BehPrep **Blood&Cells RNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Total RNA from RBC Lysed Blood Samples and Cultured Cells Based on Spin Column

Cat Number: BP109

Ver: 04

- کیت استخراج Total RNA از خون و سلول به روش ستونی بدون نیاز به استفاده از فنول و کلروفرم
- در یخچال (4 °C) نگهداری شود
- تاریخ انقضاء: سه سال پس از تولید

فهرست

محتویات کیت 3

شرایط پایداری و نگهداری 3

معرفی 3

حیطه کاربری 4

آنچه باید در مورد استخراج RNA بدانید 4

نکات مهم 5

مواد و تجهیزات مورد نیاز 5

نکات ایمنی 6

آماده سازی بافرها 6

Proteinase K 6

RC Buffer 10x 6

فرایند آماده سازی از خون محیطی 7

استخراج با استفاده از پروتئیناز K 7

استخراج با استفاده از 2ME 8

فرایند استخراج 8

بافی کوت 9

سلول‌های کشت داده شده معلق 10

سلول‌های کشت داده شده تک لایه 10

چالش‌ها و راه کارها 11

کاربردهای مولکولی بعد از استخراج 13

کیفیت RNA استخراج شده توسط کیت ویستا به ژن 13

کنترل کیفیت 14

تاریخچه ویرایش پروتکل 14

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش (BP109R010)	50 واکنش (BP109R050)	شرایط نگهداری
	HiPure RNA Mini Column	10	50	دمای اتاق
	Collection Tube	40	200	دمای اتاق
BR137	RL Buffer	4 mL	20 mL	دمای یخچال
BR134	RW1	8 mL	43 mL	دمای یخچال
BR135	RW2	16 mL	80 mL	دمای یخچال
BR136	REB	1 mL	5 mL	دمای یخچال
BR105	Proteinase K	1 vial (4mg)	1 vial (20mg)	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	د مای اتاق
BR148	2ME	300µL	300µL	دمای یخچال
BR147	RC buffer 10x	6mL	60mL	دمای یخچال

شرایط پایداری و نگهداری

- تمام محتویات کیت در صورت نگهداری مناسب در یخچال، تا پایان تاریخ درج شده بر روی برچسب پایداری خواهند داشت.
- همه محلول‌ها شفاف بوده و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد.
- تمام بافرها را قبل از استفاده به دمای محیط برسانید.

معرفی

کیت استخراج Behprep Blood & Cell RNA با متد آسان و بازدهی بالا بدون نیاز به استفاده از فنول و کلروفرم به روش ستونی طراحی شده است. RNA استخراج شده در این روش دارای خلوص بالا و کمترین میزان آلودگی‌های پروتئینی، نمکی، و مهارکننده‌های PCR می‌باشد.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep Blood& Cells RNA جهت استخراج دستی Total RNA از نمونه خون و سلول‌های کشت داده شده به روش ستونی طراحی و بهینه‌سازی شده است.

آنچه باید در مورد استخراج RNA بدانید

1. محیط استخراج RNA و تمامی وسایل مورد استفاده در این فرایند (تیوب‌ها،سرسمپلرها و ...) باید RNase-free باشند.
2. اتانول 70% می‌تواند باعث مهار آنزیم RNase گردد، از این رو تمیز کردن محیط استخراج RNA با آن، موجب جلوگیری از تخریب RNA استخراج شده می‌شود.
3. در صورت آلودگی شدید با آنزیم RNase می‌توان محیط استخراج را با استفاده از SDS 1% شستشو داد.
4. استفاده از نمونه تازه جهت استخراج RNA تخریب نشده و سالم الزامی است.
5. استفاده از حجم نمونه کمتر از مقدار توصیه شده باعث کاهش غلظت و کیفیت RNA استخراج شده می‌شود.
6. استفاده از حجم نمونه بیشتر از مقدار توصیه شده باعث افزایش تخریب RNA و کاهش کیفیت RNA استخراج شده می‌شود.
7. توصیه می‌شود ساخت cDNA و یا سایر فرایندهای مولکولی بعد از استخراج، بلافاصله بعد از استخراج انجام شود.
8. در صورت نیاز به نگهداری RNA استخراج شده، می‌توان آن را به مدت یک هفته در دمای 20 °C- یا به مدت یکماه در دمای 40 °C- نگهداری کرد.
9. در صورت نیاز به نگهداری به مدت طولانی تر، می‌توان آن را در دمای 80 °C- قرار داد یا در 500 µL اتانول 70% در دمای 20 °C-نگهداری کرد. (در روش دوم، RNA به هنگام نیاز باید به روش رسوبی جداسازی شود).

