



MOLBIOL

LightMix® in-vitro diagnostics kit **VKORC1**

Kat.-No.: 40-0302-64

Roche SAP No.: 07805985001

VKORC1 genindeki
C1173T DNA varyasyonunun tespiti

Roche Diagnostics LightCycler® Cihazları

ile kullanım içindir

SimpleProbe® formatı

64 reaksiyon için reaktifler

Teslim alındığında:

**Kurutulmuş Premiks PCR reaktiflerini ve Kontrolleri
ışıktan koruyarak oda sıcaklığında saklayın (dondurmayın)**



İçindekiler

1. Ürün Bilgileri	3
1.1 İçerik: LightMix® Kit VKORC1 C1173T	3
1.2 Kullanım Amacı	3
1.3 Özellikler	4
1.3.1 Klinik Örnekler	4
1.3.2 Cihazlar, Yazılım ve Verimlilik	4
1.4 Saklama ve Stabilité	5
2. İlave Cihazlar ve Reaktifler	6
2.1 LightCycler® Cihazları	6
2.2 Cihazlar	6
2.3 Örnek Hazırlama	6
2.4 Reaktifler	6
3. Arka Plan Bilgileri	7
3.1 Tıbbi Arka Plan	7
3.2 Metodoloji ve Test Prensipleri	8
3.3 Performans Özellikleri	8
4. Önlemler ve Uyarılar	9
5. Programlama	10
5.1 Renk Kompanzasyonu	10
5.2 Kapiler Tabanlı LightCycler® Cihazları	10
5.3 LightCycler® 480 Cihazları	11
5.4 LightCycler® 96 Cihazları	12
5.5 LightCycle PRO Cihazları	13
6. Deneysel Protokol	13
6.1 Örnek Hazırlama	13
6.2 Reaktiflerin Hazırlanması	14
6.2.1 Parametreye Özgü Reaktiflerin (PSR) Hazırlanması	14
6.2.2 Pozitif Kontrolün Hazırlanması	14
6.2.3 Genotipleme Standartlarının Hazırlanması	14
6.3 Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	14
6.3.1 64 LightCycler® Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	14
6.3.2 Tek LightCycler® Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	15
6.4 Çözünmüş Bileşenlerin Saklanması ve Stabilitesi	16
6.5 Kontrollerin ve Genotipleme Standartlarının Yüklmesi	17
6.5.1 Kapiler Tabanlı Cihazlar	17
6.5.3 LightCycler® 96 Araçları	18
6.5.4 LightCycler® PRO Cihazları	18
7. Veri Analizi ve Yorumlama:	18
7.1 Sınırlar ve Girişimler	18
7.2 Kalibrasyon	18
7.3 Kalite Kontrolü - Kabul Kriterleri	18
7.3.1 Şablon İçermeyen Kontrol	18
7.3.2 Pozitif Kontrol DNA	19
7.3.3 Genotipleme Standartları DNA	19
7.3.4 Örnekler	19
7.3.5 Anormal Erime Eğrileri	19
7.4 Harici Genotipleme Standartlarının Kaydedilmesi	20
7.4.1 Kapiler Tabanlı Cihazlar	20
7.4.2 LightCycler® 480 Araçları	20
7.4.3 LightCycler® PRO Araçları	20
7.5 Sonuçların Okunması	21
7.5.1 Erime Analizi: Kapiler Tabanlı Cihazlar	21
7.5.2 Erime Analizi: LightCycler® 480 Cihazları	21
7.5.3 Erime Analizi: LightCycler® 96 Cihazları	22
7.5.4 Erime Analizi: LightCycler® PRO Cihazları	22
7.6 Beklenen Erime Sıcaklığı	22
7.7. Sonuçların Yorumlanması	23
7.8 Nadir Varyantlar	24
8. Sorun Giderme	25
9. Referanslar	26
Versiyon Geçmişi	27

1. Ürün Bilgileri

1.1 İçerik: LightMix® Kit VKORC1 C1173T

Kurutulmuş premiks PCR reaktifleri

⚠ Işıktan koruyarak 4°C ile 25°C arasında saklayın

Kapak renk	Etiket	Açıklama içerik	Reaksiyon / Tüp durumu	Toplam
1 adet	Kırmızı	PSR	64 reaksiyon için premiks ve kurutulmuş primerler ve probalar içeren Parametreye Özgü Reaktifler (PSR). ≤ %82 Sentetik oligonükleotidler ≥ %18 Tampon	64 reaksiyon sarı pellet 64 rxs

Standartlar (Kontrol DNA)

⚠ Işıktan koruyarak 4°C ile 25°C arasında saklayın

Kapak renk	Etiket	Açıklama içerik	Reaksiyon Tüp durumu	Toplam
1 adet	Sarı	Pozitif Kontrol C1173T Heterozigot VKORC1 yaklaşık 4E5 genom eşdeğeri	40 reaksiyon / mavi pellet kurutulmuş	40 rxs
1 adet	Sarı	Genotipleme Standardı Yabanıl tip C1173 yaklaşık 4E5 genom eşdeğeri	40 reaksiyon / mavi pellet kurutulmuş	40 rxs
1 adet	Sarı	Genotipleme Standardı Mutant 1173T yaklaşık 4E5 genom eşdeğeri	40 reaksiyon / mavi pellet kurutulmuş	40 rxs

1.2 Kullanım Amacı

Bu kit, periferik kandan elde edilen nükleik asit ekstraktından elde edilen genomik insan DNA'sında, VKORC1 -1639 G>A (rs9923231) promotör varyantı ile %100 bağlantılı olan Vitamin K epoksit redüktaz kompleks alt birim 1 genindeki (VKORC1) yaygın tek-baz 1173 C>T polimorfizminin tespitine olanak sağlar.

Warfarin dozajı, Sitokrom 2C9 gen varyantlarına ve ikinci olarak VKORC1 gen varyantlarına göre ayarlanabilir. Aşağıdaki tablo [1]'den uyarlanmıştır:

VKORC1 1173	CYP 2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
CC	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0,5-2 mg
CT	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0,5-2 mg	0,5-2 mg
TT	3-4 mg	3-4 mg	0,5-2 mg	0,5-2 mg	0,5-2 mg	0,5-2 mg

Günlük Warfarin dozajı

Bu kit, CYP 2C9 gen testi ile birlikte kullanılmalıdır ve tedavi kararının tek dayanağı olması amaçlanmamıştır. Doz aralıkları farklı çalışmalardan elde edilmiştir. Yaş, ırk, vücut ağırlığı, cinsiyet, eş zamanlı kullanılan ilaçlar ve eşlik eden hastalıklar gibi diğer faktörler hesaba katılmalıdır. Warfarin aktivitesini etkileyebilecek daha nadir mutasyonları da göz önünde bulundurun.

Not: Testin performansı yalnızca LightCycler® Cihazları ile kullanıldığında garanti edilebilir (detaylar için bkz. 1.3.2).

1.3 Özellikler

LightMix® Kit VKORC1 C1173T, referans örneklerle gösterildiği gibi VKORC1 C1173T tek nükleotid polimorfizminin (SNP) tespitine olanak sağlayan bir *in-vitro* tanı testidir.

1.3.1 Klinik Örnekler

Test, UV spektrofotometri ile belirlendiği üzere (1 OD = 50 µg DNA/ml), klinik örnekten ekstrakte edilmiş, 5 ila 100 ng/µl saflaştırılmış genomik DNA içeren (toplam 10 ng - 200 ng) sulu çözeltide 2 µl saflaştırılmış genomik DNA gerektirir.

1.3.2 Cihazlar, Yazılım ve Verimlilik

Bir kit, 10 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilen 64 reaksiyon için reaktif içerir. Her çalışma bir standart ve bir Kalıp İçermeyen kontrol içermelidir.

Aşağıdaki tablo kitin bazı özelliklerini özetlemektedir:

LightCycler® Cihazlar	Yazılım Versiyon (veya üstü)	Çalışma Süresi (yaklaşık)	Maks. Örnek çalışma başına ⁽²⁾	Kitin Maksimum verimliliği ⁽³⁾	Kitin Minimum verimliliği ⁽⁴⁾
LC 1.2	4.10 ⁽¹⁾	60 dk	30 + 2 knt.	58	20
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 dk	30 + 2 knt.	58	20
LC 2.0	4.05	60 dk	30 + 2 knt.	58	20
LC480 (96 kuyucuk)	1.5	100 dakika	94 ⁽⁵⁾ + 2 knt.	60	20
LC480 (384 kuyucuk)	1.5	100 dakika	382 ⁽⁵⁾ + 2 knt.	60	20
Z480 (açık kanal)	1.5	100 dakika	94 ⁽⁵⁾ + 2 knt.	60	20
LC96	1.6	100 dakika	94 ⁽⁵⁾ + 2 knt.	60	20
LC PRO	1.X.X	70 dakika	92 ⁽⁶⁾ + 4 knt.	60	12

- 1 LightCycler® 1.2 veya 1.5 Cihazlarında yazılım versiyonu 3.5 ile testin çalıştırılması karşılaştırılabilir sonuçlar verir. Programlama, veri analizi ve sonuçların yorumlanması için talimatlar bu kılavuzda açıklanmamıştır. Mümkün olduğunda 4.10 veya daha üst bir sürüme yükseltin. LightCycler® yazılım 3.5.3 otomatik genotipleme modülünü içermez; eşdeğer sonuçlar her örneği manuel olarak analiz etmesi gereken eğitimli personel tarafından elde edilebilir.
- 2 Her çalışma toplam 2 kontrol reaksiyonu için bir heterozigot kontrol ve bir Kalıp İçermeyen Kontrol (NTC) içermelidir.
- 3 Kitin ilk çalışması genotipleme modülünü öğretmek için 4 kontrol içermelidir (LC96 hariç). İşlenebilecek maksimum örnek sayısı buna göre azalır.
Yerel düzenlemelere bağlı olarak, her çalışmada 4 genotipleme kontrolünün tümünün dahil edilmesi gerekebilir, bu da analiz edilebilecek toplam hasta örneği sayısını azaltır
- 4 Her çalışmada tek bir klinik örneğin analiz edildiği düşünülerek hesaplanmıştır.
- 5 Birden fazla kit kullanılmasını gerektirir.
- 6 Her çalışma bir heterozigot kontrol (HT), her iki Genotipleme Standardı (WT ve MT) ve bir NTC içermelidir.

