

JAK-2 KANTİTATİF REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 21QR-10-01

GİRİŞ

JAK-2 proteini, hücre içinde hematopoetik büyüme faktörü olarak görev almaktadır. Bu nedenle kanser oluşumunda, özellikle kan kanserinde önemi olabileceği düşünülmektedir. JAK2 mutasyonu, proteinini kodlayan genin 1849 pozisyonunda yer alan tek nokta baz değişimi (G>T) ile gerçekleşmekte ve valin'in, fenilalanin'e dönüşümüne (V617F) neden olmaktadır.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probu 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışmasını 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, baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her hasta için, mutasyon bölgesine uygun, Normal ve Mutant olmak üzere iki master miks çalışılır. Sistem, SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak hazırlanmış kullanıma hazır kimyasalları sağlamaktadır ve ilgili mutasyona uygun sekans spesifik primer ve prob içermektedir.

Sistem iki farklı primer-prob seti içermektedir. Mutasyon analizi için FAM işaretli, sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

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

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen

- JAK-2 Normal PCR Master Miks
- JAK-2 Mutant PCR Master Miks
- Kantitasyon PCR Master Miks
- Kontrol DNA
- Kantitasyon Standartları (QS)*

20 Test

- 400 µl
- 400 µl
- 1200 µl
- 30 µl
- 50 µl

*JAK-2 Kantitatif Real-Time PCR Kiti altı farklı kantitasyon standardı içermektedir, kantitasyon standartlarının konsantrasyonları QS1, QS2, QS3, QS4, QS5 ve QS6 olmak üzere sırasıyla 1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴, 1x10³, 1x10² copy/5 µl şeklindedir.

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla 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

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master miksler ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master miksler karıştırılır.
- Her bir örnek için, ayrı ayrı tüplere Normal ve Mutant tip master miksler **20 µl*** olarak bölünür. Optik kapaklı tüp veya strip kullanılabilir.
- Bu tüplere **5 µl (~1-100 ng) hasta DNA'sı** eklenerek örnek hazırlanmış olur.
- Optik kapaklar kapatılır, kantitasyon standartları ile birlikte ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

**Master miksler HotStart Taq DNA Polimeraz içermektedir.*

Kantitasyon standartları için;

- Kantitasyon standart eğriyi oluşturmak için, altı farklı optik kapaklı tüp veya strip'e **20 µl Kantitasyon PCR Master Miks** bölünür.
- Bu altı tüpe **5 µl** sırasıyla **QS1, QS2, QS3, QS4, QS5 ve QS6** eklenir.
- Bu standartlar örnek ile birlikte cihaza yerleştirilir, aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.
- Standart eğriyi oluşturmak için cihaza ait yazılımda örnek tipi "**Standard**" olarak seçilmeli ve **QS*** değerleri girilmelidir. Cihaz yazılımı standart eğriyi otomatik olarak oluşturacaktır.

**QS değerleri için lütfen "sistem içeriği" bölümünü kontrol ediniz.*

PCR PROGRAMI

96 °C	1 dk.	Taq Aktivasyonu
96 °C	5 sn.	32 Döngü
60 °C	45 sn.	

Floresan boya olarak **FAM ve HEX** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

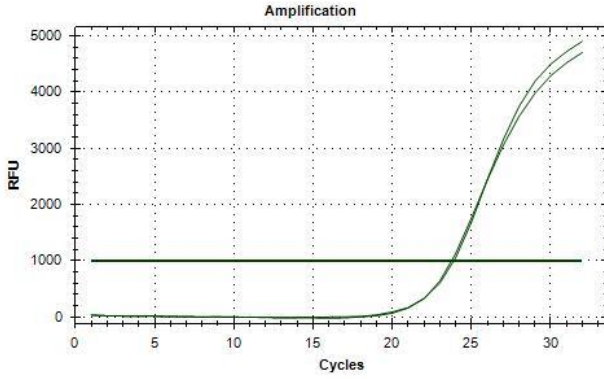
ABI Prism® 7500/7500 Fast
Bio-Rad CFX96
Rotor Gene Q
Roche LightCycler® 480

Eğer;

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

ANALİZ

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

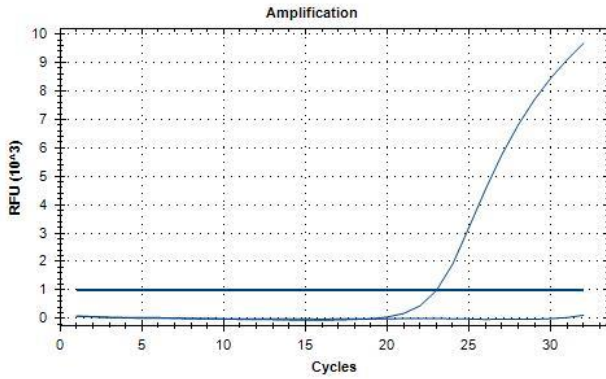


Resim 1: Internal kontroller– HEX Boya

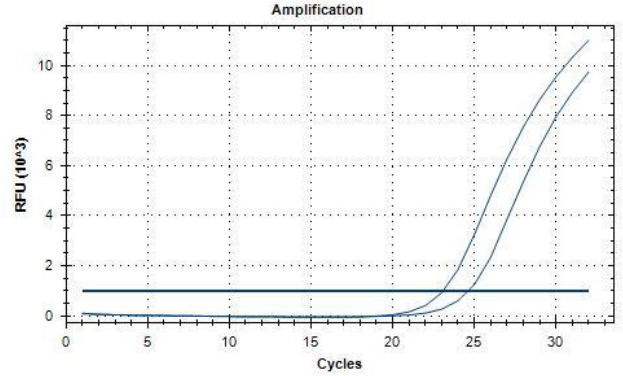
İnternal Kontrol pikleri HEX boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $20 \leq ct \leq 28$ aralığında olmalıdır.

