

SÜT ÜRÜNLERİNDEN MANDA SÜTÜ

TAYİN REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 404R-10-01

GİRİŞ

Kitimiz, çiğ/işlenmiş süt ve süt ürünleri içerisinde manda (*Bubalus bubalis*) sütünün varlığını 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. Probenin 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

Kit, PCR için gerekli tüm bileşenleri içerisinde bulundurmaktadır. Türler için spesifik primer ve problemler için yardımcı 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
• Manda-S Master Miks	400 µl
• Pozitif Kontrol DNA	25 µl
• Negatif Kontrol DNA (*)	25 µl

(*) Negatif kontrol DNA'lar ilgili türlerin çapraz reaksiyon gösterebileceği türlerden seçilmiştir (Örn: Manda için negatif kontrol inek DNA'sı, vb.).

SAKLAMA KOŞULLARI

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

DNA İZOLASYONU

Hayvan mitokondrial DNA'sının izolasyonu, spin kolon yöntemine dayalı Genomik DNA İzolasyon kiti ile yapılabilmektedir. Yöntem;

- 300 µl örnekten (Süt veya süt ürünü) 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, SNPure ve MN NucleoSpin® Genomic DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir. Ayrıca Roche ve Qiagen DNA Genomic izolasyon kitleri (Manuel/Otomatik) ile de optimum sonuçlar edilmiştir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Her tür ayrı tüplerde çalışılmalıdır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı strip veya tüpe, **20 µl master miks** alınır ve üzerine **5 µl (~1-100 ng) ekstrakte örnek DNA**'sı ilave edilir.
- Hafifçe pipetlenerek karıştırılır.
- Aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	32 Döngü
60 °C	1 dk.	

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

Eğer:

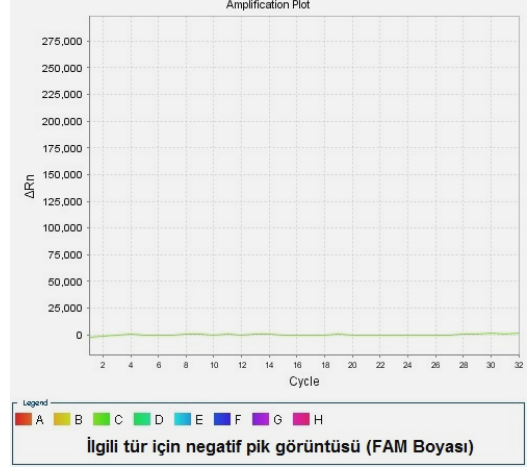
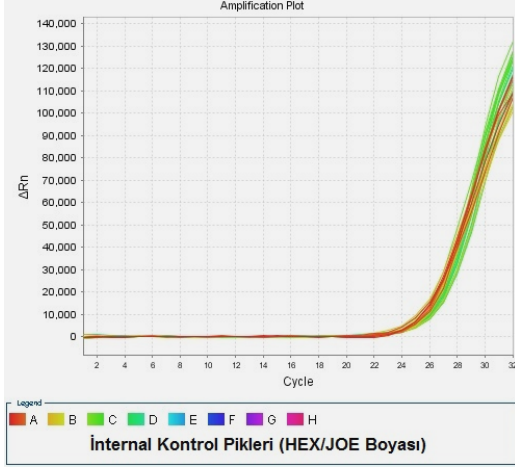
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "none" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cyclyer kullanıyorsanız, lütfen "Adjust Gain Settings" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

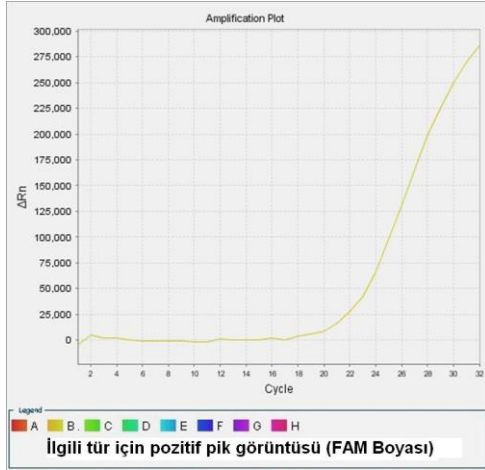
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900
Bio-Rad CFX96
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cyclyer

ANALİZ

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



İnternal kontrol, tüm kuyularda pik vermeli ve CT değeri $22 \leq X \leq 27$ aralığında olmalıdır. Pik alamadığınız durumlar için "olası problemler" bölümüne bakabilirsiniz.



Türe ait pikler için de FAM boyasında analiz yapmanız gerekmektedir. Bu boyada görmeniz gereken CT değer aralığı ise $12 \leq X \leq 29$ dur. Eğer pik yoksa söz konusu tür için "negatif" yorumunu yapabilirsiniz. Pik varsa, örneğiniz söz konusu tür için "pozitif" tir.

OLASI PROBLEMLER

İnternal kontrole ait pik görülüyorsa,

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

Pikler beklenenden 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

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: 12.05.2016