

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) veya EntroGen pureNA® Hüresiz DNA İzolasyon Kiti (kat. no. CFDNA -50) gibi bir ticari kit kullanımını öneriyoruz.

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, spektrofotometrik analiz (yani Nanodrop veya UV spektrofotometre) kullanarak konsantrasyonu ölçün ve 20 ng/µL'ye seyreltin. Konsantrasyon 20 ng/µL'nin altındaysa, reaksiyon kurulumu sırasında su hacmini ayarlayın. Bu analiz için gerekli genomik DNA yükü, test başına 100 ng DNA'dır (20 ng/reaksiyon).

Üreticinin protokolüne göre hüresiz DNA (cfDNA) izolasyon prosedürünü izleyin. Bir mL plazma 1 -100 ng cfDNA verecektir. Miktar tayini için yeterli miktara (yaklaşık 100 -20 ng) ulaşmak için cfDNA'yı 4 -5 mL plazmadan izole etmenizi öneririz. Absorbans ölçümü ile miktar tayini (örneğin, Nanodrop), verimi doğru bir şekilde belirlemek için yeterince hassas olmayabilir. CfDNA'yı ölçmek için Qubit™ dsDNA Yüksek Hassasiyet Testinin kullanılması şiddetle tavsiye edilir. cfDNA için ideal yük 3.5-15 ng/reaksiyon arasındadır.

FFPE bloklarından izole edilen DNA'nın ve plazmadan izole edilen hüresiz 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 optimal giriş DNA miktarını belirlemek için kullanılır.

5.2 Reaktif preparasyonu

- o Pozitif kontrol karışımını, 2X Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımını ve tüm primer/prob karışımlarını buz üzerinde eritin.
- o Kullanmadan önce tüpleri vorteksleyin ve döndürün.

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

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

Her 30 µL reaksiyona aşağıdaki hacimler girer:

Tablo 3. Tek bir BRAFX - RT64 reaksiyonu için reçete.

Bileşen	Hacim (µl)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	15
Astar/Prob Karışımı (E, K, D, R, M)	6
DNA örneği/PC*/NTC	9'a kadar
Moleküler dereceli su	30*** 'a kadar toplam reaksiyon hacmi

* Reaksiyon başına 1 µL PC kullanılmalıdır.

** Numune hacmi 1 µl ile 9 µl arasında olabilir.

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



Noter Yemimli Mütercan
ADA GÜLEYCAN ÖMÜRTAŞ

Her numune için beş reaksiyon ayarlanır (her mutasyon için bir tane). Tek bir çalışma ile analiz edilebilecek maksimum bilinmeyen numune sayısı, kullanılan enstrümana bağlı olarak değişir.

- Gerekirse, spektrofotometrik analizden (yani Nanodrop veya UV spektrofotometre) ve/veya EntroGen'in Dahili Kalite Kontrol Testinden (kat. no. IQCA - RT50).
 - FFPE'den izole edilen DNA yaklaşık 20 ng/reaksiyon gerektirir
 - cfDNA yaklaşık 3,5 -15 ng/reaksiyon gerektirir.
- Aşağıdaki tabloya göre Mutasyon Algılama Reaksiyonu Karışımı ve su ile her bir Astar/Prob Karışımı için bir sperat master karışımı hazırlayın (hacimler pipetleme hatasını hesaba katmak için % 5 fazlalık ile ayarlanır):

Tablo 4. N numune sayısı kullanılarak ana karışım için hesaplamalar.

Bileşenler	Hacim / oyuk (µl)	Hacim/Ana Karışım (µL)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	15	15 x n x 1.05
Astar/Prob Karışımı (E, K, D, R, M)	6	6 x n x 1.05
DNA numunesi/PC*/NTC	9'a kadar	V _{DNA}
Moleküler dereceli su	30*** 'a kadar toplam reaksiyon hacmi	(30 – V _{DNA}) x n x 1.05

* Reaksiyon başına 1 µL PC kullanılmalıdır. PC, suda 1: V_{DNA} oranında seyreltilir.

**Numune hacmi 1 µl ile 9 µl arasında olabilir.

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

V_{DNA} = Kullanılması amaçlanan DNA numunesinin hacmi (µL)

NTC, DNA numune seyrelticiye veya suya eşdeğer olmalıdır.