1.4 Saklama ve Stabilite

Reaktifler ve polimeraz karışımı için **farklı saklama koşullarına** dikkat edin!

Reaktifler ve Kontroller

Kurutulmuş reaktifleri (PSR ve Standartlar) ışıktan koruyarak oda sıcaklığında veya buzdolabında (4°C - 25°C arası) saklayın.

Kurutulmuş reaktifleri dondurmayın. Son kullanma tarihi kit etiketi üzerinde basılıdır.

2. İlave Cihazlar ve Reaktifler

2.1 LightCycler® Cihazları

LightCycler® 2.0 Cihazı

LightCycler® 2.0 Cihazı
LightCycler® Yazılım Versiyonu 4.05 veya
LightCycle® Yazılım Versiyonu 4.10 veya üstü
LightCycler® Kapilerleri (20 µl)
Veya

LightCycler® 480 Cihazları

LightCycler® 480 Cihazı (model I)
LightCycler® 480 II Cihazı
cobas z 480 Analizörü
LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.5 veya üstü
LightCycler® 480 96'lı Beyaz Multiwell Plaka veya
LightCycler® 480 384'lü Beyaz Multiwell Plaka
Veya

LightCycler® 96 Cihazı

LightCycler® 96 Cihazı
LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.0 veya üstü
LightCycler® 480 96'lı Beyaz Multiwell Plaka
LightCycler® 8'li tüp şeritleri (beyaz)
Veya

LightCycler® 1.x Cihazlar

LightCycler® 1.2 ve 1.5 Cihazlar
LightCycler® Yazılım Versiyonu 4.10
LightCycler® Kapilerleri (20 µl)
Veya

LightCycler® PRO Cihazlar

LightCycler® PRO Cihazı
LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.X.X
LightCycler® 480 96'lı Beyaz Multiwell Plaka veya
LightCycler® 480 384'lü Beyaz Multiwell Plaka

İsteğe Bağlı:

2.2 Cihazlar

LC Karousel Santrifüj 2.0 (230 Volt)
Kapatma Aleti

2.3 Örnek Hazırlama

Manuel Örnek Hazırlama:

High Pure PCR Template Preparation Kit
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
Etanol p.a.
İzopropanol p.a.

Otomatik Örnek Hazırlama:

MagNA Pure Cihazı
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

MagNA Pure 2.0 Cihazı
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

MagNA Pure Compact Cihazı
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I

MagNA Pure 96 Cihazı
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

MagNA Pure 24 Cihazı
MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit

2.4 Reaktifler

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe

Roche Diagnostics

Üretimi Sonlandırılmış
Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No: 04 898 915 001
Üretimi Sonlandırılmış

Roche Diagnostics

Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No. 05 015 278 001
Kat.-No. 05 200 881 001
Kat.-No. 04 994 884 001
Kat.-No. 04 729 692 001
Kat.-No. 04 729 749 001

Roche Diagnostics

Kat.-No. 05 815 916 001
Cihaz ile Birlikte Verilir
Kat.-No. 04 729 692 001
Kat.-No. 06 612 601 001

Roche Diagnostics

Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No. 04 779 584 001
Kat.-No. 11 909 339 001

Roche Diagnostics

Kat.-No. 09 541 713 001
Cihaz ile Birlikte Verilir
Kat.-No. 04 729 692 001
Kat.-No. 04 729 749 001

Kat.-No. 03 709 582 001
Kat.-No. 03 357 317 001

Roche Diagnostics

Kat.-No. 11 796 828 001
herhangi bir tedarikçi
herhangi bir tedarikçi
herhangi bir tedarikçi

Roche Diagnostics

Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No. 03 003 990 001

Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No. 03 003 990 001

Üretimi Sonlandırılmış
Kat.-No. 03 730 964 001

Kat.-No. 06 541 089 001
Kat.-No. 06 543 588 001

Kat.-No. 07 290 519 001
Kat.-No. 07 658 036 001

Roche Diagnostics

Kat.-No. 12 239 272 001

3. Arka Plan Bilgileri

3.1 Tıbbi Arka Plan

Warfarin, bir kumarin ilacı olup, tromboz ve tromboembolizmi önlemek için kullanılır. İlaç, VKORC1 protein aktivitesinin doza bağlı inhibisyonuna neden olur.

Warfarine bireysel yanıt, VKORC1 miktarına ve ilacın katabolizma hızına bağlıdır.

VKORC1 Aktivitesi

Vitamin K epoksit redüktaz kompleks alt birim 1 (VKORC1, OMIM: 608547), hepatositlerin endoplazmik retikulumunda bulunan bir membran proteinidir. Enzim, Vitamin K geri dönüşümünde hız sınırlayıcı basamağı katalize eder.

Warfarin, Vitamin K kullanılabilirliğini azaltarak pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X ile antikoagülan proteinler C ve S'de azalmaya neden olur ve böylece koagülasyon sürecini yavaşlatır veya hatta inhibe eder.

Yaygın VKORC1 promotör varyantı -1639 G>A'nın daha düşük protein ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu varyant, 1173 C>T (rs9934438, NG_011564.1:g.6399C>T) dahil olmak üzere en az dört diğer varyant ile tam bağlantılıdır [2].

Sonuç olarak, VKORC1 1173 TT genotipine sahip hastalar, 1173 CC ve CT taşıyıcılarına göre daha düşük Warfarin dozlarına ihtiyaç duyarlar [3].

Etnik Grup Varyasyonları

VKORC1'in alel frekansı etnik gruplar arasında değişiklik gösterir. Asya kökenli popülasyonlarda 1173 T majör alel iken, Kafkaslarda yaklaşık %40 ve Afrika kökenli Amerikalılarda sadece %14'tür.

Warfarin Katabolizması

Warfarin, sitokrom P450 CYP2C9 tarafından metabolize edilir. Özellikle daha büyük klinik etki, daha düşük Warfarin dozajları kullanılmasını gerektiren CYP2C9 yavaş metabolize edici varyantlarının varlığına bağlıdır.

İki yaygın yavaş metabolize edici CYP2C9 aleli *2 ve *3, LightMix® Kit CYP 2C9 (Roche SAP: 05945712001) kullanılarak tanımlanabilir.

Antikoagülasyon Tedavi Algoritması

US-FDA ve IWPC, antikoagülasyon tedavisine rehberlik etmek için VKORC1 ve bu iki CYP 2C9 varyantını kullanır (IWPC algoritması için bkz: www.warfarindosing.org).

Genetik Varyantlar ve Warfarin Duyarlılığı

Warfarin duyarlılığını etkileyen başka gen varyantları da bilinmektedir ancak Kafkas kökenli bireyler için rutin olarak test edilmez: VKORC1 yanlış anlamlı mutasyonları, Vitamin-K döngüsünde rolü olan CYP 24F2, EPHX1 ve GGX, VKOR kompleksinde bir kofaktör olan CALU ve özellikle CYP 2C9 alelleri *6 ve *8 yavaş metabolize ediciler.

3.2 Metodoloji ve Test Prensibi

PCR metodolojisi kullanılarak, VKORC1 geninin 176 baz çifti uzunluğundaki bir fragmenti spesifik primerler ile amplifiye edilir. Fragment, SimpleProbe® reaktifi ile dahili olarak işaretlenmiş mutasyona özgü tespit probu ile tespit edilir.

SimpleProbe® problemleri yalnızca tamamlayıcı DNA'ya bağlandıklarında floresan özellik gösterirler.

Prob, amplifiye edilmiş fragmentin mutasyon bölgesini kapsayan bir kısmına bağlanır. Prob tarafından kapsanan herhangi bir uyumsuzluk hibridi destabilize eder. Erime eğrisi analizi sırasında sıcaklık yavaşça artırılır. Prob belirli bir erime sıcaklığında ayrılır ve bu da floresanın azalmasına neden olur.

Bu üründe prob, mutant 1173T varyantının dizisi ile eşleşir ve Yabanıl tip C1173 genotipinin varlığı azalmış bir Tm ile sonuçlanır.

