

Blood RNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج RNA خون:

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
BR1 Buffer	2 ml	15ml	30 ml
BR2 Buffer	600 μ l	7.5 ml	15 ml
PW1 Buffer	300 μ l x 2	6 ml	6 ml x 2
PW2 Buffer	350 μ l	4 ml	8 ml
PE Buffer	1.5 ml	5 ml	10 ml
Proteinase K	2 mg	20 mg	20 mg x 2
Spin Column	4 pcs	50 pcs	50 pcs x 2
Collection Tube	4 pcs	50 pcs	50 pcs x 2

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

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
Ethanol volume for PW1 Buffer	1.7 ml x 2	34 ml	34 ml x 2
Ethanol volume for PW2 Buffer	2 ml	26 ml	52 ml
proteinase K Solution volume	100 μ l	1 ml	1 ml x 2

قبل از اولین استفاده:

در کیت های ۴ عددی

- مقدار ۱/۷ میلی لیتر اتانول مطلق به محلول PW1 و ۲ 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 فیوز کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K یا ۱۰۰ میکرولیتر از ddH₂O 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 ۳۴ 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 ddH₂O را به ویال حاوی پروتئیناز K اضافه کنید و سپس به آرامی ویال را ورتکس کنید تا محلول به خوبی حل گردد.

نکات مهم:

- 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.
- حجم مورد نیاز اتانول مطلق را در اولین استفاده به بافر PW1 و بافر PW2 اضافه کنید.
- قبل از شروع استخراج، انکوباسیون یا حمام آب را تا دمای °C ۳۰ گرم کنید.
- قبل از شروع استخراج، اتانول ۷۰ درصد در دمای اتاق ذخیره کنید. (توجه کنید که اتانول ۷۰ درصد را از اتانول مطلق تهیه کنید).
- قبل از شروع استخراج، در صورت مشاهده ی رسوب در محلول های BR1 و BR2 محلول ها را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

روش استخراج:

۱. ۲۰۰ میکرولیتر از بافی کوت و یا ۳۰۰ میکرولیتر خون کامل را به میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل کنید.
۲. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول BR1 را به میکروتیوب اضافه کنید.
۳. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به محلول اضافه کرده و به مدت ۱ ثانیه ورتکس کنید. سپس مخلوط حاصله را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 30°C انکوبه کنید. (در طی انکوباسیون، میکروتیوب هر چند دقیقه یکبار به آرامی تکان داده شود تا لیز سلولی به خوبی صورت گیرد).
۴. پس از اتمام انکوباسیون، روی محلول حاصله ۱۵۰ میکرولیتر از محلول BR2 بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۵. ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد روی محلول حاصله بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۶. محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید سپس به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید.
۷. پس از سانتریفیوژ، مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته، ستون را مجدداً در تیوب جمع کننده قرار دهید و از محلول PW1 به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به ستون اضافه کنید سپس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۸. 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 ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۹. 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 به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید.
۱۰. ستون را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید و به مقدار ۳۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر PE به آرامی به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۱۱. تیوب را به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید، سپس ستون را دور انداخته و مایع جمع شده در میکروتیوب را که حاوی RNA است در دمای -20°C درجه ی سانتیگراد نگهداری کنید.