Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

ARAMESH BIO GENE

Quick Guide

Viral Nucleic Acid Isolation Kit

مقدمه:

کیت Aramesh Bio Gene Viral Nucleic Acid Isolation به منظور استخراج DNA و RNA ویروسی بر اساس تکنولوژی سیلیکا با کیفیت بالا، از نمونه‌های سرم، پلاسما، بافت، مایعات بدن، کشت سلول، Thin prep با حجم نمونه اولیه ۲۵۰ میکرولیتر طراحی شده است. به طور اختصار، مرحله لیز شدن نمونه با انکوبه کردن نمونه در بافرهای لیزکننده اختصاصی صورت می‌گیرد. سپس با افزودن ABB، مرحله Binding انجام شده تا DNA/ RNA به ستون متصل شود. با انجام دو مرحله شستشو، آلودگی‌ها حذف شده و با افزودن بافر ADEB/ AREB، DNA/ RNA از ستون رها می‌شود. DNA/ RNA استخراج شده Nuclease-free، عاری از پروتئین و آلودگی‌های دیگر برای واکنش‌های پایین دست آماده خواهد بود.

محتویات:

Solution	Storage	50 preps	100 preps	Solution	Storage	50 preps	100 preps
ATL	+16 to 25°C	10 ml	20 ml	**Proteinase K**	-20°C	1.25 ml	2.5 ml
ADLB	+16 to 25°C	12.5 ml	25 ml	**G solution**	-20°C	500 µl	1 ml
AVRL	+16 to 25°C	12.5 ml	25 ml	**ADEB**	+16 to 25°C	2.5 ml	5 ml
AW1 (Ready to use)	+16 to 25°C	25 ml	50 ml	**AREB**	+16 to 25°C	2.5 ml	5 ml
AW2 (Ready to use)	+16 to 25°C	40 ml	80 ml	**Spin column**		50 pcs	100 pcs
ABB	+16 to 25°C	9 ml	18 ml	**Collection tube**		150 preps	300 preps

شرایط استفاده و نگهداری:

پس از دریافت کیت، Proteinase K (PK) و G Solution را در مقادیر مناسب توزیع نموده و در دمای 20°C- نگهداری نمایید.

مراحل انجام استخراج DNA ویروسی (سرم، پلاسما، مایعات بدن،...):

۱- قبل از شروع تست، ویال‌های حاوی نمونه را از یخچال و یا فریزر خارج کرده تا به دمای محیط برسند و یکنواخت نمایید.

۲- حتما بافر ADEB را در 75° C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.

۳- 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید

۴- 250 µl از ADLB، 10 µl از G Solution و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).

۵- ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می‌شود.

۶- در دمای 70 °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.

۷- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.

۸- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

۱۰- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

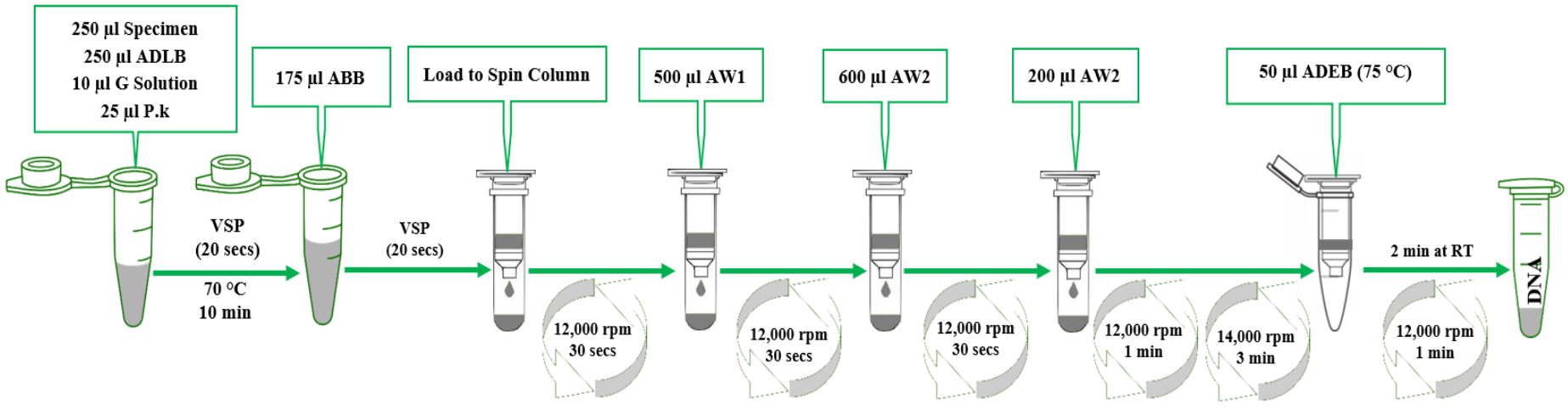
۱۱- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۱۲- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.

