CinnaPure RNA

Kit for the isolation of RNA from serum or plasma, cell culture, animal and plant Tissues.

Cat. No. PR891620 **50 Preparations**

Store kit contents at: 4-18^{o}C

CinnaGen Molecular Biology and Diagnostic Sale Office
Central Office:
4th floor, No. 56, Azimi St., Shahrak Ekbatan
Tehran, IRAN
Tel: +9821 44 690 798-800
Fax: +9821 44 690797
Place you order: **biosale@cinnagen.com**
www.cinnagen.com
CinnaGen: Pioneer in Molecular Biology and Biotechnology

استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن
CinnaPure RNA Purification Kit

پیش از شروع به کار:

حرارت آزمایشگاه بین ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد باشد. در هنگام سا نتریفوژ از یخچال آن استفاده نکنید. پیش از شروع کار، محلول لیز را ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

محتویات و مقادیر کیت استخراج RNA سیناژن

۱- محلول لیز ۲۰ میلی لیتر

۲- محلول Precipitant، ۱۵ میلی لیتر

۳- محلول شستشوی شماره یک، ۲۰ میلی لیتر

۴- محلول شستشوی شماره دو، ۴۰ میلی لیتر

۵- آب RNAase free، ۲,۵ میلی لیتر

۶- ستون خالص سازی ۵۰ عدد

۷- تیوب ۲ میلی لیتری ۱۰۰ عدد

این کیت جهت استخراج Total RNA از ۵۰ نمونه طراحی شده است.

شرایط نگهداری

کیت را در حرارت اتاق نگهداری کنید. در صورت عدم استفاده و فواصل طولانی مصرف، کیت را می توان در یخچال هم نگهداری نمود. جهت اجتناب از آلودگی تیوب حاوی آب RNAse free را در یخچال نگهداری نمایید . این کیت در حرارت اتاق حداقل تا ۶ ماه پایدار خواهد بود.

نحوه ارسال کیت: جهت ارسال کیت نیاز به استفاده از یخ، بصورت خشک و یخ ژل نمی باشد.

محدودیت های استفاده

این کیت جهت استخراج RNA total از سوسپانسیون سلولی و نیز Viral RNA از سرم یا پلاسمای آلوده طراحی گردیده است لیکن کاربرد اختصاصی جهت نمونه خاص و یا استفاده بالینی آن توصیه نمی گردد. پیش از استفاده از کیت در آزمایش های تحقیقاتی و تشخیصی از کارآیی و عملکرد مطلوب آن با یک نمونه حاصل از کشت سلولی و یا یک نمونه PCR مثبت اطمینان حاصل نمایید.

ایمنی محصول

هنگام استفاده از این کیت و سایر مواد شیمیایی از پوشش های مناسب آزمایشگاهی مانند: روپوش، دستکش و عینک استفاده کنید. از هود لامینار و یا شیمیایی استفاده کنید. محلول لیز و محلول شستشو شماره یک هر دو حاوی گوانیدین وسایر مواد شیمیایی جهت تثبیت RNA ودناتوره کردن هم زمان پروتئین و DNA می باشد. از تنفس آن اجتناب کنید.

نوک سمپلرهای آغشته به محلول لیز و محلول شستشو شماره یک را در ظرف حاوی سفید کننده اوت نکنید. نمک های گوانیدین در مجاورت سفید کننده های تجاری، موجب آزاد شدن گاز های فرّار و سمی خواهد گردید. از تنفس آن اجتناب کنید. در صورت تراوش محلول های لیز و یا محلول شستشو شماره یک بر روی سطوح، موضع را به دترجنت آغشته و سپس با آب پاک کنید. در صورت احتمال وجود عوامل عفونی در قطره تراوش شده، پس از پاک سازی با استفاده از دترجنت و آب، موضع را با استفاده از هیپوکلریت ۱٪ ضدعفونی کنید.

محلول های رسوب دهنده precipitant ، شستشو شماره یک و محلول شستشوی شماره دو هریک حاوی غلظت های متفاوت اتانول و ایزوپروپانول بوده لذا قابل اشتعال و مضر می باشند.

