

5. Kullanım Talimatları

5.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için çeşitli yöntemler mevcuttur. Tutarlılık için, RNeasy FFPE Kit veya RNeasy Mini Kit (Qiagen) gibi ticari bir kit kullanmanızı öneririz.

Üreticinin protokolüne göre toplam RNA izolasyon prosedürünü izleyin. İzolasyondan sonra, spektrofotometrik veya florometrik analiz (örn. Nanodrop, UV spektrofotometre, Qubit) kullanarak RNA konsantrasyonunu ölçün ve 16 ng/ μ l* olarak ayarlayın. Konsantrasyon 16 ng/ μ l'nin altındaysa, numunenin bir RNA konsantrasyon adımıdan geçmesi gerekebilir.

**Bu RNA konsantrasyonu, Qubit Florometre ile FFPE numunelerinin florometrik analizine dayanmaktadır. Bu RNA nicelme formu kullanılarak, miktar tayini yaklaşık 640 ng RNA (reaksiyon başına 80 ng numune) gerektirecek şekilde hesaplanmıştır. Spektrofotometrik ve florometrik analiz ile ölçülen RNA konsantrasyonları farklı olacağından, her laboratuvar analiz için optimal RNA konsantrasyonunu değerlendirmelidir.

RNA girdisinin optimizasyonu (Ek B):

Giriş RNA konsantrasyonu, RNA konsantrasyonunu dahili kontrol için tanımlanan Ct aralığı ile ilişkilendirerek optimize edilebilir (bkz. bölüm 6.2), bu şiddetle tavsiye edilir.

LUNG-RT48 testini çalıştırmadan önce optimal giriş RNA miktarını belirlemek için dahili kontrol (IC) primer karışımı (sağlanan) kullanılmalıdır (bkz. Bölüm 8, Ek B). IC reaksiyonundan ve LUNG-RT48 reaksiyonlarından elde edilen iç kontrol Ct değerleri kabaca eşdeğer olacaktır. RNA girdisini belirlemek için IC reaksiyonunun kullanılması, LUNG-RT48 tahlilinin IC Ct aralığındaki numune sayısını artıracak ve bu nedenle numune kalitesi sorunları nedeniyle yeniden çalıştırma ihtiyacını azaltacaktır.

5.2 Reaktif Hazırlama

Tüm reaktifler ve numuneler, test kurulumunun tamamı için buz/soğutulmuş bloklar üzerinde tutulmalıdır.

Tüm Astar Karışımlarını, pozitif kontrol karışımlarını ve 2X Reaksiyon Karışımını buz üzerinde eritin. Tüpleri vorteksleyin ve oda sıcaklığında yaklaşık 5 saniye döndürün. PCR reaksiyonları, toplam 20 μ l/reaksiyon kuyucuğu hacminde ayarlanır. Pipetleme kayıplarını telafi etmek için % 5 fazla hacim hesaplanarak buz üzerindeki her bir Astar Karışımı ile ayrı ayrı master karışımlar yapılmalıdır. RNA örneklerini doğrudan buz/soğutulmuş blok üzerindeki plakaya ekleyin.

Aşağıdaki bileşenler her 20 μ l reaksiyona girer:

Bileşen	Hacim
Tek Adımlı RT - qPCR Reaksiyon Karışımı (2X)	10 μ l
RT Enzim Karışımı (20x)	1 μ l
Reaksiyon 1 -8 Algılama Astar Karışımı (1 -8)	4 μ l
RNA numunesi (16 ng/ μ l**), PC veya NTC	5 μ l

Her numune için sekiz reaksiyon ayarlanır. İki pozitif kontrol (PC) sağlanmıştır. Reaksiyon 1 -3 için pozitif kontrol A kullanın. Reaksiyon 4 -8 için pozitif kontrol B kullanın. Tek bir 96 kuyucuklu PCR plakası, reaksiyon başına en fazla 10 numunenin yanı sıra bir pozitif kontrol ve bir şablon kontrolü (NTC) barındırabilir (Şekil 1).



