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

انگشت نگاری مایکوباکتریوم

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
Mycobacterium Tuberculosis
Mycobacteriology Research Center (MRC)

Dr. P. Farnia	**دکتر پریسا فرنیا**
M. Ahmadi	**مجتبی احمدی**
M. Doraghi	**معصومه دورقی**
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: 4)

عنوان و نام پدیدآور	انگشت نگاری مایکوباکتریوم = Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Mycobacterium Tuberculosis، (/ 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	: ۷۲ ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	۵۰۰۰۰ ریال: 978-600-5069-04-1
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: نویسندگان پریسا فرنیا، مجتبی احمدی، معصومه دورقی، موید آغالی میرزا، محمد ورهرام، محمد رضا مسجدی، علی اکبر ولایتی.
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: مایکوباکتریوم سل -- دستنامه های آزمایشگاهی
موضوع	: مایکوباکتریوم سل -- شناسایی
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 ۲ م/QR۸۲
رده بندی دیویی	: ۵۷۹/۳۷۴
شماره کتابشناسی ملی	: ۲۱۶۸۳۸۳

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

انگشت نگاری مایکوباکتریوم

مولفین: دکتر پریسا فرنیا، مجتبی احمدی، معصومه دورقی، 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: ۵۰۰۰۰ ریال تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

لیتوگرافی، چاپ و صحافی: سازمان چاپ و انتشارات

ISBN: 978-600-5069-04-1

Contence

فهرست

Materials & Instruments	7	۷	وسایل و تجهیزات مورد نیاز
Stock Solutions & Buffers	9	۹	محلولها و بافرهای مورد نیاز
Digestion of DNA	29	۲۹	هضم DNA
Southern-Blotting	37	۳۷	ساترن – بلوتینگ
Preparation of DNA probe by PCR	49	۴۹	تهیه DNA پروب با PCR
Hybridization & Detection	55	۵۵	هیبریداسیون وتشخیص
Appendix & References	67	۶۷	رفرانس

وسایل و تجهیزات مورد نیاز
Materials & instruments

* Micro tubes (0.5, 1.5 & 2 ml)
* 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
* Hybridization incubator
* Seal apparatus
* Thermocycler
* Polaroid equipment
* UV-Transilluminator
* Spectro-photometer RNA/DNA Calculator

* میکروتیوپهای 0.5,1.5 ,2 میلی لیتری
* سمپلر متغیر (۱۰–۱۰۰ ، ۱۰۰–۱۰۰۰) و سر سمپلر (۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰)
* دستکش ، ماسک و گان یک بار مصرف
* سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۴۵۰۰
* میکروسانتریفیوژ (با دور rpm ۱۴۰۰۰–۱۲۰۰۰)
* ورتکس یا شیکر
* بن ماری یا انکوباتور (۶۵ و ۳۷ درجه)
* فریزر ۲۰-
* وسایل الکتروفورز
* سطل قابل اتوکلاو
* دستگاه هیبریداسیون
* دستگاه پرس
* دستگاه ترموسایکلر
* دستگاه ظهور فیلم های رادیولوژی
* دستگاه U.V
* دستگاه اسپکتوفتومتر

بافر و محلولهای مورد نیاز
Stock Solution & Buffers

* بافر یک مولار تریس

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 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

* *1M 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

* بافر نیم مولار Na_2EDTA

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 برسانید. محلول بعد از اتوکلاو در دمای اتاق تا یک ماه قابل استفاده می باشد.

* *0.5 M Na2 EDTA*

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

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

Divide into aliquots and sterilize by autoclaving.

The disodium salt of EDTA will only solute when the PH of the solution is adjusted to 8.0 by the addition of NaOH.

*** بافر TE (1 X TE -1 liter)**

۱۰ سی سی از محلول یک مولار تریس (PH 8.0,7.6 or 7.4) و ۲ سی سی از محلول Na2EDTA (۰/۵M) را در ۸۰۰ سی سی آب مقطر حل نمایید. حجم محلول را به ۱۰۰۰ سی سی برسانید.

**** 1 X TE -1 litter***

Add 10 ml 1 M 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 H_2O. Sterilize by autoclaving .Store at room temperature.

*** محلول ۳ مولار سدیم استات**

مقدار ۴۰۸/۲۴ گرم سدیم استات (NaOAc-3 H2O, M.W= 136.08) را در ۸۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید. پی .اچ آن را به ۵/۲ بـا glacial acetic acid و یا با dilute acetic acid به پی.اچ ۷ برسانید. سپس با افزودن آب مقطر محلول را به ۱۰۰۰ برسانید.

**** 3M NaOAc***

Dissolve 408.24 g sodium acetate-3H2O (NaOAc-3H2O, MW-136.08) in 800 ml H2O. Adjust to PH 5.2 with glacial acetic acid or to PH 7.0 with diluted acetic acid.
Adjust volume to 1 liter with H2O. Sterilize by autoclaving and store at room temperature.

* بافر 10 X TBE

مقدار ۱۰۸ گرم Tris را به همراه ۵۵ گرم Boric acid در ۹۰۰ سی سی آب مقطر استریل حل کنید. به آن مقدار ۴۰ میلی لیتر از محلول 0.5 M Na2 EDTA با پی.اچ هشت اضافه نموده و حجم آن را به یک لیتر برسانید. محلول فوق بعد از اتوکلاو در دمای اتاق قابل نگهداری می باشد.

* 10 X TBE buffer

Dissolve 108 g Tris and 55 g Boric acid in 900 H_2O. Add 40 ml 0.5M Na_2EDTA (PH 8.0) and adjust volume to 1 liter with H_2O. Store at room Temperature.

* بافر 50 X TAE

مقدار ۲۴۲ گرم تریس را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. سپس ۱۰۰ سی سی از محلول 0.5 M Na_2EDTA (PH 8.0) و ۵۷/۱ سی سی glacial acetic acid به آن بیافزایید. حجم محلول را به یک لیتر برسانید.

* 50 X TAE

Dissolve 242 g tris in 500 ml H_2O. Add 100 ml 0.5 M Na_2EDTA (PH 8.0) and 57.1 ml glacial acetic acid. Adjust volume to 1 liter with H_2O. Store at room temperature.

