

5. Kullanım Kılavuzu



5.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için çeşitli yöntemler mevcuttur. Tutarlılık için, EntroGen gibi ticari bir kit kullanmanızı öneririz. *pureNA*® Genomik DNA İzolasyon Kiti (Cat# GDNA -50).

Üreticinin protokolüne göre genomik DNA izolasyon prosedürünü izleyin. Yeterli miktarda DNA, FFPE bloklarından veya taze donmuş kesitlerden (yaklaşık 2 -10 µg) izole edilebilir. DNA izolasyonundan sonra, florometrik analiz (örn. Qubit) kullanarak konsantrasyonu ölçün ve 10 ng/µl'ye ayarlayın. Konsantrasyon 10 ng/µl'nin altındaysa, reaksiyon kurulumu sırasında su hacmini ayarlayın.

Bu analiz, reaksiyon başına yaklaşık 80 ng DNA, 10 ng numune gerektirir. Bununla birlikte, FFPE bloklarından izole edilen DNA'nın kalitesi parçalanmaya bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, DNA konsantrasyonu, analiz için mevcut olan amplifiye edilebilir DNA miktarını yansıtmamaktadır. EntroGen'in Dahili Kalite Kontrol Testini (kat. no. IQCA - RT50), herhangi bir RT - PCR testini çalıştırmadan önce optimum giriş DNA miktarını belirlemek için kullanılır.

Her laboratuvar, DNA konsantrasyonunu iç kontrol için bölüm 6.2 'de tanımlanan optimal aralıkla ilişkilendirerek optimal giriş DNA konsantrasyonunu da değerlendirebilir.

5.2 Reaktif hazırlığı

- Primer/prob karışım tüplerini, pozitif kontrol karışımlarını ve 2X mutasyon tespit reaksiyon karışımlarını buz üzerinde eritin.
- Tüpleri vorteksleyin ve oda sıcaklığında yaklaşık 5 saniye döndürün.

Not: Reaktiflerin, kontrollerin ve numunelerin buz üzerinde tutulması önerilir.

Her numune için sekiz reaksiyon ayarlanır. PCR reaksiyonları toplam 30 µl/numune hacminde ayarlanır. Birden fazla numune için reaksiyon karışımları (kontrol numunelerinin yanı sıra), pipetleme kayıplarını telafi etmek için % 5 fazla hacimli bir ana karışım olarak önceden karıştırılmalıdır.

Alternatif olarak, doğrudan plakaya eklenen DNA örnekleri ile her bir primer/prob karışımı ile ayrı ana karışımlar yapılabilir. Bu kurulum için, DNA numunesinin seyreltilmesi ve pipetleme hatasını en aza indirmek için reaksiyon kuyucuğu başına en az 5 µl numune eklenmesi önerilir.

Aşağıdaki reaktifler her 30 µl reaksiyona girer:

Bileşenler	Hacim (µl)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	15
Astar/Prob Karışımı (1 -8)	7
DNA örneği (10 ng/µl)	1*
Moleküler dereceli su	7**

*Numune hacmi 1 µl ile 8 µl arasında olabilir.

** 30 µl reaksiyon hacmini tamamlamak için su hacmi numune hacmine göre ayarlanmalıdır.



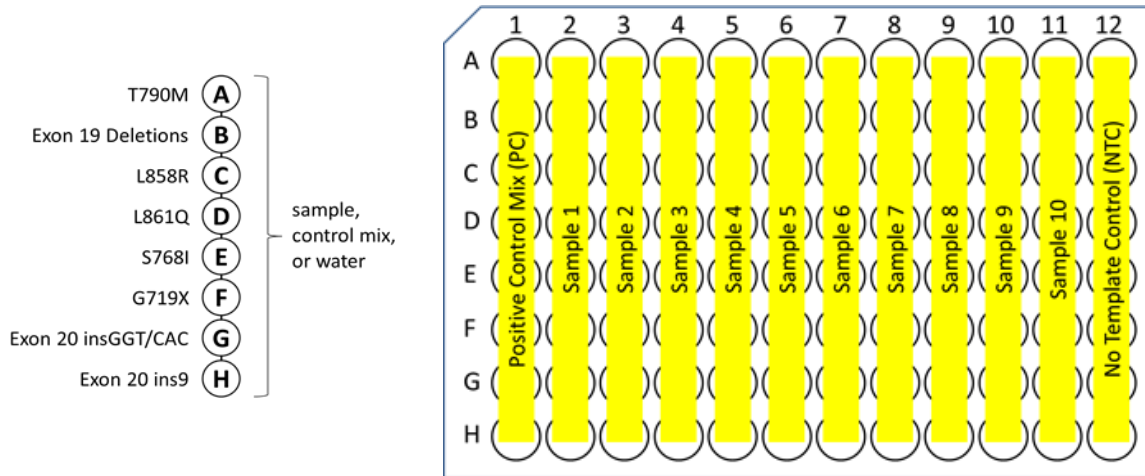
İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibraz olunan
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylıyorum.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYYAN ÖMURTAŞ

