



ARAMESH BIO GENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Total RNA Isolation Kit

مقدمه:

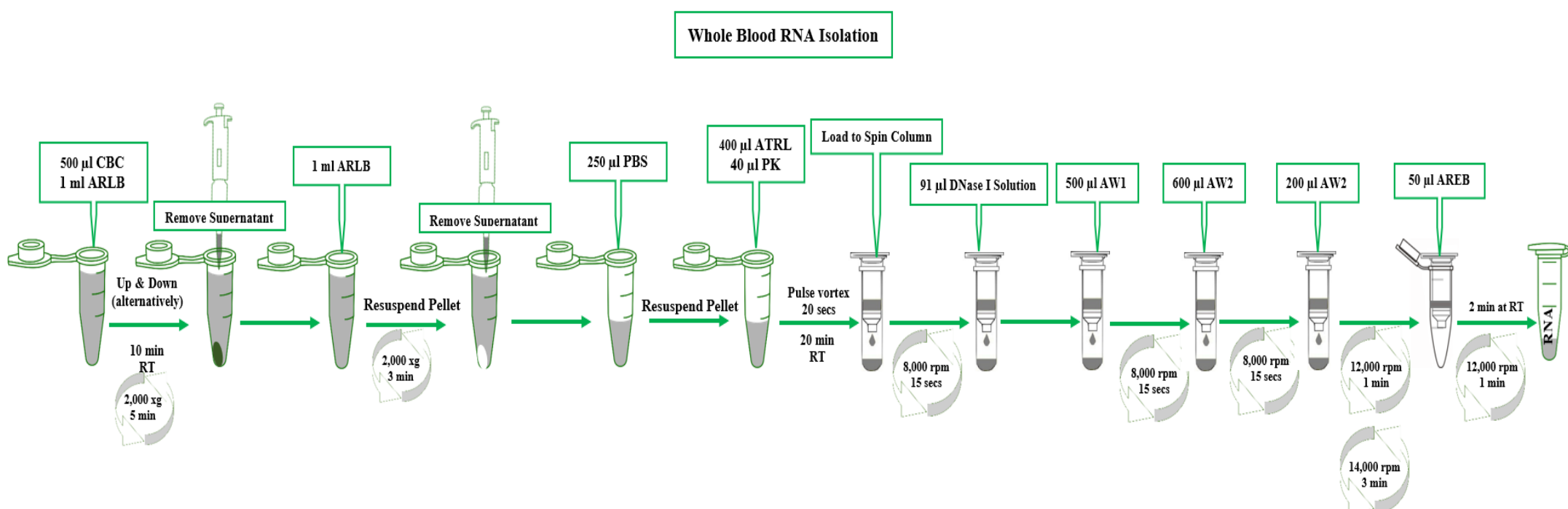
کیت Aramesh Bio Gene Total RNA Isolation به منظور استخراج سریع و آسان RNA از خون کامل، بافی کوت، کشت سلول، بافت، ویروس‌ها، باکتری‌ها و غیره بر اساس تکنولوژی سیلیکا طراحی شده است. به طور اختصار با استفاده از بافرهای اختصاصی لیز RBC و بافت، بافر ATRL و آنزیم P.K، تخلیص RNA از نمونه‌های بیولوژیکی انجام می‌شود. با انجام دو مرحله شستشو، آلودگی‌ها حذف شده و با افزودن بافر AREB، Total RNA از ستون رها می‌شود. RNA تخلیص شده دارای معیارهای با کیفیت بالا است و آماده استفاده برای کاربردهای بعدی خواهد بود.

شرایط استفاده و نگهداری:

Proteinase K (PK) را در مقادیر مناسب توزیع نموده و در دمای -20°C نگهداری نمایید.

