



RTA® JEL / PZR Saflaştırma Kiti

Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2011-12

DNA parçalarının agaroz jelden geri kazanımı ve PZR ürünlerinin saflaştırılması için
Yalnızca profesyonel kullanım için

REF

09009050 - 50 test
09009100 - 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 |
| Gerekli Diğer Malzemeler | 8 |
| Başlamadan Önce Notlar | 8 |
| Protokol (PZR Ürünleri İçin) | 9 |
| Protokol (Agaroz Jel İçin) | 10 |
| Sorun Giderme Kılavuzu | 11 |

Kit İçeriği

| Sađlanan Malzeme | Miktar | | |
|--------------------------|---------|---------|----------|
| | 10 test | 50 test | 100 test |
| Solüsyon A | 10 ml | 50 ml | 100 ml |
| Solüsyon WA* | 4.5 ml | 22.5 ml | 45 ml |
| Solüsyon E | 2 ml | 6 ml | 11 ml |
| Gel Modifier | 0.25 ml | 1 ml | 2 ml |
| Spin Kolonlar | 10 | 50 | 100 |
| Toplama Tüpleri (2 ml) | 20 | 100 | 200 |
| Toplama Tüpleri (1.5 ml) | 10 | 50 | 100 |
| Kullanma Kılavuzu | 1 | 1 | 1 |

* Solüsyon WA' yı hazırlamak için "Başlamadan Önce Notlar" kısmına bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

RTA JEL/PZR Safılaştırma Kitinin bütün içeriği oda sıcaklığında (15-25°C) kuru ortamda saklanmalıdır. Bu şartlar altında kit en az 12 ay saklanabilir.

Kullanım Amacı

RTA JEL/PZR Safılaştırma Kiti, PZR ürünlerinin hızlı safılaştırılması ve DNA parçalarının agaroz jelden (TBE veya TAE) hızlı geri kazanımı için geliştirilmiştir. Bu kit, jel parçaları ve PZR'den gelen agaroz, etidyum bromid, primerler, dNTP'ler enzimler, tuzlar ve diğer kontaminasyonların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

Ürün Kullanım Limitleri

RTA JEL/PZR Safılaştırma Kiti genel nükleik asit safılaştırma işlemleri için kullanılır. Herhangi spesifik bir organizma veya özel bir klinik amaç için kullanılmaz. Bu kitlerin, kullanıcının spesifik deneysel gereksinimlerine uygun olup olmadığı kullanıcının insiyatifindedir.

Giriş

RTA JEL/PCR Saflaştırma Kiti, PZR ürünlerinin hızlı saflaştırılması ve DNA parçalarının agaroz jelden (TBE veya TAE) hızlı geri kazanımı için geliştirilmiştir. Bu kit jel parçaları ve PCR reaksiyonundan gelen agaroz, etidyum bromid, primerler, dNTP'ler enzimler, tuzlar ve diğer kontaminasyonların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. 50 baz çiftinden daha büyük DNA parçaları verimli bir şekilde saflaştırılmaktadır. Kitin geri kazanım oranı DNA konsantrasyonu ve DNA uzunluğuna bağlı olarak % 95'e kadar çıkmaktadır. Saflaştırılmış DNA aşağıdaki uygulamalar için kullanılabilir;

- Otomatize floresans DNA dizileme
- Manuel DNA dizileme
- Klonlama
- İşaretleme

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 ağızını 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 birleştğinde 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.

Kimyasalları farklı lot numaraları ya da diğerk üreticilerin kimyasalları ile karıştırmayınız.

Son kullanma tarihi geçmiş kitleri kullanmayınız.

Gerekli Diğer Malzemeler

- 96-100% etanol (Moleküler biyoloji derecesinde)
- steril dH₂O
- termal blok veya su banyosu
- vorteks
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5ml)

Başlamadan Önce Notlar

Solüsyon WA konsantredir. İlk kullanımdan önce şişenin üzerinde ve aşağıdaki tabloda belirtilen miktarda 96-100% etanol eklenmelidir.

| <i>Kit Boyutu</i> | <i>Solüsyon WA (ml)</i> | <i>Eklenecek etanol (ml)</i> | <i>Son Hacim (ml)</i> |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 10 test | 4.5 | 1.5 | 6 |
| 50 test | 22.5 | 7.5 | 30 |
| 100 test | 45 | 15 | 60 |

