RNA virus whole-genome sequencing: প্রাণী ও উদ্ভিদের sample প্রস্তুতি

প্রাণী বা উদ্ভিদের RNA virus-এর whole-genome sequencing-এর জন্য আক্রান্ত tissue RNAlater-এ সংরক্ষণ অথবা cDNA প্রস্তুত করে BD Genomes-এ পাঠানোর নির্দেশিকা।

RNA virus WGS-এর জন্য BD Genomes দুই ধরনের sample গ্রহণ করে:

- **Option A:** আক্রান্ত tissue, RNAlater-এ সংরক্ষিত
- **Option B:** আক্রান্ত sample-এর RNA থেকে প্রস্তুত cDNA

> **বিশেষ দ্রষ্টব্য:** RNA virus WGS-এর জন্য purified total RNA গ্রহণ করা হয় না। RNA থেকে cDNA তৈরি করে পাঠান, অথবা tissue RNAlater-এ পাঠান।

Option A: আক্রান্ত tissue + RNAlater

1. Sample নির্বাচন

- **প্রাণী:** সন্দেহজনক virus-এর tissue tropism অনুযায়ী blood/whole blood, serum/plasma, nasal/oral swab, lung, liver, spleen, kidney, intestine, brain বা অন্য target tissue।
- **উদ্ভিদ:** কচি/তাজা পাতা, লক্ষণযুক্ত (symptomatic) tissue, অথবা আক্রান্ত অংশের কাছের সুস্থ-দেখতে tissue।
- প্রতি sample-এ প্রায় **100–300 mg** tissue।

2. প্রয়োজনীয় materials

RNAlater solution, sterile RNase-free 2 mL tube, sterile scissors/forceps, disposable gloves, RNase-free tissue/wipes, 70% ethanol, permanent marker ও label, cooler box ও ice pack।

3. Sample সংগ্রহ

1. Scissors/forceps 70% ethanol দিয়ে পরিষ্কার করুন এবং নতুন gloves পরুন।
2. নির্বাচিত tissue সংগ্রহ করে প্রায় 0.5–1 cm ছোট টুকরো করুন।
3. কাটার পর যত দ্রুত সম্ভব (উদ্ভিদের ক্ষেত্রে ideally 1 মিনিটের মধ্যে) RNAlater-এ দিন, যাতে viral RNA নষ্ট না হয়।

4. RNAlater-এ সংরক্ষণ

1. Pre-labelled RNase-free tube-এ tissue-এর 5–10 গুণ RNAlater নিন: 100 mg → প্রায় 1 mL, 200 mg → 2 mL, 300 mg → 3 mL।
2. Tissue যেন সম্পূর্ণ ডুবে থাকে; cap শক্ত করে বন্ধ করে আলতোভাবে কয়েকবার উল্টান।
3. প্রথমে 4 °C-এ 12–24 ঘণ্টা রাখুন, এরপর দীর্ঘমেয়াদে −80 °C-এ (জোরালোভাবে সুপারিশকৃত)। বারবার freeze–thaw এড়িয়ে চলুন।

5. BD Genomes-এ পাঠানো

Cooler box ও ice pack-এ cold chain বজায় রেখে পাঠান, সরাসরি রোদে রাখবেন না, এবং যত দ্রুত সম্ভব পাঠান।

Option B: cDNA sample

যারা নিজেরা RNA extraction ও cDNA synthesis করতে পারেন, তারা cDNA পাঠাতে পারেন।

Workflow: আক্রান্ত sample → RNA extraction → DNase treatment → RNA quality check → reverse transcription → cDNA → BD Genomes

- **RNA extraction:** RNase-free tube ও tips, gloves; দ্রুত কাজ করুন; সম্ভব হলে DNase treatment করুন; concentration ও purity যাচাই করুন। RNA দীর্ঘ সময় room temperature-এ রাখবেন না।
- **cDNA synthesis:** target virus ও sequencing strategy অনুযায়ী random primer, virus-specific primer (উদ্ভিদে oligo(dT)-ও) ব্যবহার করা যায়। Viral genome-এর যতটা সম্ভব সম্পূর্ণ অংশ ধারণ করে এমন cDNA ভালো।
- **সংরক্ষণ:** sterile nuclease-free tube-এ, পরিষ্কার Sample ID সহ, −20 °C বা −80 °C-এ। বারবার freeze–thaw নয়।

cDNA-এর সঙ্গে যে তথ্য দেবেন

Sample ID, host species (প্রাণী/উদ্ভিদ), tissue/sample type, সংগ্রহের স্থান ও তারিখ, symptomatic/asymptomatic, সন্দেহজনক বা জানা virus-এর নাম, RNA extraction method, RNA input, cDNA synthesis kit/protocol, primer তথ্য এবং জানা থাকলে cDNA concentration।

Sample labeling ও সংখ্যা

- Label: Sample ID + species + tissue + replicate, যেমন `AV01_Chicken_Lung_R1`, `PV01_Tomato_Leaf_R1`।
- Comparative study হলে প্রতি group-এ কমপক্ষে 3টি biological replicate; virus identification-এর জন্য প্রতিটি প্রাণী/গাছ বা isolate-এর আলাদা sample।

গুরুত্বপূর্ণ নির্দেশনা

- ✓ সম্ভাব্য virus-আক্রান্ত, তাজা ও উপযুক্ত tissue নির্বাচন করুন
- ✓ RNase-free materials ব্যবহার করুন
- ✓ Tissue দ্রুত RNAlater-এ দিন এবং সম্পূর্ণ ডুবিয়ে রাখুন
- ✓ দীর্ঘমেয়াদে −80 °C; বারবার freeze–thaw নয়
- ✓ cDNA হলে high-quality cDNA পাঠান
- ✓ প্রতিটি sample-এ পরিষ্কার Sample ID, species, tissue ও সন্দেহজনক virus-এর তথ্য দিন

পরবর্তী বিশ্লেষণ: Viral genome assembly → annotation → variant analysis → phylogenetic analysis।

Questions before sending samples? WhatsApp / phone +880 1308-222824 · bdgenome@yahoo.com · bdgenomes.com/guides/rna-virus-wgs/