اصول و روش استخراج RNA با استفاده از کیت سیناژن

غلظت اپتیمم نمک ها ی گوانیدین به همراه سایر عوامل دناتوره کننده پروتئینی در کنار شرایط مناسب یونی سبب لیز همزمان سلول و تثبیت اسید ریبونوکلوئیک می گردد. غشا سیلیکای موجود در ستون و دور بالا سانتریفوژ سبب تسریع در زمان و نیز افزایش خلوص RNA استخراجی می گردد.

وسایل لازم برای استخراج RNA با استفاده از کیت CinnaPure RNA Extraction

- میکروسانتریفوژ با دور بالا
- هیتر بلوک
- سمپلرمتغیر
- انکوباتور
- ورتکس / فیوژ

مواد لازم برای استخراج RNA با استفاده از کیت CinnaPure RNA Extraction

جهت استخراج RNA با استفاده از کیت فوق نیاز به مواد جداگانه نخواهد بود.

سایر وسایل و مواد مرتبط برای استخراج RNA

- Shredder: Cat. No. PR881615
- RNA later: Cat. No. R0901, R0901-20
- LiCl: Cat. No. PR891622
- 2X RNA Loading Dye: R0641
- RNA Ladders: SM1831,3 –SM1821,3
- DNaseI : EN0521, 523

نگهداری و ارسال نمونه جهت استخراج RNA

در سلول های جانوری و گیاهی RNA پس از برداشت دستخوش تغییرات خواهد شد مگر آن که بلافاصله پس از برداشت در مجاورت محلول تثبیت کننده RNA (RNA later) و یا در ازت مایع نگهداری گردد.

تخریب سلول و هموژن نمودن نمونه

RNA بدست آمده نسبت مستقیم با میزان تخریب سلول مورد استفاده دارد و لیز ناقص سلول، کاهش چشمگیر RNA استخراجی را به دنبال خواهد داشت. پس از تخریب سلول، یکنواخت سازی محلول Lysate و کاهش ویسکوزیته بوجود آمده ضروری است. طی مرحله یکنواخت سازی، DNA ژنومیک و سایر اجزای سلولی خرد شده و محلول یک نواختی ایجاد می گردد. عدم یکنواخت سازی کامل در این مرحله اتصال ناقص RNA را به غشای سیلیکا و کاهش RNA استخراجی را در پی خواهد داشت. علی رغم مراحل متفاوت لیز سلولی و یک نواخت سازی (Homogenization) با استفاده از نمونه های بیولوژیک مختلف ، مرحله اتصال RNA به غشا سیلیکا و شستشوی آن در همه موارد یکسان است. محلول لیز به تنهایی قادر به تخریب سوسپانسیون سلولی می باشد اما در مورد سایر نمونه های مورد استفاده مانند: بافت جانوری و گیاهی و نیز سلول های مخمر جهت تسریع در تخریب سلول نیاز به ابزار و آنزیم می باشد.

نمونه	تخریب سلول	هموژن کردن نمونه
سوسپانسیون سلول جانوری	محلول لیز	ورتکس، سمپلر، سرنگ- نیدل یا Shredder درصورتی که تعداد سلول $10^5 \geq$ باشد، از ورتکس استفاده کنید
بافت جانوری	tissue Lyser یا هاون	سرنگ- نیدل یا Shredder
بافت گیاهی و قارچ رشته ای	هاون	Shredder

تخریب سلول با استفاده از هاون

جهت تخریب بافت های جانوری و گیاهی با استفاده از هاون، ابتدا بایستی بافت را در ازت مایع بلافاصله منجمد نمود و سپس با استفاده از هاون و تحت ازت مایع آن را کاملا خرد نمود. سوسپانسیون بدست آمده از پودر بافت و ازت مایع را به یک تیوب از پیش سرد شده در ازت مایع با سایز مناسب منتقل کنید. اجازه دهید ازت تبخیر گردد و پیش از گرم شدن بافت لیز را اضافه کنید و بلافاصله مرحله یکنواخت سازی و یا هموژنیزاسیون را آغاز کنید.

