

Ağustos 2015

QIAasymphony® SP Protokol Sayfası

Tissue_LC_200_V7_DSP ve
Tissue_HC_200_V7_DSP (QIAasymphony DSP DNA
Mini Kiti için kullanıcı açısından doğrulanmıştır)

Bu belge Kit Versiyonu 1 için *Tissue_LC_200_V7_DSP* ve *Tissue_HC_200_V7_DSP* (QIAasymphony DSP DNA Mini Kiti için kullanıcı açısından doğrulanmıştır) QIAasymphony SP Protokol Sayfası R1'dir.

Genel bilgi

Bu protokoller QIAAsymphony SP ve QIAAsymphony DSP DNA Mini Kiti kullanılarak kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürlerden total DNA'nın saflaştırılması içindir.

Örnek tipine bağlı olarak düşük içerik (LC) veya yüksek içerik (HC) protokolünün kullanılmasını öneririz. Kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürler yüksek içerikli protokolle işlendiklerinde artmış DNA verimi sağlayacaktır ama küçük elüt hacmiyle (50 µl) kombinasyon halinde düşük içerik protokolü eğer yüksek DNA konsantrasyonu gerekiyorsa kullanılabilir.

QIAAsymphony DSP DNA Mini Kitinin, kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürlerden total DNA saflaştırılması amacıyla Tissue_LC_200_V7_DSP ve Tissue_HC_200_V7_DSP (QIAAsymphony DSP DNA Mini Kiti için kullanıcı açısından doğrulanmıştır) protokolleri ile kombinasyon halinde moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılması amaçlanmıştır. Ürünün bir hastalığın tanısı, önlenmesi veya tedavisi için kullanılması amaçlanmamıştır.

Not: Laboratuvarında kullanılan herhangi bir işlem için bu kombinasyonu kullanarak performansı doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Düşük içerik protokolü

Kit	QIAAsymphony DSP DNA Mini Kiti (kat. no. 937236)
Örnek materyal	Kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürler Önerilen maksimum örnek büyüklükleri: Hücre kültürü için, 5×10^6 hücreler Bakteri için, 1×10^9 hücreler
Protokol adı	Tissue_LC_200_V7_DSP
Varsayılan Analiz Kontrol Seti	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elüsyon hacmi	50 µl, 100 µl, 200 µl veya 400 µl
Gereken yazılım versiyonu	Versiyon 4.0

Yüksek içerik protokolü

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kiti (kat. no. 937236)
Örnek materyal	Kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürler Önerilen maksimum örnek büyüklükleri: Hücre kültürü için, 1×10^7 hücre Bakteri için, 4×10^9 hücre
Protokol adı	Tissue_HC_200_V7_DSP
Varsayılan Analiz Kontrol Seti	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elüsyon hacmi	100 µl, 200 µl veya 400 µl
Gereken yazılım versiyonu	Versiyon 4.0

Gereken ama Sağlanmayan Malzemeler

Tüm örnek tipleri için

- RNA içeriğini minimuma indirmek için: RNaz A (100 mg/ml stok solüsyonu) (kat. no. 19101)

Gram negatif bakteriler için

- Tampon ATL (kat. no. 19076)

Gram pozitif bakteriler için

- Tampon P1 (kat. no. 19051)
- Lizozim (100 mg/ml stok solüsyon)

Kültürdeki hücreler için

- Tampon P1 (kat. no. 19051)

“Sample” (Örnek) çekmecesi

Örnek tipi	Kültürdeki hücreler ve bakteriyel kültürler
Örnek girdi hacmi	220 µl (örnek başına gereken, protokole göre)*
İşlenen örnek hacmi	200 µl
Primer örnek tüpleri	n/a
Sekonder örnek tüpleri	Daha fazla bilgi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Ekler	Kullanılan örnek tüpüne bağlıdır; daha fazla bilgi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Sistem hem yüksek hem düşük içerik protokoller için örnek hacminin 220 µl altında olduğunu tanımaz çünkü örnek transferi sıvı seviyesi saptamadan yapılır. Bu nedenle örnek girdi hacminin 220 µl olduğundan emin olun.

n/a = geçersiz.

