



RTA[®] Viral DNA İzolasyon Kiti Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2010-05

IVD

In vitro tanı amaçlı insan plazma ve serum örneklerinden viral nükleik asit izolasyon ve saflaştırılması için

In vitro tanı amaçlı kullanım için

Yalnızca profesyonel kullanım için

REF

09006050 - 50 test
09006100 - 100 test

CE

RTA



İçindekiler

Kit İÇeriği	4
Saklama Koşulları ve Dayanıklılık	4
Kullanım Amacı	5
Ürün Kullanım Limitleri	5
Giriş	6-7
Uyarılar ve Önlemler	8-9
Gerekli Diğer Malzemeler	9
Başlamadan Önce Notlar	10-11
Protokol	12
Sorun Giderme Kılavuzu	13

Kit İçeriği

Sağlanan malzeme	Açıklama	50 test	100 test
Proteinase K*	Proteinaz K	5 mg	10 mg
RNA Carrier*	RNA Taşıyıcı	1 vial	1 vial
Solution B	Bağlama Solüsyonu	13.75 ml	27.5 ml
Solution W1*	Yıkama Solüsyonu	19 ml	38 ml
Solution W2*	Yıkama Solüsyonu	28.5 ml	57 ml
Solution E	Elüsyon Solüsyonu	6 ml	11 ml
Spin Columns	Kolonlar	50	100
Collection Tubes (2 ml)	2 ml Tüpler	150	300
Collection Tubes (1.5 ml)	1.5 ml Tüpler	50	100
Kullanma Kılavuzu		1	1

* RNA Taşıyıcı, Proteinaz K ve Yıkama Solüsyonlarının hazırlanması için "Başlamadan Önce Notlar" bölümüne bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

Proteinaz K hariç RTA Viral 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 Proteinaz K alikotlara bölünüp -20°C'de saklanmalıdır. Bu şartlar altında kit en az 12 ay saklanabilir.

Kullanım Amacı

RTA Viral DNA İzolasyon Kiti biyolojik materyallerden *in vitro* nükleik asit ekstraksiyon sistemidir. RTA Real-Time PCR Kitleri gibi tanı kitleri ile kullanılmak üzere örnek hazırlamak için tasarlanmıştır. Hücrelerden ya da hücreyel yapılardan saflaştırılan viral DNA daha sonra PCR, Real-Time PCR, klonlama, RFLP analizi ve sekanslama gibi hem moleküler uygulamalarda hem de tanı uygulamalarında kullanılabilir. Bu kit EDTA antikoagulanlı toplanmış insan serum ya da insan plazmasıyla kullanılmak üzere onaylanmıştır.

Ürün Kullanım Limitleri

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

Kitin kullanımı antikoagulan olarak EDTA ile muamele edilmiş insan serum ya da insan plazmaları için onaylanmıştır. 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 Viral DNA İzolasyon Kiti, RTA Real-Time PCR kitleri gibi tanı kitleriyle kullanılmak üzere örnek hazırlamak için tasarlanmıştır.

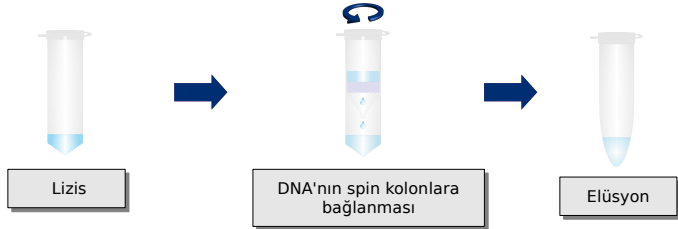
Optimum izolasyon verimi için kullanım kılavuzundaki direktiflere sıkı bir şekilde uyulmalıdır.

Kullanım süresi dolan kitler kullanılmamalıdır.

Farklı lotlara ait kitlerin bileşenleri karıştırılmamalıdır.

