

fluorion[®]

GMO QLP 1.0

Real-Time PCR Kiti

Fluorion[®] Deteksiyon Sistemi ile
Kullanım İçin

KULLANIM KILAVUZU

Doküman Kodu: PF050v001
Onaylanma Tarihi: Ocak 2010

iontek[®]

ÖRNEK

İçindekiler

	<u>Sayfa</u>
1. Kit İçeriği	5
2. Saklama	5
3. Gerekli Materyal ve Cihazlar	5
4. Önemli Notlar ve Güvenlikle İlgili Uyarılar	6
5. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar	6
6. Yöntemin Esasları	7
7. Ürün Tanımı	8
8. Kullanım Kısıtlamaları	8
9. Test Prosedürü	9
9.1. DNA İzolasyonu	9
9.2. Kit Bileşenlerinin Özellikleri	9
9.2.1. Probe PCR Mix	9
9.2.2. Deteksiyon Mix 1	10
9.2.3. Deteksiyon Mix 2	10
9.2.4. Pozitif Kontrol 1	10
9.3. PCR'ın Hazırlanması	10
9.4. Fluorion Deteksiyon Sistemi'nin Programlanması	11
10. Veri Analizi	15
11. Sorun Giderme	17
12. Referanslar	18
13. Semboller	19
14. İletişim Bilgileri	19

1. KİT İÇERİĞİ

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti, aşağıdaki kalitatif analiz bileşenlerinden oluşur.

TÜP NO.	BİLEŞEN	100 TEST	50 TEST	25 TEST
1.	dH ₂ O	(1000 µl)	(1000 µl)	(1000 µl)
2a.	Prob PCR Mix*	(2800 µl)	(1400 µl)	(700 µl)
4a.	Deteksiyon Mix1	(448 µl)	(224 µl)	(112 µl)
4b.	Deteksiyon Mix2	(448 µl)	(224 µl)	(112 µl)
6a.	Pozitif Kontrol 1	(100 µl)	(50 µl)	(25 µl)

*Fluorion Kitlerine Qiagen Quantitect ürünleri entegre edilmiştir.

2. SAKLAMA

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti bileşenlerinin tümü -20°C'de saklanmalıdır. Kitin hassasiyetini azaltabileceği için bileşenleri sık sık dondurup çözdürmekten (3 kereden fazla) kaçınılmalıdır. Eğer bileşenler küçük miktarlarda kullanılacaklarsa, küçük bölümler halinde dondurularak saklanmalıdır.

Bileşenler PCR hazırlanırken oda sıcaklığında 10-15 dakikadan fazla bırakılmamalıdır. Detection mix bileşenleri ışığa 1-2 dakikadan fazla maruz bırakılmamalıdır.

Bileşenler uygun koşullarda saklanmaları halinde, etiketlerin üzerindeki son kullanma tarihlerine dek stabilitelerini korurlar.

3. GEREKLİ MATERYAL VE CİHAZLAR

- Fluorion Detection System (İontek)
- 96-Kuyucuklu 0.2 ml İnce Çeperli PCR Plate'leri ve Optik Kalitede Yapıştırma Teybi, veya 0.2 ml İnce Çeperli PCR tüpleri ya da 8'li stripler
- DNA izolasyon Kiti
- Derin Dondurucu (-20°C)
- Isı Bloğu (56°C)
- Vortex Karıştırıcı
- 2 ml. Mikrosantrifüj Tüpleri için Rotoru Bulunan Tezgah Üstü Santrifüj
- Ayarlanabilir Mikropipetler
- Steril, Filtreli Mikropipet Uçları
- Steril 1.5 veya 2 ml. mikrosantrifüj tüpleri
- Atılabilir Eldiven

4. ÖNEMLİ NOTLAR VE GÜVENLİKLE İLGİLİ UYARILAR

Dikkatli:

- Ürün kuru buzda teslim edilmelidir. Teslim alırken ambalajda kuru buz bulunup bulunmadığını kontrol ediniz ve size kuru buzda ulaştırılmayan ürünleri kullanmayınız.
- Ürünü teslim alırken kutu ve tüp etiketlerinin üzerindeki son kullanma tarihlerini kontrol ediniz. Son kullanma tarihi geçmiş ürün veya bileşenleri kullanmayınız.