* **اتیدیوم بروماید (۵۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر)**

ابتدا ۵۰ میلی گرم اتیدیوم بروماید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. این محلول در ۴ درجه سانتی گراد، (دور از نور) قابل نگهداری برای مدت یک سال می باشد. برای به دست آوردن غلظت ۰/۵ میکرو گرم در میلی لیتر نسبت یک به ۱۰۰۰ رقیق کنید (0.5µg/ml).

* ***Ethidium bromide (500µg/ml)***

Dissolve 50 mg ethidium bromide in 100 ml distilled water. Store at 4^0C in a dark bottle for no longer than one year. Dilute stock 1:1000 to achieve working concentration of 0.5 µg / ml.

* **loading buffer**

مقادیر ۰/۰۵ گرم برمو فنل بلو، ۰/۰۵ گرم گزیلن سیانول، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۰/۱۸۶ گرم Na_2 EDTA را با هم مخلوط و حجم آن را با بافر TBE به ۱۰ میلی لیتر برسانید.

* ***Loading Buffer***

Dissolve 0.05 gram of bromophenol blue , 0.05 gram xylene cyanol , 0.186 gram Na_2 EDTA in 5 ml glycerol and bring the volume to 10 ml with TBE buffer.

* محلول آگاروز ۰/۸ درصد

ابتدا ۰/۸گرم آگاروز را وزن کرده و در یک بشر ۲۰۰ میکرولیتری منتقل و به آن ۱۰۰ میلی لیتر از بافر TBE or TE (1X) اضافه کنید. بشر را در ماکرو ویو و یا روی شعله مستقیم گاز گذاشته تا بجوشد و آگاروز موجود در آن کاملا حل شود. وقتی دمای بشر به ۶۵ درجه سانتی گراد رسید، ۱۰۰ میکرولیتر از اتیدیوم بروماید به محلول اضافه و به آرامی با دست تکان داده تا اتیدیوم بروماید در سطح محلول پخش شود. محلول آگاروز و اتیدیوم بروماید را به آرامی درون قالب ژل ریخته و اجازه دهید تا سفت شود.

* *Agarose Gel Preparation (0.8%)*

Weigh out 0.8 gram agarose powder and transfer to 200 ML bottle. Then add 100 ml of TE or TBE (1X) buffer. Dissolve the agarose by heating in a microwave. Swirl to ensure that all agarose is completely dissolved. Once the temperature of agarose reached 65^0C, add 100 µl of ethidium bromide. Swirl and pour the gel immediately in the tray. Let it solidify.

* محلول 20 X SSC

مقدار ۱۷۵/۳ گـرم از NaCL (NaCL, M.W= 58.44) و مقـدار ۸۸/۲ گـرم از Na-citrate (Na-citrate, M.W=294.1) را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. پی . اچ محلول را توسط 5 M NaCL به هفت برسانید. برای تهیه محلول 2X SSC، یک حجم از 20 X SSC به ۹ حجم آب اضافه نمایید. برای تهیه 5X SSC، یک حجم از 20 X SSC را به ۳ حجم آب اضافه نمایید.

* *20 X SSC solution*

Dissolve 175.3 g of NaCL (NaCL M.W= 58.44) and 88.2 gram of Na-citrate (Na-citrate M.W=294.1) in 1000 ml of D.W. Bring the PH into 7.0 using 5M NaCL. For 2 X SSC, add 1 volume of 20 X SSC to 9 volumes of D.W. For 5X SSC, add 1 volume of 20 X SSC to 3 volume of D.W.

* محلول HCL یک مولار

۹۱۴/۵ میلی لیتر آب مقطر در یک ظرف ۱۰۰۰ میلی لیتر ریخته و بعد با یک استوانه مدرج مقدار ۸۲/۵ میلی لیتر HCl ۳۷٪ بـه آب مقطـر بیافزایید. برای تهیه 0.25 M HCL، مقدار ۱۲۵ میلی لیتر از محلول 1 M HCL را در ۳۷۵ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.

* *1 M HCL*

Prepare 1 M HCL by adding 85.5 ml concentrated HCL (37%, Merck .P.a) to 914.5 ml water. Store at room temp for no longer than 6 months. Prepare 0.25 M HCL directly for use by adding 125 ml 1 M HCL in 375 Ml D.W

* محلول 0.4 M NaOH

ابتداد ۱۶۰ گرم NaOH را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید. این محلول 4 M NaOH می باشد. برای به دست آوردن محلول 0.4 M NaOH ، ۱۰۰ سی سی از محلول 4 M NaOH را در ۹۰۰ سی سی آب مقطر اضافه نمایید.

* 0.4 M NaOH

Prepare 4 M NaOH by dissolving 160 g NaOH in 1000 ml of D.W. Store at room temperature for no longer than 3 months. Prepare 0.4 M NaOH directly for use by adding 100 ml 4M NaOH in 900 ml D.W.

* بافر 10 X SSPE

مقدار ۱۷/۸ گرم از Na_2 HPO_4 (Na_2HPO_4 -7H20 M.W= 268.1)، ۱۰۵/۱۲ گرم از NaCL (NaCL M.W= 58.44) و ۳/۷گرم از Na_2 EDTA (Na_2 EDTA-2 H2O,M.W=372.24) را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و پی.اچ آن را به ۷/۴ برسانید. بعد از اتوکلاو، محلول فوق تا یک سال در درجه حرارت اتاق قابل نگهداری می باشد.

* 10 X SSPE

Dissolve 17.8 gram of Na_2 HPO_4 (Na_2HPO_4 -7$H_2$0 M.W= 268.1), 105.12 gram of NaCL (NaCL M.W= 58.44), and 3.7 gram of Na_2 EDTA (Na_2 EDTA-2 H2O, M.W=372.24) in 1000 ml of D.W. The PH should be 7.4. Autoclave. Store at room temperature for no longer than one year.

∗ بافر شستشوی اولیه برای Detection

مقدار ۴ گرم از SDS و ۳۶۰ گرم از Urea به همراه ۲۵ میلی لیتر از بافر 20XSSC را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید. این بافر را نباید اتوکلاو کنید و بهتر است قبل از استفاده آن را تهیه نمایید. محلول باید از فیلتر ۰/۲ میلی متر عبور کرده و در دمای اتاق تا یک سال قابل نگهداری باشد.

