



RTA®

Kandan Genomik DNA İzolasyon Kiti

Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2011-05

IVD

İnsan kan örneklerinden *in vitro* tanı amaçlı genomik nükleik asit izolasyon ve saflaştırması için

In vitro tanı amaçlı kullanım için

Sadece profesyonel kullanım için

REF

09001050 – 50 test

09001100 – 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	10
Sorun Giderme Kılavuzu	11

Kit İçeriği

Sağlanan Malzeme	10 test	50 test	100 test
Proteinaz K *	1 mg	5 mg	10 mg
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 kılavuzu	1	1	1

* Proteinaz K ve yıkama solüsyonlarını hazırlamak için “Başlamadan Önce Notlar” kısmını okuyunuz.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

Proteinaz K hariç RTA genomik DNA izolasyon 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 Kandan Genomik DNA İzolasyon Kit'i biyolojik materyallerden *in vitro* nükleik asit ekstraksiyon sistemidir. Tanı amaçlı RTA Real-Time PCR Kitleri ile kullanılmak üzere örnek hazırlamak için tasarlanmıştır. Kandan saflaştırılan genomik DNA daha sonra PCR, Real-Time PCR, klonlama, RFLP analizi ve sekanslama gibi hassas moleküler ve tanı uygulamalarında kullanılabilir. Kit'in kullanımı sitrat, heparin ya da EDTA ile muamele edilmiş taze ya da dondurulmuş insan kanı ile kullanım için onaylanmıştır.

Ürün Kullanım Limitleri

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

Kit'in kullanımı sitrat, heparin ya da EDTA ile muamele edilmiş taze ya da dondurulmuş insan kanı ile doğrulanmıştır. Diğer örneklerle çalışmak doğru olmayan sonuçlar verebilir.

Güvenilir sonuçlar örneğin doğru toplanmasına, taşınmasına, muhafaza edilmesine ve işlem metodlarına bağlıdır.

İyi eğitilmiş personel tarafından profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.

RTA Kandan Genomik DNA İzolasyon Kiti, RTA Real-Time PCR kitleri gibi tanı kitleri ile birlikte kullanılmak üzere örnek hazırlama amaçlıdır.

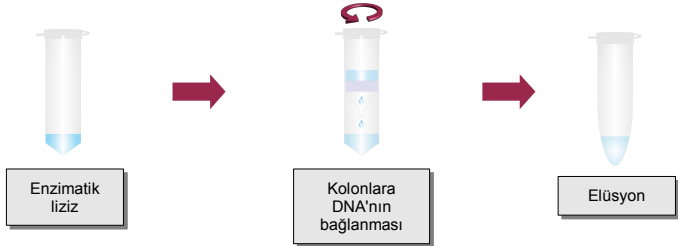
Optimum izolasyon verimi için kullanım kılavuzundaki direktiflere sıkı bir şekilde uyulmalıdır.

Kullanım süresi dolan kitler kullanılmamalıdır.

Farklı lotlara ait kitlerin bileşenleri karıştırılmamalıdır.

Giriş

Kan örneklerinden yüksek saflıkta kromozom DNA hazırlanması moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük önem taşımaktadır. Kandan DNA izolasyonu için normal prosedür zahmetli ve zaman alan bir yöntemdir. Birçok prosedür bir proteinaz ile uzun süren sindirimi (1-16 saat) veya fenol ve kloroform gibi zararlı organik çözücülerin kullanımını gerektirir. Burada 25-30 dakika içinde tam kandan saf DNA elde edilen yeni basit ve ucuz bir yöntem sunulmaktadır. Ürünün yüksek verim ve kalitesi, özel olarak dizayn edilmiş genomik DNA'ya özgü spin kolonların kullanımı ve optimize edilmiş liziz ve yıkama solüsyonlarının içeriği ile sağlanmaktadır. Kit, taze kan veya sitrat, heparin veya EDTA'da korunmuş donmuş kan örnekleri ile kullanılabilir. 200 µl kan örneği kullanılan kitle beklenen boyutu 20kb'dan yüksek olan 4-6 µg arasında saflaştırılmış genomik DNA elde etmek mümkündür. Tam kan örneklerinden elde edilen DNA miktarı genellikle kaynağa ve bunun saklama koşullarına bağlı olsa da kit spin kolonlarının maksimum DNA tutma kapasitesi 25 µg'dır. Kitle elde edilen DNA'nın 260nm/280nm oranı 1,8 ile 1,9 arasındadır. Elde edilen DNA PCR, Southern blot, Restriksiyon enzim kesimleri vb. yüksek saflık isteyen birçok işlemden kullanım için uygundur.



