



RTA®

Plasmid DNA Isolation Kit

Handbook

Date of Issue -- 2011-12

For isolation and purification of plasmid DNA from bacterial samples
For professional use only



09007050 - 50 tests
09007100 - 100 tests



Table of Contents

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Kit Contents | 4 |
| Storage and Stability | 4 |
| Intended Use | 5 |
| Product Use Limitations | 5 |
| Introduction | 6-7 |
| Warnings and Precautions | 8 |
| Additional Materials Required | 9 |
| Notes Before Starting | 9 |
| Protocol | 10-11 |
| Troubleshooting Guide | 12 |

Kit Contents

| Materials provided | Quantity | | |
|---------------------------|----------|----------|-----------|
| | 10 tests | 50 tests | 100 tests |
| Solution R | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solution L | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solution N | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solution P | 3 ml | 11 ml | 22 ml |
| Binding Solution | 5 ml | 22 ml | 44 ml |
| Wash Solution* | 2 ml | 8 ml | 16 ml |
| Spin Columns | 10 | 50 | 100 |
| Collection Tubes (2 ml) | 10 | 50 | 100 |
| Collection Tubes (1.5 ml) | 10 | 50 | 100 |
| Handbook | 1 | 1 | 1 |

* For preparation of Wash Solution see Notes Before Starting section.

Storage & Stability

All components of the RTA Plasmid DNA isolation kit except Solution R should be stored at room temperature (15–25°C). It is recommended to store Solution R at 2–8 °C after arrival of the kit for long-term usage. Under these conditions, the kits can be stored for at least 12 months.

Intended Use

RTA Plasmid DNA Isolation Kit is a plasmid extraction system from bacterial cultures. Plasmid DNA is purified from bacterial samples, which can be further used in sensitive molecular as well as diagnostic downstream applications such as PCR, endonuclease digestion, subcloning, transformation, ligation and sequencing reactions.

Product Use Limitations

RTA Plasmid DNA Isolation Kit is intended for general nucleic acid purification purposes and not for any specific organism or for any specific clinical purpose. It is up to the user's discretion whether or not it is suitable for their specific experimental needs.

Introduction

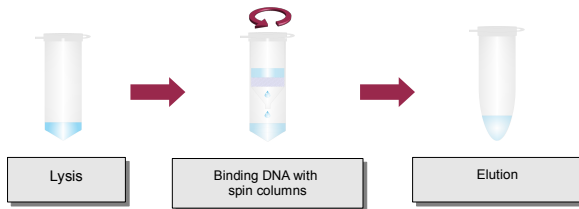
RTA Plasmid DNA Isolation Kit provides a rapid and easy method for purifying highly pure plasmid DNA from bacterial cultures without the use of phenol, chloroform, CsCl, or alcohol precipitation. Nucleic acids bind specifically to the surface of glass or silica materials in the presence of a chaotropic salt. The binding reaction occurs due to the disruption of the organized structure of water molecules and the interaction with the nucleic acids. Since the binding process is specific for nucleic acids, the bound material can be separated and purified from impurities e.g. salts and proteins, by a simple washing step. Nucleic acids elute from the matrix in a low salt buffer or water. The method is divided into three basic steps: preparation of a cleared lysate, adsorption of DNA onto glass microfiber, and washing and subsequent elution of plasmid DNA. The result is purified plasmid DNA that is ready for restriction endonuclease digestion, PCR, subcloning, transformation, ligation, and sequencing reactions.

Plasmid DNA yield can be affected by a number of factors, including plasmid copy number, insert size, the volume of culture processed, culture media and the overall binding capacity of the purification system. Of these factors, plasmid copy number, culture volume and binding capacity have the greatest influence on plasmid yield. Purified plasmid DNA is free of enzymatic inhibitors as measured by restriction endonuclease digestion. The plasmid DNA is predominantly supercoiled with no RNA contamination.

Introduction

(continued)

| | |
|----------|--|
| Yield | Up to 20 µg of plasmid DNA |
| Speed | Takes only 20 minutes to extract plasmid DNA |
| Specific | No detectable genomic DNA or RNA contamination |
| Safe | No phenol/chloroform extraction required |
| Purity | Highly purified plasmid DNA with our specially designed plasmid DNA specific columns |



Warnings and Precautions

Minimize contact with chemicals. Wear appropriate personal protective equipment when handling chemicals (for example; safety glasses, gloves or protective clothing). Minimize the inhalation of chemicals. Do not leave chemical containers open. Use only with adequate ventilation (for example; fume hood). For additional safety guidelines, consult the MSDS.

