

KLOPIDOGREL MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ (3 MUTASYON)

Kat. No: 113R-20-03

GİRİŞ

Klopidogrel, çeşitli aterosklotik hastalıkları tedavi etmek ve önlemek için yaygın olarak kullanılan bir antiplatelet ajanıdır. Araştırmalar, CYP2C19 genindeki genetik varyasyonların ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Kit, CYP2C19 geninde 636 G> A, 681 G> A ve -806 C> T mutasyonlarını tespit eder.

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

Her örnek için 2 Miks ile çalışılır. Sistem uygun sekans spesifik oligonükleotidler ile SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak dizayn edilmiş kullanıma hazır kimyasalları içermektedir. Ürün içerisinde Mutasyon analizleri için FAM, HEX/JOE, Texas RED işaretli problemler kullanılmaktadır. İnternal kontrol analizi için ise CY5 ile işaretli prob bulunmaktadır. Mutasyonlar ve ilgili boyaları Tablo 1' de görebilirsiniz. Kullandığımız 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
• Klopidogrel Master Miks 1	400 µl
• Klopidogrel Master Miks 2	400 µl
• Kontrol DNA	75 µl

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı ve örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile 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.

MUTASYON – BOYA TABLOSU

Tablo 1 : Tüp – Mutasyon - Boya

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	636 Wild-Tip (G)	FAM
	-806 Wild-Tip (C)	HEX / JOE
	681 Wild-Tip (G)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	636 Mutant (A)	FAM
	-806 Mutant (T)	HEX / JOE
	681 Mutant (A)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Tip) 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.

Eğër:

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

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

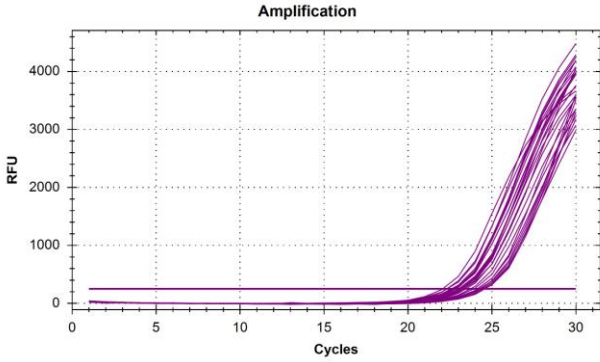
Bio-Rad CFX96

ANALİZ

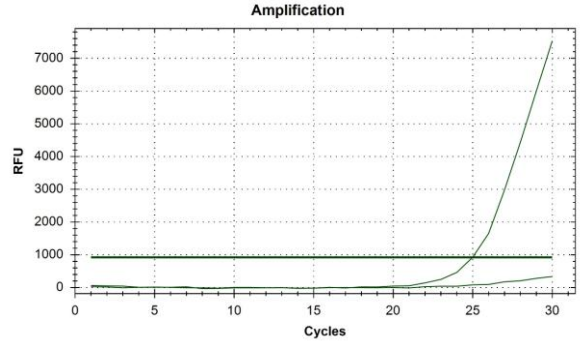
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX/JOE, Texas RED ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz. Genotipleme için Tablo 2'ye bakınız. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.

Tablo 2 : CYP2C19 Fenotipleri ve Genotip Fonksiyonel Durum Tablosu

CYP2C19 Fenotipleri ve Genotip Fonksiyonel Durum *		
636 Wild Tip (G) - 681 Wild Tip (G) - 806 Wild Tip (C)	*1	Normal Fonksiyonlu allel
681 Mutant (A)	*2	Fonksiyonsuz allel
636 Mutant (A)	*3	Fonksiyonsuz allel
806 Mutant (T)	*17	Artmış fonksiyonlu allel
Metabolizma	Genotip	Örneğin;
CYP2C19 Ultrahızlı Metabolizma	Birey, iki artmış fonksiyonlu allel taşıyorsa	*17/*17
CYP2C19 Hızlı Metabolizma	Birey, bir normal allel, bir de artmış fonksiyonlu allel taşıyorsa	*1/*17
CYP2C19 Normal Metabolizma	Bireyin iki alleli de normale	*1/*1
CYP2C19 Orta Düzey Metabolizma	Birey bir normal, bir de düşük fonksiyonlu ya da fonksiyonsuz allel taşıyorsa.	*1/*2 *2/*17 *1/*3 *3/*17
CYP2C19 Zayıf Metabolizma	Bireyin iki alleli de düşük fonksiyonlu ya da fonksiyonsuz ise	*2/*2 *2/*3 *3/*3
* The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)		
CYP2C19 metabolizması etnik durumuna göre farklılık gösterebilir.		
Bazı çalışmalar CYP2C19*17 artmış fonksiyonlu allelin, CYP2C19*2 düşük fonksiyon durumunu telafi etmediğini göstermektedir.		

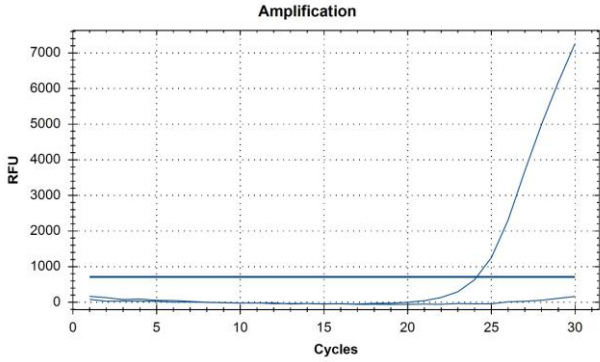


Şekil 1: Internal Kontrol Pikleri – CY5 Boyası



Şekil 4: -806 Homozigot Mutant Örnek – HEX Boyası

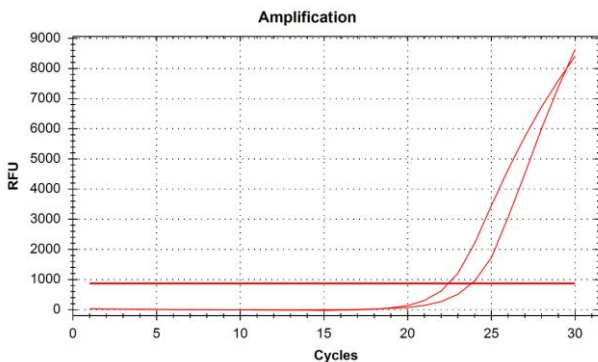
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır.



Şekil 2: 636 Homozigot Wild Tip – FAM Boyası

Wild tip ve Mutant tip master mikserin amplifikasyon pikleri Tablo 1'e göre analiz edilir. Master mikserlere ait amplifikasyon piklerinin C_T değerleri $21 \leq C_T \leq 26$ arasında olmalıdır. Bu C_T değerleri SNPPure® 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 mikste pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece "Mutant Tip" master mikste pik verir.



Şekil 3: 681 Heterozigot Örnek – Texas Red Boyası

- Heterozigot örneklerde "Wild Tip" piki ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark $4 \leq C_T \leq 6$ siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.

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

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.

UYARILAR

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

Düzenlenme Tarihi: Mayıs 2016