

Tissue RNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج RNA بافت:

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
TR1 Buffer	2 ml	20 ml	40 ml
TR2 Buffer	600 µl	8 ml	16 ml
PW1 Buffer	300 µl x 2	6 ml	6 ml x 2
PW2 Buffer	350 µl	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 µl	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 فیوژ 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 ۶۰، سپس °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).

۷. قبل از شروع استخراج، در صورت مشاهده ی رسوب در محلول های TR1 و TR2 ، محلول ها را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

روش استخراج:

۱. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول TR1 به میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه کنید.
۲. مقداری بافت را داخل فویل آلومینیومی استریل قرار داده و با تیغ استریل به قطعات ریز خرد کرده و در هاون له کنید و یا بافت را داخل فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع قرار داده سپس در هاون له کنید. ۳۰-۲۰ میلی گرم بافت را به میکروتیوب حاوی محلول TR1 اضافه کنید، میکروتیوب را چند بار سروته کنید (ورتکس نکنید).
۳. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به مخلوط اضافه کرده و میکروتیوب را چندین بار سر و ته کنید. مخلوط حاصله را به مدت ۱ دقیقه در دمای °C ۶۰، سپس ۲۵ دقیقه در دمای °C ۳۰ 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 انکوباسیون، مخلوط حاصله را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۵. محلول رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کرده و روی محلول حاصله، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول TR2 بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۶. ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به محلول حاصله اضافه کرده و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۷. محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید، سپس به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۸. پس از سانتریفیوژ، 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 کرده و آن را به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۹. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PW2 را به ستون اضافه کرده و آن را به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۱۰. 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 به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.
۱۱. ستون را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید، به مقدار ۳۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از PE را به آرامی به مرکز ستون اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۱۲. 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 °C ۲۰- نگهداری کنید.