İngilizceden Türkçeye / Türkçeden İngilizceye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibraz, tasdik
İngilizce / Türkçe astma uygunluğuna
onaylarını.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖZMURAT

Ana karışım ve qPCR plakası buz/soğutulmuş bloklar üzerinde hazırlanmalıdır.

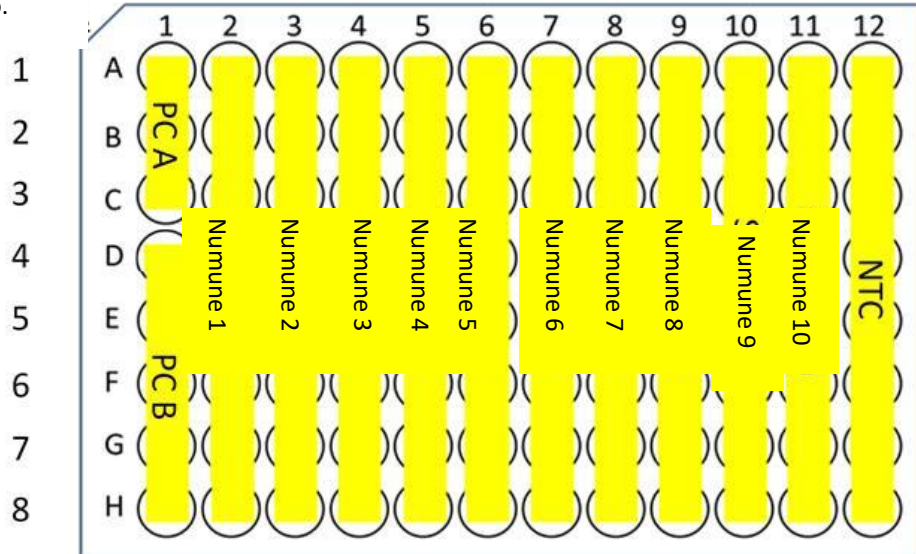
1. Çalışma için gerekli primer karışımlarını, pozitif kontrol karışımlarını ve 2X reaksiyon karışımını çözün.
2. Her tüpü vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında pikofüjde 5 saniye santrifüjleyin.
3. Aşağıdaki gibi n numune sayısı (kontroller dahil) için her bir primer karışımı ile ayrı bir ana karışım hazırlayın (% 5 eksez doz ile hesaplanır):

Reaktifler	N numune başına hacim
Tek Adımlı RT - qPCR Reaksiyon Karışımı (2X)	10,5 µl x n
RT Enzim Karışımı (20x)	1.05 µl x n
Reaksiyon Algılama Primer Karışımı (1 -8)	4.2 µl x n

4. Her tüpü vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında 5 saniye santrifüjleyin.
5. Şekil 1 'de gösterildiği gibi kuyu başına 15 µl ana karışımı dağıtın.
6. Şekil 1 'e göre şablonsuz kontrol (NTC) olarak 5 µl numune RNA, pozitif kontrol veya su ekleyin.
7. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın. Pipetleme yaparken, kabarcık oluşumunu önlemeye dikkat edin.
8. Plakayı optik sızdırmazlık filmi ile kapatın. Reaksiyon hacmini kuyunun dibine getirmek ve kuyucukların dibinde kabarcık bulunmadığından emin olmak için plakayı santrifüjleyin.
9. Plakayı termal döngüleyiciye yerleştirin ve aşağıdaki programı çalıştırın:

Sıcaklık	Zaman	Döngüler	Verilerin Toplanması
55°C	10 dk	1	Kapalı
95°C	1 min	1	Kapalı
95°C	10 sn	40	Kapalı
60°C	45 sn		Açık

Reaksiyon No.



Şekil 1. 10 bilinmeyen numuneyi analiz eden tek bir deney için önerilen plaka yerleşimi.

