نمایید.