


*In The Name Of God*

Shaheed Beheshti University of
Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis
East Mediterranean Region

Mycobacteriology
Research Center

National Research Institute
Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis
Laboratory IUATLD

# روشهای استخراج DNA

# Methods of DNA Extraction (Mycobacterium & Human)

## Mycobacteriology Research Center (MRC)

| | |
|---|---|
| **Dr. P. Farnia** | **دکتر پریسا فرنیا** |
| **Sh. Seif** | **شیما سیف** |
| **Dr. M. Sheikholslami** | **دکتر مریم شیخ الاسلامی** |
| **Dr. M. Aghali Merza** | **دکتر موید آغالی میرزا** |
| **Dr. M. Varahram** | **دکتر محمد ورهرام** |
| **Dr. M. R. Masjedi** | **دکتر محمد رضا مسجدی** |
| **Dr. A. A. Velayati** | **دکتر علی اکبر ولایتی** |

**Protocol (No: 1)**

| | |
|---|---|
| **عنوان و نام پدیدآور** | روشهای استخراج Methods of DNA Extraction (Mycobacterium & Human) = DNA / ( نویسندگان پریسا فرنیا ... [و دیگران] ) ؛ [ به سفارش] مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی Mycobacteriology Research Center (MRC) ... [ و دیگران ] . |
| **مشخصات نشر** | : تهران: مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی دکتر مسیح دانشوری، ۱۳۸۹. |
| **مشخصات ظاهری** | : ۵۴ ص. : مصور، جدول. |
| **شابک** | ۴۰۰۰۰ ریال: 978-600-5069-02-0 |
| **وضعیت فهرست نویسی** | : فیپا |
| **یادداشت** | : نویسندگان پریسا فرنیا، شیما سیف، مریم شیخ الاسلامی، موید آغالی میرزا، محمد ورهرام، محمد رضا مسجدی، علی اکبر ولایتی. |
| **یادداشت** | : کتابنامه. |
| **موضوع** | : مایکوباکتریوم -- دستنامه های آزمایشگاهی |
| **موضوع** | : مایکوباکتریوم سل -- دستنامه های آزمایشگاهی |
| **موضوع** | : دی. ان. ا. — تجزیه و تحلیل |
| **شناسه افزوده** | : فرنیا، پریسا، ۱۳۴۳ - |
| **شناسه افزوده** | : مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی دکتر مسیح دانشوری |
| **شناسه افزوده** | : مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی |
| **شناسه افزوده** | : Mycobacteriology Research Center |
| **رده بندی کنگره** | : ۱۳۸۹ ۹ ر ۲ م/QR۸۲ |
| **رده بندی دیویی** | : ۵۷۹/۳۷۴ |
| **شماره کتابشناسی ملی** | : ۲۱۶۷۵۲۶ |



**مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشگاه سل و بیماری های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی**

**روشهای استخراج DNA**

مولفین: دکتر پریسا فرنیا، شیما سیف، مریم شیخ الاسلامی، موید آغالی میرزا، دکتر محمد ورهرام، دکتر محمد رضا مسجدی، دکتر علی اکبر ولایتی

ویراستاری و صفحه آرایی: دکتر محمد ورهرام

طرح روی جلد: فائزه صفرعلی

مدیر فنی و ناظر چاپ: فائزه صفرعلی

چاپ اول: پاییز ۱۳۸۹ قیمت: ۴۰۰۰۰ ریال تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

لیتوگرافی، چاپ و صحافی: سازمان چاپ و انتشارات

ISBN: 978-600-5069-02-0

Contence

فهرست


| | | | |
|---|---|---|---|
| *Materials & Instruments* ..... | 7 | ۷ | ..... وسایل و تجهیزات مورد نیاز |
| *Stock Solutions & Buffers* ..... | 9 | ۹ | ..... محلولها و بافرهای مورد نیاز |
| *Genomic DNA Extraction from Mycobacterial Culture* ..... | 27 | ۲۷ | ..... استخراج DNA از کلنی مایکوباکتریوم |
| *Extraction of Mycobacterial DNA from Clinical Samples Specimens* ..... | 15 | ۱۵ | ..... استخراج DNA از نمونه های بالینی (خلط و ...) |
| *Extraction of mycobacterial DNA From Paraffin-Embedded Tissue* ..... | 35 | ۳۵ | ..... استخراج DNA از بافت |
| *Extraction of DNA from Human Blood* ..... | 41 | ۴۱ | ..... استخراج DNA از خون |
| *Appendix & References* ..... | 51 | ۵۱ | ..... ضمیمه و رفرانس ها |

# وسایل و تجهیزات مورد نیاز
## *Materials & instruments*

* Micro tubes (0.5, 1.5 & 2 ml)
* Falcon tubes of 15 ml
* Pasture pipette
* Adjustable pipettes & pipette tips