5.3 Cihaz Kurulumu

5.3.1 Applied Biosystems® 7500 Cihazı

SDS yazılımı sürüm 2.0 ve üstü

Yeni bir deney oluşturun: **Dosya > Yeni Deney > Gelişmiş Kurulum.**

Deney Özellikleri Altında

1. Deney için bir ad girin ve 7500/7500 Hızlı (96 kuyu) seçeneğini seçin.
2. Deney türü için Nicelik - **Karşılaştırmalı CT (CT)** seçin.
3. Reaktif türü ve rampa hızı için sırasıyla **TaqMan® Reaktifleri** ve **Standart**'i seçin. 7500 Fast cihazı kullanıyorsanız rampa hızı için Fast (Hızlı) seçeneğini seçin.
4. Sol gezinti menüsünde **Plaka Kurulumu**'na tıklayın.

Hedefleri ve Örnekleri Tanımla Sekmesi Altında

5. **Hedef Tanımlama** bölümünde **Yeni Hedef Ekle**'ye tıklayın ve aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi hedefler belirleyin.

Hedef İsmi	Bildiren	Söndürücü
RXN 1 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 1 EML4-ALK	FAM	NFQ-MGB
RXN 2 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 2 EML4-ALK	FAM	NFQ-MGB
RXN 3 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 3 EML4-ALK	FAM	NFQ-MGB
RXN 3 MET EXON 14 SKIPPING	CY5	NFQ-MGB
RXN 4 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 4 ROS1	FAM	NFQ-MGB
RXN 4 RET	CY5	NFQ-MGB
RXN 5 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 5 ROS1	FAM	NFQ-MGB
RXN 5 RET	CY5	NFQ-MGB
RXN 6 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 6 ROS1	FAM	NFQ-MGB
RXN 7 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 7 ROS1	FAM	NFQ-MGB
RXN 7 RET	CY5	NFQ-MGB
RXN 8 IC	VIC	NFQ-MGB
RXN 8 RET	CY5	NFQ-MGB

6. **Numuneleri Tanımla** bölümünde, **Yeni Numune Ekle**'ye tıklayın ve pozitif kontrol karışımı için PC A veya B, şablon kontrolü (su) için NTC ve bilinmeyen numune adlarını/numaralarını ekleyin.

Hedef ve Örnek Atama Sekmesi Altında

7. Seçilen kuyucuklara **hedef(ler)** ata bölümündeki hedeflerin kutularını işaretleyerek önceki sayfada gösterildiği gibi **Plaka Yerleşimini Görüntüle**'de seçilen kuyucuklara hedefler atayın.
8. **Pasif referans olarak kullanılacak boyayı seç** bölümünde Rox'u seçin.
9. Aşağıda listelenen **doğu** parametrelerini ayarlamak için sol gezinme menüsünde **Yöntemi Çalıştır** 'a tıklayın.

Sıcaklık	Time	Döngüler	Verilerin Toplanması
55°C	10 dk	1	Kapalı
95°C	1 min	1	Kapalı
95°C	10 sn	40	Kapalı
60°C	45 sn		Açık

- 60°C tavlama/uzatma adımı için **Toplanan Verilerin** seçildiğinden emin olun.
- Kuyu Başına Reaksiyon Hacmi** alanına 20 µl girin.
- Yeşil çalıştırmayı başlat düğmesine tıklayarak cihazı **ÇALIŞTIRMAYI BAŞLATIN**.



İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibraz amaçlı
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğunu
onaylım.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLENGAN ÖMURTAK

