



RTA®

Viral Nükleik Asit İzolasyon Kiti Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2011-10

IVD

In vitro tanı amaçlı insan serum veya plazma (EDTA) örneklerinden viral DNA ve RNA izolasyon ve saflaştırılması amacıyla kullanım için

In vitro tanı amaçlı kullanım için

Yalnızca profesyonel kullanım için

REF

09029050 - 50 test

09029100 - 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
RNA Carrier *	RNA Taşıyıcı	1 viyal	1 viyal
Proteinase K *	Proteinaz K	25 mg	25 mg x 2
Solution RL	Lizis Solüsyonu	27,5 ml	55 ml
Solution W1 *	Yıkama Solüsyonu	19 ml	38 ml
Solution W2 *	Yıkama Solüsyonu	7,5 ml	15 ml
Solution E	Elüsyon Solüsyonu	6 ml	12 ml
Spin Columns	Kolonlar	50	100
Collection tubes (2 ml)	2 ml Tüpler	300	600
Collection tubes (1,5 ml)	1,5 ml Tüpler	50	100
Kullanma Kılavuzu		1	1

* RNA Taşıyıcı, Proteinaz K ve yıkama solüsyonlarını hazırlamak için "Başlamadan Önce Notlar" kısmına bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

RTA Viral Nükleik Asit İzolasyon Kit'inin tüm parçaları aksi belirtilmedikçe oda sıcaklığında (15–25°C) ve kuru ortamda saklanmalıdır. RNA Taşıyıcı ve Proteinaz K kit teslim alındıktan sonra vakit kaybetmeden -20°C'ye konulmalıdır. Saklama sırasında daha yüksek sıcaklıklardan kaçınılmalıdır. Bu şartlar altında kit kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin belirtilen koşullardan daha düşük sıcaklıklarda saklanması bazı solüsyonlarda çökelti oluşmasına ve kitin performansının etkilenmesine neden olabilir.

Kullanım Amacı

RTA Viral Nükleik Asit 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 hücreSEL yapılardan saflaştırılan viral DNA ve RNA daha sonra PCR, Real-Time PCR, klonlama, RFLP analizi ve sekanslama gibi hem moleküler hem de tanı uygulamalarında kullanılabilir. Bu kit EDTA antikoagulanlı insan serum ya da insan plazmasıyla kullanılmak üzere onaylanmıştır.

Ürün Kullanım Limitleri

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

Kit'in 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 Nükleik Asit İzolasyon Kiti, RTA Real-Time PCR kitleri gibi tanı kitleri ile birlikte kullanılmak üzere örnek hazırlamak için tasarlanmıştır.

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

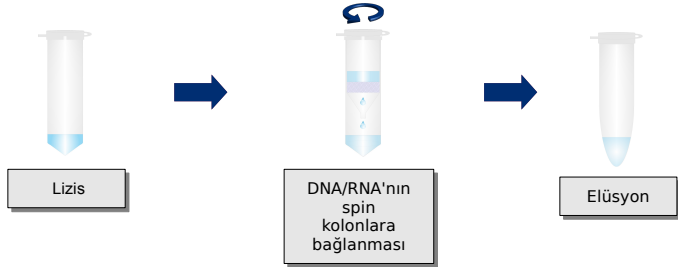
Kullanım süresi dolan kitler kullanılmamalıdır.

Farklı lotlara ait kitlerin bileşenleri karıştırılmamalıdır.

Giriş

Serum ve plazma örneklerinden yüksek saflıkta viral nükleik asit elde edilmesi tıp ve moleküler araştırma disiplinlerinde büyük önem taşımaktadır. Viral etkenler içeren serum ve plazma örneklerinden RTA Viral Nükleik Asit İzolasyon Kiti sayesinde yüksek saflıkta, hızlı ve basit bir yöntemle viral nükleik asitler elde edilir. Enzimatik bir işlem gerektirmeden 20-25 dakikada çalışma tamamlanabilmektedir. Viral nükleik asitlere özel olarak dizayn edilmiş silica bazlı spin kolonların ve optimize edilmiş lizis ve yıkama solüsyonlarının içeriği sayesinde işlem sonucunda yüksek verimlilikle ve saflıkta viral DNA ve RNA elde edilebilmektedir.

