

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 kullanımını 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 miktar tayini, numune başına toplam 120 - 360 ng DNA gerektirir (10 -30 ng/reaksiyon). DNA izolasyonundan sonra, florometrik analiz (örn. Qubit) kullanarak konsantrasyonu ölçün ve 30 ng/µl'nin altında, ancak 1,1 ng/µl'den az olmayacak şekilde seyreltin.

Not: FFPE bloklarından izole edilen DNA'nın kalitesi parçalanmaya bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, spektrofotometrik veya florometrik analiz kullanılarak ölçülen DNA konsantrasyonu, analiz için mevcut amplifiye edilebilir DNA miktarını yansıtmamaktadır. Her laboratuvar, iç kontrol için Veri Analizi ve Sonuç Yorumlama Bölümünde tanımlanan optimal VIC Ct aralığı ile DNA konsantrasyonunu ilişkilendirerek optimal giriş DNA konsantrasyonunu değerlendirmelidir. EntroGen'in Dahili Kalite Kontrol Testini (kat. No. IQCA - RT50), testi çalıştırmadan önce optimum girdi DNA miktarını belirlemek için kullanılır.

5.2 Reaktif preparasyonu

- Primer/prob karışım tüplerini, pozitif kontrol karışımlarını ve 2X mutasyon tespit reaksiyon karışımlarını buz üzerinde eritin.
- Kullanmadan önce tüpleri vorteksleyin ve döndürün.

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

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

Bileşenler	Hacim (µl)
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı 1 (2X)	15
Astar Karışımı	6
DNA numunesi (1.5-15 ng)	9'a kadar
Nükleaz içermeyen su	30** a kadar toplam reaksiyon hacmi

*Numune hacmi 1 µl ile 9 µl arasında olabilir.

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

KRAS için

Her hasta numunesi için on iki reaksiyon ayarlanır. Tek bir 96 oyuklu PCR plakası, en fazla 6 hasta numunesini, bir pozitif kontrol karışımını ve bir şablon kontrolünü barındırabilir.

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

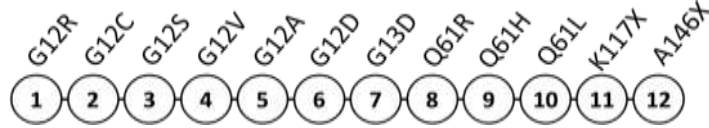
Reaktifler	Nihai Kons.	Numune başına hacim
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	1X	189 µl
10 -30 ng/µl'de pozitif kontrol karışımı, Su veya DNA	10 -30 ng/rxn	12,6 µl*
Nükleaz içermeyen su	UYGULANMADI	100,8 µl*

* Bu tablodaki hacimler reaksiyon başına 1 µl numune ve 8 µl su baz alınarak hesaplanmıştır. Başka bir numune hacmi kullanılıyorsa, su buna göre ayarlanmalıdır.

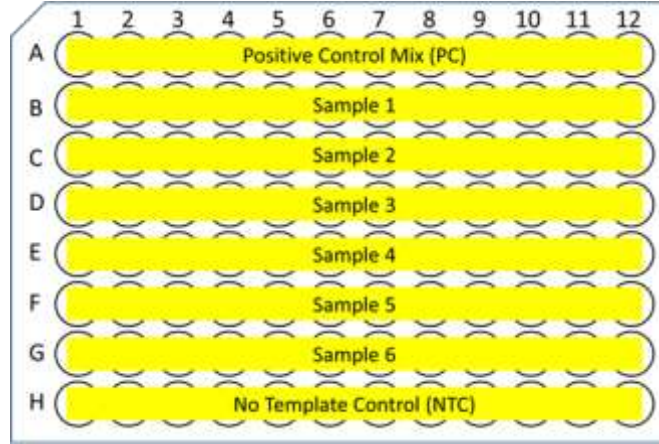
2. Vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında bir pikofüjde birkaç saniye santrifüjleyin.

3. Oyuğ başına 24 µl ana karışımı tek bir sıraya dağıtın (96 oyuklu bir plakadaki her sıra tek bir hastanın şablonunu temsil eder).
4. Aşağıdaki Şekil 1 'e göre her bir astar/prob karışımından ilgili oyuga 6 µl ekleyin.
5. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Plakayı optik sızdırmazlık filmi ile kapatın.

A. Boru Tanımı



B. 96 - Oyuğ Düzeni



Şekil 1: KRAS mutasyonları için bilinmeyen örnekleri analiz eden tek bir deney için önerilen oyuk düzeni.



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

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRZAK



BRAF için (KRAS'a refleks)

Her hasta numunesi için bir reaksiyon ayarlanır (KRAS için doğal tip). Tek bir 96 oyuklu PCR plakası, 94 'e kadar hasta numunesi, bir pozitif kontrol karışımı ve bir şablon kontrolü barındırabilir.

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

Reaktifler	Nihai Kons.	N numuneleri başına hacim
Mutasyon Tespit Reaksiyon Karışımı (2X)	1X	15 x N x 1.05 µl
BRAF Astar/Prob karışımı	1X	6 x N x 1.05 µl
Nükleaz içermeyen su	YOK	8 x N x 1.05 µl

N= taranacak numune sayısı (PC ve NTC dahil)

2. Vorteksleyerek karıştırın ve oda sıcaklığında birkaç saniye santrifüjleyin.
3. Kuyu başına 29 µl ana karışım dağıtın.
4. Kuyu başına 1 µl (10 -30 ng) numune DNA'sı, 1 µl PC veya su (NTC için) ekleyin.
5. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Plakayı optik sızdırmazlık filmi ile kapatın.

