

ÇÖLYAK REAL TIME PCR KİTİ (HLA-DQ2, HLA-DQ8) Kat. No: 111R-20-04

GİRİŞ

Çölyak hastalığı; buğday, arpa, çavdar ve yulafli gıdalara ömür boyu süren intolerans ile karakterize bir ince bağırsak hastalığıdır. Günümüzde çölyaklı bireylerin doğuştan genetik yatkınlığa sahip olduğu ve bu durumun çevresel faktörlerin de katkısıyla hastalığa dönüştüğü düşünülmektedir. Beyaz ırkta görülme sıklığı 1/300 ile 1/80 arasında olduğu belirtilmektedir. HLA DQ2 varyant için DQA1*05, DQB1*02 ve HLA DQ8 varyant için de DQA1*03, DQB1*02 haplotipleri çölyak hastalığında belirleyici özelliğe sahiptir.

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 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 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. Gen bölgesine spesifik primer ve problemler yardımı ile örneğin içeriği tespit edilir. Sistem multipleks özelliğe sahiptir. Kit, HEX/JOE boyasını kullanarak tespit ettiği internal kontrol ile PCR reaksiyonunuzun çalışıp çalışmadığını kontrol etmektedir.

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
• Çölyak Real Time PCR Master Miks 1	400 µl
• Çölyak Real Time PCR Master Miks 2	400 µl
• Kontrol DNA	20 µl

Tablo 1: Miksler, gen bölgeleri ve içerdiği boyalar

Tüp	Gen bölgesi	Boya
Miks 1	DQB1*02	FAM
	DQA1*05	TEXAS RED
	Internal Kontrol	HEX/JOE
Miks 2	DQB1*0302	FAM
	DQA1*03	TEXAS RED
	Internal Kontrol	HEX/JOE

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla 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 miks ayrı tüplerde çalışılmaktadır.
- Mix çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak bir örnek için, bir 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, TEXAS RED ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

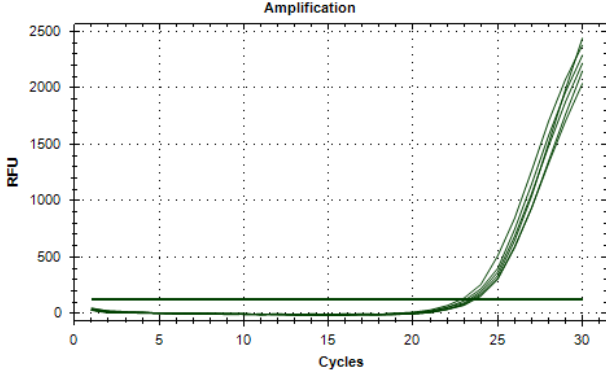
ABI Prism® 7500/7500 Fast*
Bio-Rad CFX96

*Eğer:

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

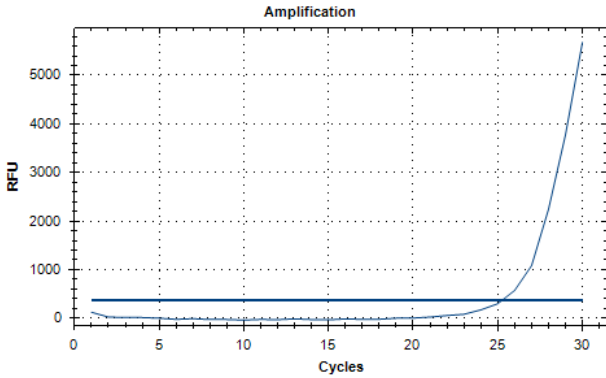
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, TEXAS RED ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri CFX96 cihazına aittir.

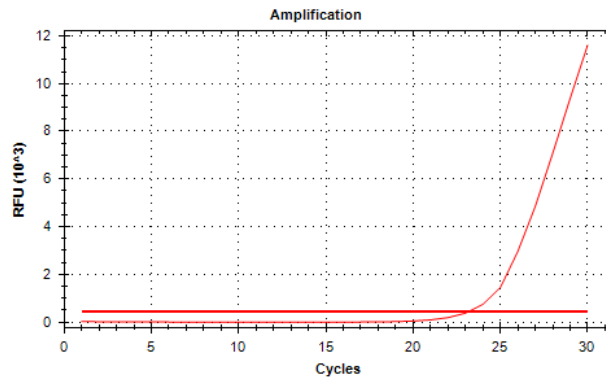


Şekil 1: Internal kontrol pikleri – HEX/JOE boya

İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır.



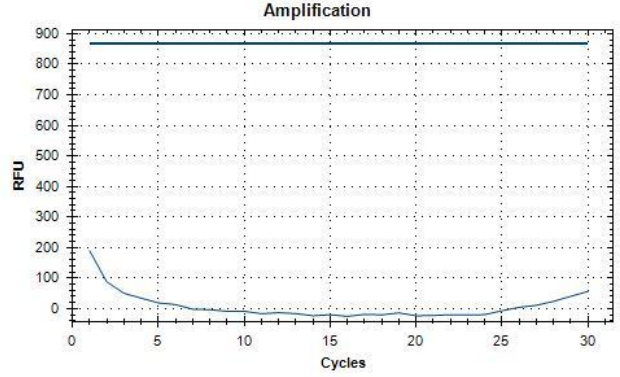
Şekil 2: DQB1*02 Pozitif sonuç – FAM boya



Şekil 3: DQA1*03 Pozitif sonuç – TEXAS RED boya

Gen bölgesinin değerlendirilmesi FAM ve TEXAS RED boyaları ile analiz edilmelidir. İlgili bölgeye ait amplifikasyon pikleri Tablo:1'de yer alan floresan boya içeriklerine göre analiz edilir. Bu aşamada cihazınıza uygun olarak yapılması gereken analiz ayarlar hakkında tech@snp.com.tr adresinden bilgi alabilirsiniz.

Seçilen boyada görülmesi gereken CT değeri aralığı ise $21 \leq ct \leq 25$ dir. Bu değer, kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak 2-3 siklus öne veya arkaya kayabilmekle birlikte, ideal bir sonuç için bu değerler arasında elde edilen pik değerleri güvenli kabul edilmektedir.



Şekil 4: DQB1*02 Negatif sonuç – FAM boya

Örneğiniz master miks ile pik vermemişse sonucu, ilgili bölge için "negatif" olarak değerlendirmelisiniz.

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 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.

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.

Düzenlenme Tarihi: 24.10.2019