



RTA[®] Gaitadan DNA İzolasyon Kiti

Kullanım Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2014-07

Gaita örneklerinden deoksiribonükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması içindir.

Yalnızca *araştırma* amaçlıdır.

Diagnostik amaçlı kullanıma uygun değildir.

Yalnızca profesyonel kullanım içindir.

REF

09028010 - 10 Test

09028050 - 50 Test

09028100 - 100 Test

İçindekiler

Kit İçeriği.	2
Saklama Koşulları ve Dayanıklılık.	2
Kullanım Amacı.	3
Ürün Kullanım Kısıtları.	3
Uyarılar ve Önlemler.	3
Kısaltmalar.	4
Gerekli Diğer Malzemeler.	4
Giriş.	5
Başlamadan Önce Notlar.	6
Protokol.	7-8-9
Sorun Giderme Kılavuzu.	9-10

Kit İçeriđi

Sađlanan Malzeme	Miktar		
	10 test	50 test	100 test
Proteinaz K*	6 mg	30 mg	60 mg
Örnek hazırlama tüpü (Solüsyon STL) [†]	10	50	100
Solüsyon B	7,5 ml	35 ml	60 ml
Solüsyon W1*	5 ml	20 ml	40 ml
Solüsyon W2*	6 ml	30 ml	60 ml
Solüsyon E	5 ml	15 ml	25 ml
Spin Kolonlar	10	50	100
Toplama Tüpleri (2 ml)	50	250	500
Toplama Tüpleri (1.5 ml)	10	50	100
Kullanım Kılavuzu	1	1	1

* Kitin ilk kullanımından önce hazırlanmalıdır. Detaylar için bu kullanma kılavuzunun “Başlamadan Önce Notlar” kısmına bakınız.

† Saklama esnasında çökelti oluşabilir. Kullanmadan önce oluşan çökeltiyi çözmek için ısıtınız. Detaylar için bu kullanma kılavuzunun “Başlamadan Önce Notlar” kısmına bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

Proteinaz K hariç kitin geri kalan diğer tüm bileşenleri oda sıcaklığında saklanmalıdır (15-25 °C). Kiti direkt güneş ışığına maruz bırakmayınız. Proteinaz K steril suda çözüldükten sonra 2-8 °C arasında saklanmalıdır. Uzun süreli saklamak için Proteinaz K istenilen miktarda bölünerek -20 °C’de saklanmalıdır. Kit, bu koşullar altında kullanıldığında herhangi bir performans kaybı olmaksızın 12 ay boyunca saklanabilir.

Kullanım Amacı

RTA Gaitadan DNA İzolasyon Kiti, taze veya donmuş gaita örneklerinden hem mikrobiyal hem konak genomik DNA'sının izolasyonu için tasarlanmış in vitro nükleik asit ekstraksiyon sistemidir. İleri aşamadaki moleküler biyoloji uygulamalarıyla birlikte kullanılmaya yönelik örnek hazırlama amacıyla kullanılır. RTA Gaitadan İzolasyon Kiti sadece araştırma amaçlı kullanılmak için tasarlanmıştır. Hastalık tanı ve tedavisine yönelik değildir.

Ürün Kullanım Kısıtları

- RTA Gaitadan izolasyon kiti, genel nükleik asit saflaştırma amacına yöneliktir ve herhangi bir spesifik organizmaya yönelik tasarlanmamıştır. Klinik amaçlı kullanılamaz. Kullanıcının spesifik deney dizaynına uygun olup olmadığı kullanıcının takdirine bırakılmıştır.
- Bu kitin sadece insan dışısından DNA izole etme yeteneği doğrulanmıştır.
- Kullanılacak örneğin alınması, taşınması ve saklanması da en az saflaştırma kadar önemli ve sonucu etkileyebilecek hassasiyetteki aşamalardır.
- Sadece eğitimli personel tarafından, profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.
- Farklı lotlara sahip kit bileşenleri birleştirilmemeli ya da bir arada kullanılmamalıdır.

Uyarılar ve Önlemler

- Tüm klinik örneklere ve bunlardan çıkan artık ve çöplere, potansiyel enfektif madde olarak muamele edilmeli ve buna göre imha edilmelidir.
- Tüm örnekler Biyogüvenlik Seviyesi 1 ya da 2 olan alanlarda ya da Class II tipindeki Biyogüvenlik Kabinlerinde hazırlanmalıdır.
- Çalışmadan önce ve sonra tüm yüzeyler tek kullanımlık bir kağıt havlu ya da peçete yardımı ile %20 oranında distile suda seyreltilmiş ve günlük olarak taze hazırlanmış çamaşır suyu ile silinmelidir.
- Tek kullanımlık eldiven, gözlük, vizör, tek kullanımlık kolluk, tek kullanımlık maske gibi laboratuvar güvenlik sarflarını kullanmayı ihmal etmeyiniz.