* Surgical musk, Gown and gloves
* Cold centrifuges (4500 rpm)
* Micro centrifuge (12000-14000 rpm)
* Vortex or stirrer
* Incubator or water bath
* -20 Freezer
* Electrophoresis apparatus
* Autoclave-able basket

* میکروتیوپهای 2, 0.5,1.5 میلی لیتری
* لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری درپیچ دار
* پیپت پاستور پلاستیکی
* سمپلر متغیر (۱۰–۱۰۰ و ۱۰۰–۱۰۰۰) و
  سر سمپلر ثابت ۱۰۰و ۱۰۰۰
* دستکش ، ماسک و گان یک بار مصرف
* سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۴۵۰۰
* میکروسانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰–۱۴۰۰۰ rpm
* ورتکس یا شیکر
* بن ماری یا انکوباتور ۵۰
* فریزر -20
* وسایل الکتروفورز
* سطل قابل اتوکلاو

# بافر و محلولهای مورد نیاز
## *Stock Solution & Buffers*

*** لیزوزیم**

۱۰ میلی گرم لیزوزیم را در یک میلی لیتر آب مقطر استریل حل کنید. این محلول را در میکروتیوبهای کوچک تقسیم و در دمای -20°C نگهداری کنید. این محلول تا یک سال قابل استفاده می باشد.

**** Lysozyme (10mg/ml)***

Dissolve 10 mg lysozyme in ml distilled water. Store in small aliquots at -20ºC for no longer than one year.

*** اس.دی.اس (۱۰ درصد)**

۱۰ گرم از اس.دی.اس را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه حل کنید. این محلول احتیاجی به اتوکلاو ندارد و در دمای اتاق تا یک ماه قابل استفاده می باشد.

**** 10% SDS***

10 gram SDS/100 ml D.W
Dissolve by heating at 65°C for 20 min. Do not autoclave. Store at room temp for no longer than 1 month.

## * بافر 1XTE

ابتدا محلولهای زیر را آماده نمایید:

**۱) محلول ۱ مولار تریس (Tris)**: ۱۲۱/۱۴ گرم از تریس (tris,MW=121.14) را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و به وسیله HCL "پی اچ " مورد نیاز را تعیین نمایید. برای مثال برای پی اچ" ۷/۴ " حدودا ۷۰ میلی لیتر و برای پی اچ "۸/۰" مقدار ۴۲ میلی لیتر HCL اضافه نمایید. سپس حجم محلول را به ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول بعد از اتوکلاو در دمای اتاق تا یک ماه قابل استفاده می باشد.

**۲) محلول نیم مولار $Na_2$ EDTA**: ۱۸۶/۱۲ گرم از $Na_2$ EDTA را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر به وسیله مگنت حل نموده و به وسیله NaOH (±20 g) پی اچ آن را به "۸/۰" برسانید.

حالا برای ساختن بافر 1XTE: ۱۰ میلی لیتر از محلول اول را با ۲ میلی لیتر محلول دوم در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید و بعد از اتوکلاو حجم آن را به ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول را در دمای اتاق نگهداری نمایید.

*** 1 X TE buffer**

First prepare the following stock buffers

*** 1 M Tris- 1 Liter**

Dissolve 121.14 g tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris, MW= 121.14 in 800 ml $H_2O$). Adjust PH to the desired value by adding concentrated HCL as following table;

1M Tris with PH 7.4 need approximately 70 ml of concentrated HCL

1M Tris with PH 7.6 need approximately 60 ml of concentrated HCL

1M Tris with PH 8.0 need approximately 42 ml of concentrated HCL

Adjust volume to 1 liter with $H_2O$. Sterilize by autoclaving and store at room temperature

*** 0.5 M $Na_2$ EDTA (PH 8.0) - 1 litter**

Dissolve 186.12 g disodium ethylenediaminetetraacetate-2 $H_2O$ ($Na_2$ EDTA-2$H_2O$,
MW =372.24) in 800 ml $H_2O$; stir vigorously on a magnetic stirrer.

Adjust to PH 8.0 with NaOH (±20 g Na OH pellets) and adjust volume to 1 liter with $H_2O$.

Divide into aliquots and sterilize by autoclaving. Store at room temperature (remember the disodium salt of EDTA will only dissolve when the PH of the solution is adjusted to 8.0 by the addition of NaOH).

*** To prepare 1X TE buffer,** Add 10 ml 1M tris (PH 8.0, 7.6 or 7.4 ) and 2 ml 0.5 M $Na_2$ EDTA (PH 8.0) to 800 ml $H_2O$. Mix and adjust volume to 1 liter with H2O. Sterilize by autoclaving .Store at room temperature.

### * محلول پروتئیناز K

۱۰ میلی گرم از پروتئیناز K را در یک میلی لیتر آب مقطر حل کنید. این محلول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت یک سال قابل نگهداری و استفاده می باشد.