۱۳- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۴- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحا در80°C- نگهداری نمایید.

Viral DNA Isolation



آدرس دفتر مرکزی: سعادت آباد، ضلع شرقی میدان کاج، خیابان سرو شرقی، خیابان مجد، پلاک ۱۱، طبقه اول، شرکت آرامش زیست ژن

پشتیبانی: ۲۲۱۴۲۲۳۱ -۰۲۱

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

ARAMESH BIO GENE

Quick Guide

Viral Nucleic Acid Isolation Kit

آماده سازی نمونه (مایعات با سلول نامناسب مانند Thin prep، ادرار، Cell Cultures، سلول‌های اپیتلیال دهان و ...) به منظور استخراج DNA ویروسی::

۳- مقدار 1-3 ml از نمونه را به ۲ میکروتیوب 1.5 ml، منتقل نموده و به مدت ۵ دقیقه در دور 10,000 xg سانتریفیوژ نمایید.

۴- پس از تشکیل pellet، مقدار 250 µl از سوپرناتانت را به همراه pellet در میکروتیوب نگهداری کرده و باقی سوپرناتانت را خارج نمایید.

❖ **توجه:** در صورتی که تهیه Pellet سلولی از نمونه در دو میکروتیوب انجام گرفته است، 250 µl سوپرناتانت را در یکی از میکروتیوب ها نگهداری نمایید و پس از پیپتینگ، محتویات را با Pellet سلولی میکروتیوب دیگر مخلوط نموده و سپس سانتریفیوژ نمایید.

مراحل انجام استخراج:

❖ قبل از شروع تست، نمونه را مطابق با مراحل فوق آماده سازی کنید.

❖ حتما بافر ADEB را در 75° C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.

❖ 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید.

❖ 250 µl از ADLB، 10 µl از G Solution و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).

❖ ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می‌شود.

❖ در دمای 70 °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.

❖ 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.

❖ کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

❖ کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

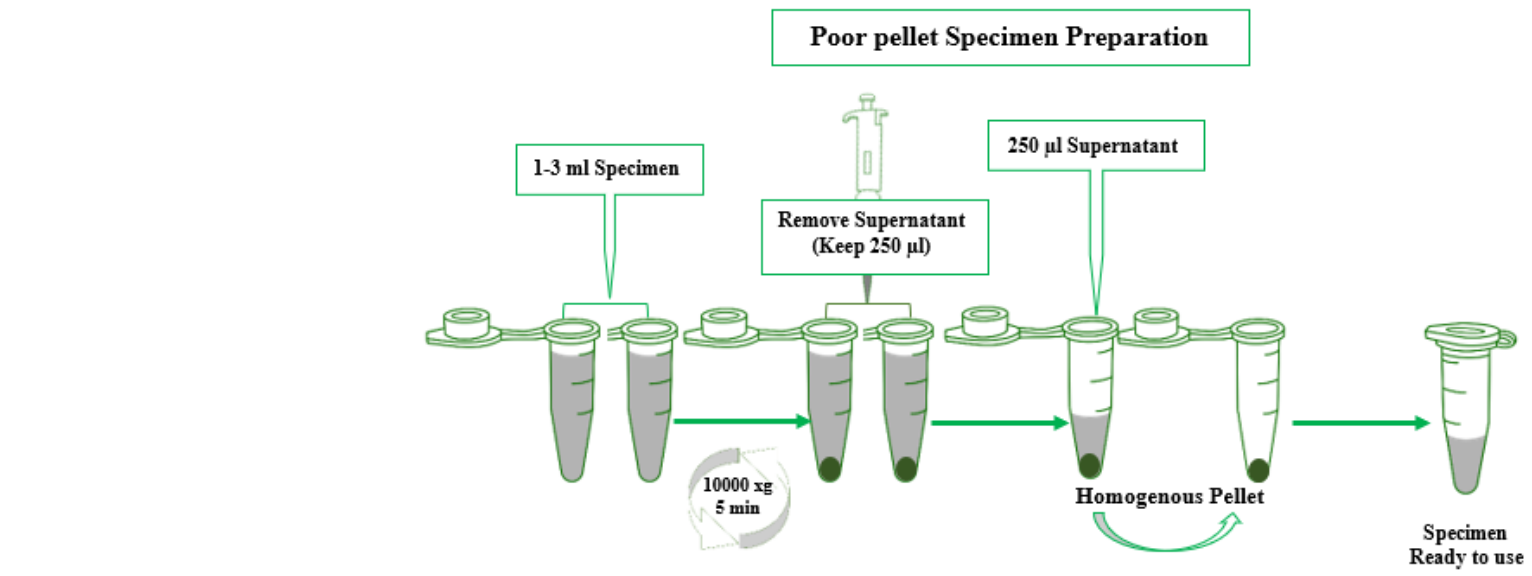
❖ کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