Genotip sonuçlarının okunması, sağlanan standartlarla karşılaştırılan erime sıcaklıklarına dayanır. Cihaz yazılımı izin veriyorsa, genotip sonuçlarının okunması otomatik genotipleme ile gerçekleştirilebilir (cihaza bağlı: 'Erime Eğrisi Genotipleme' yazılım modülü).

Otomatik genotipleme sonuçları, sapan eğriler ve ara erime noktası sıcaklıkları için manuel olarak gözden geçirilmelidir. Otomatik tiplendirme tutarlı genotip sonuçları rapor edemediğinde, genotip bölüm 7'de açıklanan kriterlere göre erime sıcaklıklarından çıkarılmalıdır.

3. 3 Performans Özellikleri

Analitik Özgüllük

Hedef gene özgüllük ve mevcut testte mutasyon bölgesinin tespiti için kullanılan PCR amplifikasyonunun uygunluğu, oluşturulan amplikonun doğrudan sekanslanması ile gösterilmiştir.

Analitik Duyarlılık

Çeşitli heterozigot insan genomik DNA'larının seri dilüsyonlarının tespiti, mevcut kitin tespit limitinin 250 kopya (1,5 ng) olduğunu ortaya koymuştur.

Tanısal Özgüllük ve Duyarlılık

Kafkas kökenli bireylerden alınan toplam 31 farklı genomik DNA örneği yayınlanmış testlerle karşılaştırılmıştır [4]; ayrıca 12 örnek sekanslama ile de analiz edilmiştir. Çalışma, kit ile elde edilen sonuçları LGC Genomics GmbH, Berlin tarafından gerçekleştirilen ABI 3730xl DNA sekanslama verileri ile karşılaştırmıştır.

Çalışma sonuçları: Her iki analitik yöntem için sonuçlar %100 uyumlu bulunmuştur.

Özellikle, 5 örnek (%16,1) homozigot CC, 13 örnek (%41,9) heterozigot CT ve 13 örnek (%41,9) homozigot 1173 TT olarak belirlenmiştir.

4. Önlemler ve Uyarılar

Kullanım Gereklilikleri

Bu ürün bir *in-vitro* tanı cihazıdır ve bu nedenle yalnızca kalifiye personel tarafından kullanılmalıdır.

Genel laboratuvar malzemelerinin kullanımı için genel önlemler gereklidir.

Laboratuvar iş akışı standart uygulamalara uygun olmalıdır. Kontaminasyon riski nedeniyle, PCR hazırlığı ve PCR amplifikasyonu fiziksel olarak ayrı alanlarda gerçekleştirilmelidir.

Farklı lotlardan reaktifleri karıştırmayın.

Reaktifleri son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

Kitle birlikte verilen kılavuz versiyonunu kullanın (kit etiketine bakın).

Laboratuvar Prosedürleri

İnsan kaynaklı tüm materyaller ve ilgili atıklar potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmelidir. Tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve yerel makamlar tarafından onaylanan dezenfektanlarla işlem yapın.

Laboratuvar çalışma alanında yemek yemeyin, içecek içmeyin veya sigara içmeyin.

Ağızla pipetleme yapmayın.

Örnekleri ve set bileşenlerini kullanırken tek kullanımlık koruyucu eldiven, laboratuvar önlüğü ve uygun göz koruması kullanın.

Alikotları pipetlerken reaktiflerin mikrobiyal veya nükleaz kontaminasyonundan kaçının. Tek kullanımlık steril uçların kullanımı zorunludur.

Örnekleri ve set bileşenlerini kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.

Örnek Hazırlama

Uygun kullanım ve imha için kullanılan ürünün prospektüsünde yer alan güvenlik talimatlarına bakın (bkz. bölüm 2.3).

Amplifikasyon ve Tespit

Bu ürünü kullanmadan önce, lütfen LightCycler® Kullanım Kılavuzunu okuyun.

Doğru örnek tanımlaması için her pozisyonu tanımlayacak bir örnek dosyası kaydedin.

LightCycler® Cihaz ayarlarını kontrol edin ve Cihazınıza özgü "PCR protokolü" bölümünde belirtilenlerle eşleştikten emin olun.

Kapiler yüzeye veya plaka kapağına eldivensiz dokunmayın.

Lütfen LightCycler® Cihazının tüm çalışma ve güvenlik talimatlarına bakın.

Atık Malzemelerin Yönetimi

Kullanılmayan reaktifleri ve atık materyalleri mevcut yasalara göre imha edin.

5. Programlama

5.1 Renk Kompanzasyonu

Bu kitin kullanımı için Renk Kompanzasyonu gerekmez; verilerin 'Renk Kompanzasyonu' etkinleştirilmiş olarak okunması sonuçların okunmasını değiştirmeyecektir.

5.2 Kapiler Tabanlı LightCycler® Cihazları

Detaylar için LightCycler® Kullanım Kılavuzuna bakın.

Programlama:

Protokol dört program adımından oluşur (Tablo 1):

1. **Örneğin denatürasyonu** ve enzimin aktivasyonu
2. **Hedef DNA'nın** PCR-amplifikasyon döngüsü
3. **PCR amplifiye** DNA dizisinin Erime ile Tanımlanması
4. **Cihazın** soğutulması

Adım:	1	2			3			4
Parametre								
Analiz Modu	Yok	Kantitasyon modu			Erime Eğrileri modu			Yok
Döngüler	1	45			1			1
Hedef °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Bekleme sa:dk:sn	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı °C/s	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Hedef Sıc. °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Adım Boyutu °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Adım Gecikmesi Döngü Sayısı	0	0	0	0	0	0	0	0
Ölçüm Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Kont.	Yok

Tablo 1: Kapiler tabanlı Cihazların programlanması

Not:

Programlama sırasında varsayılan yazılım değerlerini koruyun: kanal = 530, maks. örnek = 32, arama sıcaklığı = 30°C ve kapiler boyutu = 20 µl. Kapiler boyutu değerini 100 µl'ye değiştirmeyin.

Programı ve varsayılan değerleri "RUN Template" (Şablonu Çalıştır) olarak kaydedin, bu şekilde her çalışmayı başlatmak için yüklenebilir.

Çalışmayı başlatmadan hemen önce, eksik kapilerler nedeniyle cihazın durmasını önlemek için maks. örnek sayısını (varsayılan = 32) çalışmada yer alan örnek ve kontrol sayısına göre değiştirin.

Yazılım versiyonu 3.5.3'ü kullanan LightCycler 1.x Cihazları için Sıcaklık Artış Hızı yerine 'Sıcaklık Geçiş Oranı' bölümünü okuyun.

5.3 LightCycler® 480 Cihazları

Detaylar için LightCycler® Kullanım Kılavuzuna bakın.

Tespit Formatı: SimpleProbe®

Not: Bu kit, HFE kit kılavuzunda açıklanan Tespit Formatı ve Programlama talimatlarına uygun olarak LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y CE (TIB kat. No.: 40 0340 32 Roche SAP No.: 05945798001) ile kombinasyon halinde çalıştırılabilir.

Reaksiyon Hacmi: 10 µl

Programlama:

Protokol dört program adımından oluşur (Tablo 2):

1. **Örneğin denatürasyonu** ve enzimin aktivasyonu
2. **Hedef DNA'nın** PCR-amplifikasyon döngüsü
3. **PCR amplifiye** DNA dizisinin Erime ile Tanımlanması
4. **Cihazın** soğutulması

Adım:	1	2			3			4
Parametre								
Analiz Modu	Yok	Kantitasyon modu			Erime Eğrileri modu			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Hedef °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Ölçüm Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Kont.	Yok
Bekleme sa:dk:sn	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı C°/ s 96	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	0,29	1,5
Sıcaklık Artış Hızı C°/ s 384	4,6	4,6	2,4	4,6	4,6	2,0	0,29	2,0
Ölçümler °C başına	-	-	-	-	-	-	2	-
Hedef Sıc. °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Adım Boyutu °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Adım Gecikmesi Döngü Sayısı	0	0	0	0	-	-	-	-

Tablo 2:

Not:

Programı ve varsayılan değerleri **"RUN Template"** (Şablonu Çalıştır) olarak kaydedin, bu şekilde her çalışmayı başlatmak için yüklenebilir.

Varsayılan değer 5 yerine **derece başına 2 ölçüm** programladığınızdan emin olun; daha fazla ölçüm erime eğrisinin eğimini azaltır, deney süresini artırır ve kitin arızalanmasına neden olur.

5.4 LightCycler® 96 Cihazları

Detaylar için LightCycler® Kullanım Kılavuzuna bakın.

Ölçüm:

Tespit Formatı: 470/514 FAM			Genel
Kantitasyon Faktörü	Erime Faktörü	Entegrasyon Süresi (S)	Hacimler (µl)
10,00	1,20	Dinamik	10

Programlama

Protokol dört program adımından oluşur (Tablo 3):

1. **Örneğin denatürasyonu** ve enzimin aktivasyonu
2. **Hedef DNA'nın** PCR-amplifikasyon döngüsü
3. **PCR amplifiye** DNA dizisinin Erime ile Tanımlanması
4. **Cihazın** soğutulması

Adım:	1	2			3			4
Parametre								
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Sıcaklık Artış Hızı [°C/ s]	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	0,20	1,5
Süre [s]	600	5	10	15	30	120	1	30
Hedef [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Modu		Standart	Standart	Standart				
Ölçüm Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Kont.	Yok
Okumalar /°C							5	

Tablo 3: LightCycler® 96 Cihazlarının Programlanması

Not:

Programı ve varsayılan değerleri her çalışmayı başlatmak için yüklenebilecek '**Deney dosyası**' olarak kaydedin.