هموژنیزاسیون

الف) با استفاده از سرنگ و نیدل

سوسپانسیون سلولی و نیز محلول حاصل از لیز بافت را می توان با استفاده از سرنگ و نیدل یکنواخت نمود. با گذراندن Lysate بافتی از سرنگ دو میلی لیتری استریل با نیدل شماره۲۰- ۱۹(حداقل ۱۰ بار) می توان محلول Lysate راهموژن نمود. در مورد سوسپانسیون سلول های جانوری از سرنگ دو میلی لیتری استریل با نیدل شماره۲۳- ۲۰ استفاده کنید.

ب) با استفاده از Shredder

با استفاده از Shredder(Cat. No. PR881615) نیز می توان به شکلی موثر و سریع از Lysate حاصل از بافت و سلول، محلول هموژن شده بدست آورد. حداکثر تا 700ul از محلول Lysate را در ستون مخصوص Shredder وارد کنید و سپس ستون را درون یک تیوب دو میلی لیتری قرار داده و به مدت دو دقیقه در حداکثر سرعت سانتریفوژ کنید. طی عبور محلول Lysate از ستون، محلول هموژن شده بدست خواهد آمد.

حذف آلودگی با DNA ژنومیک

DNA باقیمانده را می توان با استفاده از آنزیم DeoxyribonucleaseI و پس از استخراج RNA حذف نمود.

پیش از شروع استخراج به یاد داشته باشید:

تهویه مناسب و نیز استفاده از هود ضروری است. بیش از 800ul محلول را وارد ستون نکنید. پلت های سلولی را می توان در $-70^{o}C$ نگهداری کرد، منوط به آن که سلول ها به تعداد و در تیوب مناسب (1.5 -2ml) فریز گردند و مستقیما وارد پروتکل استخراج شود. جهت سهولت کنده شدن پلت سلولی فریز شده طی مراحل دوم استخراج بهتر است کمی آن را گرم نمود.

محلول Lysate هموژن شده را می توان مدت ها در $-70^{o}C$ نگهداری نمود. پیش از استفاده از این محلول آن را در بن ماری $37^{o}C$ ذوب نمایید. از انکوباسیون طولانی اجتناب کنید. در صورت مشاهده مواد غیر محلول، Lysate را به مدت ۵ دقیقه در 3000-5000g سانتریفوژ کنید و مایع رویی را به تیوب جدید منتقل کنید. با توجه به غلظت نمک های به کار رفته، جهت اجتناب از تشکیل رسوب و یا کریستال های نمکی در محلول لیز مدتی آن را در انکوباتور $37^{o}C$ یا بالاتر قرار دهید. محلول لیز و محلول شستشوی شماره یک هر یک حاوی نمک های گوانیدین می باشند. از تماس آن ها با سفید کننده های تجاری و مواد ضدعفونی کننده حاوی bleach خودداری کنید. تمامی مراحل استخراج و سانتریفوژ را در حرارت اتاق $20-25^{o}C$ انجام دهید. سانتریفوژ و محلول لیز را در معرض باد مستقیم وسایل خنک کننده قرار ندهید. بسته به میزان مورد نیاز به ازای هر استخراج RNase free water را به یک تیوب منتقل کنید و در هیتر بلوک $37\ ^{o}C$ قرار دهید.

از تیوب و سر سمپلرهای Rnase free استفاده کنید و شرایط عمومی کار با RNA را رعایت کنید.

پروتکل استخراج RNA از سرم یا پلاسما

۱- 400ul محلول لیز کننده را بر روی ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم یا پلاسما اضافه کنید. ۱۰ ثانیه ورتکس کنید.

۲- 300ul محلول Precipitant را به محلول فوق اضافه کنید. با استفاده از ورتکس به مدت ۵ ثانیه مخلوط کنید.

۳- 800ul از محلول را به ستون (درون یک تیوب ۲ میلی لیتری) منتقل و سانتریفوژ کنید. تیوب ۲ میلی لیتری حاوی flow through را دور بریزید.

۴- ستون را درون یک تیوب ۲ میلی لیتری جدید (در کیت موجود است) قرار داده و 400ul از محلول واش شماره یک را به ستون اضافه و سانتریفوژ کنید. flow through را دور بریزید.

