

FMF REAL TIME PCR KİTİ MULTİPLEKS

(20 MUTASYON)

Kat. No: 11R-20-20

GİRİŞ

FMF (Ailesel Akdeniz Ateşi) genellikle Akdeniz ülkeleri halklarında görülen, otozomal resesif kalıtılan hastalıktır. Marenostriin-Encoding Fever (MEFV) genindeki farklı mutasyonlar hastalığa sebep olabilmektedir. Kitimiz, ekzon 1'de E84K, ekzon 2'de L110P, E148Q, E148V, E167D, E230K/Q, T267I, P283L, G304R, ekzon 3'de P369S, ekzon 5'de F479L ve ekzon 10'da yer alan M680I(G/C-A), M694I, M694V, K695R, V726A, A744S, R761H, mutasyonları olmak üzere 20 mutasyonu analiz etmektedir. Kit, ülkemiz ve birçok ülkede görülen MEFV mutasyonlarının %99.2-99.5'ini taramaktadır.

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 ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla floresan ışma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte floresan ışma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her örnek için 12 Miks ile çalışılır. Sistem uygun sekans spesifik oligonükleotidler ile SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak dizayn edilmiş kullanıma hazır kimyasalları içermektedir. Ürün içerisinde Mutasyon analizleri için FAM, JOE/HEX, Texas RED işaretli problemler kullanılmaktadır. İnternal kontrol analizi için ise CY5 ile işaretli prob bulunmaktadır. Mutasyonlar ve ilgili boyaları Tablo 1'de görebilirsiniz.

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
• Miks 1	400 µl
• Miks 2	400 µl
• Miks 3	400 µl
• Miks 4	400 µl
• Miks 5	400 µl
• Miks 6	400 µl
• Miks 7	400 µl
• Miks 8	400 µl
• Miks 9	400 µl
• Miks 10	400 µl
• Miks 11	400 µl
• Miks 12	400 µl
• Kontrol DNA*	75 µl

*Kontrol DNA internal kontrol ve bazı mutasyon bölgelerini içeren sentetik plasmid DNA'dır. Sentetik DNA ile elde edilmesi beklenen sonuçlar; I692del Normal, M694I Normal, M680I Homozigot Mutant, K695R Normal, A744S Normal, M694V Homozigot Mutant, V726A Homozigot Mutant ve R761H Homozigot Mutant. Sentetik DNA, örnek DNA'dan bir miktar farklı amplifikasyon peak görüntüsü verebilir.

Tablo 1 : Tüp – Mutasyon - Boya

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	P369S Wild Tip	FAM
	A744S Wild Tip	Texas Red
	E84K Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 2	P369S Mutant Tip	FAM
	A744S Mutant Tip	Texas Red
	E84K Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 3	G304R Wild Tip	FAM
	M694V Wild Tip	Texas Red
	E148V Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 4	G304R Mutant Tip	FAM
	M694V Mutant Tip	Texas Red
	E148V Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 5	E148Q Wild Tip	FAM
	V726A Wild Tip	Texas Red
	F479L Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 6	E148Q Mutant Tip	FAM
	V726A Mutant Tip	Texas Red
	F479L Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 7	M694I Wild Tip	FAM
	E167D Wild Tip	Texas Red
	T267I Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 8	M694I Mutant Tip	FAM
	E167D Mutant Tip	Texas Red
	T267I Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 9	M680I Wild Tip	FAM
	L110P Wild Tip	Texas Red
	P283L Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 10	M680I Mutant Tip	FAM
	L110P Mutant Tip	Texas Red
	P283L Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 11	K695R Wild Tip	FAM
	R761H Wild Tip	Texas Red
	E230K/Q Wild Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5
Miks 12	K695R Mutant Tip	FAM
	R761H Mutant Tip	Texas Red
	E230K/Q Mutant Tip	JOE / HEX
	Internal Control	CY5

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile 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, SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 µl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Her örnek için 12 Miks ile çalışılmalıdır.
- Nazıkçe pipetaj yaparak master mikslar 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
62 °C	1 dk.	

Floresan boya olarak **FAM, CY5, Texas Red ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Eğer:

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

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

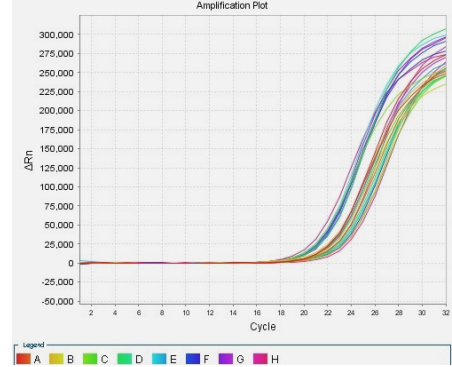
ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

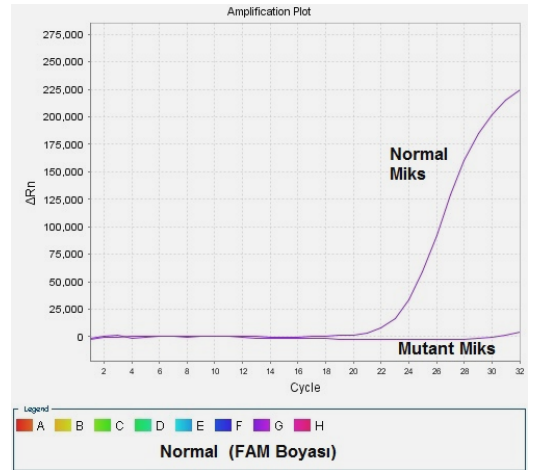
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 cihazına aittir.

