



BehPrep **Viral Nucleic Acid** Extraction Kit

For Manual Isolation of Viral DNA/RNA
Based on Spin Column

Cat Number: BPVD050

Ver: 07

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

4	محتویات کیت
4	شرایط پایداری و نگهداری
5	معرفی
5	حیطه کاربری
5	نمونه های قابل استفاده:
5	نکات مهم:
6	تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:
6	نکات ایمنی
7	آماده سازی بافرها
7	Proteinase K
7	NA Carrier
8	استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیونها
8	فرآیند
10	استخراج DNA/RNA ویروسی از مدفوع
10	مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :
10	آماده سازی نمونه
11	فرآیند
11	استخراج DNA/RNA ویروسی از نمونه سوآپ چشمی، بینی و حلق
11	مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :
11	آماده سازی نمونه
12	استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based
12	آماده سازی نمونه
13	فرآیند
15	ضمیمه ها

- 15.....آماده سازی نمونه خلط (Sputum).....
- 15.....آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage).....
- 16.....آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی.....
- 17.....چالش ها و راه کارها.....
- 19.....کنترل کیفیت.....
- 20.....تاریخچه ویرایش پروتکل.....

محتویات کیت

شرایط نگهداری	100 واکنش BPVD050	50 واکنش BPVD050	10 واکنش BPVD050R010	محتویات	CAT.NO.
دمای اتاق	100 pcs	50 pcs	10 pcs	Spin Column	
دمای اتاق	400 pcs	200 pcs	40 pcs	Collection Tube	
دمای اتاق	51 mL	26 mL	6 mL	LB Buffer	BR113
دمای اتاق	58 mL	30 mL	7 mL	WB1 Buffer	BR102
دمای اتاق	70 mL	36 mL	10 mL	WB2 Buffer	BR103
دمای اتاق	22 mL	11 mL	3 mL	VEB Buffer	BR114
بعد از آماده سازی -20°C	1 vial (40mg)	1 vial (20 mg)	1 vial (4mg)	Proteinase K	BR105
دمای اتاق	2 mL	2 mL	2 mL	PK Buffer	BR106
بعد از آماده سازی -20°C	1 vial (320 µg)	1 vial (320µg)	1 vial (320 µg)	NA Carrier	BR112
دمای اتاق	24 mL	12 mL	4 mL	TL Buffer	BR108

شرایط پایداری و نگهداری

- ستون ها در کیسه های زیپ دار بسته بندی شده اند و در دمای اتاق (18-25°C) تا پایان تاریخ انقضای کیت پایداری خواهند داشت.
- همه محلول ها شفاف هستند و در صورت تشکیل رسوب نباید از آنها استفاده کرد.

- محلول‌ها 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 هیچ تأثیری در عملکرد آن‌ها نخواهد داشت.
 - درب بافرها را بلافاصله بعد از استفاده ببندید.
- توجه: نگهداری در دمای 2–8°C (یخچال) یا 25°C– تا 15°C– (فریزر) به دلیل تشکیل رسوب در محلول‌ها، تأثیر منفی بر روی تخلیص نوکلئیک اسید خواهد گذاشت.

معرفی

کیت استخراج BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction جهت استخراج DNA/RNA ویروسی با بازدهی بالا از نمونه های Body Fluid، Liquid-based، و سوآب حلق و بینی به روش ستونی طراحی شده است. نوکلئیک اسید استخراج شده قابل برش توسط آنزیم های محدود کننده بوده و مناسب جهت کاربردهای مولکولی نظیر PCR و Southern Blot می‌باشد.

حیطه کاربری

کیت استخراج BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit جهت استخراج دستی DNA/RNA ویروسی با روش ستونی طراحی شده است.

نمونه های قابل استفاده:

نکات مهم: لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای اتاق (18–25°C) انجام می‌شود.
- از چرخه انجماد-ذوب خودداری شود.
- قبل از استفاده، تمامی نمونه‌ها و بافرها را به دمای اتاق برسانید.

