BehPrep **TRI Total RNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Total RNA
Based On Spin Column

Cat Number: BP108

Ver: 03

- 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 6

نکات ایمنی 6

آماده سازی بافرها 7

RC Buffer10x 7

مواد و تجهیزات مورد نیاز 7

فرایند استخراج RNA 8

خون محیطی 8

بافی کوت 9

سلول‌های کشت داده شده معلق 10

سلول‌های کشت داده شده تک لایه 11

بافت تازه 11

بافت گیاهی 11

چالش‌ها و راه کارها 13

کاربردهای مولکولی بعد از استخراج 15

کیفیت RNA استخراج شده توسط کیت به ژن 15

کنترل کیفیت 15

تاریخچه ویرایش پروتکل 16

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش (BP108R010)	50 واکنش (BP108R050)	شرایط نگهداری
	HiPure RNA Mini Column	10	50	دمای اتاق
	Collection Tube	40	200	دمای اتاق
BR133	Trizol	7 mL	32 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
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 TRI Total RNA Extraction با بازدهی بالا جهت استخراج Total RNA از انواع نمونه های خون، بافی کوت، بافت تازه، بافت تازه گیاهی، سلول‌های کشت داده شده تک لایه و سلول‌های کشت داده شده معلق 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 TRI Total RNA جهت استخراج دستی Total RNA از سلول و بافت به روش ستونی طراحی و بهینه سازی 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 1% SDS شستشو داد.
4. استفاده از نمونه تازه جهت استخراج RNA تخریب نشده و سالم الزامی است.
5. جهت ماندگاری و حفظ کیفیت نمونه‌های بافت تازه، می‌توان آنها را در ازت مایع Snap Freeze نمود.
6. استفاده از حجم نمونه کمتر از مقدار توصیه شده باعث کاهش غلظت و کیفیت RNA استخراج شده می‌شود.
7. استفاده از حجم نمونه بیشتر از مقدار توصیه شده باعث افزایش تخریب RNA و کاهش کیفیت RNA استخراج شده می‌شود.

8. در کیت‌های استخراج RNA بر پایه فنل-کلروفرم خلوص RNA بالاتر و آلودگی DNA کمتر می‌باشد.
9. در کیت‌های استخراج RNA بر پایه فنل-کلروفرم، به دلیل عدم آلودگی DNA، غلظت نهایی RNA در مقایسه با دیگر کیت‌ها کمتر است اما مقدار نهایی RNA بیشتر می‌باشد.
10. استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار جهت بدست آوردن RNA بدون آلودگی فنولی و نمکی الزامی است.
11. کیت‌های استخراج RNA برپایه فنول-کلروفرم توانایی استخراج RNA کوچک (کمتر از 200 نوکلئوتید) را دارند.
12. افزایش میزان نمونه اولیه تا حد توصیه شده می‌تواند مقدار miRNA استخراج شده را بصورت تصاعدی افزایش دهد.
13. بدلیل استفاده از فنول و کلروفرم در این فرایند، استفاده از هود شیمیایی در حین فرایند استخراج توصیه می‌شود.
14. بدلیل خلوص بالای RNA و عدم آلودگی DNA در این روش، میزان 500 ng تا 1 µg از RNA استخراج شده جهت ساخت cDNA با کیفیت کافی می‌باشد. (ساخت cDNA با مقادیر کمتر از 500 ng نیز امکان پذیر می‌باشد.)
15. توصیه می‌شود ساخت cDNA و یا سایر فرایندهای مولکولی بعد از استخراج، بلافاصله بعد از استخراج انجام شود.
16. 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.
17. 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).

18. جهت جلوگیری از تکرار چرخه ذوب-انجماد، RNA استخراج شده را در حجم های برابر الیکوت کنید.
19. 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.

نکات ایمنی

- استفاده از هود شیمیایی جهت رعایت اصول ایمنی پیشنهاد می‌شود.
- 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.
- بافر Trizol حاوی ترکیبات فنولی می‌باشد، بنابراین از تماس با پوست و یا استنشاق آن جدا خودداری نمایید.

