



Silica-based method

for DNA Extraction from Peripheral Blood

Instructions For Use

Catalog No.: TD-621.BL25; TD-621.BL50 & TD-621.BL100

REV V06.22

June 2022

فهرست

جدول نشانه های مورد استفاده روی برچسب محصول

۱. ساختار محصول

- ۱.۱. محتویات کیت
- ۱.۲. مواد شیمیایی و وسایل جانبی مورد نیاز

۲. شرح محصول

- ۱.۲. حیطه کاربرد
- ۲.۲. معرفی محصول
- ۳.۲. اساس عملکرد محصول
- ۴.۲. ویژگی های فنی محصول

۳. شرایط نگهداری محصول

۴. نکات ایمنی

۵. هشدارها و اقدامات احتیاطی

۶. پروتکل استفاده از محصول

- ۱.۶. مراحل آماده سازی نمونه و حجم ورودی بهینه
- ۲.۶. مراحل آماده سازی بافرها
- ۱.۲.۶. آماده سازی بافرهای DWE1 و DWE2
- ۲.۲.۶. آماده سازی محلول پروتئینازی DPK*
- ۳.۶. نکات و نحوه استفاده از TritEx® Spin Columns & Collection tubes
- ۴.۶. نکات مهم پیش از شروع فرآیند استخراج DNA
- ۵.۶. پروتکل استخراج DNA
- ۶.۶. پروتکل استخراج DNA در یک نگاه

۷. محدودیت های استفاده از محصول

۸. پیوست ها

- ۱.۸. راهنمای عیب یابی محصول (Troubleshooting guide)
- ۲.۸. کنترل کیفیت محصول (Quality control)
- ۳.۸. گزارش ارزیابی عملکرد محصول (Performance evaluation)
- ۱.۳.۸. مطالعات مقایسه ای با کیت مرجع
- ۲.۳.۸. ارزیابی عملکرد در واکنش های پایین دستی (Downstream evaluation)
- ۳.۳.۸. سنجش میزان بازدهی DNA استخراج شده (Yield of purified DNA)
- ۴.۳.۸. تکرارپذیری
- ۵.۳.۸. تجدیدپذیری
- ۴.۸. اطلاعات سفارش
- ۵.۸. پشتیبانی و خدمات پس از فروش
- ۶.۸. اطلاعات تماس

جدول نشانه های مورد استفاده روی برچسب محصول

Table 1. List of Important Symbols and Definitions.

	Catalogue Number		Keep in dry place.
	LOT Number		Caution-Consult the Instructions
	Manufacturer's address		Number of tests
	Production Date		Do not use if the primary packaging is damaged.
	Expiration Date		Read the User's Manual carefully.
	Keep at 15-25 °C		

توجه:

اکیدا به کاربرانی که برای اولین بار از محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit استفاده می کنند توصیه می شود پیش از استفاده از این محصول، همه بخش های این دستورالعمل راهنما به ویژه بخش « پروتکل استفاده از محصول » را با دقت مطالعه نمایند. علاوه بر این، این دستورالعمل دارای بخش « پروتکل استخراج DNA در یک نگاه » است که کاربران با تجربه می توانند از آن به عنوان یک رفرنس سریع حین اجرای عملیات استخراج DNA استفاده نمایند. با این وجود توصیه می شود جهت اطمینان بیشتر از صحت اجرای پروتکل، جزئیات مراحل استخراج در بخش « پروتکل استخراج DNA » مطالعه شود. همچنین، به منظور دریافت اطلاعات بیشتر در مورد محصول به سایت شرکت تریتاژن به آدرس www.tritagene.com مراجعه نمایید و یا با پشتیبانی فنی شرکت به شماره ۰۲۱-۴۴۱۸۰۱۸۱ تماس حاصل فرمایید.

۱. ساختار محصول

۱.۱. محتویات کیت

محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit، در ۲ مدل ۵۰ و ۱۰۰ تستی ارائه می‌شود که اجزای تشکیل دهنده‌ی آن در جدول زیر نشان داده شده است:

Table 2. Kit composition				
TritEx® Blood DNA Extraction Kit				
Cat No.		(TD-621.BL25)	(TD-621.BL50)	(TD-621.BL100)
No. of preparation		25 Preps	50 Preps	100 Preps
DBL	Lysis/Binding Buffer	6.25 ml	12.5 ml	25 ml
DWE1 (Conc.)	Wash Buffer 1	9 ml	18 ml	36 ml
DWE2 (Conc.)	Wash Buffer 2	3 ml	6 ml	12 ml
DEB	Elution Buffer	1.5 ml	3 ml	6 ml
DPK	Proteinase K (lyophilized)	12.5 mg	25 mg	2 × 25 mg
DPK buffer	Proteinase K Buffer	625 µl	1.25 ml	2 × 1.25 ml
-	TritEx® Spin Column	25 pcs.	50 pcs.	100 pcs.
-	TritEx® Collection Tube	30 pcs.	60 pcs.	110 pcs.
-	IFU	1	1	1

۲.۱. مواد شیمیایی و وسایل جانبی مورد نیاز

به کاربران توصیه می‌شود جهت استفاده از محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit، مواد و تجهیزات زیر را آماده‌سازی نمایند:

Table 3: Reagents, Consumables & Equipment to be supplied by the user		
TritEx® Blood DNA Extraction Kit		
Reagents	Consumables	Equipment
Ethanol (% 96-100)	Micro-pipette tips	Micro-Spin fuge
	1.5 ml or 2 ml Microtube	Vortex mixer
		Mini-centrifuge
		Thermal heating block or Water bath
		Manual Pipettors
		Protective Equipment (lab coats, gloves, goggles)

۲. شرح محصول

۱.۲. حیطه کاربرد (هدف)

محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit جهت استخراج DNA ژنومی از خون انسان به روش ستونی با واسطه غشای سیلیکایی طراحی و تولید شده است و به عنوان یک محصول IVD در آزمایشگاه‌های تشخیص کلینیکال قابل استفاده است.

۲.۲. معرفی محصول

محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit با هدف استخراج آسان و سریع DNA با کیفیت بالا از خون طراحی و تولید شده است. این روش برای استفاده از خون کامل تازه یا منجمد و خون کامل که دارای سیترات یا EDTA است مناسب می‌باشد. تکنولوژی طراحی کیت مذکور براساس ستون‌های حاوی غشای سیلیکایی می‌باشد که در شرایط بافری بهینه، قادر به استخراج DNA ژنومی با خلوص بالا در مدت زمان کوتاه است. از مزیت‌های روش سیلیکایی در استخراج نوکلئیک اسید، کاهش تعامل کاربر با نمونه‌های خون، کنترل ایمن نمونه‌های بالقوه عفونی و به حداقل رساندن آلودگی‌های بین نمونه‌ای است. هر کیت TritEx در اندازه‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ تستی تولید می‌شود و در آزمایشگاه‌های تشخیص ژنتیک و تحقیقات مولکولی که با حجم زیادی از نمونه‌های بیولوژیک جهت استخراج DNA سر و کار دارند قابل استفاده می‌باشد. کیفیت عملکرد و بازدهی این محصول به گونه‌ای است که DNA استخراج شده بطور مستقیم در واکنش‌های مولکولی پایین‌دستی (downstream) مانند انواع روش‌های PCR، Southern blotting و غیره قابل استفاده می‌باشد.

۳.۲. اساس عملکرد محصول

محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit کیت مولکولی جهت استخراج DNA ژنومی از خون به روش ستونی با واسطه غشای سیلیکایی می‌باشد. در این روش، ابتدا نمونه‌های خون در شرایط نمکی غلیظ (DBL) در حضور Proteinase K لیز شده و سپس با ایجاد شرایط بافری مناسب و انتقال نمونه بیولوژیک لیز شده به TritEx® Spin column، اتصال موثر DNA به غشای سیلیکایی ستون حاصل می‌شود. آلودگی‌های موجود شامل نمک‌ها، متابولیت‌ها و ماکرومولکول‌های محلول، طی دو مرحله شستشو با استفاده از دو بافر مجزای DWE1 و DWE2 حذف می‌شوند و در نهایت، DNA متصل به غشای سیلیکایی ستون، با استفاده از محلول DEB با خلوص و کیفیت بالا استخراج می‌شود. نمونه DNA استخراج شده فاقد پروتئین، نوکلئازها، مهارکننده‌های واکنش‌های مولکولی و سایر آلودگی‌ها می‌باشد که جهت استفاده مستقیم در واکنش‌های downstream و یا ذخیره سازی آماده می‌باشد.

