



Sử dụng trong chẩn đoán Invitro

Bảo quản các thành phần như mô tả ở mục 2

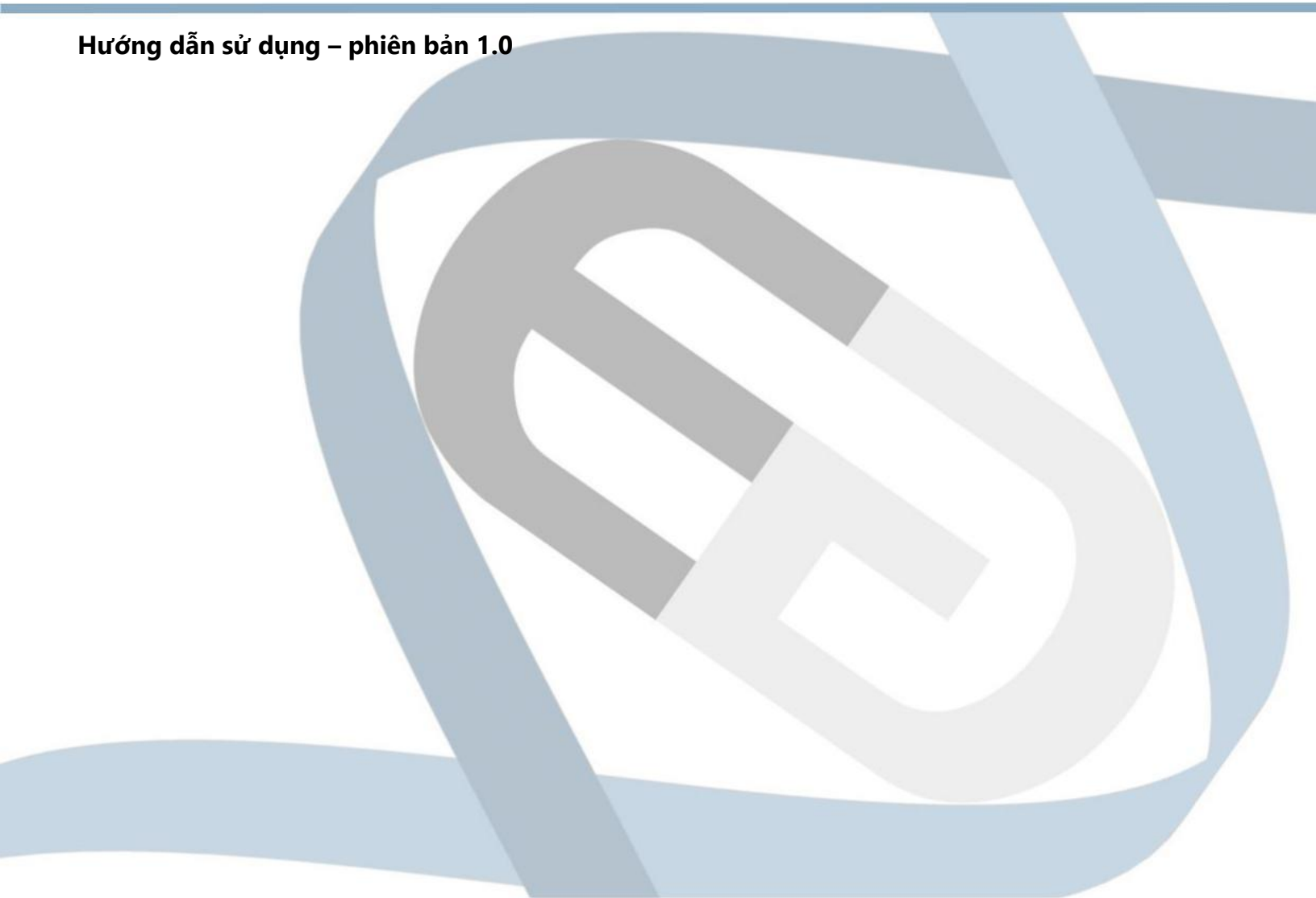
REF

CFDNA-50

pureNA™ Cell-Free DNA Isolation Kit

Kit dùng để tách chiết cell-free DNA từ các mẫu huyết tương

Hướng dẫn sử dụng – phiên bản 1.0



Nội dung

Nội dung	2
1. Mục đích sử dụng	3
2. Thuốc thử	4
2.1 Thành phần đóng gói	4
2.2 Thao tác và bảo quản	4
2.3 Độ ổn định sản phẩm	4
2.4 Quản lý chất lượng	4
2.5 Cảnh báo và phòng ngừa	4
3. Thuốc thử và thiết bị yêu cầu	5
3.1 Thuốc thử	5
3.2 Thiết bị	5
4. Hướng dẫn sử dụng	6
4.1 Các lưu ý quan trọng	6
4.2 Trước khi bắt đầu sử dụng	6
4.3 Tách chiết DNA	6
5. Lịch sử sửa đổi	9
6. Ký hiệu sử dụng	10
7. Thông báo với Khách hàng	11
7.1 Thời hạn bảo hành	11
7.2 Giới hạn bảo hành	11
7.3 Sở hữu trí tuệ	11
8. Thông tin liên hệ	12

1. Mục đích sử dụng

Bộ kit pureNA™ Cell-Free DNA Isolation kit tách chiết DNA tự do ngoại bào (cfDNA) từ các mẫu huyết tương. Bộ kit các hạt từ có kích thước chọn lọc từ để bắt được các đoạn DNA kích thước 100 bp – 500 bp nhằm hạn chế tối đa sự tạp nhiễm các DNA có khối lượng phân tử lớn trong tách chiết cfDNA. DNA tách chiết từ bộ kit này phù hợp cho PCR, qPCR, giải trình tự thế hệ mới (NGS) và các ứng dụng khác.