∗ Primary wash buffer

Dissolve 360 gram urea, 4 gram SDS, and 25 ml of 20 X SSC in to 1000 ml D.W. Do not autoclave. Either make just before use or sterilize by filtrating through 0.2 mm filter and store at room temp for no longer than one year.

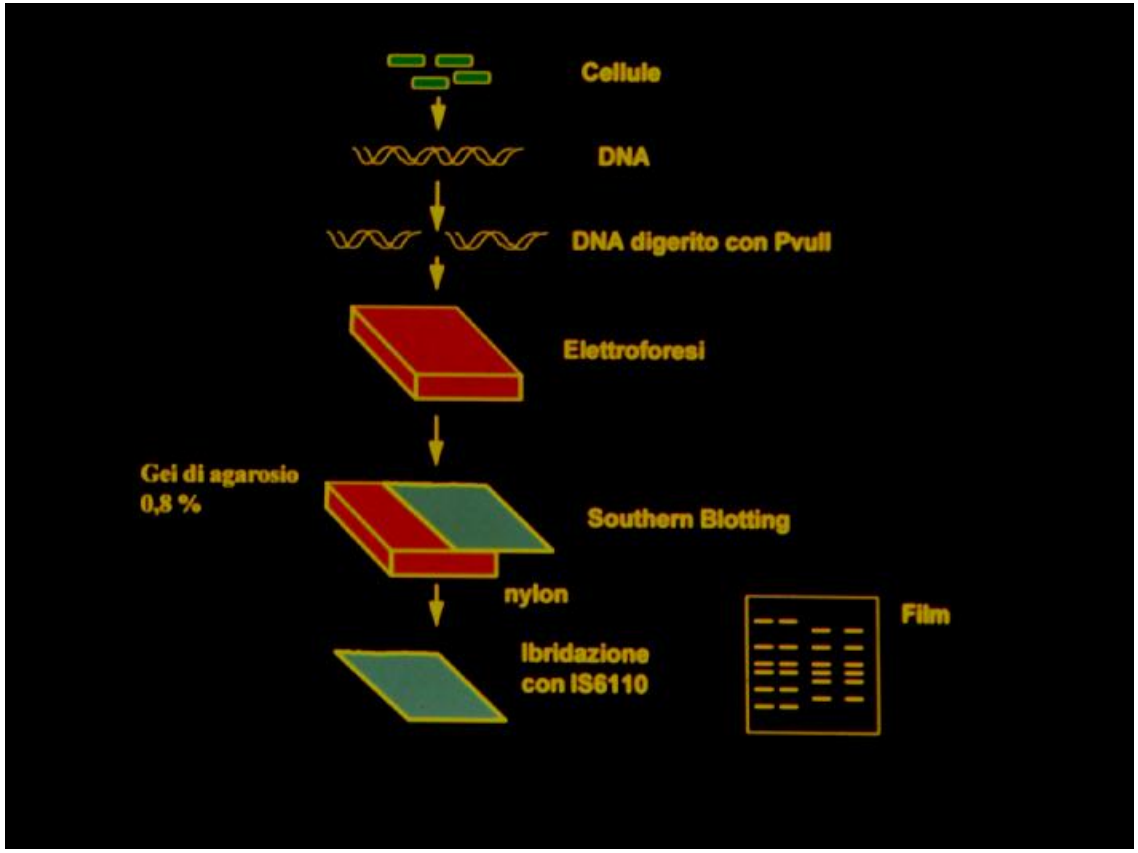
∗ بافر شستشوی ثانویه برای Detection

یک حجم از محلول 20 X SSC را در ۹ حجم آب مقطر بیافزایید.

∗ Secondary wash buffer. (20 X SSC)

One value of 20 X SSC adds to 9 ml D.W.

Overall- RFLP Procedure



هضم DNA
Digestion of DNA

* تخمین مقدار DNA استخراج شده

برای تخمین می توان از رنگ آمیزی اتیدیوم برماید و یا از دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده نمود.

برای تعیین غلظت DNA بوسیله رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ابتدا ژل آگارز ۰/۸ درصد را تهیه و بعد از سفت شدن، در تانک الکتروفورز قرار دهید. تانک را از بافری که در ساخت ژل به کار برده شده (1XTBE) پر کنید. یک یا دو میکرولیتر از DNA های استخراج شده را با کمک سمپلر در داخل هر چاهک قرار دهید. در تانک الکتروفورز را بسته، هدایتگر الکتریکی را با ولتاژ ۸۵ به مدت ۱۵ دقیقه برقرار کنید. بعد از این مراحل، مخزن برق را قطع کرده، ژل را برداشته و روی ترانس لومینیتور با استفاده از اشعه UV، مقدار DNA موجود برای هر نمونه را تخمین بزنید. (عکس ۱)

* *Estimation of DNA Concentration*

DNA concentration can be performed by staining DNA with ethidium bromide, after short electrophoresis or by using spectrophotometer.
The quality and the approximate concentration of extracted DNA were estimated before digestion by staining of DNA with ethidium bromide, after short electrophoresis (15 minutes at 85 V) on 0.8% agorase gel. (Fig 1)

