

GDO MULTİPLEKS REAL TIME PCR TARAMA KİTİ

Kat. No: 112R-20-03

GİRİŞ

Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promotor (p35S), Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase terminatör (tNOS) ve Figwort Mosaic Virus promotor (pFMV) gen dizileri, genetik modifiye organizmalar (GDO)'larda sıklıkla kullanılan düzenleyici gen bölgeleridir. Günümüzde Avrupa Birliği onayı almış tüm GDO örneklerinin bu gen bölgelerinden en az bir tanesini içermekte, bu üç bölgenin test edilmesi ile GDO taramasına olanak vermektedir.

KİT PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probuun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımamasını 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. 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
• GDO Master Miks	400 µl
• Pozitif Kontrol DNA	20 µl
• Negatif Kontrol DNA	20 µl

Tüp	Gen Bölgesi	Boya
GDO Master Miks	p35S	FAM
	tNOS	HEX/JOE
	pFMV	Texas Red
	Internal Kontrol	CYS

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

Örnek DNA'sının izolasyonu, manuel olarak ya da hazır kit yardımı ile yapılabilir. Hangi yöntemle yapılacağı kullanıcının seçimine bırakılmıştır. GDO Multipleks Real-Time PCR Tarama Kiti, CTAB bazlı manuel izolasyon yöntemine 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 (~ 0.1 - 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, HEX/JOE, CYS ve TEXAS RED** seçilmelidir.

Eğer:

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

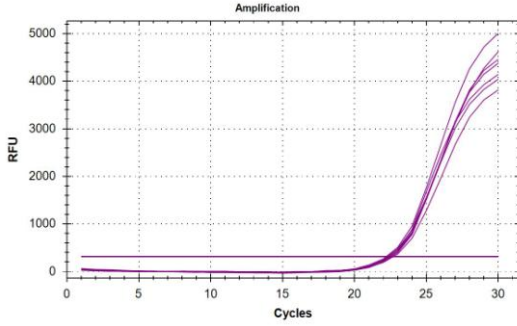
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

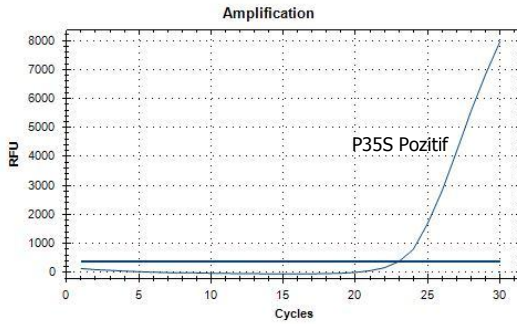
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX/JOE, CY5 ve TEXAS RED boyası ile analiz edebilirsiniz. İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile, gen bölgelerine ait pikleri ise FAM, HEX/JOE ve TEXAS RED boya ile analiz edilmelidir.



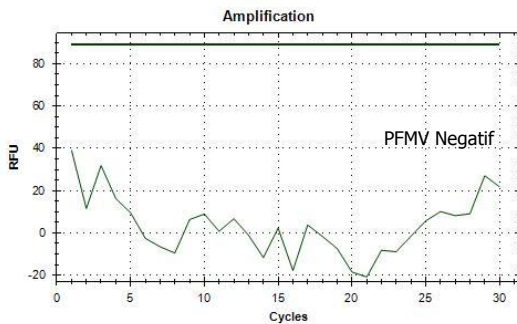
(Şekil: 1)

İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. Tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $20 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil: 1)



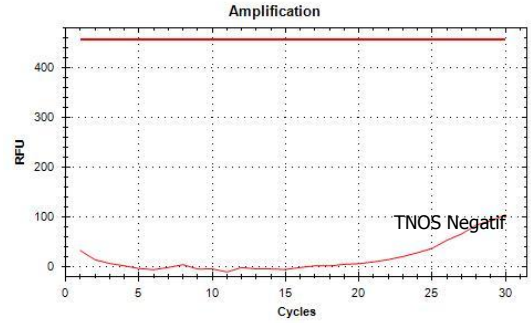
(Şekil: 2)

FAM boyası ile örneğiniz pik vermişse sonucu "**35S promotor pozitif**", pik vermemiş ise "**35S promotor negatif**" olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 2).



(Şekil: 3)

HEX/JOE boyası ile örneğiniz pik vermişse sonucu "**FMV promotor pozitif**", pik vermemiş ise "**FMV promotor negatif**" olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 3).



(Şekil: 4)

TEXAS RED boyası ile örneğiniz pik vermişse sonucu "**NOS terminatör pozitif**", pik vermemiş ise "**NOS terminatör negatif**" olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 4).

Gen bölgelerine ait pikler için de FAM, HEX/JOE ve TEXAS RED boya ile analiz yapmanız gerekmektedir. Bu boyalarda görmeniz gereken CT değeri ise $10 \leq X \leq 28$ dir. Bu değer, kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

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

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: 17.05.2017