TritaGene BIOTECH
Reality of Hi-Technology

FASTPURE®

Amniotic Fluid DNA Extraction Kit

Precipitation-based method

for DNA Extraction from Amniotic fluid Samples

Instructions For Use

Catalogue No.: FP-522.AF50; FP-522.AF100

REV **V07.22**

July 2022

فهرست

جدول نشانه های مورد استفاده روی برچسب

۱. ساختار محصول

۱,۱. محتویات کیت

۱,۲. مواد شیمیایی و وسایل جانبی موردنیاز

۲. شرح محصول

۱,۲. حیطه کاربرد

۲,۲. معرفی و اساس عملکرد محصول

۳,۲. ویژگی های فنی محصول

۳. شرایط نگهداری و انتقال محصول

۴. نکات ایمنی

۵. هشدارها و اقدامات احتیاطی

۶. پروتکل استفاده از محصول

۱,۶. مراحل آماده سازی نمونه و حجم ورودی بهینه

۱,۱,۶. آماده سازی نمونه‌های مایع آمنیوتیک

۲,۶. مراحل آماده سازی بافر AWB 2

۳,۶. نکات مهم پیش از شروع فرآیند استخراج DNA

۴,۶. پروتکل استخراج DNA

۷. محدودیت‌های استفاده از محصول

۸. پیوست ها

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

۲,۸. کنترل کیفیت محصول (Quality control)

۳,۸. اطلاعات سفارش

۴,۸. پشتیبانی و خدمات پس از فروش

۵,۸. اطلاعات تماس

جدول نشانه های مورد استفاده روی برچسب

Table 1. List of Important Symbols and Definitions.	
REF Catalogue Number	Keep in dry place.
LOT 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 FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit استفاده می‌کنند توصیه می‌شود پیش از استفاده از این محصول، همه بخش‌های این دستورالعمل راهنما به ویژه بخش « پروتکل استفاده از محصول» را با دقت مطالعه نمایند. همچنین، به منظور دریافت اطلاعات بیشتر در مورد محصول به وب‌سایت شرکت تریتاژن به آدرس www.tritagene.com مراجعه نمایید و یا با بخش پشتیانی فنی شرکت به شماره تلفن ۴۴۱۸۰۱۸۱-۰۲۱ تماس حاصل فرمایید. همکاران ما در شرکت تریتاژن همواره آماده پاسخگویی به سوالات شما در مورد نحوه استفاده از محصول می‌باشند.

۱. ساختار محصول

۱,۱. محتویات کیت

محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit، کیت استخراج DNA به روش رسوبی است. این محصول در ۲ مدل ۵۰ و ۱۰۰ تستی ارائه می‌شود که اجزای تشکیل دهنده‌ی آن برای هر مدل از محصول در جدول زیر ارائه شده است:

Table 2. Kit composition

FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit				
Cat No.		(FP-522.AF25)	(FP-522.AF50)	(FP-522.AF100)
No. of preparation		25 Preps	50 Preps	100 Preps
Reagent	**Description**	**Vol. (ml)**	**Vol. (ml)**	**Vol. (ml)**
ALS	Lysis buffer	8	15	30
APR	Precipitation buffer	10	20	40
AWB 1	Washing buffer 1	13	25	50
AWB 2 (Conc.)	Washing buffer 2	2	3	6
AHY	Rehydration buffer	3	5	10
IFU	Instructions For Use	1	1	1

۲,۱. مواد شیمیایی و وسایل جانبی موردنیاز

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

- سمپلر قابل تنظیم (۳ سایز)
- سرسمپلر فیلتردار استریل (۳ سایز)
- میکروتیوب استریل پلی‌پروپیلن (1.5 ml or 2 ml)
- رک میکروتیوب
- ورتکس-میکروفیوژ
- سانتریفیوژ رومیزی (مناسب برای میکروتیوب 1.5-2 ml)
- ترموبلاک یا بن ماری (دارای قابلیت تامین گستره دمایی 25-100 °C)
- یخچال (2-8 °C) و فریزر (-20 °C)
- دستگاه نانودراپ
- وسایل حفاظت شخصی (روپوش آزمایشگاهی، دستکش لاتکس بدون پودر و عینک محافظ)
- سطل دفع پسماند آزمایشگاهی (Safety box)
- اتانول ۱۰۰-۹۶ درصد

۲. شرح محصول

۱,۲. حیطه کاربرد (هدف)

محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit، جهت استخراج نوکلئیک اسید (DNA ژنومی) با روش رسوبی (Precipitation) از نمونه‌های مایع آمنیوتیک طراحی و تولید شده است.