5.5 LightCycle PRO Cihazları

1.X.X yazılım versiyonunu kullanın. Detaylar için LightCycler® PRO Sistem Kullanıcı Yardımına bakın.

LightMix® Kit VKORC1 için uyumlu LightCycler® Analiz Paketi (LCAP) dosyasını indirmek için navifyportal.roche.com adresini ziyaret edin. Lütfen LCAP'ın en son versiyonunu kontrol edin.

Kite özgü çalışma profili LCAP'ın bir parçasıdır ve yukarıda gösterilen çalışma koşullarına eşdeğerdir.

LightCycler® Analiz Paketi: 1012_VKORC1_96

Tespit Formatı: FAM (494/523)

LCAP dosyasını SFTP veya USB cihazının test klasörüne kaydedin.

İndirilen LCAP'ı LightCycler® PRO Cihazına aktarın, yükleyin ve etkinleştirin.

Plakalar sekmesinde bir plaka düzeni oluşturun veya içe aktarın.

6. Deneysel Protokol

Çözeltileri hazırlamadan önce Cihazı programlayın (bkz. 5. Programlama ve detaylar için LightCycler® Kullanım Kılavuzunu okuyun).

Testin tanımlanan performansı yalnızca Roche Diagnostics LightCycler® sistemleri ile kullanıldığında garanti edilebilir.

6.1 Örnek Hazırlama

Genomik DNA hazırlamak için insan periferik kanı (EDTA, sitrat) kullanın. Bu antikoagülan PCR'yi engelleyebileceğinden heparin kullanımı kesinlikle önerilmez. İlgili protokollerde açıklandığı gibi High Pure PCR Şablon Hazırlama Kiti veya kullanılan MagNA Pure Cihazına uygun ekstraksiyon kitini kullanan MagNA Pure Cihazlarını kullanarak nükleik asit saflaştırması gerçekleştirin (bkz. 2. İlave Cihazlar ve Reaktifler).

Gösterilen testlerde (7.5. Sonuçların Okunması) DNA, üreticinin talimatlarına uygun olarak High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak 200 µl kandan manuel olarak ekstrakte edilmiştir; saflaştırılmış DNA'nın kolondan son elüsyonu için 100 µl elüsyon tamponu kullanılmıştır.

6.2 Reaktiflerin Hazırlanması

6.2.1 Parametreye Özgü Reaktiflerin (PSR) Hazırlanması

►	Her PSR tüpü 64 reaksiyon için yeterlidir.
1	Premiks PSR tüpünü 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edin.
2	Pelletin tüpün dibinde olduğunu kontrol edin.
3	PSR tüpüne 66 µl PCR sınıfı Su ekleyin.
4	Oda sıcaklığında 20 saniye inkübe edin.
5	10 saniye vorteksleyin.
6	Damlaları toplamak için tüpleri santrifüj edin.

- 10 µl'lik PCR reaksiyonu için 1 µl **PSR** kullanın.

6.2.2 Pozitif Kontrolün Hazırlanması

►	HT Pozitif Kontrol tüpü 40 reaksiyon için yeterlidir.
1	HT 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edin.
2	Mavi pelletin tüpün dibinde olduğunu kontrol edin.
3	80 µl PCR sınıfı Su ekleyerek pelleti çözün.
4	Oda sıcaklığında 20 saniye inkübe edin.
5	10 saniye vorteksleyin.
6	Damlaları toplamak için tüpleri santrifüj edin.

- 10 µl'lik PCR reaksiyonu için **2 µl Pozitif Kontrol** kullanın.

- Her çalışmada **Pozitif Kontrol** kullanılmalıdır.

Lütfen dikkat edin: Tüplerin açılması çalışma alanının kontaminasyonuna neden olabilir (aerosol).

6.2.3 Genotipleme Standartlarının Hazırlanması

LightCycler® yazılım 4.05 ve üstü (kapiler tabanlı cihazlar) ve yazılım 1.5 ve üstü (LightCycler®480 cihazları) ve yazılım 1.X.X (LightCycler® PRO), bilinmeyen klinik örneklerin otomatik genotiplemesini gerçekleştirmek için referans standartlarla kalibre edilebilir.

►	Kullanılmıyorsa, Genotipleme Standartlarını kuru tutun; kit tükendiğinde veya son kullanma tarihine ulaştığında reaktifleri atın.
1	WT ve MT Genotipleme Standardı tüplerini 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edin.
2	Mavi pelletin tüpün dibinde olduğunu kontrol edin.
3	80 µl PCR sınıfı Su ekleyerek pelleti çözün.
4	Oda sıcaklığında 20 saniye inkübe edin.
5	10 saniye vorteksleyin.
6	Damlaları toplamak için tüpleri santrifüj edin.

- 10 µl'lik PCR reaksiyonu için 2 µl **WT ve MT Genotipleme Standardı** kullanın.

- Genotipleme modülünü kalibre etmek için kitin ilk çalışmasında her iki **Genotipleme Standardı** da kullanılmalıdır. LightCycler® PRO için her çalışmada her iki **Genotipleme Standardı** kullanılmalıdır.

Lütfen dikkat edin: Tüplerin açılması çalışma alanının kontaminasyonuna neden olabilir (aerosol).

6.3 Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

6.3.1 64 LightCycler® Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Çözünmüş veya aktive edilmiş reaktiflerin değişen hacimlerde saklanması önlemek için 64 reaksiyon hazırlamanızı öneririz (6.2). Çözünmüş bileşenlerin saklanması ve stabilitesi için bölüm 6.4'e bakın. Daha az örnek için reaksiyon karışımının hazırlanması için lütfen 6.3.2 "Tek reaksiyon için reaksiyon karışımı" adımına gidin.

Reaksiyon karışımını PSR tüpünde hazırlayın (soğutulmuş):

Bileşenler	64 reaksiyonlar
Halihazırda içeren PSR tüpüne (kırmızı kapak)	66,0 µl
Ekleyin:	
H ₂ O, PCR sınıfı (renksiz kapak)	343,2 µl
MgCl ₂ çözeltisi 25 mM (mavi kapak)	52,8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (kırmızı kapak), bkz. 6.2.1	66,0 µl
 PSR tüpünün "uzun boyunlu kapağını" FastStart'tan gelen kırmızı kapak ile değiştirin	
Toplam Hacim	528,0 µl

Tablo 4: 64 reaksiyon karışımı hazırlamak için bileşen hacimleri

6.3.2 Tek LightCycler® Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımını, her hacmi (Tablo 6) analiz edilecek biyolojik örnek sayısı artı üç reaksiyon (NTC, Pozitif Kontrol, bir fazla) ve (isteğe bağlı) iki **Genotipleme Standardı** ile çarparak hazırlayın. LightCycler® PRO için her çalışmada her iki **Genotipleme Standardı**, **Pozitif Kontrol** ve **NTC** zorunludur.

Reaksiyon karışımını soğutulmuş bir tüpte hazırlayın:

Bileşenler	Tek reaksiyon
H ₂ O, PCR sınıfı (renksiz kapak)	5,2 µl
MgCl ₂ çözeltisi 25 mM (mavi kapak)	0,8 µl
PSR (kırmızı kapak), bkz. 6.2.2	1,0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (kırmızı kapak), bkz. 6.2.1	1,0 µl
Reaksiyon karışımı hacmi	8,0 µl

Tablo 5: Tek reaksiyon karışımı hazırlamak için bileşen hacimleri



**Reaksiyon karışımını yavaşça pipetleyerek karıştırın.
DeneySEL başarısızlıkların yüksek bir yüzdesi
homojen olmayan reaksiyon karışımından kaynaklanır!**



6.3.3 Kapiler / Kuyucuk Yükleme Prosedürü

Her çalışma, genomik DNA veya VKORC1 PCR ürünü ile kontaminasyon olmadığını göstermek için bir **NTC** ve çalışmaya özgü erime sıcaklıklarını tanımlamak için **Pozitif Kontrol** içermelidir. Düzenleyici kurumlar veya yerel laboratuvar kuralları iki Genotipleme Standardının da dahil edilmesini gerektirebilir.

►	Çalışmayı kurarken kontrolleri dahil etmeyi unutmayın.
1	Yavaşça karıştırın, spin edin ve reaksiyon karışımı tüpünde hava kabarcığı olmadığını kontrol edin.
2	Her kapiler/kuyucuğa 8 µl reaksiyon karışımı dağıtın.
3	Zorunlu: NTC olarak 2 µl PCR sınıfı H₂O ekleyin 2 µl HT Pozitif Kontrol ekleyin. LightCycler® PRO için her iki Genotipleme Standardı (WT, MT) kullanılmalıdır.
	İsteğe Bağlı: 2 µl WT Genotipleme Standardı ekleyin. 2 µl MT Genotipleme Standardı ekleyin.
4	Kalan kapilerlere/kuyucuklara 2 µl Örnek ekleyin.
5	Kapileri/plakayı kapatın ve santrifüj edin. Hava kabarcığı olmadığını kontrol edin.
6	Rotoru/plakayı LightCycler® Cihazına yerleştirin.
7	Yalnızca kapiler tabanlı kullanıcılar: örnek sayısını girin.
8	Çalışmayı başlatın.
9	İstendiğinde deneyin adını girin.
10	Örnek verilerini örnekler penceresinde kaydedin.