به طور خلاصه، پروتکل استفاده از کیت TritEx® Blood DNA Extraction شامل ۴ مرحله است:

- لیز شدن سلول‌های موجود در نمونه‌ی خون با استفاده از محلول DBL و DPK*
- اتصال DNA ژنومی در محلول لیز شده به غشای TritEx® Spin Columns
- شستن غشا از آلودگی‌های موجود شامل نمک‌ها، متابولیت‌ها و ماکرومولکول‌های محلول، طی دو مرحله شستشو با استفاده از دو بافر مجزای DWE1 و DWE2.
- جداسازی DNA ژنومی با خلوص و کیفیت بالا از غشا با استفاده از محلول Elution Buffer

در جدول زیر، مهم ترین ویژگی های فنی TritEx® Blood DNA Extraction Kit به طور خلاصه ارائه شده است.

Table 4. Kit Specifications at a glance	
TritEx® Blood DNA Extraction Kit	
Parameter	Specifications
Processing type	Manual kit- Centrifugation
Methodology	Silica-based technology
Column type	TritEx® Mini-spin Column (Medical grade PP)
Column binding capacity	14-25 µg
Typical recovery rate	> %90
Time/prep	< 30 min
Sample type	Fresh and frozen human whole blood treated with EDTA and citrate from common blood collection systems
Typical DNA yield	3-3.5 µg depending on white blood cell count
Typical DNA quality	Ratio A260 / A280 1.7–1.9 Ratio A260 / A230 1.7–2.3
Typical DNA concentration	40–60 ng/µL
Sample volume	Up to 250 µl
Elution volume	60 µl
Final eluate	Pure DNA
Downstream DNA application	PCR techniques; Enzymatic reactions Genome sequencing; Southern blotting, etc.

۳. شرایط نگهداری و انتقال محصول

- کلیه اجزای محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit را در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) و شرایط خشک نگهداری نمایید.
- در این صورت، این محصول با حفظ کیفیت عملکرد به مدت ۱ سال تا تاریخ انقضای درج شده روی برجسب محصول پایدار می ماند.
- میکروتیوب DPK حاوی پروتئیناز K لیوفیلیزه می باشد که پس از دریافت کیت، آن را به یخچال انتقال دهید. پروتئیناز K لیوفیلیزه در یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۲ ماه و در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) به مدت ۱۸ ماه قابل نگهداری است.
- پس از رقیق سازی پروتئیناز K لیوفیلیزه با DPK buffer (فعال سازی آنزیم)، بایستی محلول DPK* در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. در این شرایط، محلول DPK* به مدت ۲ ماه پایدار است.
- پس از افزودن اتانول % 96-100 به محلول های DWE1 و DWE2 (فعال سازی بافرهای شستشو)، این بافرها در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۱ ماه پایدار هستند.
- پس از هر بار استفاده می بایستی در بطری ها محکم بسته شود تا از نفوذ آلودگی های احتمالی، تبخیر و تغییر غلظت محلول ها جلوگیری شود.
- شرایط انتقال محصول در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) می باشد و نیاز به اعمال زنجیره سرد نیست. فقط بایستی دقت شود که حین انتقال محصول، جعبه و محتویات درون آن در حالت وارونه یا کج قرار نگیرند و یا دچار آسیب فیزیکی نشوند.

۴. نکات ایمنی

تعدادی از بافرهای محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit حاوی مواد شیمیایی خطرناک هستند. به همین دلیل، استفاده از روپوش آزمایشگاه، دستکش یک بار مصرف و عینک محافظ حین کار با کیت ضروری می باشد. جهت کسب اطلاعات بیشتر، می توانید به MSDS مربوطه مراجعه نمایید. اطلاعات مربوط به این مواد شیمیایی و شیوه جلوگیری از ریسک های احتمالی ناشی از آنها در جدول زیر شرح داده شده است:

Table 5. Safety instructions-Risk and safety phrases

TritEx® Blood DNA Extraction Kit

Buffer Name	Hazardous contents	Risk & hazards	GHS Symbol	Precaution
DBL	*Chaotropic Salt (36-50 %)	-Harmful if swallowed. -Causes serious eye irritations.	 Warning	-Keep container tightly closed. - Wash with water thoroughly after handling. -Wear protective gloves / eye protection. - IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor/.../if you feel unwell. - Rinse mouth.
DWE1	*Chaotropic Salt (36-50 %) *Isopropanol (20-50 %) *Ethanol (96-100 %)	-Harmful if swallowed. -Flammable liquid and vapour. -May cause drowsiness or dizziness. -Causes serious eye irritations.	 Warning	-Keep container tightly closed. -Keep away from sources of ignition. No Smoking. - Do not breathe vapors. - Wash with water thoroughly after handling. - IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor/.../if you feel unwell. - Rinse mouth.
DPK	*Proteinase (90-100 %)	-Causes serious eye irritations. -Causes skin irritation. -May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.	 Danger	-Avoid breathing dust / vapors. -Wear protective gloves / eye protection. -If experiencing respiratory symptoms: Call your physician.

* Hazard labeling is not necessary if quantity per bottle is less than 125 g or 125 ml (certificate of exemption according to 67/548/EEC Art. 25, 1999/45/EC Art. 12 and German GefStoffV § 20 (3) and TRGS 200 7.1).

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

* For further information, see related Material Safety Data Sheet (MSDS) at www.tritagene.com.

۵. هشدارها و اقدامات احتیاطی

۱. پس از دریافت کیت و پیش از استفاده ی محصول، از صحت محتویات کیت و تعداد بافرها اطمینان حاصل کنید و در صورت مشاهده هرگونه نقص یا آسیب فیزیکی در محصول با پشتیبانی فنی شرکت تریتاژن تماس حاصل نمایید.

۲. به منظور حفظ کیفیت DNA و بازدهی مؤثر کیت در همه مراحل کار با محصول و استخراج DNA، از روش های ضد میکروبی (آسپتیک) رایج در آزمایشگاه های میکروبیولوژی استفاده نمایید.

۳. در طول زمان حمل و نقل و یا ذخیره سازی بافرها احتمال ایجاد رسوب درون بافر وجود دارد. در صورت مشاهده رسوب، تیوب را در دمای ۵۰-۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه کنید تا رسوب ها کاملاً حل شود. استفاده از بافرهای رسوبی منجر به بازیابی ضعیف DNA و کاهش کارایی محصول می شود.

۴. از افزودن سدیم هیپوکلریت یا محلول های اسیدی به بافرهای DBL، DWE1، نمونه های لیزشده ی درون بافر DBL و پسماندهای آن جدا خودداری نمایید، زیرا منجر به تولید ترکیبات سمی واکنش گر (فعال) می شود. در صورت ریختن بافرها و/یا نمونه های مذکور روی سطوح آزمایشگاهی، آن ناحیه را با آب و مواد شوینده مناسب تمیز کنید. اگر نمونه، حاوی عوامل عفونی بالقوه باشد، ابتدا آن ناحیه را با آب و مواد شوینده تمیز نموده و سپس، با استفاده از سدیم هیپوکلریت 1% ضد عفونی نمایید.

۵. بافرهای کیت همواره بایستی دور از آلودگی نگهداری شوند. توجه داشته باشید که درب تیوب بافرها جز در مواقع استفاده از بافر، همواره بسته باشد تا خلوص بافر حفظ شود و از انتقال آلودگی‌های احتمالی به درون بافرها و سپس به واکنش‌های پایین دستی (مانند انواع PCR و غیره) جلوگیری شود. در صورت مشاهده هرگونه آلودگی یا لکه در بافر، بلافاصله آن را از کیت جدا نموده و دور بیندازید. اگر تیوب‌های حاوی بافر، آسیب دیده اند و یا نشأت می‌کنند، هنگام دور انداختن تیوب‌ها از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.

۶. پسماندها و مایعات حاصل از مصرف کیت مانند لیزات سلولی که حاوی بافر لیز دنا توره کننده و پروتئیناز K هستند باید جزو مواد عفونی در نظر گرفته شوند و توصیه می‌شود که طبق دستورالعمل‌های مدیریت پسماند آزمایشگاهی و الزامات GMP مدیریت و امحا شوند.