Giriş

Enfeksiyon tanısında nükleik asitlerin tespiti, klinik örneklerden DNA'nın başarılı bir şekilde ayrılmasına bağlıdır. Klinik materyaller genellikle DNA'nın işlenmesi için gerekli enzimleri inhibe eden bir çok molekülü içermektedir. Önceki bir çok prosedür fenol ve kloroform gibi zararlı organik çözücülerin kullanımını veya klinik örneğin kaynatılması gibi zahmetli işleri gerektiriyordu. Bu yöntemler rutin klinik laboratuvarlar için uygun yöntemler değildi. Nükleik asitlerin tespitindeki bazı uygulamalar çok hassas teknikler ve yüksek verim gerektirdiği için nükleik asitlerin saflaştırılması aşamaları büyük önem kazanmıştır. Örneğin, PCR hızlı laboratuvar teşhisine ve bazı viral enfeksiyonların acil yönetimine olanak sağlamıştır. Virüsler, serum ve plazma gibi biyolojik sıvılarda düşük yoğunlukta bulunmaktadır. "RTA Viral DNA İzolasyon Kiti" serum ve plazma örneklerinden yüksek saflıkta DNA elde edebilir, yüksek verim sağlar ve klinik laboratuvarlar için pratik bir yöntem sunmaktadır.



Giriş **(devam)**

Prosedür basitçe şöyle işler; yüksek denatürasyon sağlayıcı koşullarda serum veya plazma örneklerinde lizis başlatılırken DNazlar ve RNazlar da inaktif hale getirilir. Prosedürün başlangıcında eklenen RNA Taşıyıcı (RNA Carrier) örnekteki viral DNA'ların kolonlara bağlanma verimini artırır. Lizis adımından sonra serbest kalan viral DNA'lar kolonlara aktararak seçici olarak silica jel bazlı membranlara bağlanırlar. İki adımlı yıkamalar sonrasında protein, nukleaz ve inhibitör gibi kontaminantlar da ortamdan uzaklaştırılarak yüksek derecede saf viral DNA elde edilir.

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 kiyasallar, 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.

İşlemler kontaminasyonu engellemek amacıyla dört ayrı alanda gerçekleştirilmelidir (örneğin; RNA ekstraksiyonu, PCR kurulumu, örnek eklenmesi ve çoğaltım alanı olarak). Özel bir işlem için gerekli olan tüm elemanlar, işlemin gerçekleştirileceği alanda bulundurulmalı ve farklı alanlar arasında taşınmamalıdır. Bir alandan diğerine geçileceği zaman eldivenler değiştirilmeli ve çıkarılan eldivenler alanı terketmeden önce atılmalıdır. Laboratuvar önlükleri çalışılan alana özel olmalı ve o alanın dışında giyilmemelidir. Çalışma akışı ekstraksiyon alanı ile başlayarak daha sonraki işlemleri takip edecek şekilde tek yöne doğru olmalıdır.

Uyarılar ve Önlemler (devam)

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.

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.

Bir hastanın tanısı sırasında tek tip ekstraksiyon sistemi kullanılmalıdır. Eğer RTA Nükleik Asit İzolasyon Kiti yerine başka bir sistem varsa, her iki test en azından iki örnek için paralel olarak kullanılmalıdır.

Son kullanma tarihi geçmiş kitleri kullanmayınız.

Gerekli Diğer Malzemeler

- 96-100% etanol (Moleküler biyoloji derecesinde)
- Steril dH₂O
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5ml)
- Su banyosu (donmuş örnekler için)

Başlamadan Önce Notlar

Test sonunda elde edilen DNA miktarı ortamdaki nükleaz kontaminasyonuna bağlıdır. Dolayısıyla deney sırasında ellerin, solüsyonlarla temasta olan plastiklerin ya da cam malzemelerin ve testin yapıldığı alanların dekontamine edilmesi çok önemlidir. Çalışma sırasında tek kullanımlık lateks ya da vinil eldivenler sürekli kullanılmalıdır. Prosedür boyunca kullanılan pipet ucu, mikrosantrifüj tüpü gibi plastik sarf malzemelerin RNaz/DNaz içermemesi gerekmektedir.

