

# 2X HRM-OLC Mix

## Kullanım Kılavuzu

**Tablo 1. Ürün İçeriği ve Saklama Koşulları - Raf Ömrü: 1 Yıl**

Bileşen İsmi	İçerik	Adet			Saklama
		500 Test	1000 Test	5000 Test	
2X HRM-OLC Mix	2x qPCR mix ve HRM boyası karışımı	1x2500 µL	1x5000 µL	5x5000 µL	-20 °C

**Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Ekipman ve Sarflar**

**1)** Real Time PCR Cihazı (1 adet): FAM/SybrGreen kanallı, Rampa hızı  $\geq 3^{\circ}\text{C}/\text{sn}$ . **2)** 1-10 µL Mikropipet (2 adet): Ayarlanabilir hacimli. **3)** 100 µL PCR tüp pasif soğuk bloğu (1 adet). **4)** 2,0 mL tüp pasif soğuk bloğu (1 adet). **5)** 1-10 µL Mikropipet Ucu: DNaz içermeyen. **6)** qPCR tüp ve kapağı/PCR Plate: Real time PCR cihazı ile uyumlu, DNaz içermeyen. **7)** Quick Spin Santrifüj (1 adet): Min. 3000 rpm. **8)** PCR Kurulum UV Kabini (min. 1 adet): Çalışma zemini paslanmaz çelik; UV koruma en az % 99,9.

**Prensip:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında yüksek çözünürlükte erime eğrisi (HRM) analizi. Çoğaltılan ampikonların sekans içeriğine ve uzunluğuna göre sıcaklık artışı sırasında ki çift ipliğinin açılması oldukça spesifik bir grafik oluşturur. Yüksek hassasiyette interkalatif boyalar kullanılarak, çift ipliğin açılmasıyla oluşan floresan ışınması miktarındaki düşüş anlık okumalarla belirlenir ve bu sayede farklı sekanslar ayrılabilir. Mix içerisindeki DNA Polimeraz, 5'  $\rightarrow$  3' DNA polimeraz aktivitesine, 3'  $\rightarrow$  5' (prodreadeading) eksonükleaz aktivitesine, sıcaklığa bağlı iplik-yer değiştirme aktivitesine sahiptir ve amplifikasyon ürünlerinde kör uçlar oluşturur.

**Kullanım Amacı:** Nükleik asit izolatlarında hedef gen bölgelerinin çoğaltılması ve yüksek çözünürlükte erime eğrisi (HRM) analizi yöntemiyle farklı organizmalardaki ortak lokuslarda mevcut olan sekans farklılığının belirlenmesi.

**Uyarılar:** 1) *Bio-Speedy® 2X HRM-OLC Mix*, genel laboratuvar uygulamaları için kullanılmaktadır. Herhangi bir klinik amaç/ tıbbi tanı için kullanımı önerilmemektedir. Bu kitlerin, kullanılacağı analizlere uygun olup olmadığı kullanıcının inisiyatifindedir. 2) Ürün, kontaminasyon ve aktivasyon kaybı risklerine karşı küçük hacimlere bölünerek saklanabilir. Aktivite kaybına karşı karanlık ortamda

saklanmalıdır. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla, herhangi bir DNA, RNA ve özellikle de amplifiye nükleik asit kaynağından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir. 3) Ürün içeriği, aynı isimli fakat farklı lot numaralı ya da farklı üreticilerin ürettikleri reaktifler ile karıştırılmamalıdır. 4) Ürünün raf ömrü 1 yıldır. Açılmamış olmasına rağmen son kullanım tarihi geçmiş olan ürün kullanılmamalıdır. 5) Ürün PCR kurulumu sırasında, mümkünse soğuk blok üzerinde bekletilmelidir ve PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir. Kullanım öncesinde hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır. 6) Nükleik asit izolasyonunun gerçekleştirildiği alan ile, PCR kurulumunun yapıldığı alan farklı olmalıdır. Benzer şekilde, qPCR mikslerinin tüplere dağıtıldığı alan ile, kalıp DNA'ların tüplere eklendiği alanın ayrı odalarda olması; bu mümkün değilse farklı tezgahlarda olması sağlanmalıdır. Ayrıca, qPCR miksleri ve kalıp DNA'ları pipetlemek için kullanılan mikropipetler ayrı olmalıdır. 7) Kalıp DNA ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır. 8) PCR Kurulum UV Kabini her çalışma günü başlangıcı ve sonunda en az 15 dakika boyunca UV'ye maruz bırakılmalıdır. Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10'luk NaClO ile temizlenmelidir. 9) Çalışma esnasında temiz ve yeni eldivenler kullanılmalıdır. 10) qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan bertaraf edilmelidir.

### UYGULAMA PROTOKOLU

**Tablo 2. PCR kurulumu:** 1) Kurulumdan önce uyarılar okunmalıdır. 2) Tabloda yer alan bileşen miktarları 1 reaksiyon içindir. İstendiğinde numune sayısı ve kontrol reaksiyonlarının toplamına yetecek miktarda PCR-Mix (2X HRM Mix+ Primerler+ moleküler ölçekli su) hazırlanıp PCR tüplerine dağıtılabilir. 3) Real-Time PCR cihazı programlanırken, Erime Eğrisi Analizi 65 °C - 95 °C arasında ve Ramp Rate = 0.1 °C/sn (süreklilik okuma) olacak şekilde ayarlanmalıdır.

Bileşen	Kurulum Yeri	Eklenme Sırası	Hedef qPCR (1 Reaksiyon için)	Negatif Kont. qPCR (1 Reaksiyon için)	Poz. Kontrol qPCR (1 Reaksiyon için)
2X HRM-OLC Mix	qPCR mix ekleme alanı	1	5 µL	5 µL	5 µL
Primer-Forward (10 pmol/µL)		2	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Primer-Reverse (10 pmol/µL)		3	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Moleküler Ölçekli Su		4	2 µL	4 µL	2 µL
DNA İzolatı (Numune)	Kalıp DNA ekleme alanı	5	2 µL	-	-
PC (Poz. Kont.)-Hedef		6	-	-	2 µL
TOPLAM REAKSİYON HACMİ =			10 µL	10 µL	10 µL