

MPN TARAMA KİTİ

Kat. No: 23R-20-10

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü hematopoetik ve lenfoid tümörlerin sınıflamasında, birbirinin içine geçmiş klinik ve genel moleküler özelliklere sahip bir dizi hastalık tanımlamıştır. "Philadelphia-Negatif Myeloproliferative Neoplasmlar (MPNs)" sahip hastalarda *Janus kinase* (JAK2) geninde oluşan mutasyonlar dışında thrombopoietin reseptörünü kodlayan MPL geni Ekzon 10, Calreticulin (CALR) Ekzon 9 ve CSF3R mutasyonları da klinik olarak büyük öneme sahiptir.

Kitimiz JAK-2 Ekzon 12; 530 ve 547. amino asitler arasında görülen mutasyonları, JAK-2 Ekzon 14 V617F mutasyonunu, MPL geni Ekzon 10; S505N, W515A, W515K, W515L, W515R mutasyonları, CALR Ekzon 9; Tip 1, Tip 2 ve diğer mutasyonlara ek olarak CSF3R; T615A ve T618I mutasyonlarını tarama imkanı vermektedir. Tespit edilebilen tüm mutasyonlar ile ilgili ayrıntılı bilgi için lütfen son sayfada bulunan mutasyon listesini inceleyiniz.

Kit; yukarıda belirtilen bölgeler için \leq %1 mutasyon oranını tespit edebilmektedir.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesi ile hedef spesifik hidroliz problemleri parçalaması prensibine dayanmaktadır. Probun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışmasını 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 ışma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir. Sistemde, internal kontrol dışında örnek DNA' sında sadece mutasyon varlığında amplifikasyon eğrisi saptanmaktadır. Wild tip örnekte sadece internal kontrol amplifiye olmaktadır.

Bazı bölgelerin analizlerinde, özel tasarlanmış oligonükleotidler kullanılarak wild tip dizi bloklanmakta, mutasyon taşıyan bölgeler bu bloklanmaya yakalanmadan ilgili primerlerin bölgeyi bağlanması ile mutasyon taraması mümkün hale gelmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her örnek için 4 Miks kullanılır. 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, HEX ve TEXAS RED 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

- MPN Real Time PCR Master Miks 1
- MPN Real Time PCR Master Miks 2
- MPN Real Time PCR Master Miks 3
- MPN Real Time PCR Master Miks 4
- Kontrol DNA*

20 Test

- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 400 µl
- 25 µl

*Kontrol DNA sentetik plasmid DNA'dır. Sentetik DNA, örnek DNA'dan bir miktar farklı amplifikasyon peak görüntüsü verebilir. Jak-2 Ekzon 12 pozitif kontrolü FAM boyasında Mix1, Mix 2 ve Mix 3'de pik verir. CALR pozitif kontrol ise Texas RED boyasında Mix 1 ve Mix 3'de pik verir. Her iki kontrol de Internal Kontrol bölgesi içermez ve CY5'de pik vermez.

Tablo 1: Tüpler- mutasyonlar- boyalar.

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	JAK-2 Ekzon 12	FAM
	CALR	Texas Red
	T615A	HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	JAK-2 Ekzon 12	FAM
	CALR	Texas Red
	T618I	HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	JAK-2 Ekzon 12	FAM
	CALR	Texas Red
	S505N & W515L	HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	JAK-2 Ekzon 12	FAM
	JAK-2 V617F	Texas Red
	W515A & W515K & W515R	HEX
	Internal Kontrol	CY5

DNA İZOLASYONU

Kan numunesi, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı ve sonra pıhtılaşmaya 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 4 miks ile çalışılmalıdır. Nazikçe pipetaj yapılmalıdır.
- Bir örnek için; 4 farklı miks, 4 ayrı optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl** olarak aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl ekstrakte DNA'sı** eklenerek örnek hazırlanmış olur.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

Tablo 2: PCR koşulları

96 °C	1 dk.	Taq Aktivasyonu 32 Döngü
96 °C	2 sn.	
60 °C	30 sn.	