Cảnh báo: Khách hàng sử dụng bộ kit này cần làm theo hướng dẫn, sử dụng các thuốc thử tương thích được khuyến cáo. Bất kỳ việc sử dụng các thuốc thử mất nhãn hoặc/ và sửa đổi các thành phần cũng đều sẽ làm mất trách nhiệm pháp lý của EntroGen.

2. Thuốc thử

2.1 Thành phần đóng gói

Sản phẩm bao gồm tất cả các thuốc thử cần thiết cho tách chiết cfDNA từ các mẫu huyết tương người. Các vật liệu sau đây đủ cho 50 mẫu tách chiết bao gồm cả các đối chứng và mẫu:

Trong bộ kit CFDNA-50:

Tên	Số lượng ống	Thể tích mỗi ống	Bảo quản
cfDNA Lysis/Binding Buffer	2	60 ml	Bảo quản ở 4°C sau khi thêm EtOH
cfDNA Wash Buffer	2	55 ml	Bảo quản ở 4°C sau khi thêm EtOH
Elution Buffer	2	1000 µl	Nhiệt độ phòng
Magnetic Beads	2	1000 µl	Nhiệt độ phòng

2.2 Thao tác và bảo quản

Sản phẩm được vận chuyển ở nhiệt độ phòng. Các thành phần của lô hàng nên được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.3 Độ ổn định sản phẩm

Thời hạn sử dụng của sản phẩm này là một năm kể từ ngày nhận trong điều kiện bảo quản thích hợp.

Khi EtOH được thêm vào Lysis/ Binding Buffer và Wash Buffer, chúng sẽ ổn định đến một năm khi được lưu trữ ở 4°C. Hãy chắc chắn đóng chai thật chặt để lưu trữ lâu dài.

2.4 Quản lý chất lượng

Các thành phần của sản phẩm này đã được kiểm tra độ tinh khiết và hiệu quả.

2.5 Cảnh báo và phòng ngừa

Phản ứng khuếch đại PCR cực kỳ nhạy với nhiễm chéo. Cần quan trọng việc tiến hành tách chiết DNA và các bước tiền khuếch đại khác trong các khu vực riêng biệt, các phòng riêng biệt lý tưởng cần có hệ thống thông gió riêng biệt.

Các biện pháp phòng ngừa bổ sung cần thiết khi xử lý DNA để tránh nhiễm bẩn giữa các mẫu/ thuốc thử:

- Lau sạch khu vực làm việc, các pipet và thiết bị được sử dụng trong khu vực làm việc bằng chất khử nhiễm bề mặt (chất tẩy 20% hoặc tương đương) để loại bỏ DNA và DNase, tiếp theo là sử dụng ethanol 70%.
- Vortex mỗi ống trước khi sử dụng.
- Ly tâm nhanh tất cả các ống trước khi mở nắp.
- Mở từng ống và chai cẩn thận sau khi xoáy/ trộn và tránh chạm vào bên trong nắp. Sử dụng các đầu côn ngăn không khí (có lọc) cho tất cả các bước trộn để tránh nhiễm chéo.
- Thay đổi đầu côn pipet giữa tất cả các lần chuyển chất lỏng. Luôn đeo găng tay khi thao tác với DNA/ thuốc thử.

3. Thuốc thử và thiết bị yêu cầu

3.1 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử cần thiết để tách chiết cfDNA từ các mẫu huyết tương người đều được cung cấp.

Quy trình này yêu cầu sử dụng EtOH 100% mới, Proteinase K 20mg/mL* và SDS 20%*. Proteinase K từ Qiagen (Cat. No: 19133) và SDS 20% từ VWR (Cat. no.: 97062-440) được khuyến nghị.

* Chỉ cần thiết nếu sử dụng huyết tương từ máu thu trong ống bảo quản Streck Cell-free BCT.

3.2 Thiết bị

Thiết bị yêu cầu cho tách chiết các mẫu cfDNA với bộ kit là:

- Pipet
- Vortex-Genie 2 hoặc máy vortex tương tự
- Giá từ cho sinh học phân tử (ví dụ DynaMag™-15 hoặc DynaMag™-2)
- Các ống Eppendorf 1.5ml, 2mL, và 15mL đã khử trùng, không dính

4. Hướng dẫn sử dụng

4.1 Các lưu ý quan trọng

Mẫu đầu vào: Huyết tương tươi và đông lạnh từ máu thu trong ống EDTA, ống bảo quản chứa Streck Cell-Free DNA BCT, và Acid Dextrose có thể sử dụng với quy trình tách chiết Cell-Free DNA. Huyết tương mới thu, tuy vậy, sẽ cho hiệu suất cao hơn. Hàm lượng lipid và các thành phần tạp nhiễm ức chế tồn tại trong huyết tương có ảnh hưởng đến các ứng dụng liên quan tới PCR hạ nguồn. Huyết tương được khuyến nghị là nên ly tâm 2 lần ở mức 16.000xg trong 10 phút để giảm lượng tạp chất lipid trong cfDNA tách chiết.

Định lượng: Nồng độ tách chiết sẽ thu được là 1-100ng cell-free DNA cho mỗi ml huyết tương. Do đó, định lượng bằng phép đo độ hấp thụ (ví dụ Nanodrop) có thể không đủ nhạy để xác định chính xác nồng độ. Việc sử dụng **Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay** rất được khuyến khích để định lượng cfDNA.

Khuyến nghị cho PCR: Do tính phân mảnh cao của các axit nucleic thu được từ huyết tương, cần cẩn thận trong việc thiết kế mồi. Cell-free DNA thường có kích thước nhỏ (~170bp), do vậy các mồi PCR nên được thiết kế để tạo ra các bộ khuếch đại (amplicon) từ 150 bp trở xuống. Với nồng độ cfDNA thấp trong huyết tương từ những người khỏe mạnh, có thể cần 40 chu kỳ khuếch đại trong một số trường hợp.