*** Proteinase K**

Dissolve 10 mg of proteinase in one ml of distilled water. Store in small aliquots at -20 $^{0}$C for no longer than one year.

### * محلول پروتئیناز K و اس.دی.اس

۵ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K را با ۷۰ میکرولیتر محلول اس.دی.اس ( ۱۰ درصد) مخلوط کرده. این محلول باید قبل از شروع آزمایش آماده شود.

*** SDS/Proteinase K mix**

Mix 5µl proteinase K (10 mg/ml ) with 70 µl of 10% SDS for each sample.

### * سدیم کلرید ۵ مولار

۲۹/۲ گرم از پودر NaCl را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در دمای اتاق نگهداری کنید. این محلول تا یک سال قابل استفاده می باشد.

*** NaCL (5M)**

Dissolve 29.2g NaCL in 100 ml distilled water. Autoclave. Store at room temp for no longer than one year.

* محلول CTAB/NaCL

۴/۱ گرم از پودر NaCl را در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. همچنان که محلول هم می خورد به آن ۱۰ گرم CTAB اضافه کرده و در صورت ضرورت برای حل شدن و شفاف شدن این محلول را در ۶۶ درجه سانتی گراد حرارت دهید. سپس حجم محلول را به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. این محلول در دمای اتاق تا شش ماه پایدار می باشد.

*** CTAB/NaCL solution**

Dissolve 4.1 gram NaCL in 80 ml distilled water. While stirring, add 10 gram CTAB (n-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide ). If necessary, heat solution to 650C. Adjust the volume to 100 ml distilled water. Store at room temp for no longer than 6 months.

* محلول کلروفورم/ ایزوآمیلی الکل(۲۴:۱)

۲۴ حجم از کلروفورم را با یک حجم ایزوآمیل الکل مخلوط کنید. این محلول در دمای اتاق تا یک سال پایدار می باشد.

*** Chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)**

Mix 24 volume of chloroform with 1 volume of isoamyl alcohol. Store at room temp for no longer than one year.

* **ایزوپروپانول**

در دمای اتاق برای یک سال قابل نگهداری می باشد.

*** Isopropanol:**

Store at room temp for no longer than one year.

* **اتانول ۷۰ درصد**

در دمای اتاق برای یک سال قابل نگهداری می باشد.

*** 70% Ethanol:**

Store at room temp for no longer than one year.

* **ضد انعقاد EDTA**:

با غلظت ۵٪ استفاده می گردد ( ۰/۵گرم پودر EDTA را در ۹ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و حجم نهایی را به ۱۰ میلی لیتر می رسانیم).

*** 5% EDTA as anti-coagulation**

Dissolve 0.5 g of EDTA in 10 ml of distal water.

## * بافر لیز کننده سلولهای قرمز

ابتدا محلولهای زیر را تهیه می کنیم:

محلول $NaHCO_3$ (1M) : 84.01 گرم ($NaHCO_3$, MW=84.01) را در 1000 میلی لیتر آب مقطر حل می نماییم. محلول بعد از اتوکلاو در دمای اتاق تا یک ماه قابل استفاده می باشد.

محلول $NH_4CL$(1M): ۵۳.۴۹ گرم ($NH_4CL$, MW=53.49) را در 1000 میلی لیتر آب مقطر حل می نماییم. (محلول یک مولار).

سپس از محلول شماره ۱ مقدار ۱۰ میلی لیتر و از محلول شماره ۲ مقدار ۱۵۵ میلی لیتر را برداشته و به حجم ۸۰۰ سی سی رسانده و پس از تنظیم PH (برابر 7.2) حجم را به ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید.

*** RBC Lyses Buffer**

First make the following solution

A) 1M $NaHCO_3$: Dissolve 84.01 g (MW = 84.01) in 1000 D.W

B) 1M $NH_4CL$: Dissolve 53.49 g (MW=53.49) in 1000 D.W

Then, take 10 ml of solution A and 155 ml from solution B, add 800 ml of D.W and then bring the pH to 7.2. Make the volume to 1000 D.W

## * بافر PBS

مقادیر زیر را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نمایید: ۸۰ گرم NaCl، ۲ گرم KCL، ۲۶/۸ گرم $Na_2HPO_4.7H_2O$ و ۲/۴ گرم $KH_2PO_4$ . پی اچ محلول را به ۷/۴ برسانید. سپس حجم محلول را به ۱۰۰۰ سی سی برسانید.

*** PBS Buffer:**

Dissolve the following in 800 ML of D.W; 80 gram of NaCl, 2 gram of KCL, 26.8 gram of $Na_2HPO_4.7H2O$ and 2.4 gram of $KH_2PO_4$ and make the PH to 7.4. Bring the volume to 1000 with D.W.

## * بافر SE [(EDTA(0.5 M) + NaCL (3M)]

محلول ۳ مولار NaCl: (M.W= 58.44)، ۱۷۵/۳۲ گرم از NaCL را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید.