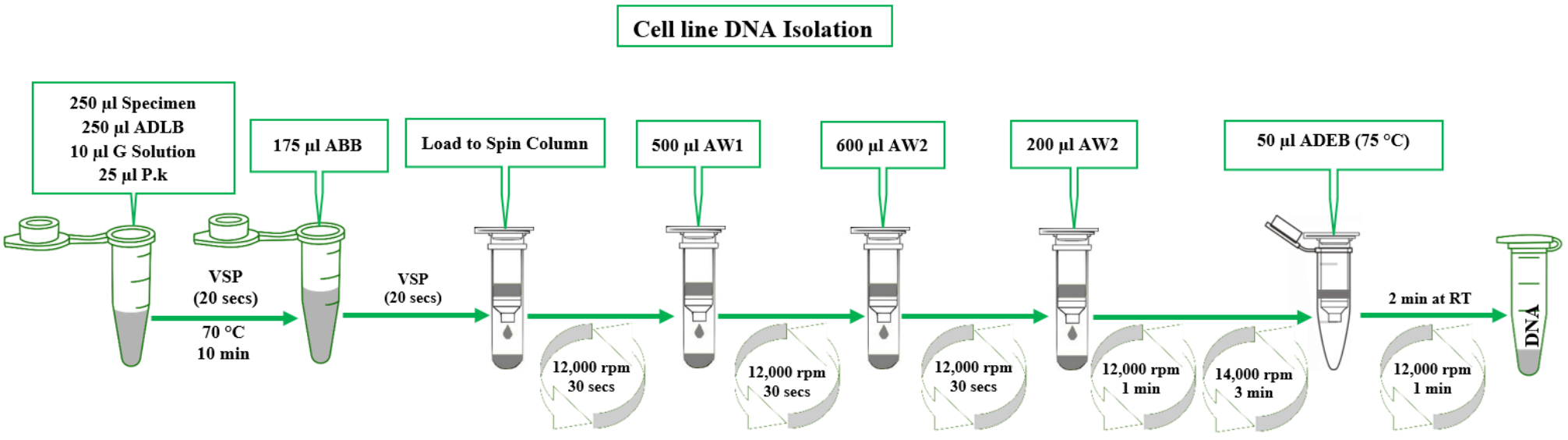
❖ کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

❖ کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.

❖ ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

❖ DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحا در80°C- نگهداری نمایید.