۲,۲. معرفی و اساس عملکرد محصول

محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit، با هدف استخراج دستی سریع و آسان DNA ژنومی از نمونه‌های بیولوژیک انسانی شامل مایع آمنیوتیک طراحی و تولید شده است. استخراج DNA به روش رسوبی نسبت به سایر روش‌ها ارزان‌تر و به صرفه‌تر می‌باشد و در آن از مواد سمی مانند فنل کلروفرم و مواد گران قیمت مانند پروتئیناز K استفاده نمی‌شود. طراحی کیت مذکور براساس روش رسوب نوکلئیک اسید می‌باشد. ابتدا آماده سازی نمونه (رسوب‌گیری سلولی نمونه‌ها) انجام می‌شود. بافر لیزکننده (ALS) درون این کیت حاوی نمک کائوتروپیک می‌باشد که سلول‌های نمونه را لیز کرده و ساختار اجزا و پروتئین‌های سلولی را دناتوره می‌کند. آلودگی‌های ناشی از پروتئین‌های دناتوره شده و سایر ناخالصی‌ها با بافر رسوب‌دهنده (APR) رسوب داده می‌شوند و فقط نوکلئیک اسیدها در فاز مایع باقی می‌مانند. در مرحله بعد، جهت رسوب دادن DNA محلول در فاز مایع، شستشو با محلول‌های بافری مربوطه (AWB 1 & 2) انجام می‌گیرد و به این ترتیب، نمک‌های موجود حذف می‌شوند. سپس، با استفاده از یک بافر آبی (AHY)، DNA مجددا هیدراته شده و با خلوص و کیفیت بالا تخلیص می‌شود. DNA استخراج شده دارای نسبت A260/A280 در محدوده‌ی ۱/۷-۱/۹ و نسبت A260/A230 در محدوده‌ی ۱/۷-۲/۳ است که دارای خلوص لازم و کافی جهت استفاده مستقیم در واکنش‌های downstream و یا ذخیره سازی می‌باشد.

۳,۲. ویژگی های فنی محصول

در جدول زیر، مهم‌ترین ویژگی‌های فنی FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit، به طور خلاصه ارائه شده است:

Table 3. Kit Specifications at a glace

FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit	
Parameter	**Specifications**
Processing type	Manual kit- Centrifugation
Methodology	Precipitation-based method
Time/prep	< 30 min
Sample type	Amniotic fluid
Typical DNA yield	**4-14 µg** depending on the sample cell count
Typical DNA quality	Ratio A260 / A280 1.7–1.9 Ratio A260 / A230 1.7–2.3
Typical DNA concentration	**50-180 ng/µl**
Sample volume	Up to 2 ml
Elution volume	**80-100 µl/test**
Final eluate	Nucleic acid (DNA)
Downstream DNA application	PCR techniques; Enzymatic reactions Genome sequencing; Southern blotting, *etc.*

۳. شرایط نگهداری و انتقال محصول

- کلیه اجزای این محصول را در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) و شرایط خشک نگهداری نمایید. در این صورت، این محصول با حفظ کیفیت عملکرد به مدت ۱ سال تا تاریخ انقضای درج شده روی برچسب محصول پایدار می‌ماند.
- پس از افزودن اتانول 96-100 % به محلول AWB 2 و فعالسازی کیت، آن را در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری نموده و حداکثر تا مدت ۳ ماه به طور کامل مورد استفاده قرار دهید.
- پس از هر بار استفاده می‌بایستی در بطری‌ها محکم بسته شود تا از تبخیر و تغییرغلظت احتمالی محلول‌ها جلوگیری شود.
- شرایط انتقال محصول در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد و نیاز به اعمال زنجیره سرد نمی‌باشد. فقط بایستی دقت شود که حین انتقال محصول، جعبه و محتویات درون آن در حالت وارونه یا کج قرار نگیرند و یا جعبه محصول و محتویات درون آن دچار آسیب فیزیکی نشوند.

