BehPrep **Viral RNA** Extraction Kit

For Manual Isolation of Viral RNA
From Respiratory Swab

Based on Spin Column

Cat Number: BBVD050

Ver: 01

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

فهرست

محتویات کیت 3

شرایط نگهداری و پایداری کیت 3

معرفی 4

حیطه کاربری 4

نمونه های قابل استفاده :..... 4

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود. 4

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند 5

نکات ایمنی 5

آماده سازی بافر ها..... 6

آماده سازی NA Carrier 6

آماده سازی نمونه 6

فرآیند 6

خلاصه تصویری فرایند استخراج 9

چالش ها و راه کارها.....10

کنترل کیفیت 10

محتویات کیت :

شرایط نگهداری	100 واکنش (BBVD0100)	50 واکنش (BBVD050)	10 واکنش (BBVD010)	محتویات	CAT.NO.
دمای اتاق	100 pcs	50 pcs	10 pcs	Spin Column	
دمای اتاق	300 pcs	150 pcs	30 pcs	Collection Tube	
دمای اتاق	320 µg	320 µg	320 µg	RNA Carrier	BR129
دمای اتاق	30 mL	15 mL	3 mL	AL Buffer	BR125
دمای اتاق	105 mL	56 mL	11 mL	WB Buffer	BR116
دمای اتاق	15 mL	8 mL	2 mL	AE Buffer	BR126
دمای اتاق	60 mL	30 ml	6 mL	Ethanol 100%	BR127

شرایط نگهداری و پایداری کیت

- ستون‌ها در کیسه های زیپ‌دار بسته‌بندی شده اند و در دمای اتاق (18–25°C) تا پایان تاریخ انقضاء کیت پایداری خواهند داشت . لطفاً توجه داشته باشید که ستون‌ها پس از باز شدن باید فورا مورد استفاده قرار گیرند.
- همه محلول ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوبات نباید از آن ها استفاده کرد. محلول ها 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 این هیچ تاثیری در عملکرد آن‌ها نخواهد داشت.
- درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید

معرفی :

کیت BehPrep Viral RNA جهت استخراج دستی RNA خالص ویروسی با روش ستونی طراحی شده است. این کیت بدون استفاده از آنزیم بهینه سازی شده است و مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر، Real Time PCR، PCR و Southern Blot می باشد.

حیطه کاربری :

کیت استخراج Behprep Viral RNA Extraction جهت استخراج دستی RNA ویروسی به روش ستونی طراحی و بهینه سازی شده است.

نمونه های قابل استفاده :

نمونه های سوآب تنفسی جهت استخراج SARS-CoV2 , آنفولانزا و ویروس RSV

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- بافر شستشو آماده مصرف می‌باشد.
- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18–25°C) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد / ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده تمامی بافر ها و نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.
- قبل از استفاده بافرها را کاملا مخلوط کنید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها باید بادقت به مرکز غشاء ستون بدون تماس با دیواره و لبه ستون اضافه شوند.

- 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 غشا ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing ، تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب ستون جدا شوند.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:

- سمپلر µL 1000-100 و µL 100-10 و سرسمپلر (RNase-DNase free)
- میکروتیوب 1.5 mL (RNase-DNase free)
- ورتکس
- میکروسانتریفیوژ
- محلول NaCl 0.9 % یا PBS (برای نمونه های کمتر از µL 200)

نکات ایمنی

- بافر AL حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشد، هنگام استفاده از آن احتیاط لازم را انجام دهید و حتما از هود لامینار استفاده شود. نمک‌های گوانیدین با محلول های شستشو واکنش نشان می‌دهد.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فورا عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست ممانعت کنید.
- هنگام کار با نمونه‌های انسانی، از متد های توصیه شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی بافر ها

آماده سازی RNA Carrier

I. میزان 320 µL بافر AE را به تیوب حاوی 320 µg RNA Carrier لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول1 µg/µL بدست آید. RNA Carrier را کاملاً حل کرده و و بطور کامل به بافر AL اضافه کنید. بافر AL محتوی RNA Carrier در یخچال نگهداری گردد.

توجه: بافر AL محتوی NA Carrier هنگام کار می بایست به دمای محیط برسد.

توجه: به یاد داشته باشید که RNA Carrier در بافر AL حل نمی‌شود؛ بنابراین ابتدا باید در بافر AE حل شده و سپس به بافر AL افزوده شود.

آماده سازی نمونه

نمونه سوآب را در محیط انتقال ویروس (VTM) به مدت 15 ثانیه ورتکس کنید تا کاملا مخلوط شود.

فرآیند

1. میزان 200 µL از نمونه جمع آوری شده (VTM) را به درون یک میکروتیوب 1.5 mL RNase-DNase free تمیز بریزید.

توجه: اگر حجم نمونه کمتر از 200 µL است، مقدار مناسب از محلول NaCl 0.9% را اضافه کنید تا حجم کل به 200 µL برسد.

2. میزان 300 µL از بافر AL حاوی RNA Carrier را به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط کنید. میکروتیوب را اندکی

سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. سپس تیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

3. میزان 250 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.

توجه : اگر دمای محیط بیش از 25°C بود، اتانول را قبل از اضافه کردن لایز، روی یخ خنک کنید.