آدرس دفتر مرکزی: سعادت آباد، ضلع شرقی میدان کاج، خیابان سرو شرقی، خیابان مجد، پلاک۱۱، طبقه اول، شرکت آرامش زیست ژن

پشتیبانی: ۲۲۱۴۲۲۳۱ -۰۲۱

Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

ARAMESH BIO GENE

Quick Guide

Viral Nucleic Acid Isolation Kit

آماده سازی نمونه (Thin prep، ادرار، Cell Cultures، سلول‌های اپیتلیال دهان و ...) به منظور استخراج DNA ویروسی:

۱- مقدار 1-3 ml از نمونه را به ۲ میکروتیوب 1.5 ml، منتقل نموده و به مدت ۵ دقیقه در دور 10,000 xg سانتریفیوژ نمایید و سوپرناتانت را به طور کامل خارج کنید تا Pellet سلولی حاصل شود.

۲- با اضافه کردن 1 ml از PBS استریل، Pellet سلولی را به مدت ۳ دقیقه در 10,000 xg شستشو دهید و سوپرناتانت را به طور کامل خارج نمایید.

توجه: در صورتی که تهیه Pellet سلولی از نمونه در دو میکروتیوب انجام گرفته است، PBS را در یکی از میکروتیوب‌ها ریخته و پس از پیپتینگ، محتویات را با Pellet سلولی میکروتیوب دیگر مخلوط نموده و سپس سانتریفیوژ نمایید.

۳- 250 µl از PBS استریل به نمونه اضافه نموده و Pellet سلولی را پیپت نموده تا یکنواخت شود.

مراحل انجام استخراج (Cell lines):

۱- حتما بافر ADEB را در 75° C انکوبه نموده و سپس استفاده نمایید.

۲- 250 µl از نمونه را به یک میکروتیوب 1.5 ml اضافه نمایید

۳- 250 µl از ADLB، و 25 µl از PK را به میکروتیوب 1.5 ml حاوی نمونه (250 µl) اضافه نمایید (از ترکیب همزمان PK و ADLB خودداری نمایید).

۴- ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات درون میکروتیوب در پایین آن جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می‌شود.

۵- در دمای 70 °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.

۶- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید .سپس میکروتیوب را به مدت ۳ دقیقه در10,000 xg سانتریفیوژ نموده و سوپرناتانت شفاف را به ستون، انتقال دهید و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

a. در صورتی که نمونه از pellet کافی برخوردار نیست، پس از افزودن ABB به نمونه، نمونه را مستقیما به ستون انتقال دهید.

