

KONNEKSİN REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 100R-10-03

GİRİŞ

Konjenital sağırlık, doğuştan olup, otozomal resesif olarak kalıtlıdır. Bu hastalığa neden olan mutasyonların % 98'i Connexin 26 geninde (GJB2) meydana gelmektedir. Kitimiz sayesinde bu gendeki, 35DelG, R184P (G>C) ve IVS 1+1 G>A olmak üzere üç mutasyonun taraması yapılabilmektedir.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

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

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her hasta için, her 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 mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve problemler içermektedir.

Sistem iki farklı primer-prob seti içermektedir. Mutasyon analizleri için FAM işaretli, sistemin doğru şekilde çalışmışlığını kontrol eden internal kontrol analizi ise HEX/JOE 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

- 35DelG Normal PCR Master Miks
- 35DelG Mutant PCR Master Miks
- R184P Normal PCR Master Miks
- R184P Mutant PCR Master Miks
- IVS1+1 G>A Normal PCR Master Miks
- IVS1+1 G>A Mutant PCR Master Miks
- Kontrol DNA

20 Test

- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 30 µl

SAKLAMA KOSULLARI

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

DNA İZOLASYONU

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

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

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master miksler ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master miksler karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl 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 boyalar olarak **FAM ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Eğer:

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "**none**" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "**Adjust Gain Settings**" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

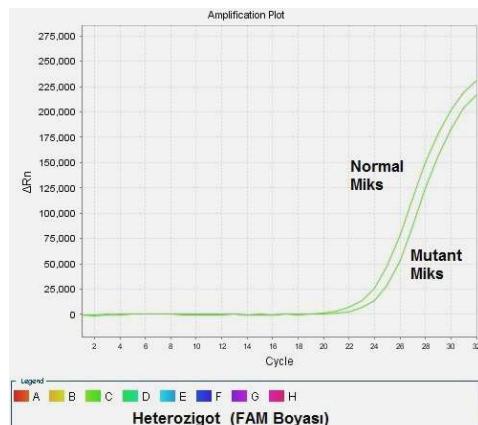
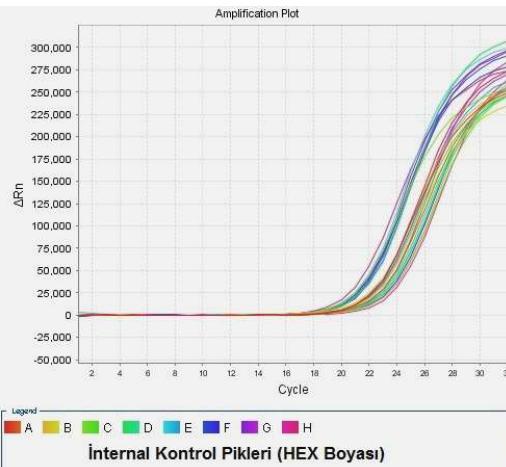
Roche LightCycler® 480 System

Rotor Gene Q

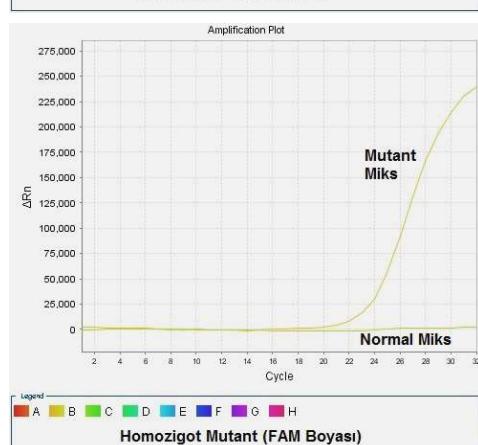
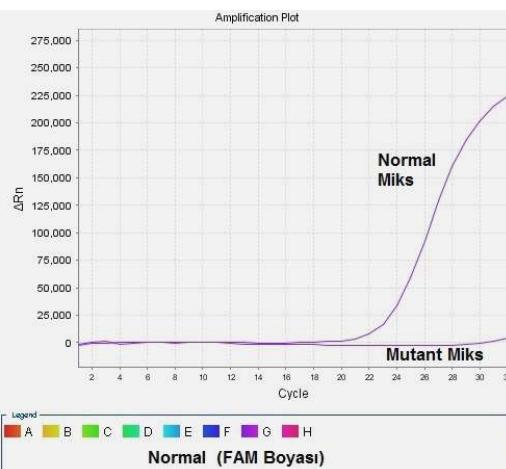
Mic qPCR Cycler

ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 cihazına aittir.



Internal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularla internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır.



OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı.

Eğer pikler geç başlıyorса,

- DNA'nın saf olmaması.
- Kismi inhibitor varlığı.
- DNA miktarının düşüklüğü.

Lütfen sorularınız için bizimle temasla geün. tech@snp.com.tr

UYARILAR

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

Düzenlenme Tarihi: 06.06.2016