- Ana karışımı vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında döndürün.
- Şekil 1** 'de gösterildiği gibi, kuyu başına ana karışımdan (30 – V DNA) µL (21 -29 µL arasında olmalıdır) dağıtın.
- Şekil 1** 'e göre her bir kuyucuğa V DNA µL DNA örneği ekleyin.
- Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
- Plakayı optik sızdırmazlık filmi (ABI/Roche plakaları) veya kapaklarla (Rotor - Gen tüpleri için) kapatın.
- Kuyuların dibinde kabarcık olmadığından emin olmak için plakaları ~1.000 rpm'de döndürün.

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

Şekil 1. 14 numuneyi analiz eden tek bir deney için önerilen plaka kurulumu. PC (pozitif kontrol) karışımı; NTC (şablon kontrolü yok, su veya numune seyreltici); S1 -14 (bilinmeyen numuneler).

5.3 Cihaz kurulumu



Uygulanan Biosystems® 7500/7500 Fast

Cihaz yazılımı sürüm 2.0 ve üzerinde:

1. SDS programını çalıştırın, ardından Dosya>Yeni Deneme>Gelişmiş Kurulum'a gidin.

Deney Özellikleri ekranında

2. Deneyi adlandırın, ardından 7500 Fast'i (veya cihazınızda Hızlı mod yoksa 7500 'ü) seçin.
3. Deney tipi için Karşılaştırmalı Ct ($\Delta\Delta$ Ct) ve deney tipi için TaqMan® Reaktiflerini seçin reaktif türü.

Kalıp Kurulumu ekranında

4. Hedef Tanımlama alanında, Hedef 1 'in adını FAM olarak değiştirin. Muhabirin FAM olarak ayarlandığından ve Quencher'in Yok veya NFQ - MGB olarak ayarlandığından emin olun.
5. İkinci bir dedektör eklemek ve IC olarak adlandırmak için Yeni Hedef Ekle'ye tıklayın. Bu dedektörün Raportörünü VIC olarak değiştirin ve SÖNDÜRÜCÜYÜ Yok veya NFQ - MGB olarak ayarlayın.
6. Numuneleri Tanımla alanına, pozitif kontrol karışımı için PC, şablon kontrolü (su) için NTC ve numune adlarını ekleyin.
7. Numuneleri ve dedektörleri yukarıda önerildiği gibi plaka düzenine eklemek için Hedefleri ve Numuneleri Ata penceresine gidin. Her iki dedektör de numune, PC veya NTC reaksiyonu içeren her kuyuya eklenmelidir.
8. Pasif Referans Boyayı "YOK" olarak ayarlayın.

alıştırma Yöntemi ekranında

9. Aşağıdaki parametrelerle yeni bir alıştırma yöntemi oluşturun.

Tablo 5. Uygulanan Biosystems® 7500/7500 Fast Instruments için parametreleri çalıştırın.

Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
60°C	30 sn		Açık

10. Reaksiyon hacminin 30 μ L'ye ayarlandığından ve Veri Toplama'nın 60°C adımıında açıldığından emin olun.
11. Reaksiyon plakasını cihaza yükleyin ÇALIŞTIRMAYI BAŞLAT 'a tıklayın.

QuantStudio 5™

Cihaz yazılımı sürüm 2.0 ve üzerinde:

1. SDS programını çalıştırın, ardından Dosya>Yeni Deney>Deney Kurulumu'na gidin
2. Deneyi adlandırın, ardından QuantStudio 5™ Sistemini seçin. Blok tipini seçin (96 - çukur 0.2 mL Blok).
3. Deney tipi için Deney tipi – Karşılaştırmalı Ct ($\Delta\Delta$ Ct) seçin.
4. Kimya için TaqMan® ve çalışma modu için Fast'i seçin.
5. Yöntem ekranına gidin ve aşağıdaki parametreleri girin:

Tablo 6. QuantStudio 5™ Cihazları için parametreleri çalıştırın.

Hacim	30 μ L	Kapsam	105°C
Sıcaklık	Süre	Döngüler	Veri toplama
95°C	10 dk	X1	Kapalı
95°C	15 sn	X40	Kapalı
60°C	30 sn		Açık



Noter Yemimli Mürtercan
ADA GÜLEYCAN OMURTAK



6. Plaka ekranına gidin ve Plaka Öznitelikleri alanında Pasif Referans Boyanın "YOK" olarak ayarlanmasını sağlayın.
7. 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.
8. 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.
9. Numuneler alanına pozitif kontrol karışımı için PC, şablon kontrolü (su) için NTC ve numune adlarını ekleyin.
10. Yukarıda önerildiği gibi plaka düzenine Hedefler ve Numuneler atayın. Her iki dedektör de numune, PC veya NTC reaksiyonu içeren her kuyuya eklenmelidir.
11. Reaksiyon hacminin 30 µL'ye ayarlandığından ve Veri Toplama'nın 60°C adımı açıldığından emin olun.
12. Reaksiyon plakasını cihaza yükleyin ÇALIŞTIRMAYI BAŞLAT 'a tıklayın.

