

## FMF REAL TIME PCR KİTİ MULTİPLEKS

**(26 MUTASYON)**

**Kat. No: 11R-20-26**

### GİRİŞ

FMF (Ailesel Akdeniz Ateşi) genellikle Akdeniz ülkeleri halklarında görülen, otozomal resesif kalıtılıan hastalıktır. Marenostrin-Encoding Fever (MEFV) genindeki farklı mutasyonlar hastalığa sebep olabilmektedir. Kitimiz, ekzon 1'de R42W, E84K, ekzon 2'de L110P, E148Q, E148V, E167D, E230K/Q, T267I, P283L, G304R, ekzon 3'de R354W, P369S, R408Q, ekzon 5'de F479L, ekzon 9'da I591T ve ekzon 10'da yer alan R653H, M680I(G/C-A), I692DEL, M694I, M694V, K695R, V726A, A744S, R761H, mutasyonları olmak üzere 26 mutasyonu analiz etmektedir. Kit, ülkemiz ve birçok ülkede görülen MEFV mutasyonlarının 99.8'ini taramaktadır.

### TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

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

### ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her örnek için 12 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, JOE/HEX, Texas RED ve Quasar 705 işaretli probalar kullanılmaktadır. Internal kontrol analizi için ise CY5 ile işaretli prob bulunmaktadır. Mutasyonlar ve ilgili boyaları Tablo 1' de görebilirsiniz. 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
Miks 1	400 µl
Miks 2	400 µl
Miks 3	400 µl
Miks 4	400 µl
Miks 5	400 µl
Miks 6	400 µl
Miks 7	400 µl
Miks 8	400 µl
Miks 9	400 µl
Miks 10	400 µl
Miks 11	400 µl
Miks 12	400 µl
Kontrol DNA	75 µl

\*Kontrol DNA bazı mutasyon bölgelerini içeren sentetik plasmid DNA'dır. Sentetik DNA ile elde edilmesi beklenilen sonuçlar; I692del Normal, M694I Normal, M680I Homozigot Mutant, K695R Normal, A744S Normal, M694V Homozigot Mutant, V726A Homozigot Mutant ve R761H Homozigot Mutant. Sentetik DNA, örnek DNA'dan bir miktar farklı amplifikasyon peak görüntüsü verebilir.

**Tablo 1 : Tüp – Mutasyon - Boya**

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	P369S Normal	FAM
	A744S Normal	TEXAS RED
	E84K Normal	JOE / HEX
	I692DEL Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 2	P369S Mutant	FAM
	A744S Mutant	TEXAS RED
	E84K Mutant	JOE / HEX
	I692DEL Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 3	G304R Normal	FAM
	M694V Normal	TEXAS RED
	E148V Normal	JOE / HEX
	R42W Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 4	G304R Mutant	FAM
	M694V Mutant	TEXAS RED
	E148V Mutant	JOE / HEX
	R42W Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 5	E148Q Normal	FAM
	V726A Normal	TEXAS RED
	F479L Normal	JOE / HEX
	R653H Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 6	E148Q Mutant	FAM
	V726A Mutant	TEXAS RED
	F479L Mutant	JOE / HEX
	R653H Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 7	M694I Normal	FAM
	E167D Normal	TEXAS RED
	T267I Normal	JOE / HEX
	R408Q Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 8	M694I Mutant	FAM
	E167D Mutant	TEXAS RED
	T267I Mutant	JOE / HEX
	R408Q Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 9	M680I Normal	FAM
	L110P Normal	TEXAS RED
	P283L Normal	JOE / HEX
	I591T Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 10	M680I Mutant	FAM
	L110P Mutant	TEXAS RED
	P283L Mutant	JOE / HEX
	I591T Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 11	K695R Normal	FAM
	R761H Normal	TEXAS RED
	E230K/Q Normal	JOE / HEX
	R354W Normal	QUASAR 705
	Internal Control	CY5
Miks 12	K695R Mutant	FAM
	R761H Mutant	TEXAS RED
	E230K/Q Mutant	JOE / HEX
	R354W Mutant	QUASAR 705
	Internal Control	CY5

### DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pihtlaşmasına engel olmak amacı ile 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, SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 µl elüsyon solusyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

### TEST PROSEDÜRÜ

- Her örnek için 12 Miks ile çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master miksler karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master mikş (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

**Tablo 2 :** PCR Koşulları

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	30 Döngü
62 °C	1 dk.	