10. جهت جلوگیری از تکرار چرخه ذوب-انجماد، RNA استخراج شده را در حجم های برابر الیکوت کنید.
11. RNA با کیفیت، دارای غلظت مناسب، OD 260/280>1.9 و OD 260/230>1.9 می‌باشد. همچنین بر روی ژل‌های احیاکننده، باند 18s و 28s به صورت کامل مشخص می‌باشد. (28s > 18s)

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از استفاده، بافرها را کاملا همگن نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشاء ستون خودداری کنید.
- بعد از هر انتقال مایع بوسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتر دار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسل، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

مواد و تجهیزات مورد نیاز

- سمپلر 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase–free)
- میکروتیوب 1.5 mL (RNase, DNase–free)
- PBS (cat:BR202) در صورت استخراج از سلول‌های کشت داده شده
- اتانول 70%
- دستکش یکبار مصرف

نکات ایمنی

- قبل از شروع فرایند استخراج محیط کار را با استفاده از الکل 70% تمیز کنید.
- بافرهای شستشو حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه‌شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی بافرها

Proteinase K

میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.

مقدار پروتئیناز K	4 mg	20 mg
مقدار بافر PK	200 µL	1 mL

- **توجه داشته باشید آنزیم آماده شده باید در دمای 20 °C– نگهداری شود.**

RC Buffer 10x

بافر RC Buffer معمولا به صورت 10X است. لطفاً میزان مورد نیاز را با استفاده از آب مقطر سترون به صورت 1x آماده کنید.

(به ازای هر 1 mL RC buffer 10x، میزان 9 mL آب مقطر استفاده کنید).

- **توجه**: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

فرایند آماده سازی از خون محیطی

نکته: استفاده از حجم بیشتر نمونه اولیه در این فرایند توصیه نمی‌شود.

1. میزان 1–3 mL خون را درون لوله فالکون ریخته و سه برابر حجم خون (3–9 mL) بافر RC buffer 1x به آن اضافه نمایید. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا ظاهر محلول از کدر به شفاف تبدیل شود.
2. نمونه خون لایز شده را به مدت 5 دقیقه در 1000 x g سانتریفیوژ کنید تا رسوب سلولی تشکیل شود. سپس مایع رویی را دور بریزید.
3. در صورت مشاهده خون بر روی رسوب سلولی، رسوب تشکیل شده را در با RC buffer 1x حجم برابر با مقدار خون اولیه (1–3 mL) حل کنید، سپس به مدت 3 دقیقه در 1000 x g سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را به آرامی و بدون آسیب به رسوب سلولی تشکیل شده دور بریزید.

نکته :

- بافر 2ME در مقایسه با پروتئیناز K خاصیت مهارکنندگی RNase قوی تری دارد و بدون استفاده از دما فرایند آن انجام می شود.
- پروتئیناز k در مقایسه با 2ME بوی نامطبوع ندارد و با استفاده از دما انجام می شود.

استخراج با استفاده از پروتئیناز K

1. میزان 350 µL بافر لایز RL و 15 µL پروتئیناز k را به رسوب سلولی اضافه کرده و آن را به وسیله ورتکس کاملا حل نمایید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.
2. جهت لایز کامل نمونه، میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56 °c انکوبه کنید. در طول انکوباسیون، تیوب را دو مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-Vortex کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.
3. در ادامه مطابق با فرایند استخراج، عمل نمایید.

استخراج با استفاده از 2ME

1. میزان 350 µL بافر لایز RL و 5 µL بافر 2ME را به رسوب سلولی اضافه کرده و آن را به وسیله ورتکس کاملا حل نمایید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.
2. جهت لایز کامل نمونه، میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. در طول انکوباسیون، تیوب را دو مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-Vortex کنید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.
3. در ادامه مطابق با فرایند استخراج، عمل نمایید.