۵- 400ul از محلول واش شماره دو را به همان ستون اضافه و سانتریفوژ کنید. flow through را دور بریزید.

۶- 400ul از محلول واش شماره دو را مجددا به همان ستون اضافه و سانتریفوژ کنید. flow through را دور بریزید.

۷- جهت اطمینان از تبخیر مقادیر الکل باقیمانده ،ستون را درون یک تیوب جدید قرار داده و سانتریفوژ کنید.

۸- ستون را درون یک تیوب 1.5ml جدید قرار داده ۳۰ میکرولیتر آب Rnase free را مستقیما بر روی مرکز ممبران اضافه کنید . جهت افزایش میزان حلالیت، تیوب را به مدت ۳ دقیقه با در بسته درون انکوباتور و یا هیتر بلوک $37^{o}C$ قرا دهید و سپس سانتریفوژ کنید.

- **زمان و دور سانتریفوژ: به مدت یک دقیقه در (≥13000rpm) ≥12000 x g**

استخراج RNA از سلول های جانوری با استفاده از کیت CinnaPure RNA Extraction

تخمین و استفاده از تعداد مناسب سلول نقش اساسی در غلظت و خلوص RNA استخراجی خواهد داشت و از سویی دیگر میزان RNA نیز بین سلول های مختلف و نیز طی مراحل سلولی، بسیار متفاوت می باشد. در صورتی که اطلاع دقیقی از میزان RNAسلول خود ندارید استخراج خود را با سه تا چهار میلیون سلول آغاز کنید . بسته به میزان RNA بدست آمده می توان در آزمون های بعدی، برآورد مناسبی از میزان سلول مورد استفاده داشت.

پروتکل استخراج:

۱- طی ۵ دقیقه و در 300xg یا در1500RPMپلت سلولی را تهیه کنید. بیش تر از $10x10^6$ سلول استفاده نکنید. با استفاده از سمپلر باقیمانده محیط کشت را خارج کنید. پلت سلولی را با استفاده از PBS استریل بشویید. حضور اندک محیط کشت در تیوب استخراج سبب کاهش غلظت محلول لیز کننده، اتصال ناقص RNA به غشا ستون و نهایتا کاهش RNA استخراج شده را به دنبال خواهد داشت.

۲- ابتدا با ضربات آهسته انگشت بر انتهای تیوب پلت سلولی را سست کنید 400 ul از محلول لیز به تیوب اضافه کنید. ۱۰ ثانیه به شدت ورتکس کنید سپس با استفاده از سمپلر محلول را کاملا یکنواخت کنید (حداقل ۱۰ بار). اگر تعداد سلول ها کم تر از $1x10^5$ باشد به مدت یک دقیقه از ورتکس استفاده کنید. جهت افزایش هموژنیسیته محلول Lysate ونیز برای تخریب DNA ژنومیک، حداقل ۱۰ بار با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتری استریل (Gauge no. 20-23) محتویات تیوب را پر و خالی کنید. جهت سهولت کار در این مرحله می توان از Shredder استفاده نمود. عدم رهایی پلت و نیز عدم یکنواختی سلول در این مرحله لیز ناقص سلولی و نهایتا کاهش RNA استخراج شده را به دنبال خواهد داشت.

۳- از محلول precipitation موجود در کیت، 300ul به تیوب اضافه کنید با استفاده از سمپلر یا با وارونه کردن تیوب به خوبی مخلوط کنید.

۴- 700ul از محتویات تیوب را که ممکن است دارای رسوب باشد به یک ستون استخراج RNA که درون یک تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید. در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ نمایید. سپس ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد تیوب ۲ میلی لیتری را دور بیاندازید.

۵- ستون را درون یک تیوب ۲ میلی لیتری جدید قرار دهید (در کیت موجود است) 400ul از محلول شستشو شماره یک را وارد ستون کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ نمایید. سپس ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید. (تیوب ۲ میلی لیتری در مرحله بعدی نیز استفاده خواهد شد).