Floresan boyalar olarak **FAM, CY5, Texas Red, HEX/JOE** ve **Quasar 705** seçilmelidir.

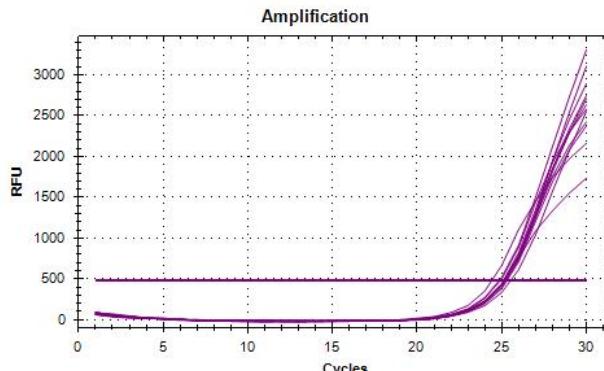
#### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

### ANALİZ

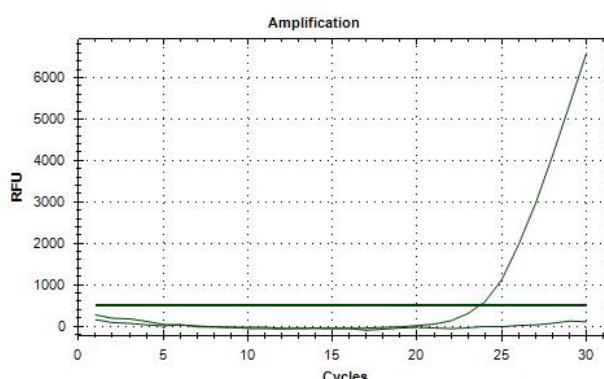
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, HEX/JOE ve Quasar 705 boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.

Pratik olması açısından protokolün sonundaki Tablo 2'den (analiz tablosu) yararlanabilirsiniz.



**Resim 1 :** Internal kontroller – CY5 boyası

İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularında internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise **21 ≤ ct ≤ 26** aralığında olmalıdır.

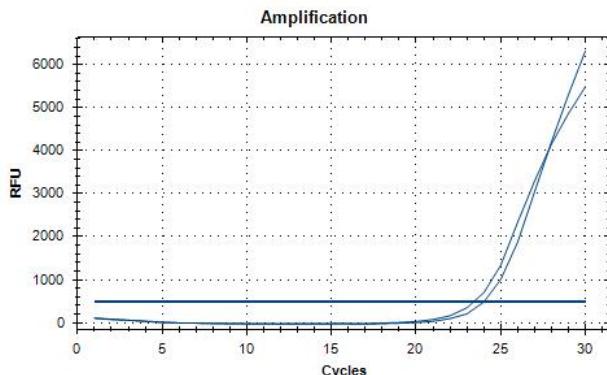


**Resim 2 :** E230K/Q Normal örnek – Hex boyası

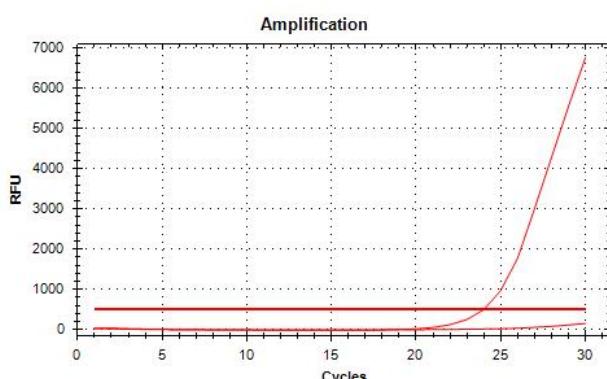
Mutasyonların amplifikasyon pikleri ilgili boyaya ile analiz edilir\*. CT değerleri **21 ≤ CT ≤ 26** arasında olmalıdır. Bu CT değerleri SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyon protokollerine göre ±2/3 siklus farklılıklar gösterebilir.

