



RTA® Bakteriden Genomik DNA İzolasyon Kiti

Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2011-12

IVD

Bakteri örneklerinden genomik nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması için
In vitro tanı amaçlı kullanım için
Yalnızca profesyonel kullanım için

REF

09005050 - 50 test
09005100 - 100 test

CE

RTA



İçindekiler

Kit İçeriği	4
Saklama Koşulları ve Dayanıklılık	4
Kullanım Amacı	5
Ürün Kullanım Limitleri	5
Giriş	6
Uyarılar ve Önlemler	7-8
Gerekli Diğer Malzemeler	8
Başlamadan Önce Notlar	9
Protokol (Gram-Negatif Bakteriler İçin)	10-11
Protokol (Gram-Pozitif Bakteriler İçin)	12
Protokol (Mikobakteriler İçin)	13
Sorun Giderme Kılavuzu	14

Kit İçeriği

Sađlanan Malzeme	Miktar		
	10 test	50 test	100 test
Proteinaz K	4 mg	20 mg	40 mg
Solüsyon BL	3 ml	11 ml	22 ml
Solüsyon B	3 ml	13.75 ml	27.5 ml
Solüsyon W1*	4 ml	19 ml	38 ml
Solüsyon W2*	6 ml	28.5 ml	57 ml
Solüsyon E	2.5 ml	11 ml	22 ml
Spin Kolonlar	10	50	100
Toplama tüpleri (2 ml)	30	150	300
Toplama tüpleri (1.5 ml)	10	50	100
Kullanma Klavuzu	1	1	1

* Yıkama solüsyonlarını hazırlamak için “Başlamadan Önce Notlar” kısmına bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

Proteinaz K hariç RTA Bakteriden Genomik DNA İzolasyon Kitinin bütün içeriği oda sıcaklığında (15-25°C) kuru ortamda saklanmalıdır. Steril suda çözüldükten sonra Proteinaz K 2-8 °C’de saklanmalıdır. Uzun süreli kullanım için ise enzimin tercih edilen miktarlarda bölünerek -20 °C’de tavsiye edilir. Bu şartlar altında kit en az 12 ay saklanabilir.

Kullanım Amacı

RTA Bakteriden Genomik DNA İzolasyon Kiti bakteriyel örneklerden *in vitro* nükleik asit ekstraksiyon sistemidir. Bakteriyel örneklerden saflaştırılan genomik DNA daha sonra PZR, endonükleaz kesimi, klonlama, transformasyon, ligasyon ve dizileme gibi moleküler uygulamalarda kullanılabilir.

Ürün Kullanım Limitleri

Kit içeriğindeki tüm kimyasallar sadece *in vitro* tanı amaçlıdır.

Bu kit bakteriyel örneklerle kullanılmak üzere onaylanmıştır. Diğer örneklerle çalışmak doğru olmayan sonuçlar verebilir.

İyi eğitilmiş personel tarafından profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.

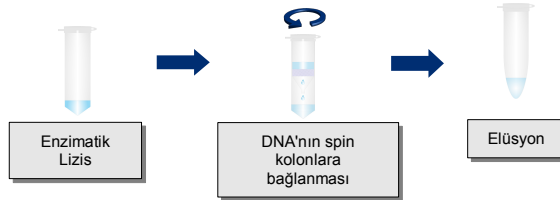
RTA Bakteriden Genomik DNA İzolasyon Kitleri bakteriyel örneklerden nükleik asit saflaştırma işlemi için kullanılır. Herhangi spesifik bir organizma veya özel bir klinik amaç için kullanılmaz .

Bu kitlerin, kullanıcının spesifik deneysel gereksinimlerine uygun olup olmadığı kullanıcının inisiyatifindedir.