Floresan boya olarak **FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7500/7500 Fast

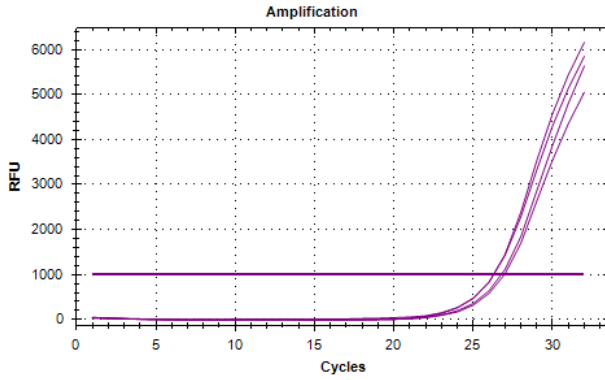
Bio-Rad CFX96

Eğer:

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

ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri BioRad CFX96 cihazına aittir. Değerlendirmeye geçmeden önce FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 boya için eşik değeri 1000 (BioRad CFX96 cihazında) olarak ayarlanmalıdır.

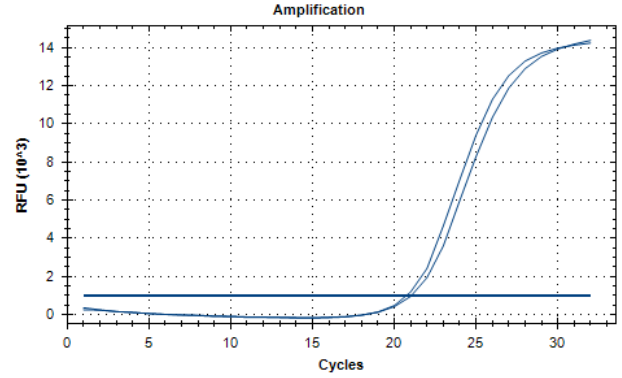


Resim 1: İnternal kontrol sonuçları (CY5 boya)

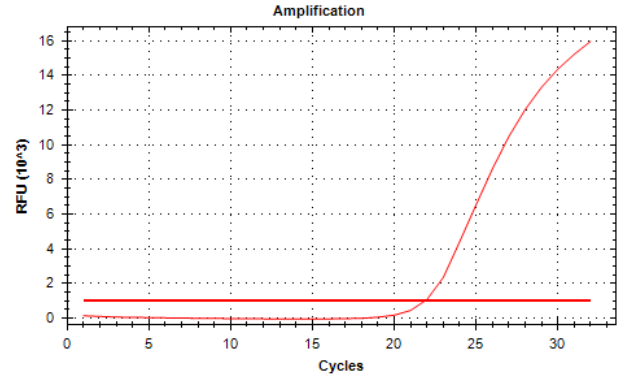
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 28$ aralığında olmalıdır.

Mutasyonların amplifikasyon pikleri ilgili boya ile analiz edilir*.

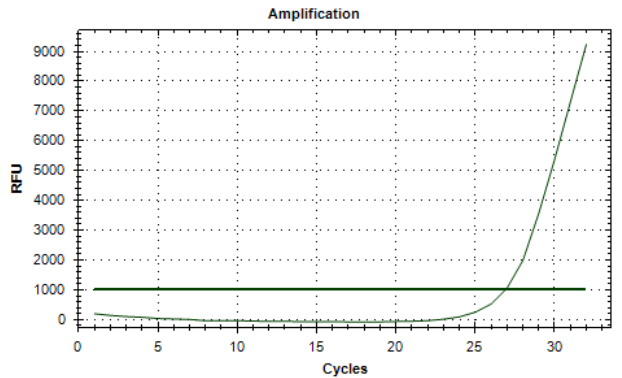
*Lütfen Tablo 1'i kontrol ediniz.



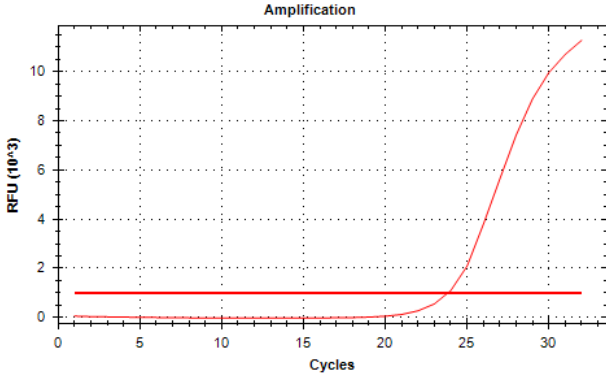
Resim 2: JAK2 Ekzon 12 pozitif sonuç (Miks 1 ve Miks 3/FAM boya)



Resim 3: CALR pozitif sonuç (Miks 2/TEXAS RED boya)



Resim 4: W515K pozitif sonuç (Miks 4/HEX boya)



Resim 5: JAK-2 V617F pozitif sonuç (Miks 4/Texas Red boya)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- DNA eksikliği,
- Testte 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.
- Mutant DNA miktarı düşüktür.

