



Total RNA Isolation Kit

معرفی و کاربردها: این کیت برای استخراج RNA از انواع سلولها و بافتهای جانوری و گیاهی و میکروارگانیسم ها کاربرد دارد. در حین استخراج توسط این کیت، پروتئین ها و DNA ژنومیک با کارایی بسیار بالا از RNA جدا می شوند. RNA استخراج شده 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
- isolation of RNAs with low level of expression including lincRNAs and antisense lncRNAs

تاریخ انقضاء	شرایط حمل	شرایط نگهداری	کیت		اجزای کیت
			25 عددی	50 عددی	
اجزای این کیت تا تاریخ انقضای مشخص شده روی جعبه کاملاً فعال و مورد استفاده می باشند. خواهشمند است به شرایط نگهداری توجه شود.	دمای محیط	4°C	25 ml	50 ml	G1 buffer
		4°C	9 ml	18 ml	G2 buffer
		-20°C	2.5 ml	5 ml	Ribonuclease-free water

پروتکل استخراج:

۱. برای استخراج از:

- **سلولهای کشت داده شده جانوری،** به یک لوله هموزنایزر حاوی یک میلی لیتر بافر G1، به میزان ۵ تا ۱۰ میلیون سلول اضافه کنید. به جای این کار می توانید محیط کشت را از فلاسک کشت سلولهای جانوری (کشت داده شده در یک لایه) خارج نموده و مستقیماً بافر G1 را به میزان ۱ میلی لیتر به ازای هر ۱۰ سانتی متر مربع سطح کشت به فلاسک حاوی سلول اضافه کنید و هم زمان با یک scraper سلولها را از کف جدا کنید. سلولها

را به لوله هموزنایزر منتقل کنید.

- **بافتهای جانوری، باکتری و مخمر،** صد میلی گرم بافت سفت یا پلت باکتریایی یا مخمری را در یک هاون چینی در داخل ازت مایع به خوبی خرد کنید. به میزان ۵۰ میلی گرم از بافت سفت یا پلت خرد شده را به یک لوله هموزنایزر حاوی یک میلی لیتر بافر G1 اضافه کنید. بافتهای نرم که به راحتی سلولهای آن از هم جدا می شوند را می توان بدون مرحله خرد کردن در هاون چینی به لوله هموزنایزر حاوی بافر G1 اضافه کرد.

۲. با انجام ورتکس و پی پت کردن بافت خرد شده و سلولها را در داخل محلول به خوبی مخلوط کنید. با استفاده از یک هموزنایزر مخلوط سلولی فوق را در ۲ پیروید زمانی ۱۵ ثانیه هر کدام هموزنیزه کنید.

۳. لوله را در دمای آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. سپس محتویات لوله هموزنایزر را به یک لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتری منتقل نمایید. لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید (اگر سانتریفیوژ یخچال دار موجود نیست این مرحله را می توان در سانتریفیوژ معمولی نیز انجام داد). محلول فوقانی لوله را به یک لوله میکروسانتریفیوژ جدید منتقل نمایید. رسوب حاصله که شامل قطعات بافتی است را دور اندازید.

۴. میزان ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به هر میلی لیتر بافر G1 حاوی بافت یا سلول هموزنیزه شده اضافه کنید. به مدت ۱۵ ثانیه به شدت لوله را تکان دهید یا ورتکس کنید. لوله را در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. سپس لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید. 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 لوله میکروسانتریفیوژ جدیدی منتقل شود. انتقال با سرسمپلر زرد و در مقادیر ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتری صورت گیرد.

۵. به لوله جدید به میزان نیمی از حجم مایع منتقل شده ایزوپروپانول اضافه شود. هم چنین به میزان نیمی از حجم مایع منتقل شده از بافر G2 نیز اضافه شود. محتویات لوله را به خوبی مخلوط کرده و آن را در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید.

۶. سپس لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید. پس از اتمام سانتریفیوژ یک رسوب سفید رنگ کم حجم (حاوی RNA) در ته لوله مشخص خواهد بود.

۷. مایع رویی را با احتیاط خارج کنید. به رسوب باقی مانده یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ (که با آب فاقد ریبونوکلاز تهیه شده است) اضافه کنید. به مدت ۵ ثانیه لوله را ورتکس کنید. لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.

۸. مایع رویی را با احتیاط و مشاهده مداوم رسوب ته لوله خارج کنید. در انتهای این مرحله رسوب در ته لوله قابل مشاهده است. سپس لوله را با درب باز در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید تا رسوب آب خود را از دست بدهد.

۹. به رسوب تقریباً خشک شده به میزان ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد ریبونوکلاز اضافه کنید. محلول حاصل را در مقادیر کوچکتر در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد برای انجام آزمایشات بعدی نگهداری کنید. نمونه های کمی از محلول فوق می توانند برای بررسی های کمی و کیفی در معرض اندازه گیری اسپکتروفتومتری یا ژل الکتروفورز قرار گیرند. ▲

Notes: Research Use Only

This product insert declares that this products has been analyzed and passed the quality control tests at the time of manufacture.

version: 072019