BehPrep **High Pure Viral RNA/DNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Viral DNA/RNA From Serum, Blood, Body fluids and Liquid-based Samples Based on spin column

Cat Number: BP125

Ver: 01

- در دمای اتاق نگهداری شود
- تاریخ انقضاء: سه سال پس از تولید

فهرست

محتویات کیت 3

شرایط پایداری و نگهداری 3

معرفی 4

حیطه کاربری 4

نکات مهم: 4

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند: 5

نکات ایمنی 5

آماده سازی بافرها 6

Proteinase K 6

NA Carrier 6

استخراج DNA/RNA ویروسی از سرم، خون و مایعات بدن 7

فرآیند 7

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based 9

آماده سازی نمونه 9

فرآیند 10

چالش‌ها و راه کارها 12

کنترل کیفیت 14

تاریخچه ویرایش پروتکل 14

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش BP125R010	50 واکنش BP125R050	100 واکنش BP125R100	شرایط نگهداری
SC-TT30814	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400 pcs	دمای اتاق
BR158	DL Buffer	3mL	11mL	22 mL	دمای اتاق
BR102	WB1 Buffer	7 mL	30 mL	58 mL	دمای اتاق
BR103	WB2 Buffer	10 mL	36 mL	70 mL	دمای اتاق
BR114	VEB Buffer	3 mL	11 mL	22 mL	دمای اتاق
BR105	Proteinase K	1 vial (4mg)	1 vial (20 mg)	1 vial (40mg)	دمای اتاق
BR106	PK Buffer	2 mL	2 mL	2 mL	دمای اتاق
BR112	NA Carrier	1 vial(320µg)	1 vial (320µg)	1 vial(320µg)	دمای اتاق
BR108	TL Buffer	4 mL	12 mL	24 mL	دمای اتاق

شرایط پایداری و نگهداری

- ستون‌ها در کیسه‌های زیپ‌دار بسته‌بندی شده‌اند و در دمای اتاق (18–25°C) تا پایان تاریخ انقضاء کیت پایداری خواهند داشت.
- همه محلول‌ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آن‌ها استفاده کرد.
- محلول‌ها را در دمای (18–25°C) و یا در حمام آب 37°C گرم کنید تا رسوبات حل شوند.

- بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشند که هیچ تأثیری در عملکرد آن‌ها نخواهد داشت.
- درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید.

توجه: نگهداری در دمای 2–8°C (یخچال) یا 25°C– تا 15°C– (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص نوکلئیک اسید خواهد گذاشت.

معرفی

کیت استخراج BehPrep High Pure Viral RNA/DNA با حساسیت و اختصاصیت بالا و با استفاده از با کیفیت ترین مواد اولیه اروپایی جهت خالص سازی طیف گسترده ای از DNA/RNA ویروس ها از نمونه های مایعات بدن نظیر خون، سرم و بافت دهانه رحم با روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

RNA و DNA ویروسی استخراج شده مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Real–Time PCR می‌باشد.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep High Pure Viral RNA/DNA جهت استخراج دستی DNA و RNA ویروسی از مایعات بدن نظیر خون، سرم و بافت دهانه رحم با روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18–25°C) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد–ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً همگن نمایید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.

- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- بعد از هر انتقال مایع به وسیله سمپلر، سرسمپلر باید تعویض گردد. استفاده از سرسمپلر فیلتردار برای کاهش آلودگی احتمالی توصیه می‌گردد.
- از تماس نوک سرسمپلر با غشاء ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing، تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسل، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:

- سمپلر 10–100 µL و 100–1000 µL و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای TL، DL و WB1 حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.

- از برخورد بافرها با چشم و پوست خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی بافرها

Proteinase K

- میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.
- **توجه داشته باشید آنزیم آماده شده باید در دمای 20 °C– نگهداری شود.**

مقدار پروتئیناز K	4 mg	20 mg	40 mg
مقدار بافر PK	200 µL	1 mL	2 mL

NA[1] Carrier

I. میزان 320 µL بافر VEB را به تیوب حاوی 320 µg NA Carrier لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول 1 µg/µL بدست آید. NA Carrier را کاملاً حل کرده و در دمای 20°C– نگهداری نمایید.
- از تکرار چرخه انجماد–ذوب NA Carrier بیش از 3 بار پرهیز کنید.
- برای ماندگاری بهتر و استفاده طولانی، 10 الیکوت 32 µL از NA Carrier فراهم کنید (هر الیکوت برای 10 واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد).