۴. نکات ایمنی

تعدادی از بافرهای محصول FastPure® Amniotic Fluid 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، می‌توانید به MSDS ماده شیمیایی 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 4. Safety instructions-Risk and safety phrases

FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit

Buffer Name	Hazardous contents	Risk & hazards	GHS Symbol	Precaution
ALS	*Chaotropic Salt	-Harmful if swallowed. Harmful in contact with skin -Causes severe skin burn and eye damage. -Harmful if inhaled. Harmful to aquatic life with long lasting effects.	 **Danger**	-Keep container tightly closed. -Do not breathe vapors. -Wash your hands thoroughly after handling. -Avoid release to the environment. -IF ON SKIN: Wash with plenty of water. -Dispose of contents in accordance with national regulation.
AWB 1	* Isopropanol	-Harmful if swallowed. -Flammable liquid and vapor. -Causes serious eye irritations. -May cause drowsiness or dizziness.	 **Warning**	-Keep container tightly closed. - Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. - Avoid breathing vapors. - Wash your hands thoroughly after handling. - IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor/…/if you feel unwell. - Rinse mouth. - Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.
AWB 2	* Ethanol (96-100 %)	-Harmful if swallowed. -Flammable liquid and vapour. -Causes serious eye irritations. -May cause drowsiness or dizziness.	 **Danger**	-Keep container tightly closed. - Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. - Avoid breathing vapors. - Wash your hands thoroughly after handling. - IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor/…/if you feel unwell. - Rinse mouth. - Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.

* 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

توصیه می‌شود کاربران محصول به موارد زیر توجه لازم را داشته باشند:

۱. پس از دریافت کیت و پیش از استفاده‌ی محصول، از صحت محتویات کیت و تعداد بافرها اطمینان حاصل کنید و درصورت مشاهده هرگونه نقص یا آسیب فیزیکی در محصول یا جعبه آن، از محصول استفاده نکنید و بلافاصله 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، نکات بهداشتی و ایمنی را رعایت فرمایید. حین استفاده از محصول از خوردن و آشامیدن و هر گونه عملی که با لمس اجزای صورت همراه باشد خودداری نمایید و از دستکش لاتکس، روپوش آزمایشگاه و عینک محافظ استفاده نمایید. پس از اتمام کار، دست هایتان را با مواد شوینده بهداشتی به طور کامل بشویید.

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

۴. از افزودن سدیم هیپوکلریت یا محلول های اسیدی به بافرهای کیت، نمونه های لیزشده‌ی درون بافر لیزکننده و پسماندهای آن جدا خودداری نمایید، زیرا منجر به تولید ترکیبات سمی واکنش‌گر (فعال) می‌شود. 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% ضدعفونی 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 نشت می‌کنند، هنگام دور انداختن تیوب‌ها از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.

۶. چنانچه زمان از تاریخ انقضای کیت گذشته باشد، از کیت استفاده نکنید و محلول‌های باقیمانده را مطابق الزامات ملی و بین المللی امحا نمایید.

۷. کلیه نمونه های بیولوژیک، پسماندها و مایعات حاصل از مصرف کیت مانند لیزات سلولی که حاوی بافر لیز دناتوره کننده هستند باید در دسته مواد عفونی در نظر گرفته شوند و توصیه می‌شود که جهت کاهش آلودگی‌های احتمالی حین کار، در صورت امکان از هود لامینار استفاده نمایید و در صورت اقدام به امحای آنها، مطابق دستورالعمل‌های مدیریت پسماند آزمایشگاهی و الزامات GMP امحا شوند.

۸. کلیه نمونه‌های مثبت DNA استخراج شده (محصول PCR، کنترل‌ها یا سایر نمونه‌های DNA) را از محلول‌های کیت دور نگه دارید و فضای استخراج DNA را از فضای واکنش‌های Downstream جدا کنید.