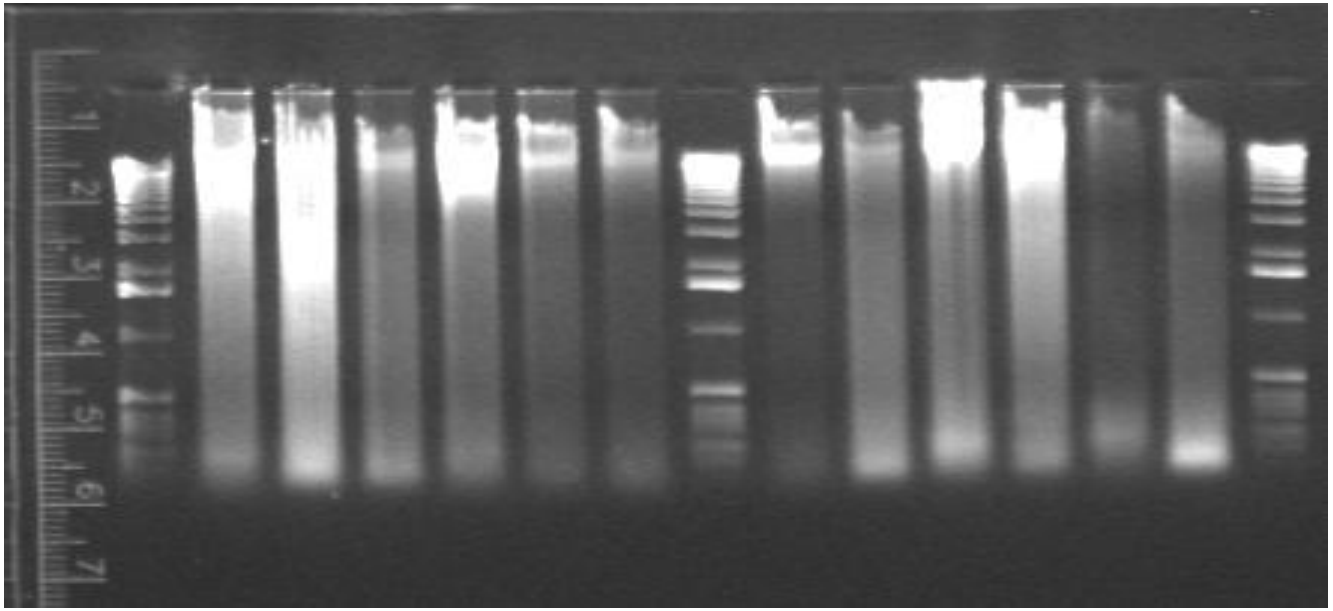


Fig 1: DNA of Mycobacterium

* Digestion of DNA

DNA of mycobacteria digested using PVUII restriction endonuclease that cleaves IS6110 once. Always prepare the mix in the following order: water, restriction buffer, DNA and enzyme. (Fig 2)

Add 1 µl of enzyme, 3 µl of enzyme buffer, 5 µl of DNA, and bring the volume to 20-25 µl with D.W (depending on DNA concentration). The Mix incubated in 37^0C for 18-24 hours.

Load samples (about 2 µl) on 1% agarose in 1x TBE buffer, in order to give an idea about digestion of the samples. (Electrophoresis at 100 voltages for 20 minutes). (Fig 3)

If the DNA were digested completely, then prepare a big gel and load the whole digested samples in to each wells and run the gel overnight with voltage 25-30. (Fig 4)
Always include $H_{37}R_V$ in gel, because it serves as an external marker for computer analysis. (Fig 3)

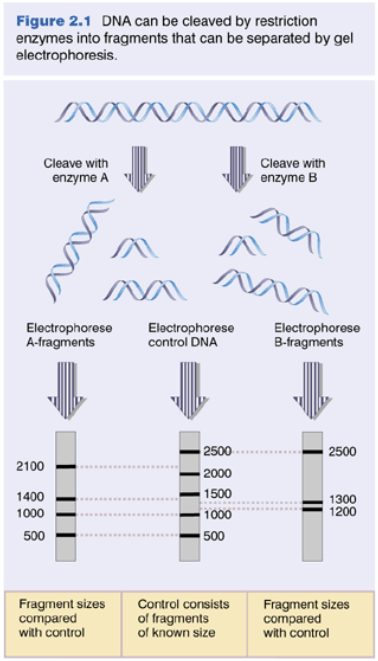
* هضم DNA

برای هضم DNA از آنزیم PVUII استفاده می کنیم. باید به خاطر داشت که همواره برای تهیه میکس ترتیب زیر رعایت شود:

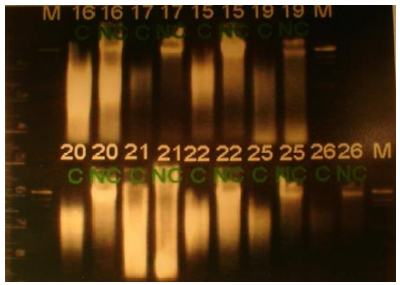
آب، بافر، DNA و آنزیم. (عکس ۲)

معمولا برای هضم مقدار ۱ میکرولیتر آنزیم، ۳ میکرولیتر بافر، ۵ میکرولیتر DNA (اگر غلظت آن مناسب باشد) و حجم کلی آن را با آب مقطر به ۲۵–۲۰ می رسانیم. میکس فوق را برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور گذاشته و سپس برای اطمینان از هضم نمونه، آنها را بوسیله رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ مشاهده می کنیم.

در صورتی که نمونه ها خوب هضم شده بود کل نمو نه هضم شده را روی ژل بزرگ که برای ساترن – بلوتینگ استفاده خواهد شد منتقل کرده و برای ۲۴–۱۸ ساعت در ولتاژ ۳۰–۲۵ الکتروفوز می نماییم. که با این کار قطعات هضم شده DNA از هم به خوبی جدا می شوند. همیشه در ژل بزرگ، از نمونه استاندار H37RV استفاده نمایید. (عکس ۳ و ۴)

