

Mammalian Blood RNA Extraction kit

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
RBC Lysis Buffer (1x)	150 ml	2-8 °C
Lysis Buffer	25 ml	
Wash Solution I	25 ml	دمای محیط
Wash Solution II* (concentrate)	5 ml	(15-25°C)
Elution Buffer	5 ml	
Spin Columns	50	—
Collection Tube	100	
Protocol	1	



Viragene®
Cell Discovery Solutions

* ۲۰ 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.

این کیت توانایی استخراج RNA با کیفیت و خلوص بالا در کمترین زمان را از نمونه خون کامل (Whole Blood) که حاوی ضد انعقادهایی مانند: سیترات و EDTA هستند، طراحی شده است.

نکات کلیدی:

- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.
- جهت دستیابی به بازدهی مطلوب، پیشنهاد می شود تمامی مراحل تا قبل از انتقال نمونه به ستون استخراج، روی یخ انجام شود.

میزان نمونه مورد نیاز:

خون پستانداران: ۱ ml - ۵۰۰ µl

موارد مورد نیاز:

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- آنزیم DNase I (در صورت نیاز به RNA عاری از DNA) (قابل سفارش از شرکت ویراژن)
- سانتریفیوژ یخچال دار
- β-mercaptoethanol
- سرنگ ۲-۵ ml

دستورالعمل:

- به ازای هر نمونه ۱۰۰۰ µl از محلول Lysis Buffer را با ۱۰۰ µl β-mercaptoethanol در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل بخوبی مخلوط کنید و تا زمان استفاده در دمای محیط (۲۵-۱۵ °C) انکوبه نمایید. توجه داشته باشید که این ترکیب همواره بصورت تازه آماده و قبل از شروع هر استخراج تهیه شود.
- قبل از شروع فرایند میکروتیوب حاوی نمونه را Vortex نکنید.
۱. ۱ ml - ۵۰۰ µl نمونه را بر روی یخ به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل اضافه نمایید.
۲. ۱ ml از محلول RBC Lysis Buffer (1x) را به میکروتیوب اضافه کرده و آن را به مدت ۱۰ دقیقه متناوباً invert نمایید.
۳. میکروتیوب را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ نمایید.
۴. سوپرناتانت با محلول رویی شفاف و قرمز رنگ را به دقت جدا کرده و دور بریزید.
توجه: در صورت عدم مشاهده رسوب سفید رنگ، مقدار کمی از سوپرناتانت را در میکروتیوب نگه دارید.
۵. مجدداً ۱ ml از محلول RBC Lysis Buffer (1x) را به رسوب سفید رنگ بر روی یخ، در میکروتیوب اضافه نموده و با انگشت به آهستگی به آن ضربه بزنید تا رسوب کاملاً در محلول حل شود.
توجه: میکروتیوب حاوی نمونه را Vortex نکنید.
۶. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ نمایید.
۷. سوپرناتانت با محلول رویی قرمز رنگ را به دقت جدا نموده و دور بریزید.
توجه: رسوب تشکیل شده در این مرحله ممکن است به خوبی قابل رویت نباشد، بنابراین با دقت سوپرناتانت را دور بریزید.
۸. از مرحله ۵ مجدداً تکرار نمایید.

۹. ۵۰۰ μl محلول از مخلوط Lysis Buffer و β-mercaptoethanol (که در ابتدای فرایند تهیه کرده اید) به نمونه اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه آن را Vortex نمایید.
 ۱۰. محلول را به درون سرنگ کشیده و سپس محتویات آن را با فشار به دیواره میکروتیوب، تخلیه نمایید. ۵ الی ۱۰ بار این کار را تکرار کنید.
 ۱۱. میکروتیوب را به مدت ۱۵ ثانیه Vortex کنید و در دمای ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. در طول این مدت زمان ۳ الی ۴ بار Vortex و Spin نمایید.
 ۱۲. ۳۰۰ μl اتانول مطلق اضافه نموده و سپس محتویات میکروتیوب را به آهستگی پیپتاژ نمایید.
 ۱۳. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.
 ۱۴. ستون -کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط (۱۵-۲۵°C) سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.
 ۱۵. ۵۰۰ μl محلول I Wash Solution 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.
 ۱۶. ۵۰۰ μl محلول II Wash Solution 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.
 ۱۸. ستون -کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
 ۱۹. کالکشن را دور انداخته و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
 ۲۰. ۱۰۰-۵۰ μl از محلول Elution Buffer را 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.
- * جهت ارزیابی نمونه استخراج شده، بهتر است به میزان ۱۰ μl از آن را در RT-PCR/PCR به کار ببرید.

راهنمای عیب یابی:

پیشنهادهات	دلایل احتمالی	ايرادات
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	خلوص یا بازدهی پایین RNA
قبل از استفاده از محلول II Wash Solution، به آن اتانول مطلق اضافه شود و پس از افزودن به خوبی ترکیب گردد و در دمای محیط نگهداری شود.	اتانول مطلق به محلول Wash Solution II اضافه نشده است.	
همواره میکروتیوب حاوی نمونه را پس از اضافه نمودن هر یک از بافرها یا محلول ها، به خوبی مخلوط نمایید.	مواد و نمونه به خوبی ترکیب نشده اند.	
در صورتی که سوپرناتانت به خوبی حذف نشود، پروتئین موجود در آن می تواند باعث جلوگیری از اتصال صحیح RNA به غشا ستون شود. لذا تا حد امکان سوپرناتانت را حذف کرده و یا بیشتر از ۲۰ μl باقی نگذارید.	باقی ماندن مقدار زیادی از سوپرناتانت در مرحله لیز گلبول قرمز	
از انجام صحیح مراحل شستشو اطمینان حاصل کنید. مراقب باشید که ستون پس از شستشو با محلول داخل کالکشن تماس پیدا نکند.	مقادیر نامناسب A260/230 در نانودراپ	کاهش عملکرد استخراج
بدلیل اختلاف در pH، صرفاً از محلول Elution Buffer موجود در کیت استفاده نمایید.	به جای Elution Buffer از آب استفاده شده است.	
محیط کار و وسایل باید عاری از RNase و استریل باشد تا از امکان آلودگی به RNase جلوگیری شود. RNA استخراج شده را سریعاً در مراحل بعدی، استفاده نمایید و یا در ۸۰°C نگهداری نمایید.	آلودگی به آنزیم RNase	عدم بازدهی RNA
از نمونه خون با ضد انعقاد مناسب استفاده شود. از نمونه های همولیز شده و نمونه هایی که لخته شده اند استفاده نشود. بهتر است همواره از نمونه خون تازه برای استخراج RNA استفاده شود.	استفاده از نمونه اولیه نامناسب	
مرحله ۱۶ را مجدداً تکرار نمایید تا محلول II Wash Solution کاملاً از محصول حذف گردد.	وجود باقی مانده اتانول در نمونه استخراج شده	مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج PCR، RT-PCR مانند: