بسمه تعالی

کیت استخراج RNA از خون و بافت به روش نانوذرات مگنت (۱۰۰ تستی)

محتویات کیت:

- بافر لیز A (CN: KPG-KLS)؛ ۱ ویال ۸۰ میلی لیتری
- بافر لیز B (CN: KPG-KLSBc)؛ ۱ ویال ۱۰ میلی لیتری
- بافر لیز بافت (CN: KPG-LBt)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری
- بافر شستشو (KPG-WBp)؛ ۱ ویال ۸۰ میلی لیتری
- آب مقطر RNase/DNase free (CN: KPG-DW)؛ ۱ ویال ۳۰ میلی لیتری
- نانوذرات مگنت (KPG-Mabead)؛ ۲۰۰ میلی گرم
- میکروتیوب ۱/۵ (KPG-mic1/5m)؛ ۱۰۰ عدد

دیگر موارد مورد نیاز: سمپلر ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکرولیتری متغیر

نمونه: این کیت برای استخراج RNA از خون و بافت به روش نانوذرات مگنت طراحی شده است. با استفاده از این کیت شما قادر خواهید بود علاوه بر خون، از نمونه های سرم، پلاسما، محیط انتقالی بدون سلولی VTM، کشت سلول و بافت هموژنیزه شده RNA تخلیص نمایید. برای این امر از حجم های زیر استفاده نمایید:

۱. خون/پلاسما/ محیط انتقالی بدون سلولی VTM: ۲۰۰ میکرولیتر
۲. محیط کشت سلول: به میزان ۱×۱۰^{۷} سلول
۳. بافت هموژنیزه شده: ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم بافت در حجم ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز بافت کاملا هموژنایز کنید و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه هموژنیزه شده را برای استخراج RNA استفاده کنید. دقت نمایید که بافر لیز برای RNA آسیب زا است بنابراین بیش از ۵ دقیقه نباید نمونه در بافر باقی بماند و بایستی فورا مرحله بعد آغاز شود.

آماده سازی نانوذرات مگنت: برای آماده سازی نانوذرات مگنت به میزان ۲۰ میلی لیتر از آب مقطر RNase/DNase free موجود در کیت را به ویال حاوی نانوذرات مگنت اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.

مراحل استخراج RNA

- به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز A به یک میکروتیوب RNase/DNase free اضافه نمایید.
- به میزان مناسب از نمونه (به طور مثال ۲۰۰ میکرولیتر از خون و یا لیز حاصل از بافت) به میکروتیوب اضافه کرده و به شدت به مدت ۱۵ ثانیه بر روی وورتکس مخلوط کنید و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. هر ۵ دقیقه یکبار نمونه ها را وورتکس کنید.
- به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز B به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت ۵ ثانیه به شدت مخلوط کنید.
- به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نانوذرات مگنت را به میکروتیوب اضافه کرده (حتما قبل از برداشت نانوذرات ویل را به خوبی تکان دهید) و با وورتکس به شدت مخلوط نمایید و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.
- میکروتیوب را در رک مخصوص گذاشته و به مدت ۳۰ ثانیه انکوبه کنید. ذرات مگنت متصل به RNA به طرف آهن ربای موجود در رک منتقل می شوند. بنابراین با استفاده از سمپلر مایع موجود در رک را به گونه ای که با ذرات مگنت برخورد نداشته باشد از داخل میکروتیوب تخلیه کنید.
- میکروتیوب ها را از رک مخصوص خارج کرده و مجددا به میزان ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز A به میکروتیوب ها اضافه نمایید و وورتکس نمایید.
- میکروتیوب را در رک مخصوص گذاشته با استفاده از سمپلر مایع موجود در رک را به گونه ای که با ذرات مگنت برخورد نداشته باشد از داخل میکروتیوب تخلیه کنید.
- میکروتیوب ها را از رک مخصوص خارج کرده و به میزان ۸۰۰ میکرولیتر بافر شستشو به میکروتیوب ها اضافه نمایید و با دست کاملا مخلوط کنید.
- میکروتیوب را در رک مخصوص گذاشته با استفاده از سمپلر مایع موجود در رک را به گونه ای که با ذرات مگنت برخورد نداشته باشد از داخل میکروتیوب تخلیه کنید.
- به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر RNase/DNase free اضافه کرده، وورتکس و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. دقت کنید بهتر است دمای آب مقطر در حدود ۵۵ درجه سانتیگراد باشد تا جداسازی RNA بهتر انجام شود.
- میکروتیوب را در رک مخصوص گذاشته و به مدت ۳۰ ثانیه انکوبه کنید. مایع موجود در میکروتیوب حاوی RNA خالص می باشد. بنابراین با استفاده از سمپلر مایع موجود را به گونه ای که با ذرات مگنت برخورد نداشته باشد از میکروتیوب خارج و به میکروتیوب استریل و RNase/DNase free منتقل کرده و در دمای ۲۰- °C ذخیره کنید.