۹. جریان کار در آزمایشگاه بایستی یک طرفه باشد؛ به طوری که از بخش استخراج شروع شده و سپس به بخش تکثیر DNA یا PCR و در مرحله بعد بخش شناسایی با الکتروفورز ادامه یابد. در هر یک از بخش‌ها ار مواد، وسایل و دستگاه‌های ویژه‌ی همان قسمت استفاده شود و به هیچ عنوان این وسایل بین بخش‌های نامبرده جابجا نشود.

۶. پروتکل استفاده از محصول

۱,۶. مراحل آماده سازی نمونه و حجم ورودی بهینه

محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit، جهت استخراج رسوبی DNA از نمونه مایع آمنیوتیک کاربرد دارد. پارامترهایی نظیر کانت (شمارش) سلولی نمونه، شرایط نگهداری نمونه و مهارت آزمایشگاهی کاربر بر میزان DNA نهایی رسوب یافته و میزان بازدهی کیت اثرگذار است. به طور معمول، میزان بازدهی استخراج DNA در این کیت، با استفاده از ۲ میلی لیتر نمونه انسانی، حدود 4-14 µg، بسته به کانت سلولی نمونه‌ی مورد استفاده می‌باشد. روش آماده‌سازی نمونه‌های قابل استخراج با استفاده از این کیت در ادامه شرح داده شده است:

۱،۱،۶. آماده سازی نمونه‌های مایع آمنیوتیک

۱. در این کیت، نمونه بیولوژیک ورودی به میزان 2 ml برای نمونه‌های مایع آمنیوتیک بهینه سازی شده است. جهت آماده‌سازی نمونه، به میزان 2 ml مایع آمنیوتیک را به میکروتیوب 2 ml تمیز انتقال دهید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ کنید.
۲. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را به آرامی و به طور کامل خارج کنید و به رسوب آن 200 µl محلول PBS یا سرم فیزیولوژی اضافه کنید. در این مرحله سلول‌ها آماده استخراج هستند.

توجه:

- *دقت شود که در این مرحله بایستی مایع رویی به صورت کامل خارج شود و سپس رسوب سلولی در 200 µl محلول PBS حل شود. توجه داشته باشید که جهت دستیابی به بازدهی حداکثری در این کیت، حجم نمونه ورودی آماده‌سازی شده برای استخراج DNA باید حداکثر 200 µl باشد.*
- *پس از آماده‌سازی سلول‌ها، استخراج DNA را از مرحله شماره ۳ پروتکل استخراج ادامه دهید.*

۲،۶. مراحل آماده سازی بافر AWB 2

محلول AWB 2 به صورت غلیظ (Concentrate) آماده سازی شده‌اند. لازم است پیش از شروع فرآیند استخراج، به هر یک از بافرها مطابق جدول زیر، حجم مشخصی از اتانول 100-96% افزوده و سپس به شدت تیوب بافرها تکان داده شود تا در نهایت بافر همگن شده و آماده‌ی مصرف شود. این محلول بافری به مدت ۱ سال (فقط تا پایان تاریخ انقضای کیت) در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) قابل نگهداری است.

توجه:

- *در پایان این مرحله، جهت جلوگیری از خطای احتمالی در نوبت های بعدی مصرف کیت، بر روی برچسب بافر مذکور علامت بزنید تا از اضافه شدن اتانول به آن اطمینان داشته باشید.*
- *بافرهای AWB 1 و AWB 2 حاوی مواد شیمیایی خطرناک است (جدول۵). هنگام آماده سازی و استفاده، نکات ایمنی را رعایت نموده و از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.*
- *همیشه قبل از استفاده از بافر شستشو، تیوب آن را چندین بار سر و ته کنید و به طور کامل تکان دهید تا یکنواخت شود.*
- *جدول زیر مقادیر اتانول لازم را برای آماده سازی بافر شستشو در کیت ۵۰ و ۱۰۰ تستی نشان می‌دهد. برای هر تعداد تست نیز با همین تناسب می‌توان Wash buffer 2 را آماده نمود.*

Table 5. Preparation of wash buffer 2 (AWB 2)

FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit		
	AWB 2	
Kit Size	**50 tests**	**100 tests**
Conc. Vol.	3 ml	6 ml
Ethanol (96-100 %)	7.5 ml	15 ml
Final Vol.	10.5	21 ml

* Mix well to have homogenous working solution.
* Mark the labels on the bottles to ensure addition of ethanol.