Ống Streck Cell-Free DNA BCT: Huyết tương từ máu thu bằng (các) ống Streck Cell-Free DNA BCT phải trải qua quá trình xử lý Proteinase K trước khi tách chiết cell-free DNA để đảm bảo hiệu quả thu hồi tối ưu. Bỏ qua xử lý với Proteinase K có thể làm giảm hiệu quả 50%.

4.2 Trước khi bắt đầu sử dụng

Lysis/Binding và Wash Buffer được vận chuyển ở dạng dung dịch cô đặc. Nếu xuất hiện cặn ở một trong hai dung dịch, ủ dung dịch ở 37°C trong 30 phút. EtOH 100% phải được thêm vào cả hai dung dịch trước khi sử dụng. Khi đã thêm EtOH, các buffer sẽ ổn định lên đến một năm khi bảo quản ở 4°C. Cần đóng nắp chắc chắn để bảo quản lâu dài.

Thêm 23 ml ethanol 100% mới vào mỗi chai Lysis/Binding Buffer và trộn bằng cách đảo đều.

Thêm 51 ml ethanol 100% mới vào mỗi chai Wash Buffer và trộn bằng cách đảo đều.

Chuẩn bị dung dịch ethanol 80% mới trước khi bắt đầu tách chiết.

4.3 Tách chiết DNA

Trước khi bắt đầu quy trình, xác định thể tích huyết tương cần sử dụng để tách chiết và tính thể tích các buffer và hạt từ cần dùng. Thể tích huyết tương đầu vào được khuyến nghị là 2ml. Đông thể tích buffer và dung dịch hạt từ dựa theo bảng sau:

Huyết tương	Lysis/Binding Buffer	Dung dịch hạt từ	Kích thước ống
X (x=ml của huyết tương)	1.25x	0.015x	N/A*
2 ml	2.5 ml	30 µl	15 ml

* Nên sử dụng (các) ống 50ml cho huyết tương nhiều hơn từ 5ml trở lên thay vì dùng ống 15ml. Khi dùng (các) ống 15ml như vậy có thể dẫn đến hiệu quả thấp hơn một chút.

Xử lý với Proteinase K

Nếu mẫu được thu trong (các) ống **Streck Cell-Free DNA BCT**, bắt buộc phải xử lý với Proteinase K để thu được hiệu suất tối ưu. Nếu máu không được thu trong ống **Streck Cell-Free DNA BCT** tiến hành với bước Ly giải/ Gắn.

Huyết tương	Proteinase K	Dung dịch SDS 20%
x (x=ml huyết tương)	0.015 x	0.050 x
2 ml	30µl	100µl

1. Thêm thể tích huyết tương thích hợp vào (các) ống có kích thước phù hợp.
2. Thêm thể tích Proteinase K (20 mg/ml) đã tính sử dụng bảng trên.
3. Thêm thể tích dung dịch SDS 20% đã tính sử dụng bảng trên.
4. Trộn bằng cách đảo đều 5 lần.
5. Ủ 60°C trong 20 phút.
6. Sau khi ủ, đặt (các) ống lên đá trong 5 để làm mát (các) ống về nhiệt độ phòng.
7. Khi (các) ống đã ở nhiệt độ phòng tiếp tục bước 2 của mục Ly giải/Gắn.

