

FFPE RNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج RNA بافت پافینه:

	4 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
PDT	4 ml	50 ml	100 ml
PTR1 Buffer	2.2 ml	28 ml	55 ml
PTR2 Buffer	320 µl	4 ml	8 ml
PTR3 Buffer	800 µl	10 ml	20 ml
PW1 Buffer	300 µl x 2	6 ml	6 ml x 2
PW2 Buffer	350 µl	4 ml	8 ml
PE Buffer	1.5ml	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 بر چسب 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 کرده 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 بر چسب 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 ۵۵، °C ۶۰، °C ۸۵ و °C ۹۰ 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 PTR1 و PTR2 محلول ها را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

روش پارافین زدایی:

۱. ابتدا ۸۰ الی ۱۰۰ میلی گرم از بافت پارافینه را به لایه های خیلی نازک خرد کرده و به میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل کنید. سپس مقدار ۱ میلی لیتر کلروفرم به میکروتیوب حاوی بافت پارافینه اضافه کنید و در دمای 55°C به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید.
۲. پس از اتمام انکوباسیون، محلول را با سمپلر خارج کرده و دوباره ۱ میلی لیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه کنید و در دمای 55°C به مدت ۲ دقیقه انکوبه کنید.
۳. پس از اتمام انکوباسیون، محلول را با سمپلر خارج کرده و سپس میکروتیوب را ۲ دقیقه در دمای محیط با در باز زیر هود لامینار قرار دهید تا باقیمانده های کلروفرم تبخیر شود.
۴. ۱ میلی لیتر اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه کرده و کاملاً ورتکس کنید، سپس اتانول را با سمپلر خارج کنید.
۵. ۱ میلی لیتر اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه کرده و کاملاً ورتکس کنید، سپس اتانول را با سمپلر خارج کرده و میکروتیوب را ۵ دقیقه با در باز در دمای محیط قرار دهید تا باقیمانده های اتانول تبخیر شده و میکروتیوب کاملاً خشک شود.
۶. ۱ میلی لیتر از محلول PDT به میکروتیوب اضافه کرده و در دمای 90°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید.
۷. پس از اتمام انکوباسیون، به مدت ۲ دقیقه با سرعت 14000 rpm سانتریفیوژ کنید، سپس محلول را با سمپلر خارج کرده و مراحل استخراج را انجام دهید.

روش استخراج:

۱. ۵۵۰ میکرولیتر از محلول PTR1 و ۸۰ میکرولیتر از محلول PTR2 به میکروتیوب حاوی بافت اضافه کرده و چند ثانیه ورتکس کنید.
۲. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به محلول اضافه کرده و میکروتیوب را به مدت ۱۰ ثانیه کاملاً ورتکس کنید. مخلوط حاصله را به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 60°C ، سپس ۱۵ دقیقه در دمای 85°C انکوبه کنید (در طی انکوباسیون، میکروتیوب هر چند دقیقه یکبار به آرامی تکان داده شود تا لیز سلولی به خوبی صورت گیرد).
۳. پس از اتمام انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول PTR3 را به میکروتیوب اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت 14000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۴. محلول رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کرده و روی محلول حاصله ۱ میلی لیتر از اتانول ۷۰ درصد بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۵. محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد، در دو مرحله منتقل کنید و به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت 8000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۶. 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 ۶۰۰ میکرولیتر به ستون اضافه کرده و آن را به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت 4000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۷. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ۴۰۰ میکرولیتر از محلول PW2 را به ستون اضافه کنید و آن را به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت 4000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۸. مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته و ستون را مجدداً در تیوب جمع کننده قرار دهید و بدون اضافه نمودن هیچ گونه محلولی آن را با سرعت 14000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
۹. ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید و 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.
۱۰. تیوب را به مدت ۲ دقیقه با سرعت 13000 rpm سانتریفیوژ کنید، سپس ستون را دور انداخته و مایع جمع شده در میکروتیوب را که حاوی RNA است در دمای -20°C درجه سانتیگراد نگهداری کنید.