مراحل انجام استخراج از خون کامل (CBC):

- ۱- قبل از شروع تست، ویال‌های حاوی نمونه را از یخچال و یا فریزر خارج کرده تا به دمای محیط برسند و یکنواخت نمایید.
- ۲- $500\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید.
- ۳- 1 ml از ARLB را به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه نمایید. سپس نمونه و ARLB را up & down نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند (از ورتکس کردن مواد خودداری نمایید).
- ۴- در دمای اتاق به مدت 10 دقیقه انکوبه نموده و متناوباً نمونه را در فواصل زمانی کوتاه، up & down نمایید.
- ۵- میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت 5 دقیقه در $2,000\text{ xg}$ سانتریفیوژ نمایید.
- ❖ توجه: به منظور از دست ندادن pellet، میکروتیوب را در سانتریفیوژ به صورتی قرار دهید که قسمت لولا (hinge) به سمت بیرون قرار بگیرد. در این حالت، pellet در راستای لولا میکروتیوب قرار گرفته و با خارج کردن سوپرناتانت، رسوب از بین نمی‌رود.
- ۶- سوپرناتانت قرمز را به آرامی و کامل خارج نموده و 1 ml از ARLB را به رسوب سفید اضافه کنید. سپس با تکان دادن میکروتیوب، pellet را در ARLB به طور کامل حل کنید (از ورتکس کردن مواد خودداری نمایید).
- ۷- میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت 3 دقیقه در $2,000\text{ xg}$ سانتریفیوژ نمایید.
- ۸- سوپرناتانت قرمز را به آرامی و کامل خارج نمایید (ممکن است یک حلقه قرمز از گلبول‌های قرمز در اطراف ناحیه رسوب سفید باقی‌مانده باشد). رسوب سفید را در $250\text{ }\mu\text{l}$ از PBS حل کنید.
- ۹- $400\text{ }\mu\text{l}$ از ATRL و $40\text{ }\mu\text{l}$ از P.K را به میکروتیوب اضافه کرده، 20 ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند و 20 دقیقه در RT انکوبه کنید. (از مخلوط کردن همزمان PK و ATRL خودداری کنید). سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.
- ۱۰- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و 15 ثانیه در $8,000\text{ rpm}$ سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کنید.
- ۱۱- $500\text{ }\mu\text{l}$ از محلول AW1 را به ستون اضافه کرده و در دور $8,000\text{ rpm}$ به مدت 15 ثانیه آن را شستشو دهید.
- ۱۲- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن $600\text{ }\mu\text{l}$ از محلول AW2 در دور $8,000\text{ rpm}$ به مدت 15 ثانیه شستشو دهید.
- ۱۳- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و و با اضافه کردن $200\text{ }\mu\text{l}$ از محلول AW2 در دور $12,000\text{ rpm}$ به مدت 1 دقیقه شستشو دهید.
- ۱۴- در دور $14,000\text{ rpm}$ به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج شود.
- ۱۵- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و $50\text{ }\mu\text{l}$ از AREB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را 2 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت 1 دقیقه در $12,000\text{ rpm}$ سانتریفیوژ کنید.
- ۱۶- RNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در -20°C و یا ترجیحاً در -80°C نگهداری نمایید.





ARAMESH BIO GENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Total RNA Isolation Kit

استخراج از Cell lines:

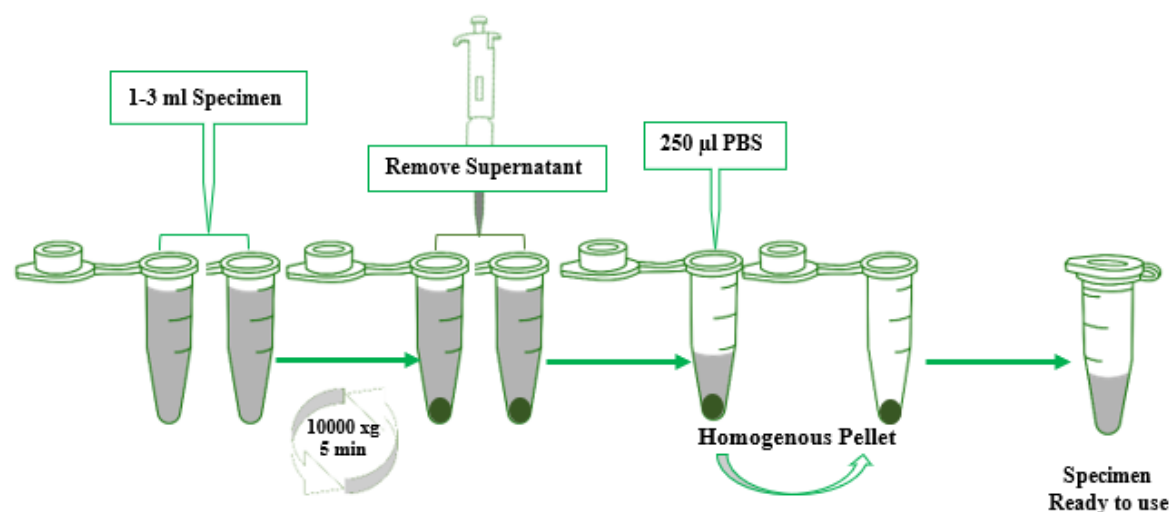
آماده سازی نمونه (Cell lines)