۶. پروتکل استفاده از محصول

۱.۶. مراحل آماده سازی نمونه و حجم ورودی بهینه

TritEx® Blood DNA Extraction Kit جهت استخراج DNA از خون انسان کاربرد دارد. پارامترهایی نظیر حجم نمونه، شرایط نگهداری نمونه و مهارت آزمایشگاهی کاربر بر میزان DNA اتصال یافته به غشای سیلیکایی ستون و بازدهی نهایی کیت اثرگذار است.

فرآیند استخراج DNA در کیت حاضر برای حجم 250 µl از نمونه ورودی موردنظر بهینه سازی شده است. جهت آماده سازی نمونه، مقدار 250 µl نمونه خون موردنظر، ابتدا با 25 µl از DPK و سپس با 250 µl بافر DBL مخلوط می‌شود. بدین ترتیب، شرایط لیز سلولی نمونه پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای 56 °C به طور کامل اتفاق می‌افتد (به بندهای ۱ و ۲ مراحل کار با کیت رجوع شود).

به طور معمول، میزان بازدهی استخراج DNA با استفاده از 250 µl خون کامل انسان، حدود 3-3.5 µg، بسته به کانت سلولی گلبول سفید خون (WBC) نمونه‌ی مورد استفاده می‌باشد.

توجه:

- اکیدا توصیه می‌شود که نمونه‌ها به صورت شفاف، یکنواخت (هموژن) و با ویسکوزیته (گرانروی) کم آماده سازی شوند و سپس به TritEx® Spin Columns انتقال داده شوند. وجود ذرات رسوبی (به ویژه درون نمونه‌های فریز شده یا قدیمی) باعث مسدود شدن فیلتر ستون و عدم عبور نمونه از ستون می‌شود.
- نمونه‌هایی که دارای رسوبات ناشی از یخ زدگی (Cryoprecipitate) هستند باید ابتدا با محلول لیزکننده DBL مخلوط شوند و سپس به منظور رسوب زدایی، سانتریفیوژ یا فیلتراسیون شوند.
- استفاده از نمونه‌های خون حاوی لخته (Clot) اکیدا توصیه نمی‌شود و نمونه خون مورد استفاده بایستی حتی الامکان تازه باشد تا کیفیت و کمیت DNA استخراج شده قابل پذیرش باشد.
- پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون در تیوب‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد (EDTA یا سیترات)، بایستی بلافاصله در دمای مناسب ذخیره سازی شود. این نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) به مدت ۳-۴ روز و یا در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد حدود ۲ سال قابل نگهداری و ذخیره سازی است. توصیه می‌شود خون منجمد را ابتدا در بن ماری 37 °C ذوب نموده و سپس، قبل شروع فرآیند استخراج DNA آن را روی یخ نگهداری نمایید.
- EDTA یک شلاتور فلزی است که به عنوان فاکتور مهارکننده‌ی نوکلئازهای وابسته به فلزات محسوب می‌شود و رایج‌ترین ضدانعقاد خون در فرآیند استخراج DNA است. هپارین نیز دارای قابلیت ضد انعقادی است ولی از آنجایی که مهارکننده قوی واکنش‌های PCR است معمولا از آن استفاده نمی‌شود.

۲.۶. مراحل آماده سازی بافرها

۱.۲.۶. آماده سازی بافرهای DWE1 و DWE2

بافرهای DWE1 و DWE2 بصورت غلیظ (Concentrate) درون کیت قرار داده شده‌اند. بنابراین، لازم است پیش از شروع فرآیند استخراج، این بافرها فعال سازی شوند. بدین منظور، به هر یک از بافرها مطابق جدول زیر، حجم مشخصی از اتانول 96-100% افزوده و سپس به شدت تیوب بافرها تکان داده شود تا در نهایت بافر همگن شده DWE1 و DWE2 جهت استفاده آماده شود. بافرهای شستشوی فعال سازی شده به مدت ۱ ماه در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) قابل نگهداری بوده و می‌توان از آنها در فرآیند استخراج استفاده نمود.

توجه:

- در پایان این مرحله، جهت جلوگیری از خطای احتمالی در نوبت های بعدی مصرف کیت، بر روی برچسب بافرهای مذکور علامت بزنیید تا از اضافه شدن اتانول به آنها اطمینان داشته باشید.
- بافر DWE1 حاوی مواد شیمیایی خطرناک است (جدول ۵). هنگام آماده سازی و استفاده، نکات ایمنی را رعایت نموده و از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.
- همیشه قبل از استفاده از بافرهای شستشو، تیوب آنها را چندین بار سر و ته کنید و به طور کامل تکان دهید تا محلول یکنواخت حاصل شود.
- جدول زیر مقادیر اتانول لازم را برای آماده سازی بافرهای شستشو در کیت ۱۰۰ تستی نشان می دهد. برای کیت های ۲۵ و ۵۰ تستی نیز با همین تناسب می توان محلول های شستشو را آماده نمود.

Table 6. Preparation of buffers DWE1 & DWE2			
TritEx® Blood DNA Extraction Kit			
For 100 preps	Buffer Name		
		DWE1	DWE2
	Conc. Vol.	36 ml	12 ml
	Ethanol (96-100 %)	24 ml	48 ml
	Final Vol.	60 ml	60 ml
* Mix well to have homogenous working solution.			
* Mark the labels on the bottles to ensure addition of ethanol.			

- توصیه می شود پس از افزودن اتانول به بافرهای DWE1 و DWE2 و فعال سازی آنها، حداکثر تا مدت ۱ ماه، به طور کامل کیت را مصرف نمایید. استفاده از کیت فعال سازی شده که به مدت طولانی نگهداری شده باشد، ممکن است باعث کاهش بازدهی کیت (low DNA yield) شود.

۲.۲.۶. آماده سازی محلول پروتئینازی DPK*

میکروتیوب DPK حاوی پروتئیناز K لیوفیلیزه است. به منظور آماده سازی آن، حجم ۱ ml از محتویات میکروتیوب DPK buffer را به یک میکروتیوب حاوی DPK بیفزایید تا محلول پروتئینازی DPK* با غلظت نهایی ۲۰ mg/ml حاصل شود. پس از همگن سازی، محلول DPK* آماده مصرف در فرآیند استخراج DNA است.

توجه:

- میکروتیوب DPK حاوی مواد شیمیایی خطرناک است (جدول ۵). توصیه می شود هنگام آماده سازی و استفاده از آن، نکات ایمنی را رعایت نموده و از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.
- محلول DPK* در یخچال (دمای ۸-۲۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۲ ماه قابل نگهداری است و توصیه می شود این محلول حداکثر تا ۲ ماه پس از رقیق سازی مورد استفاده قرار گیرد.
- از ذوب و انجماد مکرر محلول رقیق شده DPK* خودداری کنید.

۳.۶. نکات و نحوه استفاده از TritEx® Spin Columns & Collection tubes

به منظور جلوگیری از وقوع آلودگی های بین نمونه ای (Cross-contamination) حین کار با TritEx® Spin Columns و Collection tube در مراحل استخراج، توجه به نکات زیر ضرورت دارد:

- در کلیه مراحل کار با TritEx® Spin Columns از دستکش استفاده نمایید و در صورت تماس دستکش با نمونه آن را تعویض کنید.
- در هر یک از مراحل استخراج که از سمپلر جهت انتقال محلول ها استفاده می شود سرسمپلر را تعویض کنید. توصیه می شود از سرسمپلرهای فیلتر دار (Aerosol barrier tips) استفاده کنید.
- هنگام انتقال نمونه لیز شده و/ یا بافرها به ستون توجه شود که نوک سرسمپلر به لبه ها و دیواره ستون اتصال پیدا نکند و محتویات سرسمپلر دقیقاً در وسط فیلتر غشایی ستون تخلیه شود.

