کیازول KIAZOL

محلول استخراج RNA

نشانگر فنول آبی

اصول کلی

کیازول یک محلول تک فازی استخراج کلی RNA می باشدکه با کارایی بالا همه RNA موجود در نمونه را استخراج می کند (Chomczynski,1993) . نشانگر آبی فنول در این محلول می تواند به شناسایی آلودگی شدید نمونه با فنول توسط چشم غیر مسلح کمک کند.

انجام این آزمایش سادست و به دلیل وجود گوانیدین ایزوتیوسیانات در محلول RNase مهار شده و RNA دست نخورده استخراج می شود.

RNA استخراج شده می تواند در موارد زیر بکار رود:

- **RT-PCR**
- **Real-Time PCR**
- **Northern Blot analysis, Southern Blot analysis**
- **Cloning and so on.**

اطلاعات کلی

نگهداری:

در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شود. در دمای اتاق حمل می شود.

حساسیت: ۳ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم

میزان نمونه پیشنهادی:

Sample	Max	Optimum
Tissues from animal/plant	100 mg	50 mg
Bacterium	1.5×10^{9}	1×10^{7} –5×10^{8}
Cells	1.5×10^{7}	5×10^{6} –1×10^{7}
Serum	400 uL	300 uL

موارد اضافی مورد نیاز

ابزار اضافی برای انجام صحیح آزمایش:

- Adjustable micropipette
- RNase free micropipette tips
- 1.5 ml RNase free microtube
- DEPC treated water (KDEP100)
- Isopropyl alcohol (Isopropanol) (KIP100)
- 75% ethanol (in DEPC-treated water) (KETH100)
- Chloroform (KCH100)
- Liquid N2 (for tissue homogenization)
- Bench centrifuge (4˚C, 12000 RPM)
- TBE Buffer 10X (KTBE250) (For electrophoresis)
- Molecular Grade Agarose (KAGA100&KAGA50)
- Lithium Chloride Solution (KLC50) (Optional)

آماده سازی نمونه

آماده سازی بافت:

۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از بافت را در نیتروژن مایع پودر کنید. سپس بافت را به یک میلی لیتر از محلول کیازول در یک میکروتیوب 1.5 ml RNase Free **منتقل کنید.**

سلول های چسبنده:

محیط رویی را خارج کرده سپس یک میلی لیتر از محلول کیازول را به ازای ۲۰ تا ۳۰ سانتیمتر مربع به ظرف حاوی سلول اضافه کنید.سلول ها را شستشو ندهید**. سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا لیز کامل سلول صورت بگیرد. در نهایت محلول مورد نظر را به یک میکروتیوب** 1.5 ml RNase Free **منتقل کنید.**

سلول های معلق و باکتری، انگل و قارچ

سلول ها را سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را دور بریزید. یک میلی لیتر کیازول به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا لیز کامل سلول صورت بگیرد.

*** نمونه ها در این مرحله می توانند در دمای** -70 **درجه سانتیگراد به مدت یک ماه نگهداری شوند.**

***نمونه های با چربی بالا می توانند به مدت ۱۵ دقیقه در** 15000×g **سانتریفیوژ شوند تا لایه چربی در بالای مایع جمع شود.**

***قبل از ادامه به مرحله بعدی سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتیگراد آماده شود.**

جداسازی فاز تخلیص

۱- به هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه کرده و با قدرت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید . در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۲- سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در 12000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۳- در این مرحله، سه فاز متمایز مشاهده می شود. فاز رویی و قطبی حاوی RNA، فاز خاکستری و میانی حاوی DNA و فاز غیرقطبی و آبی رنگ زیری حاوی پروتئین و دبریدها.

۴- با دقت فاز رویی را به میکروتیوب RNase Free دیگری منتقل کرده و روی یخ قرار دهید. دقت کنید تا از فاز میانی برداشت نشود.

۵- با نسبت 1:1 به این فاز ایزوپروپانول یخ (انکوبه شده در دمای 20- از قبل) اضافه کرده و به آرامی با سروته کردن تیوب هم بزنید. در این مرحله برای افزایش میزان رسوب RNA می توانید آن را در دمای 20- درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کنید. از محلول لیتیوم کلراید (KLC50) نیز می توانید برای افزایش رسوب RNA استفاده کنید.

۶- در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در 12000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید و پس از آن سوپرناتانت را دور بریزید. پلت RNA سفید ممکن است در پایان این مرحله در ته تیوب دیده شود.

۷- یک میلی لیتر از اتانول ۷۵٪ در آب DEPC را به آن اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در 7500 rpmسانتریفیوژ کنید. (اتانول سرد ترجیح داده می شود).