۳،۶. نکات مهم پیش از شروع فرآیند استخراج DNA

- 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 نمونه‌های بیولوژیک مورد نظر به دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) برسد.
- قبل از شروع کار از صحت آماده‌سازی بافرها براساس پروتوکل اطمینان حاصل نمایید.

- قبل از شروع کار، دستگاه ترموبلاک را به دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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)، 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 بافر AWB 2 اطمینان حاصل کنید و سپس، برچسب روی بطری بافر را در قسمت اختصاصی علامت گذاری کنید.
- در صورت مشاهده رسوب در بافر لیزکننده، حتما قبل از شروع کار آن را در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد حداکثر تا حل شدن کامل رسوب انکوبه کنید تا دوباره محلول یکنواختی حاصل شود.
- در مراحلی که نیاز به سانتریفیوژ می باشد، سانتریفیوژ کردن در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) انجام شود.
- ترجیحا از سرسمپلر فیلتردار استریل استفاده کنید و در هر بار انتقال محلول‌ها سرسمپلر را تعویض نمایید.

۴,۶. پروتکل استخراج DNA

پس از تکمیل آماده سازی بافرها، مراحل استخراج DNA به صورت زیر انجام می شود:

۱. از نمونه بیولوژیک (مایع آمنیوتیک) به میزان 2 ml در میکروتیوب ریخته شود و به مدت ۱۵ دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ کنید.

۲. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را خارج کنید و به رسوب آن 200 µl محلول PBS یا سرم فیزیولوژی اضافه کنید.

توجه:

- *در این مرحله بایستی دقت شود که مایع رویی به صورت کامل خارج شود.*
- *در این مرحله اگر مشاهده شد که میزان رسوب سلولی ایجاد شده در ته میکروتیوب کم است یا رسوبی مشاهده نشد، می‌توان مرحله رسوب‌گیری را دوبار تکرار کرد.*
- *قبل از سانتریفیوژ، درب میکروتیوب ها را محکم ببندید تا از آلودگی بین نمونه‌ها جلوگیری شود.*

۳. به میزان 300 µl محلول لیز کننده ALS را به میکروتیوب اضافه کنید و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس کنید. میکروتیوب را به طور مختصر میکروفیوژ کنید تا قطرات داخل درب میکروتیوب در ته آن جمع‌آوری شوند.

توجه: *توصیه می‌شود جهت لیز کامل سلولی، مدت زمان ورتکس به طور دقیق رعایت شود.*

۴. میکروتیوب را در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید میکروتیوب را به طور مختصر میکروفیوژ کنید تا قطرات داخل درب میکروتیوب در ته آن جمع‌آوری شوند.

توجه: *زمان انکوباسیون را تا ۳۰ دقیقه می‌توان افزایش داد.*

۵. به میزان 400 µl محلول رسوب دهنده APR به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید.

۶. پس از آن میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ کنید و سپس،مایع رویی را به آرامی و با سمپلر به یک میکروتیوب تمیز منتقل کنید.

توجه: *بایستی دقت شود که در هنگام خارج کردن مایع از میکروتیوب، سرسمپلر با رسوب ته میکروتیوب برخورد نکند.*

۷. به میزان 500 µl از بافر شستشو AWB 1 به میکروتیوب اضافه کنید، چندین مرتبه (۱۰ تا ۲۰ بار) میکروتیوب را به صورت Up & Down تکان دهید و سپس، به مدت ۵ دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ نموده و پس از سانتریفیوژ مایع رویی را به آهستگی خارج کنید.

توجه:

- *توجه شود که تکان دادن و خروج مایع با شدت، باعث از دست دادن DNA خواهد شد.*
- *برای حفظ مقدار و کیفیت DNA استخراج شده، بهتر است مایع رویی با سمپلر و به آرامی خارج شود و برای هر نمونه از سرسمپلر جداگانه استفاده شود و دقت شود که در هنگام خارج کردن مایع از میکروتیوب، سرسمپلر با رسوب ته میکروتیوب برخورد نکند.*

۸. به میزان 200 µl از محلول AWB 2 به میکروتیوب اضافه کنید و برای شسته شدن رسوب، ۲۰ مرتبه، میکروتیوب را به صورت Up & Down تکان دهید.