The sample-preparation waste can form highly reactive compounds when combined with bleach. DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.

Dispose of unused reagents, waste and specimens in accordance with country or local regulations.

Do not pipette by mouth.

Do not eat, drink or smoke in laboratory work areas.

Avoid contact of reagents with the skin, eyes or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with large amounts of water,

Use all pipetting devices and instruments with care and follow the manufacturer's instructions for calibration and quality control; to prevent sample contamination, use new, sterile aerosol barrier or positive displacement DNase-free pipette tips and sterile pipettes.

Handle all materials containing specimens or controls according to Good Laboratory Practices in order to prevent cross-contamination of specimens or controls. Store the kit away from any source of contaminating DNA or RNA, especially amplified nucleic acid.

Do not mix reagents with different lot numbers or substitute reagents from other manufacturers.

Do not use a kit after its expiration date.

Additional Materials Required

- 96-100% ethanol (Molecular biology grade)
- sterilized dH₂O or a low-ionic strength buffer (See the Protocol Step 11)
- vortex
- Microcentrifuge
- Microcentrifuge tubes (1.5 ml)

Notes Before Starting

- Under cool ambient conditions, a precipitate may form in Solution L. If a precipitate is observed in Solution L, incubate the bottle at 37°C for some minutes to dissolve. Always keep bottles tightly closed and the buffers should be at room temperature when performing the protocol.
- Wash Solution is a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96-100%) as indicated on the bottle and in the table below:

| <i>Kit Size</i> | <i>Wash Solution (ml)</i> | <i>Ethanol to be added (ml)</i> | <i>Final Volume (ml)</i> |
|-----------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 10 tests | 2 | 8 | 10 |
| 50 tests | 8 | 32 | 40 |
| 100 tests | 16 | 64 | 80 |

Protocol

- 1. Harvest 1.5 ml of the overnight bacterial culture for 1 minute at 14,000 rpm.**

Discard supernatant.

*Remove all traces of supernatant by inverting the centrifuge tube until all media has been drained. The pellet can then be frozen at -20°C for later use. The protocol is designed for use with 1.5 ml of *E.coli* cell culture. The protocol is flexible and can be scaled to accommodate other sample volumes.*

- 2. Resuspend each sample with 100 μl of Solution R by vigorously vortexing.**

Make sure that the bacterial pellet is completely resuspended and no clumps remain.

- 3. Add 100 μl of Solution L and mix gently by inverting 5 times. Incubate at room temp. for 1 minute.**

DO NOT VORTEX. Vortexing will result in shearing of the genomic DNA, leaving free chromosomal fragments to contaminate the plasmid DNA.

- 4. Add 100 μl of Solution N and mix gently by inverting 5 times. Incubate at room temp. for 3 minutes.**

- 5. Add 200 μl of Solution P and mix gently by inverting 5 times. Incubate at room temp. for 3 minutes.**

- 6. Centrifuge at 14,000 rpm for 7 minutes. During centrifugation, insert Spin Column into a collection tube.**

- 7. Add 400 μl of Binding Solution to the prepared Spin Column and transfer cleared lysate to the column inserted in the collection tube.**

Avoid disturbing or transferring any of the white precipitate with the supernatant.

- 8. Centrifuge at 10,000 $\times g$ for 30 sec. Discard the flow through and reinsert column in the collection tube.**

Protocol *(continued)*

- 9. Add 700 μ l of Wash Solution . Centrifuge at 10,000 x g for 30 sec. Discard flow through and reinsert column in the collection tube.**
- 10. Centrifuge at 14,000 rpm for 30 sec.**
- 11. Transfer Spin Column to a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 50 μ l of sterile water or a low-ionic strength buffer (10 mM Tris, pH.8.0) to the middle of the Spin Column. Incubate at room temp. for 3 minutes.**

For eluting DNA, use a low-ionic strength buffer (≤ 10 mM in concentration, pH 7-9) or sterile deionized water. For most applications 10 mM Tris base (pH adjusted to 8 with HCl) is recommended; however, TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) may be used for applications in which EDTA will not interfere with subsequent reactions.

