

5. KULLANIM KILAVUZU

5.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için çeşitli yöntemler mevcuttur. Tutarlılık için, EntroGen pureNA® Genomik DNA İzolasyon Kiti (Kat. No. GDNA -50) gibi ticari bir kit kullanmanızı öneririz.

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 gerekirse seyreltin. Bu tahlil, numune başına toplam 25 -75 ng DNA gerektirir (5 -15 ng/reaksiyon). 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 DNA Fragmentasyon Miktar Tayinini (kat. No. FQA - RT40) herhangi bir qPCR testini çalıştırmadan önce optimal giriş DNA miktarını belirlemek için kullanılır. Her laboratuvar, DNA konsantrasyonunu iç kontrol için bölüm 6.1 'de tanımlanan optimal aralıkla ilişkilendirerek optimal giriş DNA konsantrasyonunu da değerlendirebilir.

5.2 Reaktif preparasyonu

Tüm primer/prob karışımlarını, pozitif kontrol karışımını ve 2X reaksiyon karışımını buz üzerinde eritin. Tüpleri vorteksleyin ve oda sıcaklığında birkaç saniye döndürün. Tek bir reaksiyon için PCR reaksiyon hacmi 20 µl/numunedir. Birden fazla numune için reaksiyon karışımları (kontrol numunelerinin yanı sıra), pipetleme hatalarını örtmek için % 5 fazlalığı olan bir ana karışım olarak önceden karıştırılmalı ve buz üzerine yerleştirilmelidir.

Aşağıdaki hacimler her 20 µl reaksiyona girer:

Bileşenler	Hacim (µl)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	10
Astar/Prob Karışımı (1 -5)	3
DNA numunesi (5 -15 ng)	6*
Nükleaz içermeyen su	Toplam 20 µl hacim için **

*Numune hacmi 1 µl ile 7 µl arasında olabilir.

** 20 µl reaksiyonu tamamlamak için su hacmi numune hacmine göre ayarlanmalıdır.

Her numune için beş reaksiyon ayarlanır. Tek bir 96 kuyucuklu PCR plakası, Şekil 1 'de görüldüğü gibi 14 numuneye, bir pozitif kontrol karışımına ve bir şablonuz kontrole kadar barındırabilir. Deney kurulumu sırasında soğutulmuş blokların üzerine 96 kuyucuklu plakaların yerleştirilmesi önerilir.

1. N numune sayısı için, her biri aşağıdaki gibi farklı bir astar karışımına sahip (5 Astar Karışımından) 5 farklı ana karışım hazırlayın (% 5 eksez doz ile):

Reaktifler	Nihai Kons.	n numune başına hacim
2X Reaksiyon Ana Karışımı	1X	(n+2)*10,5 µl
Astar/Prob Karışımı (1 -5)	1X	(n+2)*3,15 µl
Moleküler Sınıf Su [#]	UYGULANMADI	(n+2)*1.05 µl

#Yukarıdaki tablo, reaksiyon başına her numuneden 6 µl eklendiğini varsaymaktadır. Farklı bir numune hacmi kullanılıyorsa, su hacmi buna göre ayarlanmalıdır.

2. Oda sıcaklığında karıştırmak ve hızlı bir şekilde döndürmek için nabız vorteksi.
3. Kuyu başına 14 µl ana karışım dağıtın.



İngilizceden Türkçeye / Türkçeden İngilizceye
Türkçeye Türkçe yazıya
İngilizce Türkçe yazıya
Noter Yemimli Mütercam
ADA GÜLETCAN ÖMÜRKAR

4. Aşağıdaki Şekil 1 'e göre ilgili oyuğa 6 µl Pozitif kontrol karışımı, DNA ve/veya su ekleyin.

Not: 6 µl'den düşük numune hacimleri için ana karışımdaki su hacmi, reaksiyon başına toplam 20 µl'ye göre ayarlanmalıdır. Reaksiyon başına ana karışımın hacmi de ayarlama gerektirecektir. Ek A'daki örneğe bakınız.

- Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
- Plakayı optik sızdırmazlık filmi ile kapatın. Reaksiyon hacmini kuyunun dibine getirmek ve oyukların dibinde kabarcık bulunmadığından emin olmak için plakayı santrifüjleyin.
- Plakayı termal döngüleyiciye yerleştirin ve aşağıdaki programı çalıştırın:

Sıcaklık	Süre	Döngüler
95°C	10 dk	X1
95°C	15 sn	X40
58°C Plaka okunuşu	30 sn	

Şekil 1: 14 bilinmeyen numuneyi analiz eden tek bir deney için önerilen plaka yerleşimi. Metin içeren turuncu, mavi, yeşil, sarı ve beyaz, sırasıyla Astar/Prob Karışımı 1 -5 içeren oyukları temsil eder.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC	PC	PC	PC			S8	S8	S8	S8	S8
B	S1	S1	S1	S1	S1			S9	S9	S9	S9	S9
C	S2	S2	S2	S2	S2			S10	S10	S10	S10	S10
D	S3	S3	S3	S3	S3			S11	S11	S11	S11	S11
E	S4	S4	S4	S4	S4			S12	S12	S12	S12	S12
F	S5	S5	S5	S5	S5			S13	S13	S13	S13	S13
G	S6	S6	S6	S6	S6			S14	S14	S14	S14	S14
H	S7	S7	S7	S7	S7			NTC	NTC	NTC	NTC	NTC



İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibcaca vasıtasıyla
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylıdır.

Noter Yemini Mütercim
ADA GÜLETCAN ÖMURTAŞ

5.3 Cihaz Kurulumu

5.3.1 Bio - Rad CFX96 (yazılım sürümü 3.1 veya üstü)

Yeni bir deney oluşturun: **Başlangıç Sihirbazı > Kurulumu Çalıştır sekmesi > Çalıştırma türünü seçin >**

Kullanıcı tanımlı düğme. Protokol sekmesinin altındaki Kurulumu Çalıştır penceresinde

1. Aşağıdaki döngü koşullarını girin.

Sıcaklık	Süre	Döngüler
95°C	10 dk	X1
95°C	15 sn	X40
58°C Plaka okunuşu	30 sn	

2. İleri düğmesine tıklayın.

Plaka sekmesinin altında

3. Plaka Editörü'nü açmak için Seçilenleri Düzenle'ye tıklayın.
4. Floroforları Seç düğmesine tıklayın ve yalnızca FAM ve HEX'i seçin.
5. Plakadaki tüm kuyuları seçin ve tüm reaksiyon kuyuları için FAM ve Hex'in seçildiğinden emin olun.
6. PC reaksiyonları olan kuyuları seçin ve Numune Türü için Pozitif Kontrol'ü seçin.
7. NTC reaksiyonları olan kuyuları seçin ve Numune Türü için NTC'yi seçin.
8. Numune Adı alanına numune adlarını girin.
9. Plaka düzenleyiciden çıkmak için Tamam'a tıklayın. Program plakayı kaydetmek isterse, gelecekteki çalıştırma kurulumları için erişilebilir bir konuma "IDH1/2" olarak kaydedin.
10. Çalıştırmayı Başlat sekmesine gitmek için İleri'ye tıklayın ve Çalıştırmayı Başlat'ı seçin.

5.3.2. Uygulanan Biosystems QuantStudio™ 5 Fast (yazılım sürümü 1.4.3 veya üstü)

1. QuantStudio™ Tasarım ve Analiz Yazılımını açın.
2. **Dosya>Yeni Deney>Deney Kurulumu'na** gidin.
3. Deneyin adını söyleyin.
4. QuantStudio™ 5 Sistemini seçin.
5. Blok tipini seçin (96 - İyi 0.2 mL Blok).
 - a. Sisteminizde 96 kuyucuklu 0,1 mL Bloğu varsa, bunun yerine bunu seçin.
6. Deney türü için **Karşılaştırmalı Ct ($\Delta\Delta Ct$)** seçin.
7. Kimya için **TaqMan®** Reaktiflerini seçin ve Çalışma modu için Hızlı'yı seçin.
8. **Yöntem** penceresine gidin. Hacmi 20 µl ve kapak sıcaklığını 105° C olarak ayarlayın. Ardından aşağıdaki çalıştırma parametrelerini girin:

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
58°C	30 sn		Açık

9. **Plaka** penceresine gidin. Plaka Öznitelikleri altında Pasif Referans için "**HİÇBİRİ**" seçeneğini seçin.
10. Gelişmiş Kurulum sekmesine gidin. Hedefler alanında, Hedef 1 'in adını FAM olarak değiştirin ve dedektörün FAM olduğundan emin olun. Söndürücüyü Yok veya NFQ - MGB olarak ayarlayın.



İngilizce / Türkçe / Türkçeden İngilizceye
Tercüme Hizmetleri / Certified Translation Services
İngilizce / Türkçe astına uygunluğuna
onaylarım.

Noter Yemindli Mütercam
ADA GÜLETCAN ÖMURTAŞ

11. İkinci bir dedektör eklemek ve IC olarak adlandırmak için **Ekle** düğmesine tıklayın. Bu dedektörün Raportörünü VIC olarak değiştirin ve Söndürücüyü Yok veya NFQ - MGB olarak ayarlayın.
12. Numuneler alanına pozitif kontrol karışımı için PC, şablon kontrolü (su) için NTC ve numune adlarını ekleyin.
13. Yukarıda önerildiği gibi plaka düzenine Hedefler ve Numuneler atayın. Her iki dedektörü de numune, PC veya NTC reaksiyonu içeren her kuyuya ekleyin.
14. Reaksiyon hacmini 20 µl'ye ayarlayın ve Veri Toplama'nın 58°C adımında açıldığından emin olun.
15. Reaksiyon plakasını cihaza yükleyin, ardından **ÇALIŞTIRMAYI BAŞLAT**'I seçin.

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:

Program Adı	Döngüler	Analiz Modu
Denatüre	1	Yok
Döngü	40	Miktar Tayini

Denatüre 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
onaylıdır.

Noter Yeminli Mürtercam
ADA GÜLEYYAN ÖMURTAŞ

5.3.4 Uygulanan Biosystems® 7500/7500 Fast (yazılım sürümü 2.0 ve üstü)

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

Deney Özellikleri Altında

1. Deney için bir ad girin ve **7500 Fast** (96 kuyu) cihazını seçin.
2. Deney türü için Nicelik - **Karşılaştırmalı CT'yi ($\Delta\Delta$ CT)** seçin.
3. Reaktif türü ve rampa hızı için sırasıyla **TaqMan® Reaktifleri** ve Hızlı'yı seçin.
4. Sol gezinti menüsünde **Plaka Kurulumu**'na tıklayın.

Hedefleri ve Numuneleri Tanımla sekmesinin altında

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

Mutasyon	FAM	VIC	Söndürücü
R132	R132	R132_IC	Floresan Yok (NFQ)
R100	R100	R100_IC	Floresan Yok (NFQ)
R172	R172	R172_IC	Floresan Yok (NFQ)
R140Q/W	R140Q/W	R140Q/W_IC	Floresan Yok (NFQ)
R140L/G	R140L/G	R140L/G_IC	Floresan Yok (NFQ)

6. Pozitif kontrol karışımı için PC, şablon kontrolü (su) için NTC ve bilinmeyen numune adlarını/numaralarını ekleyin.
7. Numuneleri ve dedektörleri **Şekil 1** 'deki plaka düzeninde gösterildiği gibi plakaya ekleyin.
8. Pasif Referans Boyayı "**YOK**" olarak ayarlayın.
9. Aşağıdaki parametrelerle yeni bir çalıştırma yöntemi oluşturun ve deneyi çalıştırın.

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
58°C	30 sn		Açık

10. Reaksiyon hacmini 20 µl'ye ayarlayın ve Veri Toplama'nın 58°C adımında açıldığından emin olun.
11. Reaksiyon plakasını cihaza yükleyin, ardından **ÇALIŞTIRMAYI BAŞLAT**'i seçin.

