

BETA TALASEMİ MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 16R-20-12

GİRİŞ

Akdeniz anemisi, ya da tıptaki adıyla Beta Talasemi; Akdeniz ülkelerinde görülen, doğacak çocuğa anne-babadan ilgili genin kalıtsal olarak aktarılması ile geçen bir rahatsızlıktır. Anemi (kansızlık) oluşmasına neden olan etmen, kanda alyuvarların yapısında yer alan "hemoglobin" molekülünün yapısındaki bozukluktur.

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 ışınmasını 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 örnek için 12 mikş 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 işaretli problemler kullanılmaktadır. İnternal 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
• Mikş 1	400 µl
• Mikş 2	400 µl
• Mikş 3	400 µl
• Mikş 4	400 µl
• Mikş 5	400 µl
• Mikş 6	400 µl
• Mikş 7	400 µl
• Mikş 8	400 µl
• Mikş 9	400 µl
• Mikş 10	400 µl
• Mikş 11	400 µl
• Mikş 12	400 µl
• Kontrol DNA	75 µl

*Kontrol DNA bazı mutasyon bölgelerini içeren sentetik plasmid DNA'dır. Sentetik DNA ile elde edilmesi beklenen sonuçlar; IVS1.6 Heterozigot, -30(T>A) Homozigot Mutant, Cd5 Normal, IVS1.110 Normal, Cd 39 Normal, HBS Normal, Cd 44 Normal, IVS2.1 Homozigot Mutant, IVS1.5 Homozigot Mutant. Sentetik DNA, örnek DNA'dan bir miktar farklı amplifikasyon peak görüntüsü verebilir.

Tablo 1: Tüp – Mutasyon - Boya

Tüpler	Mutasyonlar	Boylar
Mikş 1	IVS1.6 (T>C) Wild Tip	FAM
	-30(T>A) Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 2	IVS1.6 (T>C) Mutant Tip	FAM
	-30(T>A) Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 3	Cd 5 (-CT) Wild Tip	FAM
	IVS1.110 (G>A) Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 4	Cd 5 (-CT) Mutant Tip	FAM
	IVS1.110 (G>A) Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 5	Cd 39 (C>T) Wild Tip	FAM
	HBS Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 6	Cd 39 (C>T) Mutant Tip	FAM
	HBS Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 7	Cd 29 (C>T) Wild Tip	FAM
	Cd 44 (-C) Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 8	Cd 29 (C>T) Mutant Tip	FAM
	Cd 44 (-C) Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 9	IVS2.1 (G>A) Wild Tip	FAM
	IVS1.1 (G>A) Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 10	IVS2.1 (G>A) Mutant Tip	FAM
	IVS1.1 (G>A) Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 11	IVS2.745 (C>G) Wild Tip	FAM
	IVS1.5 (G>C) Wild Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5
Mikş 12	IVS2.745 (C>G) Mutant Tip	FAM
	IVS1.5 (G>C) Mutant Tip	JOE / HEX
	Empty	Texas Red
	Internal Control	CY5

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, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Alınan kan örnekleri izolasyon aşamasına kadar +4°C'de saklanmalı, kan örnekleri bir aydan fazla bir süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir.

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

TEST PROSEDÜRÜ

- Her örnek için 12 Miks farklı tüplerde 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.	

Tablo 2 : PCR Programı

Floresan boya olarak **FAM, HEX/JOE ve CY5** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

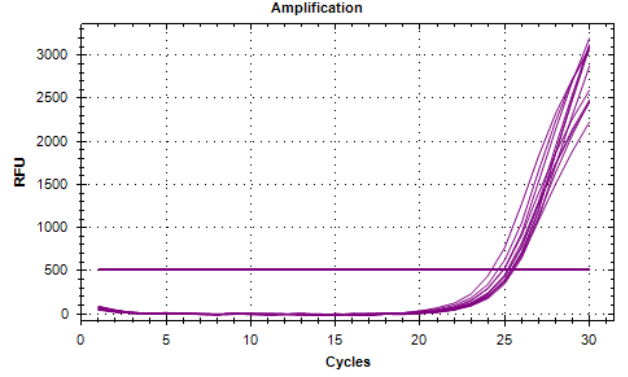
Roche LightCycler® 480 System

Eğer:

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

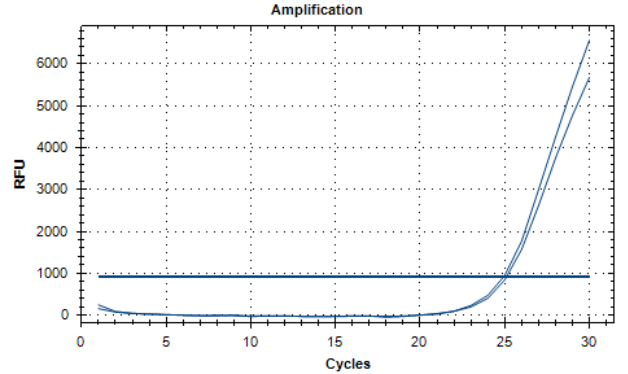
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX/JOE ve CY5 boya larında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri BioRad CFX96 cihazına aittir.



Şekil 1: Internal kontrol – CY5 boya

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

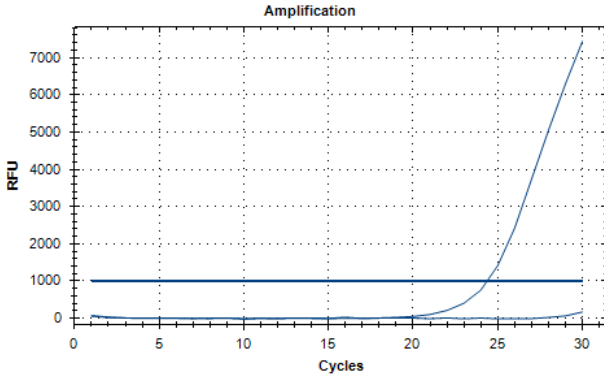


Şekil 2: IVS2.1 G>A Heterozigot (Miks 9 & 10) – FAM boya

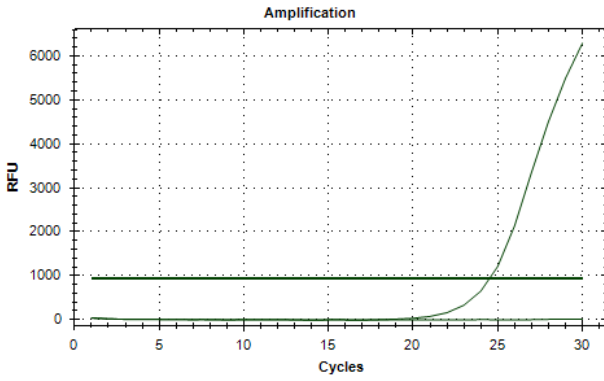
Mutasyonların amplifikasyon pikleri ilgili boya ile analiz edilir*. CT değerleri **21 ≤ CT ≤ 26** arasında olmalıdır. Bu CT değerleri SNPPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyon protokollerine göre ±2/3 siklus farklılıklar gösterebilir.

- 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" piki ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark **4 ≤ CT ≤ 6** siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.

*Lütfen Tablo 1'i kontrol ediniz.



Şekil 3: IVS2.745 C>G Wild Tip (Miks 11 & 12) – FAM boya



Şekil 4: IVS1.110 G>A Wild Tip (Miks 3 & 4) – HEX boya

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

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

Eğer pikler geç başlıyorsa,

Öncelikle örneklerinizin piklerini pozitif kontrol DNA pikleri ile karşılaştırın. Eğer pozitif kontrol DNA da bir sorun yoksa,

- Örneğinizin DNA'sı saf değildir veya az miktarda inhibitör içeriyor olabilir.
- Yeterli miktarda DNA elde edememiş olabilirsiniz.

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.
- Yukarıda belirtilen PCR programı uygulanmalıdır.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: 12.10.2019

Well	Sample	Mix1 (WT)	Mix2 (MT)	Mix3 (WT)	Mix4 (MT)	Mix5 (WT)	Mix6 (MT)	Mix7 (WT)	Mix8 (MT)	Mix9 (WT)	Mix10 (MT)	Mix11 (WT)	Mix12 (MT)
A	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
B	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
C	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
D	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
E	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
F	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
G	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
H	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		
	IVS1.6 (T>C) FAM		Cd 5 (-CT) FAM		Cd 39 (C>T) FAM		Cd 29 (C>T) FAM		IVS2.1 (G>A) FAM		IVS2.745 (C>G) FAM		
	-30 (T>A) JOE-HEX		IVS1.110 (G>A) JOE-HEX		HBS JOE-HEX		Cd 44 (-C) JOE-HEX		IVS1.1 (G>A) JOE-HEX		IVS1.5 (G>C) JOE-HEX		
	Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		Int. Control / CV5		