۷- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

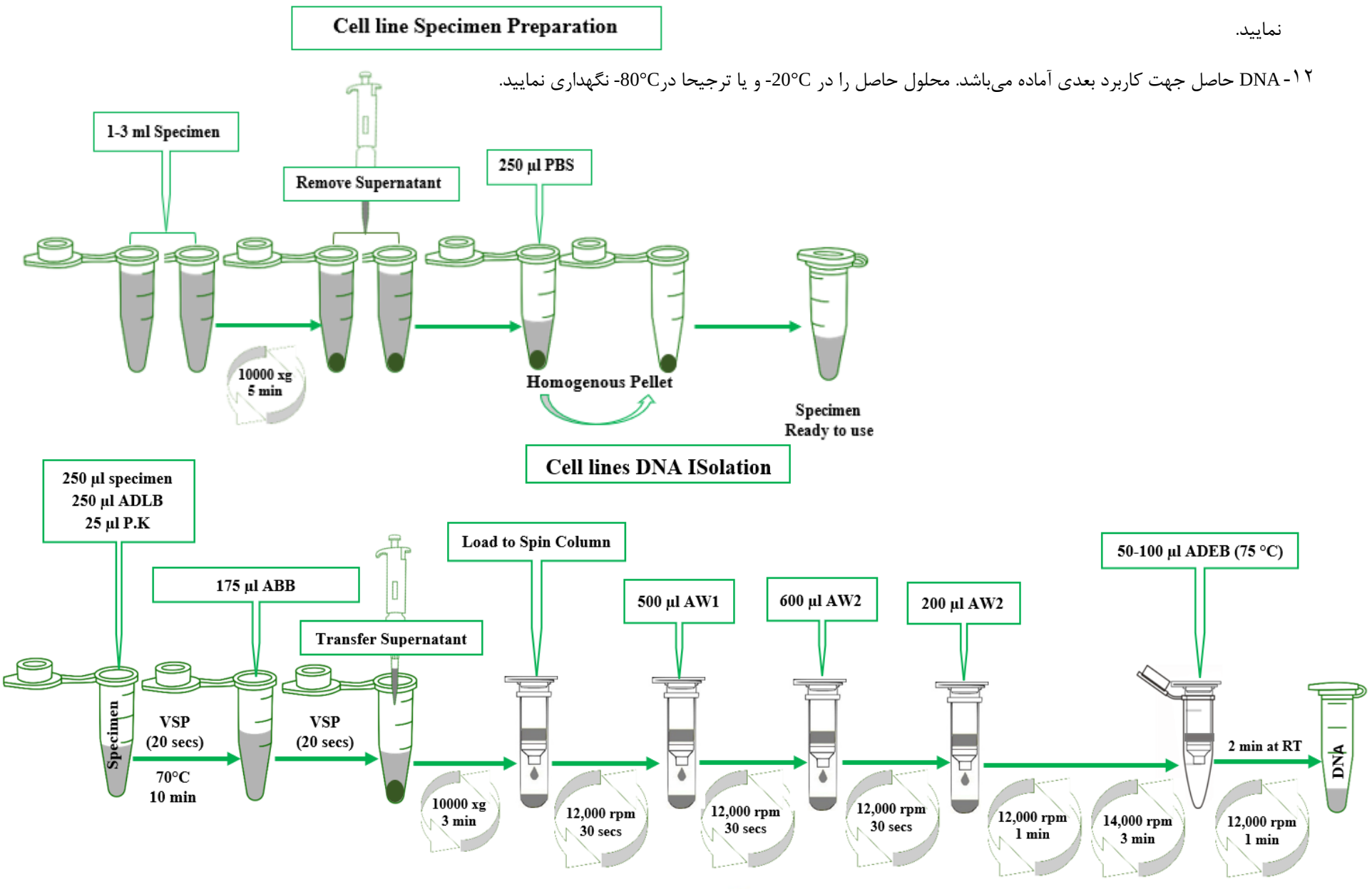
۸- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۱۰- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در دور 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو دهید تا الکل اضافی خارج شود.

۱۱- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و 50-100 µl از ADEB را به مرکز ستون اضافه نموده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۲- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده می‌باشد. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحا در80°C- نگهداری نمایید.



آدرس دفتر مرکزی: سعادت آباد، ضلع شرقی میدان کاج، خیابان سرو شرقی، خیابان مجد، پلاک۱۱، طبقه اول، شرکت آرامش زیست ژن **پشتیبانی:** ۲۲۱۴۲۲۳۱ -۰۲۱

Quick Guide

Viral Nucleic Acid Isolation Kit

استخراج DNA ویروسی از بافت/ بافت پارافینه:

پارافین زدایی:

۱- در یک هود شیمیایی، 800 µl از Xylene را به میکروتیوب حاوی برش‌های بافت پارافینه (۵ برش 5 µm) اضافه کرده و به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه نمونه را بر روی Rocker قرار دهید تا به آرامی با یکدیگر مخلوط شوند و پارافین حل شود (درصورت عدم وجود Rocker، نمونه را به خوبی ورتکس نمایید).

۲- نمونه را به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کنید تا pellet تشکیل شود، سپس سوپرناتانت را به آرامی (Pellet از بین نرود) خارج نمایید.

۳- مراحل شستشو با Xylene (شماره ۱ و ۲) را تا زمانی که پارافین کاملا حل شود، تکرار نمایید (ممکن است با توجه به سایز نمونه بافت، این مرحله نیاز به ۲ تا ۳ بار تکرار داشته باشد).

آبگیری از الکل:

۱- 800 µl از اتانول ۱۰۰٪ حجمی را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.

۲- 800 µl از اتانول ۷۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۳ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به آرامی خارج نمایید.

۳- 800 µl از اتانول ۵۰٪ (اتانول ۱۰۰٪ حجمی رقیق شده با آب مقطر) را به بافت اضافه نموده و به خوبی ورتکس کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه در 14,000 rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت الکلی را به طور کامل و به آرامی خارج نمایید.

٤- Pellet را در دمای 40 °C به مدت ۲۰ دقیقه قرار دهید تا کاملا خشک شود.