- حین استفاده از ستون، توجه داشته باشید که نوک سرسمپلر به غشای سیلیکایی ستون برخورد نکند، زیرا ممکن است باعث آسیب به فیلتر شده و فیلتراسیون به درستی صورت نگیرد.
- در کلیه مراحل کار، پیش از انتقال TritEx® Spin Columns به سانتریفیوژ ابتدا از بسته بودن کامل درب پرسی ستون اطمینان حاصل نمایید.
- از آن جایی که ممکن است پس از سانتریفیوژ، مایع جمع شده در Collection tube به دلیل دارا بودن محتویات بافری خطرناک باشد، باید به درستی و با رعایت نکات ایمنی و بهداشت دور انداخته شوند.
- در صورتی که با تعداد زیادی نمونه و ستون کار می کنید توجه داشته باشید که انتقال بافرها به ستون را برای هر نمونه به صورت مجزا انجام دهید و درب همه ستون ها را به طور همزمان و موازی باز نگذارید.
- پیشنهاد می شود برای جلوگیری از آلودگی، در هر مرحله استفاده از TritEx® Spin Columns، در مرحله پایانی Collection tube را جدا کرده و میکروتیوب 1.5 ml یا 2 ml تمیز جایگزین آن کنید و eluate را در آن جمع آوری نمایید.

۴.۶. نکات مهم پیش از شروع فرآیند استخراج

- قبل از شروع کار، توصیه می شود که این دستورالعمل استفاده را به طور کامل و دقیق مطالعه کنید.
- قبل از شروع کار، فرصت دهید تا دمای کلیه بافرها و اجزای کیت و نمونه های خون به دمای محیط (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) برسد.
- قبل از شروع کار از صحت آماده سازی بافرها و پروتئاز براساس پروتوکول اطمینان حاصل نمایید.
- قبل از شروع کار، دستگاه بلوک حرارتی (Heating block) را به دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برسانید.
- پس از هر مرحله ورتکس، به مدت چند ثانیه میکروفیوژ نیز انجام دهید تا قطرات جمع شده درون درب میکروتیوب در پایین میکروتیوب جمع شود.
- الکل مناسب برای استفاده در این محصول (هم در مراحل آماده سازی بافرها و هم طی مراحل استخراج)، اتانول 96-100 % است و به هیچ عنوان از سایر الکل ها استفاده نکنید، زیرا باعث کاهش بازده و خلوص DNA استخراج شده می شود.
- قبل از شروع کار، از افزودن مقادیر صحیح اتانول 96-100 % به بافرهای DWE1 و DWE2 اطمینان حاصل کنید (جدول ۶) و سپس، برچسب های هر دو بافر را علامت گذاری کنید.
- در صورت مشاهده رسوب در بافر DBL، حتماً قبل از شروع کار آن را در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد حداکثر تا حل شدن کامل رسوب انکوبه کنید تا دوباره محلول یکنواختی حاصل شود.
- در مرحله ای که نیاز به سانتریفیوژ می باشد، سانتریفیوژ کردن در دمای محیط (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انجام شود.
- در مرحله ای از فرآیند استخراج که نیاز به استفاده از میکروتیوب می باشد (جهت آماده سازی نمونه در مرحله اول پروتکل و یا جهت جمع آوری محلول نهایی حاوی DNA استخراج شده) و یا در مواردی که حجم نمونه بیشتر از 250 µl است، می توانید جهت تسهیل کار به جای میکروتیوب 1.5 ml از میکروتیوب 2 ml استفاده نمایید.
- جهت کاهش آلودگی های احتمالی حین کار، در صورت امکان از هود لامینار استفاده نمایید.

۵.۶. پروتکل استخراج DNA

- پس از تکمیل آماده سازی بافرها و نمونه ها، مراحل استخراج DNA به صورت زیر انجام می شود:
۱. مقدار 25 µl از محلول آنزیمی پروتئیناز K را به میکروتیوب 2 ml یا 1.5 ml اضافه کنید.
۲. 250 µl از نمونه (خون، سرم، پلاسما و سوپرناتانت سلولی) را به میکروتیوب اضافه کنید.
۳. 250 µl بافر DBL را به میکروتیوب اضافه کنید، درب آن را ببندید و به وسیله ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط کنید.

توجه:

- برای نمونه هایی که حجم بیشتر از 250 µl دارند، مقدار بافر DBL را به همان تناسب افزایش دهید.
- برای اطمینان از لیز کارآمد، ضروری است که نمونه و بافر DBL کاملاً مخلوط شوند تا یک محلول همگن تولید شود.
- از آنجا که ویسکوزیته بافر زیاد است، حتماً در حین اضافه کردن بافر، حجم دقیق با استفاده از سمپلر مناسب اضافه شود.
- محلول DPK* (پروتئیناز K) را مستقیماً به بافر DBL اضافه نکنید.

۴- میکروتیوب را در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید و پس از اتمام زمان انکوباسیون، میکروتیوب را به طور مختصر میکروفیوژ کنید تا قطرات داخل درب میکروتیوب در ته آن جمع آوری شوند.

۵. بعد از اینکه محتویات میکروتیوب به دمای اتاق رسید، ۲۶۰ µl اتانول (96-100%) به میکروتیوب اضافه کنید، درب آن را ببندید و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید. سپس میکروتیوب را مختصراً میکروفیوژ کنید. محتویات میکروتیوب باید کاملاً با اتانول مخلوط و همگن شود تا اتصال DNA به غشای سیلیکایی ستون به درستی انجام گیرد.

۶. یک ستون فیلتردار TritEx® Spin column را در Collection tube قرار دهید و با دقت محتویات میکروتیوب را به TritEx® Spin Column منتقل کنید به طوری که نوک سرسمپلر به لبه ستون برخورد نکند. درب ستون را ببندید سپس با دور 8000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. مایع جمع شده در Collection tube را دور بریزید و مجدداً ستون را درون Collection tube قرار دهید.

توجه:

- قبل از سانتریفیوژ، درب میکروتیوب ها را محکم ببندید تا آلودگی های بین نمونه ای اتفاق نیفتد.
- در صورتی که محلول به طور کامل از ستون عبور نکرد مجدداً با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید تا محتویات بالای ستون به Collection tube زیرین انتقال یابد.
- اگر محلول پس از سانتریفیوژ مجدد هنوز از غشا عبور نکرد، نمونه را دور بریزید و استخراج DNA را با نمونه جدید از ابتدا تکرار کنید.
- این مرحله را برای باقیمانده های محتویات میکروتیوب حاوی نمونه لیز شده تکرار کنید تا کل محلول لیز از TritEx® Spin column عبور داده شود.

۷. مقدار ۶۰۰ µl بافر DWE1 را به TritEx® Spin column اضافه کنید و با دور 8000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع جمع شده در Collection tube را دور بریزید و مجدداً ستون را درون Collection tube قرار دهید.

توجه: در صورتی که حجم نمونه بیشتر از ۲۵۰ µl است، لازم نیست که مقدار بیشتری از بافر DWE1 استفاده شود.

۸. مقدار ۶۰۰ µl بافر DWE2 را به TritEx® Spin column اضافه کنید و با دور 8000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. مایع جمع شده در Collection tube را دور بریزید و مجدداً ستون را درون Collection tube خالی قرار دهید. به منظور خروج کامل بافر DWE2، با حداکثر دور 14000 rpm به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نمایید تا ستون کاملاً خشک شود.

۹. در این مرحله، Collection tube را دور بیندازید و TritEx® Spin column را درون یک میکروتیوب تمیز 1.5 ml (درون کیت موجود نمی باشد) قرار دهید. مقدار ۶۰ µl محلول Elution Buffer یا DEB را به قسمت مرکزی TritEx® Spin column اضافه کنید و درب ستون را ببندید و به مدت ۲ دقیقه (۱۵-۱۰ دقیقه توصیه می شود) در دمای محیط (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انکوبه کنید.

توجه:

- به منظور افزایش میزان بازدهی DNA می توان از روش های توصیه شده در زیر استفاده نمود:
- توصیه می شود بافر DEB را پیش از استفاده تا دمای ۵۰-۶۰ درجه حرارت دهید.
- TritEx® Spin column حاوی محلول DEB را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای محیط (۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- TritEx® Spin column حاوی محلول DEB را به مدت ۱۲-۸ ساعت (overnight) در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید و پس از آن مراحل بعدی استخراج را طبق پروتکل انجام دهید (حصول DNA yield بالاتر).

۱۰. در این مرحله، میکروتیوب در برگرفته ستون را با دور 8000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. سپس، ستون را دور بیندازید و میکروتیوب حاوی DNA استخراج شده را به فریزر -۲۰ درجه انتقال دهید.