5.3.5 Rotor - Gene® Q (yazılım Sürümü 2.0 ve üzeri)

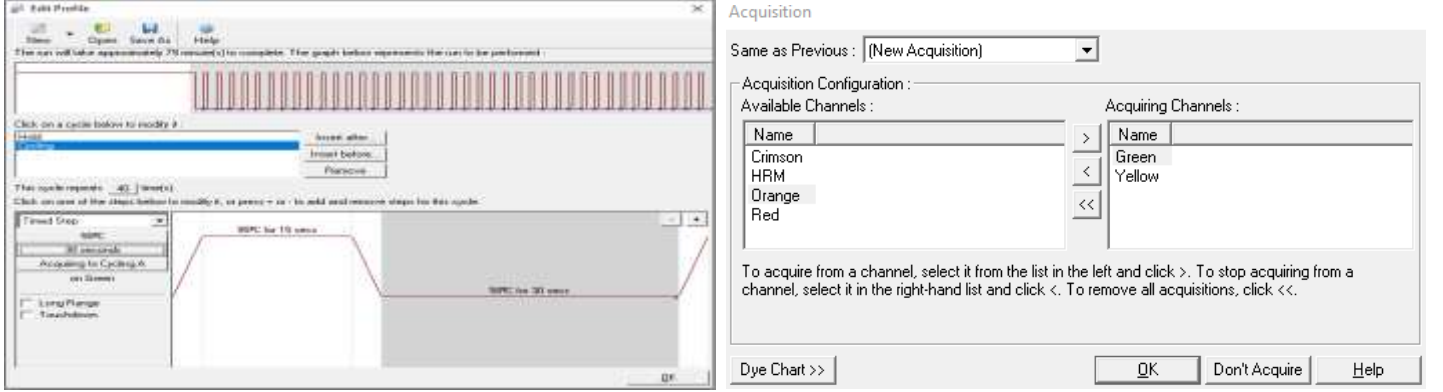
1. **Dosya>Yeni**'yi seçin, iletişim kutusundaki **Gelişmiş** sekmesine tıklayın, **İki Adım**'i seçin ve **Yeni**'ye tıklayın.
2. **72 Kuyu Rotorunu** seçin, Kitleleme Halkası Ekli kutusunu işaretleyin.
3. Reaksiyon Hacmi için 20 µl girin ve **İleri**'ye tıklayın.
4. **Profili Düzenle**'yi seçin.
5. Beklet'e tıklayın, **Bekletme Sıcaklığı** için 95°C ve Bekletme Süresi için 10 dakika girin.
6. Döngüye tıklayın, Bu döngü 40 kez tekrarlanır girin, ardından sağdaki paneldeki her adıma tıklayarak aşağıdaki Zamanlı Adım parametrelerini girin:

Adım	Sıcaklık (° C)	Süre	Veri Edinme
Tut	95°C	10 dakika	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	95°C	15 saniye	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	58°C	30 saniye	A Döngüsünü Edinme Yeşilde, Sarıda

7. Sağdaki panelde 58 °C sıcaklık ayarını seçin.
8. **Veri toplama kanallarını eklemek için A Döngüsüne Edinme**'yi seçin.



9. Kullanılabilir Kanallar alanından her bir rengi seçerek ve sağa bakan oku seçerek Yeşil ve Sarı Kanalların Kanal Edinme alanına eklendiğinden emin olun.



10. **TAMAM**'ı tıklayın.

11. Profili Düzenle penceresinde **TAMAM** 'a tıklayın.

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

12. **Kazanç Optimizasyonu**'nu seçin.

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

14. **Tümünü Optimize Et**'i seçin.

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

16. **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.

17. **Kapat** 'ı seçin.

18. İlerle'yi **seçin**.

19. Şerit borularını rotora yükleyin.

20. **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 ibraz amaçlı
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylım.

Noter Yemindi Müterecim
ADA GÜLEYYAN ÖMURTAŞ