

(RENAViro)

کیت استخراج RNA ویروسی

(Viral RNA extraction Kit) For In Vitro Diagnostics (IVD)

کد کاتالیتیک: FPKT033.0100

نگهداری: دمای اتاق

محتویات کیت:

اجزا	حجم
بافر LR (آبی)	36 ml
بافر WR1 (نارنجی)	40 ml
بافر WR2 (زرد)	10 ml
بافر ER (سبز)	6 ml
پروتئیناز K (20mg/ml)	1 ml
حامل RNA (1µg/µl)	600 µl
ستون و لوله های جمع کننده	100 عدد

شرایط نگهداری:

این کیت در دمای اتاق قابل نگهداری است.

پروتئیناز K و حامل RNA در حالت محلول باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.

تحت این شرایط، اجزای کیت تا تاریخ انقضا درج شده روی محصول پایدار هستند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز:

-اتانول مطلق

-میکروپیوژ با توان ۱۳۰۰۰g

-ویال ۱.۵ میلی لیتری استریل

-محیط انتقال ویروس (VTM) و یا بافر PBS

کاربرد:

کیت استخراج RNA ویروسی به منظور جداسازی سریع و موثر RNA ویروسی از پلاسما، سرم، مایعات عاری از سلول بدن و سوپرناتانت کشت سلول طراحی شده است.

در بهترین حالت ۳۰ دقیقه زمان صرف این فرایند می شود تا نتایج معتبر بدست آید.

توضیحات:

نمونه می تواند پلاسما، خون تیمار شده با ضدلخته ها به استثنا هپارین، سرم و یا سایر مایعات عاری از سلول بدن باشد.
با استفاده از این کیت می توان RNA ویروسی را با بازدهی بالا از سوپ حلق/بینی استخراج کرد.

ملزومات و اطلاعات ایمنی:

تمام محلول ها شفاف هستند و در صورتی که رسوب در آن ها تشکیل شده باشد نباید استفاده شوند. محلول ها را در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد و یا حمام آب گرم حرارت دهید تا رسوب آن ها حل شود.

بافرهای LR و WR1 حاوی گوانیدین هستند که ترکیبی محرک است.

از تماس بافرهای LR و WR1 با پوست، چشم یا غشاهای موكوزی جلوگیری کنید. اگر تماس صورت گرفت آن ناحیه را سریعاً با مقدار زیادی آب شست و شو دهید.

اگر محلولی روی سطح ریخته شد، قبل از پاک کردن ابتدا آن را رقیق کنید.

از اتانول های اصلاح شده استفاده نکنید.

محلول های دارای LOT مختلف را ب هم ترکیب نکنید.

بلافاصله بعد از مصرف درب بطری ها را به منظور جلوگیری از نشتی و تغییر غلظت بافرها ببندید.

بعد از باز کردن اولیه کیت تمام اجزا را در حالت درست خود نگهداری کنید.

از ترکیب شدن بافرهای LR و WR1 با سدیم هیپوکلریت جلوگیری کنید. این ترکیب گازی بسیار سمی تولید می کند.

هنگام کار با کیت و نمونه، دستکش یکبار مصرف، روپوش آزمایشگاه و عینک ایمنی بپوشید.

محلول ها را آلوده به باکتری، ویروس یا نوکلئاز نکنید. از تیپ های یکبارمصرف و فاقد نوکلئاز برای برداشتن محلول ها استفاده کنید.

فرایند آماده سازی:

آماده سازی محلول ها

طی استخراج RNA، فرایندهای لیز سلول، اتصال RNA، شست و شو و الوشن انجام می گیرد.

قبل از شروع فرایند اتانول مطلق به بافرهای شست و شو اضافه کنید:

10ml اتانول مطلق به بافر WR1 اضافه کنید.

40ml اتانول مطلق به بافر WR2 اضافه کنید.

لطفا در نظر داشته باشید که غلظت اتانول بافرهای شست و شو در طولانی مدت ممکن است کاهش یابد و منجر به کاهش بازده RNA نهایی شود.

بافر لیزکننده حاوی مولکول های حامل است که سبب افزایش اتصال RNA به غشا ستون می شوند.

اگر میخواهید همه ی کیت (۱۰۰) واکنش

(را همزمان مصرف کنید، کل پروتئیناز K و حامل RNA را به بطری بافر LR اضافه کنید و به هر نمونه به جای 350 µl، 360 µl از بافر LR آماده شده بزنید.

برای اینکه حداکثر بازده را داشته باشید، قبل از شروع استخراج، بافر ER را در دمای ۵۵-۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

پروتکل:

۱. آماده سازی نمونه

۱.الف) سوآب بینی/حلق فاقد محیط انتقال ویروس

۲۵۰ μl VTM یا PBS را داخل ویال ۱.۵ میلی لیتری بریزید. سرکتانی سوآب را جدا کرده و داخل ویال بیاندازید. درب ویال را بسته و آن را به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید. سپس آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰-۲۵) انکوبه کنید. سرکتانی را بیرون آورده و مایع آن را داخل ویال بفشارید سپس آن را دور بیاندازید. ۱۵۰ μl VTM یا PBS حاوی ویروس را در ویال ۱.۵ بریزید. ۳۵۰ μl از بافر LR به آن افزوده و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید.

