

TROMBOFİLİ MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ B (4 MUTASYON) Kat. No: 10R-20-04B

GİRİŞ

Trombozis ile ilgili sorunlar, kişilerin farklı pıhtılaşma problemlerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar belirli bazı mutasyonların pıhtılaşma üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Trombofili Paneli, FII Prothrombin, FV Leiden, MTHFR 677 ve 1298 mutasyonlarının analizini içermektedir.

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 ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla floresan ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte floresan ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Mutasyon bölgelerine uygun, Normal (Wild Tip) ve Mutant olmak üzere dört mastermiks ile çalışılır. Kit, ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve prob için dizayn edilmiştir. Sistem, mutasyonlara özgü farklı primer-prob setlerinin kombinasyonunu (Multipleks) içermektedir. Sistem ayrıca CY5 boyasında 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.

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test
• TRP-4B Miks 1 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-4B Miks 2 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-4B Miks 3 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-4B Miks 4 (Mutant Tip)	400 µl
• Kontrol DNA	40 µl

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.

Tablo 1: Mutasyon Boya Tablosu

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	FII Normal	FAM
	677 Normal	Texas Red
	BOŞ	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	FII Mutant	FAM
	677 Mutant	Texas Red
	BOŞ	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	1298 Normal	FAM
	BOŞ	Texas Red
	FV Leiden Normal	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	1298 Mutant	FAM
	BOŞ	Texas Red
	FV Leiden Mutant	JOE / HEX
	Internal Kontrol	CY5

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı ve örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Kan örnekleri uzun süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir. Kit, SNPure Genomic DNA ve MN NucleoSpin®Blood DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master mikserler ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master mikserler karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl (~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 **FAM, HEX/JOE, TEXAS RED** ve **CY5** seçilmelidir.

Eğer:

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

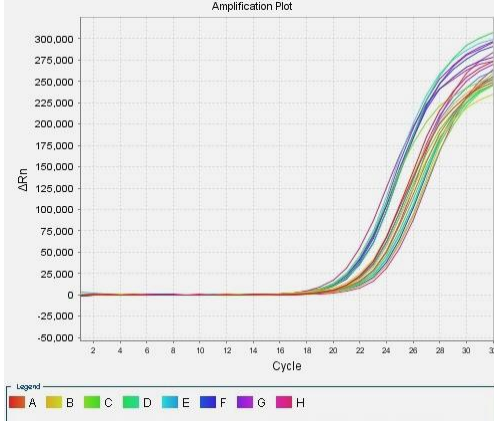
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

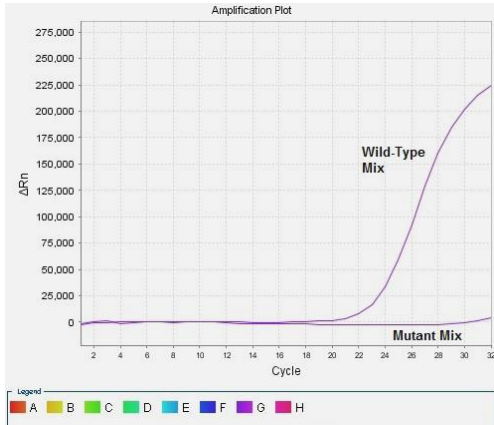
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, ve JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 Fast cihazına aittir.



Şekil 1: İnternal kontrol pikleri (CY5)

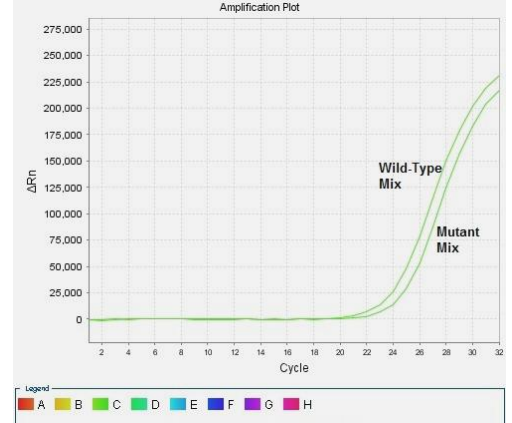
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. C_T değeri ise $21 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



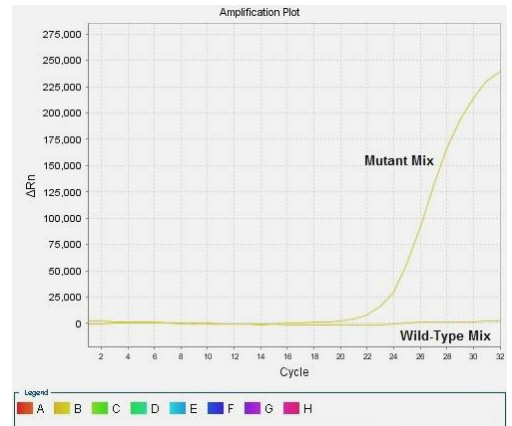
Şekil 2: FII Prothrombin Wild Type – FAM Boyası (Miks 1 – 2)

Wild tip ve Mutant tip master mikserin amplifikasyon pikleri Tablo:1'de yer alan floresan boya içeriklerine göre analiz edilir. Master mikserlere 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.

- Homozigot "Wild Tip" örnek sadece "Wild Tip" master mikserde pik verir.
- Heterozigot örnek hem "Wild Tip", hem de "Mutant Tip" master mikserde pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece "Mutant Tip" master mikserde pik verir.
- Heterozigot örneklerde "Wild Tip" piki ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark ≥ 3 ise test tekrar edilmelidir.



Şekil 3: FV Leiden Heterozygote – JOE/HEX Boyası (Miks 3 – 4)



Şekil 4: 677 Homozygote mutant – TEXAS RED Boyası (Miks 1 – 2)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

- DNA'nın saf olmaması.
- Kısmi inhibitör varlığı.
- DNA miktarının düşüklüğü.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: Mayıs 2016