BehPrep **FFPE RNA** Extraction Kit

For Manual Purification of Total RNA from Paraffin-Embedded(FFPE) Tissues based on spin column

Cat Number: BP116

Ver: 01

- در دمای اتاق نگهداری شود
- تاریخ انقضاء: سه سال پس از تولید

فهرست

محتویات کیت 3

شرایط پایداری و نگهداری 3

معرفی 4

حیطه کاربری 4

نکات مهم 4

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند 5

نکات ایمنی 6

آماده سازی بافرها 6

Proteinase K 6

Binding Buffer 6

استخراج RNA از بافت های فیکس شده در پارافین (FFPE Tissue) 7

فرآیند 7

استخراج RNA از بافت های فیکس شده در فرمالین 10

چالش‌ها و راه کارها 13

کنترل کیفیت 15

تاریخچه ویرایش پروتکل 16

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش (BP116R010)	50 واکنش (BP116R050)	100 واکنش (BP116R100)	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400 pcs	دمای اتاق
BR209	Deparaffinization solution	5 mL	21 mL	42 ml	دمای اتاق
BR154	Binding Buffer	4 mL	12 mL	24 ml	دمای اتاق
BR102	WB1 Buffer	7 mL	30 mL	58 ml	دمای اتاق
BR103	WB2 Buffer	13 mL	62 mL	125 ml	دمای اتاق
BR104	EB Buffer	3 mL	11 mL	22 ml	دمای اتاق
BR152	FRL Buffer	4 mL	12 mL	24 ml	دمای اتاق
BR105	Proteinase k	1 vial (4mg)	1 vial (30mg)	1 vial (60mg)	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	2 ml	دمای اتاق

شرایط پایداری و نگهداری

- ستون‌ها در کیسه‌های زیپ دار بسته بندی شده‌اند و در دمای اتاق (18–25 °C) تا پایان تاریخ انقضاء کیت پایداری خواهند داشت.
- همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد.

- محلول‌ها را در دمای اتاق (18–25 °C) و یا در حمام آب 37 °C گرم کنید تا رسوبات حل شوند.
- بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشند که هیچ تأثیری در عملکرد آنها نخواهد داشت.
- درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید.
- بافر FRL جهت تسهیل در فرایند جداسازی فازها، به رنگ آبی می باشد.

توجه: نگهداری در دمای 2–8 °C (یخچال) یا 15 °C– تا 25 °C– (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص RNA خواهد گذاشت.

معرفی

نمونه های بافتی تثبیت شده با پارافین یا FFPE به طور معمول از بافت‌های جراحی شده انسانی بدست می‌آید و یک روش رایج جهت حفظ و بایگانی نمونه های بافتی است. نمونه‌های بافت FFPE منبع ارزشمندی برای استخراج RNA می‌باشند که اغلب به دلیل کیفیت نمونه ذخیره شده (سن بافت، شرایط نگهداری، نسبت بافت به پارافین و ..) می‌تواند چالش برانگیز باشند.

- کیت BehPrep FFPE RNA Extraction Kit شرایط بهینه‌ی لایز را برای رفع این چالش ها مهیا می کند. در این کیت پارافین زدایی بدون نیاز به مواد شیمیایی سمی نظیر زایلن انجام می‌شود، همچنین احتیاج به انکوباسیون over night جهت لایز نمونه ندارد.

نکته: فرایند تثبیت بافت در فرمالین باعث Cross-link پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد که همین امر باعث تغییراتی در RNA و DNA می شود که می تواند تجزیه وآنالیز RNA و DNA جدا شده از FFPE را در مراحل بعدی مهار کند.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep FFPE RNA Extraction Kit جهت استخراج دستی RNA از نمونه FFPE با روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است. در این کیت RNA با

کیفیت بالا و بدون استفاده از زایلن استخراج گردیده و جهت استفاده در توالی یابی، qPCR/RT-qPCR ، آنالیز STR و دیگر تست های مولکولی کاربرد دارد.

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18–25 °C) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد-ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً همگن نمایید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- بعد از هر انتقال مایع به وسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتردار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشاء ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسل، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند

- سمپلر 10–100 µL و 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک (دمای 56°C و 80 °C)
- میکروسانتریفیوژ

- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای Binding، FRL و WB1 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.