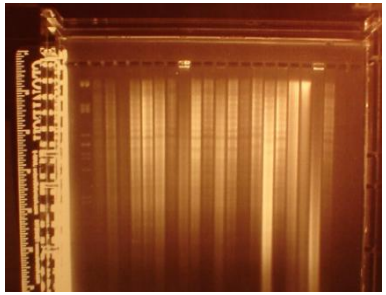


بررسی هضم یا عدم هضم
DNA
بعد از الکتروفورز کوتاه



DNA digested after short electrophoresis

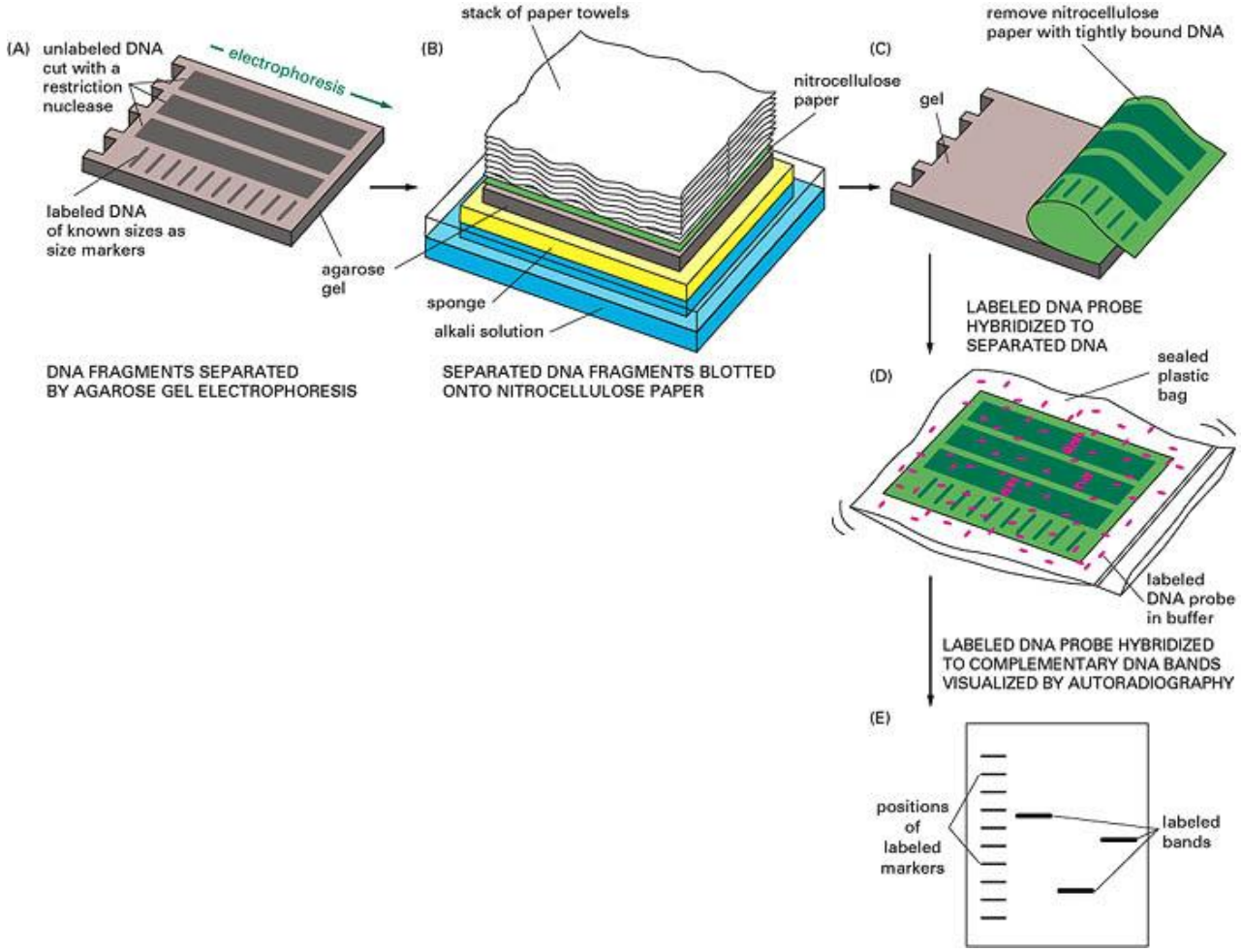
ژل ساترن بلاتینگ
بعد از ۲۴ساعت الکتروفورز
نمونه های هضم



DNA digested after long electrophoresis

مراحل شماتیک ساترن – بلوتینگ

Southern-Blotting Overview



ساترن – بلوتینگ
Southern-Blotting

* مرحله Depurination

ابتدا ژل را از ظرف اصلی آن خارج و به پلیت مخصوص شستشو انتقال دهید. ۵۰۰ میلی لیتر محلول HCL ۲۵ درصد که کار آن برداشت پورین از DNA است به روی ژل بریزید. ژل را در محلول بر روی شیکر به مدت ۱۰ دقیقه قراردهید. سپس ژل را در آب مقطر فرو برده و آن را به مدت ۱–۳ دقیقه شستشو دهید. این مرحله را ۲ بار تکرار کنید.

* *Depurination step*

Place the gel with its tray for 10 min in 500 ml 0.25 M HCL. Rinse the gel with distilled water. The whole step repeats once more.

* مرحله Denaturation

برای Denaturation (که کار آن هیدرولیز اسکلت فسفو دی استر در محلولهای فاقد پورین است)، ۵۰۰ میلی لیتر از محلول 0.4 M NaOH به ژل اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه، ژل را به آرامی شیک کنید. (محلول باید روی ژل را بپوشاند)
بعد از ۱۵ دقیقه محلول رویی ژل را دور ریخته، و با استفاده از آب مقطر آن را شستشو دهید. مجددا مرحله اول را تکرار کنید ولی در بار دوم شستشو به مدت ۲۰ دقیقه انجام می شود. ژل را با آب مقطر بشویید. بعد از این مراحل ژل برای انتقال آماده می باشد.

* *Denaturation step*

Place for 15 min in 500 ml (0.4 M NaOH) in shaker. Rinse the gel with distilled water.
Fill the tray with 0.4 M NaOH and put in shaker for 20 minutes. Rinse the gel with distilled water. At this stage the gel is ready for transfer.

* انتقال با روش کپلری (capillary)

پایه ای که ژل روی آن قرار می گرفت را به طور وارنـه درون تشـت پلاسـتیکی قـرار دهیـد. ایـن ظـرف حـاوی بـافر قلیـایی مـی باشـد. (0.4N NaOH with 1M NaCL) ابتدا یک کاغذ صافی را روی پایه جوری قرار دهید که دو طرف طول ان در داخل تشت قرار گیـرد. ژل را روی این کاغذ برگردانده (در طول این مرحله و مراحل شستشو باید به طور کامل مواظب بود که ژل آسیب نبینـد). روی ژل را غشـاء Hybond N+ که به اندازه ژل بریده شده قرار دهید. سپس چند عدد کاغذ واتمن روی غشاء قرار داده و بعـد از آن، چنـدین لایـه کاغـذ خشک کن برای جذب بهتر روی هم قرار دهید. دور ژل را با پارافیلم بندید. در این صورت جذب فقط از سطح ژل انجام می گیـرد. در آخـر صفحه مسطح شیشه ای/ پلاستیکی روی لایه های کاغذ خشک کن قرار دهید و با قرار دادن یک وزنه بر روی صفحه شیشه ای فشار بین لایه ها را فزایش دهید(مانند شکل زیر). یک انتقال کامل ۱۸ تا ۲۴ ساعت طول می کشد.