Aşağıdaki noktalara dikkat edilmelidir:

- Steril, filtrelı mikropipet uçları ve steril mikrosantrifüj tüpleri kullanılmalıdır.
- Çalışmaya başlanmadan önce tüm bileşenler oda sıcaklığına getirilmelidir. Kullanılmadan önce içeriklerinin homojen hale gelmesini sağlamak için, tüm bileşenler çözdürüldükten sonra karıştırılmalı ve kısaca santrifüjlenmelidir.
- Kit bileşenleri reaksiyon hazırlanana dek buz ya da soğutucu blok üzerinde tutulmalı, ve çabucak -20°C'ye kaldırılmalıdır.
- PCR ve nükleik asit izolasyonu farklı kompartmanlarda/yerlerde/bölümlerde yapılmalıdır. Örnekler, kit bileşenleriyle temas etmemeleri için ayrı bir yerde muhafaza edilmelidir.

Aşağıdaki güvenlik talimatlarına uyulmalıdır:

- Klinik örneklerle çalışılırken çok dikkatli olunmalıdır: Patojenlerle fiziksel temastan kaçınılmalıdır; laboratuvar önlüğü ve eldiven giyilmeli, çalışma alanında yeme ve içmeye izin verilmemeli, görevli olmayan kimselerin çalışma alanına girişi engellenmelidir.
- Nükleik asit izolasyonu aşamasında oluşan patojenik atıklar, tıbbi atığa atılmalı ve güvenli bir biçimde uzaklaştırılmalıdır.
- Sağlığa ilişkin riskleri öğrenmek için patojenle ilgili bilgi edinilmelidir.

5. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR

Son 15 yılda gıda biyoteknolojisi alanındaki gelişmelere paralel olarak tarım ürünleri ve gıda üretiminde kullanılan organizmaların genetik yapısı üzerinde değişiklikler yapılmaya başlanmıştır. Bu değişiklikler sayesinde ürünler herbisitler, pestisitler, böcekler ve diğer çevresel faktörlere karşı dirençli hale getirilebiliyor. Buna

bağlı olarak da tarım sektöründe böceklerden kaynaklanan kayıpların önüne geçilirken daha az herbisit ve pestisit kullanımı sayesinde ekonomik açıdan ciddi kazançlar sağlanabilmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) sayısı arttıkça gıda ürünlerinde bu organizmaların saptanabilmesi için uygun moleküler yöntemler ön plana çıkmaktadır. GDO tarama testlerinin temelini promotorlar, transkripsiyon terminatörleri ya da direnç genleri gibi markörlerin saptanması oluşturmaktadır. Genetiği değiştirilmiş bitkilerin çoğunluğu Karnabahar Mozaik Virüsünün (CaMV) 35S promotorunu ve Agrobacterium tumefaciens'in nopaline synthase (NOS) genini taşımaktadır. Mevcut GDO'ların %95'inden fazlası bu markörlerden en az birine sahiptir. Bu markörler gen modifikasyonu işleminin bir sonucu olarak GDO'lara aktarılırken GDO içermeyen bitkilerde bulunmamaktadır.