“Reagents and Consumables” (Reaktifler ve Sarf) çekmecesi

Pozisyon A1 ve/veya A2	Reaktif kartuşu
Pozisyon B1	n/a
Uç askı tutucu 1–17	Atılabilir filtre uçları, 200 µl veya 1500 µl
Ünite kutusu tutucu 1–4	Örnek hazırlık kartuşları veya 8-Rod Kılıflar içeren ünite kutuları

n/a = geçersiz.

“Waste” (Atık) çekmecesi

Ünite kutusu tutucu 1–4	Boş ünite kutuları
Atık torbası tutucu	Atık torbası
Sıvı atık şişesi tutucu	Boş sıvı atık şişesi

“Eluate” (Elüt) çekmecesi

Elüsyon askısı (yuva 1, soğutma pozisyonu kullanılmasını öneririz)	Daha fazla bilgi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
--	---

Gereken plastik gereçler

Plastik gereçler	Bir grup, 24 örnek*	İki grup, 48 örnek*	Üç grup, 72 örnek*	Dört grup, 96 örnek*
Tek kullanımlık filtre uçları, 200 µl†	26	50	74	98
Tek kullanımlık filtre uçları, 1500 µl†	72	136	200	264
Örnek hazırlama kartuşları§	21	42	63	84
8-Rod Kılıfları¶	3	6	9	12

* Grup başına 24'ten az örnek kullanılması çalışma başına gereken tek kullanımlık filtre ucu sayısını azaltır.

† Filtre ucu askısı başına 32 filtre ucu vardır.

‡ Gereken filtre ucu sayısına reaktif kartuşu başına 1 envanter taraması için filtre uçları dahildir.

§ Ünite kutusu başına 28 örnek hazırlama kartuşu vardır.

¶ Ünite kutusu başına on iki 8 Rod Kılıfı vardır.

Not: Verilen filtre ucu sayısı ayarlara bağlı olarak dokunmatik ekranda gösterilen rakamlardan farklı olabilir. Maksimum olası uç sayısının yüklenmesini öneririz.

Elüsyon hacmi

Elüsyon hacmi dokunmatik ekranda seçilir. Örnek tipi ve DNA içeriğine bağlı olarak son elüt hacmi seçilen hacimden 15 µl'ye kadar daha az olabilir. Elüt hacminin değişebilmesi nedeniyle transfer öncesinde elüt hacmini doğrulamayan bir otomatik Analiz Seti Sistemi kullanıldığında fiili elüt hacmini kontrol etmenizi öneririz. Daha düşük hacimlerde elüsyon son DNA konsantrasyonunu artırır ama verimi biraz azaltır. Amaçlanan aşağı yönde uygulama için uygun bir elüsyon hacmi kullanılmasını öneririz.

Örnek materyalinin hazırlanması

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Başlamadan önce önemli nokta

- QIAAsymphony manyetik partikülleri örnekte her ikisi birden varsa RNA ve DNA'yı birlikte saflaştırır. Örnekte RNA içeriğini minimuma indirmek için ilgili ön muamele protokolünde belirtilen adımda örneğe RNaz A ekleyin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Eğer Tampon ATL kullanılıyorsa beyaz presipitat içermediğini kontrol edin. Gerekirse presipitatu çözmek için zaman zaman sallayarak 37°C'de 30 dakika inkübe edin.
- Bir ThermoMixer® veya sallayıcı-inkübatörü ilgili ön muamele için gerekli sıcaklığa ayarlayın.*

Kültürdeki hücreler

Hem taze hem donmuş kültürdeki hücreler kullanılabilir. Yüksek içerik protokolünü 1×10^7 hücre değerine kadar kullanmayı öneriyoruz. Düşük içerik protokolü daha düşük DNA verimleriyle sonuçlanır ve sadece yüksek bir DNA konsantrasyonu gerekiyse küçük bir elüt hacmiyle (50 µl) kombinasyon halinde önerilir. Donmuş hücre peletleri ön muamele protokolünde tanımlandığı şekilde Tampon P1 içinde tekrar süspansiyon haline getirilmelidir.