فرایند استخراج

1. میزان 350 µL اتانول 70% را اضافه کرده و به وسیله سمپلر کاملا همگن کنید.
2. تمام محتویات میکروتیوب را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون انتقال دهید و به مدت 1 دقیقه در (8000 rpm) 6000 x g سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درون کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
3. میزان 700 µL بافر RW1 را به مرکز غشاء ستون اضافه کرده و در 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درون کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
4. میزان 750 µL بافر RW2 را به مرکز غشاء ستون اضافه کرده، ستون را به مدت 1 دقیقه در (8000 rpm) 6000 x g سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درون کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
5. مرحله 4 را دوباره تکرار کنید.
6. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملا خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

- توصیه می‌شود در مرحله 5 کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) انتقال دهید.
- هرگونه انتقال بافر RW2 در این مرحله می‌تواند بعنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.
- انجام این مرحله از انتقال بافر RW2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.

7. ستون را درون میکروتیوب 1.5 mL RNase-free (توسط کاربر فراهم گردد) قرار دهید و میزان 60 µL بافر REB از پیش گرم شده در دمای 60 °C را به مرکز غشاء ستون اضافه کنید و به مدت 5 قیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
8. ستون را به مدت 1 دقیقه در 13000 rpm سانتریفیوژ کنید.

غلظت و خلوص RNA استخراج شده (OD 260/230 , OD 260/280) را با استفاده از دستگاه نانودراپ یا اسپکتروفتومتر سنجش نمایید.

بافی کوت

نکته: با توجه به اینکه میزان سلول جداشده از بافی کوت وابسته به نحوه برداشت آن می باشد، می تواند متفاوت باشد و امکان جداسازی تمام سلول های موجود در لایه بافی کوت وجود ندارد به این دلیل غلظت به دست آمده در نمونه های بافی کوت عموما کمتر از نمونه خون مستقیم است از این رو پیشنهاد می شود در صورت امکان از نمونه خون مستقیم استفاده شود.

1. مقدار 2-10 mL خون را با سرعت 1000 x g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس با استفاده از سمپلر 500 µL از لایه بافی کوت را جدا کنید و به میکروتیوب منتقل کنید.
2. مقدار 3 برابر حجم بافی کوت (1.5ml) از بافر RC buffer 1x را به نمونه بافی کوت اضافه کرده و ورتکس نمایید. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا ظاهر محلول از کدر به شفاف تبدیل شود.
3. نمونه بافی کوت لایز شده را به مدت 5 دقیقه در 1000 x g سانتریفیوژ کنید تا رسوب سلولی تشکیل شود. سپس مایع رویی را دور بریزید.

4. در ادامه مطابق با فرایند استخراج با استفاده از پروتئیناز K یا با استفاده از 2ME ،عمل نمایید.

سلول‌های کشت داده شده معلق

نکته: استفاده از حجم بیشتر نمونه اولیه در این فرایند توصیه نمی‌شود.

1. تعداد 20–1 میلیون سلول را سانتریفیوژ کنید تا رسوب سلولی تشکیل شود. بدون آسیب به رسوب سلولی تشکیل شده، مایع رویی را کامل دور بریزید.

2. رسوب سلولی را در 1 mL بافر PBS (1x) حل کرده و دوباره سانتریفیوژ کنید تا رسوب سلولی تشکیل شود. به آرامی و بدون آسیب به رسوب سلولی تشکیل شده، مایع رویی را کامل دور بریزید.

3. در ادامه مطابق با فرایند استخراج با استفاده از پروتئیناز K یا با استفاده از 2ME ،عمل نمایید.

سلول‌های کشت داده شده تک لایه

نکته: استفاده از حجم بیشتر نمونه اولیه در این فرایند توصیه نمی‌شود.

1. این پروتکل جهت استخراج RNA از تعداد 20–1 میلیون سلول طراحی شده است.
2. محیط کشت را دور بریزید و سلول‌ها را به وسیله بافر PBS (1x) شستشو دهید.
3. . در ادامه مطابق با فرایند استخراج با استفاده از پروتئیناز K یا با استفاده از 2ME ،عمل نمایید.