6. YÖNTEMİN ESASLARI

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti real-time PCR esasına dayanır. Hedef dizi oligonükleotit problemler üzerine yerleştirilmiş floresan boyalar aracılığıyla saptanır. Test, PCR'ın primer uzatma (extension) aşaması sırasında, çift işaretli bir floresan probu parçalamak için Taq Polimeraz'ın 5' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanır. Prob, 5' ucundan floresan bir röportör molekül ile, 3' ucundan ise röportörü baskılayan ve "quencher" olarak adlandırılan başka bir floresan molekül ile işaretlenmiştir. Röportör, iki florofor birbirlerine yakınlarken ışıkla uyarıldığında, floresan sinyal yaymaz. PCR'ın primer uzatma (extension) aşaması sırasında, Taq Polimeraz DNA kalıbına bağlı bulunan proba karşılaşıp onu parçalar. Röportör, quencher'in baskılayıcı etkisinden kurtulur ve floresan sinyal oluşturur. Reaksiyonun her döngüsünde, oluşan PCR ürünü floresans düzeyinin artışı aracılığıyla, hassas bir biçimde saptanır. Röportör tarafından yayılan floresans PCR ürünü biriktikçe artar; sinyalin arka plan seviyesinin üzerine çıktığı ve ayırtedilebilir hale geldiği noktaya eşik döngüsü (threshold cycle; C_T) adı verilir.

Geleneksel PCR'ın aksine, real-time PCR jel elektroforezi gibi ek analiz yöntemlerine duyulan ihtiyacı ortadan kaldırır ve kontaminasyon riskini minimize eder.

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti örnekteki GDO DNA'sını çoğaltmak için multipleks PCR'dan yararlanır. GDO DNA amplifikasyonunun oluşturduğu floresan sinyal 5' ucundan FAM'la işaretlenmiş bir prob ile, FAM filtre çifti kullanılarak saptanır. DNA izolasyon verimini kontrol etmek ve referans için bitkiye özgü bir bölgenin amplifikasyonu sonucu oluşan floresan sinyal ise, 5' ucundan farklı bir röportör molekülle işaretlenmiş ikinci bir proba Cy5 kanalından görüntülenir.

7. ÜRÜN TANIMI

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti GDO'larda bulunan P35S ve NOS markörlerinin saptanması için kullanılır. P35S ve NOS 2 ayrı reaksiyonda analiz edilir. Herbir reaksiyonda P35S ve NOS FAM floroforuyla saptanırken bitkiye özgü referans bölge Cy5 floroforuyla saptanır.

8. KULLANIM KISITLAMALARI

- Bu ürün, bu kullanım kılavuzu uyarınca kullanılmalıdır.
- Bu ürün özel olarak real-time pcr prosedürleri uygulama ve analiz konusunda eğitim almış personel tarafından kullanılmalıdır .

9. TEST PROSEDÜRÜ

9.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için bitkiden ya da gıdadan DNA izolasyonu yapabilen kitler kullanılmalı ve izolasyon bu kitin üreticisinin talimatları uyarınca yapılmalıdır. Kullanılan materyale ya da kite göre elde edilen DNA miktarı ve kalitesinde farklılıklar olabilmektedir. Bu farklılıklar Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kitinin çalışmasını olumsuz etkileyebilir.

9.2. Kit Bileşenlerinin Özellikleri

9.2.1. Probe PCR Mix

HotStarTaq DNA Polimerazı: HotStarTaq DNA Polimerazı *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş, E.Coli'ye klonlanmış 94 kDa'luk rekombinant DNA polimerazın modifiye edilmiş bir formudur. Enzim inaktif bir formda verilir ve 95 °C'de 15 dakikalık bir inkübasyon sonrası aktif hale gelir. Bu özelliği sayesinde hatalı bağlanan primerlerin ya da primer-dimerlerin önüne geçilir ve daha yüksek PCR spesifitesi ve kantitasyon hassasiyeti sağlanır.

QuantiTect Probe PCR Tamponu: Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgCl_2 içerir, 20°C'de pH 8.7 dir.

dNTP Karışımı: Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP ve dTTP/dUTP içerir.

9.2.2. Deteksiyon Mix 1

Deteksiyon Mix 1, NOS genine ve bitkiye özgü forward ve reverse primerler ve iki ucu işaretli problemler içerir.

9.2.3. Deteksiyon Mix 2

Deteksiyon Mix 2, P35S genine ve bitkiye özgü forward ve reverse primerler ve iki ucu işaretli problemler içerir.