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

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdüremek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

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.

Düzenlenme Tarihi: 7 Ekim 2019

REFERANSLAR

- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. Blood. 2014; 123(10):1544-1551

Mutation List for CalR

	Mutations
Mix 1 (Texas Red Dye)	c.1111_1113delGAA (p.E372delE), c.1116_1116delA (p.D373fs*57), c.(1117-1119)ins (p.(D373_?)Xfs?), c.(1119_1121)ins? (p.(A352_*)Xfs*?), c.1122_1122delG (p.K375fs*55), c.1120_1122delAAG (p.K375delK), c.1090_1123del34 (p.E364fs*55), c.1122_1123GA>TTGT (p.K374fs*57), c.1120_1123delAAGA (p.K374fs*55), c.1091_1124del34 (p.E364fs*55), c.1113_1125>TTGTCT (p.E371fs*57), c.1122_1125delGAAA (p.K374fs*55), c.1123_1125AAA>TGTTT (p.K375fs*56), c.1123_1125AAA>TTTTGTTT (p.K375fs*57), c.1120_1125AAGAAA>TCTTGTCT (p.K374fs*57), c.1120_1125AAGAAA>TGGCT (p.K374fs*56), c.1125_1125delA (p.K375fs*55), c.1125_1126ins11 (p.R376fs*58), c.1120_1126AAGAAC>TAGCTA (p.K374fs*56), c.1120_1126AAGAAC>TTCTTGCTCTTCTGCTCT (p.K374fs*60)
Mix 2 (Texas Red Dye)	c.1151_1154ACAA>TTTGTG (p.D384fs*47), c.1143_1154>TCCTTGTG (p.E381fs*48), c.1147_1154GAGGACAA>TGTC (p.E383fs*46), c.1153_1154AA>TGTC (p.K385fs*46), c.1151_1154ACAA>TATGTC (p.D384fs*47), c.1151_1154ACAA>GCAATTGTC (p.D384fs*48), c.1153_1154AA>TCTTGTG (p.K385fs*47), c.1154_1154A>TTTGTG (p.K385fs*47), c.1154_1154A>TATGTC (p.K385fs*47), c.1150_1154GACAA>TGTC (p.D384fs*46), c.1154_1154A>TCTGTC (p.K385fs*47), c.1154_1155insGTGTC (p.E386fs*46), c.1154_1155insATGTC (p.E386fs*46), c.1154_1155insTTGTG (p.K385fs*47)(Type 2) , c.1155_1156insTGTC (p.E386fs*46)
Mix 3 (Texas Red Dye)	c.1129_1135AAGAGG>CTTTGCGTA (p.K377fs*54), c.1137_1138insAG (p.E380fs*38), c.1129_1138del10 (p.K377fs*50), c.1129_1139>CTCTGTC (p.K377fs*52), c.1129_1139>CTCTGCCCTC (p.K377fs*53), c.1140_1140delG (p.E381fs*49), c.1139_1140insTC (p.E380fs*51), c.1145_1146insGACGC (p.E383fs*49), c.1135_1147del13 (p.E379fs*47), c.1142_1151AGGCAGAGGA>CGGCATGTC (p.E381fs*49), c.1135_1152>CCTCCTCTTTGTC (p.E378fs*50), c.1131_1152del22 (p.E378fs*45), c.1138_1212>AGGAGGCAGAGGCAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAAGGAGGAAAGATGA (p.E380fs*62), c.1139_1215>CAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAAGGAGGAAAGTGA (p.E380fs*57), c.1143_1220>GCAGAGGACAAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAAGGAGGAAAGATG (p.A382fs*57)
Mix 1 & Mix 3 (Texas Red Dye)	c.1127_1129GCA>TTTGC (p.R376fs*55), c.1120_1129del10 (p.K375fs*52), c.1096_1129del34 (p.R366fs*56), c.1120_1131>TGCGT (p.K374fs*54), c.1098_1131del34 (p.L367fs*52), c.1127_1132GCAAG>TTTGC (p.R376fs*54), c.1100_1133del34 (p.L367fs*52), c.1124_1133del10 (p.K375fs*53), c.1122_1134del13 (p.K375fs*51), c.1100_1134>A (p.L367fs*52), c.1101_1134del34 (p.K368fs*51), c.1102_1135del34 (p.K368fs*51), c.1118_1136del19 (p.D373fs*51), c.1107_1137del31 (p.E370fs*50), c.1102_1137>GA (p.K368fs*51), c.1104_1137del34 (p.E369fs*50), c.1092_1137del46 (p.Q365fs*50), c.1102_1137>CA (p.K368fs*51), c.1093_1138del46 (p.Q365fs*50), c.1105_1138del34 (p.E369fs*50), c.1120_1138del19 (p.K374fs*50), c.1094_1139del46 (p.Q365fs*50), c.1103_1139del37 (p.K368fs*50), c.1095_1140del46 (p.L367fs*48), c.1122_1140del19 (p.K375fs*49), c.1120_1140>TCTTGTCT (p.K374fs*52), c.1110_1140del31 (p.E371fs*49), c.1112_1142del31 (p.E371fs*49), c.1090_1141del52 (p.E364fs*49), c.1089_1141del53 (p.E364fs*7), c.1111_1141del31 (p.E371fs*49), c.1099_1141del43 (p.L367fs*49), c.1122_1141>A (p.K375fs*49), c.1111_1142>T (p.E371fs*49), c.1091_1142del52 (p.E364fs*46), c.1080_1143>GGAAGAAGACAA (p.Q361fs*52), c.1093_1143del51 (p.Q365_E381del), c.1126_1144del19 (p.R376fs*48), c.1108_1144del37 (p.E370fs*48), c.1114_1144del31 (p.E372fs*48), c.1102_1145>AGGAGGAGGG (p.K368fs*51), c.1109_1145del37 (p.E371fs*47), c.1118_1145>CGTTA (p.D373fs*50), c.1115_1145del31 (p.D373fs*47), c.1125_1146del22 (p.K377fs*46), c.1116_1146del31 (p.D373fs*47), c.1101_1146del46 (p.K368fs*47), c.1100_1145del46 (p.L367fs*48), c.1111_1147del37 (p.E371fs*47), c.1104_1147>GAGGAGGCAA (p.E369fs*50), c.1104_1148>GAGGAGGAGCAGT (p.E369fs*50), c.1121_1148del28 (p.K374fs*47), c.1103_1148del46 (p.K368fs*47), c.1101_1152del52 (p.K368fs*45), c.1103_1154del52 (p.K368*45), c.1095_1155del61 (p.L367fs*43), c.1104_1155del52 (p.E369fs*44), c.1099_1156del58 (p.L367fs*44), c.1109_1160del52 (p.E370fs*43), c.1100_1160del61 (p.K368fs*42), c.1113_1160del48 (p.E371_E386del), c.1107_1176del70 (p.E370fs*37), c.1099_1159del61 (p.L367fs*43), c.1092_1143del52 (p.L367fs*46)(Type 1)
Mix 2 & Mix 3 (Texas Red Dye)	c.1130_1154>TCCATCCTTGTG (p.K377fs*49)