توجه:

- عملکرد و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده برای انواع مختلفی از واکنش های مولکولی downstream مناسب می باشد.
- چنانچه غلظت بیشتری از DNA نیاز باشد می توان Eluate به دست آمده از مرحله آخر را مجدداً به ستون اضافه کرد و مرحله سانتریفیوژ نهایی را مجدداً تکرار نمود. در این روش مقدار بازدهی کیت ۲۰-۱۰ درصد افزایش پیدا می کند.
- لازم به ذکر است که غلظت DNA استخراج شده تا حدود زیادی به کانت گلبول های سفید (WBC Count) نمونه ی خون مورد استفاده نیز بستگی دارد. تعداد گلبوهای سفید خون افراد مختلف با توجه به نوع تغذیه، وضعیت سلامت، بیماری های مختلف و یا مصرف داروهای خاص بسیار متنوع است و به همین دلیل، جذب نوری یا غلظت DNA استخراج شده از نمونه ی خون افراد مختلف در گستره عددی وسیعی گزارش می شود.

۶,۶. پروتکل استخراج DNA از خون در یک نگاه

Table 7: Protocol-at-a-glance (TritEx® Blood DNA Extraction Protocol)

TritEx® Blood DNA Extraction Process		
Lysis of blood cell		25 µl DPK* 250 µl sample & 250 µl DBL (Vortex) Incubation (8-10 min at 56°C)
Adjust DNA binding condition		260 µl ethanol %96-100 (Vortex)
Bind DNA	 	Load lysate onto TritEx® spin column 8000 rpm/ 1 min
Wash & dry silica membrane	   	1 st wash: 600 µl DWE1 2 nd wash: 600 µl DWE2 1 st wash: 8000 rpm/1 min 2 nd wash: 8000 rpm/ 1 min Dry: 14000 rpm/ 1 min
Elute highly pure DNA	 	60 µl DEB Incubation at RT (15-25°C) for 2 min (10-15 min recommended) 8000 rpm/1 min

۷. محدودیت های استفاده از محصول:

- هنگام استفاده از محصول می بایست به تاریخ انقضای نوشته شده روی لیبل جعبه توجه شود و چنانچه از تاریخ انقضای آن گذشته باشد استفاده نشود.
- کیت TritEx® Blood DNA Extraction Kit یک محصول IVD می باشد و جهت استخراج DNA از خون کامل انسان و انجام تست های تشخیصی downstream در آزمایشگاه های تحقیقاتی و تشخیص ژنتیک قابل استفاده می باشد.
- از مصرف همزمان بافرهای مختلف که مربوط به کیت هایی با شماره لات های متفاوت هستند خودداری شود.
- پودر لیوفیلیزه DPK در یخچال (دمای °C 2-8) و محلول DPK* حاوی پروتئیناز K رقیق شده را بایستی در فریزر (دمای °C -20) نگهداری نمایید. از قرار دادن آن در دمای اتاق به مدت طولانی اکیدا خودداری نمایید.
- این کیت به عنوان به محصول IVD جهت استخراج DNA از خون انسان طراحی شده است و فقط با نمونه خون کامل انسانی صحت گذاری اختصاصی شده است. بنابراین، نباید این محصول جهت استخراج نوکلئیک اسید از بافت، ادرار، مدفوع، مایع مغزی- نخاعی، و سایر نمونه های بیولوژیک و همچنین سوآب های مشکوک به نمونه ویروسی، نمونه های باکتریایی، قارچی و انگل ها در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرد.

۸. پیوست ها:

۱,۸. راهنمای عیب یابی محصول (Troubleshooting guide)

راهنمای عیب یابی محصول به عنوان مرجعی برای جلوگیری و رفع مشکلاتی است که احتمالا حین مراحل کار و/یا در نتیجه نهایی کیت رخ می دهد. رایج ترین علایم و مشکلاتی که ممکن است حین مراحل استخراج DNA و یا در نتایج نهایی پدیدار شود به همراه راه حل های پیشنهادی آنها در جدول زیر ارائه شده است. علاوه بر این، تیم پشتیبانی شرکت تربیتاژن نیز همواره آمادگی لازم را جهت پاسخ گویی به سوالات علمی و فنی کاربران محصول دارد. برای کسب اطلاعات بیشتر و یا راه های تماس به سایت شرکت به آدرس www.tritagene.com مراجعه فرمایید.

Table 8. Troubleshooting guide (TritEx® Blood DNA Extraction Kit)

علایم و مشکلات	علت و راه حل پیشنهادی
الف. غلظت بسیار کم DNA عدم وجود DNA	۱. تعداد زیاد سلول در نمونه مورد استفاده • مقدار نمونه بیش از حداکثر ظرفیت کیت منجر به لیز سلولی ضعیف و ناکارآمد می شود. مقدار نمونه اولیه را کاهش دهید یا حجم بافرها را به تناسب افزایش دهید
	۲. اضافه نشدن اتانول به مخلوط لیزات سلولی • مراحل استخراج را با استفاده از نمونه جدید تکرار کنید.
	۳. استفاده از اتانول با درصد خلوص پایین • مراحل استخراج را با استفاده از اتانول 96-100% و نمونه جدید تکرار کنید. اطمینان داشته باشید که فقط از اتانول 96-100% استفاده می کنید. مصرف سایر الکل ها به دلیل داشتن ناخالصی اکیدا توصیه نمی شود.
	۴. استفاده از سایر الکل ها (ایزوپروپانول و ...) بجای اتانول مصرف سایر الکل ها اکیدا توصیه نمی شود زیرا باعث کاهش بازدهی فرآیند استخراج می شود.
	۵. دناتوراسیون ناقص پروتئین توسط بافر DBL • ذرات رسوبی در محلول DBL تشکیل شده است که پیش از مصرف به طور کامل طی انکوباسیون حل نشدند. ابتدا ذرات رسوبی موجود در محلول را با انکوباسیون حرارتی کاملا حل کنید و سپس پروتکل استخراج را با نمونه جدید تکرار نمایید.
	۶. حضور ذرات رسوبی در بافر DBL • بافر را در °C 50-60 انکوبه کنید تا ذرات رسوبی به طور کامل حل شوند و سپس واکنش را آغاز کنید.
	۷. ذوب و انجماد مکرر نمونه های مورد استفاده

از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها خودداری کنید و ترجیحا از نمونه های خون تازه یا یک بار ذوب شده استفاده نمایید.	
۸. میزان بسیار کم سلول در نمونه برخی از نمونه های خون ممکن است تراکم سلولی کمی داشته باشند. در این حالت، حجم نمونه را زیاد نموده و ستون را چندین بار با لیزات سلولی بارگیری کنید. حجم بافر شستشو را به حداقل برسانید.	
۱۰. لیز سلولی ناکارآمد یا ناکافی لیز ناکارآمد ممکن است به چندین دلیل باشد: - مخلوط شدن ناکامل نمونه خون با بافر DBL - پس از افزودن بافر DBL به نمونه خون، میکروتیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا مخلوط همگن به دست آید. - تراکم سلولی بالا در نمونه خون - حجم نمونه خون اولیه را کاهش دهید و یا حجم بافر DBL را دو برابر کنید. - داناتوراسیون آنزیم پروتئیناز K - پروتئیناز K برای حفظ فعالیت مناسب باید در دمای ۸-۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شود.	
۱۱. آماده سازی بافرهای DWE1 و DWE2 با استفاده از اتانول ۷۰% در آماده سازی بافرهای شستشو از مقادیر مناسب اتانول ۹۶-۱۰۰% استفاده کنید. مراحل استخراج را با نمونه جدید تکرار نمایید.	
۱۲. عدم استفاده از بافرهای DWE1 و DWE2 به ترتیب ارائه شده در پروتکل کیت - طبق پروتکل کیت، ابتدا بافر DWE1 و سپس DWE2 را در مراحل استخراج استفاده نمایید. - در صورت عدم رعایت ترتیب مصرف بافرهای شستشو، مراحل استخراج را با نمونه جدید تکرار نمایید.	
۱۳. استفاده از کیت فعالسازی شده (افزودن اتانول به DWE1 و DWE2) که به مدت طولانی نگهداری شده است. پس از افزودن اتانول به بافرهای شستشو و فعالسازی کیت، توصیه می شود حداکثر به مدت ۲-۱ ماه کیت را به طور کامل استفاده نمایید. کیت حاوی اتانول که به مدت طولانی (بیش از ۱ ماه) نگهداری شده باشد دارای بازدهی (DNA yield) کمتر است.	
۱۴. کافی نبودن زمان انکوباسیون Elution buffer زمان انکوباسیون بافر DEB را تا ۱۵ دقیقه افزایش دهید و یا مرحله Final elution دو بار تکرار شود.	
۱. آماده سازی نادرست بافرها به قسمت « مراحل آماده سازی بافرها » در همین دستورالعمل مصرف مراجعه کنید.	ب. عدم کارایی مطلوب DNA در واکنش های downstream
۲. عدم استفاده از بافرهای DWE1 و DWE2 به ترتیب ارائه شده در پروتکل مراحل کار را با نمونه جدید و با دقت بیشتر مطابق پروتکل کیت تکرار کنید.	
۳. غلظت بسیار کم و یا عدم وجود DNA در محلول نهایی (Final eluate) به قسمت الف همین جدول در بالا مراجعه کنید.	
۴. وجود آلودگی RNA به همراه DNA استخراج شده RNA ممکن است اثر مهاری بر واکنش های آنزیمی پایین دستی داشته باشد. مرحله تخریب RNA باید به درستی انجام گیرد. استفاده از ماده RNase A در استخراج DNA با توجه به نوع و حساسیت تست های پایین دستی، انتخابی می باشد که می توان از RNase A در مرحله لیز سلولی و یا بعد از مرحله Final elution استفاده نمود.	
۵. کاهش حساسیت در واکنش های downstream حداکثر حجم DNA الگو (eluate) را که برای PCR لازم است مشخص کنید. ترجیحا حجم کمتر با غلظت بیشتر DNA جهت انجام واکنش PCR استفاده نمایید.	
۱. قدیمی بودن نمونه یا ذخیره سازی نادرست نمونه ها	ج. تخریب DNA