* *Blotting by capillary method*

Place a gel-holder upside down in a plastic tray. Fill the dish with Alkaline buffer (0.4N NaOH with 1M NaCL). Cut the Whatman filter paper exactly the same size of the gel. Place it on gel-holder in a way that the side of the paper floated into plastic tray that has been filed with alkaline buffer. Place the gel on gel-holder and cover it with wet nylon membrane (Wet the paper with D.W for 5 minutes and then soak in 0.4 N NaOH). Cover all 4 sides of the filter with parafilm. Place 6 thin Whatman papers followed by 6 thick Whatman papers on the filter. To improve the capillary transfer, the gel was compressed by placing 4 to 5 kg weight on the top of the blotting tower. The complete transfer was occurred in 18-24 hours. (Fig 5)

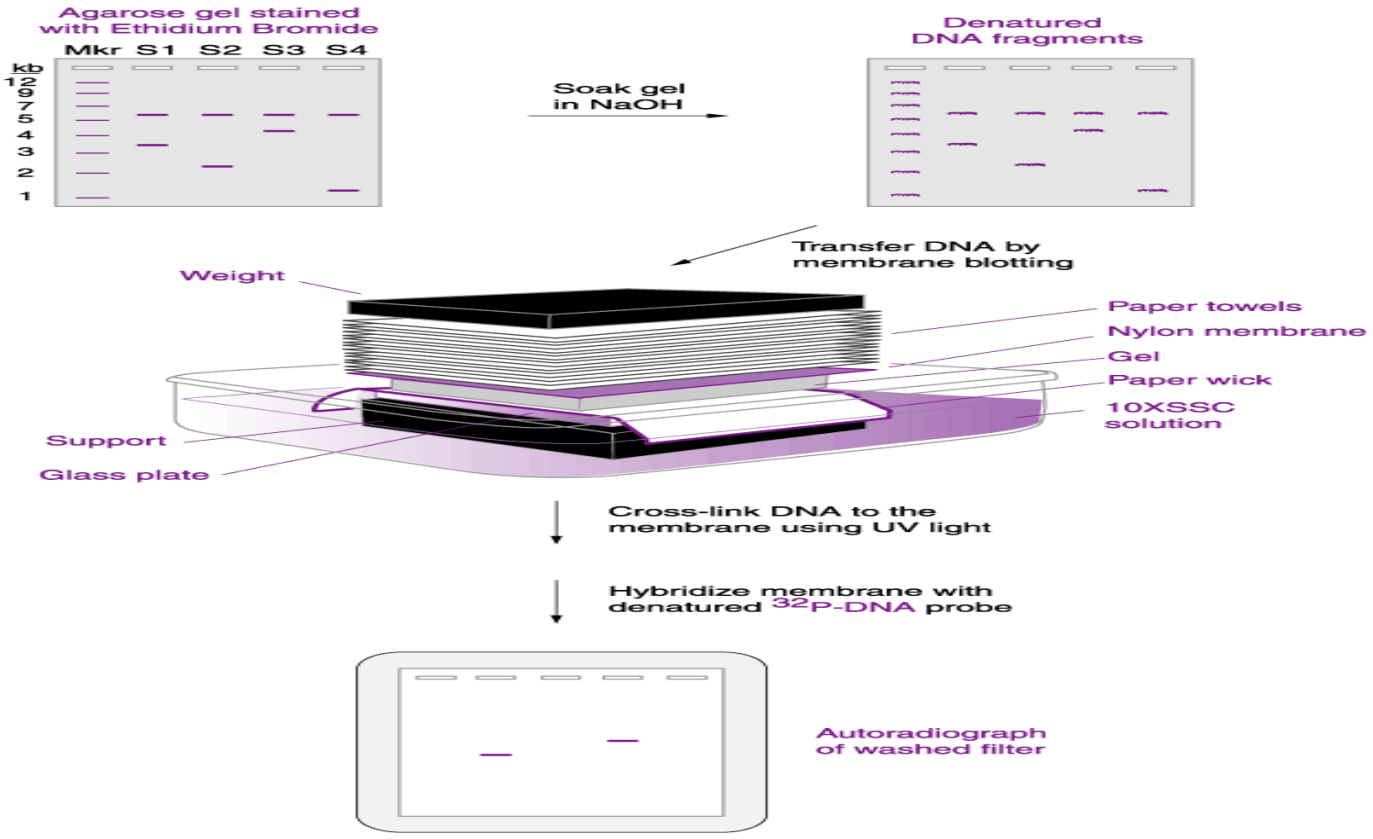


Fig 5: Blotting by Capillary Method

ساترن – بلوتینگ
Southern-Blotting

*** شستشوی غشاء Hybond N+ بعد از blotting**

ابتدا غشا را در محلول Tris solution برای مدت ۱۵ دقیقه شسته و سپس در سلفون پیچیده و برای ۵ دقیقه با نور U.V فیکس می کنیم.

**** Treatment of the membrane after blotting by capillary***

After the completion of transfer, the membrane washed by Tris- solution for 15 min. Then, it wrapped up by cellophane plastic sheet and fixed using UV trans- illuminator for 5 min.

پرایمرهای پروب
Primer for Probe Preparation

* ***Primers name: INS1***

Oligo sequence: A: 5′-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3′

Delivered: 27.1 OD (765.7µg, 122.7 nmol) Conce: 100.0µM
MW: 6239 Tm: 67 Synthesis Scale: 0.2 No.Bases: 20 GC%: 70.0
Dissolve in: 1227 µl .D.W

* ***Primers name: INS2***

Oligo sequence: B: 5′-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3′
Delivered: 25.0 OD (680.3µg, 109.6 nmol) Conce: 100.0µM
MW: 6207 Tm: 63.0 Synthesis Scale: 0.2 No.Bases: 20 GC%: 60.0
Dissolve in: 1096 µl .D.W

تهیه DNA پروب با PCR

Preparation of DNA probe by PCR

dNTP: 1 µl (0.2 mM)
INS 1:1 µl (20 pmol)
INS 2: 1 µl (20 pmol)
DNA Template: 2.5 µl (50-100)

Mgcl2: 1. 5 µl (1. 5 mM)
PCR Buffer: 5 µl (1×)
Enzyme (taq):0.25 µl (1.25 U)