http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

عیب یابی (Troublshooting):

کیت حاظر به میزان زیادی کنترل کیفی شده و احتمال برخورد با مشکل بسیار پایین می باشد. با این وجود در مواردی ممکن است در استفاده از این کیت با مشکلاتی مواجه شوید. برای حل این موارد به جدول زیر مراجعه کنید:

مشکل ایجاد شده	علل احتمالی ایجاد مشکل	نحوه برطرف کردن مشکل
میزان RNA استخراج شده کم می باشد.	نمونه حاوی مقادیر مناسب از سلول در زمان نمونه برداری نیست	✓ استفاده از مقادیر بیشتر نمونه ✓ اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر RNase/DNase free به جای ۱۰۰ میکرولیتر
	استفاده از کیت تاریخ مصرف گذشته	✓ محتویات کیت تا یک سال پس از تاریخ انقضای ذکر شده نیز قابل استفاده هستند به جز محلول لیز و نانوذرات مگنت بنابراین در زمان ذکر شده مصرف شوند.
	استفاده از میکروتیوب های حاوی RNase	✓ از میکروتیب های RNase/DNase free شرکت کارمانیا پارس ژن استفاده نمایید
	استفاده از مقادیر کمتر محلول های لیز	✓ دقیقا طبق پروتوکول کیت استخراج انجام شود.
	استفاده از نانوذرات تاریخ مصرف گذشته	✓ بعد از اضافه کردن آب، نانوذرات بیش از ۳ ماه فعال نمی باشند.
با وجود مقادیر مناسب RNA تست PCR به خوبی انجام نمی شود.	وجود مهار کننده ها در RNA استخراج شده	✓ مرحله شستشو به خوبی انجام شود و از تغییر مقادیر و زمان اجتناب کنید.

احتیاط لازم برای کار با کیت و محتویات آن

- محلول لیز موجود در کیت دارای Ph بازی و اسیدی شدید می باشند. از طرفی مواد به کار رفته در این محلول ها در برخی موارد ممکن است برای سیست اعصاب محرک باشند. بنابراین در زمان کار با این محلول ها حتما از دستکش استفاده شود و در صورت تماس با پوست با مقادیر زیادآب شستشو گردد. در زمان تماس با چشم، با مقادیر زیادآب شستشو گردد و درصورت عدم بهبودی به مراکز درمانی مراجعه گردد.
- باقی مواد موجود در کیت ایمن و فاقد خاصیت آسیب زایی به بافت انسان می باشند.

Karmania Pars Gene
http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

In the name of God

Magnetic bead RNA extraction kit from blood and tissues

Kit components:

- Lyse A buffer (CN: KPG-KLSA): 1 vial 80 mL
- Lyse B buffer (CN: KPG-KLSB): 1 vial 10 mL
- Tissue lysis buffer (CN: KPG-LBt): 1 vial 25 mL
- Washing buffer (CN: KPG-WBp): 1 vial 80 mL
- RNase/DNase free water (CN: KPG-DW): 1 vial 30 mL
- Magnetic Nanoparticle (CN: KPG-Mabead): 200 mg
- 1/5 Microtubes (KPG-1/5m) 100 preps