- ۱- مقدار 1-3 ml از نمونه را به ۲-۱ میکروتیوب 1.5 ml، منتقل نموده و به مدت ۵ دقیقه در دور 10,000 xg سانتریفیوژ نمایید و سوپرناتانت را به طور کامل خارج کنید تا Pellet سلولی حاصل شود.
- ۲- 250 µl از PBS استریل به نمونه اضافه نموده و Pellet سلولی را پیپت نموده تا یکنواخت شود.
- توجه:** در صورتی که تهیه Pellet سلولی از نمونه در دو میکروتیوب انجام گرفته است، PBS را در یکی از میکروتیوب‌ها ریخته و پس از پیپتینگ، محتویات را با Pellet سلولی میکروتیوب دیگر مخلوط نموده و سپس سانتریفیوژ نمایید.

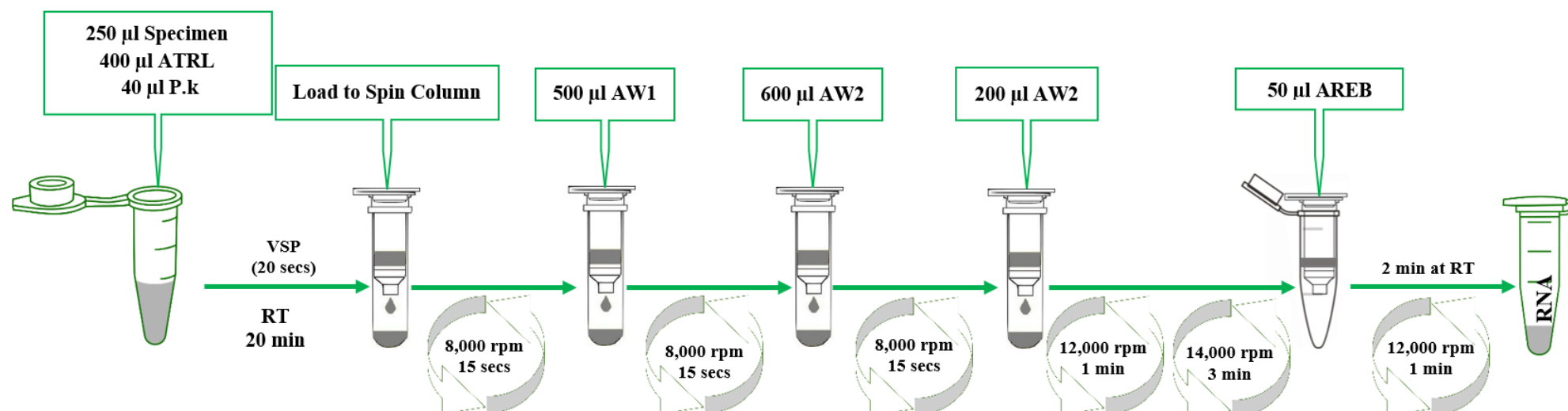
مراحل استخراج:

- ۱- 400 µl از ATRL و 40 µl از P.K را به میکروتیوب حاوی 250 µl نمونه اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند و ۲۰ دقیقه در RT انکوبه کنید. (از مخلوط کردن همزمان PK و ATRL خودداری کنید). سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.
- ۲- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۱۵ ثانیه در 8,000 rpm سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کنید.
- ۳- 500 µl از محلول AW1 را به ستون اضافه کرده و در دور 8,000 rpm به مدت ۱۵ ثانیه آن را شستشو دهید.
- ۴- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 8,000 rpm به مدت ۱۵ ثانیه شستشو دهید.
- ۵- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.
- ۶- در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج شود.
- ۷- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از AREB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفیوژ کنید.
- ۸- RNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در ۲۰°C- و یا ترجیحاً در ۸۰°C- نگهداری نمایید.

