

Y KROMOZOM MİKRODELESYON MULTİPLEKS

REAL TIME PCR KİTİ (15 BÖLGE)

Kat. No: 15R-20-15

GİRİŞ

Y Kromozomu üzerindeki mikrodelesyonlar Klinefelter sendromundan sonra en sık görülen spermatogenesis eksikliği sebebidir. Y kromozomundaki Ydq11.23 bölgelerinin (AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd) V ve VI tekrarlanan bölgeleri spermatogenesis sorumlu genlerini içermektedir. Bu bölgelerdeki mikrodelesyonlar azospermia'ya neden olmaktadır.

KİT 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

Sistem, PCR için gerekli tüm bileşenleri içerisinde bulundurur. Y kromozomunun ilgili bölgelerine ait spesifik primerler ve problemlerle multipleks analiz yapılmaktadır. Sistem ayrıca her tüpte CY5 boyası ile işaretli internal kontrol ile PCR reaksiyonunun çalışmasını kontrol etmektedir.

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

KİT İÇERİĞİ

Bileşen

• YD-15 Miks 1	200 µl
• YD-15 Miks 2	200 µl
• YD-15 Miks 3	200 µl
• YD-15 Miks 4	200 µl
• YD-15 Miks 5	200 µl
• Kontrol DNA	40 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

Kandan Genomik DNA izolasyonu, herhangi bir spin kolon yöntemiyle yapılabilir. DNA elde edildikten sonra – 20°C de saklanmalıdır. Y Mikrodelesyon 8 Bölge Real Time PCR Kiti, MN NucleoSpin®Blood ve SNPure Genomic DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir.

Tablo 1: Bölge - Boya Tablosu

Tüp	AZF Bölgeleri	Boya
Miks 1	SY14 (Kontrol)	FAM
	ZFY (Kontrol)	HEX
	SY84 (AZFa)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 2	SY127 (AZFb)	FAM
	SY255 (AZFc/DAZ)	HEX
	SY86 (AZFa)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 3	SY254 (AZFc/DAZ)	FAM
	SY134 (AZFb)	HEX
	SY81 (AZFa)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 4	SY164 (AZFb)	FAM
	SY152 (AZFc/d)	HEX
	SY145 (AZFc/d)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5
Miks 5	SY153 (AZFc/d)	FAM
	SY277 (AZFc-DAZ)	HEX
	SY142 (AZFb)	Texas Red
	Internal Kontrol	CY5

TEST PROSEDÜRÜ

- Her miks ayrı tüplerde çalışmalıdır.
- Mix çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** kullanılır. Daha sonra her tüpe **5 µl (~10-100 ng) örnek DNA** 'sı eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla 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.

Eğer:

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

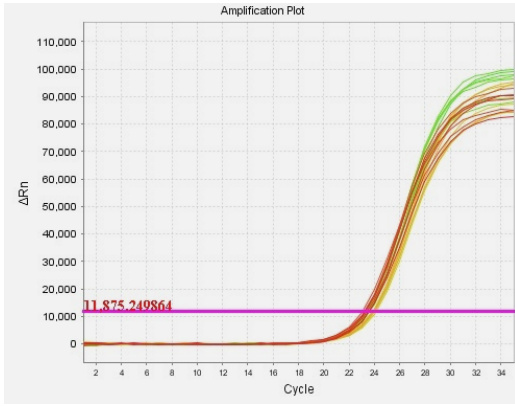
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

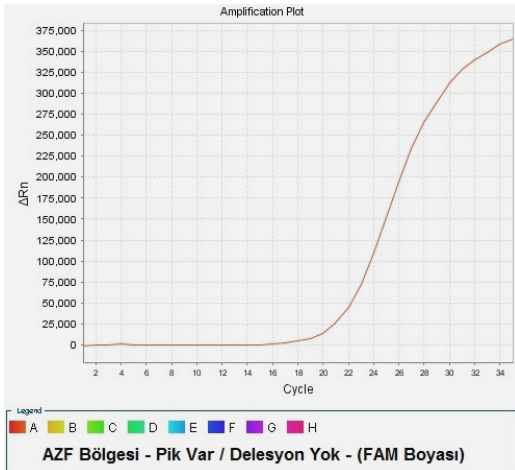
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX/JOE, TEXAS RED ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz. İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile, AZF bölgeleri ise FAM, HEX/JOE ve TEXAS boyası ile analiz edilmektedir. Hangi bölgelerin hangi mikslerde hangi boyalarla analiz edileceği bilgisi için tablo 1'e (Bölge-Boya Tablosu) bakınız.



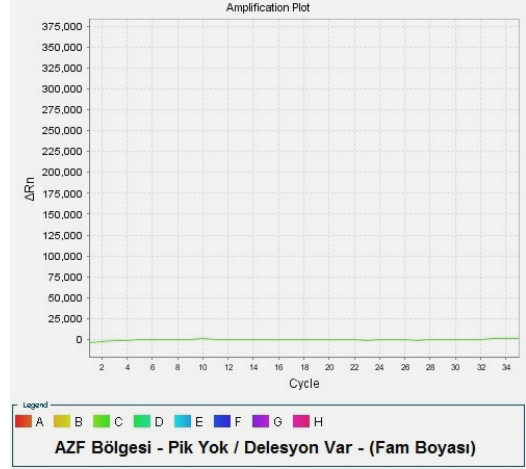
Şekil 1 : CY5 Boyasında internal Kontrol

İnternal kontrol DNA eklediğiniz tüm kuyularda CY5 boyasında pik vermeli ve CT değeri $18 \leq X \leq 25$ aralığında olmalıdır (Şekil: 1). Pik alamadığınız durumlar için "olası problemler" bölümüne bakabilirsiniz.



Şekil 2 : Miks 2, FAM Boyası – SY127 Delesyon negatif

- Örneğiniz master miks de ilgili boya ile pik vermişse sonucu, O bölge için **"Delesyon negatif"** olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 2).



Şekil 3 : Miks 3, HEX/JOE Boyası – SY134 Delesyon Pozitif

- Örneğiniz master miks de ilgili boya pik vermemişse sonucu, o bölge için **"Delesyon pozitif"** olarak değerlendirmelisiniz (Şekil: 3).

AZF bölgeleri için de FAM, HEX/JOE ve TEXAS RED boya analiz yapmanız gerekmektedir. Bu boyada görmeyen gereken CT değeri aralığı ise $18 \leq X \leq 25$ dir. Bu değer, kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak 2-3 siklus öne veya arkaya kayabilmektedir.

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 olabilir.

Böyle durumlarda çalışma tekrar edilmeli eğer aynı problem devam ediyorsa yeniden DNA izolasyonu yapılmalıdır.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. 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: 06.06.2016