Plakayı termal döngüleyiciye yerleştirin ve aşağıdaki programı çalıştırın:

Sıcaklık	Süre	Döngüler
95°C	10 dakika	X1
95°C	15 saniye	X40
60°C	60 saniye	



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

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRZAK

5.3 Cihaz Kurulumu

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 cihazı seçin (7500 veya 7500 Hızlı).
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.
4. Sol gezinti menüsünde **Plaka Kurulumu**'na tıklayın.

Hedefleri ve Örnekleri Tanımla sekmesinin altında

5. **Yeni Hedef Ekle**'ye tıklayın ve aşağıdakileri ayarlayın:
 - i. **Hedef 1**, Raportör: **FAM**, Söndürücü: **NFQ - MGB** veya **Yok**,
 - ii. **Hedef 2**, Raportör: **VIC**, Söndürücü: **NFQ - MGB** veya **Yok** için **Hedef Adını** IC olarak değiştirin.
 - iii. Pozitif kontrol karışımı için **PC**, şablon kontrolü (su) için **NTC** ve bilinmeyen numune adlarını/numaralarını ekleyin.

Hedefleri ve Numuneleri Ata sekmesi altında

6. **Görünüm Plakası Düzeni** panelindeki tüm oyukları seçin ve sol üst köşedeki seçilen oyuk paneline hedef(ler) ata bölümündeki **KRBR** ve **IC** kutularını işaretleyerek seçilen kutulara hedefler atayın.
7. Pasif Referans Boyayı "**YOK**" olarak ayarlayın.
8. Tüm A Satırı oyuklarına **PC** atayın.
9. Tüm Row H kuyularına **NTC** atayın.
10. B'den G'ye kadar olan satırlara bilinmeyen örnekler atayın (satır başına bir örnek).
11. Aşağıda listelenen bisiklet parametrelerini ayarlamak için sol gezinme menüsünde **Yöntemi Çalıştır'a** tıklayın:

Sıcaklık	Süre	Döngüler
95°C	10 dakika	X1
95°C	15 saniye	X40
60°C	60 saniye	

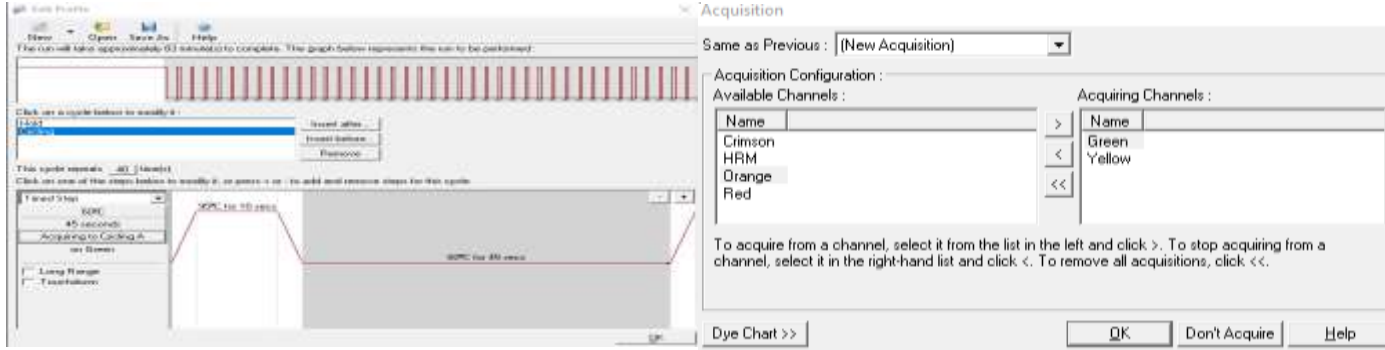
12. 60°C tavlama/uzatma adımı için **Toplanan Verilerin** seçildiğinden emin olun.
13. **Kuyu Başına Reaksiyon Hacmi** alanına 30 µl girin.
14. Çalıştır sekmesinin sağ üst köşesindeki yeşil **ÇALIŞTIRMAYI BAŞLAT** düğmesine tıklayarak Cihaz Çalıştırmasını başlatın.

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 Oyuk Rotorunu** seçin, Kitleleme Halkası Ekli kutusunu işaretleyin.
3. Reaksiyon Hacmi için 30 µl girin ve **İleri**'ye tıklayın.
4. **Profili Düzenle**'yi seçin.
5. **Bekletme** 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	60°C	60 saniye	A Döngüsünü Edinme Yeşilde / Sarıda

7. Sağdaki panelde 60 °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**'a 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**'i seçin.



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

Noter Yemini Mürerem
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRZAK

16. 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.

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.

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

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
60	Tek	00:00:60	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 amacı
İngilizce / Türkçe aslına uygunluğuna
onaylanmıştır.

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRZAK

Bio - Rad CFX96 (Yazılım sürümü 3.1 ve üstü)

1. Başlangıç Sihirbazı'nda **Yeni Deneme Oluştur'u** seçin ve açılır listede CFX96 'nın seçili olduğundan emin olun. **OK** butonuna tıklayın.
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 sec
3	60°C	60 sn
	+ Plaka Okunuşu	
4	39 kez daha 2'ye git	
	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** butonuna tıklayın.
7. Plaka düzenindeki ilk satırı (A1 - A12) seçin ve Numune Tipini Pozitif Kontrol olarak değiştirin.
8. Plaka düzenindeki son satırı (H1 - H12) seçin ve Numune Tipini NTC olarak değiştirin.
9. Plaka düzenindeki kuyuların geri kalanını (B1 - G12) seçin ve Numune Tipini Bilinmiyor olarak değiştirin.
10. Her satırı ayrı ayrı seçin (B 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 (örn. 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.



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

Noter Yeminli Mütercim
ADA GÜLEYSAN ÖMÜRZAK