Cell line Specimen Preparation



Total RNA Isolation





ARAMESH BIOGENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

Quick Guide

Total RNA Isolation Kit

استخراج از بافت / بافت پارافینه:

پارافین زدایی:

- ۱- در یک هود شیمیایی، 800 µl از Xylene را به میکروتیوب حاوی برش‌های بافت پارافینه (۵ برش 5 µm) اضافه کرده و به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه نمونه را بر روی Rocker قرار دهید تا به آرامی با یکدیگر مخلوط شوند و پارافین حل شود (در صورت عدم وجود Rocker، نمونه را به خوبی ورتکس نمایید).
- ۲- نمونه را به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کنید تا pellet تشکیل شود، سپس سوپرناتانت را به آرامی (Pellet از بین نرود) خارج نمایید.
- ۳- مراحل شستشو با Xylene (شماره ۱ و ۲) را تا زمانی که پارافین کاملاً حل شود، تکرار نمایید (ممکن است با توجه به سایز نمونه بافت، این مرحله نیاز به ۲ تا ۳ بار تکرار داشته باشد).

آبگیری از الکل:

- ۱- 800 µl از اتانول ۱۰۰٪ حجمی را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.
- ۲- 800 µl از اتانول ۷۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.
- ۳- 800 µl از اتانول ۵۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به طور کامل و به آرامی خارج نمایید.
- ۴- Pellet را در دمای 40 °C به مدت ۲۰ دقیقه قرار دهید تا کاملاً خشک شود.

مراحل استخراج:

- ۱- 200 µl از ATL به همراه 50 µl از P.K را به میکروتیوب حاوی بافت دپارافینه شده اضافه کرده، سپس نمونه را به خوبی ورتکس نموده و در 56° C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید تا بافت کاملاً لیز شود.
توجه: زمان انکوباسیون براساس نوع و اندازه بافت متغیر است. در این موارد تا زمانی که بیشترین لیز بافت صورت بگیرد انکوباسیون به طول می‌انجامد.
توجه: بهتر است انکوباسیون بر روی Thermoblock شیکردار (600 rpm) انجام شود و یا هر ۵ دقیقه، Vortex انجام شود.
- ۲- میکروتیوب حاوی نمونه را در 95 °C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید.
❖ **توجه:** در صورتی که از یک Thermoblock به منظور انکوباسیون استفاده می‌نمایید، پس از انکوباسیون در 56 °C، نمونه را تا زمان رسیدن Thermoblock به دمای 95 °C در RT قرار دهید.
❖ **توجه:** در صورتی که نمونه بافت پارافینه است و یا در فرمالین نگهداری می‌شود، انکوباسیون در دمای 95° C الزامی است.
❖ **توجه:** در صورت نگهداری نمونه در سرم فیزیولوژی و یا VTM، این مرحله انکوباسیون حذف شود.
- ۳- پس از رسیدن دمای نمونه به RT میکروتیوب را یک اسپین مختصر نمایید تا قطرات در پایین آن جمع شوند، سپس 400 µl از ATRL را به نمونه اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید.
- ۴- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۱۵ ثانیه در 8,000 rpm سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کنید.
- ۵- 500 µl از محلول AW1 را به ستون اضافه کرده و در دور 8,000 rpm به مدت ۱۵ ثانیه آن را شستشو دهید.
- ۶- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱۵ ثانیه شستشو دهید.
- ۷- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.
- ۸- در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج شود.
- ۹- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از AREB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفیوژ نمایید.
- ۱۰- RNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحاً در 80°C- نگهداری نمایید.