توجه: *برای جلوگیری از تخریب و شکسته شدن DNA از ورتکس کردن میکروتیوب اکیدا خودداری شود.*

۹. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ کنید و سپس، مایع رویی را به آرامی خارج کنید.

توجه: *برای حفظ مقدار و کیفیت DNA استخراج شده، بهتر است مایع رویی با سمپلر و به آرامی خارج شود و برای هر نمونه از سرسمپلر جداگانه استفاده شود. همچنین دقت شود که در هنگام خارج کردن مایع از میکروتیوب، سرسمپلر با رسوب ته میکروتیوب برخورد نکند.*

۱۰. پس از آن میکروتیوب را با درب باز، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه کنید.

توجه: *توجه داشته باشید که میکروتیوب ها در این مرحله بایستی کاملا خشک شوند.*

۱۱. در انتها از بافر AHY، به میزان 80 µl به میکروتیوب اضافه کنید و پس از آن به میکروتیوب ضربه بزنید (Tapping). سپس، میکروتیوب را در این مرحله به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه کنید.

۱۲. میکروتیوب حاوی DNA استخراج شده را به مدت ۳ تا ۵ ثانیه میکروفیوژ (اسپین) کنید و پس از آن به فریزر ۲۰°C- درجه انتقال دهید.
(اسید نوکئیک استخراج شده را در دمای 2-8 °C ، یک هفته می‌توان نگهداری کرد.)

توجه:

- *برای حل شدن بهتر DNA پیشنهاد می شود بافر AHY را قبل از اضافه شدن به میکروتیوب حاوی DNA در ترموبلاک به دمای ۶۵ درجه سانتی گراد برسانید.*
- *مقدار نهایی بافر AHY را می توان تا 100 µl نیز افزایش داد.*
- *در مرحله آخر می توان به جای اسپین کردن، میکروتیوب را به مدت ۱ دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ کرد.*

۷. محدودیت های استفاده از محصول:

- هنگام استفاده از محصول می‌بایست به تاریخ انقضای نوشته شده روی لیبل جعبه توجه شود و چنانچه از تاریخ انقضای آن گذشته باشد استفاده نشود.
- از مصرف همزمان بافرهای مختلف که مربوط به کیت هایی با شماره لات های متفاوت هستند خودداری شود.
- در صورتی که شرایط حمل و نقل یا انبارش کیت مطابق با الزامات ثبت شده در دفترچه راهنمای محصول رعایت نشد از کیت استفاده ننمایید.
- این کیت صرفا جهت استخراج DNA از نمونه های مایع آمنیوتیک صحه‌گذاری شده است و نبایستی از آن برای سایر نمونه های بیولوژیک استفاده نمود.
- توصیه می‌شود که کاربران کیت، اطلاعات و تجربه کافی در زمینه استخراج نوکلئیک اسید و تکنیک‌های PCR داشته باشند.

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. رایج‌ترین 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 تریتاژن نیز همواره آمادگی لازم را جهت پاسخ گویی به سوالات علمی و فنی کاربران محصول دارد. برای کسب اطلاعات بیشتر و یا راه‌های تماس به سایت شرکت به آدرس www.tritagene.com مراجعه فرمایید.

Table 6. Troubleshooting guide (FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit)