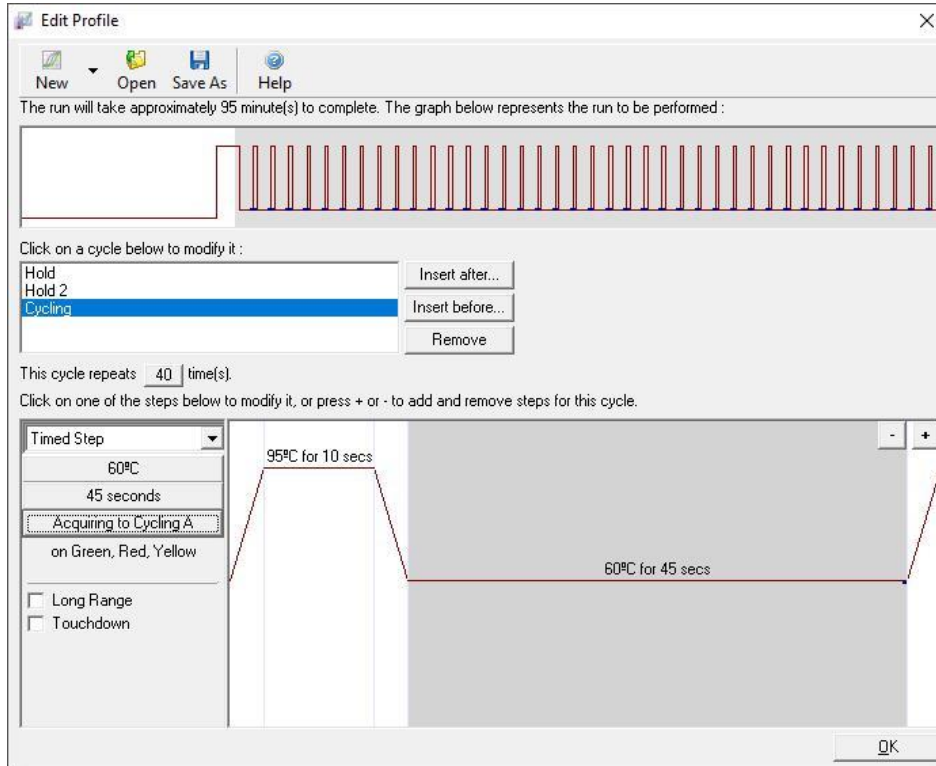
5.3.2 QIAGEN Rotor - Gene® Q

Cihaz yazılımı sürüm 2.0 ve üstü

1. **Dosya>Yeni'yi** seçin, iletişim kutusundaki **Gelişmiş** sekmesine tıklayın, **İki Adım'ı** seçin ve **Yeni'ye** tıklayın.
2. **72 - Kuyu Rotorunu** seçin, Kilitleme Halkası Ekli kutusunu işaretleyin, **İleri'ye** tıklayın, ardından **Sihirbazı Atla'ya** tıklayın.
3. **Görünüm>Çalıştır Ayarları'na** gidin, **20 µl** girin
4. **Görünüm>Profil Düzenleyici'ye** gidin. **2 Bekletme** ve **1 Bisiklet** adımı oluşturun.
5. Sağdaki panelde her adıma tıklayarak aşağıda listelenen uygun bisiklet parametrelerini girin:

Adım	Sıcaklık	Time	Döngüler	veri edinme
Tut	55°C	10 dk	1	Edinilmiyor
Tut	95°C	1 min	1	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	95°C	10 sn	40	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	60°C	45 sn		Tarihinde A Bisikletine Alınıyor Yeşil, Sarı ve Kırmızı

6. Sağdaki panelde **60 °C** sıcaklık ayarını seçin.
7. **Veri toplama kanallarını eklemek için A Döngüsüne** Edinme'yi seçin.



İngilizceden Türkçeye / Türkçeden İngilizceye
tercüme edilen iş bu tercümenin ilave olarak
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylarım.

Noter Yeminli Mütercim
AOA GÜLECYAN ÖMÜRTEPE

8. **Kullanılabilir Kanallar** alanından her bir rengi seçip sağa bakan oku seçerek **Yeşil, Sarı ve Kırmızı Kanalların Edinme Kanalları** alanına eklendiğinden emin olun.