- 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

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 می باشند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز

- سمپلر 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase–free)
- میکروتیوب 1.5 mL (RNase, DNase–free)
- سانتریفیوژ یخچال‌دار
- PBS (cat:BR202) در صورت استخراج از سلول‌های کشت داده شده
- نیتروژن مایع و هاون در صورت استخراج از بافت تازه
- اتانول 100%
- کلروفرم
- دستکش یکبار مصرف

فرایند استخراج RNA

خون محیطی

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

1. میزان 1–5 mL خون را درون لوله فالکون ریخته و سه برابر حجم خون (3–15 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 RC buffer 1x با حجم برابر با مقدار خون اولیه (1–5 mL) حل کنید ، سپس به مدت سه دقیقه در 1000 x g سانتریفیوژ کنید.
4. محلول رویی را به آرامی و بدون آسیب به رسوب سلولی تشکیل شده، دور بریزید سپس میزان 600 µL بافر Trizol را به رسوب سلولی اضافه کرده و آن را بوسیله ورتکس کاملا حل نمایید.
5. جهت لایز کامل نمونه، میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
6. میزان 120 µL کلروفرم را به نمونه آماده سازی شده اضافه کنید و به شدت تکان دهید.سپس اجازه دهید دو فاز مجزا تشکیل شود.
7. میکروتیوب را در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه در 13000 rpm سانتریفیوژ نمایید.

نکته: عدم استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در این مرحله باعث کاهش کیفیت استخراج می‌شود.

8. بعد از سانتریفیوژ سه فاز تشکیل می‌شود. فاز رویی (350–400 µL) را به آرامی و بدون برهم زدن فاز میانی، به یک میکروتیوب جدید انتقال دهید. میزان 500 µL اتانول 100% را اضافه کرده و محتویات میکروتیوب را کاملا همگن کنید.

9. تمام محتویات میکروتیوب را بدون تماس به دیواره و غشاء به ستون انتقال دهید و به مدت 30 ثانیه 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.
10. میزان 700 µL بافر RW1 را به مرکز غشاء ستون اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درون کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
11. میزان 750 µL بافر RW2 را به مرکز غشاء ستون اضافه کرده، ستون را به مدت 30 ثانیه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را درون کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
12. مرحله 11 را دوباره تکرار کنید.
13. ستون را به مدت 3 دقیقه در 13000 rpm سانتریفیوژ نمایید.

توجه: انجام مرحله 13 برای جلوگیری از انتقال بافرهای شستشو توصیه می‌شود.

14. ستون را درون میکروتیوب 1.5 mL تمیز (توسط کاربر فراهم گردد) قرار دهید و میزان 50 µL بافر REB از پیش گرم شده در دمای 60 °C را به مرکز غشاء ستون اضافه کنید. ستون را به مدت 5 قیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
15. ستون را به مدت 1 دقیقه در 13000 rpm سانتریفیوژ کنید.
16. 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: استفاده از حجم بیشتر نمونه اولیه در این فرایند توصیه نمی‌شود.

1. مقدار 1–3 mL خون را با سرعت 2000 x g به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس با استفاده از سمپلر 300 µL از لایه بافی کوت را جدا کنید و به میکروتیوب منتقل کنید.
2. مقدار 800 µL از بافر Trizol را به نمونه بافی کوت اضافه کرده و ورتکس نمایید.
3. جهت لایز کامل نمونه، میکروتیوب را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
4. میزان 200 µL کلروفرم را به نمونه آماده سازی شده اضافه کنید و به شدت تکان دهید. سپس اجازه دهید دو فاز مجزا تشکیل گردد. در ادامه مطابق با فرایند استخراج از خون محیطی، از مرحله 7 عمل نمایید.

نکته 1 : درمورد بافی کوت، حجم فاز رویی بعد از سانتریفیوژ 500–600 µL خواهد بود که می‌بایست جدا گردد.

نکته 2 : با توجه به اینکه مجموع حجم مایع رویی و اتانول در مورد بافی کوت حدود 1 mL خواهد بود، می‌بایست این دو مقدار در دو مرحله به روی ستون منتقل شود.

