

Viral DNA/RNA Extraction Kit

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Pre-Lysis Buffer (for HPV)	10 ml	دمای محیط (15-25 °C)
Virus Lysis Buffer	15 ml	
Wash Solution I	25 ml	
Wash Solution II* (concentrate)	15 ml	
Elution Buffer	4 ml	
RNA Carrier (Lyophilized)	2	
Proteinase K Buffer	2 ml	
Proteinase K (Lyophilized)	40 mg	
Spin Columns	50	
collection tubes	100	
Protocol	1	



* ۳۵ ml اتانول مطلق به بطری Wash Solution II اضافه نمایید.
 * قبل از شروع استخراج، ۳۰۰ الی ۳۰۰۰ از محلول Elution Buffer به RNA Carrier اضافه نمایید. دمای نگهداری RNA Carrier پس از انجام این فرآیند ۲۰ °C می باشد.
 * در صورت مشاهده رسوب در بافر Wash Solution I به منظور حل شدن کامل رسوب، قبل از استفاده، بافر را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه نمایید.
 * قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند ۲-۸ °C می باشد.

کیت حاضر به منظور استخراج DNA و RNA ویروسی با خلوص و غلظت مناسب از نمونه های خون، سرم، پلاسما زگیل، ترشحات واژن، سلول های کشت داده شده، سواپ های دهانی و سایر مایعات مخاطی در کمترین زمان طراحی شده است. از جمله مزایای این کیت، عدم وجود بازدارنده های بالقوه در PCR/RT-PCR می باشد.

نکات کلیدی:

- برای جلوگیری از ذوب و انجماد مکرر RNA Carrier، محلول را حداکثر در سه ویال به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر الیکوت کنید و در دمای درج شده بر روی میکروتیوب نگهداری نمایید.
- قبل از شروع فرایند استخراج، تمامی بطری های موجود در کیت را چندین بار به آرامی invert نمایید.

موارد مورد نیاز:

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل
- Water bath یا Heating block
- سانتریفیوژ

جدول ۱-

نحوه آماده سازی Carrier-Lysis Solution

تعداد نمونه	مقدار Virus lysis buffer (ml)	مقدار RNA Carrier (μl)
1	0.3 (300 الی)	12
10	3	120
20	6	240
30	9	360
40	12	480
50	15	600

به ازای هر نمونه، ۳۰۰ الی ۳۰۰۰ از Virus Lysis Buffer و ۱۲ الی ۶۰۰ از RNA Carrier استفاده شود. به مخلوط حاصل Carrier-Lysis Solution گفته می شود.

Carrier-Lysis Solution باید همواره به صورت تازه و قبل از انجام آزمایش تهیه شود.

Viral DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

۱۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از نمونه های یوکاریوتی شامل خون، پلاسما، سرم و سایر مایعات بدن.

دستورالعمل:

* قبل از شروع فرایند استخراج، Carrier-Lysis Solution را طبق جدول ۱ تهیه فرمایید.
 * قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲-۸ °C می باشد.

۱. ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از نمونه مورد نظر را به درون یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

توجه: در صورت استفاده بیش از ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از نمونه، میزان Carrier-Lysis Solution را به همان نسبت افزایش دهید.

۲. به ازای هر نمونه ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ از Carrier-Lysis Solution را به میکروتیوب اضافه نمایید.

۳. سپس ۱۴۰ الی ۱۴۰۰ از Proteinase K به میکروتیوب اضافه کرده، Vortex نمایید و در دمای ۵۶ °C به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون هر ۵ الی ۱۰ دقیقه نمونه را Spin و vortex نمایید.

۴. ۱۰۰ μl از Carrier-Lysis Solution باقی مانده را به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۱۵ ثانیه Pulse-Vortex نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.
۵. ۲۰۰ μl اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه کرده و به خوبی invert کنید.
۶. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.
توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۳۰ ثانیه در دمای محیط ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.
۷. ستون و کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید. در صورتی که حجم نمونه بیشتر از ۱۰۰ μl باشد، محتویات را مجدداً داخل همان ستون ریخته و سانتریفیوژ نمایید تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.
۸. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۹. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۱۰. مرحله ۹ را مجدداً تکرار کنید.
۱۱. ستون -کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۱۲. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۳. ۴۰-۵۰ μl از محلول Elution Buffer به مرکز ستون اضافه نمایید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

Viral RNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

۲۰۰ μl از نمونه های یوکاریوتی شامل خون، پلاسما، سرم و سایر مایعات بدن.

دستورالعمل:

* قبل از شروع فرایند استخراج، Carrier-Lysis Solution را طبق جدول ۱ تهیه فرمایید.

۱. ۲۰۰ μl از نمونه مورد نظر را به درون یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.
توجه: در صورت استفاده بیش از ۲۰۰ μl از نمونه، میزان Carrier-Lysis Solution را به همان نسبت افزایش دهید.
۲. به ازای هر نمونه ۱۰۰ μl از Carrier-Lysis Solution را به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه Pulse-Vortex نمایید.
۳. سپس میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.
۴. ۲۰۰ μl اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه کرده و به خوبی invert کنید.
۵. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون انتقال دهید.
توجه: برای بهینه سازی نتایج به مدت ۳۰ ثانیه در دمای محیط ستون-کالکشن حاوی نمونه را انکوبه نمایید.
۶. ستون و کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید. در صورتی که حجم نمونه بیشتر از ۱۰۰ μl باشد، محتویات را مجدداً داخل همان ستون ریخته و سانتریفیوژ نمایید تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.
۷. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution I را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۸. ۵۰۰ μl محلول Wash Solution II را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.
۹. مرحله ۸ را مجدداً تکرار کنید.
۱۰. ستون -کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۱۱. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۲. ۴۰-۵۰ μl از محلول Elution Buffer به مرکز ستون اضافه نمایید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