علایم و مشکلات	علت و راه حل پیشنهادی
الف. غلظت بسیار کم DNA عدم وجود DNA	**۱. از دست دادن رسوب اسید نوکئیک** • در مراحل شست و شو، مایع رویی به آرامی و ترجیحا با سمپلر تخلیه شود تا اسید نوکئیک خارج نشود.
	۲. حل نشدن کامل رسوب DNA • از حل شدن یکدست و کامل رسوب ها مطمئن شوید.
	۳. تعداد کم سلول در نمونه مورد استفاده • تعداد کم سلول به مراحل نمونه گیری بستگی دارد. جهت رفع حدودی این مشکل می‌توان مرحله رسوب گیری از نمونه را دو بار تکرار کرد.
	۴. 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
	۵. تخریب اسید نوکئیک استخراج شده • از ظروف و وسائل پلاستیکی DNase free استفاده شود.
	۶. استفاده از اتانول با درصد خلوص پایین مراحل استخراج را با استفاده از اتانول 100-96% 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 نمی‌شود.
	۷. حضور ذرات رسوبی در بافر Lysis یا ALS • بافر را در 50-60 °C انکوبه کنید تا ذرات رسوبی به طور کامل حل شوند و سپس واکنش را آغاز کنید.
	۸. ذوب و انجماد مکرر نمونه های مورد استفاده • از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها خودداری کنید و ترجیحا از نمونه های تازه استفاده نمایید.
	۹. لیز سلولی ناکارآمد یا ناکافی لیز ناکارآمد ممکن است به چندین دلیل باشد: • مخلوط شدن ناقص نمونه با بافرLysis یا ALS پس از افزودن بافر Lysis به نمونه ، میکروتیوب را به خوبی ورتکس نمایید تا مخلوط همگن به دست آید. • تراکم سلولی بالا در نمونه حجم نمونه اولیه را کاهش دهید و یا حجم بافر Lysis را دو برابر کنید.
	۱۰. آماده سازی بافرهای AWB 2 با استفاده از اتانول 70% • در آماده سازی بافرهای شستشو از مقادیر مناسب اتانول 100-96% استفاده کنید. مراحل استخراج را با نمونه جدید تکرار نمایید.
	۱۱. عدم استفاده از بافرهای AWB 1 و AWB 2 به ترتیب ارائه شده در پروتکل کیت • طبق پروتکل کیت، ابتدا بافر AWB 1 و سپس AWB 2 را در مراحل استخراج استفاده نمایید. • در صورت عدم رعایت ترتیب مصرف بافرهای شستشو، مراحل استخراج را با نمونه جدید تکرار نمایید.
ب. عدم کارایی مطلوب DNA در واکنش های downstream	**۱. آماده سازی نادرست بافرها** • به قسمت « مراحل آماده‌سازی بافرها » در همین دستورالعمل مصرف مراجعه کنید.
	۲. عدم استفاده از بافرهای AWB 1 و AWB 2 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 واکنش‌های 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 تست‌های پایین دستی، انتخابی می‌باشد که می‌توان از RNase A در مرحله لیز سلولی و یا بعد از مرحله Final elution استفاده نمود.
	۵. کاهش حساسیت در واکنش‌های 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.
ج. کیفیت پایین DNA (تخریب DNA)	**۱. قدیمی بودن نمونه یا ذخیره‌سازی نادرست نمونه‌ها** • ترجیحا از نمونه تازه استفاده کنید.
	۲. حل نشدن کامل رسوب DNA • از حل شدن یکدست و کامل رسوب ها مطمئن شوید.
د. بروز نتایج مثبت کاذب در واکنش های downstream	**۱. آلودگی نمونه های مختلف با هم در حین استخراج** • در انجام تست دقت شود نمونه ها با هم مخلوط نشوند و درب میکروتیوب ها طی مراحل استخراج بسته باشند. • بافرهای کیت را از لبه بطری به (میکرو)تیوب‌ها انتقال ندهید و حتما برای انتقال بافرها از (سر)سمپلر با حجم مناسب استفاده کنید. • در هر بار انتقال مایعات حین انجام مراحل استخراج، حتما سرسمپلر را تعویض نمایید. از یک سرسمپلر ۲ بار استفاده نشود. **۲. آلوده شدن بافرها حین انجام مراحل مختلف تست** • استخراج بایستی از ابتدا مجدد تکرار شود **۳. آلودگی محل انجام استخراج باDNA یا محصولات PCR** • تمیز کردن سطوح با شوینده‌های آبی ضروری است • دستگاه‌های مورد استفاده با شوینده‌های آبی مناسب تمیز شوند. • میکروتیوب‌ها و سرسمپلرهای اتوکلاوشده جایگزین شود. • شستشوی روپوش های آزمایشگاهی و عدم استفاده از آنها در مناطق مختلف آزمایشگاه و یا استفاده از پوشاک آزمایشگاهی جدید. • تماس با شرکت تولیدکننده جهت دریافت راهنمایی و مشاوره بیشتر
ه. بروز نتایج منفی کاذب در واکنش های downstream	**۱. تخریب نوکلئیک اسید موجود در نمونه** • از نمونه جدید استفاده کنید • ذخیره‌سازی نمونه‌ها را در شرایط مناسب انجام دهید.
	۲. از دست رفتن پلت رسوبی نوکلئیک اسید • بافر شستشو را با احتیاط با سمپلر خارج کنید به طوری که به پلت رسوبی نوکلئیک اسید آسیبی وارد نشود.
	۳. تخریب نوکلئیک اسید استخراج شده • از وسایل پلاستیکی (میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها) فاقد DNase و RNase استفاده نمایید.