چالش‌ها و راه کارها

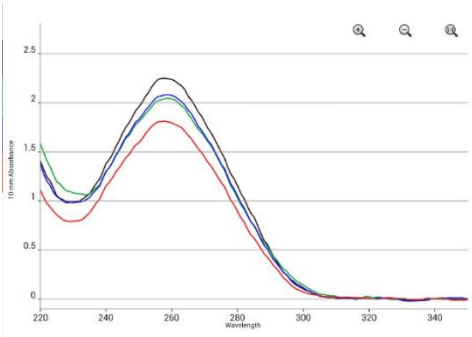
مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین RNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• بافر الوشن حتما باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید.
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون با بافر RL را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید.
	نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	• از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. • از نمونه خون که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. • برای جلوگیری از فعالیتRNase ، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. • نمونه گیری را تکرار کنید.
	محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است.	• زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید. • حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید. • مقدار زیادی از نمونه خون را استفاده کرده اید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.
	مسدود شدن غشاء ستون	• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد. • ا ز تعداد سلول بیشتر از مقادیر توصیه شده استفاده نشود.
پایین بودن نسبت A260/A280	آلودگی پروتئینی	• از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر RL و اتانول اطمینان حاصل نمایید.

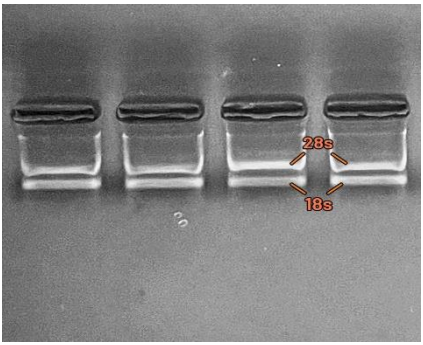
		• برای جلوگیری از انتقال بافر RW2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود. • از عدم تماس غشاء ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید. • بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید. • از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید.
پایین بودن نسبت A260/A230	آلودگی نمکی	• در حین فرآیند ستون‌ها را به آرامی جا به جا کنید. • درب ستون‌ها را به آرامی باز و بسته نمایید. • از انتقال حباب‌های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. • از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.
تخریب RNA	RNase سلولی یا محیطی	• مقدار زیادتر از حجم نمونه ذکر شده استفاده نکنید. • از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. • آلودگی RNase محیطی را به حداقل برسانید. • حداالامکان از نمونه تازه استفاده کنید.

کاربردهای مولکولی بعد از استخراج

1. RNA استخراج شده به مدت یک هفته در دمای 20 °C– و به مدت یک ماه در دمای 40 °C– پایدار خواهد بود.
2. میزان 500–1000 ng از RNA استخراج شده را برای سنتز cDNA استفاده نمایید.
3. توصیه می‌شود RNA را بلافاصله بعد از استخراج، جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار دهید.

کیفیت RNA استخراج شده توسط کیت ویستا به ژن





کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت‌های (LOT NO.) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به‌ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرارگرفته‌است.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نسخه جدید	1402/08
01	افزودن توضیحات RBC Lysis	1403/02
02	• افزودن پروتئیناز K و PK بافر به کیت • تغییر و بهینه سازی در فرآیند آماده سازی بافر ها • تغییر و بهینه سازی فرآیند استخراج	1403/08
03	• افزایش حجم WB1	1404/07
04	• اضافه شدن RC BUFFER 10X به محتویات کیت	1404/10

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دمایی	+27 +18	کاربرد تشخیصی	IVD
تعداد تست	Σ	اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستورالعمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا	REF	شماره سری ساخت	LOT

شـرکت دانـش بنیـان ویسـتا زیسـت فنـاوری بـه ژن

آدرس: شـیراز، منطقـه ویـژه اقتصادی،فـاز دوم، جنـب میـدان صـادرات

شـماره تمـاس: 09053633840 شـماره پشـتیبانی فنـی: 09170093664

کدپسـتی: 7159115468 وبسـایت: www.BehGene.com