



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. Bu tahlil, numune başına toplam 200 -500 ng DNA gerektirir (20 -50ng/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. DNA konsantrasyonunu iç kontrol için bölüm 6.1 'de tanımlanan optimal aralıkla ilişkilendirerek optimal giriş DNA konsantrasyonunu değerlendirin.

DNA izolasyonundan sonra, spektrofotometrik veya florometrik analiz (örn. Nanodrop veya Qubit) kullanarak konsantrasyonu ölçün ve 20 -50 ng/µl'ye seyreltin. Konsantrasyon 20 ng/µl'nin altındaysa, reaksiyon kurulumu sırasında su hacmini ayarlayın.

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.

PCR reaksiyonları, toplam 30 µl/reaksiyon hacminde ayarlanır. Birden fazla numune için reaksiyon karışımları (kontrol numunelerinin yanı sıra), pipetleme hatalarını kapsayacak şekilde % 5 -10 ek doz ile ana karışım olarak önceden karıştırılmalıdır.

Her 30 µl reaksiyona aşağıdaki hacimler girer:

Bileşenler	Hacim (µl)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	15
Astar/Prob Karışımı (1 -5)	6
DNA numunesi (20 -50 ng)	1*
Nükleaz içermeyen su	Toplam 30 µl hacim için **

*Numune hacmi 1 µl ile 9 µl arasında olabilir.

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

Her numune için on reaksiyon ayarlanır. Deney kurulumu sırasında soğutulmuş blokların üzerine 96 oyuklu plakaların yerleştirilmesi önerilir.

1. N sayıda numune için, her biri aşağıdaki gibi farklı bir astar karışımına sahip (10 Astar Karışımından) 10 farklı ana karışım hazırlayın (%10 fazlalık ile):

Reaktifler	Nihai Kons.	Numune başına hacim
2X Reaksiyon Ana Karışımı	1X	165 µl
Pozitif kontrol karışımı, Su veya DNA	20 -50 ng	11 µl
Nükleaz içermeyen su	-	88 µl



2. Vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında 2.000 rpm'de 10 saniye santrifüjleyin.
3. Şekil 1 'de gösterildiği gibi kuyu başına 24 µl ana karışım dağıtın.

Not: 1 µl'den büyük numune hacimleri için ana karışımındaki su hacmi, reaksiyon başına toplam 30 µl'ye göre ayarlanmalıdır.

4. Şekil 1 'e göre her Mutasyon Tespit Primer Karışımından 6 µl ekleyin.
5. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Plakayı optik sızdırmazlık filmi ile kapatın. Reaksiyon hacmini kuyunun dibine getirmek ve oyukların dibinde kabarcık bulunmadığından emin olmak için plakayı santrifüjleyin.
7. Plakayı termal döngüleyiciye yerleştirin ve aşağıdaki programı çalıştırın:

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
60°C	40 sn		Açık

Şekil 1: 6 bilinmeyen numuneyi analiz eden tek bir deney için önerilen plaka kurulumu. PC: pozitif kontrol karışımı; NTC: şablon kontrolü yok (su); S1 -6: bilinmeyen numuneler.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC G12D	PC G12S	PC G12C	PC G13R	PC G13V	PC Q61K	PC Q61L	PC Q61R	PC Q61H	PC A146T		
B	NTC G12D	NTC G12S	NTC G12C	NTC G13R	NTC G13V	NTC Q61K	NTC Q61L	NTC Q61R	NTC Q61H	NTC A146T		
C	S1 G12D	S1 G12S	S1 G12C	S1 G13R	S1 G13V	S1 Q61K	S1 Q61L	S1 Q61R	S1 Q61H	S1 A146T		
D	S2 G12D	S2 G12S	S2 G12C	S2 G13R	S2 G13V	S2 Q61K	S2 Q61L	S2 Q61R	S2 Q61H	S2 A146T		
E	S3 G12D	S3 G12S	S3 G12C	S3 G13R	S3 G13V	S3 Q61K	S3 Q61L	S3 Q61R	S3 Q61H	S3 A146T		
F	S4 G12D	S4 G12S	S4 G12C	S4 G13R	S4 G13V	S4 Q61K	S4 Q61L	S4 Q61R	S4 Q61H	S4 A146T		
G	S5 G12D	S5 G12S	S5 G12C	S5 G13R	S5 G13V	S5 Q61K	S5 Q61L	S5 Q61R	S5 Q61H	S5 A146T		
H	S6 G12D	S6 G12S	S6 G12C	S6 G13R	S6 G13V	S6 Q61K	S6 Q61L	S6 Q61R	S6 Q61H	S6 A146T		



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

Noter Yeminli Mühürüm
ADA GÜLETCAN ÖMURTAŞ



5.3 Cihaz kurulumu

5.3.1 Uygulanan Biosystems® 7500/7500 Fast

Cihaz yazılımı sürüm 2.0 ve üzerinde:

1. Dosya>Yeni Deney>Gelişmiş Kurulum'u seçin.
2. Bir deney adı girin ve 7500/7500 Fast (96 oyuk) seçin.
3. Deney türü için Kantitatif - Karşılaştırmalı Ct'yi ve reaktifler için TaqMan® Reaktiflerini seçin. Sol gezinti panelinde Plaka Kurulumu'na tıklayın.
4. İki hedef ekleyin ve biri için FAM® ve diğeri için VIC® seçin. Her iki hedef için de Söndürücü için NFQ - MGB'yi (veya Hiçbirini) seçin.
5. Ekranın sağ tarafına, deneyiniz için PC, NTC ve örnek adları ekleyin.
6. Hedefleri ve Örnekleri Ata sekmesini seçin ve Şekil 1 'de gösterildiği gibi kuyulara örnekler atayın.
7. Her iki hedefi de PC ve NTC dahil olmak üzere tüm numune kuyularına atayın.
8. Pasif Referans Boya için Yok'u seçin.
9. Döngü parametrelerini ayarlamak için sol paneldeki Çalıştır Yöntemine tıklayın.
10. Numune hacmini 30 µl'ye ayarlayın.
11. Bisiklet parametrelerini aşağıda gösterildiği gibi ayarlayın:

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
60°C	40 sn		Açık

12. Plakayı yukarıdan yükleyin ve çalıştırmaya başlayın.



İngilizceden Türkçeye / Türkçeden İngilizceye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibraz olduğu
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğunu
onaylıyorum.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLETCAN ÖMÜRTEPE



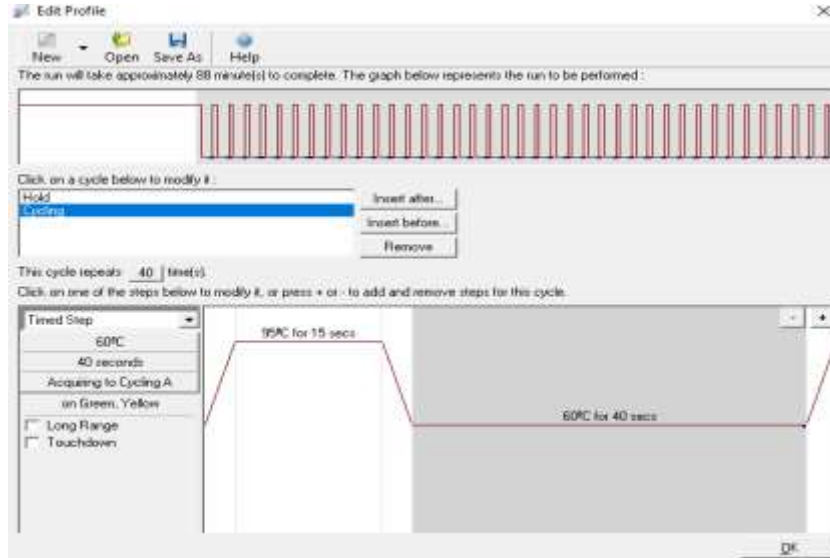
5.3.2 Rotor - Gene® Q

Cihaz yazılımı sürüm 2.0 ve üzerinde:

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, Reaksiyon Hacmi için 30 µl 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:

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Veri edinme
Tut	95°C	10 dakika	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	95°C	15 saniye	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım 40 döngü	60°C	40 saniye	A Döngüsünü Edinme Yeşilde/ Sarıda

6. Sağdaki panelde 60 °C sıcaklık ayarını seçin.
7. Veri toplama kanallarını eklemek için A Döngüsünü Edinme'yi seçin.
8. Kullanılabilir Kanallar alanından her bir rengi seçerek ve sağa bakan oku seçerek Yeşil ve Sarı Kanalların Kanal Edinme alanına eklendiğinden emin olun.



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

Noter Yemimli Mütercim
ADA GÜLETCAN ÖMURTAŞ



HİZMETLERİ
CERTIFIED
SERVICES

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :		Acquiring Channels :	
Name		Name	
Crimson	>	Green	
HRM	<	Yellow	
Orange	<<		
Red			

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 >> OK Don't Acquire Help

9. **TAMAM**'a 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**'i 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 ibraz olduğu
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylım.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEÇCAN BASMURTAK



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/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:

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
60	Tek	00:00:40	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.

5.3.4 Bio - Rad CFX96

Yazılım Sürümü 3.1

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

Adım	Sıcaklık	Süre
1	95°C	10 dk
2	95°C	15 sn
3	60°C	40 sn
4	+ Plaka Okunuşu 39 kez daha 2'ye GİT SON	

3. Numune Hacmini 30 µl 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 (Tamam)'a tıklayın.



7. Plaka düzenindeki ilk satırı (A1 - A10) seçin ve Numune Tipini Pozitif Kontrol olarak değiştirin.
8. Plaka düzeninde ikinci satırı (B1 - B10) seçin ve Numune Tipini NTC olarak değiştirin.
9. Plaka düzenindeki kuyuların geri kalanını (C1 - C10) seçin ve Numune Tipini Bilinmiyor olarak değiştirin.
10. Her satırı ayrı ayrı seçin (C satırından başlayarak) 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 ibraz ettiği
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğunu
onaylıyorum.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLCAYAN BATURAK