Mutation List for Jak2 Exon12

Tubes	Mutations
Mix 1 (FAM Dye)	F537IK539L, K539L, F533IK539L, H538QK539L, H538DK539LI540S, K539LL545V, H538del, H538-K539delinsL, H538-K539delinsI, H538-K539delinsF, H538-K539del
Mix 4 (FAM Dye)	V536-I546dup11, V536-F547dup12, (V536F,F37-I546dup10), F537-F547dup11, (F537-I546dup10, F547L), (F547L, I540-F547dup8)
Mix 1 & Mix 2 (FAM Dye)	F537-K539delinsK, F537-K539delinsL, F537-K539del
Mix 1 & Mix 3 (FAM Dye)	I540-N542delinsS, I540-N542delinsK, I540-E543delinsK, N542-E543del, R541-E543delinsK, (I540S, R541-E543delinsK), I540-E543delinsMK, I540-D544delinsMK, E543-D544del, N542-D544delinsN, R541-D544del, D544-L545del

Mutation List for Jak2 V617F

Tubes	Mutations
Mix 4 (Texas Red Dye)	JAK-2 V617F

Mutation List for CSFR

Tubes	Mutations
Mix 1 (HEX Dye)	T615A
Mix 2 (HEX Dye)	T618I

Mutation List for MPL

Tubes	Mutations
Mix 3 (HEX Dye)	S505N, W515L
Mix 4 (HEX Dye)	W515A, W515K, W515R