prepIT®·L2P

بروتوكول المختبر للتنقية اليدوية للحمض الريبي النووي (DNA) من عينة تبلغ 0.5 مل

لتنقية الحمض النووي الريبوزي (DNA) الجينومي من عائلات Oragene® و ORAcollect® لأدوات تجميع العينة.
للمزيد من اللغات والبروتوكولات، قم بزيارة موقعنا الإلكتروني http://www.dnagenotek.com.

يصف البروتوكول التالي طريقة تنقية DNA خطوة بخطوة في جزء يبلغ 500 ميكرولتر من العينة.

الكواشف المندرجة في البروتوكول

prepIT®.L2P (catalog #: PT-L2P)

الأجهزة والكواشف

- جهاز الطرد المركزي الدقيق القادر على العمل عند 15,000 × *g*
- أنابيب دقيقة 1.5 مل (مثل Axygen #MCT-150-C)
- حاضنات هوائية أو مائية عند 50 درجة مئوية
- الإيثانول (من 95% إلى 100%) في درجة حرارة الغرفة
- الإيثانول (70%) في درجة حرارة الغرفة
- محلول منظم لتخزين DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) أو محلول مشابه

طريقة العمل

خطوات التنقية	ملاحظات
1. اخلط العينة الموجودة في عدة DNA Genotek عن طريق القلب والرج برفق لمدة ثواني معدودة.	• هذه الخطوة لضمان الخلط الكامل للعينات اللزجة.
2. قم بتحضين العينة عند 50 درجة مئوية في حاضنة مائية لمدة ساعة واحدة كحد أدنى، أو في حاضنة هوائية لمدة ساعتين كحد أدنى. **ملاحظة:** ربما يكون استخدام الحاضنة الهوائية أفضل حيث أن أنابيب العينة قد تطفو في الحمام المائي. إذا كان من الضروري استخدام الحمام المائي، تأكد من أن جزء الأنبوبة الذي يحتوي على العينة يبقى مغمورا في الماء.	• تُعد هذه الخطوة الخاصة بالمعالجة الحرارية ضرورية لضمان تحرير DNA بشكل كافٍ، ولضمان أن يحدث تعطيل دائم لإنزيمات النوكلياز. • يمكن إجراء خطوة التحضين في أي وقت بعد جمع العينة وقبل تنقيتها. • يعد تحضين العينة الكاملة في أنبوبة التجميع الأصلية قبل تجزئتها ضرورياً لضمان تجانس العينة. • يمكن تحضين العينة عند درجة حرارة 50 درجة مئوية طوال الليل إذا كان ذلك ملائماً. • يتطلب الأمر وقتاً أطول في الحاضنة الهوائية لأن توازن درجة الحرارة يكون أبطأ في الحاضنة الهوائية عنه في الحاضنة المائية.
3. قم بنقل 500 ميكرولتر من العينة المخلوطة إلى أنبوبة الطرد المركزي الدقيق البالغ حجمها 1.5 مل.	• يمكن تخزين الجزء المتبقي من العينة عند درجة حرارة الغرفة أو تجميدها (-15 درجة مئوية إلى -20 درجة مئوية).
4. بالنسبة للعينة التي يبلغ حجمها 500 ميكرولتر، قم بإضافة 20 ميكرولتر (25/1 من الحجم) من PT-L2P إلى أنبوبة طرد مركزي دقيق ثم قم بالخلط عن طريق التدوير لثواني معدودة.	• تصبح العينة متعكرة بسبب ترسيب الشوائب والمثبطات.
5. قم بالتحضين في الثلج لمدة 10 دقائق.	• يمكن الاستبدال بالتحضين في درجة حرارة الغرفة لكن ذلك يكون أقل فعالية في إزالة الشوائب.

CE IVD

PD-PR-00234 Issue 1/2012-05
© 2012، جميع الحقوق محفوظة لشركة DNA Genotek Inc ، وهي فرع من شركة OraSure Technologies, Inc.