- Kit bileşenlerinden herhangi biri teniz ile temas ederse hiç vakit kaybetmeden bol su ile yıkayınız. Gözünüz ya da ağız içi gibi mukus membranınızla temas etmesi halinde ise temas eden bölgeyi yine bol su ile yıkayınız, fakat bu kez bir hekime de başvurmayı ihmal etmeyiniz.
- Mümkünse filtreli pipet uçlarını tercih ediniz.
- Kitin içindeki bazı solüsyonlar Guanidin tuzları içermektedir. Bu tuzlar çamaşır suyuyla karıştırıldıklarında reaktif bileşikler ve toksik gazlar oluştururlar. Bu solüsyonları ya da izolasyon sırasında ortaya çıkan çöpü çamaşır suyu ile karıştırmayınız.
- Kiti DNA ve RNA, özellikle de amplifiye olmuş nükleik asit gibi kontaminasyon kaynaklarından uzak tutunuz.
- Farklı lot numarasına sahip solüsyonları birbiri ile karıştırmayınız ya da başka firmaların ürünü 2 i bunların yerine kullanmayınız ya da kombine etmeyiniz.
- Daha fazla bilgi için, lütfen www.rtalabs.com.tr adresinden talep edebileceğiniz Malzeme Güvenlik Bilgi Formu (MGBF)'na başvurunuz.

Kısaltmalar

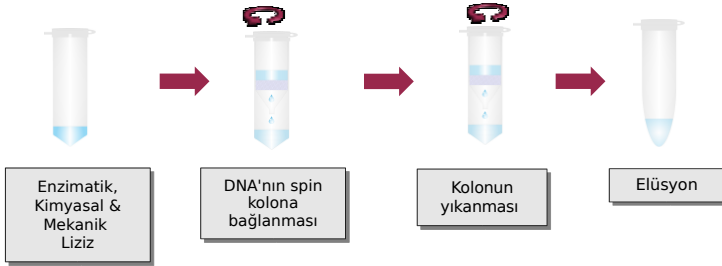
- MBD; Moleküler Biyoloji Derecesinde; DNase & Rnase bulundurmayan
- EtOH; Absolüt Etanol
- µL; Mikrolitre
- mL; Mililitre
- deH2O; De-iyonize su (Type 1 ASTM'ye göre)

Gerekli Diğer Malzemeler

- Moleküler Biyoloji Derecesinde (DNase & RNase bulundurmayan) deH2O
- Termal blok veya su banyosu
- Moleküler Biyoloji Derecesinde 96-100% Etanol
- Mikrosantrifüj
- Vorteks karıştırıcı
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml)
- Mikrosantrifüj tüpleri (2.0 ml)
- Mikropipet seti ve steril filtreli mikropipet uçları
- Spatula

Giriş

RTA Gaitadan DNA İzolasyon Kiti taze veya donmuş gaita örneklerinden çeşitli organizmaların ve konak hücrelerin total DNA izolasyonu için hızlı ve kullanışlı bir yöntem olması amacıyla geliştirilmiştir. Kitin çalışma prensibi DNA'nın yüksek konsantrasyondaki kaotrofik tuzlar varlığında cam fiberi (silika) membranlara bağlanabilmesine dayanmaktadır. Kitin üstün performansa sahip olması, son derece dayanıklı parazit hücre duvarlarını parçalayarak açılmasının yanı sıra, gaitada mevcut PCR inhibitörlerini de uzaklaştırabilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Spesifik olarak optimize edilmiş liziz / yıkama solüsyonları özellikle nükleik asitleri yakalamak için geliştirilirken, STL solüsyonu örnekteki inhibitörleri uzaklaştırmak için geliştirilmiştir. İzolasyon işleminin sona ermesiyle beraber yüksek verimlilik ve saflıkta örnek elde edilir.



RTA Gaitadan DNA İzolasyon Kiti 200 mg taze ya da dondurulmuş gaitayla kullanılmak üzere optimize edilmiştir; fakat 50-200 mg miktar aralığında da kullanılabilir. Beklenen DNA ürünü 10-30 µg'dır ve örnek miktarına bağlı olarak değişebilir. Beklenen DNA konsantrasyonu 75-250 ng/µl'dir. Yeni saflaştırılmış DNA, 2-8°C 'de birkaç gün saklanabilir. Uzun süreli saklama için -20 °C önerilir.