- 12. Centrifuge at 14,000 rpm for 1 minute.**
- 13. Discard the Spin Column, the eluate in the microcentrifuge tube includes plasmid DNA.**

Troubleshooting Guide

| Problem | Reason | Solution |
|---|---|--|
| Poor or low recovery | Improper washing | Confirm the wash solution concentrate was diluted with the specified volume of ethanol. Keep bottles tightly capped between uses to prevent evaporation. |
| | Insufficient number of cells | Culture may be too old. Prepare a new culture. |
| | Prolonged alkaline lysis | Reduce the time for cell lysis to 3 minutes or until the suspended cells form a clear viscous solution after inversion with the lysis solution. |
| | Poor elution | Repeat elution or increase elution volume. Incubation of column at 70°C for 3 minutes with Elution buffer may increase yields. |
| | Lysis reaction may have been incomplete. | Do not exceed recommended culture volumes. Decrease culture volume. |
| Chromosomal DNA contamination | Chromosomal DNA is sheared by vortexing the tube to mix the contents after adding solution L or solution N or solution P. | Mix the contents of the tube by gentle inversion; do not vortex. |
| Enzymatic reactions using recovered DNA do not proceed | DNA concentration is too low. | Precipitate the DNA with alcohol, then resuspend DNA in a smaller volume of elution buffer. |
| | High salt content in the final plasmid DNA eluate | Precipitate the DNA using ethanol. |
| | Residual ethanol from the diluted wash solution | Centrifuge the column for 1 minute after the wash step to remove any residual wash solution. |

RTA Laboratories

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi

Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze / Kocaeli / Turkey

Phone: 0262 648 5300

Fax: 0262 751 0677

E-mail: rta@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr

RTA.BR.012 Revision Date/Revision No:06.08.2014/2



RTA® Plazmid DNA İzolasyon Kiti

Kullanma Kılavuzu

Yayın Tarihi -- 2011-12

Bakteri örneklerinden plazmid DNA izolasyonu ve saflaştırılması için
Yalnızca profesyonel kullanım için

REF

09007050 - 50 test
09007100 - 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 |
| Gerekli Diğer Malzemeler | 9 |
| Başlamadan Önce Notlar | 9 |
| Protokol | 10-11 |
| Sorun Giderme Kılavuzu | 12 |

Kit İçeriği

| Sađlanan Malzeme | Miktar | | |
|--------------------------|---------|---------|----------|
| | 10 test | 50 test | 100 test |
| Solüsyon R | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solüsyon L | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solüsyon N | 2 ml | 5.5 ml | 11 ml |
| Solüsyon P | 3 ml | 11 ml | 22 ml |
| Bağlama Solüsyonu | 5 ml | 22 ml | 44 ml |
| Yıkama Solüsyonu * | 2 ml | 8 ml | 16 ml |
| Spin Kolonlar | 10 | 50 | 100 |
| Toplama Tüpleri (2 ml) | 10 | 50 | 100 |
| Toplama Tüpleri (1.5 ml) | 10 | 50 | 100 |
| Kullanma Kılavuzu | 1 | 1 | 1 |

* Yıkama solüsyonunu hazırlamak için “Başlamadan Önce Notlar” kısmına bakınız.

Saklama Koşulları & Dayanıklılık

Solüsyon R hariç RTA Plazmid DNA İzolasyon Kitinin bütün içeriği oda sıcaklığında (15-25°C) kuru ortamda saklanmalıdır. Uzun süreli kullanım için kit ulaştıktan sonra Solüsyon R 2-8 °C’de saklanmalıdır. Bu şartlar altında kit en az 12 ay saklanabilir.

Kullanım Amacı

RTA Plazmid DNA İzolasyon Kiti bakteriyel örneklerden plazmid elde etmek için geliştirilmiş bir sistemdir. Bakteriyel örneklerden saflaştırılan plazmid DNA daha sonra PZR, endonükleaz kesimi, klonlama, transformasyon, ligasyon ve dizileme gibi moleküler uygulamalarda kullanılabilir.

