

Super plus RNA extraction kit

Bacterial

مواد	حجم	دمای نگهداری
Lysis Buffer	40ml	4
Wash Buffer1	35ml	Room temperature
Wash Buffer2	35ml	Room temperature
Elution Buffer	2.0ml	Room temperature
Precipitation Solution	15ml	Room temperature
Spin column	50	Room temperature

- ✓ Lysis Buffer در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ماه پایداری دارد. در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ۳ سال پایداری خواهد داشت.
- ✓ تمام محلول ها قبل از استفاده به خوبی به هم زده شوند.

Bacterial گرم منفی RNA

Protocol

- حدود 1-2 میلیارد باکتری یا ۲-۳ کلون باکتری را برداشته و به ۳۰۰ میکرولیتر آب استریل درون میکروتیوب اضافه نمایید.
- ۲۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم با غلظت ۲۰ mg/ml به آن اضافه کرده و به خوبی ورتکس کنید.
- به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر انکوبه کنید و هر ۵ دقیقه ورتکس کنید. (برای باکتری های گرم مثبت این زمان میتواند بیشتر باشد).
- به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰Rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و سپس فاز رویی را دور بریزید.
- به رسوب باکتری ۸۰۰ میکرولیتر Lysis Buffer اضافه کرده و پیپیتینگ و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس نمایید.
- ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه کرده و ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید.
- به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰Rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ نمایید.
- فاز رویی را به یک میکروتیوب جدید منتقل، ۳۰۰ میکرولیتر Precipitation اضافه کرده و به خوبی ورتکس نمایید.
- ستون را درون زیر ستون قرار داده و محتویات میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰Rpm سانتریفیوژ کنید (در دمای اتاق) و سپس محتویات زیر ستون را خالی نمایید.
- ۷۰۰ میکرولیتر Wash Buffer1 اضافه کرده و ۹۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰Rpm سانتریفیوژ کنید و محتویات زیر ستون را خالی کنید.
- ۷۰۰ میکرولیتر Wash Buffer2 اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰Rpm سانتریفیوژ کنید و محتویات زیر ستون را خالی نمایید.

- محتویات زیر ستون را خالی کرده و به مدت ۳ دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید تا ستون خشک شود و سپس زیر ستون را اوت نمایید.
- ستون را در یک میکروتیوب جدید قرار داده و به مرکز آن **۳۵** میکرولیتر **Elution Buffer** اضافه نمایید.
- به مدت ۳ دقیقه در دمای **۶۵** درجه سانتی گراد قرار دهید.
- به مدت ۲ دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید و سپس غلظت را با استفاده از نانودراپ قرائت نمایید.