Ly giải/ Gắn

1. Thêm thể tích huyết tương thích hợp vào (các) ống có kích thước phù hợp.
2. Thêm 1.25ml Lysis/Binding Buffer cho mỗi 1ml huyết tương sử dụng vào (các) ống.
3. Thêm 15µl Magnetic Bead Solution cho mỗi 1ml huyết tương sử dụng vào (các) ống.
Quan trọng: Trộn đều hạt từ trước khi thêm vào. Không được để thấy cặn ở đáy dung dịch sau khi trộn. Các hạt từ sẽ lắng nhanh, vì vậy hãy trộn lại dung dịch hạt từ sau khi thêm vào từng mẫu. Không làm như vậy có thể dẫn đến hiệu suất không nhất quán.
4. Vortex hoặc lắc mạnh (các) ống với tốc độ cao nhất (>3000 RPM) trong 10 minutes ở nhiệt độ phòng.
Để đạt hiệu suất thu hồi cao nhất, đảm bảo rằng huyết tương/ dung dịch đệm được trộn mạnh trong (các) ống. Máy vortex có bộ phận giữ ống cho phép trộn dễ dàng hơn.
5. Đặt (các) ống vào giá đỡ từ trong 2 đến 5 phút hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
6. Trong khi giữ (các) ống trên giá từ, loại bỏ phần nổi phía trên. Cẩn thận không loại bỏ các hạt từ.
7. Giữ ống trên giá từ trong 1 phút và loại bỏ phần nổi phía trên

Rửa 1

8. Thêm 1000 µl Wash Buffer vào (các) ống Lysis/binding.
9. Rửa hạt từ bằng cách vortex ống trong 10 giây hoặc hút nhả 10 lần.
10. Chuyển huyền phù hạt từ vào (các) ống 2 ml chống dính mới trên giá từ.
11. Để các hạt gắn vào giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
12. Hút dịch nổi từ (các) ống 2 ml và sử dụng dịch nổi để rửa (các) ống lysis/ binding.
13. Chuyển phần còn lại chứa các hạt từ trong (các) ống lysis/binding vào (các) ống 2 ml.
14. Giữ nguyên (các) ống trên giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trở nên trong suốt.
15. Loại bỏ càng nhiều đệm sau khi rửa càng tốt, sử dụng pipet 1000 µl.
16. Búng nhẹ vào thanh từ 5 lần và loại bỏ Wash Buffer còn dư bằng pipet 200 µl.
17. Chuyển (các) ống sang giá thường và thêm 1000 µl Wash Buffer.
18. Rửa hạt từ bằng cách vortex ống trong 20 giây hoặc hút nhả 10 lần.
19. Ly tâm nhanh (các) ống.
Các bước ly tâm cần thiết khi vortex để rửa hạt. Chỉ nên quay một vòng ngắn để lấy dung dịch ra khỏi nắp ống.
20. Đặt (các) ống trở lại giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
21. Loại bỏ càng nhiều đệm sau khi rửa càng tốt, sử dụng pipet 1000 µl.
22. Búng nhẹ vào thanh từ 5 lần và loại bỏ Wash Buffer còn dư bằng pipet 200 µl.

Rửa 2

23. Chuyển (các) ống sang giá thường và thêm 1000 µl EtOH 80%.
24. Rửa hạt từ bằng cách vortex ống trong 20 giây hoặc hút nhà 10 lần.
25. Ly tâm nhanh (các) ống.
26. Đặt (các) ống trở lại giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
27. Loại bỏ càng nhiều EtOH sau khi rửa càng tốt, sử dụng pipet 1000 µl.
28. Búng nhẹ vào thanh từ 5 lần và loại bỏ EtOH còn dư bằng pipet 200 µl.
29. Chuyển (các) ống sang giá thường và thêm 1000 µl EtOH 80%.
30. Rửa hạt từ bằng cách vortex ống trong 20 giây hoặc hút nhà 10 lần.
31. Ly tâm nhanh (các) ống.
32. Đặt (các) ống trở lại giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
33. Loại bỏ càng nhiều EtOH sau khi rửa càng tốt, sử dụng pipet 1000 µl và để nắp mở.
34. Búng nhẹ vào thanh từ 5 lần.
35. Loại bỏ EtOH còn dư bằng pipet 200 µl.
36. Để (các) ống trên giá từ trong 2 phút và búng nhẹ vào thanh từ 5 lần và loại bỏ EtOH còn dư bằng pipet 20 µl.
37. Để hạt từ khô thêm 1-3 phút.
Cẩn thận không để hạt từ bị khô quá, có thể sẽ dính vào ống.

