

## ÇUPRA TÜR TAYİN REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 316R-10-01

### GİRİŞ

Çupra Tür Tayin Real-Time PCR Kiti, işlenmiş balık ürünleri ve yemleri içerisinde Çupra (*Sparus aurata*) materyalinin bulunup bulunmadığını tespit eder. Kit, % 0,1 'in altında bir tespit limiti (LOD) ile çok yüksek hassasiyet sağlar.

### KİT PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probu 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.

### ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Kit, PCR için gerekli tüm bileşenleri içerisinde bulundurmaktadır. Çupra türüne spesifik primer ve problemler yardımı ile örneğin içeriği tespit edilir. Kit ayrıca 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.

### KİT İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test
• Çupra Master Miks	400 µl
• Pozitif Kontrol DNA	20 µl
• Negatif Kontrol DNA (*)	20 µl

(\*) Negatif kontrol DNA'lar ilgili türlerin çapraz reaksiyon gösterebileceği türlerden seçilmiştir (Örn: Çupra için negatif kontrol levrek DNA' sı, vb.). Böylece sistemin çapraz reaksiyon kontrolünü de yapabilirsiniz.

### 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

Balık mitokondrial DNA'sının izolasyonu, spin kolon yöntemine dayalı herhangi bir Kandan Genomik DNA İzolasyon kiti ile yapılabilmektedir. Bu tip kitlerde solüsyon isimleri farklı olsa da genelde prensipleri aynıdır. Özetle;

- 50-100 mg örnekten (Et, işlenmiş gıda veya yem) temiz bir tüpe alınıp üzerine **300 µl Lizis buffer** ve **25 µl enzim** konularak enzimin aktivasyon sıcaklığında **30 dk** inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra tüpler **13.000 rpm'de 2 dk** santrifüj edilip, berrak kısım temiz bir tüpe aktarılır.
- Bu tüp içerisine kitin protokolünde belirtildiği miktarda alkol eklenip oluşan karışım spin kolona aktarılır ve belirtilen hızda ve sürede santrifüj edilir.
- Sonraki aşamalar da kitin protokolünde belirtildiği şekilde yapılarak yıkama ve elüsyon işlemi tamamlanır.

Kitimiz, MN NucleoSpin®Blood ve SNPure Genomic DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir.

### TEST PROSEDÜRÜ

- Mix çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** kullanılır. Daha sonra her tüpe **5 µl (~10-100 ng) örnek DNA** 'sı eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

### PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	30 Döngü
60 °C	1 dk.	

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

### Eğer:

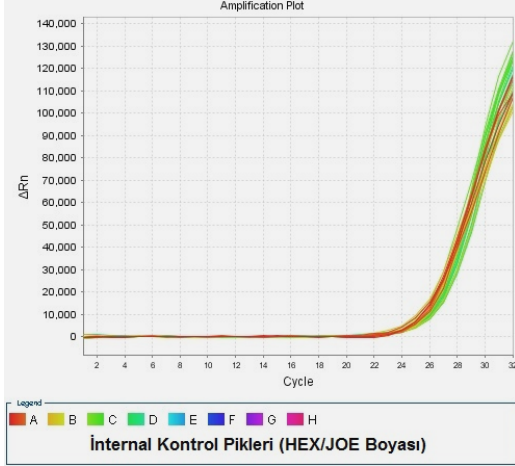
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak **"none"** seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cyclus kullanıyorsanız, lütfen **"Adjust Gain Settings"** kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900  
Bio-Rad CFX96  
Roche LightCycler® 480 System  
Rotor Gene Q  
Mic qPCR Cyclus

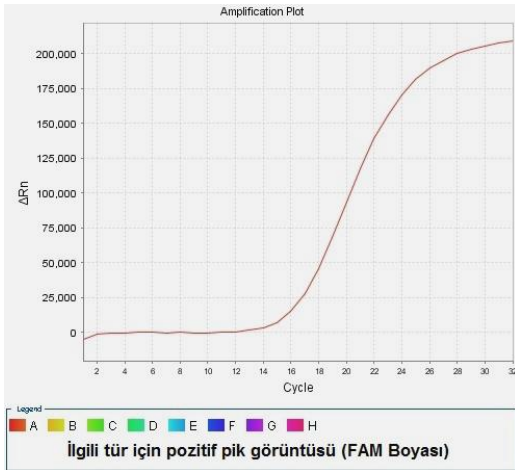
## ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile, türe ait pikleri ise FAM boyası ile analiz edilmelidir.



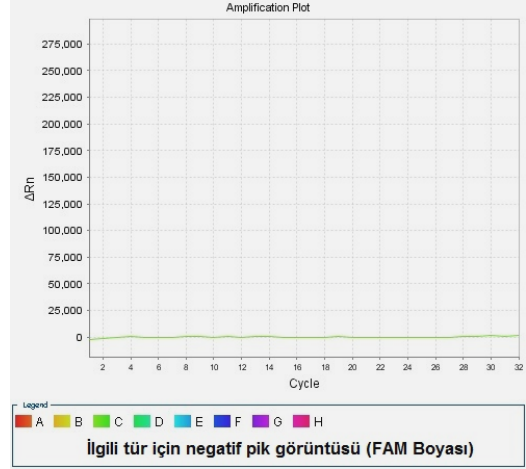
(Şekil: 1)

İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. Tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise  $22 \leq ct \leq 27$  aralığında olmalıdır (Şekil: 1)



(Şekil: 2)

- Örneğiniz master miks ile pik vermişse sonucu "**Çupra pozitif**" olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 2).



(Şekil: 3)

- Örneğinizde pik olmaması durumunda sonucu "**Çupra negatif**" olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 3).

Türe ait pikler için de FAM boyasında analiz yapmanız gerekmektedir. Bu boyada görmeniz gereken CT değer aralığı ise  $12 \leq X \leq 29$  dur. Bu değer, kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak 2-3 siklus öne veya arkaya kayabilmektedir.

## 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.

Böyle durumlarda çalışma tekrar edilmeli eğer aynı problem devam ediyorsa yeniden DNA izolasyonu yapılmalıdır.

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

## UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR 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: 12.03.2012