1. Her numune için aşağıdaki gibi bir ana karışım hazırlayın (% 5 fazlalık ile hesaplanır):

Reaktifler	FINAL	Numune başına hacim
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	1X	126µl
Pozitif kontrol 10 ng/µl'de DNA, Su veya numune DNA'sını karıştırır	10 ng	8.4 µl
Nükleaz içermeyen su		58.5 µl

- Oda sıcaklığında karıştırmak ve hızlı bir şekilde döndürmek için nabız vorteksi.
- Kuyu başına 23 µl ana karışımı bir sonraki sayfada gösterildiği gibi tek bir sütuna (A - H) dağıtın.
- Her astar/prob karışımından karşılık gelen kuyucuğa 7 µl ekleyin.



Şekil 1: Her örnek için sekiz reaksiyon düzenlenmiştir. Tek bir 96 kuyucuklu PCR plakası, bir pozitif kontrol karışımı ve bir şablonuz kontrol (NTC) olmak üzere 10 'a kadar bilinmeyen numuneyi barındırabilir. 72 kuyucuklu bir rotor (gösterilmemiştir), bir pozitif kontrol karışımı ve bir şablonuz kontrol (NTC) olmak üzere 7 'ye kadar bilinmeyen numuneyi barındırabilir. Önerilen plaka yerleşimi yukarıda gösterilmiştir.

Not: 1 µl'den büyük numune hacimleri için ana karışımdaki su hacmi, reaksiyon başına toplam 30 µl'ye göre ayarlanmalıdır. Reaksiyon başına ana karışımın hacmi de ayarlama gerektirecektir.

- Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
- Plakayı optik sızdırmazlık filmi veya kapakları ile kapatın.
- Yan duvarlardan damlacıkları indirmek ve kuyuların dibinde kabarcık bulunmadığından emin olmak için plakayı kısaca santrifüjleyin.



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

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEŞCAN ÖMÜRZAK

5.3 Cihaz Kurulumu

5.3.1 Applied Biosystems® Aletleri:

7500/7500 Hızlı (SDS Yazılım sürümü 2.0 ve üstü);

StepOne/Plus (Yazılım sürümü 2.2 ve üstü);

QuantStudio™ 5 (yazılım sürümü 1.4.3 veya üstü)



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

Deney Özellikleri Kapsamında

1. Deney için bir ad girin ve deney için uygun bloğu seçin.
2. Deney türü için **Miktar Tayini - Karşılaştırmalı C_T (ΔΔ C_T)** seçin.
3. Reaktif türü ve rampa hızı için sırasıyla **TaqMan® Reaktifleri** ve Hızlı'yı seçin. 7500 Standart bir cihaz kullanıyorsanız **Standart sekmesini** seçin. Standart ve Hızlı mod arasında performans farkı yoktur.
4. Sol gezinti menüsünde **Plaka Kurulumu** 'na veya QuantStudio™ 5' te **Tanımla** 'ya tıklayın.

Hedefleri ve Örnekleri Tanımla'nın altında

5. QuantStudio™ 5 'te **Yeni Hedef Ekle'ye** veya **Yeni'ye** tıklayın ve aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi aşağıdakileri ayarlayın:

Adı Soyadı	Florofor	Söndürücü
IC	VIC	Floresan Yok (NFQ)
EGFR	FAM	Floresan Yok (NFQ)

6. Numuneleri Tanımla altında: Pozitif kontrol karışımı için PC, şablon kontrolü (su) için NTC ve bilinmeyen numune adları/numaraları ekleyin.
7. Hedefleri ve Numuneleri Ata Sekmesini seçin, numuneleri ve dedektörleri Şekil 1 'de gösterildiği gibi plakaya ekleyin.
8. Pasif Referans Boyayı "YOK" olarak ayarlayın.
9. Çalıştırma Yöntemini aşağıdaki parametrelerle ayarlayın ve deneyi çalıştırın.