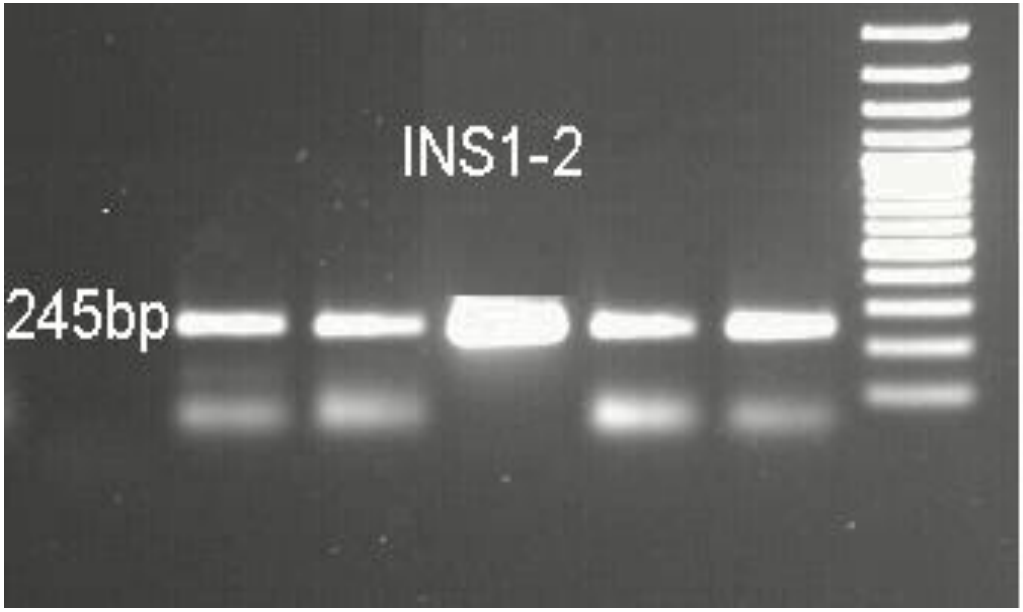
* ***PCR Cycle:***

Initial denaturation 6 min 94°c			
30 Cycles	Step1 Step 2 Step 3	1 min 1 min 1 min	94 ˚C 61.5 ˚C 72 ˚C
Final extension 10 min 72 ˚C			

The PCR products can be examined by electrophoresis and staining with ethidium bromide. The PCR fragments should be 245 bp in length using primer INS-1 and INS-2.

* *Purification of the PCR product:*

For this step use the Quick Spin Sephadex G50 column (as instructed by manufacturer) or any other PCR-product purification kit.



تشخیص و ردیابی
Detection& Labeling

* تشخیص و ردیابی

این سیستم به طور مستقیم DNA شناساگر را با آنزیم پراکسیداز نشان دار می کند.
این عمل با دناتوره کردن کامل شناساگر صورت می گیرد، به طوری که شناساگر حاصل شده تک رشته ای می باشد و بار منفی دارد. سپس آنزیم پراکسیداز که همراه یک پلی مر با بار مثبت است، اضافه می شود. در نتیجه یک اتصال سست با DNA بوجود می آید.
افزودن گلوتارآلدئید منجر به تشکیل اتصالات عرضی می شود به طوری که شناساگر به طور کووالان بـه آنـزیم متصـل مـی شـود. پـس از نشاندار شدن شناساگر، این محلول برای هیبرید شدن با DNA هدفی که روی غشاء است، بکار می رود.
آنزیم پراکسیداز اکسیداسیون سوبسترای لومینول را کاتالیز می کند که این سوبسترا در حضور یک تقویت کننده شیمیایی باعـث ایجـاد نـور می گردد که روی فیلم ردیابی می شود.

* *Detection& Labeling*

The system involves direct labeling of DNA probe with the enzyme horseradish peroxidase (HRP). This is achieved by completely denaturing the probe so that it is single-stranded and therefore negatively charged. HRP, which has been complexes with a positively charged polymer, is added and it forms a loose attachment to the DNA by charge attraction.
Addition of glutaraldehyde causes the formation of chemical cross-links so that probe is covalently bound to the enzyme. Once labeled, the probe is used in hybridization with target DNA immobilized on a membrane. HRP catalyses the oxidation of the substrate luminal which, in the presence of a chemical enhancer, results in a large and sustained light emission, that is readily detected on film.

هیبریداسیون وتشخیص
Hybridization & Detection (continuation)

*** هیبریداسیون و ردیابی شامل ٤ مرحله است:**

- نشاندار کردن شناساگر
- هیبریداسیون
- شستشوی غشا پس از هیبریداسیون
- ردیابی

**** Hybridization and Detection include four stages (using ECL detection system):***

- Labeling of the probe
- Hybridization
- Washing the membrane N+ after hybridization
- Detection

شناساگر (۱۰µl) را با آب (۱۰µl) رقیق نمایید.

Dilute the probe (10µl) with water (10 µl).

شناساگر را به مدت ۵ دقیقه با قرار دادن در آب جوش دناتوره نمایید. بلافاصله در یخ به مدت ۱ دقیقه قرار دهید.

Denature the probe for 5 min by placing it in a boiling water bath. Chill on ice immediately for one min.

مخلوط شناساگر را چند ثانیه در میکروسانتریفوژ قرار دهید، سپس هم حجم شناساگر معرف نشاندار را بیفزایید. (با دقت مخلوط نمایید.)

Spin the probe-mixture a few seconds in a micro-centrifuge and add an equal volume DNA labeling reagent. Mix well by carefully pipetting.

هم حجم مخلوط، گلوتارآلدئید بیفزایید و با دقت مخلوط نمایید.

Add the same volume glutaraldehyde. Mix well by carefully pipetting.

به مدت یک ثانیه به خوبی مخلوط نمایید و در میکروسانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ قرار دهید، سپس ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.
Vortex carefully for 1 sec; then spin the solution a few seconds in a micro-centrifuge at 12,000 rpm and incubate for 10 min at 37°C.

غشاء را در درون لوله مخصوص هیبریداسیون به همراه بافر هیبریداسیون قرار دهید تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، آماده هیبرید گردد.
Pre-hybridize the filter in a roller bottle for 15 min at 42°C in hybridization buffer.

بافر هیبریداسیون را به همراه شناساگر نشاندار شده به لوله مخصوص هیبریداسیون بیفزایید.
Pour the hybridization buffer in a bottle adds the labeled probe to the buffer, mix well and pour the buffer-probe mix in the bottle.

عمل هیبریداسیون در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انجام می گیرد.
Hybridize overnight at 42°C under rolling.