9.2.4. Pozitif Kontrol 1

Pozitif Kontrol 1 Round-up Ready Soya DNA'sı içermektedir. Reaksiyon verimini test etmek amacıyla PCR'a dahil edilebilir. Pozitif kontrolün eşik döngü değeri izolasyon verimine göre değişiklik gösterebilir.

9.3. PCR'ın Hazırlanması

Pozitif ve negatif kontrolün duplake olarak, örneklerin ise triplike olarak çalışılması önerilir. Tüm kit bileşenlerini kullanmadan önce çözündürün. PCR'ı hazırlamak için aşağıdaki tablodan yararlanın. Tablodaki değerler yalnızca bir reaksiyon için verilmiştir, master mix için gereken miktarları bulmak için bu değerleri örnek sayısı ile çarpın.

NOS Reaksiyonu

Probe PCR Mix	12.5 µl
Detection Mix 1	4.0 µl
dH2O	5.5 µl
Örnek DNA	
Negatif/Pozitif Kontrol	3.0 µl
Toplam Hacim	25.0 µl

P35S Reaksiyonu

Probe PCR Mix	12.5 µl
Detection Mix 2	4.0 µl
dH2O	5.5 µl
Örnek DNA	
Negatif/Pozitif Kontrol	3.0 µl
Toplam Hacim	25.0 µl

96-kuyucuklu plate'in kuyucuklarına ya da 0,2 µl'lik PCR tüplerine 22 µl master mix pipetleyin ve 3 µl DNA (örnek/pozitif kontrol/negatif kontrol) ekleyin. Plate'i ya da PCR tüplerini sıkıca kapayın. Her kuyucuktaki solüsyonun kuyucuğun dibinde olduğundan emin olun. Gerekliyse santrifüjleyin.

9.4. Fluorion Deteksiyon Sistemi'nin Programlanması

Fluorion GMO QLP 1.0 Real-Time PCR Kiti termal protokolü, HotStarTaq DNA Polimerazın aktivasyonu için bir ilk denatürasyon, iki aşamalı amplifikasyon döngüleri ve son bir inkübasyondan oluşur (Fig. 1). Real-Time PCR verileri, amplifikasyon döngüsünün ikinci aşamasında toplanır.

İlk denatürasyon	95°C	15:00 min.	} 50 döngü
Amplifikasyon	95°C	00:40 min.	
Veri Toplama	58°C	00:45 min.	
Sonsuz Inkübasyon	22°C	∞	

Fluorion Deteksiyon Sistemi, kurulumu ve kalibrasyonu yapılarak kullanıcıya teslim edilir.

Sistem, Fluorion Kitleri ile Real-Time PCR başlatılmadan yarım saat önce açılarak çalıştırılmalıdır. Sistem bileşenleri arasındaki bağlantının sorunsuz biçimde kurulabilmesi için önce termal döngü cihazı ve optik modül, sonra bilgisayar ve yazılım açılmalıdır.

Fluorion Kitleri kullanılarak bir Real-Time PCR reaksiyonu başlatılmadan önce şu aşamaların tamamlanmış olması gerekmektedir:

- Kullanılacak filtre çiftlerinin seçilmesi (FAM ve Cy5)
- Örnek, standart, pozitif kontrol, negatif kontrol içeren kuyucukların tanımlanması, standartlara değer verilmesi,
- Doğru termal protokolün seçilmesi.