مراحل انجام استخراج:

۱- قبل از شروع تست، Thermoblock را بر روی 56 °C تنظیم نمایید.

۲- مقدار مورد استفاده از بافر ADEB را به میکروتیوب استریل انتقال دهید و آن را در 75 °C انکوبه نمایید.

۳- 250 µl از ATL به همراه 25 µl از P.K را به میکروتیوب حاوی بافت (دپارافینه شده) اضافه کرده، سپس نمونه را به خوبی ورتکس نموده و در 56° C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید تا بافت کاملا لیز شود.

توجه: زمان انکوباسیون براساس نوع و اندازه بافت متغیر است. در این موارد تا زمانی که بیشترین لیز بافت صورت بگیرد انکوباسیون به طول می‌انجامد. زمان طولانی انکوباسیون ممکن است سبب آسیب به DNA شود، به همین منظور ۲۰ میکرولیتر P.K را به نمونه اضافه نمایید.

توجه: بهتر است انکوباسیون بر روی Thermoblock شیکردار (600 rpm) انجام شود و یا هر ۵ دقیقه، Vortex انجام شود.

٤- میکروتیوب حاوی نمونه را در 95 °C به مدت ۱ ساعت انکوبه نمایید.

توجه: در صورتی که از یک Thermoblock به منظور انکوباسیون استفاده می‌نمایید، پس از انکوباسیون در 56 °C، نمونه را تا زمان رسیدن Thermoblock به دمای 95 °C در RT قرار دهید.

توجه: در صورتی که نمونه بافت پارافینه است و یا در فرمالین نگهداری می‌شود، انکوباسیون در دمای 95° C الزامی است.

توجه: در صورت نگهداری نمونه در سرم فیزیولوژی و یا VTM، این مرحله انکوباسیون حذف شود.

٥- پس از رسیدن دمای نمونه به RT میکروتیوب را یک اسپین مختصر نمایید تا قطرات در پایین آن جمع شوند، سپس 250 µl از ADLB را به نمونه اضافه نموده و به خوبی ورتکس شود، در نهایت 175 µl از ABB را به نمونه اضافه کرده و به خوبی ورتکس نمایید. سپس میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین نموده تا قطرات در پایین آن جمع شوند.

- ترکیب نمونه، ADLB و ABB با یکدیگر باید سریعا انجام شود و بلافاصله با ورتکس کردن، محلول یکسان شود.

a. در مواقعی که تعداد نمونه ها بالا است، می‌توان ADLB و ABB را از قبل با یکدیگر مخلوط نمود. رسوب تشکیل شده در هنگام ترکیب این بافرها، در واکنش‌های پایین دست بعدی، اثری ندارد.

٦- میکروتیوب را به صورت مختصر اسپین نمایید تا قطرات در پایین آن جمع شوند. کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۷- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

۸- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 به ترتیب در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