- قبل از استفاده، بافرها را کاملاً همگن نمایید.
- پروتئیناز K را قبل از استفاده ورتکس نمایید.
- محلول‌ها و نمونه‌ها را با دقت بدون تماس با دیواره و لبه‌ها به مرکز غشاء ستون اضافه نمایید.
- 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 غشاء ستون خودداری کنید.
- توصیه می‌شود بعد از Pulse-vortexing، تیوب‌ها را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب‌ها جدا شوند.
- به منظور جلوگیری از تشکیل آئروسول، درب ستون‌ها را در طول سانتریفیوژ ببندید.

تجهیزات و مواد مورد نیاز که باید فراهم شوند:

- سمپلر 100-100 μ L و 1000-100 μ L و سرسمپلر (RNase, DNase-free)
- میکروتیوب 1.5 mL و 2 mL (RNase, DNase-free)
- ورتکس
- اتانول 100%
- ترموبلاک
- میکروسانتریفیوژ
- کالکشن تیوب 2 mL

نکات ایمنی

- بافرهای TL، LB و WB1 حاوی نمک‌های گوانیدین می‌باشند، از این رو هنگام استفاده از آن‌ها احتیاط نمایید. نمک‌های گوانیدین با محلول‌های سفیدکننده واکنش نشان می‌دهند.

- در تمام مراحل دستکش بپوشید و در صورت تماس بین دستکش و نمونه، آن را فوراً عوض کنید.
- از برخورد بافرها با چشم و پوست خودداری کنید.
- هنگام کار، از دستورالعمل‌های توصیه شده برای کار با مواد زیستی خطرناک پیروی کنید.

آماده سازی بافرها

Proteinase K

- میزان مناسب از بافر نگهدارنده PK (PK Buffer) را مطابق جدول زیر به میکروتیوب حاوی پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت 20 ثانیه به خوبی ورتکس کنید. آنزیم پروتئیناز K آماده مصرف می‌باشد.
- توجه داشته باشید آنزیم آماده شده باید در دمای 20°C - نگهداری شود.

40 mg	20 mg	4 mg	مقدار پروتئیناز K
2 mL	1 mL	200 μL	مقدار بافر PK

¹ NA Carrier

- میزان 320 μL بافر VEB را به تیوب حاوی 320 μg NA Carrier لیوفیلیزه اضافه کنید تا یک محلول 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ بدست آید. NA Carrier را کاملاً حل کرده و در دمای 20°C - نگهداری نمایید.
- از تکرار چرخه انجماد-ذوب NA Carrier بیش از 3 بار پرهیز کنید.
 - برای ماندگاری بهتر و استفاده طولانی، 10 الیکوت 32 μL از NA Carrier فراهم کنید (هر الیکوت برای 10 واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد).

¹ NA Carrier = Nucleic Acid Carrier

۱۱. به ازای هر نمونه، میزان 3 μL از NA Carrier را به 500 μL از بافر LB اضافه کنید. برای مثال اگر تعداد 10 نمونه برای استخراج دارید، 30 μL از NA Carrier را به 5.1 mL از بافر لایز اضافه کنید.

- در هنگام لایز به ازای هر نمونه فقط 500 μL بافر لایز حاوی NA Carrier نیاز دارید و مقادیر بیشتر برای جلوگیری از خطای پিপتاژ در نظر گرفته شده است.

توجه: سایر بافرهای این کیت آماده مصرف می‌باشند.

استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها

- نمونه تازه و منجمد در این روش قابل استفاده می‌باشد.
- قبل از شروع فرآیند، نمونه منجمد را به دمای اتاق برسانید.

فرآیند

1. میزان 15 μL پروتئیناز K را درون یک میکروتیوب 2 mL تمیز بریزید. سپس 500 μL از نمونه را به درون تیوب اضافه نمایید.

- اگر حجم نمونه کمتر از 500 μL است، مقدار مناسب از محلول (1X) PBS را اضافه کنید تا حجم کل به 500 μL برسد.
- استفاده از حجم کمتر از 500 μL نمونه در این فرآیند توصیه نمی‌شود.

2. میزان 500 μL بافر LB را به نمونه اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را اندکی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند، و سپس به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید. در طول زمان انکوباسیون، تیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف Pulse-vortex کنید.

