

TROMBOFİLİ MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ (9 MUTASYON) Kat. No: 10R-20-09

GİRİŞ

Trombozsis ile ilgili sorunlar, kişilerin farklı pıhtılaşma problemlerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar belirli bazı mutasyonların pıhtılaşma üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Trombofili Paneli, FII Prothrombin, FV Leiden, FV Cambridge ve FV 1299, MTHFR 677 ve 1298, FXIII V34L, Beta Fibrinojen 455 G>A ve PAI-1 4G/5G mutasyonlarının analizini içermektedir.

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

Mutasyon bölgelerine uygun, Normal (Wild Tip) ve Mutant olmak üzere altı mastermiks ile çalışılır. Kit, ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve prob için dizayn edilmiştir. Sistem, mutasyonlara özgü farklı primer-prob setlerinin kombinasyonunu (Multipleks) içermektedir. Sistem ayrıca CY5 boyasında internal kontrol içeriği ile PCR reaksiyonunuzun çalışmasını da kontrol etmektedir. 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
• TRP-9 Miks 1 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-9 Miks 2 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-9 Miks 3 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-9 Miks 4 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-9 Miks 5 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-9 Miks 6 (Mutant Tip)	400 µl

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.

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı ve örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Kan örnekleri uzun süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir. Kit, SNPure Genomic DNA ve MN NucleoSpin®Blood DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir.

Tablo 1: Mutasyon Boya Tablosu

Tubes	Mutations	Dyes
Miks 1	FII Normal	FAM
	FV Normal	HEX/JOE
	677 Normal	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5
Miks 2	FII Mutant	FAM
	FV Mutant	HEX/JOE
	677 Mutant	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5
Miks 3	1298 Normal	FAM
	FV 1299 Normal	HEX/JOE
	PAI -1 5G	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5
Miks 4	1298 Mutant	FAM
	FV 1299 Mutant	HEX/JOE
	PAI -1 4G	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5
Miks 5	FXIII Normal	FAM
	FV Cambridge Normal	HEX/JOE
	Beta-Fibrinojen Normal	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5
Miks 6	FXIII Mutant	FAM
	FV Cambridge Mutant	HEX/JOE
	Beta Fibrinojen Mutant	TEXAS RED
	İnternal Kontrol	CY5

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master mikslar ayrı ayrı 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 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, HEX/JOE, TEXAS RED** ve **CY5** seçilmelidir.

Eğer:

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

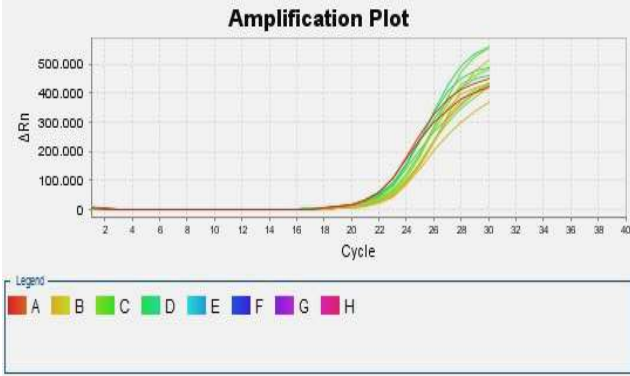
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

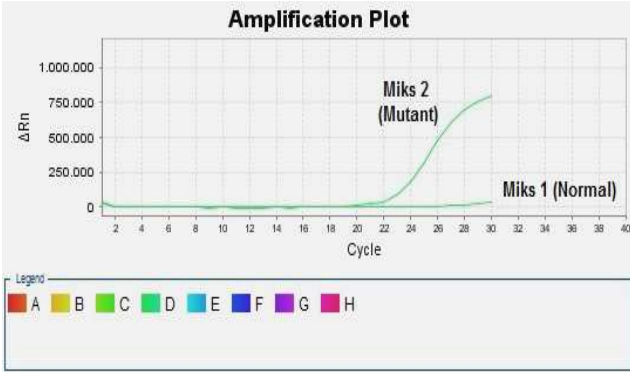
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, ve JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 Fast cihazına aittir.



Şekil 1: İnternal kontrol pikleri (CY5)

İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. C_T değeri ise $21 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



Şekil 2: FV Homozigot Mutant (Miks 1 – Miks 2, JOE)

Wild tip ve Mutant tip master mikserin amplifikasyon pikleri Tablo:1’de yer alan floresan boya içeriklerine göre analiz edilir. Master mikserlere ait amplifikasyon piklerinin C_T değerleri $21 \leq C_T \leq 26$ arasında olmalıdır. Bu C_T 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 mikserde pik verir.
- Heterozigot örnek hem “Wild Tip”, hem de “Mutant Tip” master miksde pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece “Mutant Tip” master miksde pik verir.
- Heterozigot örneklerde “Wild Tip” piki ile “Mutant Tip” pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark ≥ 3 ise test tekrar edilmelidir.



Şekil 3: FII Heterozigot (Miks 1 – Miks 2, FAM)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- DNA eksikliği,
- Test’te inhibitör varlığı.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

- DNA’nın saf olmaması.
- Kısmi inhibitör varlığı.
- DNA miktarının düşüklüğü.

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

UYARILAR

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

Düzenlenme Tarihi: Mart 2020