

کیت استخراج RNA ویروسی از خون و مایعات بدن شماره کاتالوگ (BP-151)

این کیت برای استخراج RNA ویروسی از خون و مایعات بدن می باشد که برای انجام ۵۰ تست آماده شده است. در این کیت ابتدا RNA ویروسی از پلاسما یا حاوی ضد انعقاد نظیر EDTA، سرم و سایر مایعات بدن که فاقد توده سلولی است هستند جدا سازی می شود. این کیت برای استخراج RNA از سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن می باشد. در این سیستم ابتدا نمونه سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن در حضور ترکیبات لیز کننده نظیر فنل و پروتئیناز K قرار می گیرد. سپس RNA آزاد شده ویروس در حضور Carrier RNA و گوانیدین HCL و ایزوتیوسیانات RNA ویروسی و سپس و با اضافه شدن اتانول ۹۶% و طی چند مرحله شستشو سایر مواد و ناخالصی ها شسته شده و فقط RNA ویروسی به ستون جاذب Spin column اتصال می یابد. در نهایت با اضافه شدن بافر الوشن و شرایط PH بازی RNA ویروسی مورد نظر از ستون شسته شده و برای استفاده های بعدی در فریزر 20- نگهداری می شود.

محتویات کیت:

Components	مقدار
BP Lysis Buffer	1× 24ml
BP Binding solution	1×24 ml
BP washing Buffer 1	1× 30ml
BP washing Buffer 2	1× 30ml
BP Elution Buffer	1× 3ml
Spin column	عدد 50

پروتکل انجام آزمایش:

تجهیزات لازم:

۲- سانتریفیوژ

۳- سمپلر ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ لاند

روش کار:

- ۱- ابتدا مقدار $200\mu\text{L}$ از نمونه پلاسمای بیمار در یک میکروتیوب تمیز و استریل بریزید به آن اضافه کنید و سپس به آن $200\mu\text{L}$ از ویال **BP Lysis Buffer** اضافه کنید و سپس مخلوط کنید و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده دهید.
- ۲- سپس $200\mu\text{L}$ از ویال **BP Binding Solution** به آن اضافه نموده و همچنین $200\mu\text{L}$ اتانل ۹۶ درصد به آن اضافه کرده و برای مدت ۲۰ ثانیه با دور آهسته ورتکس و سپس اسپین کنید.
- ۳- مخلوط حاصله را به **Spin column** انتقال دهید احتیاط نماید در حین انتقال نباید درب آن مرطوب گردد سپس دور **8000 RPM** بمدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۴- مایع زیر ستون را دور بریزید و سپس $500\mu\text{L}$ از ویال **BP washing Buffer 1** به آن اضافه گردید و سپس در دور **8000 RPM** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۵- مایع زیر ستون را دور بریزید و سپس $500\mu\text{L}$ از ویال **BP washing Buffer 2** به آن اضافه گردید و سپس در دور **14000 RPM** به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۶- مایع زیر ستون را دور بریزید و سپس در دور **14000 RPM** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۷- ستون **Spin column** را به یک میکروتیوب 1.5 میلی لیتری فاقد **RNA & DNA free** منقل گردید و به آن $50\mu\text{L}$ از ویال **BP Elution Buffer** اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس در دور **8000 RPM** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۸- ستون **Spin column** دور انداخته شد و **RNA** استخراج شده در ته لوله جمع شده باید فوراً به **cDNA** تبدیل شود و یا برای استفاده بعدی در فریزر منهای 70° نگهداری کنید.

BP RNA Extraction Kit

مواد مورد نیاز:

- ۱- گوانیدین هیدروکلراید
- ۲- توئین ۲۰
- ۳- تریتون X100
- ۴- NaOH
- ۵- پروتئیناز K
- ۶- ستون های سیلیکا خریداری شده از آلمان
- ۷- تریس هیدروکلراید
- ۸- سدیم آزاید
- ۹- ایزوپروپانول
- ۱۰- EDTA
- ۱۱- پروتئیناز K
- ۱۲- آب Rnase Dnase Free
- ۱۳- Spin column

پروسه:

این کیت از ۵ سری محلول تشکیل شده است.

❖ BP Lysis Buffer

این بافر حاوی ترکیباتی نظیر مقادیر مناسبی از توئین ۲۰، تریتون X-100، تریس HCL و محلول EDTA با غلظت مناسب مخلوط کرده و با کمک NaOH پی اچ آن را بر روی ۸ تنظیم می کنیم و به کمک آب دوبار تقطیر حجم آن را به یک لیتر می رسانیم. این محلول را به میزان ۴۰ میلی لیتر در ویال های استریل جهت تهیه کیت می ریزیم.

❖ BP Binding Solution

این محلول حاوی ترکیباتی نظیر مقادیر مناسبی از گوانیدین تیوسیانات و تریس هیدروکلراید با مولاریته مناسب می باشد.

❖ BP washing Buffer 1

این بافر در مرحله اول شستشوی ستون استخراج RNA استفاده می شود و حاوی مقدار مناسبی از تریس هیدروکلراید و ایزوپروپانول است که بصورت کنستانتتره ۹۶% ساخته می شود.

❖ BP washing Buffer 2

این بافر در مرحله دوم شستشوی ستون استخراج RNA استفاده می شود و حاوی مقدار مناسبی از تریس هیدروکلراید و ایزوپروپانول است که بصورت کنستانتتره ۶۵% ساخته می شود.

❖ BP Elution Buffer

این بافر حاوی ترکیبات مقدار مناسبی از محلول EDTA با مولاریته مشخص بوده که با مقدار مناسبی از سدیم آزاید ترکیب شده و به کمک سود مقدار پی اچ آن بر روی ۸.۵ تنظیم می شود.

Spin column

این ستون جاذب بصورت آماده خریداری می گردد و در کیت قرار می گیرد

آزمون های اعتبار سنجی:

بعد از تولید این کیت آزمون های اعتبار سنجی با کمک نمونه های استاندارد NIBSC WHO از ویروس حاوی RNA نظیر HCV اعتبار سنجی می شود و کمترین میزان تیتري از این ویروس که توسط کیت قابل تشخیص است مورد ارزیابی قرار می گیرد.

توصیف:

در این کیت ابتدا RNA ویروسی از پلاسمای حاوی ضد انعقاد نظیر EDTA ، سرم و سایر مایعات بدن که فاقد توده سلولی است هستند جدا سازی می شود.

این کیت برای استخراج RNA از سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن می باشد. در این سیستم ابتدا نمونه سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن در حضور ترکیبات لیز کننده نظیر فنل و پروتئیناز K قرار می گیرد. سپس RNA آزاد شده ویروس در حضور Carrier RNA و گوانیدین HCL و ایزوتیوسیانات RNA ویروسی و سپس و با اضافه شدن اتانول ۹۶% و طی چند مرحله شستشو سایر مواد و ناخالصی ها شسته شده و فقط RNA ویروسی به ستون ستون جاذب Spin column اتصال می یابد. در نهایت با اضافه شدن بافر الون و شرایط PH بازی RNA ویروسی مورد نظر از ستون شسته شده و برای استفاده های بعدی در فریزر -20 نگهداری می شود.