۶- 400ul از محلول شستشو شماره دو را به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ نمایید. سپس ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید. (تیوب ۲ میلی لیتری در مرحله بعدی نیز استفاده خواهد شد).

۷- 400 ul از محلول شستشو شماره دو را مجددا به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ نمایید. سپس ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید.

۸- جهت اجتناب از آلودگی ستون با مقادیر اندک اتانل باقیمانده در محلول شستشو شماره دو در این مرحله بهتر است ستون استخراج RNA را با در بسته درون یک تیوب دو یا یک و نیم میلی لیتری جدید قرار داد و مجددا سانتریفوژ نمایید. ستون را به آرامی از درون تیوب خارج کنید و درون یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید قرار دهید.

۹- 30ul از محلول RNase free water را که تاکنون در هیتر بلوک 37^oC قرار گرفته بود را درست در مرکز غشا درون ستون اضافه کنید. جهت افزایش غلظت RNA استخراجی در این مرحله در ستون را به آرامی ببندید و به مدت سه دقیقه در انکوباتور 37^oC انکوبه و سپس سانتریفوژ نمایید.

۱۰- اگر میزان RNA مورد انتظار بیش از ۳۰ میکرو گرم باشد، مرحله قبل را با استفاده از ۲۰ میکرولیتر آب Rnase free دیگر تکرار کنید و اگر غلظت بالاتری از RNA مورد نیاز است همان محلول eluate ابتدایی را مجددا جمع آوری و مستقیما بر روی همان ممبران اضافه کنید و بلافاصله سانتریفوژ نمایید.

زمان و دور سانتریفوژ: به مدت یک دقیقه در **≥12000 x g (≥13000rpm)**

استخراج RNA از بافت جانوری با استفاده از کیت CinnaPure RNA Extraction

برآورد صحیح از میزان بافت مورد استفاده نقش اساسی در غلظت و خلوص RNA استخراجی خواهد داشت و از سویی دیگر میزان RNA نیز بین بافت های مختلف بسیار متفاوت می باشد. در صورتی که اطلاع دقیقی از میزان RNAبافت خود ندارید استخراج خود را با ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم بافت آغاز کنید.

پیش از شروع استخراج به یاد داشته باشید: حداکثر میزان بافت مورد استفاده بیش از ۳۰ میلی گرم نباشد. در مورد بافت های دهیدراته،RNA active و نیز تثبیت شده درون محلول های حفظ کننده RNA حداکثر میزان بافت در شروع کار قدری کم تر و در حدود ۱۵ تا ۲۰ میلی گرم در نظر گرفته شود. بهترین روش جهت برآورد میزان بافت مورد نیاز وزن کردن آن می باشد. حین استخراج RNA برخی بافت های جانوری تمایل به ایجاد رسوب و افزایش ویسکوزیته دارند. جهت دست یابی به نتایج مناسب، بافت جانوری را بلافاصله پس از برداشت به میزان مناسب درون محلول های تثبیت کننده RNA و یا در برودت -70°C و یا با استفاده از ازت مایع بلافاصله منجمد و سپس در -70°C نگهداری کنید. حداکثر میزان ۳۰ میلی گرم از بافت مورد نظر را (از پیش وزن شده) درون هاون به همراه ازت مایع قرار داده و کاملا خورد کنید. بافت را که بصورت پودر درآمده است به همراه ازت مایع درون یک تیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری (یا تیوب با سایز مناسب) از پیش سرد شده در ازت مایع وارد کنید.

۱- پس از تبخیر ازت، 400ul از محلول لیز به تیوب اضافه کنید، ۲۰ ثانیه ورتکس کنید و سپس با استفاده از سمپلر محلول را کاملا یکنواخت کنید.درصورت افزایش ویسکوزیته Lysate انتهای نوک سر سمپلر را ببرید و از آن استفاده کنید. جهت افزایش هموژنیسیته محلول Lysate ونیز برای تخریب DNA ژنومیک، حداقل ۱۰ بار با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتری استریل (Gauge no. 19) محتویات تیوب را پر و خالی کنید. در صورتی که هنوز بقایای بافتی و مواد جامد در محلول Lysate وجود دارد به مدت ۵ دقیقه در 3000-5000g سانتریفوژ کنید و مایع رویی را به تیوب جدید منتقل کنید. عدم یکنواختی سلول در این مرحله لیز ناقص سلولی و نهایتا کاهش RNA استخراج شده را به دنبال خواهد داشت. جهت سهولت کار در این مرحله می توان از Shredder استفاده نمود.