خطوات التنقية	ملاحظات
6. قم بفصل العينة (عن طريق عملية الطرد المركزي) لمدة 5 دقائق عند $15,000 \times g$.	• قد يكون إجراء عملية الطرد المركزي لفترة أطول (حتى 15 دقيقة) مفيداً في تقليل تعكير (ارتفاع A_{320}) محلول DNA النهائي.
7. قم بنقل الجزء الطافي بعناية باستخدام طرف الماصة إلى أنبوبة طرد مركزي دقيق جديدة. **تخلص من الكريات التي تحتوي على شوائب.**	• تحتوي الكرية على شوائب متعكرة. في حال اضطراب عارض للعينة، قم بإعادة عملية الطرد المركزي للأنبوبة.
8. قم بإضافة 600 ميكرولتر من إيثانول يكون تركيزه من 95% إلى 100% في درجة حرارة الغرفة إلى 500 ميكرولتر من الجزء الطافي. قم بالخلط برفق عن طريق القلب 10 مرات.	• أثناء الخلط مع الإيثانول يحدث ترسيب لـ DNA. قد يظهر هذا ككتلة من ألياف DNA أو كراسب دقيق، وذلك بناءً على كمية DNA في العينة. • حتى في حالة عدم ظهور كتلة، تتم استعادة DNA عن طريق اتباع الخطوات التالية بدقة.
9. اسمح للعينة بالثبات عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، وذلك للسماح بالترسيب الكامل لـ DNA.	• لا يوصى بالقيام بالتحضين عند درجة حرارة تبلغ -20 درجة مئوية بسبب إمكانية ترسب الشوائب مع DNA.
10. ضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي الدقيق في اتجاه معلوم. قم بفصل العينة في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين عند $15,000 \times g$.	• على سبيل المثال، ضع كل أنبوبة في جهاز الطرد المركزي الدقيق بحيث يشير جزء المفصّلة في الغطاء في اتجاه بعيد عن مركز الدوار. بعد انتهاء عملية الطرد المركزي يمكن تحديد موضع الكرية (حتى إذا كانت بالغة الصغر جداً لدرجة أنه لا يمكن رؤيتها بسهولة)، وتكون موجودة في طرف الأنبوبة تحت المفصّلة.
11. قم بإزالة الجزء الطافي بعناية باستخدام طرف الماصة وتخلص منه. احرص على تجنب بعثرة كريّة DNA.	• تحتوي هذه الكريّة على DNA. يؤدي فقدان الكرية إلى فقدان DNA. • إن تدوير الأنبوبة بحيث تكون الكريّة في الجدار العلوي يسمح لك بتحريك طرف الماصة بشكل آمن على امتداد الجدار السفلي وبإزالة الجزء الطافي بالكامل. • قد يحتوي الجزء الطافي على شوائب وتجب إزالته تماماً بقدر الإمكان. • قد يؤدي التجفيف المفرط للكرية إلى جعل DNA أكثر صعوبة في الذوبان.
12. الغسل بالإيثانول: أضف 250 ميكرولتر من إيثانول 70% بحرص. دعه ثابتاً عند درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة. **قم بإزالة الإيثانول بالكامل بدون بعثرة الكرية.**	• من المهم إزالة كل الإيثانول من العينة. الاحتفاظ بالإيثانول قد يؤثر على أداء المقايسة. • احرص على عدم بعثرة كريّة DNA. • قد تكون كرية DNA صغيرة. • لفصل الكرية، قم بعملية الطرد المركزي للعينة لمدة 5 دقائق عند $15,000 \times g$. • بعد إزالة الإيثانول 70% يمكن القيام بالدوران التذبذبي للأنبوبة للسماح بإزالة الإيثانول المتبقي.
13. أضف 100 ميكرولتر من محلول TE (انظر الصفحة 1) لإذابة كرية DNA. قم بالتدوير لمدة 5 ثواني على الأقل.	• إذا كان المطلوب تركيز أعلى من DNA، ينبغي إضافة 50 ميكرولتر من محلول TE. • ملاحظة: الكميات الكبيرة من DNA ذي الوزن الجزيئي العالي يمكن أن تكون بطيئة في الذوبان (الهيدرة) بشكل كامل. • تعد الهيدرة غير الكاملة لـ DNA سبب عدم الدقة في تقدير تركيز DNA، مما يؤثر سلبيا على التطبيقات الفرعية مثل PCR.
14. للتأكد من هيدرة DNA (الكريات والمسحة) تماماً قم بالتحضين عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل ثم التدوير، أو قم بالتحضين عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة مع التدوير أحيانًا.	• تعد الهيدرة غير الكاملة لـ DNA سبب عدم الدقة في تقدير تركيز DNA، كما تعد سبب فشل التطبيقات الفرعية مثل PCR.

© 2012، جميع الحقوق محفوظة لشركة DNA Genotek Inc ، وهي فرع من شركة OraSure Technologies, Inc.