Other material that are not provided by this kit:

- 1000 and 100 microliter samplers

Sample: This kit is designed to extract RNA from blood and tissue using magnetic nanoparticle technology. Using this kit, you will be able to purify RNA from serum, plasma, VTM cell-free transfer medium, cell culture and homogenized tissue samples in addition to blood. For this, use the following volumes:
1. Blood/plasma/VTM cell-free transfer medium: 200 µl

2. Cell culture medium: at the rate of 1×10^7 cells

3. Homogenized tissue: add 30 to 50 mg of homogenized tissue in a volume of 400 microliters of tissue lysis buffer and homogenized completely. Finally add 200 microliters of the homogenized sample the next steps. Pay attention that incubation should not last more than 5 minutes at this stage.

Preparation of magnet nanoparticles: To prepare magnet nanoparticles, add 20 ml of RNase/DNase free distilled water included in the kit to the vial containing magnet nanoparticles and mix well.

RNA extraction steps

- Add 500 microliters of lysis buffer A to a RNase/DNase free microtube.
- Add the appropriate amount of the sample (for example, 200 microliters of blood or tissue lysate) to the microtube and mix vigorously for 15 seconds on the vortex and incubate at room temperature for 10 minutes. Vortex the samples every 5 minutes.
- Add 100 µL of Lysis Buffer B to the microtube and mix vigorously for 5 seconds.
- Add 200 microliters of magnet nanoparticles to the microtube (be sure to shake the vial well before using the nanoparticles) and mix vigorously with a vortex and incubate for 5 minutes at room temperature.
- Place the microtube in a special rack and incubate for 30 seconds. The magnet particles that are attached to the RNA are moved towards the magnet in the rack. Therefore, by using the sampler, drain the liquid in the rack so that it does not come into contact with the magnet particles from inside the microtube.
- Remove the microtubes from the special rack and again add 300 microliters of lysis buffer A to the microtubes and vortex.
- Put the microtube in a special rack and use the sampler to drain the liquid in the rack so that it does not come into contact with the particles of the microtube.
- Remove the microtubes from the special rack and add 800 microliters of washing buffer to the microtubes and mix thoroughly by hand.
- Put the microtube in a special rack and use the sampler to drain the liquid in the rack so that it does not come into contact with the particles of the microtube.
- Add 100 microliters of RNase/DNase free distilled water, vortex and incubate for 2 minutes at room temperature. Make sure that the temperature of the distilled water is around 55 degrees Celsius for better RNA separation.
- Place the microtube in a special rack and incubate for 30 seconds. The liquid in the microtube contains pure RNA. Therefore, by using the sampler, transfer the existing liquid from the microtube to a sterile and RNase/DNase free microtube in such a way that it does not come into contact with the particles of the magnet and store it at -20 °C.

Karmania Pars Gene

Troubleshooting:

- The current kit is highly quality controlled and the probability of encountering a problem is very low. However, in some cases, you may encounter problems using this kit. Refer to the following table to solve these issues:

Problem	Reasons	Solving
Low Yeild	Low cell count in the sample	✓ Use more samples
		✓ Add 50 µL RNase/DNase free water
	Using an expired kit	✓ Althopugh the components of the kits has more than 1 year stability, lysis buffer A and B had 6 months stability.
	Using the material contaminated with RNase	✓ Use the RNase/DNase free materials, You can prepare them from Karmania Pras Gene Company
	Using low amounts of lysis buffer	✓ Please follow the protocole
	Using expired magnets	✓ After adding the water, magnetic nanoparticles are active for 3 months
RNA is not appropriate for PCR	Presence of PCR inhibitor	✓ Do not change the washing step

Safety:

The lysing solution in the kit has a very alkaline and acidic Ph. On the other hand, the substances used in these solutions may in some cases be stimulating for the nervous system. Therefore, when working with these solutions, be sure to use gloves and in case of contact with the skin, wash with large amounts of water. In case of contact with the eyes, wash with large amounts of water and if there is no improvement, refer to medical centers.

KPG
Karmania Pars Gene