۳ - از محلول precipitation موجود در کیت، 300ul به تیوب اضافه کنید با استفاده از سمپلر به خوبی مخلوط کنید.

۴- 700ul از محتویات تیوب را که ممکن است دارای رسوب باشد به یک ستون استخراج RNA که درون یک تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید. در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد. تیوب ۲ میلی لیتری را دور بیاندازید.

5- 400ul از محلول شستشو شماره یک را مجددا به همان ستون استخراج RNA که درون یک تیوب دو میلی لیتری جدید (در کیت موجود است) قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید. (تیوب ۲ میلی لیتری در مرحله بعدی نیز استفاده خواهد شد).

7- 400ul از محلول شستشو شماره دو را مجددا به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید. (تیوب ۲ میلی لیتری در مرحله بعدی نیز استفاده خواهد شد).

۸- 400 ul از محلول شستشو شماره دو را مجددا به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید.

۹- جهت اجتناب از آلودگی ستون با مقادیر اندک اتانل باقیمانده در محلول شستشو شماره دو در این مرحله بهتر است ستون استخراج RNA را با در بسته درون یک تیوب دو یا یک و نیم میلی لیتری جدید قرار داد و مجددا و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از درون تیوب خارج کنید و درون یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید قرار دهید.

۱۰- 30ul از محلول RNase free water را که تاکنون در هیتر بلوک 37°C قرار گرفته بود را درست در مرکز غشا درون ستون اضافه کنید. جهت افزایش غلظت RNA استخراجی در این مرحله در ستون را به آرامی ببندید و به مدت سه دقیقه در حرارت اتاق و یا انکوباتور 37°C انکوبه نمایید و به مدت یک دقیقه سانتریفوژ کنید.

۱۱- اگر میزان RNA مورد انتظار بیش از ۳۰ میکرو گرم باشد، مرحله قبل را با استفاده از ۲۰ میکرولیتر آب Rnase free دیگر تکرار کنید و اگر غلظت بالاتری از RNA مورد نیاز است همان محلول eluate ابتدایی را مجددا جمع آوری و مستقیما بر روی همان ممبران اضافه کنید و بلافاصله سانتریفوژکنید.

- **زمان و دور سانتریفوژ: به مدت یک دقیقه در (≥13000rpm) ≥12000 x g**

استخراج RNA از بافت گیاهی با استفاده از کیت CinnaPure RNA Extraction

برآورد صحیح از میزان بافت مورد استفاده نقش اساسی در غلظت و خلوص RNA استخراجی خواهد داشت و از سویی دیگر میزان RNA نیز بین بافت های مختلف گیاهی متفاوت می باشد. در صورتی که اطلاع دقیقی از میزان RNA بافت گیاه خود ندارید استخراج خود را با حداکثر ۵۰ میلی گرم بافت یا $3\text{-}4 \times 10^6$ سلول گیاهی آغاز کنید .

پیش از شروع استخراج به یاد داشته باشید:

جهت دست یابی به نتایج مناسب، بافت گیاهی را بلافاصله پس از برداشت به میزان مناسب درون محلول های تثبیت کننده RNA و یا در بروودت 70°C- و یا با استفاده از ازت مایع بلافاصله منجمد و سپس در 70°C- نگهداری کنید.

حداکثر میزان ۱۰۰ میلی گرم از بافت (از پیش وزن شده) یا $1x10^7$ سلول گیاهی مورد نظر را درون هاون به همراه ازت مایع قرار داده و کاملا خورد کنید. بافت را که بصورت پودر درآمده است به همراه ازت مایع درون یک تیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری (یا تیوب با سایز مناسب) از پیش سرد شده در ازت مایع وارد کنید.

