

DİREKT KİSTİK FİBROZİS DELTA 508 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 14R-30-01

GİRİŞ

Kistik Fibrozis (CF) otozomal resesif kalıtımla geçen ağır bir metabolizma bozukluğudur. Doğumdan itibaren birçok organda fonksiyon bozukluklarına yol açarak günlük yaşamı büyük ölçüde etkilemektedir. Özellikle akciğer, pankreas, ter bezleri, sindirim sisteminde etki göstermekte, erkek üreme kanallarında kalın ve yapışkan bir mukusun salgılanması ile tıkanmaya sebep olmaktadır. Semptomlar yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkmaya başlar. Delta F508 (fenilalanin) delesyonu kistik fibrozis hastalığıyla ilişkili en yaygın mutasyondur.

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 ışımasını 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

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 çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için 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	20 Test	50 Test
• ΔF508 Normal (Wild Type) kt PCR Master Miks	440 µl	1100 µl
• ΔF508 Mutant Direkt PCR Master Miks	440 µl	1100 µl
• Kontrol DNA	20 µl	30 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

Kit, DNA izolasyonuna gerek duymadan tam kandan direkt olarak çalışmaya uygundur.

Kan örnekleri uygun steril EDTA ya da Sitratlı kan tüplerinde oda sıcaklığında saklanmalıdır.

TEST PROSEDÜRÜ

- Miksi çözünmesi için oda sıcaklığına bırakılır
- Mikx çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her bir örnek için, beyaz PCR Plate / tüpe **22 µl Direkt Miks** bölünür.
- Periferik tam kan tüpü ters düz edilerek karıştırılır.
- Daha sonra Direkt Mikslerin olduğu her tüpe **0.5 µl örnek kanı** eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 Min.	Holding
95 °C	15 Sec.	40x Döngü
62 °C	1 Min.	

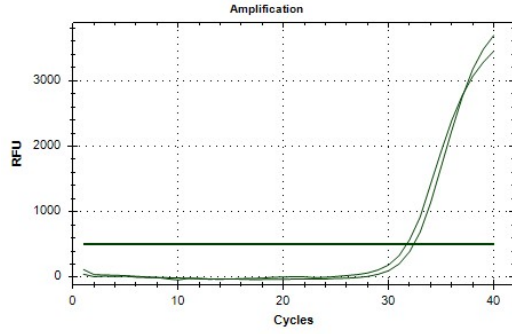
Floresan boya olarak **FAM ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

Bio-Rad CFX96, Opus 96
ABI Prism® 7500/7500 Fast
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler
Long Gene

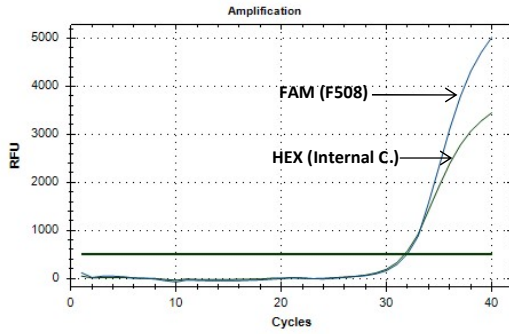
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri BioRad CFX96 cihazına aittir. Pozitif örnekler için, İnternal kontrol ve F508 amplifikasyon pikleri birbirlerine yakın olmalı, aradaki ct değer farklı ≤4 olmalıdır (Şekil 2).

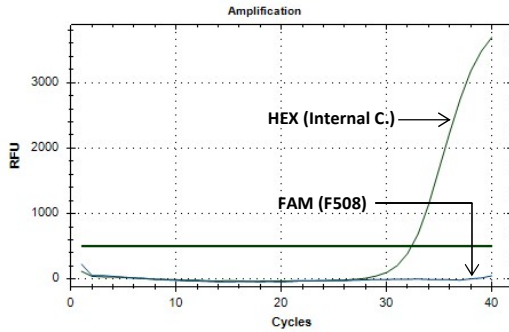


Şekil 1: Internal kontrol – HEX boyası

İnternal Kontrol pikleri HEX boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $26 \leq ct \leq 36$ aralığında olmalıdır.



Şekil 2: F508 Wild Type Miks – FAM ve HEX boyası



Şekil 3: F508 Mutant Miks – FAM ve HEX boyası

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- Örnek eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı söz konusudur.

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

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR Direkt 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: 07.04.2023

- 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 4 siklus fark olmalıdır.