

## MPL W515L/K REAL TIME PCR KITI

Kat. No: 22R-10-01

### GİRİŞ

"Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN)" sahip hastalarda *Janus kinase* (JAK2) geninde oluşan mutasyonlar dışında thrombopoietin reseptörünü kodlayan MPL geni Ekzon 10 ve *calreticulin* (CALR) Ekzon 9 mutasyonları da klinik olarak büyük öneme sahiptir. Elisa Rumi ve arkadaşlarının yaptığı ve toplam 1235 hastayı içeren bir çalışmada (Blood, 2014 123: 1544-1551) ET tanısı almış hastaların %4'ünde MPL Ekzon 10 mutasyonuna rastlanılmıştır.

### 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 doğru olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

### ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her hasta için, mutasyon bölgesine uygun, W515L/K tarama miski ile çalışılır. Eğer sonuç pozitif bulunur ise mutasyonun ayırımı için W515L ve W515K master miskleri kullanılır. Sistem, SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak hazırlanmış kullanıma hazır kimyasalları sağlamaktadır ve ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve problemler içermektedir.

Sistem iki farklı primer-prob seti içermektedir. Mutasyon analizleri için TEXAS RED işaretli, sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise CY5 boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

Kullandığınız kit sistemi "ready to use" özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil Real Time PCR reaksiyonu için gerekli tüm komponentleri içermektedir. Kit  $\leq$  %1 mutant oranını tespit etmektedir.

### SİSTEM İÇERİĞİ

#### Bileşen

- W515L/K PCR Master Miks
- W515L PCR Master Miks
- W515K PCR Master Miks
- Kontrol DNA

#### 20 Test

- 400  $\mu$ l
- 200  $\mu$ l
- 200  $\mu$ l
- 20  $\mu$ l

### 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

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  $\mu$ l elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

### TEST PROSEDÜRÜ

- Nazıkçe pipetaj yaparak W515L/K tarama master miksi karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20  $\mu$ l master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **5  $\mu$ l (~10-100 ng) hasta DNA'sı** eklenerek örnek hazırlanmış olur.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

### PCR PROGRAMI

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

Floresan boya olarak **TEXAS RED ve CY5** seçilmelidir.

### Eğer:

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

### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

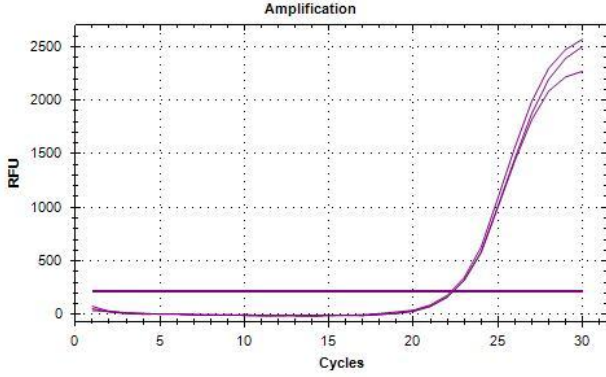
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

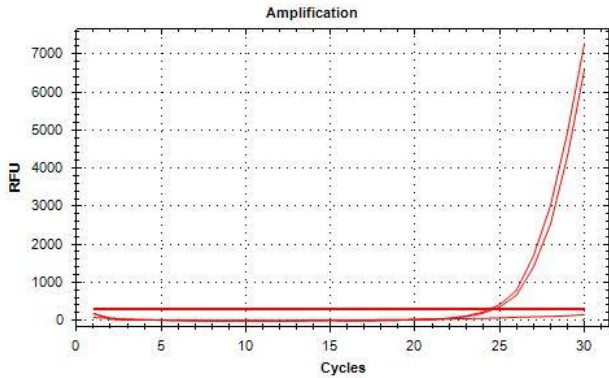
Roche [LightCycler® 480 System](#)

## ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı TEXAS RED ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri BioRad CFX96 cihazına aittir.



İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise  $22 \leq ct \leq 26$  aralığında olmalıdır.

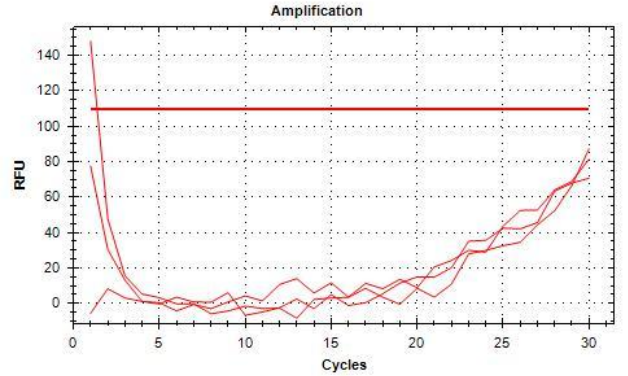


Not: W515L/K ve W515K miskleri ile pozitif, W515L miski ile negatif sonuç verisi

W515L/K, W515L ve W515K master mikslere ait amplifikasyon pikleri TEXAS RED boyası ile analiz edilir. Master mikslere ait amplifikasyon piklerinin  $C_T$  değerleri  $21 \leq C_T \leq 26$  arasında olmalıdır. Bu  $C_T$  değerleri SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyon protokollerine göre  $\pm 2/3$  siklus farklılıklar gösterebilir.

İlk aşama olarak W515L/K tarama miksi sonucu kontrol edilerek, amplifikasyon pikinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak pozitif veya negatif olarak değerlendirme yapılır.

W515L/K pozitif sonuç gösteren örneklerin W515L ve W515K ayırımı için ilgili mikslere ait pikler değerlendirilerek sonuç verilir.



## 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](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 mikslere raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: 11 Kasım 2018