خطوات التنقية	ملاحظات
15. خيارات تخزين DNA المميَّه بالكامل: a) يوصى بالتخزين في TE، أو في الأجزاء عند -20 درجة مئوية للتخزين طويل الأمد، أو b) في TE عند 4 درجات مئوية لمدة شهرين.	• تجميد DNA المنقَّى في TE يؤدي إلى ترسيب DNA. عند تذويب عينة DNA المنقَّى المتجمدة، أعر كل اهتمامك لعملية الهيدرة، كما تمت مناقشتها في الخطوة 14.

التقدير الكمي للحمض الريبي النووي (DNA)

بواسطة طريقة التفلور

التحاليل التي تستخدم الصبغات الفلورية تكون أكثر تحديداً من الامتصاص عند 260 نانومتر، وذلك عند التحديد الكمي لمقدار DNA مزدوج الشريط (dsDNA) في عينة DNA. إننا نوصي باستخدام الصبغات الفلورية مثل PicoGreen® أو SYBR® Green I في التحديد الكمي لـ dsDNA، وذلك بسبب وجود تداخل أقل بـ RNA. تم وصف البروتوكول قليل التكلفة باستخدام SYBR Green I في PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*[1]. وبدلاً من ذلك يمكن استخدام معدات متاحة تجارياً مثل عدة تحليلInvitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA (رقم الفئة Q-33130). وبالنسبة لكلا البروتوكولين، فإننا نحبذ أن يتم تخفيف DNA المنقَّى بنسبة 1:50 بواسطة محلول Tris-EDTA، كما نحبذ استخدام 5 ميكرولتر في مقايسة التقدير الكمي.

بواسطة طريقة الامتصاص

إذا اخترت القيام بالتقدير الكمي لـ DNA بواسطة طريقة الامتصاص، فإننا نوصي بأن تقوم أولاً بمعالجة العينة المنقاة باستخدام إنزيم ريبونوكلياز (Rnase) لهضم RNA المتداخل ثم إزالة أجزاء RNA عن طريق ترسيب DNA بواسطة الإيثانول. تم وصف البروتوكول المفصَّل في PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*[2]. يرجى ملاحظة أن يحتوي DNA المستخلص من عينة من الفم نموذجياً على كمية RNA أكبر من الموجودة في عينات الدم. تأكد من أن الـ DNA المرسَّب عن طريق الكحول قد تمت إذابته بالكامل قبل قراءة الامتصاص.

معامل التحويل: الامتصاص الذي يبلغ 1 عند 260 نانومتر يقابل تركيز 50 نانوجرام/ميكرولتر، وذلك بالنسبة لـ DNA مزدوج الشريط (dsDNA) النقي.

تأكد من أن قيم الامتصاص تقع في نطاق المدى الخطي لمقياس الطيف الضوئي. قم بإعادة تخفيف العينات التي تقع خارج المدى الخطي وإعادة قياسها. اطلع على وثائق الجهاز الخاص بك للحصول على مزيد من المعلومات.

الطريقة:

1. قم بتخفيف 10 ميكرولتر من الـ DNA المنقَّى والمعالج بإنزيم الريبونوكلياز (RNase-treated DNA) باستخدام 90 ميكرولتر من TE (تخفيف بنسبة 10/1). قم بالخلط عن طريق السحب لأعلى وأسفل برفق باستخدام الماصة. انتظر حتى تختفي الفقاعات.
2. استخدم محلول TE في الخلية المرجعية (الفارغة).
3. قم بقياس الامتصاص عند 320 نانومتر و280 نانومتر و260 نانومتر.
4. احسب قيم A_{280} وA_{260} المصحَّحة عن طريق طرح الامتصاص عند 320 نانومتر (A_{320}) من قيم A_{280} وA_{260}.
5. تركيز DNA بوحدة نانوغرام/ميكرولتر = القيمة المصحَّحة لـ A_{260} × 10 (معامل التخفيف) × 50 (معامل التحويل).
6. نسبة A_{260}/A_{280}: اقسم قيمة A_{260} المصحَّحة على قيمة A_{280} المصحَّحة.

© 2012، جميع الحقوق محفوظة لشركة DNA Genotek Inc ، وهي فرع من شركة OraSure Technologies, Inc.

