

Y KROMOZOM MİKRODELESYON REAL TIME PCR KİTİ (15 BÖLGE)

Kat. No: 15R-10-15

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 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

Sistem, PCR için gerekli tüm bileşenleri içerisinde bulundurmaktadır. Y kromozomunun ilgili bölgelerine ait spesifik primerler ve problemlerle analiz yapılmaktadır. Sistem ayrıca her tüpte HEX/JOE boyası ile işaretli internal kontrol (Prothrombin geni - FII; OMIM: 176930) ile PCR reaksiyonunuzun çalışmasını kontrol etmektedir.

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

KİT İÇERİĞİ

Bileşen	10 Test
• ZFY (Kontrol) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY14-SRY (Kontrol) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY81 (AZF-a) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY84-USP9Y (AZF-a) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY86 (AZF-a) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY127 (AZF-b) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY134 (AZF-b) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY142 (AZF b) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY145 (AZF-c/d) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY152 (AZF-c/d) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY153 (AZF-c/d) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY164 (AZF-b) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY254 (AZF-c/DAZ) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY255 (AZF-c/DAZ) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• SY277 (AZF-c/DAZ) Real Time PCR Master Miks	200 µl
• Kontrol DNA	100 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

Kit genomik DNA ile çalışmaktadır. Kaynak olarak tam kan kullanılmalı, kanlar EDTA'lı tüplere alınmalı, alındıktan hemen sonra bir kaç kez tüpü çevirmek suretiyle kanın pıhtılaşmadan tüp içeriğindeki EDTA ile karışması sağlanmalıdır. Kan tüpleri, bir iki hafta içinde DNA izolasyonu yapılacaksa + 4°C 'de, daha uzun süre bekletilecekse – 20°C de saklanmalıdır.

Kandan Genomik DNA izolasyonu, herhangi bir spin kolon yöntemiyle yapılabilir. DNA elde edildikten sonra – 20°C de saklanmalıdır. Y Mikrodelesyon 15 Bölge Real Time PCR Kiti, MN NucleoSpin®Blood ve SNPure Genomic DNA izolasyon kitine göre optimize edilmiştir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Her bölge ayrı strip 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 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 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

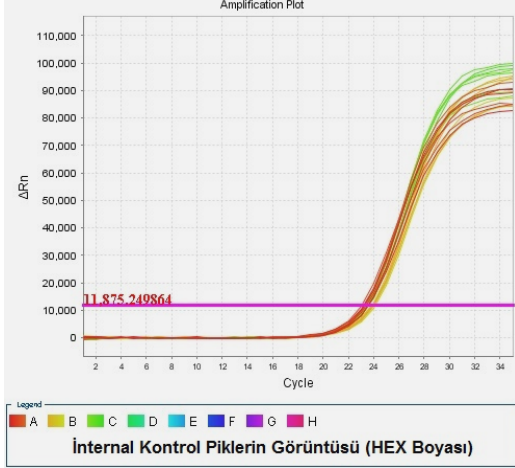
Roche LightCycler® 480 System

Rotor Gene Q

Mic qPCR Cycler

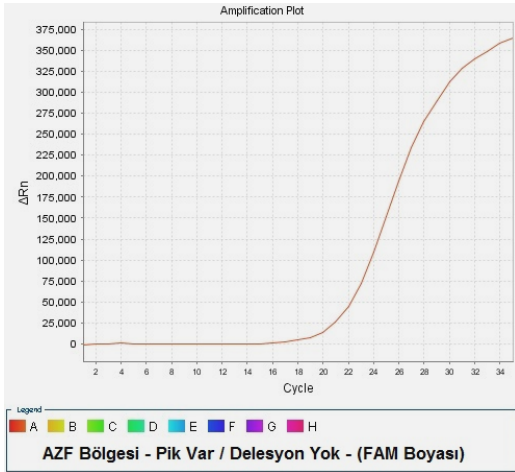
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile, AZF bölgeleri ise FAM boyası ile analiz edilmelidir.



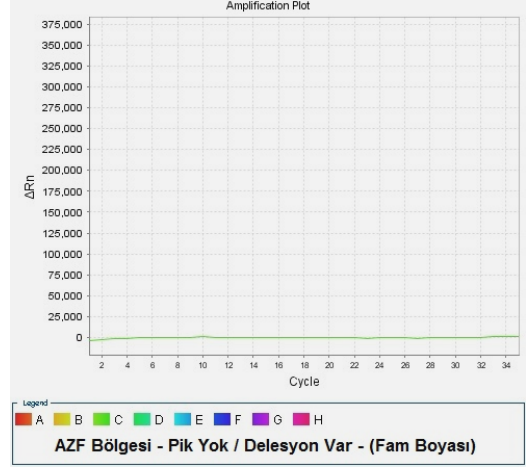
(Şekil : 1)

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



(Şekil: 2)

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



(Şekil: 3)

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

AZF bölgeleri için de FAM boyasında analiz yapmanız gerekmektedir. Bu boyada görmeniz gereken CT değer 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 olabilirsiniz.

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: 12.03.2012