Bu aşamaların nasıl yapılması gerektiği aşağıda açıklanmıştır:

FDS yazılım ana menüsünün Dosya seçeneğinden Yeni tıklanır. Açılan pencerede "Yeni Deney Dosyası Oluştur" seçeneği işaretlenerek "Onayla" tıklanır. Otomatik olarak açılan "Kanal Seçimi" penceresinden Kanal 1 ve Kanal 3 aynı anda seçilir ve "Onayla" tıklanır (Figür 1). Standartlar, negatif kontroller ve örnekler Modül Düzenleme ekranında seçilen kuyucuğuna tıklanması ve uygun tipin seçilmesi yoluyla tanımlanır (Standartlar için viral yük miktarı da yazılmalıdır) (Figür 2). Termal Protokolü seçmek için Gen Amplifikasyonu ekranına geçilir. Deney program bölümünün altındaki "Aç" butonu tıklanarak tanımlı termal protokoller arasından uygun protokol seçilir. Ekranda seçilen protokolün sıcaklık döngüleri grafik halinde belirir. "Başla" butonuna tıklanarak deney başlatılır (Figür 3).

c)

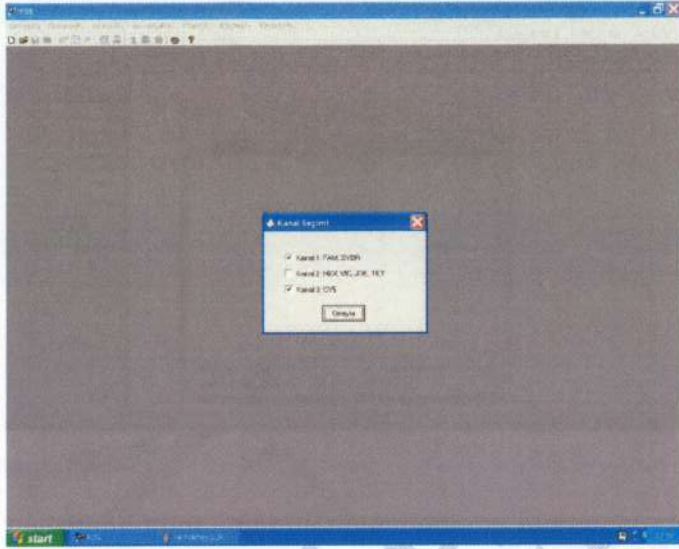


Fig. 1: Kit Çalışmasının Başlatılması; a), b) Yeni deney dosyasının Oluşturulması, c): Kanal Seçimi

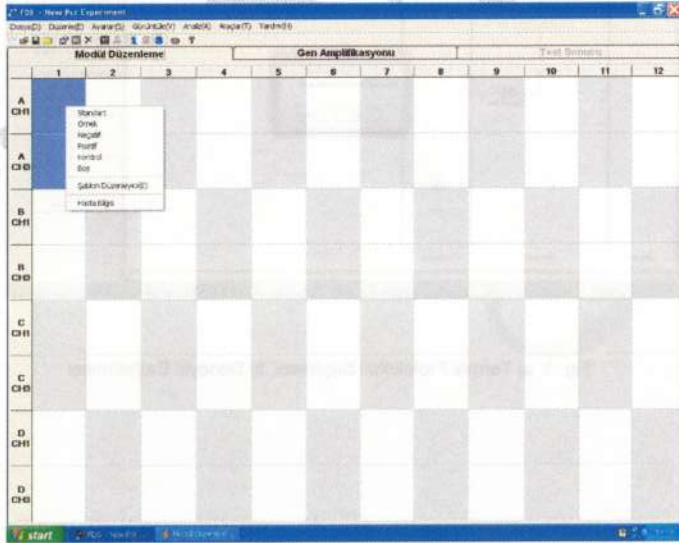
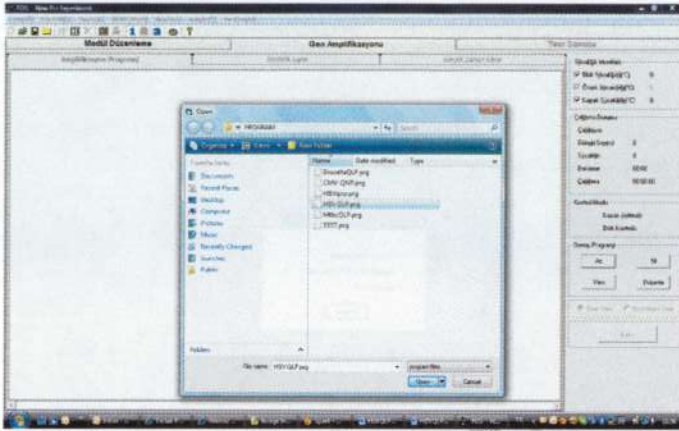