• نمونه بیش از حد قدیمی یا ذخیره سازی نادرست نمونه منجر به شکستن قطعات DNA و تخریب آن می‌شود. از نمونه خون تازه استفاده کنید.	
د. شناور شدن DNA هنگام بارگذاری در ژل	۱. ممکن است اتانول مربوط به بافرهای شستشو در محلول نهایی DNA باقی مانده باشد • اطمینان حاصل کنید که مرحله شستشو با بافرهای DWE1 و DWE2 مطابق پروتکل انجام شود. غشای سیلیکایی ستون باید از طریق سانتریفیوژ مجدد کاملاً خشک شود.
ه. فیلتراسیون ناقص	۱. عبور ناقص لیزات سلولی از فیلتر غشایی ستون • مجدداً لیزات سلولی موجود در بالای ستون را با دور بالا به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید تا مخلوط لیز به طور کامل از فیلتر غشایی ستون عبور کند و به درون Collection tube زیرین انتقال یابد.
۲. مسدود شدن فیلتر ستون	• رسوب های ناشی از یخ زدگی (Cryoprecipitant) در پلاسما مشاهده می شود که ناشی از ذوب و انجماد مکرر پلاسماست. توصیه می شود از نمونه های پلاسمایی که بیش از یک بار ذوب و منجمد شده اند استفاده ننمایید.
۳. وقوع آلودگی های بین نمونه ای (Cross-contamination)	• به قسمت « نکات و نحوه کار با TritEx Spin Columns & Collection tube » در همین دستورالعمل مراجعه کنید.

۲.۸. کنترل کیفیت محصول (Quality control)

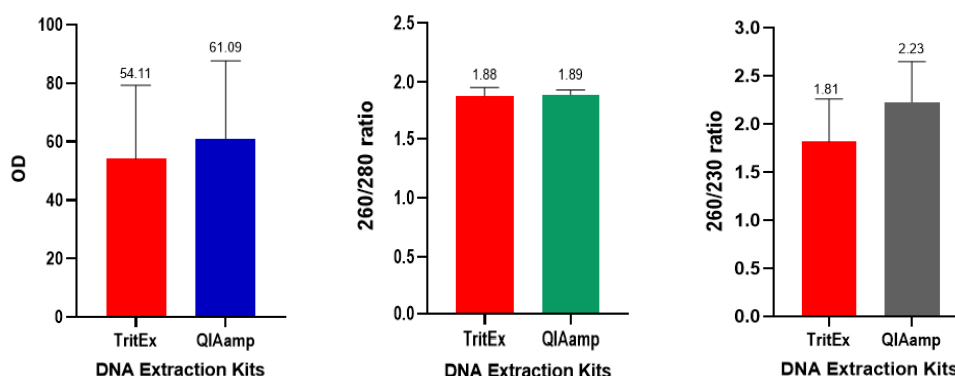
شرکت تریتاژن به منظور حفظ دائمی کیفیت محصولات، کلیه سری ساخت‌های محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit را بر اساس ضوابط و الزامات سیستم مدیریت کیفیت ISO 13485:2016 تولید نموده و مورد ارزیابی‌های کنترل کیفی قرار می‌دهد. کیفیت عملکرد و پایداری هر سری ساخت محصول (lot-to-lot) که به میزان بازده نهایی و خلوص DNA استخراج شده بستگی دارد، با روش‌های سنجش اسپکتروفتومتری، ژل الکتروفورز و واکنش مولکولی PCR سنجش و ارزیابی می‌شود. در صورت تأیید نتایج کنترل کیفی، محصولات هر لات قابل عرضه به مشتریان می‌باشد. در صورت لزوم، نتایج آزمایشات کنترل کیفی با ثبت درخواست و ارائه Cat No. و LOT No. محصول در قالب Certificate of Analysis (COA) قابل ارائه است.

۳.۸. گزارش ارزیابی عملکرد محصول (Performance evaluation)

۱.۳.۸. مطالعات مقایسه ای با کیت مرجع

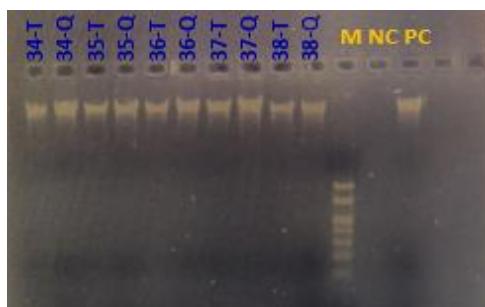
به منظور ارزیابی صحت و دقت عملکرد محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit، تعداد ۱۰۰ تست با نمونه‌های خون و شرایط یکسان به صورت موازی و مقایسه‌ای با کیت مشابه خارجی دارای نشان IVD انجام شد. کیت خارجی مشابه که به عنوان کیت مرجع جهت مطالعات مقایسه‌ای استفاده شد QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit محصول شرکت Qiagen آلمان است که دارای نشان IVD جهت استخراج DNA از خون می‌باشد و در آزمایشگاه‌های بالینی قابل استفاده است.

غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های یکسان با استفاده از هر دو کیت به ترتیب با روش‌های سنجش اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز تعیین شد. بررسی‌های آماری انجام شده روی نتایج به دست آمده از ۱۰۰ تست موازی انجام شده و مقایسه‌ی میانگین جذب نوری (OD) در نمونه‌های مشابه استخراج شده با کیت‌های TritEx و کیت مرجع با یکدیگر اختلاف معناداری نداشتند. علاوه بر این، میانگین نسبت 260/280 (میزان آلودگی DNA با پروتئین) در نمونه های استخراج شده با کیت TritEx برابر با ۱/۸۸ و در کیت مرجع برابر با ۱/۸۹ می باشد که هر دو مقدار قابل قبول است. همچنین میانگین نسبت 260/230 (میزان آلودگی DNA با نمک ها و ترکیبات آلی) در نمونه های استخراج شده با کیت TritEx برابر با ۱/۸۱ و در کیت مرجع برابر با ۲/۲۳ است که در کیت TritEx این عدد مناسب‌تر می‌باشد.



تصویر ۱. ارزیابی عملکرد کیت TritEx Blood DNA Extraction Kit با روش مطالعه مقایسه‌ای با کیت مشابه خارجی (QIAamp) به عنوان کیت مرجع (IVD). **A:** نمودار ستونی مقایسه‌ای میانگین جذب نوری یا غلظت DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)، مربوط به نمونه‌های استخراج شده با کیت TritEx و کیت مرجع. **B:** نمودار ستونی مقایسه‌ای میانگین نسبت 260/280، مربوط به نمونه‌های استخراج شده با کیت TritEx و کیت مرجع. **C:** نمودار ستونی مقایسه‌ای میانگین نسبت 260/230، مربوط به نمونه‌های استخراج شده با کیت TritEx و کیت مرجع.