* Örnek yükleme ve Genotipleme Standartları kalibrasyonu için bölüm 6.5'e bakın.

6.4 Çözünmüş Bileşenlerin Saklanması ve Stabilitesi

Reaksiyon Karışımı

Parametreye Özgü Reaktifler (**PSR**), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe ve MgCl₂ içeren tam reaksiyon karışımı buzdolabında (2°C – 8°C) 30 güne kadar saklanabilir.

Uzun süreli ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

Parametreye Özgü Reaktifler (PSR)

Çözünmüş PSR buzdolabında (2°C – 8°C) saklandığında 30 güne kadar stabildir. Uzun süreli ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

Pozitif Kontrol

Çözünmüş Pozitif Kontrol buzdolabında (2°C - 8°C) saklandığında 30 güne kadar stabildir.

Genotip Standartları

Çözünmüş **Genotipleme Standartları** buzdolabında (2°C – 8°C) saklandığında 30 güne kadar stabildir.

6.5 Kontrollerin ve Genotipleme Standartlarının Yüklenmesi

Pozisyon 1 ve 2 olarak tanımlanan örnekler her çalışmada doldurulmalıdır; örnek 3 ve 4 yalnızca kitinlik çalışmasında Genotipleme Standartlarının öğretilmesi için gereklidir. LightCycler® PRO için her çalışmada her iki Genotipleme Standardı kullanılmalıdır.



Genotip sonuçları erime sıcaklıklarına dayanır.

LightCycler® 2.0 ve LightCycler® 480 yazılımında bulunan otomatik genotipleme modülünün kullanımı isteğe bağlıdır, ancak LightCycler® PRO için zorunludur.

Detaylar için LightCycler® Kullanım Kılavuzuna bakın.

6.5.1 Kapiler Tabanlı Cihazlar

"Samples data - Capillary View" (Örnekler verisi - Kapiler Görünümü) bölümünde, Örnek Adını ikinci sütunda açıklandığı gibi girin. "Analysis Type – Genotyping" (Analiz Tipi – Genotipleme) seçeneğini seçin. Kanal 530'u seçin ve diğerlerinin tümünün seçimini kaldırın. Açılır menüden "Sample Type" (Örnek Türü) seçeneğini seçin ve "Genotip" açıklamasını kopyalayın:

Poz	Örnek Ad	Kanal	Hedef Ad	Örnek Tipi	Genotip
1	NTC	530	Hedef 1	Şablon İçermeyen Kontrol	/
2	HT	530	Hedef 1	Erime Standardı	VKORC1 C1173T Heterozygous
3	WT	530	Hedef 1	Erime Standardı	VKORC1 C1173 Yabanıl Tip
4	MT	530	Hedef 1	Erime Standardı	VKORC1 1173T Mutant

6.5.2 LightCycler® 480 Araçları

"Sample Editor" (Örnek Düzenleyici) penceresinde, "Step1: Select Workflow" (Adım 1: İş Akışı Seç) bölümünde, "Melt Gen" (Erime Geno) seçeneğini seçin. Filtre kombinasyonu 465-510. **Pozitif Kontrol ve Genotipleme Standartlarının** açıklamasını aşağıdaki gibi girin:

Poz	Örnek Ad	Erime Geno Örnek Türü	Erime Geno Genotip
1	NTC	Şablon İçermeyen Kontrol	/
2	HT	Erime Standardı	VKORC1 C1173T Heterozigot
3	WT	Erime Standardı	VKORC1 C1173 Yabanıl Tip
4	MT	Erime Standardı	VKORC1 1173T Mutant

6.5.3 LightCycler® 96 Araçları

"Sample Editor" (Örnek Düzenleyici) penceresinde, aşağıda açıklandığı gibi, **Pozitif Kontrol** ve isteğe bağlı olarak **Genotipleme Standartlarının** açıklamasını girin:

Tablo Görünümü

Renk	Pozisyon	Örnek Adı	Örnek Türü	Boya
	A1	NTC	Bilinmeyen	FAM
	A2	HT	Bilinmeyen	FAM
	A3	WT	Bilinmeyen	FAM
	A4	MT	Bilinmeyen	FAM

6.5.4 LightCycler® PRO Cihazları

Plaka düzeninde uyumlu LCAP seçilmelidir. Erime Standartları ve NTC ilgili kuyucuk pozisyonuna atanmalıdır.

Poz	Örnek Numarası	Örnek Rolü	Genotip
1	1012_VKORC1_NTC	Şablon İçermeyen Kontrol	/
2	VKORC1_HT	Erime Standardı	VKORC1 C1173T Heterozygous
3	VKORC1_WT	Erime Standardı	VKORC1 C1173 Yabanıl Tip
4	VKORC1_MT	Erime Standardı	VKORC1 1173T Mutant

7. Veri Analizi ve Yorumlama:

7.1 Sınırlar ve Girişimler

evcut test VKORC1 C1173T DNA'sına özgüdür.

Bu test için bilinen girişimler yoktur.

7.2 Kalibrasyon

Kalibrasyon 6.2.4, 6.3.3, 6.5, 7.3.2 ve 7.3.3'te açıklanan prosedüre göre gerçekleştirilmelidir.

7.3 Kalite Kontrolü - Kabul Kriterleri

Güvenilir bir genotipleme analizi gerçekleştirmek için, her çalışmada Kalıp İçermeyen Kontrol **NTC** ve **HT** Pozitif Kontrolün dahil edilmesi esastır. LightCycler® PRO için **NTC** ve **HT** Pozitif Kontrole ek olarak her çalışmada her iki Genotipleme Standardı **WT** ve **MT**'nin dahil edilmesi esastır.

Not: Test, problemlerin iyi bağlanmayacağı 60°C'lik bir bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilir ve 'kantitasyon'da düşük veya hiç sinyal vermez. Bu nedenle, kabul kriterleri yalnızca aşağıda açıklanan erime eğrisi paternlerinin tanımına dayanmaktadır.

7.3.1 Şablon İçermeyen Kontrol

NTC (Zorunlu - position 1).

NTC'nin erime eğrisi analizi negatif sonuç vermelidir: teste özgü erime pikleri (bkz. 7.3.2) tespit edilmemelidir.

NTC'nin bir veya daha fazla spesifik pik göstermesi durumunda (yazılımın arka plan gürültüsünü pencere boyutuna büyüterek erime piklerinin varlığını önermesini önlemek için sinyali örnek sonuçlarıyla karşılaştırın), bir kontaminasyon veya pipetleme hatası oluşmuştur; oturum geçerli değildir ve prosedür tekrarlanmalıdır. Sorun devam ederse, suyu ve/veya reaktifleri değiştirin ve tekrarlayın.

Spesifik olmayan bir sıcaklıkta pik tespit edilmesi durumunda (bkz. paragraf 7.3.5 ve 7.7), yazılım bunu yanlışlıkla pozitif olarak tanımlayabilir, bu durumda otomatik genotipleme imkansızdır.

Bu durumda - otomatik genotiplemeyi etkinleştirmek için - NTC örneğini "No Template Control" (Şablon İçermeyen Kontrol) seçeneğinden "Unknown" (Bilinmeyen) seçeneğine değiştirin (bkz. paragraf 6.5); alternatif olarak, sonuçlar erime sıcaklıklarından okunmalıdır (bkz. paragraf 7.7). LightCycler® PRO Cihazları için geçerli değildir.

7.3.2 Pozitif Kontrol DNA

Erime eğrisi analizi her zaman göstermelidir:

HT Pozitif Kontrol (Zorunlu - pozisyon 2).

Erime eğrisi analizi kanal 530'da her zaman iki erime piki göstermelidir.

HT Heterozigot klinik örnekleri taklit eder.

Beklenen erime sıcaklığı için bkz. **7.7 Sonuçların Yorumlanması**.

7.3.3 Genotipleme Standartları DNA

WT Genotipleme Standardı (İsteğe bağlı - pozisyon 3).

Erime eğrisi analizi kanal 530'da her zaman tek bir erime piki göstermelidir.

WT, homozigot **Yabanıl Tip** klinik örnekleri taklit eder.

MT Genotipleme Standardı (İsteğe bağlı - pozisyon 4).

Erime eğrisi analizi kanal 530'da her zaman tek bir erime piki göstermelidir.

MT, homozigot **Mutant** klinik örnekleri taklit eder.

Beklenen erime sıcaklığı için bkz. **7.7 Sonuçların Yorumlanması**.

7.3.4 Örnekler

Mevcut testin sonucu her zaman bir veya iki erime piki göstermelidir.

 Örnek başına ikiden fazla pik beklenmez.

Erime piki profilleri, bu bölümde açıklanan kabul kriterlerine ve **7.7 Sonuçların Yorumlanması** bölümünde açıklanan beklenen erime sıcaklığı ve izin verilen varyasyona uygun olmalıdır.