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

مقدار پروتئیناز K	4 mg	30 mg
مقدار بافر PK	200 µL	1000 µL

Binding Buffer

مقدار مناسب اتانول 100 یا 96 درصد را مطابق جدول زیر به بطری حاوی Binding Buffer اضافه کرده و پس از بستن درب بطری به مدت 20 ثانیه به خوبی مخلوط

کنید. Binding Buffer آماده مصرف می‌باشد. **(توجه داشته باشید به منظور جلوگیری از رسوب بافر، آن را در دمای اتاق نگه دارید)**

مقدار Binding Buffer	4 mL	12 mL
مقدار اتانول	7 mL	21 mL

توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

استخراج RNA از بافت های فیکس شده در پارافین (FFPE Tissue)

- طول RNA استخراج شده با توجه به نوع، سن بافت و کیفیت مواد مورد استفاده در تثبیت بافت، معمولاً 650 bp< می باشد.
- استفاده از تثبیت کننده‌هایی نظیر اسمیم تتراکسید (Osmium tetroxide) که باعث Cross-linking می‌شود، توصیه نمی‌گردد؛ زیرا این مواد، استخراج RNA از بافت‌های تثبیت شده را دشوار می‌سازد.
- زمان لایز به سایز و سن بافت مورد استفاده بستگی دارد؛ بنابراین کاهش میزان RNA استخراج شده از بافت FFPE نسبت به بافت تازه، طبیعی است.

فرآیند

1. میزان 10–30 mg از بافت تثبیت شده در پارافین را در یک میکروتیوب 1.5 mL Nuclease–Free قرار دهید. (جهت دوفازی شدن محلول و جداسازی لایه زیرین استفاده از میکروتیوب 1.5ml توصیه می شود).

- توصیه می‌شود میزان بافت مورد نظر توسط دستگاه میکروتوم (معادل 3 تا 10 برش به ضخامت 5–10 µm، با توجه به نوع و حجم بافت) برش داده شود.
- در صورت نسبت بالای مقدار پارافین به بافت، ابتدا پارافین ها را با استفاده از تیغ استریل تمیز جدا کنید و سپس به میکروتیوب منتقل کنید.

2. میزان µl 400 بافر Deparaffinization Solution را اضافه کرده و ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند، و به مدت 5 دقیقه در دمای 80°C انکوبه نمایید. (در طول زمان انکوباسیون دو بار ورتکس کنید).

3. میزان µl 180 بافر FRLرا اضافه کرده و ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شوند. سپس به مدت 15 ثانیه در g x 10000 سانتریفیوژ کنید. در این مرحله دو لایه تشکیل می‌شود که لایه زیرین آبی رنگ است.

4. میزانµl 20 پروتئیناز K با احتیاط کامل و بدون بر هم خوردن لایه ها، به لایه آبی رنگ زیرین اضافه کنید. این کار بصورت pipetting جهت هموژنایز شدن کامل پروتئیناز و همگن شدن رسوب بافت در لایه آبی رنگ زیرین صورت گیرد.
5. میکروتیوب را به مدت 1 ساعت در دمای 56°C انکوبه کنید. از ورتکس دادن اجتناب کنید تا ترتیب لایه ها حفظ شود. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).
6. سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 80°C انکوبه کنید. از ورتکس دادن اجتناب کنید تا ترتیب لایه ها حفظ شود. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).
7. میکروتیوب را به مدت 3 دقیقه بر روی یخ قرار دهید و سپس 15 دقیقه در g x 10000 سانتریفیوژ کنید. در این مرحله با احتیاط و بدون کشیدن رسوب بافت هایی که لایز نشده اند (در صورت تشکیل) میزان µL 150 مایع آبی رنگ زیرین را جدا کنید و به میکروتیوب جدید (Nuclease-free) منتقل کنید.

- انتقال لایه روغنی در فاز بالایی به میکروتیوب را به حداقل برسانید. با این حال مقدار کمی از آن تاثیری بر روی نتیجه نمی گذارد.

8. میزان µl 550 از Binding Buffer آماده شده را به نمونه (مایع جدا شده) اضافه کنید و 10 ثانیه Pulse-vortex کنید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

9. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را، بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید، و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
10. میزان µL 500 بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
11. میزان µL 600 بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
12. بار دیگر مرحله 11 را تکرار نمایید.

- در این مرحله مقدار الوشن مورد نیاز را که بهتر است بصورت گرم شده استفاده شود، در دمای 60 °C قرار دهید.

13. ستون را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور بریزید.

- برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.
- توصیه می‌شود قبل از این مرحله 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 WB2 در این مرحله، می‌تواند بعنوان بازدارنده در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج عمل کند.

- انجام این مرحله از انتقال بافرWB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.

14. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در میکروتیوب 1.5 mL Nuclease-free جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. میزان 50 µL بافر EB را که از قبل در دمای 60°C گرم شده است، به مرکز غشای ستون اضافه کنید. ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- میزان RNA استخراج شده به حجم و نوع بافت مورد استفاده بستگی دارد. به طور کلی میزان نهایی RNA استخراج شده از 10–30 mg بافت پارافینه، 3–6 µg با کیفیت A260/280 ratio=1.9–2 خواهد بود.

- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر EB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج RNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج RNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر EB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج RNA را افزایش خواهد داد.

- RNA استخراج شده را می توان به مدت 1 هفته در دمای 20°C– ذخیره نمایید

استخراج RNA از بافت های فیکس شده در فرمالین

1. میزا ن 10–30mg از بافت تثبیت شده در فرمالین را در یک میکروتیوب 2 mL قرار دهید.

2. میزان 1mL اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 10 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس اتانول را خارج کرده ومیزان 1 mL اتانول 70% اضافه کنید و بعد از10 دقیقه انکوباسیون در دمای محیط همین روند را با اتانول 50% نیز انجام دهید. این مرحله جهت هیدراته کردن بافت انجام می گیرد.

3. میکروتیوب را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به بافت، مایع رویی (supernatant) را به وسیله پیپت جدا کرده و دور بریزید.
4. میزان 1 mL آب مقطر را به رسوب اضافه کرده و ورتکس کنید. میکروتیوب را با حداکثر سرعت به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید. با احتیاط کامل و بدون آسیب رساندن به بافت، مایع رویی (supernatant) را بطور کامل جدا کرده و دور بریزید.
5. میزان 180µl بافر TL را به رسوب اضافه کنید. سپس میزان 20µl پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملا مخلوط نمایید. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.

6. میکروتیوب را به مدت 1 ساعت در دمای 56°C انکوبه کنید. سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 80°C انکوبه کنید. در طول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید. (عدم رعایت دما و زمان گفته شده در این مرحله باعث کاهش راندمان استخراج خواهد شد).
7. میکروتیوب را به مدت 3 دقیقه بر روی یخ قرار دهید و سپس 15 دقیقه در 10000 x g سانتریفیوژ کنید. با احتیاط و بدون کشیدن رسوبی از بافت های که لایز نشده اند (در صورت تشکیل) محلول رویی را به میکروتیوب جدید (Nuclease-Free) منتقل کنید.
   - مراقب باشید رسوب تشکیل شده همراه با محلول رویی به میکروتیوب انتقال داده نشود. چنانچه این مرحله به درستی انجام نگیرد، کیفیت RNA استخراج شده را تحت تأثیر قرار خواهد داد.
8. میزان 550µl بافر Binding آماده شده را اضافه کنید و 10 تا 15 ثانیه Pulse-vortex کنید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
   - در این مرحله امکان تشکیل کلاف سفید رنگ در نتیجه افزودن Binding buffer وجود دارد که باید به طورکامل به ستون انتقال داده شود.

- به یاد داشته باشید استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول ممکن است باعث کاهش بازده در فرآیند استخراج شود.

9. در ادامه مطابق پروتکل استخراج از بافت پارافینه، از مرحله 9 عمل نمایید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین RNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• در ابتدا مقدار پارافین اضافه را به وسیله تیغ استریل از بافت جدا کنید. • با مقدار بیشتر نمونه تست را دوباره تکرار کنید. • 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 را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر لایز مخلوط نمایید. • نمونه بافت FFPE را به برش های کوچکتری تبدیل کنید. • اگر بافت به خوبی لایز نشده است زمان انکوباسیون با بافر FRL را تا 2 ساعت افزایش دهید.
	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 بافت 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.
	عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	• مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج RNA را با نمونه جدید تکرار کنید. • آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود. • آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید.

		• پس از اضافه کردن پروتئیناز K به نمونه فوراً آن را پیپتاژ کنید تا رسوب بافت حل شود.
	استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول	• استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.
	مسدود شدن غشاء ستون	• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد. • قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید. • 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. • در زمان کشیدن لایه آبی رنگ زیرین اگر رسوبی از بافت های لایز نشده ته نشین شده بود از جمع آوری آن توسط سمپلر و بردن بر روی ستون خودداری کنید.
پایین بودن نسبت A260/A280	آلودگی پروتئینی	• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند، بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر Binding،FRL و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می شود. • از عدم تماس غشای 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. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم. • به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده سازی باید در 20°C- نگهداری شود.
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.
قطعه قطعه شدن RNA	ورتکس پیاپی	• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با اتانول، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید. • از کیفیت بافت مورد استفاده اطمینان حاصل کنید. • از نمونه بافت با، سن کمتر استفاده کنید.

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	1403/03
01	افزایش حجم WB1	1404/07

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دمایی		کاربرد تشخیصی	
تعداد تست		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: 07191009596 امور مشتریان: 09912070924

کدپسـتی: 7159115468 وبسـایت: www.BehGene.com