

KİSTİK FİBROSİS MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ (18 MUTASYON)

Kat. No: 14R-20-18

GİRİŞ

Kistik Fibrozis (CF) otozomal resesif kalıtımla geçen ağır bir metabolizma bozukluğudur. Doğumdan itibaren birçok organda fonksiyon bozukluklarına yol açarak günlük yaşamı büyük ölçüde etkilemektedir. Özellikle akciğer, pankreas, ter bezleri, sindirim sisteminde etki göstermekte, erkek üreme kanallarında kalın ve yapışkan bir mukusun salgılanması ile tıkanmaya sebep olmaktadır. Semptomlar yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkmaya başlar.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Proben 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımısını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla floresan ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte floresan ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her örnek için 12 Miks ile çalışılır. Sistem uygun sekans spesifik oligonükleotidler ile SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak dizayn edilmiş kullanıma hazır kimyasalları içermektedir. Ürün içerisinde Mutasyon analizleri için FAM, JOE/HEX, Texas RED işaretli problemler kullanılmaktadır. İnternal kontrol analizi için ise CY5 ile işaretli prob bulunmaktadır. Mutasyonlar ve ilgili boyaları Tablo 1' de görebilirsiniz.

Kullandığınız kit sistemi "ready to use" özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil Real Time PCR reaksiyonu için gerekli tüm komponentleri içermektedir.

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test
• Miks 1	400 µl
• Miks 2	400 µl
• Miks 3	400 µl
• Miks 4	400 µl
• Miks 5	400 µl
• Miks 6	400 µl
• Miks 7	400 µl
• Miks 8	400 µl
• Miks 9	400 µl
• Miks 10	400 µl
• Miks 11	400 µl
• Miks 12	400 µl
• Kontrol DNA	75 µl

Tablo 1 : Tüp – Mutasyon - Boya

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	G542X Wild Tip	FAM
	W1282X Wild Tip	JOE / HEX
	E92K Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	G542X Mutant Tip	FAM
	W1282X Mutant Tip	JOE / HEX
	E92K Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	1677delTA Wild Tip	FAM
	K68E Wild Tip	JOE / HEX
	2789+5G>A Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	1677delTA Mutant Tip	FAM
	K68E Mutant Tip	JOE / HEX
	2789+5G>A Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 5	ΔF508 Wild Tip	FAM
	1717-1G>A Wild Tip	JOE / HEX
	4010delTATT Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 6	ΔF508 Mutant Tip	FAM
	1717-1G>A Mutant Tip	JOE / HEX
	4010delTATT Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 7	F1052V Wild Tip	FAM
	I148T Wild Tip	JOE / HEX
	G551D Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 8	F1052V Mutant Tip	FAM
	I148T Mutant Tip	JOE / HEX
	G551D Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 9	Y1032C Wild Tip	FAM
	3849+10kbC>T Wild Tip	JOE / HEX
	R560T Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 10	Y1032C Mutant Tip	FAM
	3849+10kbC>T Mutant Tip	JOE / HEX
	R560T Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 11	2183AA--G Wild Tip	FAM
	S4X Wild Tip	JOE / HEX
	N1303K Wild Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 12	2183AA--G Mutant Tip	FAM
	S4X Mutant Tip	JOE / HEX
	N1303K Mutant Tip	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Alınan kan örnekleri izolasyon aşamasına kadar +4°C'de saklanmalı, kan örnekleri bir aydan fazla bir süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir.

Sistemimiz, MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 µl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Her örnek için 12 Miks ile çalışılmalıdır.
- Nazıkçe pipetaj yaparak master mikslar karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl (~1-100 ng) hasta DNA'sı** eklenerek örnek hazırlanmış olur.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	30 Döngü
60 °C	1 dk.	

Floresan boya olarak **FAM, CY5, Texas Red ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

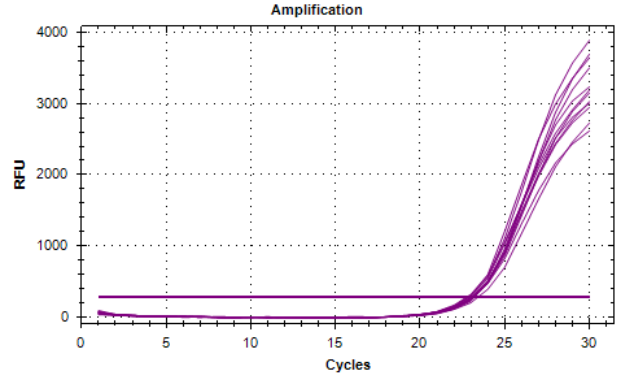
Bio-Rad CFX96

Eğer:

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak **"none"** seçeneğini seçiniz.