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Verilerin Toplanması
0 C°	10 dk	1	
0 C°	15 sn.	40	
0 C°	30 sn.		FAM, VIC



İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibrazı ancak
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylanmıştır.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRTEK

5.3.2 Rotor - Gene® Q

Yazılım sürümü 1.7 ve üzeri ve

Rotor - Gene® 3000 Yazılım sürümü 6.1.3



1. **Dosya>Yeni'yi** seçin, iletişim kutusundaki **Gelişmiş** sekmesine tıklayın, **İki Adım'a çift tıklayın**.
2. **72 - Kuyu Rotorunu** seçin, Kilitleme Halkası Ekli kutusunu işaretleyin, **Sihirbazı Atla'yı** tıklayın.
3. **Görünüm> Ayarları Çalıştır'a** gidin, Reaksiyon Hacmi için 30µl girin ve Tamam'a tıklayın.
4. **Görünüm>Profil Düzenleyici'ye** gidin. Kutuda iki döngü listelenmelidir; Bekletme ve Bisiklete binme.
5. Sağdaki panelde her bir adıma tıklayarak aşağıdaki adım parametrelerini girin:

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Verilerin Toplanması
0 C°	10 dakika	1	Edinilmiyor
0 C°	15 saniye	40	Edinilmiyor
0 C°	30 saniye		A Bisikletine Kazandırma Yeşil / Sarı

6. OK (Tamam)'a tıklayın.

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

7. **Görünüm>Kazanç Optimizasyonu'na** gidin, Kanal Ayarları açılır menüsünden Edinmeyi **Optimize Et'i** seçin ve **1. Edinimden 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.

8. Şerit borularını rotora yükleyin.
9. **Çalıştır > Çalıştır'ı Başlat sekmesine** gidin, 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 terecimenin ibraz ettiği
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylarım.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLRYCAN ÖMURTAK

5.3.3 Roche LightCycler® 480

Yazılım Sürümü: 1.5 ve üzeri



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/HEX/Yellow555** 'in (533 -580) seçili olduğundan emin olmak için **Özelleştir'e** tıklayın.
4. Reaksiyon hacmini 30 µl olarak değiştirin.
5. Aşağıdaki program ve sıcaklık hedeflerini ekleyin:

Uygulama Adı	Döngüler	Analiz Modu
Denature	1	Yok
Döngü	40	Miktar Tayini

Denatürasyon Adımı için:

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

Döngü Adımı için:

Hedef (°C)	Edinim Modu	Bekleme (ss:dd:ss)	Rampa Hızı (°C/s)
95	Yok	00:00:15	4.4
58	Tek	00:00:30	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.



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

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLRYCAN ÖMÜRZAK

5.3.4 Bio - Rad CFX96

Yazılım Sürümü 3.1 ve üzeri



1. Başlangıç Sihirbazı'nda Yeni Deneme Oluştur'u seçin ve açılır listede CFX96 'nın seçili olduğundan emin olun. OK (Tamam)'a tıklayın.
2. Deney Kurulumu penceresinin Protokol sekmesinde Yeni Oluştur'u seçin ve aşağıdaki döngü parametrelerini girin.

Adım	Sıcaklık	Süre
1	0 C°	10 dk
2	0 C°	15 sn
3	0 C°	30 sn
	+Plaka Okuma	
4	2 39 kez daha GİT	
	SON	

3. Numune Hacmini 30µl olarak değiştirin.
4. Tamamlandığında, protokol şablonunu kaydetmek için Tamam'a tıklayın. Sonraki çalışmalar için kullanmak üzere kaydedilen şablon dosyasının konumunu not edin. Plaka kurulum penceresine gitmek için İleri'ye tıklayın.
5. Plaka sekmesinde, plaka düzeni oluşturmak için Yeni Oluştur'a tıklayın.
6. Floroforları Seç düğmesine tıklayın ve FAM ve VIC'in yanındaki kutuları işaretleyin.
Diğer tüm işaretler kaldırılmalıdır. OK butonuna tıklayın.
7. Plaka düzenindeki ilk sütunu (A1 - H1) seçin ve Numune Tipini Pozitif Kontrol olarak değiştirin.
8. Plaka düzenindeki son sütunu (A12 - H12) seçin ve Numune Tipini NTC olarak değiştirin.
9. Plaka düzenindeki kuyuların geri kalanını (A2 - H11) seçin ve Numune Tipini Bilinmiyor olarak değiştirin.
10. Her sütunu ayrı ayrı seçin ve Numune Adı alanına numunenin adını yazın. Bittiğinde, numune adını kaydetmek için klavyedeki Enter tuşuna basın. Bu adımı her numune için gerçekleştirin.
11. Ayarlar'a tıklayın ve kullanılan plaka türünü seçin (örneğin, BR Beyaz veya BR Şeffaf).
12. Tamamlandığında, plaka düzenini kaydetmek için Tamam'a tıklayın.
13. Çalıştırmaya başlamak için İleri'ye, ardından Çalıştırmaya Başla'ya tıklayın.



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

Noter Yeminli Müterecim
ADA GÜLEYGAN ÖMÜRTEK