- توصیه می‌شود میزان 3 μL از محلول NA Carrier را به 500 μL بافر LB اضافه نمایید

3. میزان 600 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.
4. میزان 800 μL از 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 (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
5. مرحله قبل را با اضافه کردن باقیمانده مخلوط به ستون تکرار کنید.
6. میزان 500 μL بافر WB1 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
7. میزان 600 μL بافر WB2 را اضافه کرده و در (8000 rpm) 6000 x g به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.
8. 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 بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می‌کند.
- برای خشک شدن بهتر فیلتر می‌توانید درب ستون را به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق باز گذاشته و سپس مراحل بعد را انجام دهید.
9. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی میکروتیوب 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 60 μL بافر VEB 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.
- استفاده کمتر از 60 μL بافر VEB باعث افزایش قابل توجه غلظت نوکلئیک در مایع عبوری می‌شود، اما میزان نوکلئیک اسید استخراج شده را اندکی کاهش خواهد داد.

- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر VEB تا بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می تواند باعث افزایش میزان استخراج نوکلئیک اسید شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج نوکلئیک اسید را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر VEB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود، 20-50% میزان استخراج نوکلئیک اسید را افزایش خواهد داد.
- نوکلئیک اسید استخراج شده را در دمای 20°C - ذخیره نمایید.

استخراج DNA/RNA ویروسی از مدفوع

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :

1. محلول سالین 0.9% (Saline Solution)

2. فیلتر $0.22\ \mu\text{m}$

آماده سازی نمونه

1. میزان 0.5-1.0 mL از نمونه مدفوع را در حداکثر 5 mL محلول سالین 0.9% (حداکثر رقت 1:10) حل نمایید.

2. محلول را در $4000 \times g$ به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ کنید تا یک محلول شفاف حاصل شود.

3. مایع رویی را به وسیله فیلتر $0.22\ \mu\text{m}$ فیلتر نمایید.

فیلتراسیون در این مرحله باعث جداسازی سلول ها از نمونه مدفوع و در نتیجه، کاهش میزان نوکلئیک اسید سلولی در نمونه آماده سازی شده می شود.

فرآیند

1. میزان $500\ \mu\text{L}$ از نمونه فیلتر شده را درون میکروتیوب $2\ \text{mL}$ بریزید. $15\ \mu\text{L}$ پروتئیناز K را اضافه نمایید.
 2. میزان $500\ \mu\text{L}$ بافر LB را اضافه کنید و به مدت 20 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. میکروتیوب را به مدت 10 دقیقه در دمای 56°C انکوبه نمایید.
 3. میزان $600\ \mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کنید و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شوند. در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها، از مرحله 4 عمل شود.
- توجه: در این فرآیند، مرحله الوشن را با استفاده از $60\ \mu\text{L}$ بافر VEB انجام دهید.

استخراج DNA/RNA ویروسی از نمونه سوآپ چشمی، بینی و حلق

مواد و تجهیزات اختصاصی مورد نیاز در این روش :

- PBS (1X) حاوی ترکیبات ضد قارچ

آماده سازی نمونه

1. بعد از نمونه‌گیری به وسیله سوآپ، آن را درون $2\ \text{mL}$ بافر فسفات سالین حاوی ترکیبات ضد قارچ و ضد باکتری قرار دهید و به مدت 2-3 ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.

2. مطابق پروتکل تغلیظ نمونه، حجم نمونه را از 2 mL به 200 μ L برسانید.
3. جهت تغلیظ نمونه، می‌توانید از کیت تغلیظ نمونه‌های ویروسی به‌ژن استفاده نمایید.
4. چنانچه به کیت تغلیظ دسترسی ندارید مراحل استخراج را با حجم 500 μ L از نمونه طبق فرآیند استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها انجام دهید.

استخراج DNA ویروسی از نمونه Liquid-Based

این فرآیند دارای حساسیت بالا جهت استخراج DNA ویروس می‌باشد.