Uyarılar ve Önlemler

Tüm klinik örnekler ve işlemler sonrası atıklar potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak muamele edilmelidir; örnekler Biyo-güvenlik seviye 1 ya da örneğe bağlı olarak Biyo-güvenlik seviye 2 alanlarında hazırlanmalıdır.

Çalışmaya başlamadan önce ve sonra tüm çalışma yüzeyleri taze hazırlanmış %10 çamaşır suyu ya da antiviral ajanlarla dezenfekte edilmelidir.

Kullanılmayan kıyasallar, 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.

Klinik örneklerle ya da kit içerisindeki kimyasallarla çalışırken personel koruyucu ekipmanlar kullanınız (gözlük, eldiven, koruyucu giysiler). Örneklerle ve test kimyasalları ile çalışıldıktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız. 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 DNaz-RNAsız 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.

Uyarılar ve Önlemler (devam)

Kit ile sağlanan solüsyonların bazıları guanidinyum tuzları içermektedir; çamaşır suyu ya da asidik çözeltiler ile karıştığı takdirde reaktif bileşikler ve toksik gazlar meydana gelebilir. Örnek hazırlanması sırasında açığa çıkan atıkların üzerine direkt olarak çamaşır suyu ya da asidik solüsyonlar eklemeyiniz.

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

- 96-100% etanol (Moleküler biyoloji derecesi)
- Steril dH₂O
- Isıtıcı blok veya su banyosu
- Vorteks cihazı
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5ml)
- Mikropipet seti
- Filtreli mikropipet uçları

Başlamadan Önce Notlar

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 saklanır.

Proteinaz K		
Test sayısı	Sağlanan miktar	Eklenecek dH₂O
10 test	1 mg	0.2 ml
50 test	5 mg	1 ml
100 test	2 x 5 mg	2 x 1 ml

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

Solüsyon W1		
Test sayısı	Sağlanan miktar	Eklenecek etanol
10 test	4 ml	4 ml
50 test	19 ml	19 ml
100 test	38 ml	38 ml
Solüsyon W2		
Test sayısı	Sağlanan miktar	Eklenecek etanol
10 test	6 ml	2 ml
50 test	28.5 ml	9.5 ml
100 test	57 ml	19 ml

Protokol

- 1) 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpünün dibine 20 µl Proteinaz K eklenir, 200 µl örnek eklenir ve 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır. Kan örneği donmuş ise, 37°C'deki su banyosunda çözdürülür. Örnek eklendikten sonra fazla beklenmemelidir, aksi takdirde verim düşebilir.
- 2) 250 µl Solüsyon B eklenir.
- 3) 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
- 4) Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65°C'de 15 dakika inkübe edilir.
- 5) 200 µl etanol (% 96-100) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
- 6) Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarılır.
- 7) 6.000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- 8) 700 µl Solüsyon W1 eklenir. 6.000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- 9) 700 µl Solüsyon W2 eklenir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirilir.
- 10) 14.000 x rpm'de 30 saniye santrifüj yapılır.
- 11) Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilir.
- 12) 200 µl 70°C'ye ısıtılmış Solüsyon E eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir. 14.000 x rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır.
- 13) Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA bulunur.

Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Sebebe	Çözüm
Tıkanmış kolon	Örnek çok fazla	200 µl'den fazla kan kullanılıyorsa, Proteinaz K, Solüsyon B ve etanol hacimlerini aynı oranda arttırın. Lizatı parçalar halinde bir kolondan geçirin.
	Tamamlanmamış liziz	4. basamakta iyi karıştırıldığından emin olun.
Düşük DNA miktarı	Yanlış yıkama	Yıkama solüsyon konsantrelerinin belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltildiğini doğrulayınız. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayınız.
	Zayıf elüsyon	Elüsyonu tekrarlayın veya elüsyon hacmini arttırın.
	Tıkanmış kolon	Yukarıyı okuyunuz.
Düşük A₂₆₀ / A₂₈₀	Kolona aşırı yüklemekten dolayı ya da yetersiz lizizden dolayı saflaştırma tamamlanmamıştır.	Başlangıçtaki kan hacmini düşürün ya da "Tıkanmış kolon" bölümüne bakın.
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.007 Revizyon Tarihi/Revizyon No:04.05.2012/3