- 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" pik ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark **3 ≤ CT ≤ 4** siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir. Ct değer farkının > 4 oolu durumlarda sonuç normal verilebilir.

\*Lütfen Tablo 1'yi kontrol ediniz.



**Resim 3 :** E148Q Heterozigot Mutant örnek – Fam boyası



**Resim 4 :** M694V Homozigot Mutant örnek – Texas Red boyası

#### **OLASI PROBLEMLER**

##### **Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,**

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı.

##### **Eğer pikler gec başlıyorса,**

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

Lütfen sorularınız için bizimle temasla geçin. [tech@snp.com.tr](mailto:tech@snp.com.tr)

#### **UYARILAR**

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserler kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikserlerin 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 çözüdmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

**Düzenlenme Tarihi: 18.10.2017**

#### **KAYNAKLAR**

1. Zamani A.G., Acar A., Yıldırım M.S., "Spectrum of mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) in Turkish patients of the Central Anatolia region: a comparison of two mutation detection system", *Genetics and Molecular Research* (2013), 12 (4): 5152-5159
2. Oztuç S., Ulaş M., Ergun S., et all., "Screening of common and novel familial mediterranean fever mutations in south-east part of Turkey", *Mol Biol Rep* (2014) 41:2601–2607
3. Kocakap D.B.S., Günel A. et all., "The frequency of Familial Mediterranean fever gene mutations and genoTips at Kırıkkale and comparison with the mean of regional MEFV mutation frequency of Turkey", *Mol Biol Rep* (2014) 41:1419–1426
4. Gunesacar R., Celik M.M., Arica V., et all., "Frequency of MEFV gene mutations in Hatay province, Mediterranean region of Turkey and report of a novel missense mutation (I247V)", *Gene* (2014), 546: 195–199
5. Dogan H., Bayrak O.F., Emet M., et all., "Familial Mediterranean fever gene mutations in north-eastern part of Anatolia with special respect to rare mutations", *Gene* (2015), 568: 170–175
6. Yazıcı A., Cefele A., Hakan Savlı H., "The frequency of MEFV gene mutations in behcet's disease and their relation with clinical findings", *Rheumatol Int* (2012) 32:3025–3030
7. Centre for Arab Genomic Studies, "The Catalogue for Transmission Genetics in Arabs", *Familial Mediterranean Fever Gene*, [www.cags.org.ae](http://www.cags.org.ae)
8. Belmahi I., Cherkaoui J.I., Iman Hama I., et all., "MEFV mutations in Moroccan patients suffering from familial Mediterranean Fever", *Rheumatol Int* (2012) 32:981–984
9. Chaabouni HB, Ksantini M, M'rard R,,et all., "MEFV mutations in Tunisian patients suffering from familial Mediterranean fever Semin Arthritis Rheum". (2007) 36(6):397-401.
10. Mansour I , Delague V, Cazeneuve C, et all, Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Grek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694Vand M694I mutations, *European Journal of Human Genetics*, (2001) 9, 51–55

Well	Sample								
		Mix1 (WT)		Mix2 (MT)		Mix3 (WT)		Mix4 (MT)	
		G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	Mix11 (WT)
<b>A</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix12 (MT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>B</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	Mix11 (WT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>C</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148S / T. RED	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix12 (MT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>D</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix11 (WT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>E</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix12 (MT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>F</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix11 (WT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / T. RED	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>G</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix12 (MT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	
<b>H</b>	P369S / FAM	G304R / FAM	E148Q / FAM	V726A / T. RED	E167D / T. RED	L110P / T. RED	R761H / T. RED	R761H / T. RED	Mix11 (WT)
	A744S / T. RED	M694V / T. RED	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	T267I / JOE-HEX	P283L / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	E230K(Q) / JOE-HEX	
	E84K / JOE-HEX	E148V / JOE-HEX	F479L / JOE-HEX	R42W / QUA 705	R553H / QUA 705	R408Q / QUA 705	I591T / QUA 705	R354W / QUA 705	
	1692DEL / QUA 705			Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	Int. Control / CY5	
	Int. Control / CY5			G304R / FAM	E148Q / FAM	M694I / FAM	M680I / FAM	K695R / FAM	