II. به ازای هر نمونه، میزان 3 µL از NA Carrier را به 200 µL از بافر DL اضافه کنید. برای مثال اگر تعداد 10 نمونه برای استخراج دارید، 30 µL از NA Carrier را به 2.1 mL از بافر لایز اضافه کنید.

[1] NA Carrier = Nucleic Acid Carrier

- در هنگام لایز به ازای هر نمونه فقط 200 µL بافر لایز حاوی NA Carrier نیاز دارید و مقادیر بیشتر برای جلوگیری از خطای پیپتاژ در نظر گرفته شده است.

توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

استخراج DNA/RNA ویروسی از سرم، خون و مایعات بدن

- نمونه تازه و منجمد در این روش قابل استفاده می‌باشد.
- قبل از شروع فرآیند، نمونه منجمد را به دمای اتاق برسانید.

فرآیند

1. میزان 15 µL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 200 µL از نمونه را به درون تیوب اضافه نمایید.
   - اگر حجم نمونه کمتر از 200 µL است، مقدار مناسب از محلول PBS (1X) را اضافه کنید تا حجم کل به 200 µL برسد.
   - **استفاده از حجم کمتر از 200 µL نمونه در این فرآیند توصیه نمی‌شود.**
2. میزان 200 µL بافر DL را به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند، و سپس به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.
   - توصیه می‌شود میزان 3 µL از محلول NA Carrier را به 200 µL بافر DL اضافه نمایید
3. میزان 300 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند.
4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 1

دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

5. میزان 500 µL بافر WB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
6. میزان 600 µL بافر WB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. توصیه می‌شود در این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
   - انجام این مرحله از انتقال بافرWB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
   - برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.
8. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی میکروتیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 60 µL بافر VEB را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
   - استفاده کمتر از 60 µL بافر VEB باعث افزایش قابل توجه غلظت نوکلئیک در مایع عبوری می‌شود، اما میزان نوکلئیک اسید استخراج شده را اندکی کاهش خواهد داد.
   - به‌طورکلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر VEB تا بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج نوکلئیک اسید شود.
   - انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج نوکلئیک اسید را به همراه خواهد داشت.

- اگر مرحله الوشن با بافر VEB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج نوکلئیک اسید را افزایش خواهد داد.

- نوکلئیک اسید استخراج شده را در دمای 20°C– ذخیره نمایید.

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid–Based

این فرآیند دارای حساسیت بالا جهت استخراج DNA ویروس HPV می‌باشد.

آماده سازی نمونه

1. جهت تغلیظ نمونه میزان 1–5 mL نمونه را در 4500 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده، مایع رویی را کاملا خارج کنید. به صورتی که فقط رسوب سلولی باقی بماند.

- چنانچه در آزمایشگاه مولکولی خود سانتریفیوژ لوله فالکون موجود ندارید، به منظور تغلیظ، میزان 2 mL نمونه را در (8000 rpm) 6000 x g سانتریفیوژ نمایید. در صورت کافی نبودن رسوب تشکیل شده، این فرایند را تکرار کنید.
- از آنجایی که غلظت و کیفیت نهایی DNA استخراج شده وابسته به نحوه نمونه گیری و میزان سلول های موجود در نمونه Liquid–Based می‌باشد، لازم است میزان رسوب سلولی قابل توجهی پیش از شروع فرایند استخراج تشکیل شود.

نکته: اگر نمونه شفاف و بدون رسوب باشد پیشنهاد می شود:

1. تیوب نمونه گیری کاملا ورتکس شود تا تمام سلول ها و بافت های متصل به سایتوبراش از آن جدا شود.
2. حداکثر میزان نمونه اولیه استفاده شود.
3. حداکثر سرعت(10000Rpm) و زمان (15 دقیقه) را جهت سانتریفیوژ استفاده کنید.
4. نحوه خارج کردن مایع رویی به صورتی باشد که حداقل 150µl از مایع در انتهای میکروتیوب باقی بماند تا حداقل رسوب تشکیل شده از دست نرود.