Protokol (PZR Ürünleri İçin)

1. 1.5 ml. lik eppendorf tüp içindeki PZR ürününe hacminin 6 katı kadar Solüsyon A eklenir.
Örneğin; 100 µl PZR ürününe 600 µl Solüsyon A eklenir.
2. Vorteks ile iyice karıştırılır.
3. 200 µl etanol (96-100%) eklenir ve vortekle iyice karıştırılır.
4. Kısa santrifüj yaptıktan sonra karışım, toplama tüpü içinde bulunan spin kolona aktarılır.
5. 10,000 x g ' de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
6. 500 µl Solüsyon WA eklenir ve 10,000 x g ' de 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
7. 14,000 rpm ' de 30 saniye santrifüj edilir.
8. Spin kolon 1.5 ml. lik toplama tüpüne yerleştirilir.
9. Spin kolonun ortasına 50-100 µl Solüsyon E eklenir. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
Eğer örnekteki DNA konsantrasyonu düşükse 50 µl Solüsyon E kullanın. Aksi takdirde elüsyon için 100 µl' ye kadar herhangi bir hacimde Solüsyon E kullanılabilir. Solüsyon E hacmini saflaştırılmış DNA' nın daha sonraki işlemlerde gerekli miktarına göre seçiniz.
10. 14,000 x rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır.
11. Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda saflaştırılmış DNA bulunur.

Protokol (Agaroz Jel için)

1. Agaroz jeldeki (TBE veya TAE) DNA bandını keserek alınır.
2. Jel parçası bir tüp içinde tartılır ve 4 katı hacminde Solüsyon A eklenir.
Örneğin; 100 mg jel parçasına 400 µl Solüsyon A eklenir.
3. 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
4. 60 °C' de jel parçası tamamen eriyene kadar inkübe edilir. (5-10 dakika).
5. 10 µl Gel Modifier eklenir ve 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
6. Kısa santrifüj yaptıktan sonra karışım toplama tüpü içinde bulunan spin kolona aktarılır.
7. 10,000 x g ' de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
8. 500 µl Solüsyon WA eklenir ve 10,000 x g ' de 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
9. 14,000 rpm ' de 30 saniye santrifüj edilir.
10. Spin kolon 1.5 ml. lik toplama tüpüne yerleştirilir.
11. 50-100 µl Solüsyon E eklenir. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
Eğer örnekteki DNA konsantrasyonu düşükse 50 µl Solüsyon E kullanın. Aksi takdirde elüsyon için 100 µl' ye kadar herhangi bir hacimde Solüsyon E kullanılabilir. Solüsyon E hacmini saflaştırılmış DNA' nın daha sonraki işlemlerde gerekli miktarına göre seçiniz.
12. 14,000 x rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır.
13. Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda saflaştırılmış DNA bulunur.

Sorun Giderme Kılavuzu

| Sorun | Neden | Çözüm |
|--|---|--|
| Tıkanmış kolon | Jel parçası erimemiş | Jel parçasını doğru tarttığınızdan ve yeterli miktarda Solüsyon A eklediğinizden emin olun. |
| Zayıf veya düşük geri kazanım | Yanlış yıkama | Solüsyon WA' nın konsantrasyonunu belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltiltiğini doğrulayın. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayın. |
| | Zayıf elüsyon | Elüsyon hacmini azaltın. |
| | Solüsyonun yüksek pH' ı | Agaroz jelden DNA saflaştırırken Gel Modifier eklemeyi unutmayın. |
| | Tıkanmış kolon | Yukarı bakınız. |
| Elde edilen DNA ile yapılan enzimatik reaksiyonlar yürümüyor. | DNA konsantrasyonu çok düşük | DNA'yı alkol ile çöktürün, daha sonra daha küçük hacim Solüsyon E ile çözün. |
| | Elde edilen DNA'nın yüksek tuz içeriği | DNA'yı alkol ile çöktürün. |
| | Yıkama solüsyonlarından arta kalan etanol | Kalan etanolu uzaklaştırmak için yıkama basamaklarından sonra kolonu 1 dakika santrifüj edin. |



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. 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.009 Revizyon Tarihi/Revizyon No:06.01.2012/1