

TROMBOFİLİ MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİTİ A (8 MUTASYON) Kat. No: 10R-20-08A

GİRİŞ

Trombozis ile ilgili sorunlar, kişilerin farklı pıhtılaşma problemlerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar belirli bazı mutasyonların pıhtılaşma üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Trombofili Paneli, FII Prothrombin, FV Leiden, FV Cambridge ve FV1299, FXIII V34L, MTHFR 677 ve 1298 ve PAI-1 4G/5G mutasyonlarının analizini içermektedir.

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

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Mutasyon bölgelerine uygun, Normal (Wild Tip) ve Mutant olmak üzere dört mastermiks ile çalışılır. Kit, ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve prob için dizayn edilmiştir. Sistem, mutasyonlara özgü farklı primer-prob setlerinin kombinasyonunu (Multipleks) içermektedir. Sistem ayrıca HEX boyasında internal kontrol içeriği ile PCR reaksiyonunuzun çalışmasını da kontrol etmektedir.

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
• TRP-8A Miks 1 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-8A Miks 2 (Mutant Tip)	400 µl
• TRP-8A Miks 3 (Wild Tip)	400 µl
• TRP-8A Miks 4 (Mutant Tip)	400 µl
• Kontrol DNA	80 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.

Tablo 1: Mutasyon Boya Tablosu

Tüp	Mutasyon	Boya
Miks 1	FII Wild Type	QUASAR 705
	FV Leiden Wild Type	HEX/JOE
	677 Wild Type	TEXAS RED
	1298 Wild Type	FAM
	Internal Control	CY5
Miks 2	FII Mutant	QUASAR 705
	FV Leiden Mutant	HEX/JOE
	677 Mutant	TEXAS RED
	1298 Mutant	FAM
	Internal Control	CY5
Miks 3	FV Cambridge Wild Type	QUASAR 705
	FV 1299 Wild Type	HEX/JOE
	PAI – 1 5G	TEXAS RED
	FXIII Wild Type	FAM
	Internal Control	CY5
Miks 4	FV Cambridge Mutant	QUASAR 705
	FV 1299 Mutant	HEX/JOE
	PAI – 1 4G	TEXAS RED
	FXIII Mutant	FAM
	Internal Control	CY5

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı ve örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla 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 mikser ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Nazikçe pipetaj yaparak master mikser 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.	

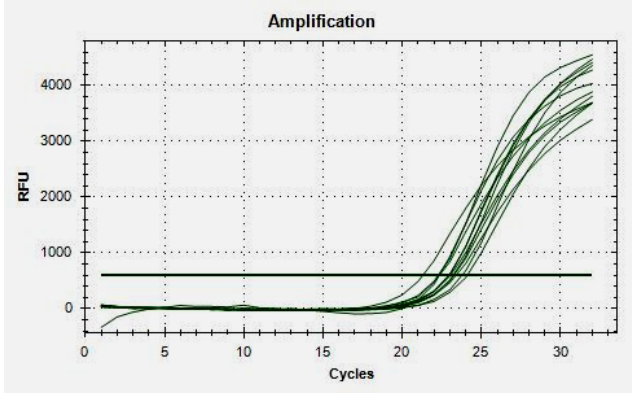
Floresan boya olarak, çalışılan tüm kuyularda **FAM, HEX, Quasar 705, CY5 ve TEXAS RED** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

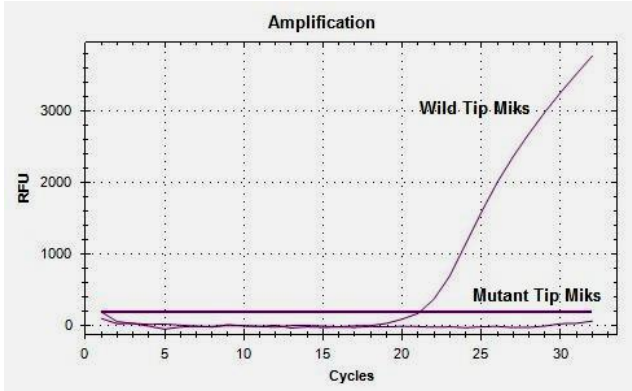
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, CY5, Texas Red, Quasar 705 ve HEX boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.



Şekil 1: İnternal kontrol pikleri (HEX)

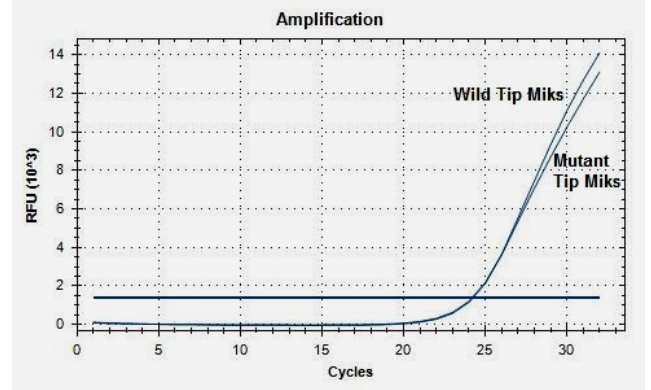
İnternal Kontrol pikleri HEX boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. C_T değeri ise $21 \leq C_T \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



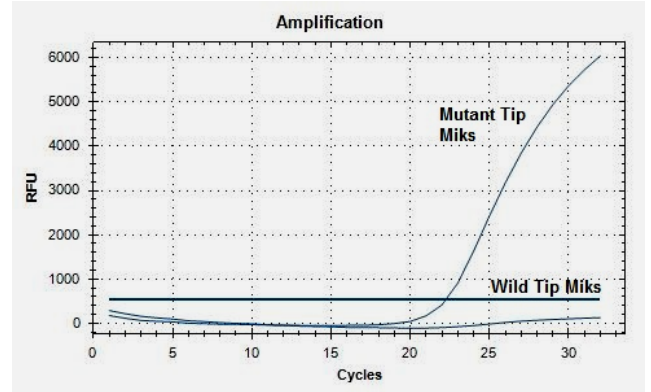
Şekil 2: FV Homozigot Wild Tip (Miks 1 – Miks 2, CY5)

Wild tip ve Mutant tip master mikslerin amplifikasyon pikleri Tablo:1'de yer alan floresan boya içeriklerine göre analiz edilir. Master mikslere 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 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 $4 \leq C_T \leq 6$ siklus aralığında ise test tekrar edilmelidir.



Şekil 3: FXIII Heterozigot (Miks 3 – Miks 4, FAM)



Şekil 4: 1298 Homozigot Mutant Tip (Miks 1 – Miks 2, FAM)

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 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: Mart 2020