



SIM
BIO
LAB



کیت استخراج نوکلئیک اسید ویروسی

بر پایه ستون سیلیکا

SimEX Viral Nucleic Acid (VNA) Extraction Kit

Cat.NO: SBL15-2326

معرفی کیت :

کیت SimEX VNA برای استخراج نوکلئیک اسید ویروسی از نمونه‌های مایعات زیستی، پلاسما، سرم و ... طراحی شده است. مواد تشکیل دهنده این کیت فاقد ترکیبات فنولی و اسید بوده و در نتیجه نگرانی‌های زیستی ناشی از پسماندهای کیت کمتر است. استفاده از تکنولوژی ستون‌های سیلیکا در طراحی این کیت منجر به افزایش سرعت پروسه استخراج شده است. علاوه بر این با داشتن پروتکل آسان، می‌توان از این کیت به صورت همزمان برای استخراج RNA از تعداد زیادی نمونه، استفاده کرد.

اساس کار:

فرایند استخراج بر اساس لیز پارتیکل‌های ویروسی با استفاده از نمک‌های آبدوست (گوانیدین) طراحی شده است. وجود غلظت‌های بالای نمک گوانیدین و اتانول منجر به تمایل نوکلئیک اسید برای اتصال به ستون سیلیکا می‌شود. با توجه به غلظت نسبتاً کم ویروس در نمونه‌های مایعات زیستی به منظور تسهیل فرآیند رسوب و اتصال نوکلئیک اسید به ستون سیلیکا بخصوص در ویروس‌های RNA دار، به محلول لیز کننده قبل از استفاده RNA Carrier اضافه می‌شود. این ماده منجر به تسهیل در رسوب RNA ویروسی می‌شود. بعد از اتصال RNA به ستون آلودگی‌های نمکی، پروتئین‌ها و چربی‌ها با استفاده از محلول شستشو دهنده حذف شده و در نهایت با استفاده از بافر آزادسازی دارای غلظت نمکی و PH مناسب، نوکلئیک اسید از فیلتر سیلیکا جدا شده و در داخل بافر آزادسازی حل می‌شود. این نوکلئیک اسید با خلوص بسیار بالا برای استفاده در واکنش‌های پایین دست آماده می‌باشد.

محتویات کیت :

مقادیر در کیت	عنوان برجسب	اجزا
35 ml	SLB	بافر لیزکننده
60 ml	SWB	بافر شستشو
10 ml	SEB	بافر آزاد سازی
1.28 mg	RNA Carrier	RNA ناقل (Carrier (RNA
100 pieces	Spin columns	ستون استخراج
200 pieces	Collection tube	Collection tube

مواد و وسایل مورد نیاز فرایند استخراج که در کیت تعبیه نشده است:

✓	اتانول ۹۶-۱۰۰٪	✓	سمپلر ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر
✓	میکروفیوژ	✓	نوک سمپلر فیلتردار ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر
✓	هات پلیت	✓	سمپلر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر
✓	شیکر	✓	نوک سمپلر فیلتردار ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر
✓	سانتریفیوژ با حداکثر دور 13000 rpm	✓	میکروتیوب 1.5 ml

نکات مهم قبل از شروع کار:

تمام بافرها قبل از استفاده باید از نظر وجود رسوب مورد بررسی قرار بگیرند. در صورت وجود رسوب در محلول لیز ویروسی باید بافر در حمام آبی 60°C قرار بگیرد تا این رسوبات به طور کامل حل شود.

محلول SEB را تا رسیدن به دمای 60 درجه سانتی گراد گرمادهی کنید.

RNA Carrier (لیوفلیزه) در ۳۰۰ میکرولیتر محلول SEB حل شود.

به تعدادی نمونه که قصد استخراج آن را داریم در یک میکروتیوب یا لوله فالکون محلول SLB ریخته (به ازای هر نمونه ۳۰۰ میکرولیتر) و به نسبت ۱:۱۰۰ محلول RNA Carrier به آن اضافه کنید (به عنوان مثال برای ۱۰ نمونه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر محلول SLB و ۳۰ میکرولیتر محلول RNA Carrier را با هم مخلوط نمایید).

توجه: بعد از اضافه نمودن RNA Carrier به محلول SLB باید این محلول فوراً استفاده شود لذا از ذخیره کردن این محلول برای واکنش‌های بعدی اجتناب نمایید.

نکته: دقت شود که حجم اتانول مورد نیاز برای محلول شست‌شوی SWB افزوده شده است.

نحوه استفاده از کیت:

۱- ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط SLB و ۳ میکرولیتر RNA Carrier و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه کنید.