۱-پس از تبخیر ازت بلافاصله 400ul از محلول لیز به تیوب اضافه کنید، با استفاده ورتکس شدید، محلول را کاملا یکنواخت کنید.

انکوباسیون به مدت یک تا سه دقیقه در حرارت ۵۶درجه سانتی گراد ممکن است سبب تسریع تخریب بافت گردد.

(به یاد داشته باشید؛ نگهداری بافت های کیاهی حاوی نشاسته زیاد در حرارت فوق، تورم بافت را به دنبال خواهد داشت)

۲- محلول Lysate را به درون shredder که خود درون یک تیوب ۲ میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید. به مدت دو دقیقه در حداکثر سرعت سانتریفوژ کنید.

جهت تسهیل در حمل Lysate به درون Shredder می توانید انتهای نوک سر سمپلر را ببرید و از آن استفاده کنید.

۳- بدون برهم زدن رسوب، مایع رویی بدست آمده را به آرامی به درون یک تیوب دیگر وارد کنید.

۴ - از محلول precipitation موجود در کیت، 300ul به تیوب اضافه کنید با استفاده از سمپلر به خوبی مخلوط کنید.

۵- 700ul از محتویات تیوب را که ممکن است دارای رسوب باشد به یک ستون استخراج RNA که درون یک تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید. در ستون را به آرامی ببندید. و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد تیوب ۲ میلی لیتری را دور بیاندازید.

۶- ستون استخراج RNA را درون یک تیوب ۲ میلی لیتری جدید (در کیت موجود است) قرار داده و 400ul از محلول شستشو شماره یک را مجددا به آن اضافه کنید درب ستون را به آرامی ببندید . و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید. (تیوب ۲ میلی لیتری در مرحله بعدی نیز استفاده خواهد شد).

۷- 400 ul از محلول شستشو شماره دو را به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید. سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که بـــــــــا flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید.

۸- 400 ul از محلول شستشو شماره دو را مجددا به همان ستون استخراج RNA که درون همان تیوب دو میلی لیتری قرار گرفته است منتقل کنید، در ستون را به آرامی ببندید و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از تیوب خارج کنید بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد محتویات تیوب ۲ میلی لیتری را خالی کنید.

۹- جهت اجتناب از آلودگی ستون با مقادیر اندک اتانل باقیمانده در محلول شستشو شماره دو در این مرحله بهتر است ستون استخراج RNA را با در بسته درون یک تیوب دو یا یک و نیم میلی لیتری جدید قرار داد و مجددا و سانتریفوژ کنید. ستون را به آرامی از درون تیوب خارج کنید و درون یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید قرار دهید.

۱۰- 30ul از محلول RNase free water را که تاکنون در هیتر بلوک 37-°C قرار گرفته بود را درست در مرکز غشا درون ستون اضافه کنید. جهت افزایش غلظت RNA استخراجی در این مرحله در ستون را به آرامی ببندید و به مدت سه دقیقه در حرارت اتاق و یا انکوباتور 37°C انکوبه نمایید و به مدت یک دقیقه در (≥13000 rpm) ≥12100 x g سانتریفوژ کنید.

۱۱- اگر میزان RNA مورد انتظار بیش از ۳۰ میکرو گرم باشد، مرحله قبل را با استفاده از ۲۰ میکرولیتر آب Rnase free دیگر تکرار کنید و اگر غلظت بالاتری از RNA مورد نیاز است همان محلول eluate ابتدایی را مجددا جمع آوری و مستقیما بر روی همان ممبران اضافه کنید و بلافاصله سانتریفوژکنید.

زمان و دور سانتریفوژ: به مدت یک دقیقه در (≥13000rpm) ≥12000 x g

نگهداری، تعیین کیفیت RNA استخراجی

نگهداری : RNA بدست آمده را در آب RNAse free نگهداری و ترجیحا در 70°C- و در غیر این صورت در 20°C- نگهداری کنید. در واکنش های Downstream جهت جلوگیری از تخریب RNA بدست آمده می توان از آنزیم Ribolock™ RNase Inhibitor (Eo0381) عموما با غلظت 1u/ul استفاده نمود.