آماده سازی نمونه

1. جهت تغلیظ نمونه میزان 1-5 mL نمونه را در 4500 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده، مایع رویی را کاملاً خارج کنید. به صورتی که فقط رسوب سلولی باقی بماند.
 - چنانچه در آزمایشگاه مولکولی خود سانتریفیوژ لوله فالكون موجود ندارید، به منظور تغلیظ، میزان 2 mL نمونه را در (8000 rpm) $6000 \times g$ سانتریفیوژ نمایید. در صورت کافی نبودن رسوب تشکیل شده، این فرایند را تکرار کنید.
 - از آنجایی که غلظت و کیفیت نهایی DNA استخراج شده وابسته به نحوه نمونه‌گیری و میزان سلول‌های موجود در نمونه Liquid-Based می‌باشد، لازم است میزان رسوب سلولی قابل توجهی پیش از شروع فرایند استخراج تشکیل شود.
- نکته: اگر نمونه شفاف و بدون رسوب باشد پیشنهاد می‌شود:
1. تیوب نمونه‌گیری کاملاً ورتکس شود تا تمام سلول‌ها و بافت‌های متصل به سایتوبراش از آن جدا شود.
 2. حداکثر میزان نمونه اولیه استفاده شود.

3. حداکثر سرعت (10000Rpm) و زمان (15 دقیقه) را جهت سانتریفیوژ استفاده کنید.

4. نحوه خارج کردن مایع رویی به صورتی باشد که حداقل $150\mu\text{L}$ از مایع در انتهای میکروتیوب باقی بماند تا حداقل رسوب تشکیل شده از دست نرود.

فرآیند

1. میزان $180\mu\text{L}$ از بافر TL را به رسوب سلولی اضافه کرده و ورتکس کنید.
2. میزان $15\mu\text{L}$ پروتئیناز K را اضافه کرده و به وسیله ورتکس کاملاً مخلوط نمایید و به مدت 20 دقیقه در دمای 56°C انکوبه کنید. به منظور لایز کامل نمونه، درطول زمان انکوباسیون میکروتیوب را 5 مرتبه در فواصل زمانی مختلف ورتکس نمایید.

- استفاده از پروتئیناز K در این مرحله ضروری می باشد. نکته: در صورتی که تکه های بافتی لایز نشده و یا ذرات پلاستیکی مربوط به سایتوبراش در محیط لایز باقی مانده است، میتوانید میکروتیوب را در $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید و تنها مایع رویی را به میکروتیوب دیگر منتقل کنید.

3. میزان $200\mu\text{L}$ بافر LB و میزان $300\mu\text{L}$ اتانول 100% را به نمونه اضافه کرده و به مدت 15 ثانیه Pulse-vortex نمایید تا کاملاً مخلوط شوند. میکروتیوب را کمی سانتریفیوژ کنید تا قطرات مایع از درب تیوب جدا شود.

- توصیه می شود میزان $3\mu\text{L}$ از محلول NA Carrier را به $200\mu\text{L}$ بافر LB اضافه نمایید.

4. تمام محلول حاصل از مرحله قبل را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون انتقال دهید. درب ستون را ببندید و در $6000 \times g$ (8000 rpm) به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را در کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

5. میزان 500 μ L بافر WB1 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

6. میزان 600 μ L بافر WB2 را بدون تماس با دیواره و لبه ها به ستون اضافه کنید. درب ستون را ببندید و آن را در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید. کالکشن تیوب و مایع عبوری را دور ریخته و ستون را بر روی کالکشن تیوب جدید قرار دهید.

7. توصیه می شود 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 بافر WB2 به مرحله الوشن جلوگیری می کند.
- 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 1.5 mL جدید (باید توسط کاربر فراهم شود) قرار دهید. با احتیاط کامل درب ستون را باز کرده و میزان 60 μ L بافر VEB از پیش گرم شده در دمای 60°C را به مرکز ستون اضافه نمایید. ستون را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس در (8000 rpm) $6000 \times g$ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

- به طور کلی افزایش زمان انکوباسیون با بافر VEB، بیشتر از 5 دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن می تواند باعث افزایش میزان استخراج DNA شود.
- انکوبه کردن ستون با درب بسته در دمای 60°C افزایش راندمان استخراج DNA را به همراه خواهد داشت.
- اگر مرحله الوشن با بافر VEB رد شده از ستون برای بار دوم تکرار شود،

50%-20 میزان استخراج DNA را افزایش خواهد داد
DNA استخراج شده را در دمای °C 20- ذخیره نمایید.