Ürün Kullanım Limitleri

RTA Plazmid DNA İzolasyon Kitleri genel nükleik asit saflaştırma işlemi için kullanılır. Herhangi spesifik bir organizma veya özel bir klinik amaç için kullanılmaz . Bu kitlerin, kullanıcının spesifik deneysel gereksinimlerine uygun olup olmadığı kullanıcının insiyatifindedir.

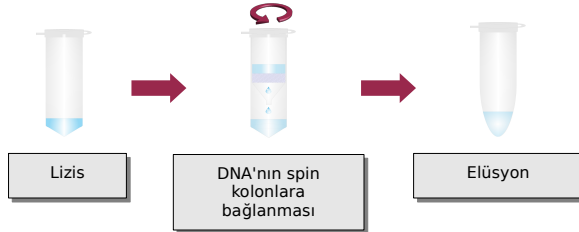
Giriş

RTA Plazmid DNA İzolasyon Kiti fenol, kloroform, CsCl veya alkol çöktürmesi gibi yöntemleri kullanmadan bakteri kültürlerinden yüksek saflıkta plazmid DNA saflaştırmak için hızlı ve kolay bir metod sağlamaktadır. Kaotropik tuz varlığında nükleik asitler silika veya cam yüzeylere özgün olarak bağlanırlar. Bağlanma reaksiyonu su moleküllerinin düzenli yapılarının ve nükleik asitler ile etkileşimlerinin bozulması ile olur. Bağlanma işlemi nükleik asitlere özgü olduğu için bağlanan DNA tuz, protein gibi safsızlıklardan basit bir yıkama safhası ile ayrılır ve saflaştırılır. Nükleik asitlerin matriksten elüsyonu düşük tuzlu bir tampon veya su ile yapılır. Metod, 3 basit basamağa ayrılabilir: temiz lizatların hazırlanması, DNA'nın silika tabanlı matriks üzerine bağlanması, ve yıkama ve sonra plazmid DNA'nın elüsyonu. Sonuçta ise restriksiyon enzim kesimi, PZR, klonlama, transformasyon, ligasyon ve dizi analizi gibi yöntemlerde kullanım için hazır saf plazmid DNA elde edilir.

Elde edilen plazmid DNA miktarı birçok faktör tarafından etkilenebilir. Bunlar plazmid kopya sayısı, eklenmiş DNA büyüklüğü, işlenen kültürün hacmi, kültür besiyeri ve saflaştırma sisteminin bütün bağlanma kapasitesidir. Bunlar arasında plazmid kopya sayısı, kültür hacmi ve bağlanma kapasitesi plazmid eldesi üstünde büyük etkiye sahiptir. Saflaştırılmış plazmid DNA enzimatik inhibitörlerden arınmış ve RNA içermemektedir.

Giriş (devam)

| | |
|---------|--|
| Verim | 20 µg'a kadar plazmid DNA |
| Hız | Plazmid DNA saflaştırma sadece 20 dakika sürüyor. |
| Özgü | Genomik DNA veya RNA kontaminasyonu yok. |
| Güvenli | Fenol kloroform ekstraksiyonu gerekmiyor. |
| Saf | Özel olarak dizayn edilmiş plazmid DNA'ya özgü spin kolonlar ile yüksek saflıkta plazmid DNA |



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. 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 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. 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 derecesinde)
- steril su veya düşük iyonik kuvvette bir tampon (bakınız; Protokol 11. basamak)
- vorteks
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml)

Başlamadan Önce Notlar

- Serin çevre koşullarında Solüsyon L'de bir çökelti oluşabilir. Böyle bir çökelti gözlenirse bunu çözmek için şişeyi 37°C'de birkaç dakika inkübe ediniz. Şişeler daima sıkıca kapatılmalı ve protokol uygulanırken solüsyonların oda sıcaklığında olmalıdır.
- Yıkama solüsyonu konsantredir. İlk kullanımdan önce şişenin üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda etanol (96-100%) eklenir:

| <i>Kit Boyutu</i> | <i>Yıkama Solüsyonu (ml)</i> | <i>Eklenecek etanol (ml)</i> | <i>Son Hacim (ml)</i> |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 10 test | 2 | 8 | 10 |
| 50 test | 8 | 32 | 40 |
| 100 test | 16 | 64 | 80 |