Başlamadan Önce Notlar

Eğer kit iklimlendirme yapılmayan bir ortamda saklanıyorsa, Solüsyon STL soğuk havalarda, oda sıcaklığında çökelti oluşturabilir. Böyle bir durumda çökeltiyi çözmek için solüsyon STL şişesini, çökeltiler tamamen çözünene kadar 70 °C su banyosunda bekletiniz. Tüm solüsyonların protokol öncesinde ve protokol uygulanırken oda sıcaklığında olduğundan emin olunuz, değil ise oda sıcaklığına gelmesini bekleyiniz. Proteinaz K'yı kullanıma hazır hale getirmek için aşağıdaki tabloda verilen değerleri kullanınız. Proteinaz K'yı pipet ile karıştırmayınız ve direkt kapağını kapatıp çözünene kadar vorteksleyiniz.

Kit Boyutu	Proteinaz K (mg)	Eklenecek dH2O (ml)
10 test	6	0.3
50 test	30	1.5
100 test	2 x 30	2 x 1.5

Solüsyon W1 ve W2'yi kullanıma hazır hale getirmek için aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda absöüt etanol ekleyiniz. Akabinde elinizde ya da vorteks ile en az 10 saniye boyunca çalkalamayı ihmal etmeyiniz.

Kit Boyutu	Solüsyon W1 (ml)	Eklenilecek Ethanol (ml)	Son Hacim (ml)
10 testlik	5	5	10
50 testlik	20	20	40
100 testlik	40	40	80
Kit Boyutu	Solüsyon W2 (ml)	Eklenilecek Ethanol (ml)	Son Hacim (ml)
10 testlik	6	2	8
50 testlik	30	10	40
100 testlik	60	20	80

Protokol

Gaitadaki hücrelerin ve biyolojik yapıların parçalanması;

1. Her örnekten 50 ile 200 mg arasındaki miktarda gaitayı, içerisinde Solüsyon STL bulunan mor kapaklı örnek hazırlama tüpüne alınız.
2. En yüksek hızda 30 saniye boyunca vorteksleyiniz.
3. Örnek toplama tüpünün kapağını kırarak sıvı haldeki örneği 2 ml'lik tüpe aktarınız.
4. Örnekleri 95°C'de 20 dakika boyunca inkübe ediniz.
5. Örnek tüplerini 3 dakika boyunca 18,000 g'de santrifüj ederek çözünür (temizlenmiş, şeffaf süpernatant) ve çözünmez (pellet) fraksiyonlarına ayırınız.
6. Tüm süpernatantı alınız ve yeni bir 1.5 mL'lik mikro tüpe aktarınız.
7. Örnek tüplerini yine 18,000 g'de 3 dakika boyunca santrifüjleyiniz.
8. Her bir örnek tüpündeki süpernatantın tamamını alıp, yeni bir 1.5 mL'lik mikro tüpe aktarınız.

Temizlenmiş süpernatantdaki proteinlerin parçalanması;

9. Her bir örnek tüpüne 25 µL Proteinaz K ekleyiniz. Karıştırmak için kısaca vorteksleyiniz.
10. Her bir örnek tüpüne 500 µL Solüsyon B ekleyiniz. Karıştırmak için 5 sn vorteksleyiniz. Kısa santrifüj metodu ile, tüpün çeperlerine dağılan damlacıkları bir araya toplayınız.
11. Örnek tüplerini 70 °C'de 10 dakika boyunca inkübe ediniz. Kısa santrifüj metodu ile, tüpün çeperlerine dağılan damlacıkları bir araya toplayınız.

DNA'nın spin kolona bağlanması;

12. Her bir örnek tüpüne 650 µl absolüt etanol ekleyiniz.
13. Örnek tüplerini 5 saniye vorteksleyerek karıştırınız. Kısa santrifüj metodu ile, tüpün çeperlerine dağılan damlacıkları bir araya toplayınız.
14. Proteinleri parçalanmış ve temizlenmiş lizatın 750 µL'sini toplama tüpüne takılmış halde bulunan spin kolona aktarınız.

15. 30 saniye boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz. İçindeki kolon süzütüsü atık ile toplama tüpünü çöpe atınız.
16. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne takınız.
17. Proteinleri parçalanmış ve temizlenmiş lizatin geri kalanını da spin kolona aktarınız.
18. 30 saniye boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz. İçindeki kolon süzütüsü atık ile toplama tüpünü çöpe atınız.

Safsızlıkları uzaklaştırmak için, spin kolona bağlı halde bulunan DNA moleküllerinin yıkanması;

19. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne takınız.
20. Kolona 700 µL W1 Solüsyonu ekleyiniz.
21. 30 saniye boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz. İçindeki kolon süzütüsü atık ile toplama tüpünü çöpe atınız.
22. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne takınız.
23. Kolona 700 µL W2 Solüsyonu ekleyiniz.
24. 30 saniye boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz. İçindeki kolon süzütüsü atık ile toplama tüpünü çöpe atınız.
25. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne takınız.
26. Boş olan spin kolonu ağzı açık şekilde 70°C'de 5 dakika boyunca bekletiniz.
27. Boş olan spin kolonu 1 dakika boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz. Eğer varsa içindeki kolon süzütüsü atık ile atık toplama tüpünü çöpe atınız.

