

Sars-CoV-2 RNA Extraction Kit

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
Virus Lysis Buffer	15 ml	دمای محیط (15-25°C)
Wash Solution I	25 ml	
Wash Solution II* (concentrate)	15 ml	
Elution Buffer	4 ml	
RNA Carrier (Lyophilized)	—	—
Spin Columns	50	
Protocol	1	



* ۳۵ ml اتانول مطلق به بطری Wash Solution II اضافه نمایید.
 * قبل از شروع استخراج، ۳۰۰ الی ۳۰۰ الی 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.

کیت حاضر به منظور استخراج RNA از نمونه COVID-19 با خلوص و غلظت مناسب از نمونه های خون، سرم، پلاسما و سایر مایعات بدن در کمترین زمان طراحی شده است. از جمله مزایای این کیت، عدم وجود بازدارنده های بالقوه در Real-Time 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.

تعداد نمونه	مقدار lysis buffer (ml)	مقدار RNA Carrier (الی)
1	0.3 (300 الی)	6
10	3	60
20	6	120
30	9	180
40	12	240
50	15	300

جدول ۱- نحوه آماده سازی Carrier-Lysis Solution

به ازای هر نمونه، ۳۰۰ الی از Lysis Buffer و ۶ الی 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.

موارد مورد نیاز :

- اتانول مطلق (۹۹٪)
- میکروتیوب ۱/۵ ml استریل

میزان نمونه مورد نیاز:

۲۰۰ الی از سوسپانسیون سلولی، بزاق و سایر مایعات مخاطی تنفسی

دستورالعمل:

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

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

۲. به ازای هر نمونه ۳۰۰ الی از Carrier-Lysis Solution را به میکروتیوب اضافه نمایید.

۳. میکروتیوب را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ °C) انکوبه نمایید.

۴. ۲۰۰ الی اتانول مطلق به میکروتیوب اضافه کرده و به خوبی مخلوط 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.
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. ستون - کالکشن خالی را به مدت ۱ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ نمایید.
۱۰. کالکشن را دور بیاندازید و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار دهید.
۱۱. ۵۰-۴۰ 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.

* اسید نوکلئیک استخراج شده را در دمای -20°C نگهداری کنید.

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. 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 انجام مراحل شست و شو به صورت صحیح می تواند سبب عدم حذف عوامل بازدارنده PCR/RT-PCR در نمونه شود. این مرحله در میزان جذب نوری $260/230$ نیز تاثیر بسزایی دارد.	عدم نگهداری کیت در دمای تعیین شده RNA Carrier اضافه نشده است. اسیدنوکلیک تخریب شده است. به جای Elution Buffer از آب استفاده 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.	وجود مواد بازدارنده پس از استخراج	کاهش عملکرد استخراج
مرحله ۱۰ را مجدداً تکرار نمایید تا محلول Wash Solution II 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 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