محلول ۱ مولار EDTA : ( MW=372.54)، ۳۷۲/۵۴ گرم از EDTA را در 800 سی سی آب مقطر حل کنید. پی اچ محلول را بـه ۸ رسانده و سپس به حجم ۱۰۰۰ برسانید.

محلول نیم مولار EDTA : مقدار ۲۵۰ سی سی از محلول ۱ مولار EDTA را با ۲۵۰ سی سی آب مقطر حل کنید.

برای ساخت بافر : ۵۰۰ میلی لیتر محلول نیم مولار EDTA + ۵۰۰ میلی لیتر محلول ۳ مولار NaCl

*** SE Buffer [(EDTA (0.5 M) + NaCL (3M)]**

3 M NaCL (M.W= 58.44); Dissolve 175.32 gram of NaCL in 1000 ml D.W.
1 M EDTA (MW= 372.54); Dissolve 372.54 gram of EDTA in 800 mL D.W and make the PH to 8.2 and bring the volume to 1000.
0.5 M EDTA; take 250 ml from 1 M solution and bring it to 500 ml with D.W
SE buffer; one volume of 3M NaCL + one volume of 0.5 M EDTA

*** سدیم استات ($C_2H_3O_2Na$) ۳ مولار**

۲۴۹/۰۹ گرم از سدیم استات (M.W= 82.03) را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید . پی.اچ محلول را به ۵ برسانید.

*** Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$, MW = 82.03)**

Dissolve 246.09 gram of sodium acetate in 1000 D.W and bring PH to 5.

*** بافر Digestion buffer**

ابتدا مواد زیر را با مقادیر ذکر شده تهیه می کنیم:

a) محلول ۱ مولار تریس – کلرید: مقدار ۱۵۷/۶ گرم پودر تـریس (Tris HCL, MW=157.6) را وزن کـرده و در 800 ml آب مقطر حل کنید . پی اچ محلول فوق را به ۹ برسانید .

b) محلول ۱ مولار EDTA: مقدار ۳۷۲/۲ گرم پودر EDTA (1M, MW=372.2) را وزن کرده و در 1000 ml آب مقطر حل کنید.

c) محلول ۱ مولار NaCL: مقدار ۵۸/۴۴ گرم پودر NaCL (1M, MW=58.44) را وزن کرده و در 1000 ml آب مقطر حل کنید.

d) محلول ۱ درصد SDS: مقدار ۱ گرم پودر SDS را وزن کرده و در 100 ml آب مقطر حل کنید.

برای ساخت Digestion buffer: مقدار ۵۰۰ سی سی از محلول Tris HCL (1M) ، مقدار ۲۰ سـی سـی از محلـول EDTA (1M)، مقدار ۱۰ سی سی محلول NaCL (1M) و مقدار ۱۰۰ سی سی از محلول SDS را برداشته، مخلوط کرده و به حجـم ۱۰۰۰ سـی سـی برسانید.

*** Digestion buffer**

1M Tris –HCl: Dissolve 157.6 gram of Tris-HCl in 800 ml D.W, bring the PH to 9
IM EDTA: Dissolve 372.2 gram of EDTA in 1000 ml D.W
IM NaCL: Dissolve 58.44gram of Nacl in 1000 ml D.W
I % SDS: Dissolve 1 gram of SDS in 100 ml D.W
**Digestion buffer;** 500 ml of 1M Tris-HCL, 20 ml of 1M EDTA, 10 ml of NaCL, 100 ml of SDS, bring the total volume to 1000 ML.

# استخراج DNA از کلنی مایکوباکتریوم

## *Genomic DNA Extraction from mycobacterial culture*

ابتدا یک لوپ کلنی از روی محیط کشت برداشته و در400 میکرولیتر از محلول 1X TE به حالت سوسپانسیون در آورید و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه غیر فعال کنید.

Transfer at least one loop of mycobacterial cells into micro centrifuge tube containing 400µl of 1 X TE.
Heat 20 min at $80^0$C to kill the cells, and cool at room temperature.

به هر نمونه µl ۱۰۰–۵۰ از Lysozyme در رقت 10mg/ml اضافه کرده و بعد از Vortex به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

Add 50-100 µl of 10 mg/ml lysozyme.Vortex and incubate for 24 hours at 37 $^{o}$C

به هر نمونه 72.5 µL از proteinase K+ SDS 10% اضافه کرده و به مدت 24 ساعت در دمای ºC ۶۵ قرار دهید.

Mix proteinase K and SDS 10%; SDS=70µL+( proteinase K=2.5µL)
Add 72.5 µl of 10 % SDS/Proteinase K mix, vortex shortly and incubate 24 hours at $65^{o}$C.

به هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۵ مولار NaCL و۱۰۰ میکرولیتر از محلول (CTAB /NaCl) اضافه و vortex کرده و در دمای $65^0$C به مدت ۱۰ دقیقه قرار دهید.