فرآیند

1. میزان 180 µL از بافر TL را به رسوب سلولی اضافه کرده و ورتکس کنید.
2. میزان 15 µL پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملا مخلوط نمایید و به مدت 20 دقیقه در دمای 56 °C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل نمونه، درطول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

- استفاده از پروتئیناز K در این مرحله ضروری می باشد.

نکته: در صورتی که تکه های بافتی لایز نشده و یا ذرات پلاستیکی مربوط به سایتوبراش در محیط لایز باقی مانده است، میتوانید میکروتیوب را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید و تنها مایع رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کنید.

3. میزان 200 µL بافر DL و میزان 300 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملا مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.

- توصیه می‌شود میزان 3 µL از محلول NA Carrier را به 200 µL بافر DL اضافه نمایید.

4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون انتقال دهید.درب ستون را ببندید و در 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
5. میزان 500 µL بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

6. میزان µL 600 بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. توصیه می شود در این مرحله کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. ستون را با حداکثر سرعت (13000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- انجام این مرحله از انتقال بافر WB2به مرحله الوشن جلوگیری می کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.

8. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی میکروتیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان µL 60 بافر VEB از پیش گرم شده در دمای °C 60 را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) 6000 x g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر VEB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای °C 60 افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر VEB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20–50% میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد

DNA استخراج شده را در دمای °C 20– ذخیره نمایید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
لایز نامناسب	کافی نبودن نمونه	• از نحوه صحیح نمونه برداری اطمینان حاصل کنید • الوشن بافر حتماً باید به مرکز غشای ستون اضافه شود. • زمان انکوباسیون با بافر الوشن را بیشتر کنید. • انکوباسیون با بافر الوشن را حتما در دمای 60°C انجام دهید.
	عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	• مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA/RNA را با نمونه تازه تکرار کنید. • آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود. • آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید. • پس از اضافه کردن نمونه به پروتئیناز K فوراً عمل ورتکس را انجام دهید.
	نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	• از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده‌است، استفاده نکنید. • از نمونه خون یا مایعات بدن که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. • برای جلوگیری از فعالیت DNase، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. • نمونه‌گیری را تکرار کنید.
	محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است.	• زمان سانتریفیوژ کردن را افزایش دهید. • حداکثر سرعت سانتریفیوژ را اعمال کنید. • مقدار زیادی از نمونه اولیه را استفاده کرده‌اید. • در استخراج DNA از نمونه-Liquid Based ، قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت

		سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.
	استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول	• در تمامی فرآیندهای استخراج استفاده از سایر الکل‌ها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.
	مسدود شدن غشای ستون	• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد. • قبل از شروع فرآیند، بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید. • در استخراج DNA/RNA از پلاسما، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب کرایو از چرخه انجماد-ذوب خودداری کنید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید. •
پایین بودن نسبت A260/A280	آلودگی پروتئینی	• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر DL ،TL و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود. • از عدم تماس غشای ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید. • بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید. • از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم.

		به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده‌سازی باید در 20°C- نگهداری شود.
تخریب RNA	RNAseمحیطی یا سلولی	• مقدار زیادتر از حجم نمونه ذکر شده استفاده نکنید • از نمونه های که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید . • آلودگی RNase محیطی را به حداقل برسانید. • حداالامکان از نمونه تازه استفاده کنید.
قطعه قطعه شدن DNA	ورتکس پیاپی	• ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با اتانول، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید.

کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت‌های (.LOT NO) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به‌ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرارگرفته‌است.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نگارش پروتکل	1403/
01	افزایش حجم WB1	1404/07

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دمایی		کاربرد تشخیصی	
تعداد تست		اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستورالعمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا		شماره سری ساخت	

شـرکت دانـش بنیـان ویسـتا زیسـت فنـاوری بـه ژن

آدرس: شـیراز، منطقـه ویـژه اقتصادی،فـاز دوم، جنـب میـدان صـادرات

شـماره تمـاس: 07191009596 امور مشتریان: 09912070924

کدپسـتی: 7159115468 وبسـایت: www.BehGene.com