HPV DNA Extraction Kit

میزان نمونه مورد نیاز:

- ۶۰۰-۷۰۰ μl از نمونه های حاوی ویروس HPV شامل ترشحات واژن، پلاسما، سرم، سواپ های دهانی و سایر مایعات مخاطی.
- بافت زگیل: ۱۰-۲۵ mg
- سلول های کشت داده شده: تا ۱۰^۶ x ۵ سلول

* قبل از شروع استخراج، محتویات ویال حاوی Proteinase K Buffer را به ویال پودر لیوفیلیزه پروتئیناز K اضافه نموده و پس از چندین بار Invert آن را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید. دمای نگهداری آنزیم پروتئیناز K پس از انجام این فرآیند در دمای ۲۰-۲۸ °C می باشد.

۱. ۶۰۰-۷۰۰ از نمونه ی مورد نظر را به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل انتقال دهید.

۲. میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) سانتریفیوژ کرده و شکل گیری رسوب را بررسی نمایید، سپس سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب را نگه دارید.

۳. ۴۰۰ الی ۴۰۰ Proteinase K را به محتویات میکروتیوب حاوی رسوب انتقال دهید.

۴. ۲۰۰ الی ۲۰۰ از Pre-Lysis Buffer را به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex و سپس Spin نمایید. سپس در دمای ۵۶ °C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید. در طی مدت زمان انکوباسیون، هر ۵ دقیقه میکروتیوب را invert نمایید. (در صورت حل نشدن بافت، می توان زمان انکوباسیون را به صورت Overnight افزایش داد).
توجه: در صورتی که نمونه مورد استفاده سرم و یا پلاسما می باشد، زمان انکوباسیون را به ۳۰ دقیقه کاهش دهید.

۵. ۲۰۰ الی ۲۰۰ از Virus Lysis Buffer را به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۱۵ ثانیه Vortex و Spin نمایید. سپس ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید.

۶. ۲۵۰ الی ۲۵۰ اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۵ ثانیه Vortex نمایید.

۷. ستون را داخل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون استخراج انتقال دهید.
توجه: ستون-کالکشن حاوی نمونه را برای بهینه سازی نتایج به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید.

۸. ستون و کالکشن را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید. محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و مجدداً ستون را در همان کالکشن قرار دهید.

۹. ۵۰۰ الی ۵۰۰ محلول I Wash Solution را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۰. ۴۵۰ الی ۴۵۰ محلول II Wash Solution را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کنید. محتویات داخل کالکشن را دور بریزید و ستون را مجدداً در همان کالکشن قرار دهید.

۱۱. مرحله ۱۰ را مجدداً تکرار نمایید.

۱۲. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

۱۳. کالکشن را دور بیندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.

۱۴. ۵۰-۷۰ الی ۵۰-۷۰ از محلول Elution Buffer را به مرکز ستون اضافه کنید. درب آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.

راهنمای عیب یابی:

پیشنهادهات	دلایل احتمالی	ايرادات
به دمای درج شده روی لیبل تمامی اجزای کیت دقت فرمایید و هر کدام را در دمای مناسب خود نگهداری کنید. RNA Carrier را طبق جدول ارائه شده اضافه نمایید. استفاده از Proteinase K در میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ تاثیر بسزایی دارد. لذا از زمان انکوباسیون، ترکیب کامل نمونه با آنزیم و نگهداری آن در شرایط مناسب اطمینان حاصل فرمایید. بهتر است نمونه مورد استفاده تازه و یا در شرایط درستی نگهداری شده باشد. محیط و وسایل کار باید عاری از هرگونه نوکلئاز باشند. از Vortex بیش از حد در حین فرایند استخراج خودداری شود.	عدم نگهداری کیت در دمای تعیین شده RNA Carrier اضافه نشده است. Proteinase K از فرایند حذف شده و یا به خوبی مخلوط نشده است. اسیدنوکلیک تخریب شده است.	مقادیر کم و یا عدم وجود اسیدنوکلیک در پایان فرایند استخراج
بدلیل اختلاف در pH، صرفاً از محلول Elution Buffer موجود در کیت استفاده نمایید.	به جای Elution Buffer از آب استفاده شده است.	کاهش عملکرد استخراج
عدم انجام مراحل شست و شو به صورت صحیح می تواند سبب عدم حذف عوامل بازدارنده PCR/RT-PCR در نمونه استخراج شده شود. این مرحله در میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ نیز تاثیر بسزایی دارد. مرحله ۱۰ در پروتکل Viral و یا مرحله ۱۲ در پروتکل HPV را مجدداً تکرار نمایید تا محلول II Wash Solution کاملاً از محصول حذف گردد. این مورد می تواند نتایج Ct در RT-PCR را تحت تاثیر قرار دهد. لذا RNA Carrier را به میزان درستی از Elution Buffer ترکیب نمایید.	وجود مواد بازدارنده پس از استخراج وجود اتانول در نمونه استخراج شده RNA Carrier به درستی در Elution Buffer حل نشده است	مشکلات مرتبط با فرایندهای پس از استخراج مانند: PCR, RT-PCR