علاوه بر این، جهت بررسی و مقایسه‌ی کیفیت DNAهای ژنومی استخراج شده از نمونه خون‌های یکسان با دو کیت TritEx و QIAamp ژل الکتروفورز انجام شد. به این منظور، آگارز ژل الکتروفورز با مقدار $2 \mu\text{l}$ از هر نمونه DNA استخراج شده با دو کیت به صورت موازی انجام شد. در این پروسه یک نمونه از DNAهای استخراج شده با کیت مرجع که دارای غلظت و کیفیت مناسب بود به عنوان کنترل مثبت و یک نمونه فاقد DNA عنوان کنترل منفی، به همراه مارکر 100 bp در هر ران کاری در کنار نمونه‌های مورد بررسی الکتروفورز شدند.

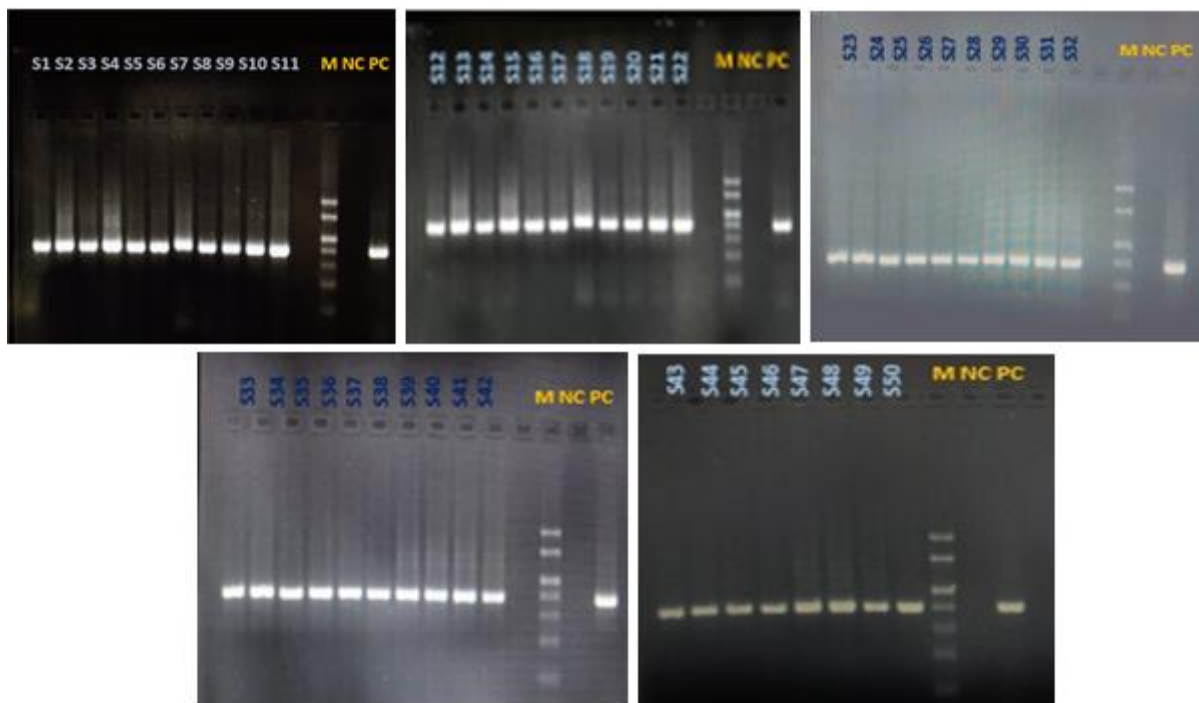


تصویر ۲. آنالیز مقایسه‌ای نمونه‌های DNA استخراج شده با کیت‌های TritEx و کیت مشابه خارجی (کیت مرجع) به صورت موازی با روش آگارز ژل الکتروفورز. از هر نمونه DNA استخراج شده با کیت TritEx (T) و کیت مرجع (Q) به میزان $2 \mu\text{l}$ روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. **T:** نمونه DNA استخراج شده با کیت TritEx؛ **Q:** نمونه DNA استخراج شده با کیت مرجع (شماره‌های یکسان T و Q، نشان‌دهنده‌ی DNA استخراج شده از نمونه‌های خون یکسان است). **M:** سایز مارکر 100-1000 bp. **NC:** کنترل منفی (فاقد نمونه خون). **PC:** کنترل مثبت (نمونه خون با کیفیت DNA قابل قبول).

۲،۳،۸. ارزیابی عملکرد در واکنش‌های پایین دستی (Downstream evaluation)

DNA ژنومی تخلیص شده در واکنش‌های پایین دستی (Downstream) شامل تست‌های تشخیصی (IVD) در آزمایشگاه‌های بالینی و تشخیص ژنتیک مورد استفاده است. میزان elution buffer مورد استفاده در تخلیص DNA و حجم نهایی DNA استخراج شده مورد استفاده در واکنش‌های پایین دستی بر کیفیت عملکرد واکنش‌ها تاثیرگذار است. به منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با کیت TritEx در واکنش‌های پایین دستی از روش PCR با پرایمر اختصاصی جهت تکثیر قطعه‌ی ژنی به طول 400 bp از ژنوم انسانی استفاده شد. تعداد ۵۰ نمونه‌ی متفاوت از خون انسان

جمع‌آوری شد و DNA آن‌ها با استفاده از کیت TritEx استخراج گردید. تست PCR با استفاده از ۵۰ نمونه DNA استخراج شده انجام شد و ژل الکتروفورز ۲ μl از هر یک از محصولات PCR و حضور باند 400 bp مؤید کیفیت مطلوب و میزان مناسب DNA استخراج شده با کیت TritEx است که به عنوان DNA الگو در انواع مختلفی از واکنش‌های مولکولی پایین دستی قابل استفاده می‌باشد.

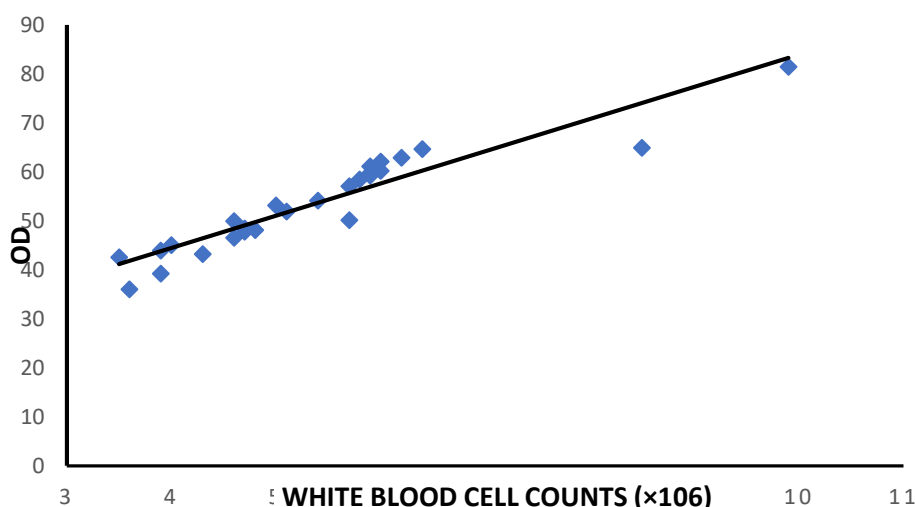


تصویر ۳. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با کیت TritEx® در واکنش‌های پایین دستی (Downstream evaluation). ژل الکتروفورز مقدار ۲ μl از هر یک از ۵۰ نمونه محصول PCR و حضور باند 400 bp روی ژل تأیید کننده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده با کیت TritEx® Blood DNA Extraction Kit می‌باشد. M: سایز مارکر 100-1000 bp. NC: کنترل منفی (محصول PCR فاقد DNA الگو). PC: کنترل مثبت (محصول PCR دارای قطعه‌ی ژنی 400 bp).

۳.۳.۸. سنجش میزان بازدهی DNA استخراج شده (Yield of purified DNA)

میزان بازدهی DNA از خون کامل به تعداد گلبول‌های سفید خون (WBCs و لوکوسیت‌ها) موجود در نمونه‌ی خون، روش استخراج DNA و حجم elution buffer نهایی بستگی دارد. تعداد گلبول‌های سفید در نمونه‌های خون افراد مختلف، متفاوت است و بسته به سن، جنسیت، وضعیت سلامت فرد (بیماری‌های عفونی و غیره) متغیر است.