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.
3. Reaksiyon Hacmi için 30 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. **Döngü'ye** tıklayın, Bu döngü 40 kez tekrarlanır girin, ardından sağdaki paneldeki her adıma tıklayarak aşağıdaki Zamanlı Adım parametrelerini girin:

Tablo 7. Rotor - Gene Q Enstrümanları için parametreleri çalıştırın.

Bisiklete binmek	Sıcaklık	Süre	Koleksiyon
Tut	95°C	10 dakika	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım	95°C	15 saniye	Edinilmiyor
Zamanlanmış Adım (40 döngü)	60°C	30 saniye	Kanalların Edinilmesi: Yeşil ve Sarı

7. Sağdaki panelde 60°C sıcaklık ayarını seçin.
8. Veri toplama kanallarını eklemek için **A Döngüsünün Edinilmesi'ni** seçin.



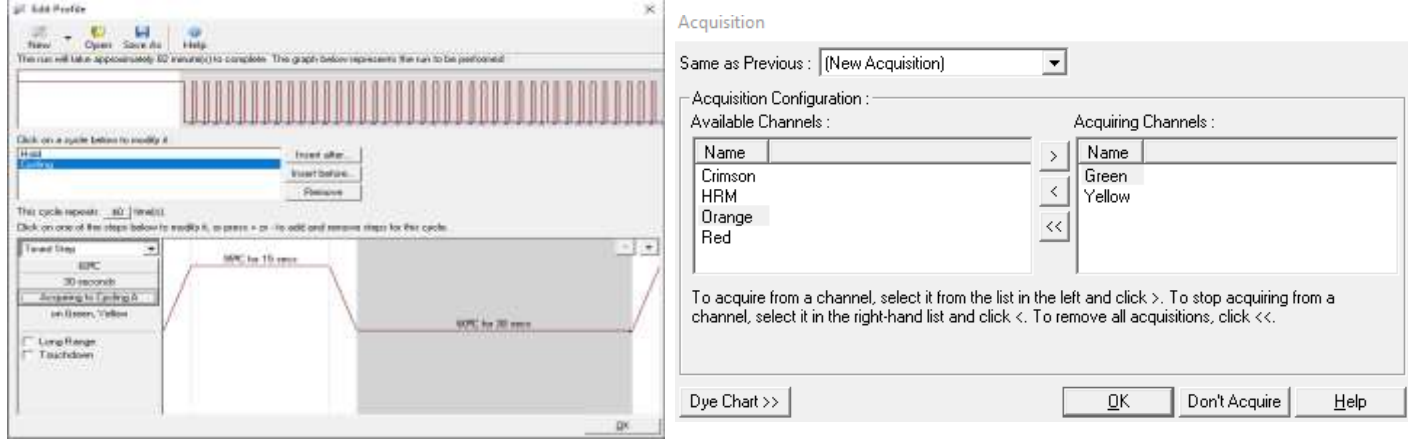
İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
tercüme edilen iş bu tercümenin ibracı vakkat
İngilizce / Türkçe astına uygunluğuna
onaylanmıştır.

Noter Yeminli Mütercan
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRTEK



NOTER YEMİNLİ TERÇÜME HİZMETLERİ
SWORN TRANSLATION SERVICES

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



10. **TAMAMı** 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.



İngilizce'den Türkçeye / Türkçeden İngilizce'ye
terçüme edilen iş bu terçümenin ibracı vakkat
İngilizce / Türkçe astına uygunluğuna
onaylanmıştır.

Noter Yemimli Mürrecan
ADA GÜLEVCAN ÖMÜRTEK

19. Şerit borularını rotora yükleyin.
20. **Çalıştırmayı Başlat'** seçin, ardından çalıştırmayı başlatmak için Başlat düğmesine tıklayın.
21. Not: Çalıştırma başladığında **Numuneleri Düzenle** iletişim kutusu açılır. Numune bilgileri, cihaz çalışırken veya çalışma tamamlandıktan sonra girilebilir.

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	00:00:30	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.



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

Noter Yeminli Mütercan
ADA GÜLEYCAN OMURTAK