

پروتکل استخراج از ۱ میلی لیتر سرم/پلازما (با Carrier RNA)

قبل از شروع:

- انکوباتور را بر روی ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- بافر 2 CFDW را طبق دستورالعمل آماده سازی مواد در صفحه ۴ کتابچه راهنما آماده کنید.
- به مقدار حداکثر یک میکروگرم به ازای هر نمونه، carrier RNA به بافر CFDL اضافه کنید. این مخلوط همیشه باید به صورت تازه و به تعداد نمونه های مورد آزمایش آماده شود.
- تیوب حاوی tBioBead CF را قبل از استفاده شیک و یا ورتکس کنید تا به طور کامل یکنواخت شوند.

پروتکل:

۱- مقدار ۱ میلی لیتر پلازما یا سرم را به یک لوله ی ۱۵ میلی لیتری اضافه کنید.

نکته مهم: اگر مقدار سرم یا پلازما کمتر از ۱ میلی لیتر است، با اضافه کردن بافر CFDE حجم آن را به ۱ میلی لیتر برسانید.

۲- مقدار ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K به لوله اضافه کنید.

۳- مقدار ۶۷ میکرو لیتر از بافر CFDL اضافه کنید.

۴- با ورتکس کردن لوله در حد اکثر سرعت، محتوای آن را به خوبی مخلوط کنید.

۵- لوله را در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کنید.

نکته مهم: هر ۱۰ دقیقه یکبار لوله را ورتکس کنید و یا از انکوباتور شیکردار استفاده کنید.

۶- لوله را از انکوباتور خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

نکته مهم: این مرحله بسیار اهمیت دارد تا دمای نمونه کاهش یافته و به دمای اتاق برسد.

۷- مقدار ۱ میلی لیتر بافر CFDB به نمونه اضافه کنید. نمونه را با حداکثر سرعت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید.

۸- مقدار ۱۰ میکرو لیتر tBioBead CF به نمونه اضافه کنید. نمونه را با سر و ته کردن لوله حداقل ۱۰ بار به خوبی مخلوط کنید.

۹- نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و به طور مداوم مخلوط کنید. مخلوط کردن در این مدت ۱۰ دقیقه باید یا با شیکر و یا باراکر انجام شود.

نکته مهم: به هیچ عنوان از ورتکس استفاده نکنید زیرا با تشکیل کف، موجب کاهش اثربخشی استخراج می شود. سرعت مخلوط کردن در شیکر و یا راکر باید به گونه ای تنظیم شود که ذرات مگنتیک در محلول باقی مانده و رسوب نکنند.

۱۰- مقدار ۱ میلی لیتر از لیزت را به یک لوله ی ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.

۱۱- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود، صبر کنید.

- ۱۲- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
- ۱۳- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، باقیمانده لیزت از مرحله ۱۰ را به لوله ۱/۵ میلی لیتری مرحله ی قبل منتقل کنید و تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود، صبر کنید.
- ۱۴- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
- ۱۵- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر 1 CFDW به نمونه اضافه کنید و لوله ی حاوی ذرات مگنتیک را از روی رک بردارید.
- ۱۶- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.

نکته مهم: برای بهترین نتیجه، ضروری است که ذرات مگنتیک در این مرحله به خوبی یکنواخت شوند.

- ۱۷- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود، صبر کنید.
- ۱۸- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
- ۱۹- مراحل ۱۵ تا ۱۸ را (شستشو با بافر 1 CFDW) تکرار کنید.
- ۲۰- مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بافر 2 CFDW به لوله اضافه کنید.
- ۲۱- ذرات مگنتیک را به مدت ۲ دقیقه با ورتکس یکنواخت کنید.
- ۲۲- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود، صبر کنید.
- ۲۳- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
- ۲۴- مراحل ۲۰ تا ۲۳ را (شستشو با بافر 2 CFDW) تکرار کنید.
- ۲۵- درب لوله را بسته و به مدت ۳۰ ثانیه از روی رک مگنتیک بردارید.
- ۲۶- لوله را مجدداً بر روی رک مگنتیک قرار دهید و تا جذب کامل ذرات مگنتیک به جداره لوله صبر کنید.
- ۲۷- درب لوله را بدون خارج کردن لوله از رک مگنتیک باز کرده و باقیمانده محلول شفاف شده را با پیپت خارج و دور بریزید. مراقب باشید تا ذرات مگنتیک متصل به جداره لوله را لمس نکنید.
- ۲۸- درب لوله را باز گذاشته و به مدت ۲۵ دقیقه صبر کنید تا ذرات مگنتیک کاملاً خشک شوند.
- ۲۹- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، مقدار ۳۰ تا ۶۰ میکرو لیتر بافر CFDE به لوله اضافه کنید. درب لوله را بسته و آن را از روی رک مگنتیک بردارید.
- ۳۰- لوله را به مدت ۵ دقیقه ورتکس کنید.
- ۳۱- لوله را بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنت از محلول جدا شده و به جدار لوله جذب شوند. تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود، صبر کنید.
- ۳۲- محلول شفاف حاوی ccfDNA را به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.
- ۳۳- نمونه را در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره کنید.