Add 100 µl of 5M NaCL
Add 100 µl of CTAB/NaCL solution, which is pre-warmed at $65^0$C for 5 min. Vortex until the liquid content becomes white (milky). Incubate for 10 min at $65^0$C

به هر نمونه ۷۵۰ میکرولیتر از محلول Chloroform / Isoamyl alcohol اضافه کرده و نمونه ها را ۲۰ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.

Add a volume of about 750 µl of chloroform/isoamyl alcohol. Vortex for at least 10 sec, and centrifuge at room temp for 20 min at 12,000 rpm.
Becomes white (milky). Incubate for 10 min at $65^0$C.

محلول رویی رسوب را به میکروتیوپ دیگری منتقل کرده (حداقل ۱۸۰ µl) و به هر نمونه Isopropanol (per 1000µl = 600µl) افزوده و بعد از میکس کردن نمونه ها را در فریزر $-20^0$C بگذارید.

Transfer all of the aqueous supernatant in 180 µl amounts to a fresh micro centrifuge tube.
Carefully add 0.6 volume (450 µl) isopropanol to precipitate the nucleic acids. Shake carefully by hand. Place for overnight at -20$^0$C.

نمونه ها را از ۲۰˚c– در آورده و به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را بیرون ریخته و به رسوب آن ۱ میلی لیتر از Ethanol 70% اضافه کرده و دوباره در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را بیرون ریخته و لوله را به صورت وارونه بر روی کاغذ صافی (به مدت ۱۰ دقیقه) بگذارید.

Spin for 20 min at 12,000 rpm. Remove most of the supernatant; leave about 20 µl above the pellet. Add 1 ml of 70% cold ethanol and centrifuge for one minute at 12000 rpm. Discard the supernatant and keep the micro tube reversely on a filter paper for 10 min.

به نمونه ها حدود ۱۰-۳۰µl از محلول TE(1X) افزوده و در ۳۷$^o$C قرار دهید (۳ الی ۴ ساعت). سپس به ۴$^o$C انتقال و تا زمان آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری شوند.

Add 10-30 µl 1 X TE and keep at 37$^0$C for 3-4 hours. Transfer & keep at 4$^0$C in refrigerator.




Fig 1: Electrophoresis of DNA on 0.8 % Agarose Gel

# استخراج DNA مایکوباکتریوم از نمونه های بافت

## *Extraction of mycobacterial DNA from paraffin-embedded tissue*

۱۵۰ میکرو لیتر از محلول Chelex (۵ درصد) به بافتها (در حالت پارافینه و یا بیوپسی) افزوده می شود.

Add 150µl of a 5% Chelex suspension to 14µm paraffin –embedded tissue section.

برای ۱۰–۵ دقیقه نمونه ها ورتکس می گردد. نمونه ها به طور کامل باید با محلول Chelex پوشانده شوند.

Vortex thoroughly (5-10 min). The section should be completely covered with the Chelex suspension.

نمونه ها برای ۳۰ دقیقه در $^{0}C$ 100 غیر فعال می شود (در حالت بافت پارافینه، پارافین ها را به وسیله سر سوزن استریل خارج می کنیم)

Heat the mixture at 100 $^{0}C$ for 30 min. The paraffin then appears floating on the surface of the solution. Paraffin should be removed by sterile needle.

سپس به مدت ۱۰دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ و از مایع رویی آن برای PCR استفاده می شود.

The tubes are centrifuged at 14000 rpm for 10 min. Transfer the solution (beneath the paraffin), to a clean micro centrifuge tube. This solution contains chromosomal DNA and can be used for further PCR.

برای PCR از DNA غلیظ (۱۰ ng) و رقیق شده (۱:۴ ) استفاده می شود.

The PCR is run with two different dilutions of the extracted DNA; 10µl undiluted DNA and 10 µl DNA of a 1:4 dilution, in 50µl PCR mix.

# استخراج DNA مایکوباکتریوم از نمونه های بالینی (خلط و ...)

## *Extraction of mycobacterial DNA from clinical specimens (sputum & others)*

سدیمان به دست آمده بعد از مراحل هضم و آلوده زدایی، (رجوع شود به کتاب شماره ۲) به خوبی مخلوط می شوند.

Following digestion and decontamination, the sediments are removed and vertex thoroughly.

به هر ۵۰۰ µl سدیمان، 1000 µl Digestion Buffer اضافه کرده به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰°C غیر فعال می شود.

To each 500 µl of sample sediments, 1000µl of digestion buffer added and they were incubated at 80ºC for 20 min.

نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ می شود.

Centrifuge the sample at 14,000 rpm for 15 minutes

مایع رویی را دور ریخته و به سدیمان آن مقدار Digestion buffer 250 µl و 140 µl فنل اشباع اضافه و به شدت ورتکس گردد.

Discard the supernatant completely. To the sediment add 250µl of digestion buffer and 140µl of phenol.

نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ می شود.

Centrifuged the samples at 14000 g for 15 min.

مایع رویی را به میکروتیوپ جدید منتقل می کنیم و به هم حجم آن chloroform-isoamly alcohol, اضافه می کنیم.

Transfer the supernatant to a new micro-tube, and add equal amount of chloroform-isoamly alchohol.

نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ می شود.

Centrifuged the samples at 14800 rpm for 15 min.

مایع رویی را برداشته و به میکروتیوپ جدید منتقل کنید. ۱/۱۰ حجم آن سدیم استات ۳ مولار (پی. اچ=۵/۹) اضافه نمایید و سپس ۰/۷ حجم آن، محلول ایزوپروپانول سرد به آن افزوده و یک شب در $-۲۰^{o}C$ انکوبه کنید.

Transfer the supernatant into a new micro-tube. To 0.1 volume of sample add sodium acetate (3M) and to 0.7 volume of sample add cold isopropanol. The tubes were incubated at -20ºC overnight.

نمونه ها را از $-۲۰^{0}C$ در آورده و به مدت 20 دقیقه در دور 14000 rpm سانتریفیوژ می کنیم. محلول رویی را بیرون ریخته و به رسوب آن ۱ میلی لیتر از Ethanol 70% اضافه کرده و دوباره در دور 14000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. محلول رویی را بیرون ریخته و لوله را به صورت وارونه بر روی کاغذ صافی به مدت ۱۰ دقیقه می گذاریم.

Spin 20 min at 14,000 rpm. Remove most of the supernatant; leave about 20 µl above the pellet. Add 1 ml of 70% cold ethanol and centrifuge for one minute at 14000 rpm. Discard the supernatant and keep the micro tube reversely on a filter paper for 10 min.

به نمونه ها حدود 10-30µl محلول TE(1X) افزوده و در $۳۷^{o}C$ قرار می دهیم (۳ الی ۴ ساعت). سپس به $۴^{o}C$ انتقال و تا زمان آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری می شوند

Re-dissolve the pellet in the amount of 1X TE (10- 30 µl).

# استخراج ژنومیک DNA انسان از نمونه خون
## *Extraction of Human DNA from Blood Sample*

* مراحل لیز کردن گلبولهای قرمز

* Lyses of RBC Cells

به هر یک از نمونه ها، ۱۰ میلی لیتر از محلول "RBC Lysis Buffer" اضافه کرده و به آرامی لوله ها را تکان دهید. نمونه ها ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می شوند.

Add 10 ml of RBC lysis buffer and shake gently. Incubated 10 min at room temp.

نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ می گردد.

Centrifuge the samples (using cold centrifuge) at 3000 rpm for 10 min

مایع رویی را خالی کرده تا در نهایت ۳ میلی لیتر نمونه در ته لوله باقی بماند

Take out the supernatant, leave the sediments (about 3 ml)

۵ میلی لیتر محلول "RBC Lysis Buffer" را به هر یک از لوله ها اضافه کرده و به شدت vortex می کنیم تا رسوب WBC از ته لوله کنده شود.

Add 5 ml of RBC lyses buffer to each tubes. Vortex vigorously till the sediments get detached

با اضافه کردن "RBC Lyses Buffer" به هر یک از نمونه ها حجم نهایی را به ۱۵ میلی لیتر می رسانیم.

Add RBC lyses buffer to each tubes and brings the volume to 15 ml.

مراحل را تکرار می کنیم تا زمانی که مایع رویی به رنگ صورتی شفاف در آید و رسوب WBC سفید رنگ شود.

Repeat the steps.Till the supernatant become clear pink and the sediments becomes white in color.

مایع رویی را به طور کامل تخلیه می کنیم به طوری که فقط رسوب WBC در ته لوله باقی بماند.

Take out the supernatant completely, only the WBC pellet should remain in the tubes

**∗ Lyses of White Blood Cells**

∗ مراحل لیز کردن گلبولهای سفید

به هر یک از لوله های حاوی رسوب WBC مقدار 1000 میکرولیتر از محلول PBS افزوده و به شدت Vortex می نماییم.

To the sediments of WBC in each tube, add 500 µl of PBS and vortex vigorously.

به هر یک از نمونه ها مقدار ۶۰ میکرو لیتر SDS 10% و 500 میکرولیتر از SE buffer افزوده و به شدت Vortex می کنیم.

Add 60 µl of SDS (10%) and 500 µl of SE buffer. Vortex vigorously.

به هر نمونه مقدار ۱۵ میکرولیتر آنزیم Proteinase K افزوده و نمونه ها را به مدت یک دقیقه vortex می نماییم تا همگن شود.

Add 15 µl of proteinase K to each tube and vortex for 1 min until homogeneity achieved.

نمونه ها را به مدت یک شب در دمای 55 درجه سانتی گراد انکوبه می نماییم.

