

FII PROTHROMBIN REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 101R-10-01

GİRİŞ

Prothrombin, pıhtılaşma mekanizmasında önemli olan trombinin öncü maddesidir. Prothrombin genindeki 3' untranslated bölgesinde 20210 pozisyonunda yer alan tek nokta baz değişimi (G>A) otozomal dominant bir polimorfizmdir. Bu mutasyon venöz trombozis riskini arttırmaktadır.

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 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 mikş 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 komponentleri içermektedir.

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test
• FII Norma (Wild Type) PCR Master Mikş	400 µl
• FII Mutant PCR Master Mikş	400 µl
• Kontrol DNA	20 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.

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

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master mikşler ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master mikşler karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master mikş (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 ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Eğer:

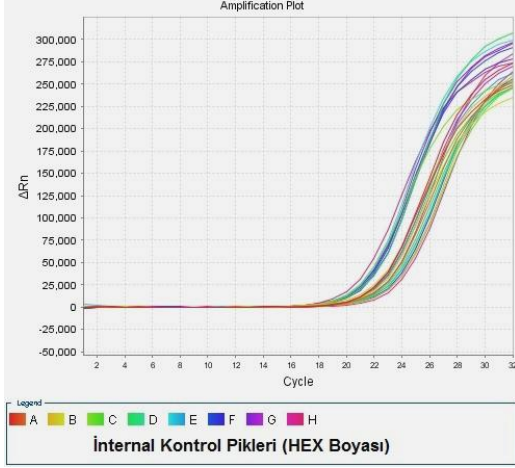
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "**none**" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "**Adjust Gain Settings**" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

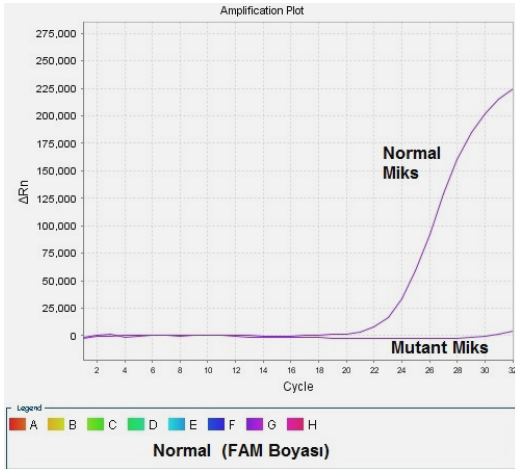
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900
Bio-Rad CFX96
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler

ANALİZ

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

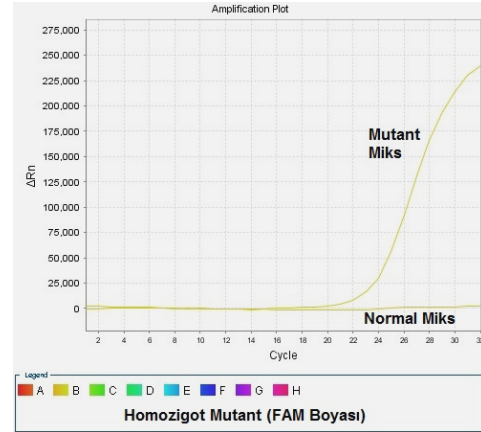
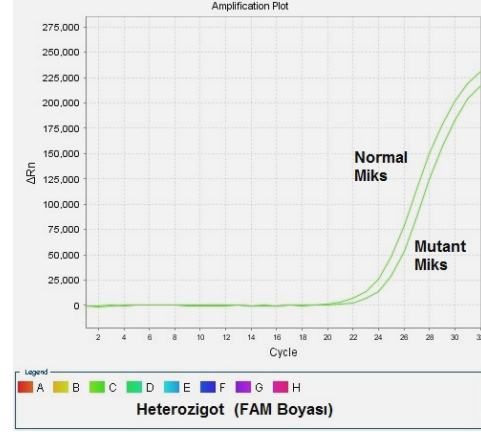


İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır.



Wild tip ve Mutant tip master mikserin amplifikasyon pikleri FAM boyası ile 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 mikserlerde 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.



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

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserler kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, 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