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange

Acquiring Channels :

Name
Green
Red
Yellow

To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >>

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ¹ , SYBR Green 1 ¹ , Fluorescein, EvaGreen ¹ , Alexa Fluor 488 ¹
Yellow	530nm	555nm	JOE ¹ , VIC ¹ , HEX, TET ¹ , CAL Fluor Gold 540 ¹ , Yakima Yellow ¹
Orange	585nm	610nm	ROX ¹ , CAL Fluor Red 610 ¹ , Cy3.5 ¹ , Texas Red ¹ , Alexa Fluor 568 ¹
Red	625nm	660nm	Cy5 ¹ , Quasar 670 ¹ , Alexa Fluor 633 ¹
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ¹ , Alexa Fluor 680 ¹
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ¹ , EvaGreen ¹

9. **TAMAM**ı tıklayın.

10. Profili Düzenle penceresinde **Tamam** 'a tıklayın.

İsteğe bağlı: İletişim kutusunun üst kısmındaki Farklı Kaydet düğmesini kullanarak bu profili ileride kullanmak üzere kaydedin.

11. **Kazanç Optimizasyonu**'nu seçin.

12. Kanal Ayarları altındaki açılır menüyü **seçin ve Tüm Kanalları Seçin**.

13. **Tümünü Optimize Et**'i seçin.

14. Önceki pencereye geri dönmek için tüm kazanç ayarı seçenekleri için **Tamam**'ı seçin.

15. **1. Alımdan Önce Optimizasyon Gerçekleştir**'in yanındaki kutuyu işaretleyin.

Not: Bu adım, her yeni reaktif partisi için yalnızca bir kez gerçekleştirmek için gereklidir. Kazanç ayarları belirlendikten sonra, aynı parti numarasına sahip reaktiflerle gelecekteki çalışmalar için aynı ayarları kullanın.

16. **Kapat** 'ı seçin.

17. İlerle'yi seçin.

18. Şerit borularını rotora yükleyin.

19. **Çalıştırmayı Başlat**'ı seçin, ardından çalıştırmayı başlatmak için Başlat düğmesine tıklayın.

Not: Çalıştırma başladığında **Numuneleri Düzenle** iletişim kutusu açılır. Numune bilgileri, cihaz çalışırken veya çalışma tamamlandıktan sonra girilebilir.



İngilizceden Türkçeye / Türkçeden İngilizceye
tercüme edilen iş bu tercümenin ilave olarak
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onyarılm.

Noter Yemimli Mütercim
ADA GÜLETCAN ÖMÜRTEPE

5.3.3 Roche LightCycler® 480

Yazılım sürümü 1.5 ve üstü

1. Navigatörde, yeni bir **LightCycler® 480 Deneyi** başlatmak için **Yeni'ye** tıklayın.
2. **Algılama Formatı** için **Çift Renkli Hidroliz Probu / UPL Probu**'nu seçin.
3. **FAM (460 -510)** ve **VIC (533 -580)** öğelerinin seçili olduğundan emin olmak için **Özelleştir'e** tıklayın.
4. Reaksiyon hacmini 20 µl olarak değiştirin.
5. Aşağıdaki program ve sıcaklık hedeflerini ekleyin:

Uygulama Adı	Döngüler	Analiz Modu
Etkinleştirme	1	Yok
Denature	1	Yok
Periyot	40	Miktar Tayini

Etkinleştirme Adımı için:

Hedef (°C)	Edinim Modu	Bekleme (ss:dd:ss)
55	Yok	00:10:00

Denatürasyon Adımı için:

Hedef (°C)	Edinim Modu	Bekleme (ss:dd:ss)
95	Yok	00:01:00

Döngü Adımı için:

Hedef (°C)	Edinim Modu	Bekleme (ss:dd:ss)	Rampa Hızı (°C/s)
95	Yok	00:00:10	4.4
60	Tek	00:00:45	2.2

6. **Numune Düzenleyici'ye** gidin ve **İş Akışı** olarak **Rel Quant**'ı seçin, ardından numuneleri plakaya atayın.
7. **Deneme** düğmesini seçin ve dosyayı kaydetmek ve çalıştırmayı başlatmak için **Çalıştırmayı Başlat'a** tıklayın.