شرکت ویستا زیست فناوری به ژن

کیت تخلیص اسید نوکلئیک ویروسی

BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit

Cat .No: BPVD050

- در دمای اتاق نگهداری شود
- تاریخ انقضا: یک سال پس از تولید

آدرس: شیراز،رکن آباد، خیابان کارآفرین، مرکز رشد بیوتکنولوژی علوم پزشکی شیراز، کد پستی: 7146864685

وبسایت: www.behgene.com

شماره تماس: 09053633840

1. اطلاعات کلی

1.1. محتویات کیت:

نوع	مقدار
ستون (Spin Column)	100
کالکشن تیوب (Collection Tube)	200
حامل RNA (RNA Carrier)	1250µg
پروتئناز K (Proteinase K)	۱/۲۵ mL *2
بافر لایز (LB Buffer)	20 mL
بافر شستشو شماره یک (WB1 Buffer)	22 mL
بافر شستشو شماره دو (WB2 Buffer)	16 mL
بافر الوشن (EB Buffer)	10 mL

- همه محلول ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوبات نباید از آنها استفاده کرد. محلولها را در دمای 25-15 درجه سانتی گراد یا در حمام آب 37 درجه سانتیگراد گرم کنید تا رسوبات حل شوند.
- بافرها ممکن است تا حدودی زرد رنگ باشند که این هیچ تاثیری در عملکرد آن‌ها نخواهد داشت.

2.1. نکات احتیاطی

- از چرخه انجماد / ذوب خودداری شود
- قبل از استفاده بافرها را کاملا مخلوط کنید
- بافر LB و WB1 حاوی نمک های گوانیدین می باشند، هنگام استفاده از آن ها احتیاط لازم را انجام دهید. نمک های گوانیدین با محلول های شستشو واکنش نشان می دهد.

3.1. شرایط نگهداری:

محتویات کیت باید در دمای 25-15 درجه سانتیگراد نگهداری شوند. در صورت نگهداری در شرایط مناسب، تمام اجزای کیت تا تاریخ انقضا چاپ شده روی برچسب پایدارخواهند بود. نگهداری در دمای 2 تا 8 (یخچال) یا 15- تا 25- درجه سانتیگراد (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول ها تأثیر منفی بر روی تخلیص اسید نوکلئیک خواهد گذاشت.

4.1. آماده سازی بافرها

۱.۴.۱. حامل RNA (RNA Carrier)

حامل RNA دو کار انجام می دهد: اولا، اتصال اسیدهای نوکلئیک ویروسی به غشای سیلیکا را افزایش می دهد؛ به ویژه اگر مولکول های هدف بسیار کمی در نمونه وجود داشته باشد. ثانیا، افزودن مقادیر زیادی از حامل RNA باعث کاهش احتمال تخریب RNA ویروسی می شود.

۲.۴.۱. افزودن حامل RNA به بافر LB

640 میکرولیتر بافر VEB را به تیوب حاوی 1250 میکروگرم حامل RNA لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول 2 µg/µl بدست آید. RNA حامل را کاملاً حل کنید، آن را به اندازه های مناسب تقسیم نمایید و سپس در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. از یخ زدن و ذوب شدن بیش از 3 بار حامل RNA خودداری کنید. الیکوت های 64 µl برای انجام 10 تخلیص 10 تایی آماده شوند.

- ❖ توجه: به یاد داشته باشید که حامل RNA دربافر LB حل نمی شود. بنابراین ابتدا باید در بافر VEB حل شده و سپس به بافرLB اضافه شود.
- ❖ توجه: برای 10 بار تخلیص، یک ویال حاوی 64 میکرولیتر محلول حامل RNA را ذوب کرده و با 2/2 میلی لیتر بافرLB کاملاً مخلوط کنید. حتما در هنگام کار به صورت تازه تهیه گردد! از ذخیره کردن خودداری نمایید!

۱.۴.۳. بافر WB1

بافر WB1 با غلظت زیاد (concentrate) تهیه می شود. قبل ازاستفاده برای باراول، مقدار 29 ml اتانول (96-100٪) را به آن اضافه کرده و حجم را به 51 میلی لیتر برسانید. بافر WB1 در دمای اتاق (15-25 درجه سانتیگراد) به مدت 1 سال تا تاریخ انقضاء کیت، پایدارخواهد بود.

۱.۴.۴. بافر WB2

بافر WB2 با غلظت زیاد (concentrate) تهیه می شود. قبل ازاستفاده برای باراول، مقدار 37 ml اتانول (96-100٪) را به آن اضافه کرده و حجم را به 53 میلی لیتر برسانید. بافر WB2 در دمای اتاق (15-25 درجه سانتیگراد) به مدت 1 سال تا تاریخ انقضاء کیت، پایدارخواهد بود.