Protokol

1. Geceboyu büyümüş bakteri kültürünün 1.5 ml'sini 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yaparak toplanır. Süpernatant atılır.
Santrifüj tüpünü ters çevirip süpernatantın tamamını boşaltmaya çalışın, dibinde kalan besiyerini pipet yardımıyla çekin. Hücreler bu haliyle -200C'de dondurulup ileride kullanılabilir. Protokol 1.5 ml E.coli hücre kültürü için dizayn edilmiştir. Protokol diğer hacimler ve başka bakteri kültürleri için de kullanılabilir.
2. Her örnek 100 µl Solüsyon R'de şidetle vorteks yapılarak çözülür.
Bakteri hücrelerinin tamamen çözüldüğüne ve hiç topak kalmadığına emin olun.
3. 100 µl Solüsyon L eklenir ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırılır. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
VORTEKS YAPMAYIN. Vorteks yapmak genomik DNA'nın kırılmasına ve kromozom parçacıklarının plazmid DNA'yı kontamine etmesine neden olur.
4. 100 µl Solüsyon N eklenir ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırılır. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. 200 µl Solüsyon P eklenir ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırılır. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
6. 14,000 rpm'de 7 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj sırasında Spin kolon bir toplama tüpü içine yerleştirilir.
7. 400 µl Bağlama Solüsyonunu hazırlanmış Spin kolona eklenir ve temiz lizat üstüne aktarılır.
Süpernatant ile birlikte beyaz çöküntüyü bozmaktan veya almaktan kaçının.
8. 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.

Protokol (devam)

9. 700 µl Yıkama Solüsyonu eklenir. 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilir.
10. 14,000 rpm'de 30saniye santrijüj yapılır.
11. Spin kolonu steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edilir. 50 µl steril su veya düşük iyonik kuvvette bir tampon (10 mM Tris, pH.8.0) Spin kolonun tam ortasına indirilir ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
DNA elüsyonu için, düşük iyonik kuvvette bir tampon (≤10 mM konsantrasyonda, pH 7-9) veya steril deiyonize su kullanın Çoğu uygulamalarda 10 mM Tris baz (pH 8) tavsiye edilir; ancak, TE tampon (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) sonraki reaksiyonlarda EDTA'nın etkilemediği uygulamalarda kullanılabilir.
12. 14,000 rpm'de 1 dakika santrijüj yapılır.
13. Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpün içindeki elüsyon tamponunda plazmid DNA bulunuyor.

Sorun Giderme Kılavuzu

| Sorun | Neden | Çözüm |
|--|---|---|
| Zayıf veya düşük geri kazınım | Yanlış yıkama | Yıkama Solüsyonunun konsantresinin belirlenmiş etanol hacimleriyle seyreltildiğini doğrulayın. Buharlaşmayı önlemek için şişelerin kapaklarını iyice kapayın. |
| | Yetersiz hücre sayısı | Kültür eski olabilir. Yeni bir kültür hazırlayın. |
| | Uzun süren liziz | Hücre lizizi için geçen süreyi azaltın. Liziz solüsyonu ile karıştırdıktan sonra temiz bir solüsyon görünümü alana kadar bekleyin. |
| | Zayıf elüsyon | Elüsyonu tekrarlayın veya elüsyon hacmini arttırın. Kolonu Elüsyon tamponu ile 70°C'de 3 dakika inkübe etmek verimi artırabilir. |
| | Liziz reaksiyonu tamamlanmamış olabilir. | Tavsiye edilen kültür hacmini aşmayın. Kültür hacmini azaltın. |
| Kromozom DNA kontaminasyonu | Solüsyon L, Solüsyon N veya Solüsyon P' yi ekledikten sonra tüpü vorteks yaparak karıştırmak kromozom DNA'yı kırabilir. | Tüpü nazıkce ters çevirerek karıştırın; vorteks yapmayın. |
| Elde edilen DNA ile yapılan enzimatik reaksiyonlar yürümüyor. | DNA konsantrasyonu çok düşük. | DNA'yı alkol ile çöktürün, daha sonra daha küçük hacim Elüsyon tamponu veya su 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. A.Ş.

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi

Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze / Kocaeli / Türkiye

Tel: 0262 648 5300

Faks: 0262 751 0677

E-posta: rta@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr

RTA.BR.012 Revizyon Tarihi/Revizyon No:06.08.2014/2