Bir çalışmayı tekrarlamadan önce yaygın hataları göz önünde bulundurun; özellikle amplifikasyon profilini, kullanılan doğru master-mix ve MgCl₂ konsantrasyonunu kontrol edin ve reaktiflerin yetersiz saklanması da cihazın arızalanmasına neden olabileceğini unutmayın.

7.3.5 Anormal Erime Eğrileri

Beklenmeyen erime eğrisi, yanlış örnek hazırlamadan, ürünlerdeki bir kusurdan veya prob bağlanma bölgesindeki bir varyanttan kaynaklanabilir. Tüm prosedür tekrarlanmalıdır (örnek hazırlama, amplifikasyon ve tespit). Anormal erime eğrisi devam ederse, dizinin tanımlanması için başka bir yöntem kullanılmalıdır. Diziyi doğrulamak veya bilinmeyen mutasyonları tanımlamak için PCR fragmentini DNA sekanslama için gönderin.

Ürün iyileştirme ve piyasa sonrası gözetim amacıyla lütfen sapan erime örneklerini TIB Molbiol GmbH, Berlin laboratuvarlarına gönderin. Göndermeden önce service@tib-molbiol.de ile iletişime geçin. Bilinen varyantların örnekleri paragraf 7.8'de gösterilmiştir. **Nadir Varyantlar.**

7.4 Harici Genotiplleme Standartlarının Kaydedilmesi



(4.0'ın altındaki LC1.x yazılım versiyonları, LightCycler®96 ve LightCycler® PRO Cihazları için geçerli değildir).

Genotiplleme analizinden sonra, örnek 1 ila 4 kabul kriterlerine uyuyorsa (bkz. paragraf 7.3), Genotiplleme Standartlarını aşağıdaki gibi kaydedin ve tüm sonraki çalışmalarda Harici Standart kullanın.

7.4.1 Kapiler Tabanlı Cihazlar

Erime Eğrisi analizi - Genotiplleme penceresinde "Standard (Int)" menüsünü açın ve "Save standards as External" (Standartları Harici olarak kaydet) seçeneğini seçin.

7.4.2 LightCycler® 480 Araçları

Erime Eğrisi Genotiplleme analiz penceresinde "Standards (In-run)" (Standartlar (Çalışma içi)) menüsünü açın ve "Save as ext." (Harici olarak kaydet) seçeneğini seçin.

7.4.3 LightCycler® PRO Araçları

Genotiplleme Standartları **her** çalışmada kullanılmalıdır.

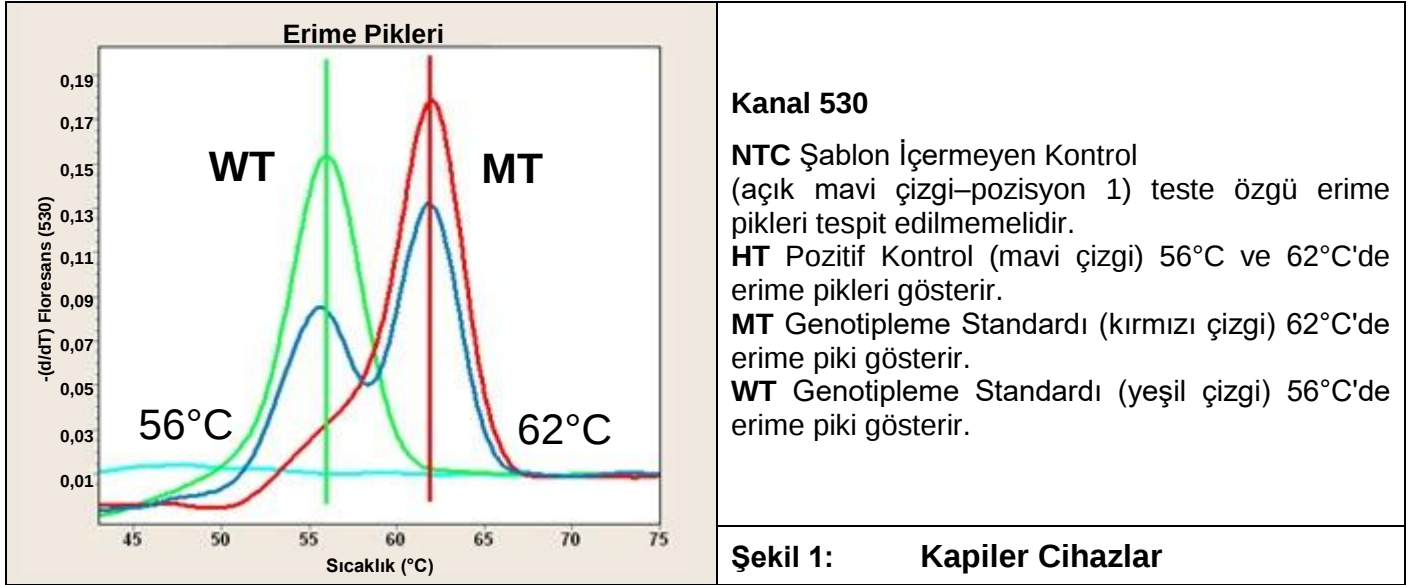
7.5 Sonuçların Okunması

Veri analizini LightCycler® Kullanım Kılavuzlarında açıklandığı şekilde gerçekleştirin.

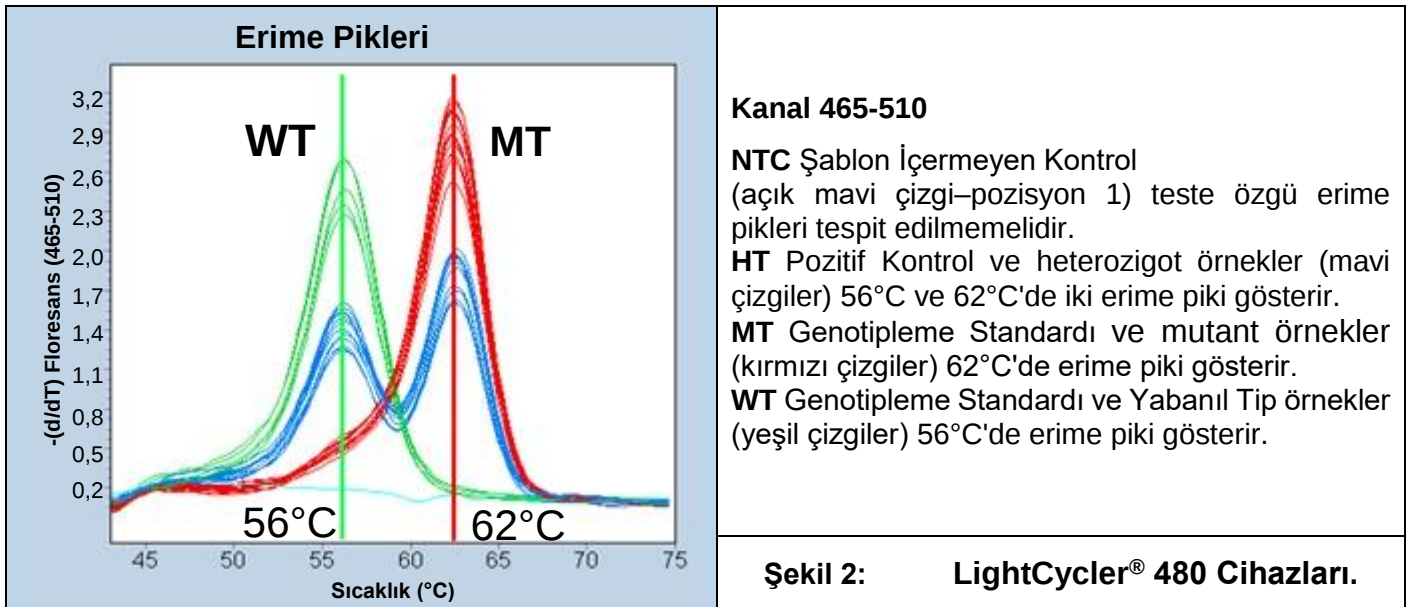


LightCycler® 2.0 ve LightCycler® 480 yazılımında bulunan genotipleme modülünün kullanımı isteğe bağlıdır; otomatik genotip modülü başarısızlığı durumunda (skor <0,6 veya res<0,4), manuel erime eğrisi tanımlamasına (T_m çağrısı) geçin ve sonuçları bölüm 7.7'deki tablo ile karşılaştırın. **Sonuçların Yorumlanması.**