Incubate the samples at 65°C over night.

## * Protein separation & DNA isolation

## * جداسازی پروتئینها و استخراج DNA

نمونه ها را به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری در پیچ دار منتقل می کنیم.

Transfer the specimens in fresh micro-tubes(1.5 µl)

به هم حجم نمونه ها مخلوط فنل – کلروفرم اضافه افزوده و به شدت Vortex می کنیم تا همگن گردد.

Add equal volume of phenol –chloroform to each tube and vortex.

نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ می گردد.

The sample centrifuged at 13000 rpm for 10 min.

مایع رویی را با استفاده از سمپلر ۱۰۰ به آرامی برداشته و به میکروتیوپ دیگری منتقل می نماییم. (در این مرحله پروتیئن ها به صورت لخته سفید رنگی در بین دو فاز آلی و آبی قرار دارند، بایستی نهایت دقت را داشته باشیم تا پروتئین ها به مرحله بعدی وارد نشوند)

Take out the supernatant and transfer it to fresh micro-tubes (the protein are visible as a "white band" between water and phenol phase. This step should be performed gently. Avoid touching by tips.

دوباره به هم حجم نمونه ها، محلول کلروفرم – ایزو آمیل الکل (۲۴: ۱) افزوده و به آرامی چندین بار تکان دهید.

Add equal volume of chloroform-isoamly alchohol to each tube and turns the tubes ups and down for few seconds.

نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ می گردد.

Centrifuged at 14000 rpm for 10 min.

مایع رویی را برداشته و به میکروتیوپ جدید منتقل کنید: ۱/۱۰ حجم آن سدیم استات ۳ مولار (پی . اچ=۵/۹) اضافه نمایید. سپس ۰/۷ حجم آن محلول ایزوپروپانول سرد به آن افزوده و یک شب در $-20^{o}C$ انکوبه کنید.

Transfer the supernatant into a new micro-tube. To 0.1 volume of sample add sodium acetate (3M) and to 0.7 volume of sample add cold isopropanol. The tubes were incubated at -20ºC overnight.

نمونه ها را از $-20^{0}C$ در آورده و به مدت 20 دقیقه در دور 14000 rpm سانتریفیوژ می کنیم. محلول رویی را بیرون ریخته و به رسوب آن ۱ میلی لیتر از Ethanol 70% اضافه کرده و دوباره در دور 14000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. محلول رویی را بیرون ریخته و لوله را به صورت وارونه بر روی کاغذ صافی به مدت ۱۰ دقیقه می گذاریم.

Spin 20 min at 14,000 rpm. Remove most of the supernatant; leave about 20 µl above the pellet. Add 1 ml of 70% cold ethanol and centrifuge for one minute at 14000 rpm. Discard the supernatant and keep the micro tube reversely on a filter paper for 10 min.

به نمونه هاحدود 10–30µl از محلول TE(1 X) افزوده و در $37^{o}C$ قرار می دهیم (۳ الی ۴ ساعت). سپس به $4^{o}C$ انتقال و تا زمان آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری می شوند

Re-dissolve the pellet in the amount of 1X TE (10- 30 µl).

