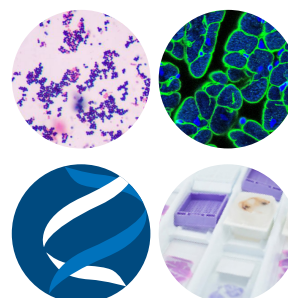


Total RNA Extraction kit

Animal Tissue, Cultured Cells, Gram Negative Bacteria, Gram Positive Bacteria

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Lysis Buffer	25 ml	
Wash Solution I	25 ml	دمای محیط
Wash Solution II* (concentrate)	10 ml	(15-25°C)
Elution Buffer	5 ml	
Spin Column	50	
Collection Tubes	100	
Protocol	1	



Viragene®
Cell Discovery Solutions

* ۴۰ ml اتانول مطلق به بطری Wash Solution II اضافه نمایید.
* در صورت مشاهده رسوب در بافر Wash Solution I به منظور حل شدن کامل رسوب، قبل از استفاده، بافر را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه نمایید.

کیفیت حاضر قابلیت استخراج Total RNA از نمونه های زیر، با غلظت و خلوص مناسب را در کمترین زمان ممکن دارا می باشد:

- نمونه های متنوع بافتی پستانداران مانند کبد موش، طحال، ریه، قلب، مغز و بافت های چربی
- سلول های کشت داده شده چسبنده و غیر چسبنده (به شکل سوسپانسیون) از رده های مختلف سلولی
- باکتری گرم منفی و گرم مثبت

نکات کلیدی:

- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.

موارد مورد نیاز:

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- ایزوپروپانول
- Heating block یا Water bath
- آنزیم DNase I (در صورت نیاز به RNA عاری از DNA، قابل سفارش از شرکت ویراژن آکام)
- سانتریفیوژ یخچال دار
- هاون، نیتروژن مایع (جهت استخراج از بافت)
- محلول PBS 1x (جهت استخراج از سلول کشت داده شده)
- محلول Tris HCl (10mM, PH 8.0) (جهت استخراج از باکتری گرم منفی)
- آنزیم لیزوزیم با غلظت ۵۰ mg/ml، محلول Tris HCl (10mM, PH 8.0) (جهت استخراج از باکتری گرم مثبت)

Animal Tissue RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

بافت جانوری (کبد موش، شش، قلب، طحال، ...): ۵۰-۱۰۰ mg

دستور العمل:

- به ازای هر نمونه ۱۵۰۰ الی ۵۰۰۰ از محلول Lysis را در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل و در دمای ۶۵°C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.
- ۱. نمونه را در هاون و به کمک نیتروژن مایع بصورت پودر در آورده و همگن نمایید، سپس به میکروتیوب حاوی مخلوط Lysis (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید. (جهت جلوگیری از تخریب اسید نوکلئیک، این مرحله را با سرعت و بدون وقفه انجام دهید.)
توجه: در صورت عدم دسترسی به نیتروژن مایع، می توانید با کوبیدن نمونه و یا با استفاده از تیغ، نمونه ها را به قطعات کوچک تر و همگن تبدیل کنید. توجه داشته باشید این مرحله در بازدهی کیت تاثیرگذار خواهد بود.
- ۲. میکروتیوب را به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید و در دمای ۶۵°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان هر ۲ دقیقه میکروتیوب را Spin و Vortex نمایید.
- ۳. میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C، سانتریفیوژ نمایید.
- ۴. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
- ۵. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Cultured Cells RNA Extraction kit

میزان نمونه مورد نیاز:

میزان سلول مورد نیاز : ۱۰^۶ سلول

دستورالعمل:

* قبل از آغاز فرایند، Lysis Buffer را در ۶۵ °C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.
* در صورت استفاده از سلول های چسبنده، لازم است در ابتدا با استفاده از Trypsin-EDTA آنها را به شکل سوسپانسیون درآورید.

۱. سوسپانسیون حاوی سلول های کشت داده شده را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید. سپس سوپرناتانت را با احتیاط دور بریزید و به رسوب باقی مانده ۲۰۰ μl محلول PBS 1x اضافه نموده و بخوبی پیتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.
۲. به میکروتیوب حاوی نمونه، ۵۰۰ μl از محلول Lysis Buffer (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. در طول این مدت زمان، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
۳. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C، سانتریفیوژ نمایید.
۴. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
۵. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Gram Negative Bacteria RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

۱۰^۹ سلول باکتری گرم منفی کشت داده شده (5ml)

دستورالعمل:

* قبل از آغاز فرایند، Lysis Buffer را در ۶۵ °C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.