سه راه برای کنترل کیفیت RNA استخراجی وجود دارد: تعیین غلظت، تعیین خلوص و مشاهده آن بر روی ژل.

ساده ترین راه برای برآورد خلوص و کیفیتRNA استخراجی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری است.

تعیین غلظت : حداکثر میزان جذب RNA در طول موج ۲۶۰ است و به عنوان یک قاعده کلی، قرایت یک OD در ۲۶۰ نانومتر معادل ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر RNA می باشد.

تعیین خلوص: نسبت جذب RNA استخراج شده را در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ به عنوان شاخص خلوص RNA در نظر گرفته می شود. در بسیاری از پروتکل ها میزان 260/280: 1.8-2.0 به معنی خلوص بالای RNA می باشد.

علاوه بر نسبت فوق، OD A260/230 نیز به عنوان معیاری جهت برآورد میزان آلودگی به پروتئین و املاح باقیمانده از پروتکل استخراج می باشد. تمایل این نسبت به سمت ۲,۰(۱,۶ به بالا) به معنی عدم آلودگی RNA بدست آمده به پروتئین و یا سایر املاح می باشد.

با استفاده از کیت CinnPure RNA Extraction غالبا نسبت های فوق در محدوده قابل قبول خواهد بود وRNA بدست آمده درتمامی پروتکل های Down stream قابل استفاده خواهد بود. در غیر این صورت و جهت رفع مقادیر بسیار اندک ناخالصی باقیمانده از LiCl استفاده نمایید.

به یاد داشته باشید که از همان آبRNase free که RNA استخراجی در آن حل شده است به عنوان بلانک استفاده کنید.

بررسی کیفیت RNA بر روی ژل:

ملکول های RNA را می توان بر روی ژل های معمولی و یا دناتوره و نیز با استفاده از ژل های آکریل آمید بررسی نمود. مزیت استفاده از ژل های معمولی عدم کاربرد مواد مضری مانند Formamide در آن می باشد اما با توجه به پیوند های قوی درون ملکولی تعیین دقیق اندازه ملکول های RNA بر روی ژل معمولی چندان دقیق نخواهد بود لذا جهت بررسی دقیق تر ملکول های RNA استفاده از ژل های دناتوره و یا بافر لودینگ حاوی فورم آمید پیشنهاد می گردد.

برای سهولت در کاربرد فورم آمید در ژل nativeمی توان از 2x RNA Loading Dye(R0641) و همچنین جهت تعیین سایز و برآورد غلظت RNA بر روی ژل native ویا دناتوره می توان از :

RiboRuler^{TM} High Range RNA Ladder, SM1821/3 استفاده نمود.

پس از الکتروفورز نمونه حاوی RNA ، رنگ آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید و تحت نور فرابنفش سه ناحیه بر روی ژل قابل بررسی خواهد بود. با توجه به میزان سلول های استخراج شده، نواحی 28S و 18S کاملا بر ژل متمایز خواهند بود. علاوه بر دو ناحیه فوق در قسمت انتهای ژل نیز باندهای سبک تر 5.8S و 5.0S نیز قابل مشاهد خواهند بود.

لازم به یادآوری است RNA28S تقریبا در ۵۰۰۰ باز و 18S تقریبا در ۱۹۰۰ باز قرار خواهد گرفت و نسبت 28S/18S تقریبا 2/1 خواهد بود. باند ضعیف و بالاتر از 28S متعلق به DNA باقیمانده می باشد. در اغلب پروتکل های Down Stream وجود مقادیر اندک DNA در نتیجه واکنش موثر نخواهد بود در غیر این صورت از آنزیمEN0521,3,5 DNase برای رفع آن استفاده کنید.

جهت بررسی و کنترل کیفیت این کیت از نمونه های سرمی آلوده به ویروس های HCV ، HIV طی واکنش qRTPCR، متعاقب سنتز cDNA و همچنین از سه تا چهار میلیون سلول CHO و جهت قرایت OD از NanoDrop1000 استفاده شده است.

230489