Kullanmadan önce aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi Liyofilize RNA Taşıyıcı içerisine uygun miktarda solüsyon E ve Proteinaz K tüpüne de uygun miktarda steril su ekleyiniz. Ekleme işleminden sonra iyice vorteksleyiniz. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra RNA Taşıyıcı ve Proteinaz K solüsyonları alikotlar halinde farklı tüplere bölünerek -20 °C'de saklanmalıdır. Alikotlar 3-4 defadan daha fazla dondurup çözündürülmemelidir, aksi takdirde elde edilen viral DNA miktarında azalma görülebilir.

	Liyofilize RNA Taşıyıcı	Proteinaz K
<i>Kit Boyutu</i>	<i>Eklenecek Solüsyon E</i>	<i>Eklenecek dH₂O</i>
10 test	160 µl	0.2 ml
50 test	330 µl	1 ml
100 test	660 µl	2x1 ml

Başlamadan Önce Notlar (devam)

Solüsyon W1 ve Solüsyon W2 konsantredir. İlk kullanımdan önce şişenin üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda etanol (%96-100) eklenir. Solüsyonların şişeleri kullanımlar arasında buharlaşmadan korumak için sıkıca kapatılmalıdır. Etanol eklenmiş solüsyonlar oda sıcaklığında saklanmalıdır (15-25 °C).

Solüsyon W1		
<i>Kit Boyutu</i>	<i>Orjinal Miktar</i>	<i>Eklenecek Etanol</i>
10 test	4 ml	4 ml
50 test	19 ml	19 ml
100 test	38 ml	38 ml

Solüsyon W2		
<i>Kit Boyutu</i>	<i>Orjinal Miktar</i>	<i>Eklenecek Etanol</i>
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 6  l RNA Taşıyıcı ve 20  l Proteinaz K eklenir.
2. 200  l serum veya plazma eklenir ve 250  l Solüsyon B eklenip 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
3. Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65  C'de 15 dakika inkübe edilir.
4. 200  l etanol (96-100%) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
5. Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarılır.
6. 6,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki t p atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
7. 700  l Solüsyon W1 eklenir. 6,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
8. 700  l Solüsyon W2 eklenir. 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
9. 14,000 x rpm'de 30 saniye santrifüj yapılır.
10. Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edilir.
11. 50-100  l 70  C'ye ısıtılmış Solüsyon E eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
Eğer örnekteki virüs yoğunluğu az ise 50  l Solüsyon E eklenir. Aksi takdirde 100  l'ye kadar Solüsyon E kullanılabilir. Solüsyon E 'nin hacmini, saflaştırılan DNA'nın sonraki işlemlerdeki gerekliliklerine göre ayarlayınız.
12. 14,000 x rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır.
13. Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda viral DNA bulunur.

 nemli Notlar:

- Serum ya da plazma  rneği donmuş halde ise, 37 C'deki su banyosunda  z d r l r.
- Protokol  rnek hacmine göre orantılı olarak ölçeklenebilir. Bu durumda örnek miktarının değişimine bağlı olarak RNA Taşıyıcı, Proteinaz K, Solüsyon B ve etanol hacimleri doğru orantılı olarak arttırılmalıdır.

Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Neden	Çözüm
Tıkanmış kolon	Örnek çok fazla	200 µl'den fazla örnek kullanılıyorsa, Proteinaz K, Solüsyon B ve etanol hacimlerini aynı oranda arttırın. Lizatı parçalar halinde bir kolondan geçirin. .
	Tamamlanmamış liziz	3. basamakta iyi karıştırıldığından emin olun.
Düşük DNA miktarı	Yanlış yıkama	Yıkama solüsyon konsantrelerinin belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltilmediğini doğrulayınız. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayınız.
	Zayıf elüsyon	Elüsyon hacmini düşürün.
	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.005 Revizyon Tarihi/Revizyon No:05.01.2012/2