مثال

1. افترض أن القيم المقاسة A_{320} = 0.025، A_{280} = 0.175، A_{260} = 0.295

2. سيكون تركيز DNA في العينة المخفَّفة يساوي:
(A_{260} - A_{320}) × 10 (معامل التخفيف) × 50 (معامل التحويل)
= (0.025 – 0.295) × 10 × 50
= 0.270 × 10 × 50
= 135 نانوجرام/ميكرولتر أو 135 ميكروجرام/مللي لتر

3. تكون نسبة A_{260}/A_{280} المصحَّحة:
($_{320}$A - $_{260}$A) ÷ ($_{320}$A - $_{280}$A)
= (0.025 – 0.296) ÷ (0.025 – 0.175)
= 0.15 ÷ 0.27
= 1.8

المراجع

1. DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
2. RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

الدعم الفني متوفر من الاثنين إلى الجمعة (من الساعة 9 صباحًا إلى 5 مساءً)

الهاتف المجاني (أمريكا الشمالية): 1.866.813.6354، الخيار 6
جميع الدول الأخرى: 613.723.5757، الخيار 6
البريد الإلكتروني: support@dnagenotek.com

DNA•Oragene® وDNA•ORAcollect® غير متاحان للبيع في الولايات المتحدة.
DISCOVER•Oragene® متاح لغرض البحث فقط وليس للاستخدام في الأغراض التشخيصية.
بعض منتجات DNA Genotek قد لا تكون متاحة في جميع المناطق الجغرافية.
Oragene® وprepIT وORAcollect هي علامات تجارية مسجلة لشركة DNA Genotek Inc. جميع الماركات والأسماء الأخرى الواردة هنا هي ملك لمالكيها ذوي الصلة.
جميع بروتوكولات شركة DNA Genotek والمستندات التقنية ومذكرات التطبيقات متاحة في قسم الدعم على موقعنا الإلكتروني www.dnagenotek.com.

© 2012، جميع الحقوق محفوظة لشركة DNA Genotek Inc ، وهي فرع من شركة OraSure Technologies, Inc.

دليل مرجعي سريع
بروتوكول المختبر للتنقية اليدوية للحمض الريبي النووي (DNA) من عينة تبلغ 0.5 مل

خطوات التنقية
1. اخلط العينة الموجودة في مجموعة DNA Genotek عن طريق القلب والرج برفق لمدة ثواني معدودة.
2. قم بتحضين العينة عند 50 درجة مئوية في حاضنة مائية لمدة ساعة واحدة كحد أدنى، أو في حاضنة هوائية لمدة ساعتين كحد أدنى.
3. قم بنقل 500 ميكرولتر من العينة المخلوطة إلى أنبوب الطرد المركزي الدقيق.
4. قم بإضافة 20 ميكرولتر من PT-L2P إلى أنبوبة طرد مركزي دقيق ثم قم بالخلط عن طريق التدوير لثواني معدودة.
5. قم بالتحضين في الثلج لمدة 10 دقائق.
6. قم بفصل العينة (عن طريق عملية الطرد المركزي) لمدة 5 دقائق عند $15,000 \times g$.
7. قم بنقل الجزء الطافي بعناية باستخدام طرف الماصة إلى أنبوبة طرد مركزي دقيق جديدة. **تخلص من الكريات.**
8. أضف 600 ميكرولتر من إيثانول يكون تركيزه من 95% إلى 100% عند درجة حرارة الغرفة إلى الجزء الطافي الصافي. قم بالخلط برفق عن طريق القلب 10 مرات.
9. اسمح للعينة بالثبات عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، وذلك للسماح بالترسيب الكامل لـ DNA.
10. ضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي الدقيق في اتجاه معلوم. قم بفصل العينة (عن طريق عملية الطرد المركزي) لمدة دقيقتين عند $15,000 \times g$.
11. قم بإزالة الجزء الطافي بعناية باستخدام الماصة وتخلص منه. احرص على تجنب بعثرة كرية DNA.
12. أضف 250 ميكرولتر من إيثانول 70% بحرص. دعه ثابتاً عند درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة. **قم بإزالة الإيثانول بالكامل بدون بعثرة الكرية.**
13. أضف 100 ميكرولتر من محلول TE وقم بتدوير العينة لمدة 5 ثواني على الأقل.
14. قم بالتحضين عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل، أو قم بالتحضين عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة مع التدوير أحيانًا
15. التخزين: في الأجزاء عند -20 درجة مئوية للتخزين طويل الأمد (موصى به) أو عند 4 درجات مئوية لمدة شهرين.

© 2012، جميع الحقوق محفوظة لشركة DNA Genotek Inc ، وهي فرع من شركة OraSure Technologies, Inc.