BehPrep **Viral Nucleic Acid** Extraction Kit

For Manual Isolation of Viral DNA/RNA
Based on Spin Column

Cat Number: BPVD050

Ver: 07

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

فهرست

محتویات کیت 4

شرایط پایداری و نگهداری 4

معرفی 5

حیطه کاربری 5

نمونه های قابل استفاده: 5

نکات مهم: 5

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند: 6

نکات ایمنی 6

آماده سازی بافرها 7

Proteinase K 7

NA Carrier 7

استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیونها 8

فرآیند 8

استخراج DNA/RNA ویروسی از مدفوع 10

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش : 10

آماده سازی نمونه 10

فرآیند 10

استخراج DNA/RNA ویروسی از نمونه سوآپ چشمی، بینی و حلق 11

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش : 11

آماده سازی نمونه 11

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based 12

آماده سازی نمونه 12

فرآیند 13

ضمیمه ها 15

آماده سازی نمونه خلط (Sputum) 15
آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage) 15
آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی 16
چالش‌ها و راه کارها 17
کنترل کیفیت 19
تاریخچه ویرایش پروتکل 20

محتویات کیت

CAT.NO.	محتویات	10 واکنش BPVD050R010	50 واکنش BPVD050	100 واکنش BPVD050	شرایط نگهداری
	Spin Column	10 pcs	50 pcs	100 pcs	دمای اتاق
	Collection Tube	40 pcs	200 pcs	400 pcs	دمای اتاق
BR113	LB Buffer	6 mL	26 mL	51 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 (320 µg)	1 vial (320µg)	1vial(320 µg)	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 Viral Nucleic Acid Extraction جهت استخراج DNA/RNA ویروسی با بازدهی بالا از نمونه های Liquid–based، Body Fluid ، و سوآب حلق و بینی به روش ستونی طراحی شده است. نوکلئیک اسید استخراج شده قابل برش توسط آنزیم های محدود کننده بوده و مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot می‌باشد.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit جهت استخراج دستی DNA/RNA ویروسی با روش ستونی طراحی شده است.

نمونه های قابل استفاده:

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، LB 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

[1] NA 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 500 µL از بافر LB اضافه کنید. برای مثال اگر تعداد 10 نمونه برای استخراج دارید، 30 µL از NA Carrier را به 5.1 mL از بافر لایز اضافه کنید.

[1] NA Carrier = Nucleic Acid Carrier

- در هنگام لایز به ازای هر نمونه فقط 500 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 مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها

- 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 500 µL از نمونه را به درون تیوب اضافه نمایید.
   - اگر حجم نمونه کمتر از 500 µL است، مقدار مناسب از محلول PBS (1X) را اضافه کنید تا حجم کل به 500 µL برسد.
   - استفاده از حجم کمتر از 500 µL نمونه در این فرآیند توصیه نمی‌شود.
2. میزان 500 µL بافر LB 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 500 µL بافر LB اضافه نمایید
3. میزان 600 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. میزان µL 800 از محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
5. مرحله قبل را با اضافه کردن باقیمانده مخلوط به ستون تکرار کنید.
6. میزان µL 500 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.
7. میزان µL 600 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.
8. 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.
9. 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 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 µL 60 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/RNA ویروسی از مدفوع

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :

1. محلول سالین 0.9% (Saline Solution)
2. فیلتر 0.22 µm

آماده سازی نمونه

1. میزان 0.5–1.0 mL از نمونه مدفوع را در حداکثر 5 mL محلول سالین 0.9% (حداکثر رقت 1:10) حل نمایید.
2. محلول را در 4000 x g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا یک محلول شفاف حاصل شود.
3. مایع رویی را به وسیله فیلتر 0.22 µm فیلتر نمایید.

فیلتراسیون در این مرحله باعث جداسازی سلول‌ها از نمونه مدفوع و در نتیجه، کاهش میزان نوکلئیک اسید سلولی در نمونه آماده‌سازی شده می‌شود.

فرآیند

1. میزان 500 µL از نمونه فیلتر شده را درون میکروتیوب 2 mL بریزید. 15 µL پروتئیناز K را اضافه نمایید.