Kültürdeki hücreler için ön muamele protokolü

1. Maksimum 1×10^7 hücreyi 300 x g hızında oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika santrifüje edin. Hücre peletini bozmamaya dikkat ederek süpernatanı çıkarın ve atın.

Not: Hücre peleti gelecekte kullanım için –20°C veya –70°C'de saklanabilir veya hemen kullanılabilir.

2. Peleti tekrar 220 µl Tampon P1 içinde süspansiyon haline getirin ve örneği bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne (sağlanmamıştır) aktarın.

3. 20 µl proteinaz K ekleyin ve tüpe parmağınızı vurarak karıştırın.

Not: QIAsymphony DSP DNA Mini Kitinin enzim askısından proteinaz K kullanın.

4. Tüpü bir ThermoMixer veya karıştırıcı-inkübatöre koyun ve 900 devir/dk hızında 30 dakika ile 2 saat arasında sallayarak 56°C'de inkübe edin.

Not: Lizis süresi hücrelerin tipine ve hücre sayısına bağlıdır. 2 saatten sonra çözünmez materyal veya yüksek ölçüde visköz lizatların varlığıyla görüldüğü şekilde lizis tam değilse lizis süresi uzatılabilir veya adım 6'da tanımlandığı gibi çözünmez materyal santrifügasyonla giderilebilir. Gece boyunca lizis mümkündür ve hazırlığı etkilemez.

5. Örnekte RNA içeriğini minimuma indirmek için, adım 6 ile devam etmeden önce 4 µl RNaz A (100 mg/ml) ekleyip oda sıcaklığında (15–25°C) 2 dakika inkübe edin.

* Aletlerin üreticinin talimatı
emin olun.

ına göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının

6. Lizattan 220 µl miktarını QIAAsymphony SP örnek taşıyıcıyla uyumlu örnek tüplerine dikkatle aktarın.

Not: Lizatlar sindirilmemiş materyal içeriyorsa, süpernatanı örnek tüpüne aktarmadan önce oda sıcaklığında 2 dakika tam hızla santrifüje edin. Uyumlu örnek tüplerinin tam listesi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. 2 ml tüpler (örn., Sarstedt® kat. no. 72.693 veya 72.608) kullanılmasını öneririz.

Bakteriler

Hem taze hem donmuş bakteriyel kültürler kullanılabilir. Yüksek içerik protokolünü 4×10^9 hücre değerine kadar kullanmayı öneriyoruz. Düşük içerik protokolü daha düşük DNA verimleriyle sonuçlanır ve sadece yüksek bir DNA konsantrasyonu gerekiyse küçük bir elüt hacmiyle (50 µl) kombinasyon halinde önerilir. Bakteriyel büyüme genellikle bir spektrofotometre kullanılarak bakteriyel kültürün optik dansitesi (OD) şeklinde ölçülür. Ancak OD ölçümleri kullanılan spektrofotometre tipine ve ölçülen bakteriyel türe önemli ölçüde bağlıdır. Bu nedenle spektrofotometreyi ölçülen OD değerlerini bakteriyel hücre sayılarıyla ilişkilendirerek kalibre etmeyi öneririz. Donmuş peletler ön muamele protokollerinde tanımlandığı şekilde Tampon P1 (Gram pozitif bakteriler) veya Tampon ATL (Gram negatif bakteriler) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmelidir.

Gram negatif bakteriler için ön muamele protokolü

1. Oda sıcaklığında (15–25°C) 5000 x g hızında 10 dakika santrifügasyonla maksimum 4×10^9 hücreyi alın. Bakteri peletini bozmamaya dikkat ederek süpernatanı çıkarın ve atın.

Not: Hücre peleti gelecekte kullanım için –20°C veya –70°C'de saklanabilir veya hemen kullanılabilir.

