



Plant RNA Isolation Kit

محتویات کیت استخراج RNA گیاهی:

	4 preps sample	25 preps sample	50 preps sample	100 preps sample
PR1 Buffer	2.6 ml	17 ml	35 ml	70 ml
PR2 Buffer	800 μ l	5 ml	10 ml	20 ml
PR3 Buffer	600 μ l	4 ml	8 ml	15 ml
PW1 Buffer	300 μ l x 3	4.2 ml	8.5 ml	8.5 ml x 2
PW2 Buffer	350 μ 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 μ l	500 μ 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 فیوز کرده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K یا ۵۰۰ 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 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 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 و °C ۶۰ 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 PR1، آن را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه در دمای °C ۶۰ قرار دهید تا رسوبات حل شوند.

روش استخراج:

۱. ۶۵۰ میکرولیتر از محلول PR1 را به میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه کنید.
۲. مقداری بافت گیاهی داخل هاون استریل 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 بافر لیزکننده 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 چند ثانیه ورتکس کنید.
۴. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول PR2 را به میکروتیوب اضافه کرده، ورتکس کنید. سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه کرده، به خوبی ورتکس نمایید. مخلوط حاصله را به مدت ۲ دقیقه در دمای 60°C ، سپس ۲۵ 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).
۵. پس از انکوباسیون، میکروتیوب را در سانتریفیوژ با سرعت 14000 rpm به مدت ۵ دقیقه قرار دهید.
۶. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی را به آرامی برداشته و به میکروتیوب ۲ میلی لیتری دیگر منتقل کنید.
۷. روی محلول حاصله، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول PR3 بریزید و به آرامی میکروتیوب را سر و ته کنید.
۸. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد روی محلول حاصله بریزید، سپس میکروتیوب را به مدت چند ثانیه سر و ته کرده و 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 10000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۹. پس از سانتریفیوژ، مایع جمع شده در تیوب جمع کننده را دور ریخته، سپس باقیمانده ی محلول حاصله را به ستون جداسازی که در داخل تیوب جمع کننده قرار دارد منتقل کنید، سپس دوباره در سانتریفیوژ با سرعت 10000 rpm 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 ۱ دقیقه با سرعت 10000 rpm 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 ۱ دقیقه با سرعت 10000 rpm 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 ۱ دقیقه با سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۱۳. 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.
۱۴. ستون را به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید و به مقدار ۳۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از PE به آرامی به مرکز ستون اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۱۵. 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 - نگهداری کنید.