2. میزان 500 µL بافر LB را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید.
3. میزان 600 µL اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها، از مرحله 4 عمل شود.

توجه: در این فرآیند، مرحله الوشن را با استفاده از 60 µL بافر VEB انجام دهید.

استخراج DNA/RNA ویروسی از نمونه سوآپ چشمی، بینی و حلق

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :

- PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ

آماده سازی نمونه

1. بعد از نمونه‌گیری به وسیله سوآپ، آن را درون 2 mL بافر فسفات سالین حاوی ترکیبات ضد قارچ و ضد باکتری قرار دهید و به مدت 3-2 ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.
2. مطابق پروتکل تغلیظ نمونه، حجم نمونه را از 2 mL به 200 µL برسانید.
3. جهت تغلیظ نمونه، می‌توانید از کیت تغلیظ نمونه‌های ویروسی به‌ژن استفاده نمایید.

4. چنانچه به کیت تغلیظ دسترسی ندارید مراحل استخراج را با حجم 500 µL از نمونه طبق فرآیند استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها انجام دهید.

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based

این فرآیند دارای حساسیت بالا جهت استخراج DNA ویروس 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 LB 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 LB 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.

آماده سازی نمونه خلط (Sputum)

1. مقدار 1 mL نمونه خلط و برابر با حجم آن، محلول NaOH (1M) را اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید.
2. نمونه را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا قابل پیپت کردن شود و سپس در (7500rpm) 5000x g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. بدون آسیب به رسوب تشکیل شده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 450 µL محلول PBS (1X) حل کنید، سپس به مدت 1 دقیقه ورتکس نمایید.از محلول بدست آمده جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)

1. حداقل میزان 10 mL از نمونه BAL را درون فالکون 50 mL یا 15 mL انتقال داده و در 300 x g به مدت 10-5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
2. . محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست‌آمده را در 1 mL بافر PBS (1X) حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید. تیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا رسوب کاملاً حل شود، سپس در 10,000 x g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در 500 µL بافر PBS (1X) حل نمایید و به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید. از رسوب به دست آمده می-توانید جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

توجه: نمونه‌های BAL کمتر از 10 mL، تا 70% بازده استخراج DNA ژنومیک را پایین می‌آورد.

آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی

اگر حجم نمونه بیشتر از 500 µL باشد، نمونه را در چند تیوب 2 mL با حجم‌های برابر تقسیم کنید و در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون ها عمل نمایید.

- نسبت حجم بافر LB، اتانول و نمونه در این فرآیند 1:1:1 می‌باشد. (حجم بافر LB و اتانول برابر با حجم نمونه ی اولیه می‌باشد.)
- محتویات تیوب‌ها را در چند مرحله از یک ستون عبور دهید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
غلظت پایین DNA استخراج شده	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 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 هایی 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 بافت یا خون 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 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 LB ،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.
پایین بودن نسبت A260/A230	آلودگی نمکی	• در حین فرآیند ستون‌ها را به آرامی جا به جا کنید. • درب ستون‌ها را به آرامی باز و بسته نمایید. • از انتقال حباب‌های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. • از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.
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	نسخه جدید	1401/02
01	1. اعمال تغییرات در حجم ریجنت‌ها در برخی از فرآیندها. 2. اعمال تغییرات در سرعت سانتریفیوژ در برخی فرآیندها. 3. بروزرسانی فرآیند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED. 4. اضافه کردن نحوه آماده‌سازی نمونه از خلط در قسمت ضمیمه‌ها.	1401/04
02	افزودن فرآیند استخراج RNA ویروسی.	1402/02
03	1. تغییر فرایند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED 2. تغییر در فرایند الوشن استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها 3. اضافه شدن آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی در قسمت ضمیمه ها	1402/04
04	تغییر در کت نامبر ستون	1402/05
05	1. افزوده شدن بافر TL به محتویات 2. بهبود فرایند استخراج از نمونه LIQUID-BASED 3. افزودن چالش ها و راهکارها	1403/02
06	1.تغییر فرایند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED 2.تغییر آماده سازی نمونه خلط (SPUTUM) 3. تغییر مقدار بافر PBS(1X) در آماده سازی نمونه BAL	1403/06
07	1. 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