۸- سوپرناتانت را دور ریخته و اتانول باقیمانده را در هوای اتاق خشک کنید.

۹- پلت باقیمانده را در ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب DEPC یا بافر TE حل کنید.

*** نمونه های بیش از حد خشک شده می توانند در دمای ۵۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گیرند تا حل شوند.**

تعیین مقدار و کیفیت RNA

مقدار RNA: روش جذبی

۱- ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده را به ۹۹۰ میکرولیتر از آب DEPC یا بافر TE اضافه کنید.

۲- جذب محلول را یکبار در ۲۶۰ و بار دیگر در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری کنید.

۳- محاسبه مقدار: جذب ۲۶۰ ضربدر ۴۰ ضردبدر ۱۰۰= µg RNA/ml

۴- محاسبه خلوص: نسبت جذب ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر (نسبت ۱/۹ تا ۲ مناسب می باشد).

*** جذب مناسب ۲۶۰ یا ۲۸۰ باید بین ۰/۱ تا ۱ باشد.**

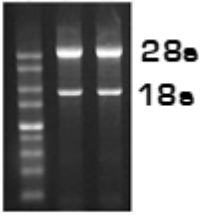
*** نانودراپ به عنوان جایگرین می تواند استفاده شود.**

کیفیت RNA: ژل اگاروز Native

- یک میکروگرم RNA می تواند در ژل آگاروز ۱٪ در بافر TBE و ولتاژ ۸۰ تا ۱۰۰ قرار گیرد.

-دو باند مجزا در زیر نور UV مشخص خواهد شد. (باتد 28s و 18s برای یوکاریوت ها و باند 26s و 16s برای پروکاریوت ها).

-در صورت سالم بودن RNA باند 28s یا 26s دوبرابر 18s یا 16s درخشندگی دارد بدون اینکه اسمیری زیر باند 18s/16s دیده شود.



نمونه های RNA تا ۶ ماه در دمای 70- درجه سانتی گراد باقی می مانند.

توصیه ها

خودداری از آلودگی DNA:

۱- طراحی پرایمرها را به صورت اگزون به اگزون انجام دهید تا از تکثیر محصول ژنومی جلوگیری شود.

۲- نمونه ها را در مجاورت آنزیم DNase I قرار دهید تا DNA موجود تجزیه شود.

نکات مهم

RNase ممکن است به صورت تصادفی از پوست و تنفس شما به نمونه منتقل شود. RNase بسیار مقاوم است پس برای جلوگیری از آلودگی نکات زیر رعایت شود.

- **همیشه دستکش پوشیده و از ماسک دهانی استفاده شود.**
- **از مواد پلاستیکی یه بار مصرف و RNase Free استفاده شود.**

نحوه DEPC کردن ظروف: بعد از شستشو، ظروف فلزی در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت استریل شده و RNase از بین می رود. ظروف پلاستیکی در محلول DEPC 0.1% قرار داده می شوند و سپس در یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو می شوند.

- **کار کردن با RNA در محلی که ایزوله نیست و رفت و آمد دارد هرگز توصیه نمی شود.**

مشکل یابی

مشکل	دلیل	راه حل
مقدار کم RNA	لیز ناقص	افزایش مقدار نمونه
		افزایش کوبیدن با نیتروژن مایع
	حل نشدن کامل پلت در آب DEPC	پیپت آرام پلت در ۵۵ درجه سانتیگراد
تخریب نمونه	نمونه ها بلافاصله فریز نشده اند	نمونه ها در نیتروژن مایع جمع آوری شوند
	نمونه RNA در دمای نامناسب ذخیره شده است	نمونه ها پس از جداسازی در دمای 70- درجه ذخیره شوند
آلودگی DNA	برداشت از فاز میانی	همه فاز مایع رویی را برندارید.
	تکان شدید در مرحله کلروفورم	به آرامی هم بزنید
	نمونه با مقدار چربی و پروتئین بالا	به مرحله شماره آماده سازی نمونه مراجعه کنید
نسبت پایین A260/A280	RNA در آب DEPC حل شده است	نمونه در محلول Tris-HCl (pH=7.0) حل شود
	استفاده کمتر از مقدار توصیه شده کیازول	لطفا از مقدار توصیه شده کیازول استفاده نمایید
	زمان انکوباسیون کم در محلول کیازول	زمان انکوبه در کیازول را به ۱۵ دقیقه افزایش دهید
	آلودگی فاز آبی با فاز کلروفورم (آبی رنگ)	سانتریفیوژ مجدد برای تفکیک فازها

Sample	Concentration	A260/A280	A260/A230

Sample	Concentration	A260/A280	A260/A230

References

Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. BioTechniques 15,532-537

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com