2. تجهیزات و محلول هایی که باید فراهم شود:

سمپلر و سرسمپلر (RNAase/DNAse free)

میکروتیوب 1.5 (RNAase/DNAse free)

اتانول ٪96-100

هات بلاک

میکروسانتفیوژ

برای نمونه های کمتر از 200µl محلول سدیم کلراید 9 درصد

3. نکات مهم

- نمونه یا محلول را با دقت به وسیله پیپت به فیلتر ستون، طوری که نمونه روی لبه نریزد، اضافه کنید.
- سر سمپلر را بعد از هر بار اضافه کردن مایع عوض کنید. استفاده از سرسمپلر aerosol-barrier توصیه می شود.
- دقت شود که سرسمپلر با غشا ستون برخورد نداشته باشد.
- پس از تمامی مراحل pulse-vortexing، میکروتیوب ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات از داخل درب خارج شوند.
- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه ، آن را فوراً عوض کنید.

توجه: تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (15-25 درجه سانتیگراد) انجام می شود.

کارهایی که باید قبل از شروع کار انجام شود:

- نمونه ها را به دمای اتاق برسانید
- بافر VEB را به دمای اتاق برسانید
- اطمینان حاصل کنید که بافرهای WB1 و WB2 و RNA Carrier طبق دستورالعمل ذکر شده تهیه شده اند.

- حامل RNA بازسازی شده در بافر VEB را طبق دستورالعمل ذکر شده به بافر LB اضافه کنید

1.3 فرآیند سانتریفیوژ کردن ستون

ستون را قبل از قراردادن در میکروسانتریفیوژ ببندید و مطابق دستورالعمل سانتریفیوژ کنید.

ستون و تیوب را از میکروسانتریفیوژ خارج کنید. ستون را در یک تیوب جدید قرار دهید. لطفاً به یاد داشته باشید که مایع تصفیه شده ممکن است حاوی پسماندهای خطرناک باشد و باید به درستی دور ریخته شود.

هر بار فقط یک ستون را باز کنید و مراقب باشید که از تولید آئروسل جلوگیری شود.

4. فرآیند

1. میزان 25 میکرولیتر پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب تمیز 1.5 میلی لیتر بریزید.
2. 200 میکرولیتر از نمونه (پلاسما ، سرم ، مایعات بدن و غیره) را به درون تیوب اضافه نمایید.

توجه: اگر حجم نمونه کمتر از 200 میکرولیتر است، مقدار مناسب از محلول کلرید سدیم 0.9% را اضافه کنید تا حجم کل به 225 میکرولیتر برسد.

3. 200 میکرولیتر بافر LB (حاوی ۲۸ میکروگرم در میلی لیتر RNA حامل) اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه وورتکس کنید تا کاملا میکس شود.
توجه: لازم است که نمونه و بافر LB کاملاً مخلوط شوند تا یک محلول همگن حاصل شود.

4. تیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56 درجه انکوبه کنید.
5. سپس آنرا مقداری سانتریفیوژ کنید تا قطرات داخل درب از بین بروند
6. 250 میکرولیتر اتانول (96–100%) به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه وورتکس نمایید. مواد حاصل از تجزیه سلول (lysate) را به مدت 3 دقیقه با اتانول در دماي اتاق (15–25 درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

توجه: اگر دمای محیط بیش از 25 درجه سانتیگراد بود، اتانول را قبل از اضافه کردن لیز روی یخ خنک کنید.

7. تیوب را مقداری سانتریفیوژ کنید تا قطرات داخل درب از بین بروند.
8. با احتیاط تمام لیزحاصل از مرحله 7 را بر روی ستون بدون خیس کردن لبه ها اضافه کنید و آنرا در 8000rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

توجه: اگر لیزاز ستون عبور نکرد ، سانتریفیوژ را با حداکثر سرعت تا زمانی که از ستون عبور کند، انجام دهید

9. 500 میکرولیتر بافر WB1 اضافه کرده ودر rpm 8000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در تیوب جدیدی قرار دهید.
توجه: این مرحله باعث افزایش عملکرد کیت هنگام کار با نمونه های بازدارنده می شود.

10. 500 میکرولیتر بافر WB2 اضافه کرده ودر 8000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. ماده عبوری را دور ریخته و ستون را در تیوب جدید قرار دهید.

11. ستون را دوباره در تیوب قرار دهید و با حداکثر سرعت (14000 rpm) به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا غشاء کاملاً خشک شود. سپس تیوب و ماده عبوری را دور بریزید.

12. ستون را در یک میکروتیوب 1.5 میلی لیتری تمیز قرار دهید.

13. 20–150 میکرولیتر از بافر VEB را به مرکز غشاء اضافه کنید. درب را ببندید و 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. سپس با حداکثر سرعت (14000 rpm) به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید

توجه:

- اطمینان حاصل کنید که VEB به دمای اتاق برسد.
- اگر شستشو در حجم های کوچک انجام می شود (کمتر از50 میکرولیتر) ، برای شستشوی کامل RNA و DNA متصل شده، VEB باید در مرکز غشاء قرار گیرد.
- انکوباسیون در دمای اتاق به مدت 5 دقیقه پس از افزودن VEB، به طور کلی باعث افزایش استخراج DNA وRNA قبل از سانتریفیوژ می شود.