

استخراج RNA از بافت و خون با استفاده از ستون استخراج

استخراج RNA بهتر است بلافاصله بعد از جمع‌آوری نمونه انجام شود. در غیر این صورت نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری تا زمان استخراج در دمای 70°C - یا نیتروژن مایع نگهداری شوند. در تهیه محلول‌ها حتماً از آب فاقد نوکلئاز (DEPC- treated water) استفاده نمایید.

1. 750µl از محلول نمازول (NamaZol) را به نمونه اضافه کنید.
 - نمونه بافت (5-50µg) با استفاده از هموژنایزر لیز شود.
 - نمونه خون (250µl) با استفاده از سمپلر چندین بار مخلوط شود.
 2. نمونه را به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
 3. 200µl کلروفرم به هر نمونه اضافه کرده و مخلوط نمایید تا محلول یکنواختی به دست آید. سپس به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
 4. نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه و دور 12000rpm در دمای 4°C سانتریفیوژ نمایید.
 5. فاز آبی را با دقت به یک لوله جدید منتقل کنید.
 6. 100µl ایزوپروپانول و 400µl از **Binding Buffer** را به نمونه اضافه کرده و مخلوط نمایید.
 7. نمونه را در یک یا دو مرحله به ستون‌های استخراج اضافه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه و دور 10000rpm سانتریفیوژ کنید.
 8. ستون استخراج را در لوله جمع‌آوری کننده جدید قرار داده و 500µl از محلول **Wash Buffer II** به آن اضافه کنید.
 9. نمونه را به مدت ۱ دقیقه و دور 10000rpm سانتریفیوژ کنید. سپس به مدت ۲ تا ۳ دقیقه و بالاترین دور (14000rpm) سانتریفیوژ کنید.
 10. ستون استخراج را در یک میکروتیوب 1.5ml قرار داده و 100-20µl از محلول **Elution Buffer** به آن اضافه کنید. (برای بازدهی بیشتر بهتر است لوله‌ها را به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در دمای 65°C قرار دهید.
 11. نمونه‌ها را به مدت ۱ دقیقه و دور 12000rpm سانتریفیوژ کنید.
- نمونه RNA را می‌توانید در دمای -70°C نگهداری نمایید.