Bacterial گرم مثبت RNA

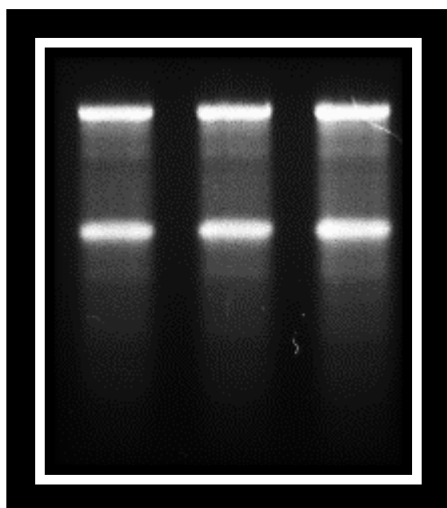
Protocol

- حدود **1-2** میلیارد باکتری یا **۲-۳** کلون باکتری را برداشته و به **۳۰۰** میکرولیتر آب استریل یا دپس درون میکروتیوب اضافه نمایید.
- **۲۰** میکرولیتر آنزیم لیزوزیم با غلظت **۲۰ mg/ml** به آن اضافه کرده و به خوبی ورتکس کنید.
- به مدت **۱-۲۴** ساعت در دمای **۲۵** درجه سانتی گراد انکوبه کنید .
- به مدت **۵** دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** و دمای **۴** درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و سپس فاز رویی را دور بریزید.
- به رسوب باکتری **۸۰۰** میکرولیتر **Lysis Buffer** اضافه کرده و پیپیتینگ و به مدت **۱۰** ثانیه ورتکس نمایید.
- **۳۰۰** میکرولیتر کلروفرم اضافه کرده و **۱۵** ثانیه ورتکس نمایید.
- به مدت **۵** دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- به مدت **۵** دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** و دمای **۴** درجه سانتی گراد سانتریفیوژ نمایید.
- فاز رویی را به یک میکروتیوب جدید منتقل، **۳۰۰** میکرولیتر **Precipitation** اضافه کرده و به خوبی ورتکس نمایید.
- ستون را درون زیر ستون قرار داده و محتویات میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و **۳۰** ثانیه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید(در دمای اتاق) و سپس محتویات زیر ستون را خالی نمایید.
- **۷۰۰** میکرولیتر **Wash Buffer1** اضافه کرده و **۹۰** ثانیه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید و محتویات زیر ستون را خالی کنید.
- **۷۰۰** میکرولیتر **Wash Buffer2** اضافه کرده و **۳۰** ثانیه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید و محتویات زیر ستون را خالی نمایید.
- محتویات زیر ستون را خالی کرده و به مدت ۳ دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید تا ستون خشک شود و سپس زیر ستون را اوت نمایید.
- ستون را در یک میکروتیوب جدید قرار داده و به مرکز آن **۳۵** میکرولیتر **Elution Buffer** اضافه نمایید.
- به مدت ۳ دقیقه در دمای **۶۵** درجه سانتی گراد قرار دهید.
- به مدت ۲ دقیقه در دور **۱۲۰۰۰Rpm** سانتریفیوژ کنید و سپس غلظت را با استفاده از نانودراپ قرائت نمایید.

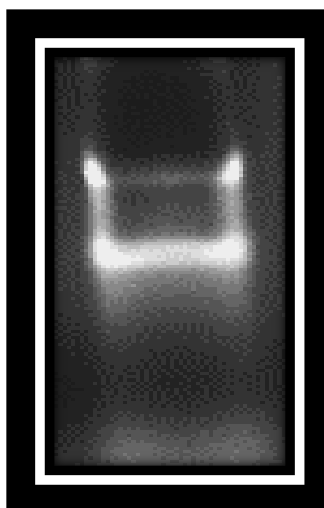
نحوه گذاشتن ژل RNA

- ساخت ژل آگارز 1-1/5 درصد.
- حدود ۰/۶-۱ میکروگرم RNA درون چاهک ها لود کنید.
- اگر غلظت RNA برابر با $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ یا $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ باشد، ۵ میکرولیتر از نمونه را برداشته، با یک میکرولیتر لودینگ بافر 6x مخلوط کرده و لود کنید.
- اگر غلظت RNA برابر با $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ یا $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ باشد، ۱ میکرولیتر از نمونه را برداشته با ۴ میکرولیتر آب دیس مخلوط و با ۱-۲ میکرولیتر لودینگ بافر 6x مخلوط کرده و لود کنید.
- اگر غلظت RNA برابر با $1/5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ یا $1500 \mu\text{g}/\text{ml}$ باشد، ۱ میکرولیتر از نمونه را برداشته و با ۹ میکرولیتر آب مخلوط کنید. سپس ۶ میکرولیتر از آن را با ۱-۲ میکرولیتر لودینگ بافر 6x مخلوط کرده و لود کنید. غلظت RNA لود شده در این حالت ۰/۹ میکروگرم است.
- حدود ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۵ نمونه ها را الکتروفورز کرده.

نکته: در صورت برداشتن غلظت بالای RNA باند ها به خوبی از هم جدا نمی شوند. در ضمن باید نسبت مخلوط کردن نمونه با لودینگ بافر رعایت شود تا باندها به خوبی از هم تفکیک شوند یعنی یک میکرولیتر لودینگ بافر را با ۴-۵ میکرولیتر لیتر نمونه مخلوط کرده در صورت زیاد بودن لودینگ بافر باندها تفکیک خوبی نخواهند داشت.



متناسب بودن غلظت نمونه و لودینگ بافر



غلظت بالای نمونه و زیاد بودن نسبت لودینگ بافر به نمونه