۲,۸. کنترل کیفیت محصول (Quality control)

شرکت تریتاژن به منظور حفظ دائمی کیفیت محصولات، کلیه سری ساخت‌های محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit را بر اساس ضوابط و الزامات سیستم مدیریت کیفیت ISO 9001:2015 و 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 سری ساخت 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. اطلاعات سفارش

Table 7: Ordering information		
FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit		
Cat. No.	**Size**	**Contents**
FP-522.AF100	100 tests	Buffers (ALS, APR, AWB 1, AWB 2, AHY) IFU
FP-522.AF50	50 tests	Buffers (ALS, APR, AWB 1, AWB 2, AHY) IFU
FP-522.AF25	25 tests	Buffers (ALS, APR, AWB 1, AWB 2, AHY) 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.

۴,۸. پشتیبانی و خدمات پس از فروش

محصول FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit توسط تیم علمی و تخصصی شرکت تولیدی تحقیقاتی تریتاژن زیست فناور طراحی، تولید و پشیبانی می شود. این محصول جهت استخراج DNA از نمونه‌های مایع آمنیوتیک مورد ارزیابی عملکردی قرار گرفته است و قابل استفاده در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی و ژنتیک می‌باشد.

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 می‌توانید محصول موردنظر خود را با اطمینان خاطر انتخاب کنید.

توصیه می شود پس از خرید محصول، ابتدا دستورالعمل استفاده از محصول (همراه با محصول یا قابل دریافت از وب‌سایت شرکت) را به صورت کامل و دقیق مطالعه نمایید و سپس، اقدام به استفاده از محصول کنید. علاوه بر این، بخش پشتیبانی فنی شرکت تریتاژن نیز همواره آماده پاسخگویی به سوالات علمی و فنی مشتریان در زمینه نحوه عملکرد و رفع مشکلات احتمالی حین استفاده از محصول می‌باشد. جهت ارتباط با بخش فنی تریتاژن به اطلاعات تماس در انتهای این دستورالعمل مراجعه نمایید.

لازم به ذکر است در صورت عدم رضایت مشتری از محصول و اعلام نقص، شرکت مستندات تولید و نتایج کنترل کیفی آن سری ساخت مورد بررسی قرار خواهد گرفت. چنانچه ضمن بررسی، این نکته برای مسئولین مربوطه در شرکت تریتاژن احراز شود که نقص گزارش شده، ناشی از روند تولید و کنترل کیفی محصول است، محصول به صورت رایگان تعویض خواهد شد. در غیر این صورت، شرکت نسبت به نقص یا آسیب های نامشخص وارد شده به محصول هیچ گونه مسئولیتی عهده دار نمی‌باشد.

۵,۸. اطلاعات تماس

جهت دریافت مشاوره، ثبت سفارش و یا دریافت پشتیبانی فنی می توانید با یکی از راه‌های ارتباطی زیر با شرکت تریتاژن تماس حاصل نمایید:

تلفن: ۲-۴۴۱۸۰۱۸۱-۰۲۱

وب‌سایت: www.tritagene.com

آدرس ایمیل: tritagene@gmail.com و info@tritagene.com

آدرس: تهران، اتوبان حکیم (همدانی)، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، شرکت تولیدی تحقیقاتی تریتاژن زیست فناور

TritaGene BIOTECH
Reality of Hi-Technology

IFU Revision & Update Plan		
FastPure® Amniotic Fluid DNA Extraction Kit		
No.	**IFU No.**	**Date of Rev.**
1st	V07.22	2022-07

July 2022