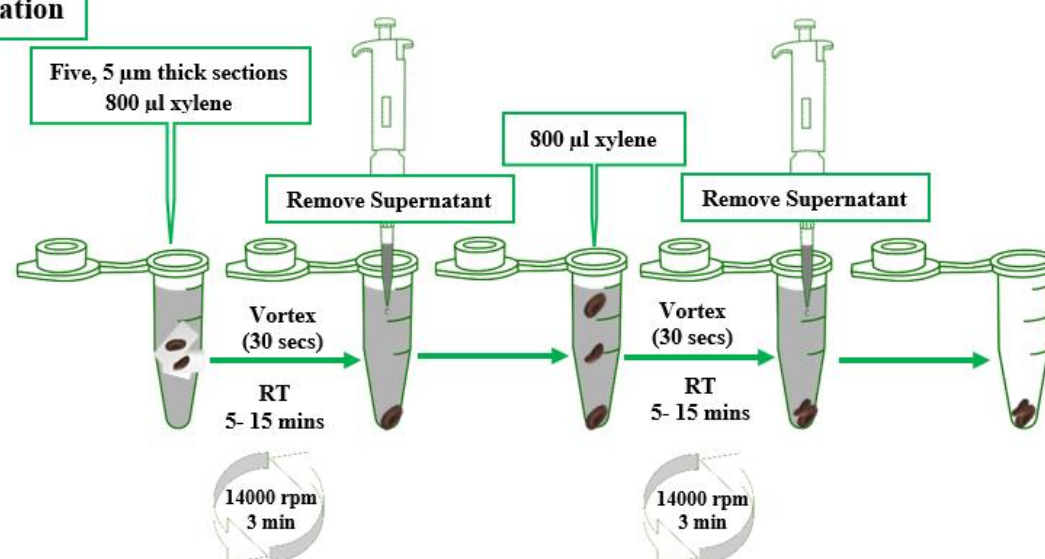
ARAMESH BIOGENE

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

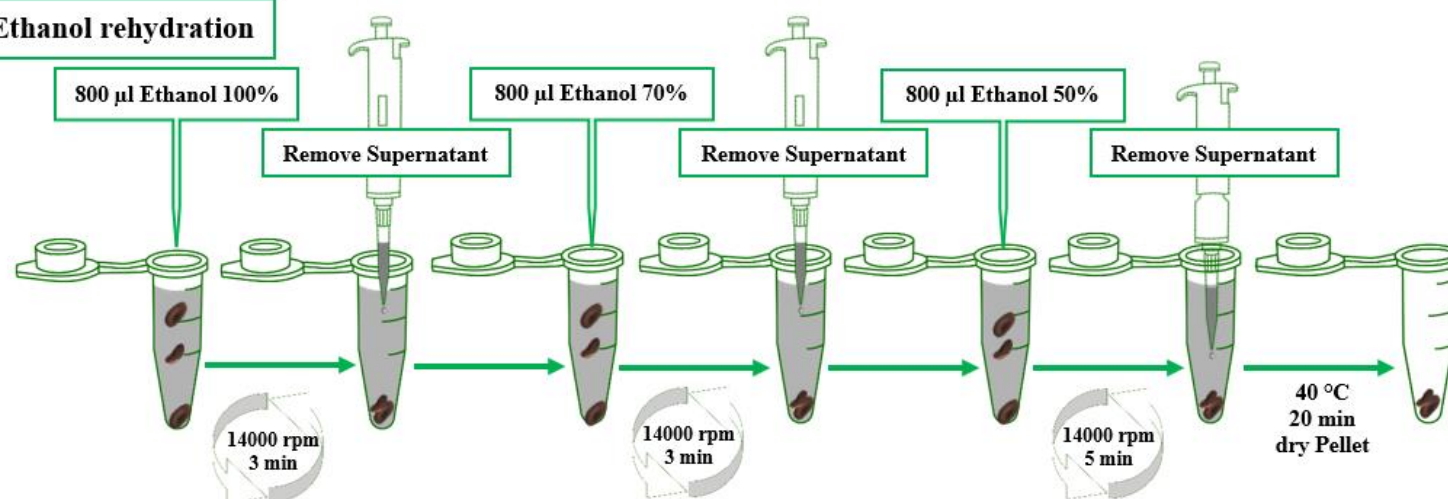
Quick Guide

Total RNA Isolation Kit

Tissue deparaffinization



Ethanol rehydration



Tissue Total RNA Isolation