Giriş

Son yıllarda moleküler biyolojik tekniklerdeki ilerlemeler bakterilerin tanımlanması için PCR ve DNA dizi analizi gibi tekniklerin rutin kullanımı oldukça arttırmıştır. Yüksek saflıkta ve kalitede DNA eldesi olanak tanıyan bir ekstraksiyon PCR ve dizileme reaksiyonu için oldukça önemlidir. Geleneksel genomik DNA izolasyon yöntemleri zaman ve işgücü gerektirmektedir. Çoğu yöntemde bir proteaz ile uzun parçalama süreçleri veya fenol ve kloroform gibi tehlikeli organik çözücülerin kullanılması gerekmektedir. Burada bakterilerden saf genomik DNA ekstraksiyonu için basit ve ucuz bir yöntem sunmaktayız. Ürünün yüksek verim ve kalitesi, özel olarak dizayn edilmiş genomik DNA'ya özgü spin kolonların kullanımı ve lizis ve yıkama solüsyonlarının optimize edilmiş içeriği ile sağlanmaktadır.

RTA Bakteriden Genomik DNA İzolasyon Kiti ile Gram-pozitif bakteriler, Gram-negatif bakteriler ve mikobakteriler gibi birçok bakteri türünden yüksek saflıkta DNA elde edilebilmektedir. Kit ile sıvı ve katı kültürlerle çalışılabilir. İzolasyonun zor olduğu Gram-pozitif bakteriler ve mikobakteriler için ek bir lizis aşaması uygulanmaktadır. Spektrofotometrik ölçümlere göre izole edilen genomik DNA'nın saflığı (A_{260}/A_{280}) 1,8 ile 1,9 arasında değişmektedir. DNA konsantrasyonu bakteri kültürünün tipi ve hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir. Saflaştırılan genomik DNA PZR, Southern Blotting ve restriksiyon enzim kesimi için uygundur.



Uyarılar ve Önlemler

Kimyasallarla mümkün olduğu kadar az temas ediniz. Kimyasallarla çalışırken personel koruyucu ekipmanlar kullanınız (gözlük, eldiven, koruyucu giysiler). Kimyasalların solunmasından kaçınınız. Kimyasal kaplarının ağzını açık bırakmayınız. Sadece yeterli havalandırma olan ortamlarda kullanınız (Örneğin çeker ocak). Daha fazla güvenlik bilgisi için MSDS (Malzeme Güvenlik Bilgi Formu) isteyiniz.

Örnek hazırlama atıklarının bazılarının içindeki kimyasallar çamaşır suyu veya asidik çözeltilerle birleştiğinde reaktif bileşikler oluşturabilir. O yüzden bu atıklara çamaşır suyu veya asidik çözeltiler eklenmemelidir.

Kullanılmayan kimyasallar, atıklar ve örnekler ülke ya da bölgesel düzenlemelere uygun olarak ortadan kaldırılmalıdır.

Ağızla pipetleme yapmayınız. Çalışma alanında herhangi bir şey yemeyiniz, içecek ya da sigara içmeyiniz. Deri, gözler ve mukoz membranların kimyasallarla temasından kaçınınız. Eğer temas gerçekleşirse, vakit kaybetmeden bolca su ile yıkayınız.

Tüm pipetleme araçları ve cihazları dikkatli bir şekilde kullanınız ve üreticinin kalibrasyon ve kalite kontrol talimatlarına uyunuz; örnek kontaminasyonunu engellemek için, yeni, steril hava bariyerli ya da pozitif boşluklu DNazsız pipet uçları ve steril pipetler kullanınız.

Örnek ve kontroller arasında çapraz kontaminasyondan korunmak için örnek ya da kontrol içeren tüm materyalleri İyi Laboratuvar Pratikleri'ne uygun olarak kullanınız. Kiti kontaminasyon yaratabilecek herhangi bir DNA ya da RNA, özellikle amplifiye nükleik asit kaynağından uzakta saklayınız.

Kimyasalları farklı lot numaraları ya da diğer üreticilerin kimyasalları ile karıştırmayınız. Son kullanma tarihi geçmiş kitleri kullanmayınız.

Gerekli Diğer Malzemeler

- Lizozim (bazı bakteri türlerinin verimli lizisi için lysostaphin gibi enzimlerin kullanımı gerekebilir.)
- TE tamponu (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 1 M DTT
- 96-100% etanol (Moleküler biyoloji derecesinde)
- Ribonükleaz A (opsiyonel)
- Steril dH₂O
- Termoblok veya su banyosu
- Vorteks
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml)

Başlamadan Önce Notlar

Serin koşullarında Solüsyon BL'de bir çökelti oluşabilir. Böyle bir çökelti gözlenirse bunu çözmek için şişe 37°C'de veya 56°C'de birkaç dakika inkübe edilir. Şişeler daima sıkıca kapatılmalı ve protokol uygulanırken solüsyonların oda sıcaklığında olması gerekir.