10 test, 50 test ve 100 testlik olarak kullanıma sunulan RTA Viral Nükleik Asit İzolasyon Kiti için 500 µl serum veya plazma örneği yeterlidir. Kit'in kolay çalışma prosedürü sayesinde basit laboratuvar altyapısı ile aynı anda birçok örnekten viral nükleik asitler saflaştırılabilmektedir. Elde edilen viral nükleik asitler direkt olarak RT-PCR, qRT-PCR, qPCR, virüslerin tespit edilmesi, viral yük belirlenmesi ve viral genotipleme gibi çeşitli işlemler için uygundur.



Giriş **(devam)**

Prosedür basitçe şöyle işler; yüksek denatürasyon sağlayıcı koşullarda serum veya plazma örneklerinde lizis başlatılırken nükleazlar da inaktif hale getirilir. Prosedürün başlangıcında eklenen RNA Taşıyıcı (RNA Carrier) örnekteki viral nükleik asitlerin kolonlara bağlanma verimini artırırken nükleazlar tarafından yıkımını da önler. Lizis adımından sonra serbest kalan viral nükleik asitler kolonlara aktarılacak seçici olarak silica jel bazlı membranlara bağlanırlar. İki adımlı yıkamalar sonrasında protein, nükleaz ve inhibitör gibi kontaminantlar da ortamdan uzaklaştırılarak yüksek derecede saf viral nükleik asit 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 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.

Klinik örneklerle ya da kit içerisindeki kimyasallarla çalışırken personel koruyucu ekipmanlar kullanınız (gözlük, eldiven, koruyucu giysiler). Örneklerle ve test kimyasalları ile çalışıldıktan sonra eller 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 Nükleik Asit 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 Rnaz/DNAsız 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.

Kit'i 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 (2 ml)
- Su banyosu (donmuş örnekler için)

Başlamadan Önce Notlar

Test sonunda elde edilen DNA/RNA miktarı ortamdaki nükleaz kontaminasyonuna bağlıdır. Oldukça stabil olan RNaz enzimleri düşük miktarlarda bulunsalar bile kısa bir sürede ortamdaki RNA'ları yıkabilmektedir. 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 ve steril tek kullanımlık plastik malzemeler kullanılmalıdır. Prosedür boyunca kullanılan pipet ucu, mikrosantrifüj tüpü gibi plastik sarf malzemelerin RNaz/DNaz içermemesi gerekmektedir.

RL solüsyonunda uzun süreli saklama periyotlarında ortam sıcaklığına bağlı olarak çökelti oluşabilir. Her kullanımdan önce RL Solüsyonu kontrol edilmelidir. Çökeltinin oluştuğu durumlarda 37°C'lik su banyosunda solüsyon tekrar homojen hale gelmesi için bekletilmelidir.

İlk kullanımdan önce liyofilize RNA Taşıyıcı tüpüne, test sayısına bağlı olarak aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda E Solüsyonu ve Proteinaz K tüpüne de belirtilen miktarlarda distile su eklenir ve vorteks yapılarak iyice çözündürülür. Çözündürme aşamasından sonra ana solüsyonlar kullanım sıklığına bağlı olarak küçük miktarlarda porsiyonlanarak -20°C' de saklanmalıdır. Her porsiyon RNA Taşıyıcı ve Proteinaz K en fazla 3-4 kere dondurulup çözülmelidir, aksi halde elde edilen DNA/RNA'da kayıplar meydana gelebilir.