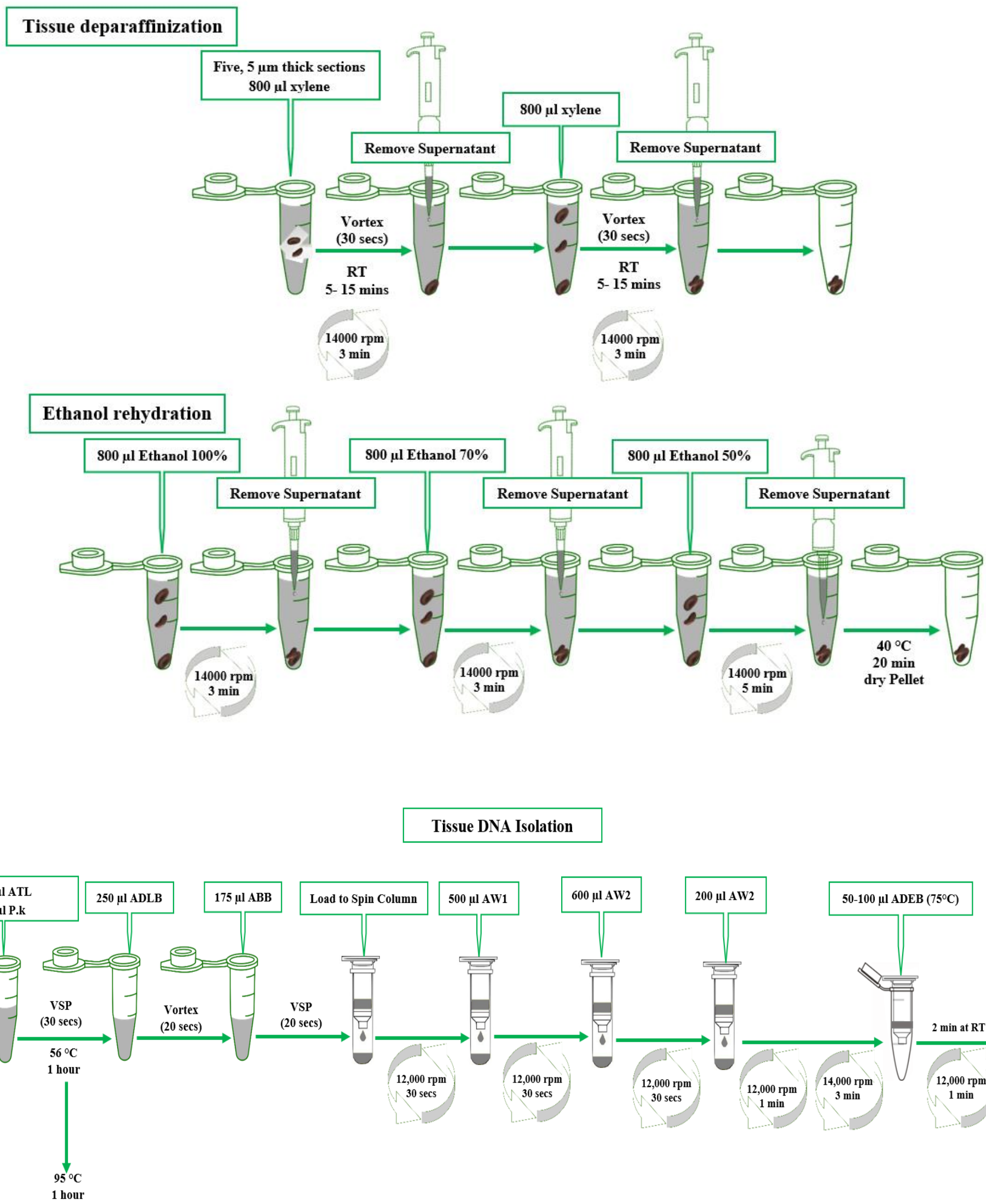
۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 200 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۱۰- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج گردد.

۱۱- ستون را به یک میکروتیوب جدید منتقل نموده و ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر ADEB را به مرکز ستون اضافه کرده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

آدرس دفتر مرکزی: سعادت آباد، ضلع شرقی میدان کاج، خیابان سرو شرقی، خیابان مجد، پلاک ۱۱، طبقه اول، شرکت آرامش زیست ژن **پشتیبانی:** ۲۲۱۴۲۲۳۱ -۰۲۱

۱۲- DNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده است. محلول حاصل را در 20°C- و یا ترجیحا در 80°C- نگهداری نمایید.



Research
Development
& Production of
Advanced Medical Diagnosis

ARAMESH BIO GENE

Quick Guide

Viral Nucleic Acid Isolation Kit

مراحل انجام استخراج RNA ویروسی:

۱- قبل از شروع تست، ویال‌های حاوی نمونه را از یخچال خارج کرده و با Pulse Vortex یکنواخت نمایید تا به دمای محیط برسند.

۲- 10 µl از G Solution را به میکروتیوب 1.5 ml اضافه نموده و 250 µl از AVRL را به میکروتیوب اضافه نمایید.

❖ **توجه:** در صورت مخلوط کردن G Solution با AVRL حتما محلول ها محاسبه حجم شوند تا نسبت ها به هم نریزند.

۳- 250 µl نمونه را به میکروتیوب حاوی AVRL اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نمایید تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نموده تا قطرات درون میکروتیوب در پایین جمع شوند؛ همچنین از آلودگی با آئروسل جلوگیری می گردد.