Spin kolona bağlı DNA'nın elüsyonu

28. Yıkanmış kolonu yeni bir 1.5 mL'lik elüsyon tüpüne takınız.
29. 50 µL ile 100 µL arasında istenen miktardaki Solüsyon E'yi spin kolona pipetleyiniz.
30. Spin kolonu 3 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 °C) inkübe ediniz.
31. Spin kolonu 1 dakika boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz.
32. Spin kolonu 30saniye boyunca 18,000 g'de santrifüjleyiniz.
33. Spin kolonu atınız ve DNA elüsyonunun bulunduğu elüsyon tüpünü daha sonraki işlemlerde kullanmak üzere -20 °C'de saklayınız.

Not: İzolasyon sonrası PCR uygulamalarında en iyi sonucun alınması için, PCR karışımına Betain solüsyonu eklenmesi, kesinlikle tavsiye edilmektedir. Betain solüsyonunun PCR karışımı içerisindeki son konsantrasyonu 1 - 1,25

M olacak şekilde uygulanabilir (ör. Sigma Betaine solution - 5 M, PCR Reagent Kat. No. B0300)

Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Sebebe	Çözüm
Fraksiyondan sonra lizatın homojen olmaması	Örnek miktarının fazla olması	STL Solüsyonu içeren örnek toplama tüpüne örneği eklemeyden önce örnek miktarını azaltın.
	Yetersiz santrifüj	Proteinaz K inkübasyonundan önce santrifüj adımı tekrarlayın. Lizat hazırlama aşamalarında kabarcık oluşturmamaya dikkat edin.
Kolonun Tıkanması	Lizatın homojen olmaması	Daha az örnek miktarı ile prosedürü başlatın.
	Örnek miktarının fazla olması	STL Solüsyonu içeren örnek toplama tüpüne örneği eklemeyden önce örnek miktarını azaltın.
	Yetersiz liziz	STL Solüsyonu içeren örnek toplama tüpüne örneği eklemeyden önce örnek miktarını azaltın.
	Yetersiz fraksiyon	Saflaştırma işlemi boyunca kullanılan santrifüjün protokolde belirtilen çekim kuvvetini karşıladığından emin olun. Eğer santrifüj belirtilen çekimi sağlayamıyorsa santrifüj süresini arttırın.
Düşük DNA verimi	Yanlış yıkama	Yıkama solüsyonlarının belirtilen etanol hacimleriyle seyreltilmişinden emin olun.
	Seyreltik örnek	Kullanılan elüsyon tamponunun miktarını azaltın.
	Örnekte az miktarda DNA veya hücre olması	Örnek miktarını kitin belirtilen limitlerine kadar arttırın.

Sorun	Sebeup	Çözüm
İşlem sonrası uygulamaların verimsiz çalışması ya da hiç çalışmaması	Yüksek tuz konsantrasyonu ve izole edilen DNA'daki PCR inhibitörleri gibi safsızlıklar	Protokolü daha az miktarda örnekle başlatın ve/veya DNA'yı etanolün %70 final konsantrasyonu ile iki kez tekrar ekstrakte edin. Ayrıca sorun giderme tablosunun "Düşük A260 / A280" bölümüne bakın.
	Düşük DNA verimi	Sorun giderme tablosunun aynı başlıklı "Düşük DNA verimi" bölümüne bakın.
	Arta kalan Sol W2 veya Etanol	Yıkama solüsyonu kalıntılarını uzaklaştırmak için, yıkama adımlarından sonra kolonu 1 dk boyunca santrifüj edin.
Yüksek A260 / A280	RNA kontaminasyonu	Opsiyonel RNaz adımını uygulayın: Eluata 20mg/ml'lik stoktan 10-15µL Rnaz ekleyin ve 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edin. 500µL Sol B ve EtOH ekleyin. Ardından protokolün 16. adımı ile devam edin.
Düşük A260 / A280	Aşırı yüklenmiş kolonların eksik sürede saflaştırılması ya da yetersiz liziz	Örneğin başlangıç hacmini azaltın ya da "Kolon Tıkanması" bölümüne bakın.
	Düşük Proteinaz K aktivitesi	Proteinaz K 'yı uzun vadeli stoklama için -20°C'de küçük miktarlarda porsiyonlayın. Problem devam ederse, yeni bir örnek ve Proteinaz K kullanın.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.

Ş.

Cumhuriyet Cad. No:3 GEPOSB 41400

Gebze / Kocaeli / Türkiye

Tel: 0262 648 5300

Faks: 0262 751 0677

E-posta: info@rtalabs.com.tr