Column RNA Isolation Kit

Cat. No.: S-1020-5; 5 applications
Cat. No.: S-1020; 25 applications
Cat. No.: S-1020-1; 50 applications
Cat. No.: S-1020-250; 250 applications

DENA ZIST ASIA
MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS
www.denazist.ir

معرفی و کاربردها:

این کیت حاوی ستون‌های سانتریفیوژ و بافرهای لازم برای استخراج سریع و ساده RNA از انواع زیادی از سلول‌های جانوری، گیاهی، باکتریایی و مخمر است. ترکیب خاص محلول‌های به کار برده‌شده در این کیت باعث استخراج انتخابی RNA می‌گردد. میزان و کیفیت بالای RNA استخراج‌شده توسط این کیت برای انواع کاربردهای بیولوژی مولکولی مورد آزمون کیفی و کمی قرار گرفته است. این موارد عبارتند از:

RT-PCR, RT-qPCR, next-generation sequencing, microRNA isolation, and isolation of RNAs with low level of expression including lincRNAs and antisense lncRNAs

VERSION: Oct. 2022

قبل از اولین استفاده:

در کیت‌های ۵، ۲۵، و ۵۰ عددی به محلول DR2 به ترتیب میزان ۲.۴، ۱۲ و ۲۴ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ تا ۱۰۰ درصد اضافه کنید. در کیت‌های ۲۵۰ عددی به میزان ۶۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ تا ۱۰۰ درصد به هر ظرف DR2 اضافه کنید. مطمئن شوید که ظرف حاوی DR2 و اتانول لیبل‌گذاری شده باشد.

پروتکل استخراج:

توجه: **تمامی مراحل لازم است در شرایط RNase-free انجام گیرد. برای استخراج RNA با کیفیت و کمیت مطلوب لازم است توجه شود که استخراج از بعضی از بافت‌های گیاهی (برای مثال گیاهان دارای ترکیبات فنلی و نشاسته بالا) و جانوری و میکروارگانیسم‌های خاص نیازمند استفاده از روش‌های خاصی است که می‌توانند تکمیل‌کننده مرحله آماده‌سازی اولیه در این پروتکل باشند.**

۱. آماده‌سازی اولیه: یکی از موارد a تا c را انجام دهید.

a . **سلول‌های کشت داده‌شده جانوری:** به یک لوله هموژنایزر یا یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر **DR1**، به میزان ۵ تا ۱۰ میلیون سلول اضافه کنید. به جای این کار می‌توانید محیط کشت را از فلاسک کشت سلول‌های جانوری (کشت داده‌شده در یک لایه) خارج نموده و مستقیما بافر DR1 را به میزان ۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰ سانتی‌متر مربع سطح کشت به فلاسک حاوی سلول اضافه کنید و هم زمان با یک scraper سلول‌ها را از کف جدا کنید و به لوله هموژنایزر منتقل کنید.

b . **بافت‌های جانوری، باکتری و مخمر:** ۱۰۰ میلی‌گرم بافت سفت یا پلت باکتریایی یا مخمری را در یک هاون چینی در داخل ازت مایع به خوبی خرد کنید. به میزان ۵۰ میلی‌گرم از بافت سفت یا پلت خردشده را به یک لوله هموژنایزر حاوی یک میلی‌لیتر بافر **DR1** اضافه کنید.

c . **بافتهای نرم** که به راحتی سلول‌های آن از هم جدا می‌شوند را می‌توان بدون مرحله خردکردن در هاون چینی به لوله هموژنایزر حاوی بافر DR1 آضافه کرد.

۲. با انجام ورتکس و پی‌پت کردن (۲ دقیقه) و یا استفاده از یک هموژنایزر (۲ دقیقه)، بافت خردشده و سلول‌ها را در داخل محلول به خوبی ریز، مخلوط و هموژنیزه کنید. لوله را در دمای آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. سپس محتویات لوله هموژنایزر را به یک لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل نمائید.

۳. لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید (اگر سانتریفیوژ یخچال‌دار موجود نیست این مرحله را می‌توان در سانتریفیوژ معمولی نیز انجام داد). محلول فوقانی لوله را به یک میکروتیوب جدید منتقل نمائید. رسوب حاصله که شامل قطعات بافتی است را دور اندازید.

۴. میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میلی‌لیتر بافر DR1 حاوی بافت یا سلول هموژنیزه شده اضافه کنید. به مدت ۱۵ ثانیه به شدت لوله را تکان دهید. لوله را در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. سپس لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید.

۵. پس از اتمام سانتریفیوژ سه فاز تشکیل خواهد شد. فاز بالایی حاوی RNA است که لازم است با احتیاط از عدم آلودگی با فاز میانی به میکروتیوب جدیدی منتقل شود.

توجه: **برای انتقال از سرسمپلر زرد (تیپ‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتری) که انتهای آن با قیچی کوتاه شده است (حدود ۷ میلیمتر) استفاده شود. بهتر است انتقال در مقادیر ۵۰ میکرولیتری صورت گیرد. به این ترتیب از اعمال نیروی مکش زیاد در حین انتقال کاسته می‌شود و احتمال آلودگی با فاز میانی به حداقل می‌رسد.**

-------RNA BINDING TO THE COLUMN------

۶. به لوله جدید به میزان نیمی از حجم مایع منتقل‌شده اتانول ۹۶ یا ۱۰۰ درصد اضافه شود. محتویات لوله را به خوبی مخلوط کرده و به ستون که در داخل لوله جمع‌کننده قرار دارد منتقل کنید. سپس لوله را به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید. مایع جمع‌شده در لوله جمع‌کننده را دور بریزید و ستون را به داخل لوله جمع کننده برگردانید.

-------WASHING------

۷. به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر **DR2** به داخل ستون وارد کنید و سپس به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید. مایع جمع شده در لوله جمع کننده را دور بریزید و ستون را به داخل لوله جمع‌کننده برگردانید.

۸. پس از اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر **DR2**، ستون و لوله جمع‌کننده را به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید. ستون را در داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید قرار دهید.

-------ELUTION-------

۹. به داخل آن به میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از بافر **DR3** اضافه کنید و پس از گذشت ۳ دقیقه، آن را به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۳.۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید.

۱۰. محلول حاصل حاوی RNA است و باید در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. ◢

Kit components:
Buffers: DR1, DR2, DR3
Spin Columns

Store DR1 at 4 °C, and DR2 and DR3 buffers at room temperature.
Expiry date: 24 month after shipping

حمل دمای محیط
نگهداری طولانی مدت دمای آزمایشگاه به جز DR1 (باید در یخچال نگهداری شود)
استفاده فقط برای مصارف تحقیقاتی
این محصول موازین کنترل کیفی را گذرانده است.