توجه: چنانچه به RNA با بازدهی و کیفیت بهتر برای انجام فرآیندهای مولکولی نیاز دارید، مقدار اتانول اضافه شده در این مرحله را دو برابر کنید و محلول لایز را طی دو مرحله از ستون عبور دهید (500 µL به ازای هر مرحله)

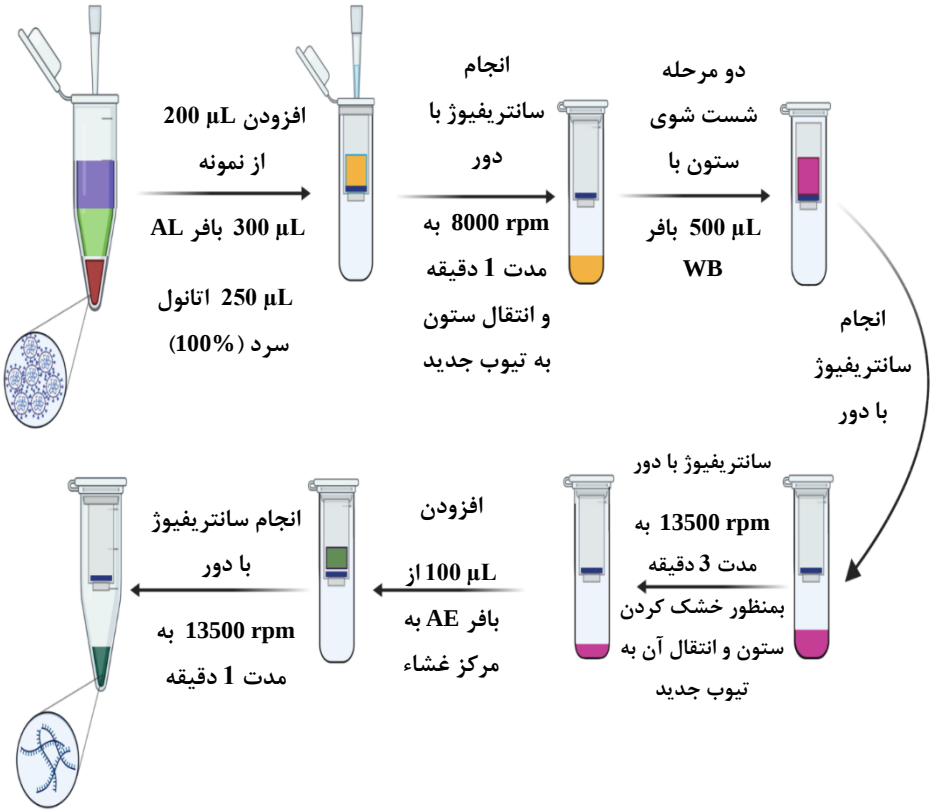
4. محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به ستون (متصل شده به کالکشن تیوب) اضافه کنید و آن را در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
توجه: اگر نمونه از ستون عبور نکرد، ستون را مجددا با حداکثر سرعت دستگاه تا زمانی که نمونه از ستون عبور کند، سانتریفیوژ نمایید.
5. میزان 500 µL بافر WB را به ستون اضافه کرده و در 6000 x g (8000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
6. بار دیگر مرحله 5 را تکرار کنید.
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 بافرWB 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 RNase–DNase free 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 100 µL بافر AE 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.

- به‌طورکلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر AE تا بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می‌تواند باعث افزایش میزان استخراج RNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان RNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر AE رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 50%–20 میزان RNAرا افزایش خواهد داد.
- RNA استخراج شده را در دمای 20°C– ذخیره نمایید.

خلاصه تصویری فرایند استخراج



چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها
میزان بسیار کم یا نبود RNA	میزان کم نمونه	– نمونه با محلول NaCl 0.9 % مخلوط شود تا به حجم 200 µL برسد. – حتما نمونه به مرکز ستون اضافه شود.
	لایز نامناسب نمونه	– زمان انکوباسیون با بافر AL رعایت شود – ورتکس تا جایی انجام شود که محلولی همگن حاصل شود.
	فریز و ذوب کردن مکرر نمونه	– تا حد امکان از نمونه تازه استفاده شود – تا زمان شروع فرایند استخراج نمونه در 20°C –قابل نگهداری می‌باشد. – نمونه‌گیری دوباره انجام شود.
	عدم تخلیه کامل محلول از ستون	– مدت زمان سانتریفیوژ را بیشتر کنید – حداکثر سرعت سانتریفیوژ اعمال شود.
	مسدود شدن فیلتر ستون	– بافرها از نظر وجود رسوب ارزیابی شوند. – بافرها قبل از استفاده باید به دمای اتاق برسند.
مشکل در فرآیندهای مولکولی بعد از استخراج	وجود ماده بازدارنده در نمونه حاصل از استخراج	– شستشوی بیشتر با بافر WB
دو فاز شدن AL و حامل RNA	عدم حل کردن حامل RNA در بافر AE	–RNA Carrier باید ابتدا در بافر AE حل شده و سپس به بافر AL اضافه شود در غیر این صورت پودر RNA Carrier غیر قابل انحلال خواهد بود.

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.

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