Rửa giải

38. Chuyển các ống sang giá thường và thêm thể tích Elution Buffer mong muốn và hòa tan hạt từ.
Quan trọng: Thể tích Elution Buffer tối thiểu là 15 µl cho mỗi ml huyết tương được đề xuất để thu hồi DNA với hiệu suất tối ưu.
39. Vortex hoặc lắc mạnh (các) ống trong 5 phút.
40. Ly tâm nhanh (các) ống.
38. Đặt (các) ống trở lại giá từ trong 10-30 giây hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt.
41. Chuyển dịch rửa giải sang (các) ống 1.5 ml không dính.

5. Lịch sử sửa đổi

Lần sửa đổi cuối: Tháng 4, 2020	
Sửa đổi	(Các) mục ảnh hưởng
Phiên bản đầu tiên	Tất cả

6. Ký hiệu sử dụng

Các ký hiệu dưới đây được sử dụng trên nhãn và bao bì của sản phẩm, phù hợp với tiêu chuẩn EN980.



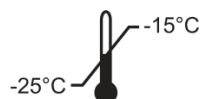
Số danh mục



Số lô



Ngày hết hạn



Điều kiện bảo quản



Nhà sản xuất



Mục đích sử dụng



Đại diện Ủy ban Châu Âu

7. Thông báo với khách hàng

7.1 Thời hạn bảo hành

EntroGen bảo đảm sản phẩm không có sai sót về vật liệu và sự sản xuất, phải tuân thủ các yêu cầu kỹ thuật của EntroGen tại thời điểm vận chuyển. Tùy thuộc vào sự xác minh của EntroGen và khi có thông báo bằng văn bản của khách hàng, nếu sản phẩm không tuân thủ các yêu cầu kỹ thuật hoặc bất kỳ thiếu sót nào về nguyên liệu hoặc sản xuất trong vòng 30 ngày kể từ ngày vận chuyển, toàn bộ trách nhiệm pháp lý của EntroGen và cách khắc phục riêng cho từng khách hàng có thể là sửa chữa hoặc thay thế các sản phẩm bị lỗi, tùy thuộc vào quyết định của EntroGen.

7.2 Giới hạn bảo hành

Điều kiện bảo hành không bao gồm bất kỳ thiệt hại của sản phẩm do sử dụng sai mục đích, lựa chọn địa điểm không phù hợp, các thao tác của khách hàng hoặc bất kỳ hoạt động nào trái với hướng dẫn và các thông số thiết lập cho sản phẩm. Điều kiện bảo hành không bao gồm các thiệt hại hoặc thiết sót do sửa chữa hoặc thay đổi vị trí của sản phẩm do các đơn vị khác ngoài đại diện của EntroGen. Hơn nữa, sản phẩm được thiết kế để thực hiện các phản ứng ở độ nhạy phân tích được chỉ định cho mẫu DNA không bị phân mảnh nhiều và không chứa các vật liệu có thể ức chế phản ứng khuếch đại. Bảo hành không bao gồm mọi thiệt hại do tai nạn, phá hoại, hỏa hoạn, lũ lụt, các yếu tố môi trường khác hoặc các điều kiện bất khả kháng. Các mặt hàng được bảo hành không bao gồm mặt hàng được cung cấp bởi các nhà sản xuất thứ ba, chẳng hạn như máy tính và phần mềm có liên quan. Nếu bạn có thắc mắc về điều kiện bảo hành, hãy liên hệ với dịch vụ khách hàng của EntroGen.