ردیابی
Detection

ابتدا بافر شستشوی اولیه را در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد گرم نمایید.
Prewarm the primary wash buffer to 42°C.

محلول هیبریداسیون را دور بریزید و بافر شستشوی اولیه را به غشاء بیفزایید. این مرحله را دو بار انجام دهید.
First discard the hybridization solution and add the primary wash buffer to the roller. Repeat this stage twice.

غشاء را در یک ظرف پلاستیکی تمیز قرار دهید.
Place the filter in a clean plastic box.

۵۰۰ میلی لیتر از بافر شستشوی ثانویه را به غشاء افزوده و غشاء را به مدت ۵ دقیقه در حال تکان دادن شستشو دهید. این مرحله را دو بار انجام دهید.
Add 500 ml secondary wash buffer to the filter and wash the filter for 5 min at room temp on a shaking platform. Repeat this stage twice.

ابتدا از وجود تمام وسایل مورد نیاز در اتاق تاریک اطمینان حاصل نمایید.
Make sure that all equipment is available because the work in the darkroom should not be interrupted.

غشاء را از بافر شستشوی ثانویه خارج نموده و در یک ظرف پلاستیکی تمیز قرار دهید.
Bring the filter from the secondary wash buffer in a clean plastic box.

محلول ردیابی را روی غشاء بریزید. ظرف حاوی غشاء و معرف ردیابی را دقیقاً ۱ دقیقه بطور یکنواخت تکان دهید.
Pour the detection mix directly on the blot on the DNA-side. Spread it evenly by rotating the box for exactly 1 min.

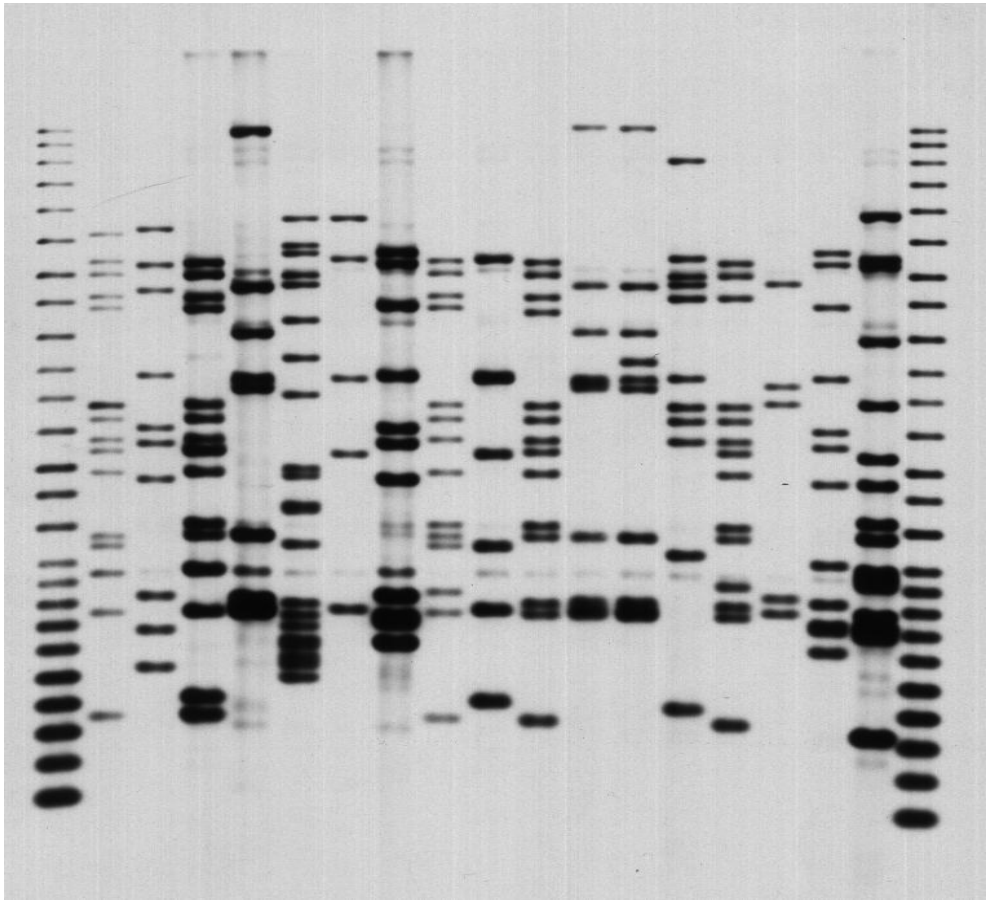
غشاء را در درون پلاستیک قرار دهید؛ سپس پلاستیک حاوی غشاء را در کاست قرار دهید.
Warp the filter with the carrier in plastic and place it in a cassette with the DNA side on top.

غشاء را از ظرف حاوی معرف خارج نمایید و درون کاست فیلم قرار دهید.
Take the filter from the box, drain and bring it onto a carrier.

فیلم را از جعبه در اتاق تاریک خارج نمایید و روی غشاء قرار دهید.
Take a film from the package and fold one of the corners of the film. Place the film on the filter with the folded corner on the right top of the filter.

کاست را به مدت ۱ دقیقه ببندید.
Close the cassette for exactly one min.

فیلم را داخل دستگاه رادیولوژی قرار دهید.
Place the film in the radiology machine.



References:

∗ Van Soolingen D, De Haas PE, Hermans PW, Van Embden JD. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. Methods Enzymol. 1994; 235:196-205. Review.

∗ Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden J. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex species: a reliable tool for recognizing Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol. 1992 Jul; 30(7):1772-7.

∗ Van Embden JD, Van Soolingen D, Small PM, Hermans PW. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. Res Microbiol. 1992 May; 143(4):385-91. Review. No abstract available.

∗ Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, et al. 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

∗ Ramazanzadeh R, Farnia P, Amirmozafari N, et al.Comparison between molecular epidemiology, geographical regions and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from Iranian and Afghan patients. Chemotherapy. 2006; 52(6):316-20. Epub 2006 Sep 27

∗ Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. J Infect. 2006 Nov; 53(5):331-6. Epub 2006 Feb 1

∗ Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. J Infect. 2004 Aug; 49(2):94-101

∗ Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates from Iran.

∗ Van Soolingen D, Hermans PW, De Haas PE, Soll DR, Van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991 Nov; 29(11):2578-86

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