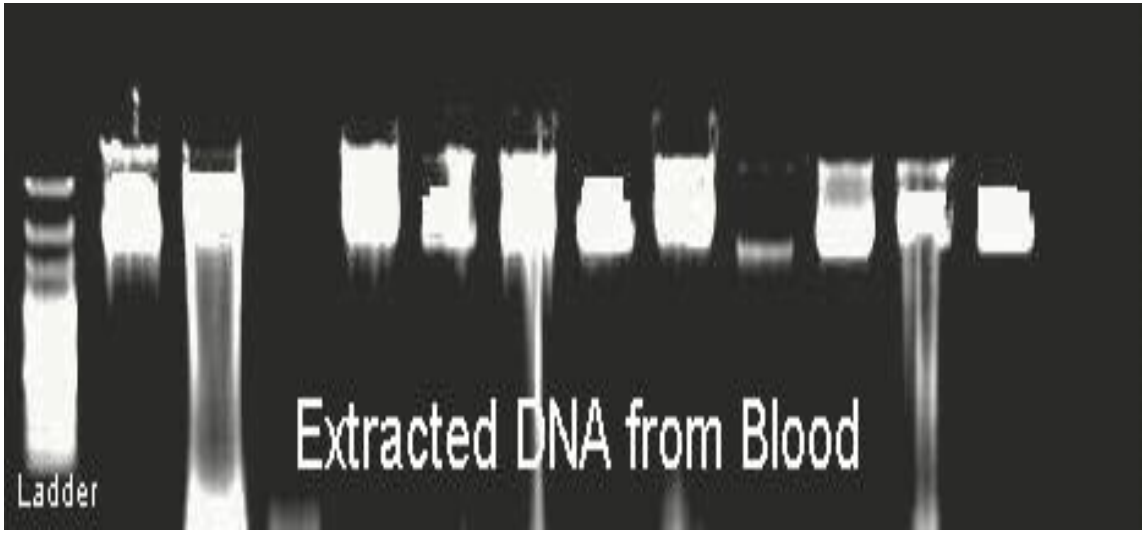



Fig 2: Extracted DNA from Blood

# ضمیمه

## *Appendix*

| Name of chemical | Formula (M.W) | Company | Catalogue No | |
|---|---|---|---|---|
| Lysozyme | Lysozyme 1000 mg | MERCK | 042 | 1 |
| Sodium dodecy sulfate (SDS) | $C_2H_{25}NAO_4$ ( 288,38 ) | MERCK | 113760 | 2 |
| Tris (hydroxyl methyl) amino methan | $H_2NC(CH_2OH)_3$ (121,14 ) | MERCK | 108382 | 3 |
| EDTA | Triplex III ( 372.24 ) | MERCK | 108421 | 4 |
| Proteinase K | (Activity : 1-3 unit / mg) | MERCK | p-8044 | 5 |
| Sodium chloride | NaCL ( 58.44 ) | MERCK | 106400 | 6 |
| Cetrimonium bromide (CTAB) | $C_{19}H_{42}BrN$ ( 364.46 ) | MERCK | 102343 | 7 |
| $NAHCO_3$ | (84. 01 ) | – | - | 8 |
| $NH_4CL$ | ( 53.49 ) | SIGMA | A5666 | 9 |
| Sodium acetate | $C_2H_3O_2Na$ (82.03) | SIGMA | S-2889 | 10 |
| Potassium chloride | KCl (74 . 56) | MERCK | Art.4953 | 11 |
| Di sodium hydrogen phosphate | $Na_2H PO_4. 2 H_2O$ (177.99) | MERCK | 106580 | 12 |
| Potassium dihydrogen phosphate | $K H_2PO_4$ ( 136.09 ) | MERCK | 104871 | 13 |
| Tris-HCl | $C_4 H_{11}NO_3 CH$(157.60 ) | MERCK | 108219 | 14 |
| Phenol | _ | Cinagen | MR 7841 C | 15 |
| Ethanol | $C_2H_5OH$( 46.79) | SIGMA | 100 983 | 16 |
| Isopropanol | $C_3 H_{80}$ ( 60.10 ) | SIGMA | 19516 | 17 |
| Isoamylalchohol | $C_5H_{120}$ (88 . 15 ) | MERCK | 979 | 18 |
| Chloroform | $CHCI_3$ (119.38 ) | MERCK | 102445 | 19 |

# References:

* D.Van Soolingen, P.E.W. De Hass, P.W.W.Hermans and J.D.A. Van Embden. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, the Netherlands.

*Roche Molecular Biochemical's .Labs FAQS .Find a Quick solution.

* Molecular Cloning .A Laboratory Manual .Third Edition .WWW. Molecular Cloning .Com J.Sambrook and D.W.Russell.

* Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabee J, Douraghei M, Ghazisaeedi K, Mansorri D, Bahadori M, Vincent V, Gutierrez C, Velayati AA .Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. J Infect. 2004 Aug; 49(2):94-10

*Farnia P, Masjedi MR, Nasiri B, Mirsaedi M, Sorooch S, Kazeampour M, Velayati AA. Instability of IS6110 patterns in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis Epidemiol Infect. 2007 Feb; 135(2):346-52

*Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, Khazampour M, Tabarsi P, Baghei P, Marjane M, Bahadori M, Zarifi AZ, Velayati AA The recent-transmission of Mycobacterium tuberculosis strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping.BMC Infect Dis. 2008 Aug 6;8:109

*Merza M, Farnia P, Anoosheh S, Varahram M, Kazampour M, Pajand O, Saeif S, Mirsaeidi M, Masjedi MR, Velayati AA, Hoffner S The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. Braz J Infect Dis. 2009 Aug; 13(4):252-6

*Merza MA, Farnia P, Salih AM, Masjedi MR, Velayati AA. The most predominant Spoligopatterns of Mycobacterium tuberculosis isolates among Iranian, Afghan-Immigrant, Pakistani and Turkish tuberculosis patients: a comparative analysis. Chemotherapy. 2010; 56(3):248-57.

Shaheed Beheshti University of Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis East Mediterranean Region

Mycobacteriology Research Center

National Research Institute Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis Laboratory IUATLD

Address: Mycobacteriology Research Centre, Iranian National Reference TB Laboratory, National Research Institute of Tuberculosis & Lung Disease (NRITLD), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Shaheed Bahonar Ave, Daarabad, P.C: 19569/44413, P.O Box: 19575/154, Tehran, Iran.
Tel: +98(21) 27122571
Fax: +98(21) 26109505
E-mail: mrc @ nritld.ac.ir, pfarnia @ nritld.ac.ir, Website: www.mrc.ac.ir