Pratik olması açısından protokolün sonundaki Tablo 2'den (analiz tablosu) yararlanabilirsiniz.



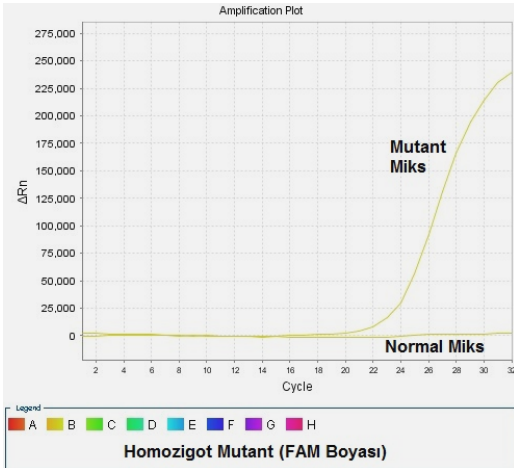
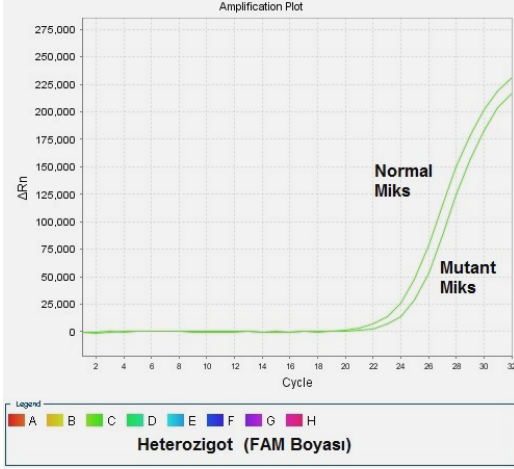
İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise **21 ≤ ct ≤ 26** aralığında olmalıdır.



Mutasyonların amplifikasyon pikleri ilgili boya ile analiz edilir*. CT değerleri **21 ≤ CT ≤ 26** arasında olmalıdır. Bu CT değerleri SNPure® Blood DNA ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyon protokollerine göre ±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 ≤ CT ≤ 6** siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.

*Lütfen Tablo 1'i kontrol ediniz.



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 miksler kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikslerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

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.

Düzenlenme Tarihi: 18.10.2017

KAYNAKLAR

1. Zamani A.G., Acar A., Yildirim M.S., "Spectrum of mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) in Turkish patients of the Central Anatolia region: a comparison of two mutation detection system", Genetics and Molecular Research (2013), 12 (4): 5152-5159
2. Oztuzcu S., Ulas M., Ergun S., et al., "Screening of common and novel familial mediterranean fever mutations in south-east part of Turkey", Mol Biol Rep (2014) 41:2601-2607
3. Kocakap D.B.S., Günel A. et al., "The frequency of Familial Mediterranean fever gene mutations and genoTips at Kirikkale and comparison with the mean of regional MEFV mutation frequency of Turkey", Mol Biol Rep (2014) 41:1419-1426
4. Gunesacar R., Celik M.M., Arica V., et al., "Frequency of MEFV gene mutations in Hatay province, Mediterranean region of Turkey and report of a novel missense mutation (I247V)", Gene (2014), 546: 195-199
5. Dogan H., Bayrak O.F., Emet M., et al., "Familial Mediterranean fever gene mutations in north-eastern part of Anatolia with special respect to rare mutations", Gene (2015), 568; 170-175
6. Yazici A., Cefle A., Hakan Savli H., "The frequency of MEFV gene mutations in behcet's disease and their relation with clinical findings", Rheumatol Int (2012) 32:3025-3030
7. Centre for Arab Genomic Studies, "The Catalogue for Transmission Genetics in Arabs", Familial Mediterranean Fever Gene, www.cags.org.ae
8. Belmahi I., Cherkaoui JI., Iman Hama I., et al., "MEFV mutations in Moroccan patients suffering from familial Mediterranean Fever", Rheumatol Int (2012) 32:981-984
9. Chaabouni HB, Ksantini M, M'rad R., et al., "MEFV mutations in Tunisian patients suffering from familial Mediterranean fever Semin Arthritis Rheum". (2007) 36(6):397-401.
10. Mansour I , Delague V, Cazeneuve C, et al, Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Grek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694Vand M694I mutations, European Journal of Human Genetics, (2001) 9, 51-55

Well	Sample	Mix1 (WT)	Mix2 (MT)	Mix3 (WT)	Mix4 (MT)	Mix5 (WT)	Mix6 (MT)	Mix7 (WT)	Mix8 (MT)	Mix9 (WT)	Mix10 (MT)	Mix11 (WT)	Mix12 (MT)
A	P369S / FAM												
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		E230K/Q / JOE-HEX
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS
B	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
C	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
D	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
E	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
F	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
G	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		
H	P369S / FAM		G304R / FAM		E148Q / FAM		M694I / FAM		M680I / FAM		K695R / FAM		
	A744S / T. RED		M694V / T. RED		V726A / T. RED		E167D / T. RED		L110P / T. RED		R761H / T. RED		
	E84K / JOE-HEX		E148V / JOE-HEX		F479L / JOE-HEX		T267I / JOE-HEX		P283L / JOE-HEX		E230K/Q / JOE-HEX		
	Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		Int. Control / CYS		