

## BETA TALASEMİ PANELİ REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 16R-10-06

### GİRİŞ

Akdeniz anemisi, ya da tıptaki adıyla Beta Talasemi; Akdeniz ülkelerinde görülen, doğacak çocuğa anne-babadan ilgili genin kalıtsal olarak aktarılması ile geçen bir rahatsızlıktır. Anemi (kansızlık) oluşmasına neden olan etmen, kanda alyuvarların yapısında yer alan "hemoglobin" molekülünün yapısındaki bozukluktur. Beta Talasemi Paneli IVS1.1 G>A, IVS2.1 G>A, IVS1.110 G>A, IVS2.745 C>G, IVS1.6 T>C ve orak hücre mutasyon analizlerini içermektedir.

### TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

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

Her hasta için, her mutasyon bölgesine uygun, Normal ve Mutant olmak üzere iki master miks çalışılır. 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 FAM işaretli, sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX/JOE boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

Kullandığınız kit sistemi "ready to use" özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil Real Time PCR reaksiyonu için gerekli tüm componentleri içermektedir.

### SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test
• IVS-1 Normal PCR Master Miks	400 µl
• IVS-1 Mutant PCR Master Miks	400 µl
• IVS-2 Normal PCR Master Miks	400 µl
• IVS-2 Mutant PCR Master Miks	400 µl
• IVS-1-110 Normal PCR Master Miks	400 µl
• IVS-1-110 Mutant PCR Master Miks	400 µl
• IVS-2-745 Normal PCR Master Miks	400 µl
• IVS-2-745 Mutant PCR Master Miks	400 µl
• IVS-6 Normal PCR Master Miks	400 µl
• IVS-6 Mutant PCR Master Miks	400 µl
• Orak Hücre Normal PCR Master Miks	400 µl
• Orak Hücre Mutant PCR Master Miks	400 µl
• Kontrol DNA	55 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.

### 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 µl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

### TEST PROSEDÜRÜ

- Wild Tip ve Mutant Tip master mikslar çözülür ve nazikçe pipetaj yaparak master miks karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl (~1-100 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 ve HEX/JOE** seçilmelidir.

### Eğer;

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "**none**" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "**Adjust Gain Settings**" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

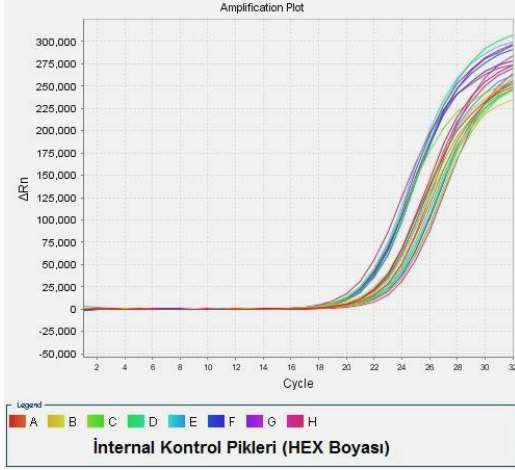
Roche **LightCycler® 480 System**

Rotor Gene Q

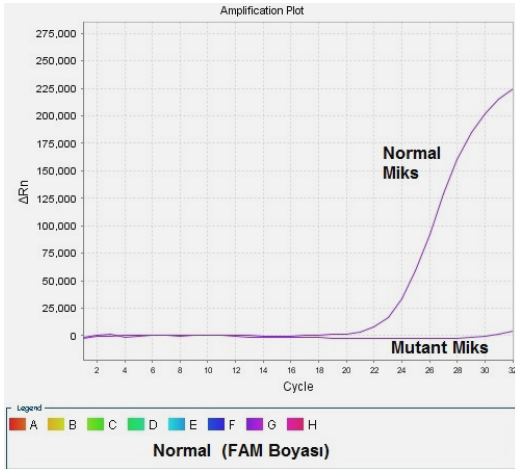
Mic qPCR Cycler

## ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 cihazına aittir.

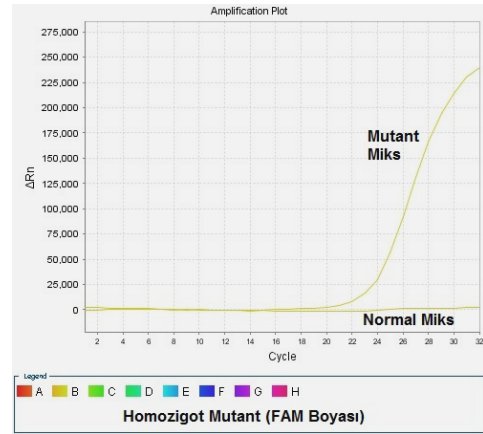
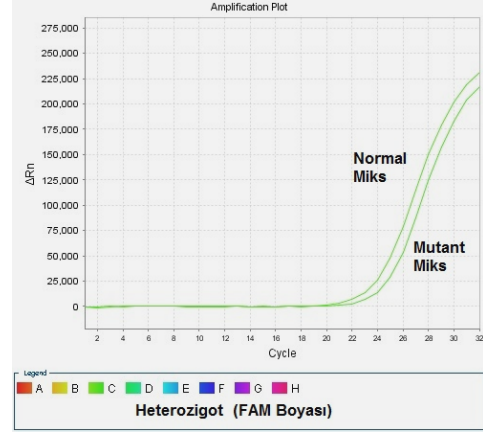


İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise  $22 \leq ct \leq 26$  aralığında olmalıdır.



Mutasyonların amplifikasyon pikleri FAM boyası ile analiz edilir. CT değerleri  $21 \leq CT \leq 26$  arasında olmalıdır. Bu CT 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 mikslerde pik verir.
- Heterozigot örnek hem "Wild-Tip", hem de "Mutant Tip" master miksde pik verir.
- Homozigot mutant örnek sadece "Mutant Tip" master miksde pik verir.
- Heterozigot örneklerde "Wild-Tip" piki ile "Mutant Tip" pikleri arasında en fazla 3 siklus fark olmalıdır. Bu fark  $4 \leq CT \leq 6$  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](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 mikslerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenlenme Tarihi: 12.03.2012