

KONNEKSİN MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ (10 MUTASYON)

Kat. No: 100R-20-10

GİRİŞ

Konjenital sağırılık, doğuştan olup, otozomal resesif olarak kalıtılır. Bu hastalığa neden olan mutasyonların % 98'i Connexin 26 geninde (GJB2) meydana gelmektedir. Kitimiz sayesinde bu gendeki, 35DelG, 167delT, M34T, L90P, R184P (G>C), V37I, IVS 1+1 G>A, W24X, 312Del ve E47X olmak üzere on mutasyonun taraması yapılabilmektedir.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımmasını 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 ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya 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 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, ve JOE/HEX işaretli problemler kullanılmaktadır. İnternal kontrol analizi için ise CY5 ile işaretli prob bulunmaktadır. Mutasyonlar ve ilgili boya Tablo 1' de görülmektedir.

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

SİSTEM İÇERİĞİ

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

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

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

Tablo 1 : Tüp – Mutasyon - Boya

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	35DelG Normal	FAM
	167Del Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	35DelG Mutant	FAM
	167Del Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	M34T Normal	FAM
	L90P Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	M34T Mutant	FAM
	L90P Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 5	R184P Normal	FAM
	V37I Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 6	R184P Mutant	FAM
	V37I Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 7	IVS1+1 Normal	FAM
	V24X Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 8	IVS1+1 Mutant	FAM
	V24X Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 9	312Del Normal	FAM
	E47X Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 10	312Del Mutant	FAM
	E47X Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master mikslar ayrı ayrı çalışmalıdır.
- Nazikçe 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** ve **CY5** seçilmelidir.

Eğer:

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

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

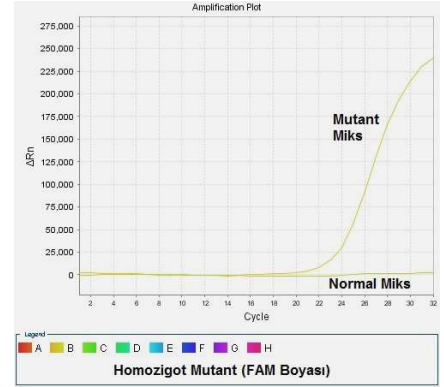
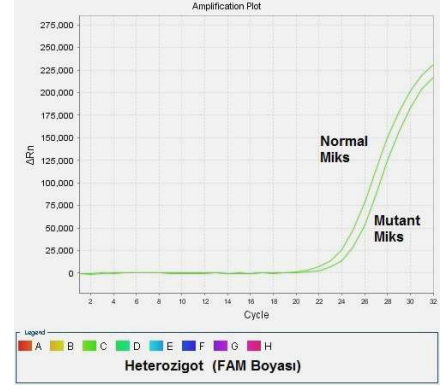
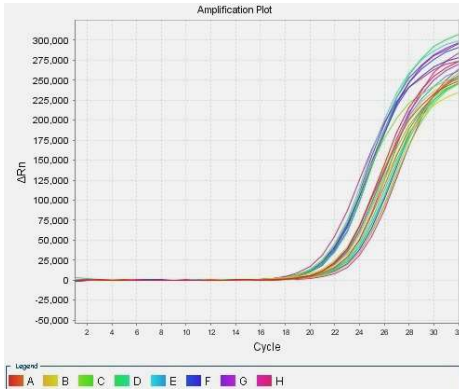
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

Roche LightCycler® 480 System

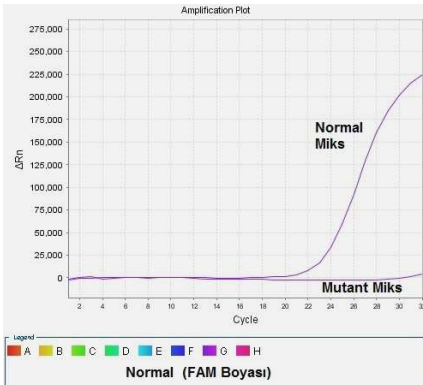
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX/JOE ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 cihazına aittir.



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

Wild tip ve Mutant tip master mikslerin amplifikasyon pikleri FAM boyasına göre analiz edilir. Master mikslere 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 mikslerde 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 $4 \leq C_T \leq 6$ siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.

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 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.

Düzenlenme Tarihi: 01.02.2019