7.5.1 Erime Analizi: Kapiler Tabanlı Cihazlar



7.5.2 Erime Analizi: LightCycler® 480 Cihazları

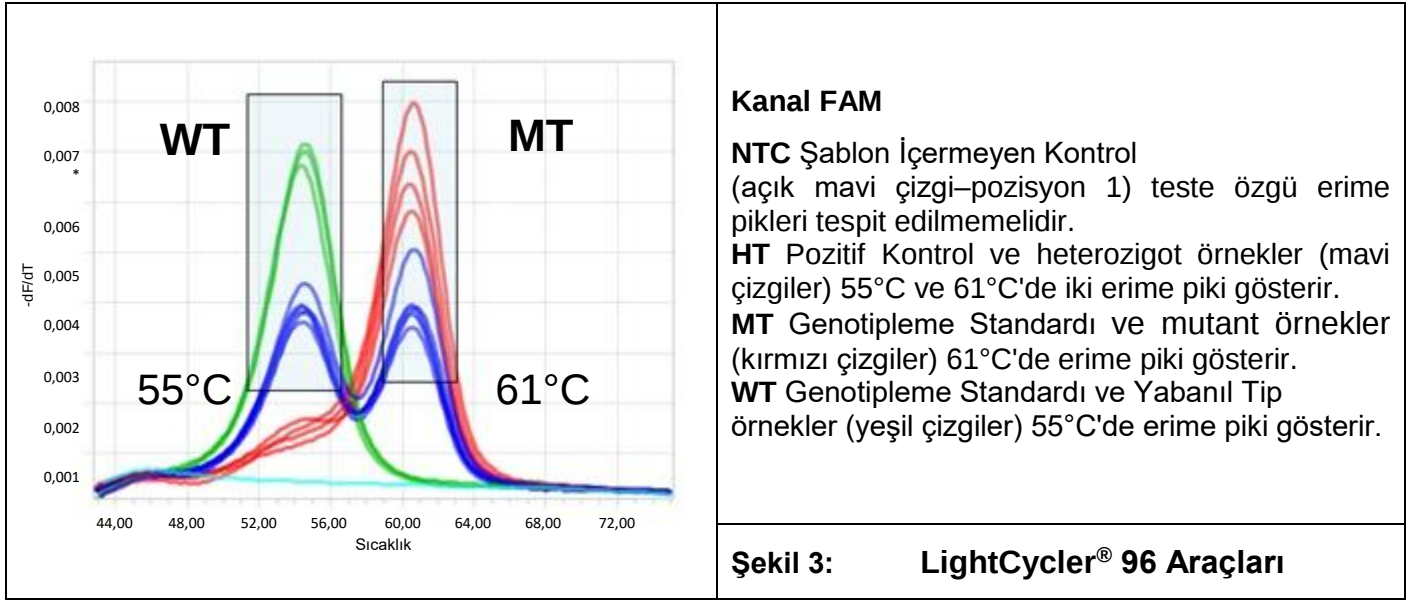


7.5.3 Erime Analizi: LightCycler® 96 Cihazları

Analiz Ekle: **Tm Çağırısı**

Verileri görüntüle: **Erime piki**

Pikleri seçmek için kullanın: **Alan işaretleyici aracı**



7.5.4 Erime Analizi: LightCycler® PRO Cihazları

Veri analizini LightCycler® PRO Sistem Kullanıcı Yardımında açıklandığı şekilde gerçekleştirin.

Hedef Sonuçlar sekmesinde sonuçları gözden geçirin ve onaylayın. Bilinmeyen örneklerin sonuçlarını onaylamadan önce erime standartlarının (**HT**, **WT**, **MT**) ve **NTC**'nin sonuçlarını onaylamak gereklidir. Sonuçların üzerine yazılabilir, üzerine yazılan sonuçlar işaretlenecektir. Sonuçların üzerine yazılabilir, üzerine yazılan sonuçlar işaretlenecektir. Örnek Sonuçları sekmesinde onaylanan sonuçlar yayınlanabilir.

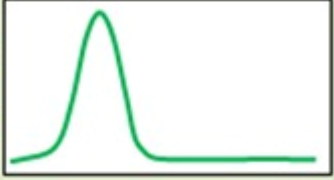
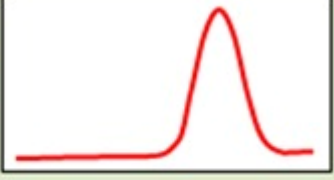
7.6. Beklenen Erime Sıcaklığı

Genotip	homozigot VKORC1 C1173	heterozigot VKORC1 C1173T	homozigot VKORC1 1173T
Erime piklerinin sayısı	1	2	1
Piklerin erime sıcaklığı	55 – 57 °C	55 – 56 °C ve 61 – 62 °C	61 – 63 °C
Pikler arası sıcaklık farkı	---	6 °C	---
Fenotip	Aseptomatik	CYP2C9 *1/*2 veya *2/*3 ile birlikte artmış Kumarin Duyarlılığı	Artmış Kumarin Duyarlılığı

Tablo 6: LightCycler® 480 Cihazlarında gerçekleştirilen tipik analiz sonuçları

7.7. Sonuçların Yorumlanması

Otomatik genotip modülü başarısızlığı durumunda, manuel erime eğrisi tanımlamasına (Tm çağırısı) geçin ve sonuçları karşılaştırın

VKORC1 C1173T Erime piki/pikleri		VKORC1 Genotipleri	Metabolizatörler Fenotip
C1173	1173T		
Erime Pikleri  Sıcaklık (°C)		VKORC1 C1173 yabanıl tip	Normal Warfarin Dozajı CYP2C9 veya diğer gen mutasyonları olmadıkça
55 - 57	-		
Erime Pikleri  Sıcaklık (°C)		VKORC1 C1173T	Yalnızca belirli CYP2C9 alelleri ile birlikte hafif artmış Kumarin Duyarlılığı
55 - 57	61- 63		
Erime Pikleri  Sıcaklık (°C)		VKORC1 1173T	Artmış Kumarin Duyarlılığı (CYP2C9'a ilave)
-	61 - 63		
ΔTm 6 °C			Tablo 7: Tipik analiz sonuçları



Erime sıcaklıklarının değişimine izin verildi:

- ±0,5 °C aynı genotipteki örnekler arasında
 - ±1,5 °C genotipleme standardı ve biyolojik örnekler arasında
 - ±1,5 °C heterozigot genotipler için erime pikleri arasındaki ΔT
 - ±1,5 °C çalışmalar arasında aynı genotipe sahip erime pikleri arasında
 - ±5,0 °C yukarıdaki çizimde rapor edilen sıcaklıklar ile yerel cihazlar arasında. Bu varyasyon cihaza bağlıdır: her zaman çalışmaya dahil edilen **Pozitif Kontrol** ile elde edilen sıcaklığa bakın
- Sonuçlarınızı bilinen alel frekansı ile karşılaştırın.

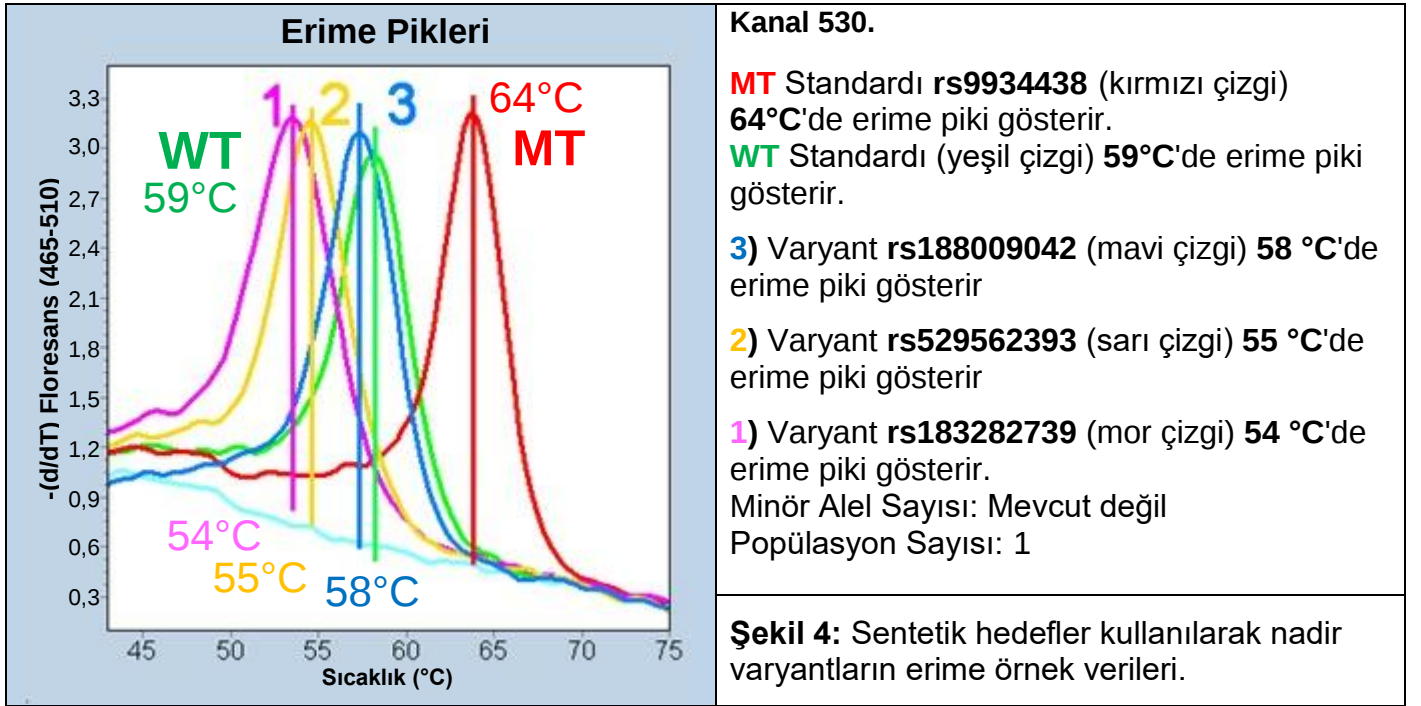
Kafkaslarda T aleli için alel frekansı = 0,3558'dir, bu nedenle yaklaşık %13 T ve %41 C homozigot sonuç bekleyin.