نکته: در صورت استفاده از نمونه‌های مخاط (مثل نمونه سواب نازوفارنکس) قبل از استفاده باید محلول کاملاً یکنواخت شود. برای این کار می‌توان نمونه‌ها را یک بار منجمد و ذوب کرد. در صورت ادامه حالت کشسان پیشنهاد می‌شود در شرایط عاری از آئروسول (ترجیحاً زیر هود ایزوله) نمونه به مدت سی ثانیه ورتکس شود و پس از حداقل ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰ °C مورد استخراج قرار گیرد.

۲- نمونه را ورتکس و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ °C انکوبه نمایید.

۳- به منظور جمع کردن قطرات نمونه در داخل میکروتیوب نمونه را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۴- مقدار ۳۳۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه کنید و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید تا کاملاً یکنواخت شود (اضافه کردن مقدار بیشتر تا ۵۰۰ میکرولیتر می‌تواند منجر به افزایش کارایی استخراج گردد).

۵- ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط بالا را به آرامی به ستون قرار داده شده روی کالکشن انتقال دهید و به مدت یک دقیقه با سرعت 13000rpm سانتریفیوژ کنید. ستون را به کالکشن جدید منتقل کنید.

نکته: اگر محلول به طور کامل از ستون عبور نکرد، دوباره با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید تا کاملاً محلول لیز از ستون عبور کند.

۶- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر SWB را به ستون اضافه کنید. ستون را به مدت ۱ دقیقه با سرعت 13000rpm سانتریفیوژ کنید. ستون را به یک کالکشن جدید منتقل کنید (در صورت لزوم این مرحله را یک بار دیگر تکرار نمایید).

۷- ستون خالی را به کالکشن جدید منتقل کرده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت 13000rpm سانتریفیوژ کنید.

توجه: این مرحله برای حذف کامل اتانول از ستون بسیار ضرورت دارد باقیماندن اتانول روی ستون می‌تواند باعث کاهش راندمان استخراج و همبستگی اختلال در واکنش Real-Time PCR بعدی شود.

۸- ستون را به یک میکروتیوب 1.5 ml استریل منتقل کرده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول SEB (که قبلاً دمای ۶۰°C رسانیده شده است) به مرکز ممبران ستون اضافه کنید و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

توجه: دقت کنید که محلول به مرکز فیلتر اضافه شود، همچنین از تماس نوک سمپلر به فیلتر اجتناب نمایید.

۹- ستون را به مدت یک دقیقه با سرعت 13000rpm سانتریفیوژ کنید.

۱۰- ستون را دور انداخته و میکروتیوب 1.5 ml حاوی ژنوم استخراج شده ویروس را جهت واکنش بعدی استفاده کنید و یا برای ذخیره سازی به ۲۰°C منتقل نمایید.

توجه: کیت‌های Real-Time PCR مختلف به علت تفاوت ترکیب بافری و خصوصیات آنزیم مورد استفاده در آنها معمولاً مقادیر متفاوتی از Viral RNA/DNA استخراج شده را استفاده می‌کنند و بعضاً عدم توجه به این نکته منجر به تداخل در واکنش و عدم تکرار پذیری نتایج می‌شود به همین علت پیشنهاد می‌شود مقدار مورد استفاده از RNA/DNA عیناً براساس پروتکل کیت Real-Time PCR مربوطه محاسبه شود. در عین حال بررسی‌های به عمل آمده نشان دهنده کارایی مناسب مقدار ۵ میکرولیتر از Viral RNA/DNA استخراج شده در کیت SIMBIOLAB در اکثر کیت‌های Real-Time PCR موجود در بازار است.



بافر لیز کننده ۳۰۰ (SLB) میکرولیتر
۳ RNA Carrier میکرولیتر
نمونه ۲۰۰ میکرولیتر

۱۵ ثانیه ورتکس

انکوبه در دمای ۶۰/۱۵-۱۰ دقیقه



افزودن ۳۳۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ یا مطلق،
۱۵ ثانیه ورتکس، انتقال به ستون حاوی فیلتر



سانتریفیوژ ۱۳،۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه

دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube

افزودن ۵۰۰ میکرولیتر SWB



سانتریفیوژ ۱۳،۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه



دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube

افزودن ۵۰۰ میکرولیتر SWB



سانتریفیوژ ۱۳،۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه



دور ریختن محلول جمع آوری شده در collection tube



سانتریفیوژ ۱۳،۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه



انتقال ستون حاوی فیلتر به میکروتیوب ۱.۵ ml جدید

افزودن ۱۰۰ میکرولیت بافر آزادسازی (SEB) گرم شدن به مرکز ستون



سانتریفیوژ ۱۳،۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه

ذخیره محلول جمع آوری شده در ۲۰°C