Başlamadan Önce Notlar (devam)

İlk kullanımdan önce Proteinaz K tüpüne, tüpün üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda dH₂O eklenir. ve vorteks yapılarak iyice çözülür. Daha sonra 2-8 °C'de veya alikotlanıp -20 °C'de saklanır.

Kit Boyutu	Proteinaz K (mg)	Eklenecek dH₂O (ml)
10 test	4	0.2
50 test	20	1
100 test	2 x 20	2 x 1

Solüsyon W1 ve Solüsyon W2 konsantredir. İlk kullanımdan önce şişenin üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda etanol (96-100%) eklenir:

Kit Boyutu	Solüsyon W1 (ml)	Eklenecek etanol (ml)	Son Hacim (ml)
10 test	4	4	8
50 test	19	19	38
100 test	38	38	76
Kit Boyutu	Solüsyon W2 (ml)	Eklenecek etanol (ml)	Son Hacim (ml)
10 test	6	2	8
50 test	28.5	9.5	38
100 test	57	19	76

Protokol (Gram-Negatif Bakteriler İçin)

- 1) a) Sıvı kültürden;
 - ✓ Gece boyu büyütülmüş bakteri kültüründen 1,5 ml 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanır.
 - ✓ Üst sıvı atılır.
 - *Santrifüj tüpü besiyeri kalıntılarının tamamı akana kadar ters şekilde tutulmalıdır. Hücre peleti daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ta saklanabilir.*
 - ✓ Pelet üzerine 200 µl Solüsyon BL eklenir.
 - ✓ Pelet iyice vortekslenerek çözülür.
 - *Hücre peletinin tamamen çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının kalmadığından emin olunmalıdır.*
- b) Katı kültürden;
 - ✓ Öze kullanılarak agar üzerinden bir bakteri kolonisi alınır.
 - ✓ 200 µl solüsyon BL içine aktarılır ve vorteks kullanılarak iyice çözülür.
 - *Hücre peletinin tamamen çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının kalmadığından emin olunmalıdır.*
- 2) 20 µl Proteinaz K çözeltisi eklenir.
- 3) Vortekslenerek karıştırılır ve 56°C'ta 1 saat bekletilir.
 - *İnkübasyon sırasında örneklerin karıştığından emin olun. Bir termomikser veya çalkalamalı su banyosu kullanın veya örnekleri her 10 dakikada bir vorteks ile karıştırın.*
 - **Opsiyonel RNaz Basamağı:** RNA sorun değilse, 3. basamağa geçin. Eğer RNA-içermeyen genomik DNA gerekli ise, 10 µl RNaz (20 mg/ml) ekleyin ve 10 saniye vurum-vorteks yaparak karıştırın ve kısa santrifüjden sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edin ve 4. basamağa geçin.

Protokol
(Gram-Negatif
Bakteriler için)
(devam)

- 4) 250 µl Solüsyon B eklenir ve 20 saniye boyunca vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
- 5) Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65°C'ta 15 dakika inkübe edilir.
- 6) 200 µl etanol (96-100%) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
- 7) Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarılır.
- 8) 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- 9) 700 µl Solüsyon W1 eklenir. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- 10) 700 µl Solüsyon W2 eklenir. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
- 11) 14,000 x rpm'de 30 saniye santrifüj yapılır.
- 12) Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edilir.
- 13) 200 µl 70°C'ye ısıtılmış Solüsyon E eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
- 14) 14,000 x rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır.
- 15) Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA bulunur.