Varyasyonlar durumunda talimatlara bakın: **7.3.5 Anormal Erime Eğrileri**

7.8 Nadir Varyantlar

Bu cihazda kullanılan diziler diğer bilinen gen varyantları ile etkileşime girmez; yeni varyantlar genellikle WT veya MT'den farklı bir Tm piki oluşturacaktır. Testin doğru genotipi ayırt etme yeteneğini göstermek için, GeneBank'ta rapor edilen tüm varyantları taklit etmek için sentetik hedefler kullanılır (Kasım-2023). Sentetik hedeflerle elde edilen mutlak Tm değerleri biyolojik örneklerden elde edilenlerden farklı olabilir, ancak **göreceli ΔTm sabit kalmalıdır**.

Bu kit, bölüm **1.2 Kullanım Amacı**'nda belirtilenlerin dışındaki varyantları tanımlamak için tasarlanmamıştır. Anormal erime pikleri gösteren dizilerin tanımlanması için başka bir yöntem kullanılmalıdır (bkz. **7.3.5** ve **7.7**).



#	RS	Tm	HGVS	MAF
WT		59 °C		
MT	rs9934438	64 °C	NG_011564.1:g.6399C>T	A=0,33635 (42235/125568)
1	rs183282739	54 °C	NG_011564.1:g.6407T>G	C=0,00029 (36/125568)
2	rs529562393	55 °C	NG_011564.1:g.6388A>G	C=0,0002 (1/5008) ^{1000G}
3	rs188009042	58 °C	NG_011564.1:g.6393A>G	C=0,00096 (120/125568)

MAF = Minör Alel Sayısı (varyant frekansı); **MD**= mevcut değil

Deneyssel olarak test edilen rs kodlu (dbSNP) varyantlar, İnsan Genom Varyasyon Topluluğu (HGVS) nomenklatürü ve alel frekansları (TOPMed verilerine dayalı).

Sıcaklıklar (Tm) sentetik hedefler kullanılarak toplanmıştır.

Bu Tm değerleri genotipin tahmini için kullanılmamalıdır. Bölüm 7.5 ila 7.7'deki bilgileri kullanın.

8. Sorun Giderme

Cihaza özgü kodlar:	Kapiler tabanlı cihazlar	LightCycler® 96, 480 ve PRO cihazları
Olay	Olası Neden	Çözüm
Örnek algılanmadı	Santrifüj yapılmış	Kapileri santrifüj edin
Tüm PCR'lar negatif	Yanlış tespit kanalı seçimi	Analiz öncesi doğru kanalı ayarlayın
	Yanlış amplifikasyon protokolü	Cihaz programını kontrol edin
Çeşitli örnekler arasında tutarsız taban çizgisi	Yanlış pipetleme	Her örnekte karışım miktarının homojenliğini sağlayın
	Homojen olmayan reaksiyon karışımı	Reaksiyon kabına dağıtmadan önce reaksiyon karışımını temiz 200µl'lik uç ile 10 kez aşağı yukarı pipetleyin
	Multiwell plaka kötü kapatılmış	Multiwell plakanın düzgün şekilde kapatıldığından emin olun
Taban çizgisi "Testere dişi benzeri"	Kuyucukta kabarcık	Çalışma öncesi plakayı santrifüj edin
	Kapilerin karouseldeki konumu yanlış	Kapileri karousele sıkıca bastırın
Pozitif Kontrolde sinyal yok	Cihaz ayarlanırken hata	Pozitif Kontrolün pozisyon ayarlarını kontrol edin
	Yanlış PSR / MgCl ₂ konsantrasyonu	Testi tekrarlayın
	Pozitif Kontrol veya standart bozunması	Yeni bir Pozitif Kontrol veya standart alikota kullanın
NTC Şablon İçermeyen Kontrolde pozitif sinyal	Cihaz ayarlanırken hata	NTC'nin pozisyon ayarlarını kontrol edin
	Dağıtım hatası	Örnekleri, NTC, Pozitif Kontrolleri ve standartları dağıtırken çalışma sayfasına uyun
	Dağıtım hatası	Örnekler arasında her zaman uçları değiştirin
	Dağıtım hatası	Örnek test tüpü içeriğinin dökülmesinden kaçın
	PCR sınıfı suyun kontaminasyonu	Yeni bir PCR sınıfı su alikota kullanın
	Reaksiyon karışımının kontaminasyonu	Reaksiyon karışımını hazırlamak için yeni reaktif alikotları kullanın
	Amplifikasyon reaksiyonları için ekstraksiyon/hazırlama alanının kontaminasyonu	Yüzeyleri ve cihazları sulu deterjanlarla temizleyin, laboratuvar önlüklerini yıkayın, kullanımdaki test tüplerini ve uçları değiştirin
	Amplifikasyon reaksiyonları için ekstraksiyon/hazırlama alanının kontaminasyonu	Talimatlara göre reaksiyon karışımına LightCycler® Uracil DNA Glycosylase (Kat. No.03 539 806 001) ekleyin
Örneklerde sinyal yok	Düşük DNA miktarı	DNA konsantrasyonunu kontrol edin
	Örnek inhibisyonu	Örneği seyreltin ve PCR'ı tekrarlayın veya ekstraksiyonu ve PCR'ı tekrarlayın veya Pozitif Kontrol ekleyin ve tekrarlayın
Beklenen sıcaklık aralığı dışında erime eğrisi	Pozitif Kontrol ile uyumlu TM pikleri ile: Yanlış reaktif konsantrasyonu	Sonuçları manuel olarak Pozitif Kontrole göre atayın
	Pozitif Kontrol ile uyumsuz TM pikleri ile: Olası ekstraksiyon inhibitörü	DNA'yı 1:3 seyrelterek testi tekrarlayın
	Pozitif Kontrol ile uyumsuz TM pikleri ile: Olası farklı mutasyon	Testi sekanslama ile tekrarlayın ve beklenmeyen varyantı service@tib-molbiol.de adresine bildirin

9. Referanslar

1) Dean, L.

Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1.

JMedical Genetics Summaries, 2013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84174/>

2) M.J. Rieder, A.P. Reiner, B.F. Gage, D.A. Nickerson, C.S. Eby, H.L. McLeod, D.K. Blough, K.E. Thummel, D.L. Veenstra and A.E. Rettie.

Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose

New England Journal of Medicine 352; 22: June 2, 2005

3) Laurent Bodin, Céline Verstuyft, David-Alexandre Tregouet, Annie Robert, Liliane Dubert, Christian Funck-Brentano, Patrice Jaillon, Philippe Beaune, Pierre Laurent-Puig, Laurent Becquemont, and Marie-Anne Lorient

Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity

BLOOD, 1 July 2005; volume 106, number 1

4) E. Hatch, E. A. Sconce, A. K. Daly and F. Kamali

A rapid genotyping method for the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene.

J Thromb Haemost 2006; 4: 1158–9.

NCBI Reference: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs9934438>

Alıcıya Bildirim – Patentler ve Ticari Markalar

Bu ürünün satın alma fiyatı, BioFire Defense'ten lisanslı, ABD patent hakları ve ABD dışındaki karşılık gelen patent hakları kapsamında sınırlı, devredilemez bir lisans içerir. Bu lisans, yalnızca bu miktardaki ürünün söz konusu patentlerde açıklanan HybProbe testleri ve ilgili süreçler için insan tanı kullanımlarının yanı sıra alıcının araştırma ve geliştirme faaliyetleri için kullanılmasına izin verir.

Açıkça belirtilen lisanslar dışında, TIB MOLBIOL bu kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğine dair garanti vermez.

LightCycler®, MagNA Pure® ve High Pure®, Roche Diagnostics'in ticari markalarıdır.

ABI 3730xl Genetic Analyzer ve Sequencing Analysis, Applied tarafından tescilli ürünlerdir.

LightMixx®, TIB MOLBIOL'un ticari markasıdır. SimpleProbe®, hibridizasyon problemleri ve LightMixx® Kitleri Roche'tan lisanslı olarak üretilmektedir.

Versiyon Geçmişi

Kırmızı ile işaretlenen notlar laboratuvar prosedürlerinin değiştirilmesini gerektiren olayları belirtir

Mavi ile işaretlenen notlar bileşimdeki iyileştirmeleri ve değişiklikleri belirtir

Versiyon	Olay	Tarih
V180404	7.8.2 MAF değerleri içeren tablo eklendi	04/04/2018
V190123	7.7 Sorumluluk reddi beyanı eklendi; MAF değerleri güncellendi; EDMA düzeltildi	11/02/2019
V241024	LightCycler® PRO ve MagNa Pure24 eklendi. LightCycler® Nano ve FastStart DNA Master HybProbe kaldırıldı. Editöryal değişiklikler.	24/10/2024
V241024	Bıçimlendirme ve dil sürümü	26/05/2025

Cihaz gözlemlerini, sapmaları ve sorunları lot numarası/numaraları ve kısa bir hata açıklaması ile birlikte yerel Roche temsilcinize bildirin.

Üretici:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlin, Almanya
www.tib-molbiol.de