۱.ب) سرم، پلاسما، ادرار، سوپرناتانت کشت سلول، مایع فاقد سلول،

بافت آلوده به ویروس، سوآب بینی/حلق داخل محیط انتقال ویروس

۱۵۰ μl سرم، پلاسما، ادرار، سوپرناتانت کشت سلول، VTM/PBS حاوی ویروس، مایع فاقد سلول یا بافت آلوده به ویروس را در ویال ۱.۵ بریزید. به نمونه ۳۵۰ μl بافر LR اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید.

۲. به هر نمونه ۶ μl حامل RNA و ۱۰ μl پروتئیناز K اضافه کنید. مخلوط را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۸ درجه انکوبه کنید.

۳. به هر نمونه ۵۰ μl اتانول مطلق بیافزایید.

۴. یک ستون خالص سازی داخل لوله جمع کننده قرار دهید. همه ی نمونه ی آماده شده را روی فیلترستون بریزید. ستون و لوله را به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ RPM سانتریفوژ کنید.

۵. مایع زیری را دور بریزید. ۵۰ μl بافر WR1 روی فیلتر بریزید و به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ RPM سانتریفوژ کنید.

۶. مایع زیری را دور بریزید. ۵۰۰ μl بافر WR2 روی فیلتر بریزید و به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ RPM سانتریفوژ کنید.

۷. ستون و لوله را به مدت ۳ دقیقه با حداکثر سرعت (حدود ۱۴۰۰۰ RPM) سانتریفوژ کنید تا اضافات بافر شست و شو از نمونه خارج شود.

۸. لوله جمع کننده را دور بیاندازید و ستون را داخل یک ویال ۱.۵ تمیز و استریل قرار دهید. ۵۰ μl بافر ER روی فیلتر ستون ریخته و به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ RPM سانتریفوژ کنید.

👉 برای رسیدن به حداکثر بازده، می توانید محلول حاوی RNA را دوباره روی فیلتر بریزید و سانتریفوژ را تکرار کنید.

در این مرحله، ویال حاوی RNA ویروسی می باشد. می توانید این RNA را مستقیماً در RT-PCR استفاده کنید و یا آن را در ۲۰- درجه برای آنالیزهای بعدی نگهداری کنید.

تماس و پشتیبانی:

- در صورت داشتن سوال و یا مشکل در رابطه با این محصول و یا سایر محصولات کیاژن فناور آریا، لطفاً با واحد پشتیبانی فنی تماس بگیرید. محققان ما به حل مشکل شما کمک موثری خواهند کرد.
- لطفاً در صورتی که جهت بهبود و افزایش کارایی محصولات کیاژن فناور آریا پیشنهادی دارید آن را با ما در میان بگذارید. پیشنهادات مشتریان همواره کمک شایان توجهی به جامعه محققین سراسر دنیا کرده است.
- برای طرح سوالات، حل مشکلات، پیشنهاد بهبود یا گزارش کاربردهای جدید، لطفاً از پشتیبانی فنی آنلاین سایت کیاژن فناور آریا بازدید کنید.
- از سایت www.kiagene.ir جهت دانلود یا درخواست بروشور، SDS، COA و اطلاعات محصول بازدید کنید.
- جهت تماس تلفنی، فکس و ایمیل به ما، سایت www.kiagene.ir را مشاهده کنید.

مشاهدات	علت احتمالی	پیشنهادهات
بازده یا خلوص پایین نوکلئیک اسید	کیت در شرایط بهینه نگهداری نشده است.	کیت را در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
	بافرها و سایر محتویات کیت در معرض شرایطی بوده اند که باعث کاهش کارایی آن ها شده است.	همه ی بافرها را در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
		بعد از مصرف درب بطری ها را محکم ببندید تا از تغییر pH، حجم و آلودگی بافرها جلوگیری شود.
		پروتئینازK و حامل RNA را در دمای ۱۵-۲۵- نگهداری کنید.
	اتانول به بافر شست و شو اضافه نشده است.	قبل از استفاده، اتانول مطلق به بافرهای شست و شو اضافه کنید.
	بعد از افزودن اتانول بافر را هم بزنید و در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.	
نوکلتیک اسید خوب با آب الوت نشده است.	محلول ها و نمونه خوب با هم مخلوط نشده اند.	روی بطری بافر شست و شو علامت بزنید که اتانول افزوده شده است یا خیر.
	آب pH مناسب ندارد.	همواره نمونه را با معرف ها به خوبی مخلوط کنید.
		اگر از آب و یا بافر مورد نظر خودتان برای الوشن نمونه استفاده می کنید، اطمینان حاصل کنید که pH مشابه بافر ER داشته باشد.
جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر بسیار زیاد است.	فیبرهای شیشه ای همراه با نمونه الوت شده اند.	نمونه الوت شده را به مدت ۱ دقیقه با حداکثر دور سانتریفوژ کنید، سپس مایع بالایی فاقد فیبرهای ته ویال را در ویال جدید بریزید.
بازده پایین RNA	فعالیت زیاد RNaseها	مراقب باشید در محیط فاقد RNase کار کنید.
		ابزار شروع کار را سریعاً استفاده کنید و یا تا قبل از استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
		RNA الوت شده را مستقیماً در فرایندهای پایین دستی استفاده کنید و یا آن را بلافاصله در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.