

TROMBOFİLİ MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ A (12 MUTASYON) Kat. No: 10R-20-12A

GİRİŞ

Trombozis 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 1299, FV Cambridge, FV Y1702C, MTHFR 677, MTHFR 1298, MTR 2756, MTRR 66, FXIII Val34Leu, Beta-Fibrinogen 455 G>A ve PAI-1 4G/5G mutasyonlarının analizini içermektedir.

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 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 Tip olmak üzere altı master miks ile çalışılır. Kit, ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve prob için dizayn edilmiştir. Sistem, mutasyonlara özgü farklı primer-prob setlerinin kombinasyonunu (Multipleks) içermektedir (Bkz. Tablo 1). 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-12A Miks 1 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-12A Miks 2 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-12A Miks 3 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-12A Miks 4 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-12A Miks 5 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-12A Miks 6 (Mutant Tip)	400 µl
• Kontrol DNA	60 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

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.

MUTASYON-BOYA TABLOSU

Tablo 1: Mutasyon Boya Tablosu

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	FII Wild Tip	QUASAR 705
	FV Leiden Wild Tip	HEX/JOE
	677 Wild Tip	TEXAS RED
	1298 Wild Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	FII Mutant Tip	QUASAR 705
	FV Leiden Mutant Tip	HEX/JOE
	677 Mutant Tip	TEXAS RED
	1298 Mutant Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	FV Cambridge Wild Tip	QUASAR 705
	FV 1299 Wild Tip	HEX/JOE
	PAI – 1 5G	TEXAS RED
	FXIII Wild Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	FV Cambridge Mutant Tip	QUASAR 705
	FV 1299 Mutant Tip	HEX/JOE
	PAI – 1 4G	TEXAS RED
	FXIII Mutant Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5
Miks 5	MTRR 66 Wild Tip	QUASAR 705
	MTR 2756 Wild Tip	HEX/JOE
	Beta Fib. Wild Tip	TEXAS RED
	FV 1702 Wild Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5
Miks 6	MTRR 66 Mutant Tip	QUASAR 705
	MTR 2756 Mutant Tip	HEX/JOE
	Beta Fib. Mutant Tip	TEXAS RED
	FV 1702 Mutant Tip	FAM
	Internal Kontrol	CY5

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Tip) 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.	

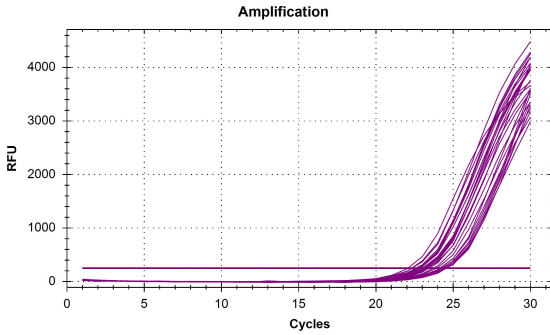
Floresan boya olarak **FAM, HEX/JOE, TEXAS RED, Quasar 705** ve **CY5** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

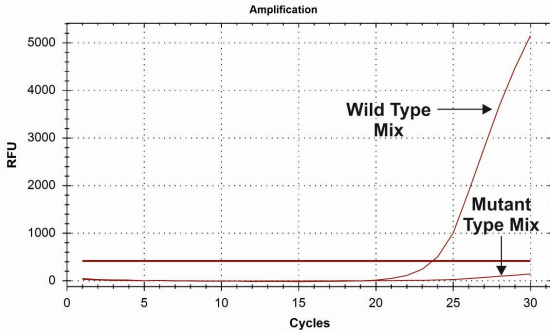
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, Quasar 705 ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.



Şekil 1: İnternal kontrol pikleri - CY5 Boyası

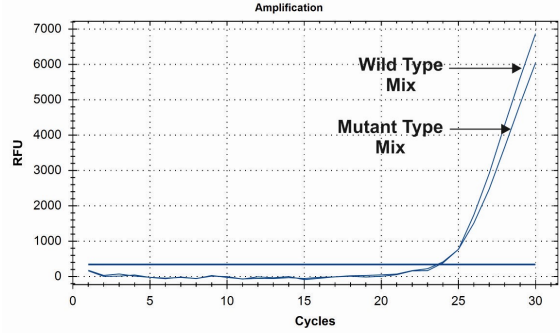
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. C_T değeri ise $21 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



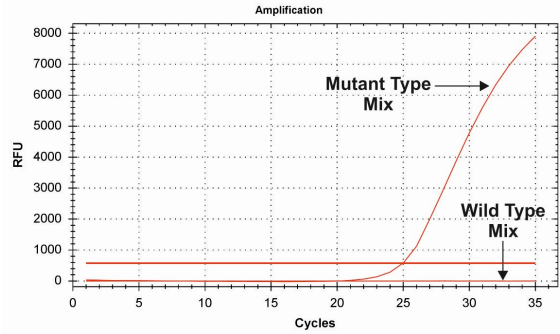
Şekil 2: FII Wild Tip - Quasar 705 Boyası (Miks 1 – 2)

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 mikste pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece "Mutant Tip" master mikste 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: FXIII Heterozigot – FAM Boyası (Mix 3 – 4)



Şekil 4: Fibrinogen Homozigot Mutant – TEXAS RED Boyası (Mix 5 – 6)

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