

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

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 ve MTHFR 677 ve 1298 mutasyonlarının analizini içermektedir.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probenin 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 iki 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

- TRP-4A Miks 1 (Wild Tip)
- TRP-4A Miks 2 (Mutant Tip)
- Kontrol DNA

20 Test

- 400 µl
- 400 µl
- 50 µl

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler -20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözündürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

Tablo 1: Mutasyon Boya Tablosu

| Tüp | Mutasyon | Boya |
|---------------|--------------------------|------------|
| Wild Tip Miks | FII Prothrombin Wild Tip | Quasar 705 |
| | FV Leiden Wild Tip | HEX |
| | 677 Wild Tip | Texas Red |
| | 1298 Wild Tip | FAM |
| | Internal kontrol | CY5 |
| Mutant Miks | FII Prothrombin Mutant | Quasar 705 |
| | FV Leiden Mutant | HEX |
| | 677 Mutant | Texas Red |
| | 1298 Mutant | FAM |
| | 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 mikslere ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazıkçe pipetaj yaparak master mikslere 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. | |

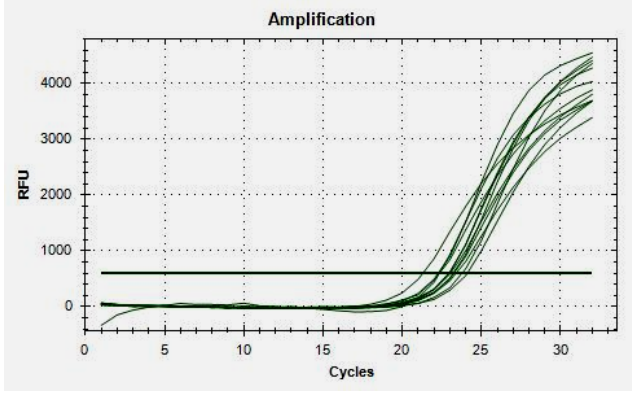
Floresan boya olarak, çalışılan tüm kuyularda **FAM, HEX, QUASAR 705, CY5 ve TEXAS RED** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

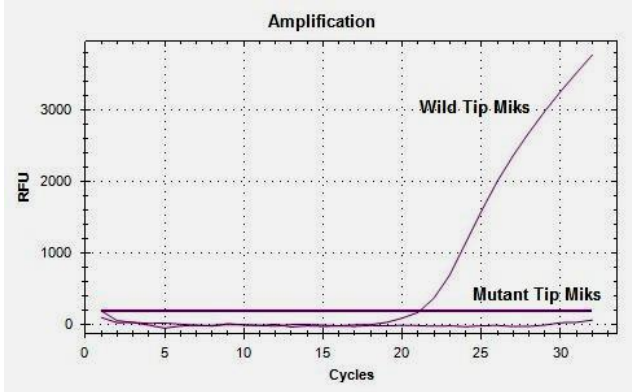
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, Quasar 705 ve HEX boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.



Şekil 1: İnternal kontrol pikleri (CY5)

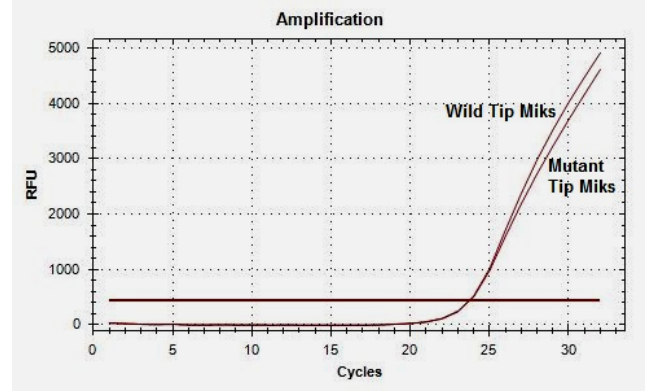
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. C_T değeri ise $21 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



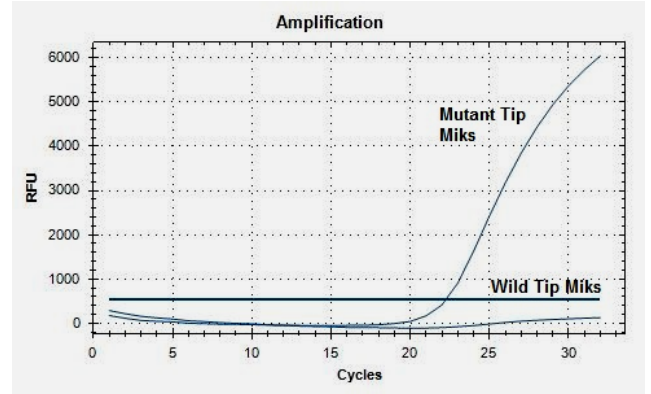
Şekil 2: FV Homozigot Wild Tip (HEX)

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 $4 \leq C_T \leq 6$ siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.



Şekil 3: FII Heterozigot (Quasar 705)



Şekil 4: 1298 Homozigot Mutant Tip (FAM)

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 mikserin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: Mayıs 2016