Fig. 2: Örneklerin Tanımlanması.

a)



b)

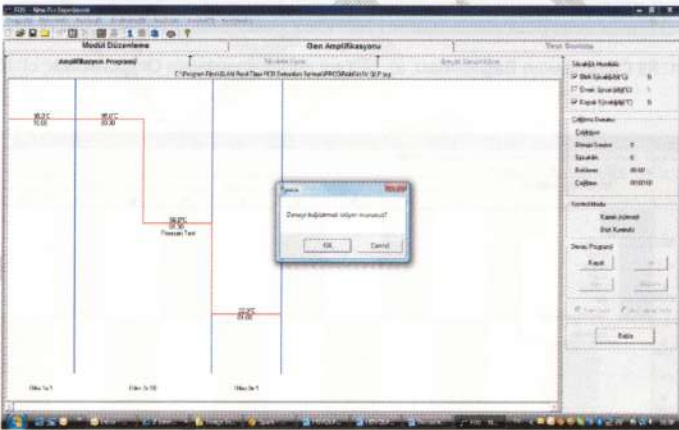


Fig. 3: a) Termal Protokolün Seçilmesi, b) Deneyin Başlatılması

10. VERİ ANALİZİ

Termal protokol sona erince, Fluorion Deteksiyon Sistemi yazılımı baseline döngülerini ve eşik otomatik olarak hesaplar. Baseline döngüleri her bir örnek için ayrı ayrı belirlenir. Eşik, tüm örneklerin baseline döngülerinin üzerindeki standart sapmasının 10 katı olarak hesaplanır.

Amplifikasyon örnekleri Fig. 4'te verilmiştir.

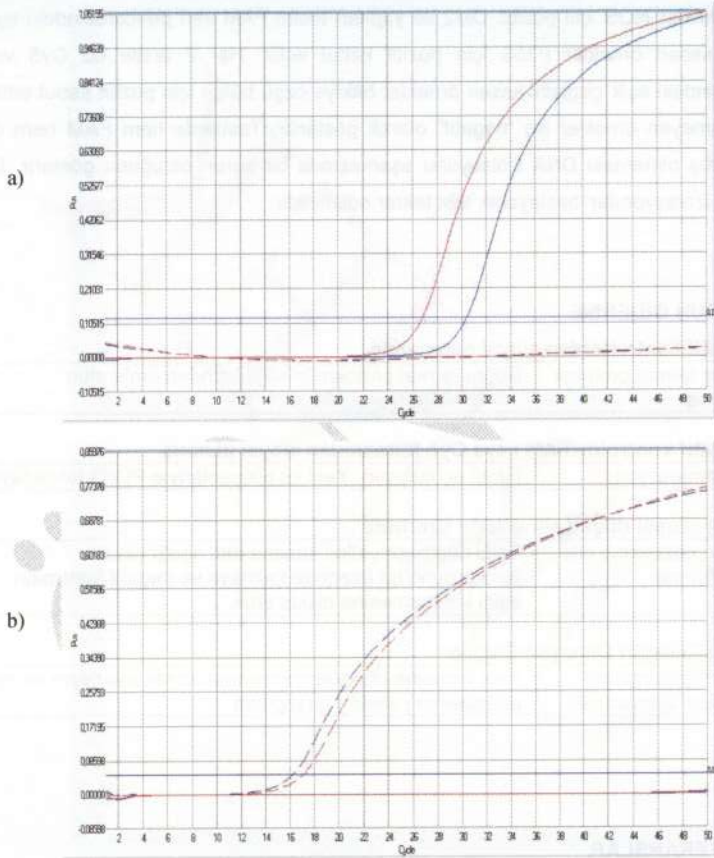


Fig. 4: Fluorion Deteksiyon Sistemi veri analizi; a) FAM filtresinden alınan sinyal, b) Cy5 filtresinden alınan sinyal.