Test Sayısı	Liyofilize RNA Taşıyıcı'ya eklenecek Solüsyon E	Proteinaz K'ya eklenecek dH2O
10 test	160 µl	250 µl
50 test	800 µl	1250 µl
100 test	2x 800 µl	2 x 1250 µl

**Başlamadan
Önce
Notlar
(devam)**

İlk kullanımdan önce W1 Solüsyonu ve W2 Solüsyonu şişelerine test sayısına bağlı olarak aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda etanol (96-100%) eklenir. Kullanıldıktan sonra buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapatılmalıdır. Solüsyonlar etanol eklendikten sonra oda sıcaklığında (15-25°C) saklanır.

W1 Solüsyonu		
Test Sayısı	Orijinal Miktar	Eklenecek Etanol
10 test	4 ml	4 ml
50 test	19 ml	19 ml
100 test	38 ml	38 ml

W2 Solüsyonu		
Test Sayısı	Orijinal Miktar	Eklenecek Etanol
10 test	1.5 ml	6 ml
50 test	7,5 ml	30 ml
100 test	15 ml	60 ml

Protokol

1. 25 µl Proteinaz K ve 500 µl serum ya da plazma 2.0 ml'lik tüpün içerisine konulur.
2. Örneğin zerine 500 µl Solution RL, 15 µl RNA Taşıyıcı ve 2.5 µl internal kontrol eklenir. Vurum-vorteks ile 20 defa karıştirılır.
3. Oda sıcaklığında (15-25 °C) alkalanarak 15 dakika inkübe edilir.
4. Kısa santrifüjden sonra 650 µl etanol (96-100%) eklenerek 20 kez 1-2 saniyelik kısa aralıklarla vortekslenir. 3 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
5. Karışımın 860 µl'si kolona transfer edilir. 1 dakika 6,000 x g'de santrifüj yapılır. Alttaki tüpteki sıvı atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
6. Karışımın geri kalanı için 5. adım tekrarlanır. Sıvı içeren alttaki tp atılır ve yıkama adımı için kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
7. 700 µl Solution W1 eklenir. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
8. 700 µl Solution W2 eklenir. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
9. 700 µl etanol (96-100%) eklenir. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
10. Tüpün kapağı açık bırakılarak kalan etanol'n uçması için 60°C'de 5 dakika çalkalanarak bekletilir.
11. 16,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır.
12. Spin kolon steril 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilir.
13. 50 µl Solution E eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
14. 16,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır.
15. Spin kolon atılır. Mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda viral DNA/RNA bulunmaktadır. Elde edilen viral DNA/RNA zeltisi direkt olarak çeşitli PCR uygulamalarında kullanılabilir, aksi halde -20°C ya da -80°C' de saklanmalıdır.

Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Neden	Çözüm
Düşük DNA/RNA miktarı	RNaz kontaminasyonu	Çalışma ortamında RNaz bulunmamasını sağlayın. Elüsyon sonrası hemen kullanılmayan DNA/RNA'lar uzun süreli kullanımlar için -20°C ya da -80°C'de saklanmalıdır.
	Yanlış yıkama	Yıkama solüsyonlarının belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltildiğinden emin olun. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayın.
	Zayıf elüsyon	Elüsyon basamağını tekrarlayın veya elüsyon hacmini arttırın.
	Degrade olmuş ya da düşük konsantrasyonda RNA Taşıyıcı	Kitle gelen liyofilize taşıyıcı RNA 'nın doğru porsiyonlandığından emin olun. 3-4 kereden fazla dondurulup çözülen RNA Taşıyıcı'yı kullanmayın.
Elde edilen DNA/RNA'lar ile yapılan deneyler çalışmıyor	Eluatta çok düşük konsantrasyonda DNA/RNA	DNA/RNA'yı alkol ile çöktürün, daha sonra daha küçük hacimde Solution E veya dH ₂ O ile çözün.
	Elde edilen DNA/RNA'da yüksek tuz içeriği	DNA/RNA'yı etanol 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.014 Revizyon Tarihi/Revizyon No:04.01.2012/1