به منظور تعیین محدوده‌ی بازدهی DNA در کیت TritEx® Blood DNA Extraction Kit، تعداد ۲۵۰ نمونه خون از ۲۷ گروه اهداکنندگان سالم تهیه شد که دارای شمارش گلبول سفید در گستره‌ی 1×10^7 - 4×10^6 cells/ml بودند. پس از استخراج DNA از نمونه‌های مذکور و تعیین جذب نوری (OD) با اسپکتروفتومتر، نمودار خطی استاندارد جذب نوری رسم شد. بررسی‌های آماری بر روی نتایج حاصل از کیت TritEx®، نشان داد میزان بازدهی DNA یا expected DNA yield در این کیت، بسته به کانت سلولی WBC نمونه‌های خون، معادل 3-3.5 μg می‌باشد.



تصویر ۴. نمودار خطی میزان بازدهی DNA با استفاده از TritEx® Blood DNA Extraction Kit. مطابق پروتکل کیت، میزان نمونه‌ی خون ورودی، ۲۵۰ µl و میزان Elution buffer نهایی ۶۰ µl می‌باشد. استخراج DNA از نمونه‌های خون اهداکنندگان سالم با کانت سلولی WBC محدودی $4 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/ml انجام شد. با توجه به مینیمم و ماکسیمم میانگین جذب نوری که نشانگر غلظت DNA استخراج شده (ng/µl) در ۶۰ µl محلول elution buffer نهایی است و همچنین آنالیز آماری نتایج حاصل، میزان بازدهی DNA یا expected DNA yield در کیت TritEx معادل ۳-۳.۵ µg بسته به کانت گلبول‌های سفید نمونه‌های خون تعیین شد.

۴.۳.۸. تکرارپذیری

تکرارپذیری (Repeatability)، اندازه‌گیری دقت در شرایط تکرار یک تست است که در آن نتایج آزمون‌های مستقل با یک پروتکل معین در یک آزمایشگاه توسط یک کاربر و با استفاده از تجهیزات یکسان در یک بازه‌ی زمانی مشخص به دست می‌آید. جهت انجام تست تکرارپذیری، از تعداد ۵ نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و ۲ سری ساخت (LOT) از محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌ها در شرایط یکسان آزمایشگاهی (در یک آزمایشگاه با شرایط کار، اپراتور و دستگاه یکسان) با استفاده از کیت TritEx انجام شد. تست‌ها در طی ۶ روز شامل روز صفر، روز ۳ و روز ۶ انجام گرفت و در هر یک از روزهای مذکور، هر نمونه ۴ بار با ۲ سری ساخت (LOT) مختلف استخراج DNA گردید. در مجموع، در ۳ روز آزمایش از هر نمونه ۱۲ مرتبه استخراج DNA انجام شد که مجموعاً ۶۰ تست انجام شد. بررسی‌های آماری نتایج نهایی، تایید کننده‌ی تکرارپذیری محصول (۹۹٪ >) می‌باشد.

۵.۳.۸. تجدیدپذیری

تجدیدپذیری (Reproducibility)، اندازه‌گیری دقت با روش اندازه‌گیری یکسان تحت شرایط متفاوت (اپراتور متفاوت، دستگاه‌های متفاوت، امکانات آزمایشگاهی متفاوت و شرایط کار متفاوت) می‌باشد. جهت بررسی تجدیدپذیری، مجموعاً تعداد ۵۳ واکنش استخراج DNA با استفاده از دو سری ساخت (LOT) محصول TritEx Blood DNA Extraction Kit و یک نمونه خون در ۲ مرکز آزمایشگاهی مختلف (شرایط مختلف، کاربران مختلف و دستگاه‌های متفاوت) انجام شد. آنالیز آماری نتایج دریافت شده از دو مرکز، تایید کننده‌ی تجدیدپذیری محصول به میزان ۹۷.۷٪ می‌باشد.

۴,۸. اطلاعات سفارش

Table 9: Ordering information		
TritEx® Blood DNA Extraction Kit		
Cat. No.	Size	Contents
TD-621.BL100	100 tests	Buffers (DBL, DWE1, DWE2, DEB) DPK (2 × 25 mg) DPK buffer (2 × 1.25 ml) TritEx® Spin Columns (100 pcs) TritEx® Collection tubes (110 Pcs) IFU
TD-621.BL50	50 tests	Buffers (DBL, DWE1, DWE2, DEB) DPK (25 mg) DPK buffer (1.25 ml) TritEx® Spin Columns (50 pcs) TritEx® Collection tubes (60 Pcs) IFU
TD-621.BL25	25 tests	Buffers (DBL, DWE1, DWE2, DEB) DPK (12.5 mg) DPK buffer (625 µl) TritEx® Spin Columns (25 pcs) TritEx® Collection tubes (30 Pcs) IFU

به منظور کسب اطلاعات بیشتر در مورد محصولات شرکت تریتاژن و یا دسترسی به نسخه الکترونیک بروشورها و دفترچه راهنمای استفاده محصولات به سایت شرکت به آدرس www.tritagene.com مراجعه کنید و یا با بخش پشتیبانی شرکت تماس حاصل فرمایید. اطلاعات تماس با شرکت در انتهای این دستورالعمل ارائه شده است.

۵,۸. پشتیبانی و خدمات پس از فروش

محصول TritEx® Blood DNA Extraction Kit توسط تیم علمی و تخصصی شرکت تولیدی تحقیقاتی تریتاژن زیست فناوری طراحی، تولید و پشتیبانی می شود. این محصول جهت استخراج ستونی DNA از خون انسان مورد ارزیابی عملکردی قرار گرفته است و در آزمایشگاه های بیولوژی مولکولی و ژنتیک قابل استفاده می باشد.

همه اجزای این محصول به طور کامل دارای گارانتی می باشد. قبل از خرید محصول، جهت کسب اطلاعات بیشتر در مورد ویژگی ها و اختصاصیت های عملکردی محصول به سایت شرکت مراجعه کنید و یا با واحد فروش شرکت تماس حاصل نمایید و بدین ترتیب با داشتن اطلاعات کامل و دقیق می توانید محصول مورد نظر خود را با اطمینان خاطر انتخاب کنید.

پس از خرید محصول، بخش پشتیبانی شرکت تریتاژن که متشکل از پژوهشگران و متخصصان کارآموزده می باشد آماده پاسخگویی به سوالات مشتریان در زمینه نحوه عملکرد و رفع مشکلات احتمالی حین استفاده از محصول می باشد. راه های ارتباط با پشتیبانی عبارتند از:

۱. تماس تلفنی با بخش پشتیبانی شرکت تریتاژن با شماره های ۰۲۱-۴۴۱۸۰۱۸۱ و ثبت سوالات یا درخواست ها
۲. مراجعه به بخش Contact us در سایت شرکت تریتاژن به آدرس www.tritagene.com
۳. ارسال سوالات و مشکلات مرتبط با عملکرد محصول به ایمیل بخش پشتیبانی شرکت به آدرس technicalsupport@tritagene.com

همچنین، در صورت عدم رضایت مشتری از محصول، چنانچه پس از بررسی مدارک تولید و نتایج کنترل کیفی توسط بخش فنی، برای مسئولین مربوطه در شرکت احراز شود که نقص گزارش شده، ناشی از روند تولید محصول است، محصول به صورت رایگان تعویض خواهد شد.

۶.۸. اطلاعات تماس

جهت دریافت مشاوره یا خرید محصول می توانید از طریق یکی از راههای ارتباطی زیر با شرکت تریتاژن تماس حاصل نمایید:

تلفن: ۰۲۱-۴۴۱۸۰۱۸۱-۲

وبسایت: www.tritagene.com

ایمیل ثبت سفارش: sales@tritagene.com

ایمیل پشتیبانی فنی: technicalsupport@tritagene.com

آدرس: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج (اتوبان شهید فهمیده)، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، شرکت تریتاژن زیست فناوری.



IFU Revision & Update Plan		
TritEx® Blood DNA Extraction Kit		
No.	IFU No.	Date of Rev.
1 st	V09.21	2021-09
2 nd	V06.22	2022-06

June 2022