



# Plant DNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج DNA گیاهی:

|                 | 4 preps sample  | 25 preps sample | 50 preps sample | 100 preps sample |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| PP1 Buffer      | 2 ml            | 12 ml           | 25 ml           | 50 ml            |
| PP2 Buffer      | 2 ml            | 12 ml           | 25 ml           | 50 ml            |
| PP3 Buffer      | 2 ml            | 13 ml           | 25 ml           | 50 ml            |
| PW1 Buffer      | 300 $\mu$ l x 3 | 4.2 ml          | 8.5 ml          | 8.5 ml x 2       |
| PW2 Buffer      | 350 $\mu$ l     | 2 ml            | 4 ml            | 8 ml             |
| PE Buffer       | 1.5 ml          | 2.5 ml          | 10 ml           | 20 ml            |
| Proteinase K    | 2 mg            | 10 mg           | 20 mg           | 20 mg x 2        |
| Spin Column     | 4 pcs           | 25 pcs          | 50 pcs          | 50 pcs x 2       |
| Collection Tube | 4 pcs           | 25 pcs          | 50 pcs          | 50 pcs x 2       |

\* آماده سازی بافر PW1 و PW2 و محلول پروتئیناز K قبل از اولین استفاده:

|                               | 4 preps sample | 25 preps sample | 50 preps sample | 100 preps sample |
|-------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Ethanol volume for PW1 Buffer | 1.7 ml x 3     | 26 ml           | 51.5 ml         | 51.5 ml x 2      |
| Ethanol volume for PW2 Buffer | 2 ml           | 13 ml           | 26 ml           | 52 ml            |
| proteinase K Solution volume  | 100 $\mu$ l    | 500 $\mu$ l     | 1 ml            | 1 ml x 2         |

قبل از اولین استفاده:

در کیت های ۲۵ عددی

- مقدار ۲۶ میلی لیتر اتانول مطلق به محلول PW1 و ۱۳ میلی لیتر به محلول PW2 اضافه کنید و سپس برچسب روی ظرف ها را علامت گذاری کنید.
- قبل از اولین استفاده ویال حاوی پروتئیناز K را فیوژ کرده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K یا ۵۰۰ میکرولیتر از ddH<sub>2</sub>O را به ویال حاوی پروتئیناز K اضافه کنید و سپس به آرامی ویال را ورتکس کنید تا محلول به خوبی حل گردد.

در کیت های ۵۰ عددی

- مقدار ۵۱/۵ میلی لیتر اتانول مطلق به محلول PW1 و ۲۶ میلی لیتر به محلول PW2 اضافه کنید و سپس برچسب روی ظرف ها را علامت گذاری کنید.
- قبل از اولین استفاده ۱ میلی لیتر از محلول پروتئیناز K یا ۱ میلی لیتر از ddH<sub>2</sub>O را به ویال حاوی پروتئیناز K اضافه کنید و سپس به آرامی ویال را ورتکس کنید تا محلول به خوبی حل گردد.

## نکات مهم:

- I. ویال پروتئیناز K را در دمای °C ۲۰- نگهداری کنید. قبل از اولین استفاده حجم مورد نیاز محلول پروتئیناز K را به ویال پروتئیناز K اضافه کنید، سپس ورتکس کرده و مطمئن شوید که پروتئیناز K کاملاً حل شده است.
- II. حجم مورد نیاز اتانول مطلق را در اولین استفاده به بافر PW1 و بافر PW2 اضافه کنید.
- III. قبل از شروع استخراج، انکوباسیون یا حمام آب را تا دمای °C ۶۰ گرم کنید.
- IV. قبل از شروع استخراج، در صورت مشاهده ی رسوب در محلول PP1، آن را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

## روش استخراج:

۱. ۴۵۰ میکرولیتر از محلول PP1 را به میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه کنید.
  ۲. مقداری بافت گیاهی داخل هاون ریخته و کامل خرد کنید یا مقداری بافت گیاه را داخل فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع قرار داده ، سپس داخل هاون کاملاً پودر کنید. اگر بافت مورد نظر خشک باشد ۲۰-۴۰ میلی گرم یا اگر بافت تازه باشد ۸۰-۱۰۰ میلی گرم برداشته و داخل میکروتیوب ۲ میلی لیتری که از قبل محلول PP1 به آن اضافه شده، بریزید ( توجه داشته باشید که از ریختن مستقیم ازت مایع روی بافت مورد نظر بپرهیزید).
  ۳. میکروتیوب را چند بار سروته کرده و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.
  ۴. ۴۵۰ میکرولیتر از محلول PP2 را به میکروتیوب اضافه کرده، ورتکس کنید، سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه کرده، به خوبی ورتکس کنید. محلول حاصله را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید. ( در طی انکوباسیون، میکروتیوب هر چند دقیقه یکبار به آرامی تکان داده شود تا لیز سلولی به خوبی صورت گیرد).
  ۵. پس از انکوباسیون، میکروتیوب را در سانتریفیوژ با سرعت  $14000\text{ rpm}$  به مدت ۵ دقیقه قرار دهید.
  ۶. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی را به آرامی برداشته و به میکروتیوب ۲ میلی لیتری دیگری منتقل کنید.
  ۷. روی محلول حاصله، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PP3 بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
  ۸. مقدار ۵۵۰ میکرولیتر اتانول مطلق روی محلول حاصله بریزید، سپس میکروتیوب را به مدت چند ثانیه سر و ته کرده و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید و پس از آن به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
  ۹. پس از سانتریفیوژ، مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته، سپس باقیمانده ی محلول حاصله را در دو مرحله به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید، سپس دوباره در سانتریفیوژ با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه قرار دهید.
  ۱۰. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ستون را مجدداً در تیوب جمع کننده قرار دهید و از محلول PW1 به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۲ دقیقه با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
  ۱۱. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PW1 به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۲ دقیقه با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
  ۱۲. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PW2 به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۲ دقیقه با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
  ۱۳. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته، ستون را مجدداً در تیوب جمع کننده قرار دهید و بدون اضافه نمودن هیچ گونه محلولی آن را با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۴۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
  ۱۴. ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید و به مقدار ۳۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PE به آرامی به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
  ۱۵. تیوب را به مدت ۲ دقیقه با سرعت  $\text{rpm}$  ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید، سپس ستون را دور انداخته و مایع جمع شده در میکروتیوب را که حاوی DNA است در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه ی سانتیگراد نگهداری کنید.
- توجه: برای حذف مقادیر احتمالی RNA ، ۴ میکرولیتر آنزیم RNase A با غلظت  $10\text{ mg/ml}$  ( از اجزای کیت نمی باشد) را در مرحله ۴ قبل از اضافه کردن پروتئیناز K اضافه کنید و چند ثانیه ورتکس کرده، سپس بقیه مراحل را ادامه دهید