۱. پس از کشت Overnight باکتری مورد نظر به صورت، آن را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.
۲. سوپرناتانت را با احتیاط دور بریزید و به رسوب حاصل، ۲۰۰ μl محلول Tris HCl (10mM, PH 8.0) اضافه و به خوبی پیتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.
۳. به میکروتیوب حاوی نمونه، ۵۰۰ μl از محلول Lysis Buffer (که از قبل انکوبه کرده اید) اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه کنید. در طول این مدت زمان، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
۴. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C، سانتریفیوژ نمایید.
۵. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
۶. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Gram Positive Bacteria RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

۱۰^۹ سلول باکتری گرم مثبت کشت داده شده (۵ml)

دستورالعمل:

● به ازای هر نمونه ۵۰۰ μl از محلول Lysis Buffer را در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل و در دمای ۶۵ °C تا زمان آماده سازی نمونه انکوبه نمایید.

۱. پس از کشت Overnight باکتری مورد نظر به صورت، آن را به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمایید.
۲. سوپرناتانت را با احتیاط دور بریزید و به رسوب حاصل، ۲۰۰ μl محلول Tris HCl (10mM, PH 8.0) اضافه و به خوبی پیتاژ نمایید تا کاملاً همگن شود.
۳. ۲۵ μl آنزیم Lysozyme (با غلظت ۵۰ mg/ml) را به میکروتیوب اضافه کنید و خوب پیتاژ کنید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، میکروتیوب را هر ۵ دقیقه Vortex و Spin نمایید.
۴. Lysis Buffer (که از قبل انکوبه کرده اید) را به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه نمایید.
۵. میکروتیوب را به خوبی Vortex نموده و در دمای ۶۵ °C به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان، میکروتیوب را ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
۶. میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C، سانتریفیوژ نمایید.
۷. سوپرناتانت را با احتیاط و به آرامی برداشته و به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
۸. ادامه مراحل طبق Washing Protocol در صفحه ۳ انجام شود.

Washing Protocol

دستورالعمل:

۱. ۵۰۰ μl ایزوپروپانول به میکروتیوب حاوی سوپرناتانت اضافه و به خوبی پیتپاژ نمایید تا مخلوطی همگن به دست آید.
۲. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.
توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.
۳. ستون و کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. سپس محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید. در صورتی که حجم نمونه بیش از ۷۰۰ μl باشد، محتویات را مجدداً داخل همان ستون ریخته و سانتریفیوژ نمایید تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.
۴. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۵. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۶. مرحله ۵ را مجدداً تکرار نمایید.
۷. ستون-کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۸. کالکشن را دور بیاندازید و ستون را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۹. ۱۰۰-۵۰ μl از محلول Elution Buffer به مرکز ستون اضافه کنید، درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

* اسید نوکلئیک استخراج شده در دمای ۲۰ °C نگهداری کنید.

راهنمای عیب یابی:

پیشنهادات	دلایل احتمالی	ایرادات
به دمای درج شده روی لیبل تمامی اجزای کیت دقت فرمایید و هر کدام را در دمای مناسب خود نگهداری کنید.	عدم نگهداری کیت در دمای تعیین شده	عدم مشاهده نتیجه یا غلظت کم DNA/RNA
مقادیر بالای نمونه می تواند موجب لیز سلولی ناکافی، انسداد ستون و متعاقباً کاهش بازده استخراج گردد. مقادیر را طبق دستورالعمل استفاده نمایید.	میزان بالای نمونه اولیه	
نمونه باید تازه و یا شرایط نگهداری آن به درستی رعایت شده باشد.	عدم استفاده از نمونه تازه یا نمونه با شرایط نگهداری نامناسب	
از آنجایی که سرعت و میزان خرد و همگن کردن نمونه در بازده استخراج تاثیر بسزایی دارد، این مرحله را به درستی انجام دهید تا از ایجاد توده سلولی جلوگیری بعمل آید.	هضم نامناسب نمونه اولیه	
قبل از اضافه نمودن ایزوپروپانول، سوپرناتانت باید فاقد توده سلولی باشد. استفاده از مقادیر بالای نمونه منجر به ناکارآمدی لیز سلولی و در نتیجه کاهش خلوص DNA/RNA خواهد شد.	انسداد ستون استخراج	
از انجام صحیح مراحل شستشو اطمینان حاصل کنید. مراقب باشید که ستون پس از شستشو با محلول داخل کالکشن تماس پیدا نکند. در صورت رخداد، مرحله ۱۱ را مجدداً تکرار کنید.	مقادیر نامناسب 260/230 در نانودراپ	خلوص کم RNA/DNA
مرحله ۷ از Washing Protocol را مجدداً تکرار نمایید تا محلول Wash Solution II کاملاً از محصول حذف گردد.	وجود باقی مانده اتانول در نمونه استخراج شده	مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج PCR، RT-PCR مانند:
بدلیل اختلاف در PH، صرفاً از محلول Elution Buffer موجود در کیت استفاده نمایید.	به جای Elution Buffer از آب استفاده شده است.	کاهش عملکرد استخراج