Protokol (Gram-Pozitif Bakteriler için)

- 1) a) Sıvı kültürden;
 - ✓ Gece boyu büyütülmüş bakteri kültüründen 1,5 ml 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanır.
 - ✓ Üst sıvı atılır.
 - *Santrifüj tüpü besiyeri kalıntılarının tamamı akana kadar ters şekilde tutulmalıdır. Hücre peleti daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ta saklanabilir.*
 - ✓ Pelet üzerine yeni hazırlanmış Lizozim Çözeltisinden [20 mg/ml Lizozim DTT içeren TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA ; pH: 8.0, 1mM DTT)çözülür] 200 µl eklenir.
 - ✓ Pelet iyice vortekslenerek çözülür.
 - *Hücre peletinin tamamen çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının kalmadığından emin olunmalıdır.*
- b) Katı kültürden;
 - ✓ Öze kullanılarak agar üzerinden bir bakteri kolonisi alınır.
 - ✓ 200 µl yeni hazırlanmış Lizozim Çözeltisi [20 mg/ml Lizozim DTT içeren TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA ; pH: 8.0, 1mM DTT)çözülür] içine aktarılır ve vorteks kullanılarak hücreler iyice çözülür.
 - *Hücre peletinin tamamen çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının kalmadığından emin olunmalıdır.*
- 2) Hücre çözeltisi 3 dakikada bir kez karıştırılarak en az 30 dakika boyunca 37°C'ta inkübe edilir.
- 3) 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürülür ve üst sıvı atılır. 200 µl Solüsyon BL ve 20 µL Proteinaz K çözeltisi eklenir ve "Gram Negatif Bakteri Protokolü"nü 3. basamağından devam edilir.

Protokol (Mikobakteriler için)

- 1) Lj besiyerinden koloniler 1 ml TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA ; pH: 8.0) ile yıkanarak toplanır ve 1 saat boyunca 15 dakikada bir kez karıştırılarak 80°C'ta inkübe edilir.
- 2) Daha sonra 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edilir ve üstsıvı atılır.
- 3) Pelet üzerine yeni hazırlanmış Lizozim Çözeltisinden [20 mg/ml Lizozim DTT içeren TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA ; pH: 8.0, 1mM DTT) çözülür] 200 µl eklenir.
- 4) Pelet iyice vortekslenerek çözülür.
Hücre peletinin tamamen çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının kalmadığından emin olunmalıdır.
- 5) Hücre çözeltisi 3 dakikada bir kez karıştırılarak en az 30 dakika boyunca 37°C'ta inkübe edilir.
- 6) 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürülür ve üst sıvı atılır. 200 µl Solüsyon BL ve 20 µL Proteinaz K çözeltisi eklenir ve "Gram Negatif Bakteri Protokolü" nün 3. basamağından devam edilir.

Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Neden	Çözüm
Zayıf veya düşük geri kazanım	Yanlış yıkama	Yıkama Solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltilmiş olduğunu doğrulayın. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayın.
	Yetersiz hücre sayısı	Kültür eski olabilir. Yeni bir kültür hazırlayın.
	Zayıf elüsyon	Elüsyonu tekrarlayın veya elüsyon hacmini arttırın. Kolonu Elüsyon tamponu ile 70°C'de 3 dakika inkübe etmek verimi artırabilir.
	Liziz reaksiyonu tamamlanmamış olabilir.	Tavsiye edilen kültür hacmini aşmayın. Kültür hacmini azaltın. "Gram-Negatif Bakteriler" Protokolündeki 3. adımda iyice vortekslediğinizden emin olun.
Düşük A260 / A280 oranı	Kolon tıkanmasına ya da yetersiz lizise dayalı olarak saflaştırmanın tamamlanamaması	Başlangıç kültürü hacminizi azaltın.
Elde edilen DNA ile yapılan enzimatik reaksiyonlar yürümüyor.	DNA konsantrasyonu çok düşük.	DNA'yı alkol ile çöktürün, daha sonra daha küçük hacim Elüsyon tamponu veya su ile çözün.
	Elde edilen DNA'nın yüksek tuz içeriği	DNA'yı alkol ile çöktürün.
	Yıkama solüsyonlarından arta kalan etanol.	Kalan etanolü uzaklaştırmak için yıkama basamaklarından sonra kolonu 1 dakika santrifüj edin.

RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.

Cumhuriyet Cad. No:3 GEPOSB 41400 Gebze / Kocaeli / Türkiye

Tel: 0262 648 5300

Faks: 0262 751 0677

E-posta: info@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr

RTA.BR.010 Revizyon Tarihi/Revizyon No:09.01.2012/1