٤- در دمای اتاق (16-25 °C) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.

۵- 175 µl از ABB را به میکروتیوب اضافه کرده، ۲۰ ثانیه Pulse Vortex نموده تا مواد به خوبی مخلوط شوند. سپس به صورت مختصر اسپین نمایید.

٦- کل حجم محلول درون میکروتیوب را به ستون اضافه نموده و ۳۰ ثانیه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

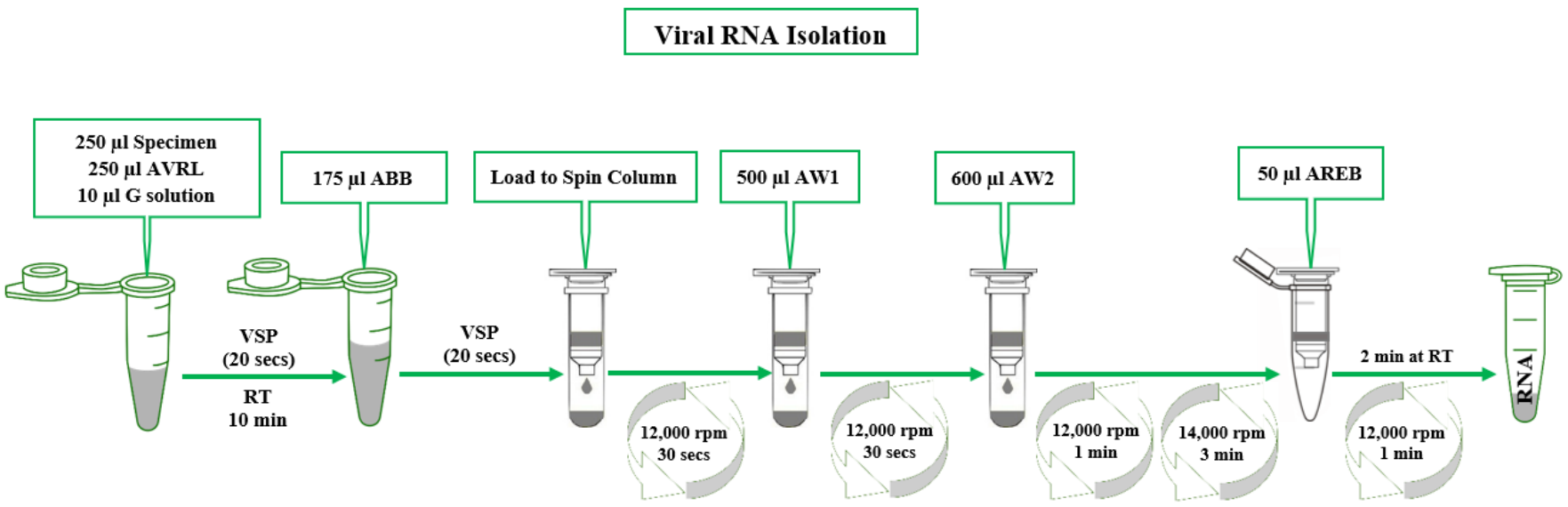
۷- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 500 µl از محلول AW1 در دور 12,000 rpm به مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهید.

۸- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و با اضافه کردن 600 µl از محلول AW2 در دور 12,000 rpm به مدت ۱ دقیقه شستشو دهید.

۹- کالکشن تیوب را با محتویات آن دور ریخته و ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل نموده و در 14,000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا الکل اضافی خارج شود.

۱۰- ستون را به یک میکروتیوب جدیدمنتقل نموده و 50 µl از AREB را به مرکز ستون اضافه کرده و آن را ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نموده و به مدت ۱ دقیقه در 12,000 rpm سانتریفوژ نمایید.

۱۱- RNA حاصل جهت کاربرد بعدی آماده است. محلول حاصل را در 20°C- و ترجیحا در80°C- نگهداری نمایید.



آدرس دفتر مرکزی: سعادت آباد، ضلع شرقی میدان کاج، خیابان سرو شرقی، خیابان مجد، پلاک۱۱، طبقه اول، شرکت آرامش زیست ژن **پشتیبانی:** ۲۲۱۴۲۲۳۱ -۰۲۱