سلول‌های کشت داده شده معلق

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

1. تعداد 1–20 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. در ادامه مطابق با فرایند استخراج از خون محیطی، از مرحله 4 عمل نمایید.

سلول‌های کشت داده شده تک لایه

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

1. محیط کشت را دور بریزید و سلول‌ها را(تعداد 20–1 میلیون سلول) به وسیله بافر PBS (1x) شستشو دهید.
2. میزان 600 µL بافر Trizol را به سلول‌ها اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملا همگن نمایید. سپس محلول را به یک میکروتیوب منتقل کنید. در ادامه مطابق فرایند استخراج از خون محیطی، از مرحله 5 عمل نمایید.

بافت تازه

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

1. میزان 100–20 mg بافت تازه را درون نیتروژن مایع با استفاده از هاون یا هموژنایزر کاملا پودر کنید.
2. بافت پودر شده را به یک میکروتیوب تمیز 1.5 mL انتقال داده و بلافاصله میزان 600 µL بافر Trizol را به آن اضافه نمایید و به وسیله ورتکس کاملا همگن کنید. در ادامه مطابق فرایند استخراج از خون محیطی، از مرحله 5 عمل نمایید.

بافت گیاهی

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

1. میزان 300–100 mg بافت گیاهی را بلافاصله بعد از جمع آوری، جهت حفظ کیفیت RNA درون نیتروژن مایع یا دمای 80– °C فریز کنید.
2. بافت تازه را درون نیتروژن مایع با استفاده از هاون یا هموژنایزر، کاملا پودر کنید.

3. بافت پودر شده را به یک میکروتیوب تمیز 1.5 mL انتقال داده و بلافاصله میزان 600 µL بافر Trizol را به آن اضافه نمایید و به وسیله ورتکس کاملا همگن کنید. در ادامه مطابق فرایند استخراج از خون محیطی، از مرحله 5 عمل نمایید.

چالش‌ها و راه کارها

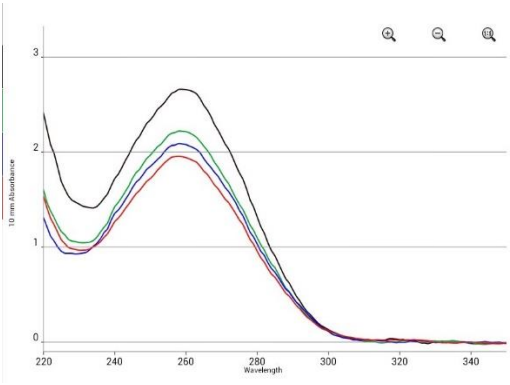
مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین RNA استخراج شده	کافی نبودن نمونه	• بافر الوشن حتما باید به مرکز غشاء ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را در دمای 60 °C انجام دهید
	لایز نامناسب نمونه	• زمان انکوباسیون با بافر Trizol را رعایت کنید. • برای افزایش بازده، نمونه را به وسیله ورتکس به طور کامل با بافر Trizol 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 فعالیت RNase ، 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.

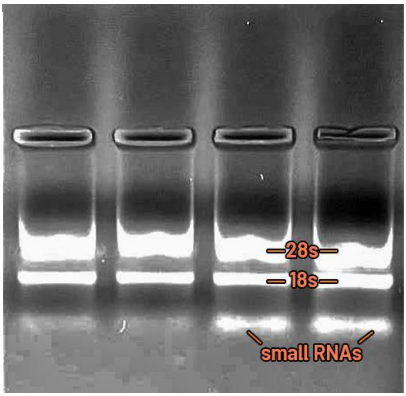
		• از مخلوط شدن مایع رویی با اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر RW2 به مایع عبوری از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود. • از عدم تماس غشاء ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید. • بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند 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 سنتزcDNA مورد استفاده قرار دهید.

کیفیت RNA استخراج شده توسط کیت 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 آماده سازی بافر • تغییر و بهینه سازی زمان انکوباسیون در فرآیند استخراج RNA	1403/08
02	• افزایش حجم WB1	1404/07
03	• اضافه شدن RC buffer 10x به محتویات کیت	1404/10

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		شماره سری ساخت	

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