

HEMOKROMATOZIS 3 BÖLGE REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 12R-10-03

GİRİŞ

Hemokromatozis, vücutta aşırı demir depolanması ile karakterize bir hastalıktır. Klasik hemokromatozis, hemokromatozis (HFE) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan otozomal resesif bir hastalıktır. HFE geninde 40'tan fazla mutasyona rastlanmıştır. Ancak yapılan araştırmaların neredeyse tamamı en çok rastlanılan iki mutasyondan bahsetmektedir. Bunlar, kitimizin de içeriğinde bulunan H63D (Histidin 63 Aspartik Asit), C282Y (Sistein 282 Tirozin) ve S65C (Serin 65 Sistein) mutasyonlarıdır. H63D, 187. pozisyonundaki C>G dönüşümü ile, C282Y ise, 845. pozisyonundaki G>A dönüşümü ile ve S65C de 193. Pozisyonundaki A>T dönüşümü ile oluşmaktadır.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probenin 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 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

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 HEX/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	20 Test
• H63D Normal PCR Master Miks	400 µl
• H63D Mutant PCR Master Miks	400 µl
• C282Y Normal PCR Master Miks	400 µl
• C282Y Mutant PCR Master Miks	400 µl
• S65C Normal PCR Master Miks	400 µl
• S65C Mutant PCR Master Miks	400 µl
• Kontrol DNA	30 µl

*Kontrol DNA bazı mutasyon bölgelerini içeren sentetik plasmid DNA'dır. Sentetik DNA ile elde edilmesi beklenen sonuçlar H63D, C282Y, S65C Heterozigot DNA'dır. Sentetik DNA, örnek DNA'dan bir miktar farklı amplifikasyon peak görüntüsü verebilir.

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

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

TEST PROSEDÜRÜ

- Normal (Wild Type) ve Mutant Tip master miksler farklı tüplerde 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 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 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

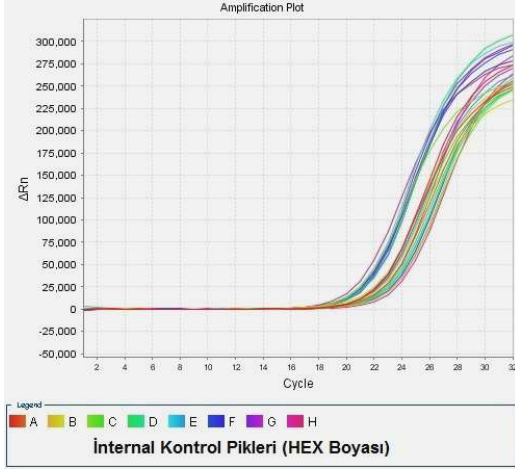
Roche LightCycler® 480 System

Rotor Gene Q

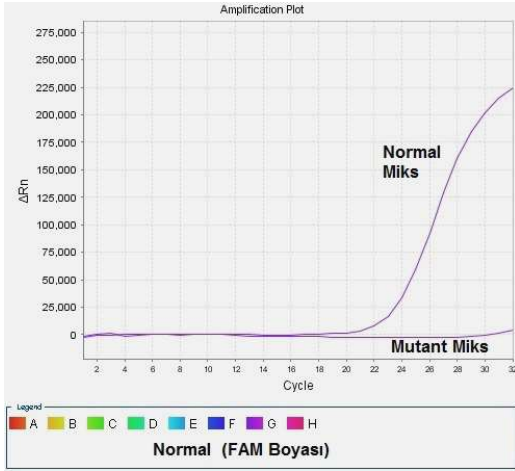
Mic qPCR Cycler

ANALİZ

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

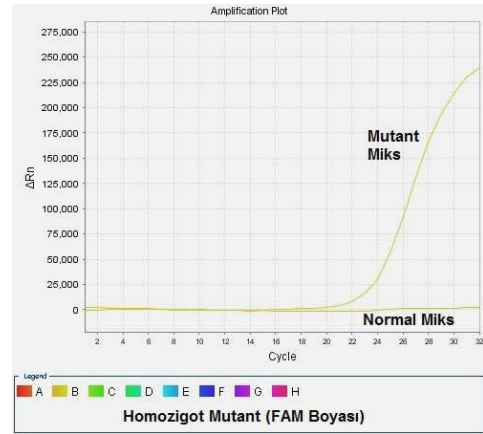
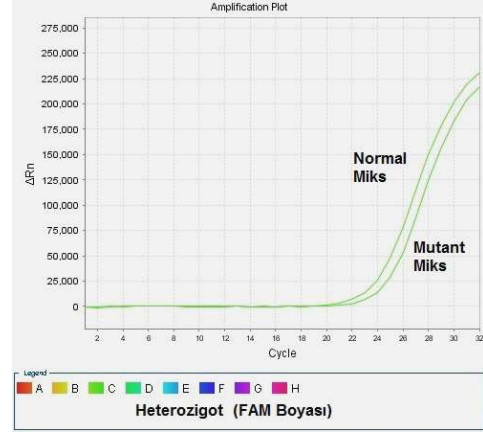


İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır.



Mutasyon değerlendirmesi FAM boyası ile analiz edilmelidir. Bu aşamada cihazınıza uygun olarak yapılması gereken analiz ayarlar hakkında tech@snp.com.tr adresinden bilgi alabilirsiniz. Bu boyada görülmesi gereken CT değer aralığı ise $21 \leq ct \leq 25$ dir. Bu değer, kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak 2-3 siklus öne veya arkaya kayabilmekle birlikte, güvenilir bir sonuç için bu değerler arasında elde edilen pik değerleri kabul edilmektedir.

Aynı şekilde heterozigot bir örnek için normal ve mutant piklerden elde edilen ct değerleri arasında ki fark **en fazla 3 siklus** olmalıdır. Fark **7 siklustan** fazla ise geriden gelen pik ihmal edilmekte, fakat normal ve mutant pikler arasında ki ct değerinin $4 \leq ct \leq 7$ olduğu durumlarda testin tekrar edilmesi önerilmektedir.



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 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