Otomatik analiz özelliklerinden bazıları ya da tümü elle değiştirilebilir. Baseline döngüleri ve eşik pozisyonuna yeni değerler verilebilir ve analiz bu yeni değerlere göre yapılabilir. Düşük pozitif örnekleri saptayabilmek için eşik olabildiğince aşağı çekilebilir. Eşik çizgisini arka planın (background) üzerinde bırakmaya dikkat edilmelidir.

Not: Sonuçların analizi, real-time PCR verilerini analiz etmek için gerekli eğitimi almış personel tarafından yapılmalıdır.

Analiz sonucunda DM1 ile yapılan testte FAM veri penceresindeki eşik çizgisini kesen örnekler NOS için pozitif, DM2 ile yapılan testte FAM veri penceresindeki eşik çizgisini kesen örnekler P35S için pozitif kabul edilir. Her 2 testte de Cy5 veri penceresindeki eşik çizgisini kesen örnekler bitkiye özgü bölge için pozitif kabul edilir. Eşiği kesmeyen örnekler ise "negatif" olarak gösterilir. Testlerde hem FAM hem de Cy5'te artış olmaması DNA izolasyonu aşamasında bir sorun olduğunu gösterir. Bu durumda izolasyondan başlayarak test tekrar edilmelidir.

11. SORUN GİDERME

Pozitif kontrollerden sinyal alınmamış

Yanlış termal protokol seçilmiş	Doğru termal protokolün seçildiğinden emin olun
---------------------------------	---

Negatif kontrolde FAM veya Cy5 filtresinden sinyal alınmış

Kontaminasyon	Fitreli uç kullanın. Yeni kit bileşenleriyle PCR'ı tekrarlayın
---------------	--

Eşik çizgisi düşük sinyallerin üzerinde

Eşiğin pozisyonu elle ayarlanmalı	Eşiği düşük sinyalleri kesene dek aşağı çekin. Background'un üzerinde kalmaya ve negatif kontrolün eşiği kesmemesine dikkat edin.
-----------------------------------	---

Kırık/Düzgün Olmayan Çizgiler

Baseline döngüleri yeniden ayarlanmalı	Yeni baseline döngülerini manuel olarak ayarlayın ve eşik döngülerini yeniden hesaplatın
--	--

12. REFERANSLAR

Laube et al. (2010), Food Chemistry, 118:979-986.

GMO Detection Method Database, <http://gmdd.shgmo.org/>

Analytes and Related PCR Primers Used for GMO Detection and Quantification, European Commission Joint Research Center, 2007.

13. SEMBOLLER



Son Kullanma Tarihi



Parti



Katalog Numarası



Sıcaklık Sınırlaması



Dikkat; Yardımcı dokümanlara başvurunuz



Üretici

14. İLETİŞİM BİLGİLERİ

iontek

Meridyen İş Merkezi
Ali Rıza Gürcan Cad. Çirpıcı Yolu No:1/410
34010 Merter İstanbul-TURKEY
Phone: +90 212 481 55 16
Fax: +90 212 481 55 18
e-mail: iontek@iontek.com.tr
www.iontek.com.tr

Tescilli Markalar: QIAGEN®, QuantiTect™, HotStarTaq™, Sensiscript™, Omniscript™, ve QIAamp™ QIAGEN GmbH, (Hilden, Almanya) 'nin tescilli markasıdır. Bu markaların içindeki bileşenler QIAGEN GmbH (Hilden, Almanya) tarafından geliştirilmiş ve üretilmiştir.

iontek ve Fluorion iontek A.S.'nin tescilli markalarıdır.