

FV CAMBRIDGE REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 103R-10-01

GİRİŞ

FV Cambridge yeni tespit edilen bir mutasyondur. Venöz tromboz riskini arttıran 1691 pozisyonundaki FV Leiden mutasyonuna ek olarak, 1091 pozisyonunda arjinin – treonin dönüşümüne neden olan tek nokta mutasyonu (G>C) Cambridge olarak adlandırılmıştır.

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 ışma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışma 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 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

- FVC Normal PCR Master Miks
- FVC Mutant PCR Master Miks
- Kontrol DNA

20 Test

- 400 µl
- 400 µl
- 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 çözdüremek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

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.

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master miksler ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master miksler 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 ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Eğer:

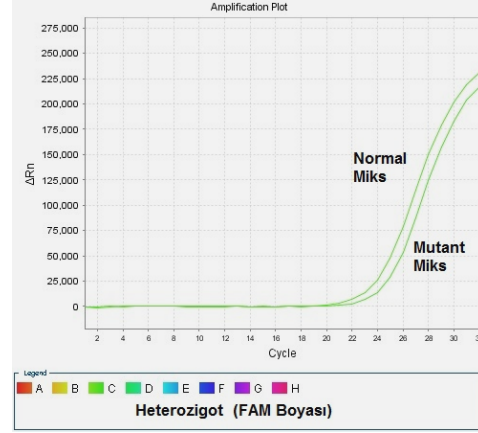
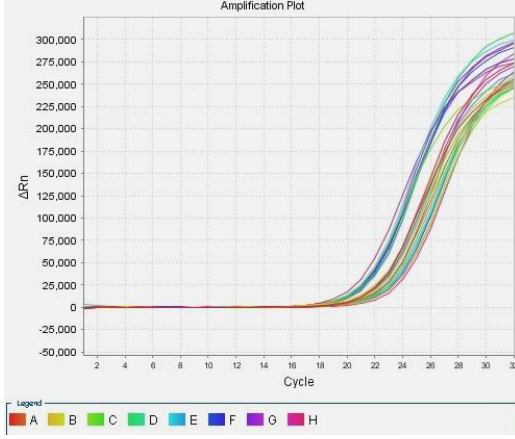
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "none" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cyclus kullanıyorsanız, lütfen "Adjust Gain Settings" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

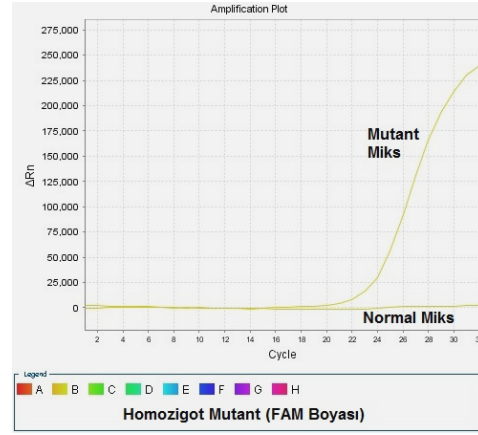
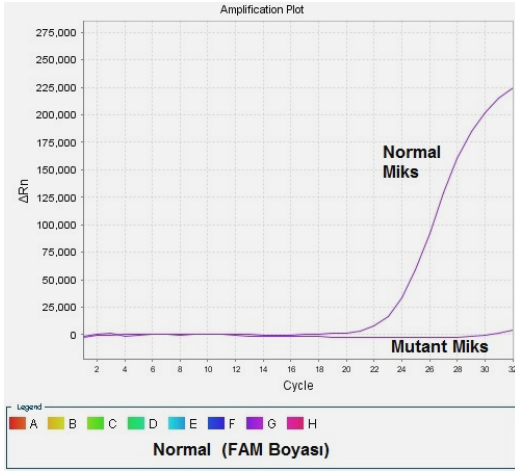
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900
Bio-Rad CFX96
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cyclus

ANALİZ

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



İnternal Kontrol pikleri 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 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.

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 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