BẢO HÀNH ĐƯỢC THỰC HIỆN THAY CHO TẤT CẢ CÁC ĐIỀU KIỆN KHÁC, NHƯ BẢO HÀNH RỖ RÀNG HAY NGỤ Ý, BAO GỒM NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN ĐỐI VỚI BẢO HÀNH NGỤ Ý VỀ TÍNH THƯƠNG MẠI HOẶC TÍNH PHÙ HỢP CHO MỘT MỤC ĐÍCH CỤ THỂ; BẤT KỲ BẢO HÀNH NGỤ Ý NÀO PHÁT SINH TỪ MỘT QUÁ TRÌNH GIAO DỊCH HOẶC THỰC HIỆN, TÙY CHỈNH HOẶC SỬ DỤNG THƯƠNG MẠI; HOẶC BẤT KỲ BẢO ĐẢM NGỤ Ý VỀ VI PHẠM BẰNG SÁNG CHẾ. TRONG BẤT KỲ TRƯỜNG HỢP NÀO, ENTROGEN SẼ KHÔNG CHIU TRÁCH NHIỆM VỀ BẤT KỲ THIẾT HẠI NÀO, BAO GỒM NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN, THIẾT HẠI TRỰC TIẾP, GIÁN TIẾP, NGẪU NHIÊN, ĐẶC BIỆT HOẶC HẬU QUẢ (BAO GỒM, NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN, TỔN THẤT LỢI NHUẬN, DOANH THU HOẶC THU NHẬP) CHO SẢN PHẨM.

7.3 Sở hữu trí tuệ

Sản phẩm dựa trên tài sản trí tuệ có giá trị và sản xuất phát triển bởi EntroGen, Inc. và được cung cấp cho tổ chức mua (khách hàng) chỉ nhằm mục đích thử nghiệm chẩn đoán phân tử để xác định các đột biến mục tiêu bằng cách sử dụng công nghệ và phương pháp của EntroGen được liệt kê và mô tả trong hướng dẫn sử dụng kèm theo. Bất kỳ việc sử dụng sản phẩm hoặc thành phần nào của sản phẩm theo cách thức khác với mô tả trong hướng dẫn sử dụng đều bị EntroGen nghiêm cấm. Bằng cách mở hộp sản phẩm khách hàng đồng ý không thay đổi các thành phần của EntroGen cung cấp, bao gồm mồi và probes và không để các thành phần sản phẩm hoặc đưa sản phẩm vào bất kỳ phân tích nào cho mục đích tạo ra một công nghệ tương tự bất kể mục đích sử dụng của nó. Khách hàng đồng ý không bán lại sản phẩm hoặc bất kỳ thành phần nào của sản phẩm cho bên thứ ba trừ khi được EntroGen cho phép bằng văn bản. Khách hàng sẽ giữ các thông tin trong hướng dẫn sử dụng sản phẩm bí mật và coi nó như một bí mật thương mại của EntroGen. Nếu khách hàng không đồng ý với các điều khoản sử dụng được mô tả ở trên, sản phẩm không sử dụng phải được trả lại đầy đủ cho EntroGen.

Không có bằng sáng chế cho thực hiện Quy trình Nuclease 5' được chuyển tải, bằng ngụy ý hoặc bằng cách đưa ra quyết định mua cho người mua. Giấy phép và giấy phép bổ sung có thể được yêu cầu để thực hiện một số phần của xét nghiệm này. Người mua/người dùng cuối có trách nhiệm tìm kiếm các giấy phép đó từ người giữ bản quyền.

8. Thông tin liên hệ



EntroGen, Inc
20950 Warner Center Lane, Suite B
Woodland Hills, CA 91367, USA
Tel: +1 818 716 1070
Fax: +1 818 716 1077
Email: info@entrogen.com; support@entrogen.com
Web: www.entrogen.com



Antisel SA
Spectra Building, 12klm
thessaloniki-Halkidiki
PO 57001, Thermi, Greece
Tel: +30 210 779 5980
Fax: +30 210 771 6932
Email: antisel@antisel.gr
Web: www.antisel.gr