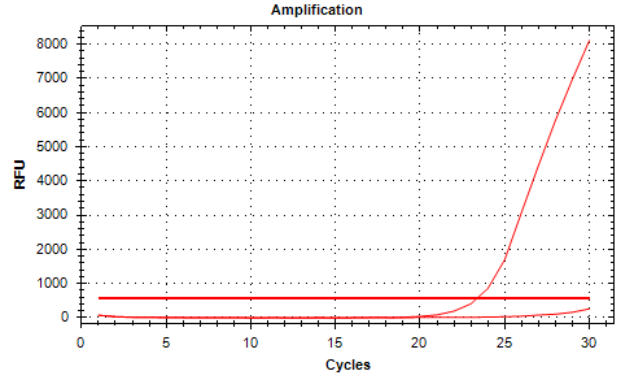
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri BioRad CFX96 cihazına aittir.

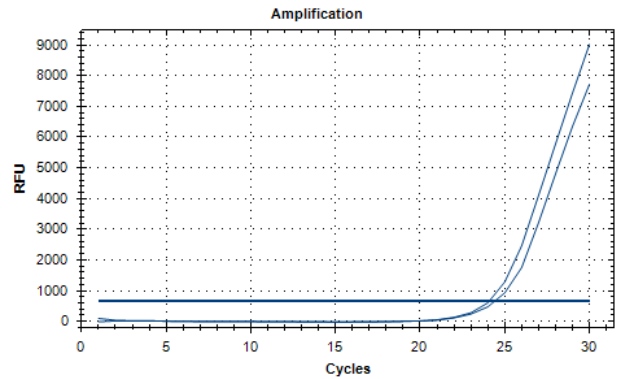


Şekil 1: Internal kontrol – CY5 boya

İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise **22 ≤ ct ≤ 26** aralığında olmalıdır.



Şekil 2: 2789+5G>A Wild Tip (Miks 3 & 4) – TEXAS RED boya



Şekil 3: ΔF508 Heterozigot (Miks 5 & 6) – FAM boya

Mutasyonların amplifikasyon pikleri ilgili boya ile analiz edilir*. CT değerleri $21 \leq CT \leq 26$ arasında olmalıdır. Bu CT değerleri SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyon protokollerine göre $\pm 2/3$ siklus farklılıklar gösterebilir.

- Homozigot "Wild-Tip" örnek sadece "Wild Tip" master miklerde pik verir.
- Heterozigot örnek hem "Wild-Tip", hem de "Mutant Tip" master miklerde pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece "Mutant Tip" master miklerde pik verir.
- Heterozigot örneklerde "Wild-Tip" piki ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark $4 \leq CT \leq 6$ siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.

*Lütfen Tablo 1'i kontrol ediniz.

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı söz konusudur.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

Öncelikle örneklerinizin piklerini pozitif kontrol DNA pikleri ile karşılaştırın. Eğer pozitif kontrol DNA da bir sorun yoksa,

- Örneğinizin DNA'sı saf değildir veya az miktarda inhibitör içeriyor olabilir.
- Yeterli miktarda DNA elde edememiş olabilirsiniz.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master miklerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: 12.04.2019

Well	Sample	Mix1 (WT)	Mix2 (MT)	Mix3 (WT)	Mix4 (MT)	Mix5 (WT)	Mix6 (MT)	Mix7 (WT)	Mix8 (MT)	Mix9 (WT)	Mix10 (MT)	Mix11 (WT)	Mix12 (MT)
A	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
B	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
C	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
D	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
E	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
F	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
G	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	G542X / FAM		1677delta / FAM		ΔF508 / FAM		F1052V / FAM		Y1032C / FAM		2183AA--G / FAM		
H	W1282X / JOE-HEX		K68E / JOE-HEX		1717-1G>A / JOE-HEX		I148T / JOE-HEX		3849+10kbc>T / JOE-HEX		S4X / JOE-HEX		
	E92K / Texas Red		2789+5G>A / Texas Red		4010delTATT / Texas Red		G551D / Texas Red		R560T / Texas Red		N1303K / Texas Red		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		