ضمیمه ها

آماده سازی نمونه خلط (Sputum)

1. مقدار 1 mL نمونه خلط و برابر با حجم آن، محلول (1M) NaOH را اضافه کرده و نمونه را کاملاً ورتکس نمایید.
2. نمونه را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا قابل پپیت کردن شود و سپس در (7500rpm) $5000 \times g$ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. بدون آسیب به رسوب تشکیل شده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در 450 μ L محلول (1X) PBS حل کنید، سپس به مدت 1 دقیقه ورتکس نمایید. از محلول بدست آمده جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.

آماده سازی نمونه BAL (Bronchoalveolar Lavage)

1. حداقل میزان 10 mL از نمونه BAL را درون فالكون 50 mL یا 15 mL انتقال داده و در $300 \times g$ به مدت 5-10 دقیقه سانتریفیوژ نمایید.
2. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به دست آمده را در 1 mL بافر (1X) PBS حل نمایید و به تیوب 2 mL انتقال دهید. تیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا رسوب کاملاً حل شود، سپس در $10,000 \times g$ به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کنید.
3. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در 500 μ L بافر (1X) PBS حل نمایید و به مدت 1 دقیقه با حداکثر سرعت Pulse-vortex کنید. از رسوب به دست آمده می-توانید جهت فرآیند استخراج استفاده نمایید.
توجه: نمونه های BAL کمتر از 10 mL، تا 70% بازده استخراج DNA ژنومیک را پایین می آورد.

آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی

اگر حجم نمونه بیشتر از 500 μ L باشد، نمونه را در چند تیوب 2 mL با حجم‌های برابر تقسیم کنید و در ادامه مطابق پروتکل استخراج DNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها عمل نمایید.

- نسبت حجم بافر LB، اتانول و نمونه در این فرآیند 1:1:1 می‌باشد. (حجم بافر LB و اتانول برابر با حجم نمونه ی اولیه می‌باشد).
- محتویات تیوب‌ها را در چند مرحله از یک ستون عبور دهید.

چالش‌ها و راه کارها

مشاهدات	دلایل محتمل	راه کارها		
	کافی نبودن نمونه	- از نحوه صحیح نمونه برداری اطمینان حاصل کنید - الوشن بافر حتماً باید به مرکز غشای ستون اضافه شود. - زمان انکوباسیون با بافر الوشن را بیشتر کنید. - انکوباسیون با بافر الوشن را حتما در دمای 60°C انجام دهید.		
		عملکرد نامناسب آنزیم پروتئیناز K	- مجدداً مراحل آماده‌سازی آنزیم پروتئیناز K را انجام دهید و استخراج DNA را با نمونه تازه تکرار کنید. - آنزیم پروتئیناز K پس از آماده‌سازی باید در دمای 20°C- نگهداری شود. - آنزیم پروتئیناز K را مستقیماً به بافر لایز اضافه نکنید. - پس از اضافه کردن نمونه به پروتئیناز K فوراً عمل ورتکس را انجام دهید.	
			نگهداری نمونه در شرایط نامناسب	- از نمونه‌ای که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده‌است، استفاده نکنید. - از نمونه‌هایی که مدت زیادی در دمای اتاق، درون یخچال و یا فریزر قرار گرفته‌اند، استفاده نکنید. - برای جلوگیری از فعالیت DNase، از ذوب کردن نمونه‌های منجمد درست تا قبل از شروع فرآیند خودداری نمایید. - نمونه‌گیری را تکرار کنید.
				محلول لایز شده به طور کامل از ستون عبور نکرده است.

سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید.		
• در تمامی فرآیندهای استخراج استفاده از سایر الکلها به جای اتانول توصیه نمی‌شود.	استفاده از ایزوپروپانول به جای اتانول	
• در صورت تشکیل رسوب در بافرها، نباید از آنها استفاده کرد. • قبل از شروع فرآیند، بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از نمونه اولیه بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده نکنید. • در استخراج DNA از پلاسما، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب کرایو از چرخه انجماد-ذوب خودداری کنید. • قبل از منتقل کردن محلول لایز شده به ستون، آن را با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید و از انتقال رسوب آن به ستون خودداری نمایید. •	مسدود شدن غشای ستون	
• برای اطمینان از عملکرد صحیح بافرها، قبل از شروع فرآیند بافرها را به دمای اتاق برسانید. • از اتانول با درصد خلوص پایین استفاده نکنید. • از مخلوط شدن نمونه ها با بافر LB، TL، و اتانول اطمینان حاصل نمایید. • برای جلوگیری از انتقال بافر WB2 به مرحله الوشن از ستون، انجام مرحله خشک کردن مطابق فرآیند مربوطه توصیه می‌شود. • از عدم تماس غشای ستون با مایع عبوری در کالکشن تیوب، قبل از مرحله الوشن اطمینان حاصل کنید. • بافرهای شستشو را به ترتیب ذکر شده در فرآیند استفاده نمایید. • از افزودن اتانول قبل از انتقال محصول لایز به ستون، اطمینان حاصل نمایید. • کاهش عملکرد آنزیم پروتئیناز K به دلیل عدم رعایت شرایط نگهداری آنزیم.	آلودگی پروتئینی	پایین بودن نسبت A260/A280