2. Bakteriyel peleti tekrar 220 µl Tampon ATL içinde süspansiyon haline getirin ve örneği bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne (sağlanmamıştır) aktarın.

3. 20 µl proteinaz K ekleyin ve tüpe parmağınızı vurarak karıştırın.

Not: QIAAsymphony DSP DNA Mini Kitinin enzim askısından proteinaz K kullanın.

4. Tüpü bir ThermoMixer veya karıştırıcı–inkübatöre koyun ve 900 devir/dk hızında 30 dakika ile 2 saat arasında sallayarak 56°C'de inkübe edin.

Not: Lizis süresi hücrelerin tipine ve hücre sayısına bağlıdır. 2 saatten sonra çözünmez materyal veya yüksek ölçüde visköz lizatların varlığıyla görüldüğü şekilde lizis tam değilse lizis süresi uzatılabilir veya adım 6'da tanımlandığı gibi çözünmez materyal santrifügasyonla giderilebilir.

5. Örnekte RNA içeriğini minimuma indirmek için, adım 6 ile devam etmeden önce 4 µl RNaz A (100 mg/ml) ekleyip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.

6. Lizattan 220 µl miktarını QIASymphony SP örnek taşıyıcıyla uyumlu örnek tüplerine dikkatle aktarın.

Not: Lizatlar sindirilmemiş materyal içeriyorsa, süpernatanı örnek tüpüne aktarmadan önce oda sıcaklığında 2 dakika tam hızla santrifüje edin. Uyumlu örnek tüplerinin tam listesi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. 2 ml tüpler (örn., Sarstedt kat. no. 72.693 veya 72.608) kullanılmasını öneririz.

Gram pozitif bakteriler için ön muamele protokolü

1. Oda sıcaklığında (15–25°C) 5000 x g hızında 10 dakika santrifügasyonla maksimum 4 x 10⁹ hücreyi alın. Bakteri peletini bozmamaya dikkat ederek süpernatanı çıkarın ve atın.
Not: Hücre peleti gelecekte kullanım için –20°C veya –70°C'de saklanabilir veya hemen kullanılabilir.
2. Bakteriyel peleti tekrar 200 µl Tampon P1 içinde süspansiyon haline getirin ve örneği bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne (sağlanmamıştır) aktarın.
3. 20 µl lizozim ekleyin (100 mg/ml) ve tüpe parmağınızı vurarak karıştırın.
4. Tüpü bir ThermoMixer veya karıştırıcı–inkübatöre koyun ve 900 devir/dk hızında 30 dakika ile 2 saat arasında sallayarak 37°C'de inkübe edin.
Not: Lizis süresi hücrelerin tipine ve hücre sayısına bağlıdır.
5. 20 µl proteinaz K ekleyin ve tüpe parmağınızı vurarak karıştırın.
Not: QIASymphony DSP DNA Mini Kitinin enzim askısından proteinaz K kullanın.
6. 900 devir/dk hızında 30 dakika sallayarak 56°C'de inkübe edin.
7. Örnekte RNA içeriğini minimuma indirmek için, adım 8 ile devam etmeden önce 4 µl RNaz A (100 mg/ml) ekleyip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
8. Lizattan 220 µl miktarını QIASymphony SP örnek taşıyıcıyla uyumlu örnek tüplerine dikkatle aktarın.

Not: Lizatlar sindirilmemiş materyal içeriyorsa, süpernatanı örnek tüpüne aktarmadan önce oda sıcaklığında 2 dakika tam hızla santrifüje edin. Uyumlu örnek tüplerinin tam listesi için bakınız www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. 2 ml tüpler (örn., Sarstedt kat. no. 72.693 veya 72.608) kullanılmasını öneririz.

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunmaktadır ve QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Bu belgede kullanılan tescilli isimler, ticari markalar vs. bu şekilde işaretlenmemiş olsalar bile kanunen koruma altında olmadıkları düşünülmemelidir. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