Mutasyon değerlendirmesi FAM boyası ile analiz edilmelidir.

Jak-2 Real Time PCR Kiti, tespit limiti (LOD) \leq %1 Jak-2 mutasyonu olarak belirlenmiştir.

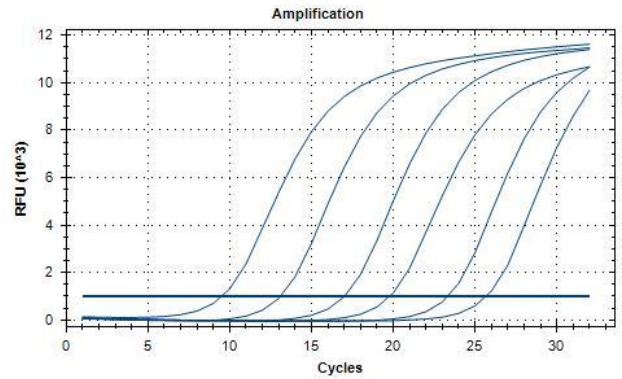


Resim 2: Normal örnek (sadece normal miks ile amplifikasyon) – FAM Boya



Resim 3: JAK-2 pozitif örnek
(Normal ve mutant miks ile amplifikasyon) – FAM Boya

JAK-2 Kantitasyonu



Resim 4: Kantitasyon standartları amplifikasyon eğrileri – FAM Boya

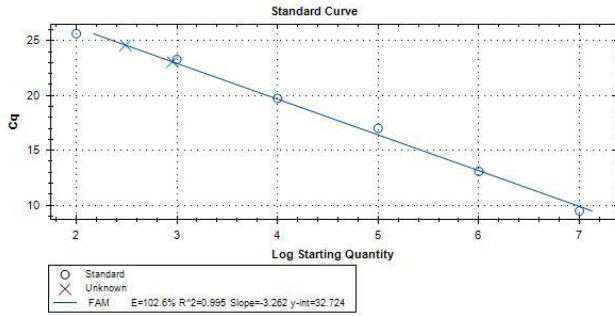
1. Adım

Doğru mutasyon yüzdesinin hesaplanabilmesi için FAM boyasına ait eşik değeri 1000 (BioRad CFX96 cihazı için) olarak ayarlanmalıdır.

Diğer cihazlar için gerekli eşik değeri ayarları için lütfen tech@snp.com.tr bağlantısından iletişime geçiniz.

2. Adım

Standart eğrinin oluşturulması için, cihaza ait yazılımda kantitasyon standartlarının örnek tiplerinin "Standard" olarak seçilmesi ve QS değerlerinin girilmesi gerekmektedir. Bu adımlar tamamlandıktan sonra standart eğri, yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanacaktır (Resim 5).



Resim 5: Standart eğri – FAM Boya

Standart eğri için ideal slope değeri $-3 \geq \text{slope} \geq -3,6$ olmalıdır. Bu değer altında ve üzerindeki değerler, mutasyon yüzde değerlendirmesini etkileyebilmektedir.

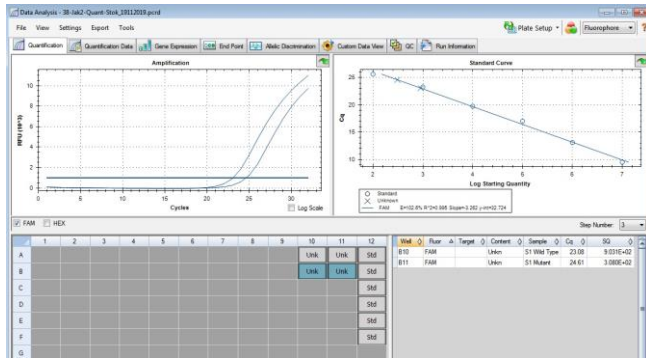
3. Adım

1 ve 2. Adımdan sonra real time PCR cihazına ait yazılım otomatik olarak her örnek için normal ve mutant SQ (Standard Quantification) değerlerini hesaplamaktadır.

4. Adım

Mutasyon yüzde hesabı için aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{Mutasyon Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{SQ Mutant}}{\text{SQ Normal} + \text{SQ Mutant}}$$



Resim 6: JAK-2 pozitif örnek sonucu

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
B10	FAM		Unkn	S1 Wild Type	23.08	9.031E+02
B11	FAM		Unkn	S1 Mutant	24.61	3.080E+02

Resim 7: JAK-2 pozitif örnek SQ değerleri

Resim 7'de SQ değerleri verilen örnek çalışmanın mutasyon yüzdesi için;

$$\% = \frac{3,08 \times 10^2}{(9,03 \times 10^2 + 3,08 \times 10^2)}$$

Formül ile S1 örneğinin mutasyon yüzdesi %25 olarak hesaplanmıştır.

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.
- Mutant DNA miktarı düşüktür.

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

UYARILAR

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

SAKLAMA KOŞULLARI

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

Düzenlenme Tarihi: 01.12.2019