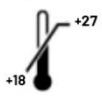
به یاد داشته باشید آنزیم پروتئیناز K بعد از آماده سازی باید در 20°C- نگهداری شود.		
- در حین فرآیند ستون ها را به آرامی جا به جا کنید. - درب ستون ها را به آرامی باز و بسته نمایید. - از انتقال حباب های تشکیل شده در مرحله لایز به ستون خودداری نمایید. - از تماس نوک سرسمپلر با بدنه ستون خودداری نمایید.	آلودگی نمکی	پایین بودن نسبت A260/A230
- مقدار زیادتر از حجم نمونه ذکر شده استفاده نکنید - از نمونه های که دفعات زیادی منجمد و ذوب شده است، استفاده نکنید. - آلودگی RNase محیطی را به حداقل برسانید. - حداکثر امکان از نمونه تازه استفاده کنید.	RNase محیطی یا سلولی	تخریب RNA
ورتکس را در مرحله مخلوط کردن نمونه با اتانول، به حداقل رسانده و برای مخلوط کردن تیوب را 10 بار به آرامی سر و ته نمایید.	ورتکس پیاپی	قطعه قطعه شدن DNA

کنترل کیفیت

تمام اجزاء و سری ساخت های (LOT NO.) هر کیت در واحد کنترل کیفیت شرکت ویستا زیست فناوری به ژن بر اساس معیارهای مدون از پیش تعیین شده، جهت اطمینان از صحت محصول مورد ارزیابی قرار گرفته است.

تاریخچه ویرایش پروتکل

شماره ویرایش	توضیحات	تاریخ
00	نسخه جدید	1401/02
01	1. اعمال تغییرات در حجم ریجنت‌ها در برخی از فرآیندها. 2. اعمال تغییرات در سرعت سانتیفریوژ در برخی فرآیندها. 3. بروزرسانی فرآیند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED. 4. اضافه کردن نحوه آماده‌سازی نمونه از خلط در قسمت ضمیمه‌ها.	1401/04
02	افزودن فرآیند استخراج RNA ویروسی.	1402/02
03	1. تغییر فرایند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED 2. تغییر در فرایند الوشن استخراج DNA/RNA ویروسی از مایعات بدن و سوسپانسیون‌ها 3. اضافه شدن آماده سازی مایع مغزی-نخاعی (CSF) و نمونه مایع چشمی در قسمت ضمیمه ها	1402/04
04	تغییر در کت نامبر ستون	1402/05
05	1. افزوده شدن بافر TL به محتویات 2. بهبود فرایند استخراج از نمونه LIQUID-BASED 3. افزودن چالش ها و راهکارها	1403/02
06	1.تغییر فرایند استخراج DNA ویروسی از نمونه LIQUID-BASED 2.تغییر آماده سازی نمونه خلط (SPUTUM) 3. تغییر مقدار بافر PBS(1X) در آماده سازی نمونه BAL	1403/06
07	1. افزایش حجم WB1	1404/07

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تشخیصی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		مخاطرات زیستی
	احتیاط		حاوی دستور العمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد کالا

شرکت دانش بنیان ویستا زیست فناوری به ژن

آدرس: شیراز، منطقه ویژه اقتصادی، فاز دوم، جنب میدان صادرات

شماره تماس: 09053633840 شماره پشتیبانی فنی: 09170093664

کدپستی: 7159115468 وبسایت: www.BehGene.com

