

Salmonella sp. Real-time PCR Tespit Kiti
Protokolü

PD-S001-01

50 Reaksiyon

İnternal Pozitif Kontrol (IPC):




- Olası PCR reaksiyonunu engelleyen maddelerin (PCR inhibitör) varlığını belirlemek için *Salmonella* sp. probe Mix, primer ve probe seti ile Internal Pozitif Kontrol (IPC) template içermektedir.

GİRİŞ:

- *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden olan *Salmonella* spp. doğada, hayvanlarda ve insanda bulunan, çok basit ve çabuk üreyen mikroorganizmadır. *Salmonella* gıda yoluyla bulaşan hastalıklar içerisinde önemli bir yer almaktadır. İnsanlarda bağırsak ve safra kesesinde taşıyıcı halinde bulunan *salmonella*'nın 150'den fazla çeşidi bulunmaktadır. *Salmonella* tavukların yumurtalıklarında bulunan bir bakteridir ve pişmemiş etlerde, tavuklarda ve yumurtada bulunma olasılığı mevcuttur.
- **BM *Salmonella* Tespit Kiti** *invA* genine özgü olarak, bütün patojen *Salmonella* türlerinin spesifik ve hassas tespiti için tasarlanmıştır. Kitte kullanılan primer seti gelişmiş biyoinformatik analizler ile geniş kapsamlı referans DNA dizileri ile %100 benzerlik göstermektedir.

KİTİN İÇERİĞİ:

- *Salmonella* sp. Real-Time PCR tespit Kiti 50 örneğin testi için tasarlanmıştır.

Bileşen	Tüp Rengi	Hacim (µl)	Tüp Sayısı
qPCR Master Mix (PMM)		250	1
<i>Salmonella</i> sp. Probe Mix (HPM)		200	1
PCR Grade Water (NC)		1000	1

Kullanım ve Saklama Koşulları:

- Kitin tüm bileşenleri -20°C sıcaklığında saklanmalıdır.
- Mümkün olduğunca çözme/dondurma sayısı en aza indirilmesi tavsiye edilmektedir.

PROSEDÜR:

Ön-zenginleştirme:

- Aseptik şartlarda 25 gram gıda stomacher poşetlerine tartılarak üzerlerine 225 ml TPS eklenir.
- Örnekler stomacher poşetleri ile 37°C'lik inkübatöre kaldırılır.
- Ertesi gün her numuneden 1 ml alınarak bakteri DNA izolasyon kiti veya kaynatma yöntemleri ile DNA ekstraksiyonu yapılır.

▪ Kaynatma yöntemiyle DNA izolasyonu:




- Ön-zenginleştirme örneğinden 1 mL alınarak mikrosantrifüj tüpünde 10 dakika süreyle 14,000 RPM de santrifüj yapılır. Hücrelerin çökmesiyle üstte kalan sıvı atılır.
- Pellet'in üzerine 300 µL steril saf su eklenip vorteks yaparak tekrar çözülür.
- Tüp 5 dakika 14,000 RPM de santrifüj edilerek üstteki sıvı dikkatlice atılır.
- Pellet'in üzerine 200 µL steril saf su eklenip vorteks yaparak çözülür.
- Tüp 15 dakika 100°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra hızlıca buz üzerine kaldırılır.
- Tüp 5 dakika 14,000 RPM de santrifüj edilerek üstteki sıvı dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarılır. Tüp 10 dakika 100°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra hızlıca buz üzerine kaldırılır. PCR çalışmaları için elde edilen örnekten 3-5 µL kullanılır.

PCR UYGULAMASI:

1. DNA kontaminasyon riskini azaltmak için pipetleme işlemlerinin özel kabin veya PCR'a uygun temiz ortamda ve filtreli pipet uçları ile yapılması tavsiye edilmektedir.
2. PCR cihazında uygun programın ayarlanması için döngü sayısı, sıcaklıklar ve süreleri altta verilen tablodaki gibi düzenlenmelidir.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	15 dk.	1
95°C	15 sn	40
60°C	1 dk	

3. PCR cihazı programında her örneğin iki hedef gen bölgesi için FAM ve JOE olarak iki boya tipi işaretlenmelidir. Passive Reference Dye olarak ROX boyası seçilmelidir.
4. Kitteki solüsyonlar -20°C çıkarılarak çözülür.
5. PCR mikisinin hazırlanması için bir tüp alınarak hedef gen adı ile işaretlenir.
6. Alttaki tablo örnek alınarak PCR master mikisinin hazırlanır:

Bileşen	Tüp Rengi	Bir Örnek için	NTC Örneği için
qPCR Master Mix (PMM)		5 µl	5 µl
<i>Salmonella sp.</i> Probe Mix (HPM)		4 µl	4 µl
DNA (5-100 ng/µl)		1-5 µl	-
PCR Grade Water		25 µl'ye tamamlanır	16µl

Not: Pipetleme sırasında PMM ve HPM için ayrı pipet uçları kullanılmalıdır.

Not: Tabloda verilen hacimler bir örnek içindir. Pipetleme hatası göz önüne alarak, Master miksi hazırlarken toplamda %10 daha fazla Miks hamcı için hesaplama yapılmalıdır.

7. Tekrarlı çek-boşalt pipetleme ile hazırlanan miksin karışımı yapılır.
8. Hazırlanan master miksten alınarak optik kapaklı tüplere veya real-time PCR plate kuyucuklarının dibine dağıtılır.
9. DNA örneğinden 3-5 µl alınarak miksin içerisine eklenir. Tekrarlı çek-boşalt pipetleme ile örneğin miks ile karışması sağlanır.

Not: Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.

10. NTC örneği için DNA yerine PCR Grade Su eklenir.
11. Tüplerin kapağı kapatılır veya plate'in özel filmi üzerine yapıştırılır.
12. Örnekler real-time PCR cihazına yerleştirilir ve önceden hazırlan uygun program çalıştırılır.

SONUÇLARIN ANALİZİ:

PCR programı sona erdikten sonra çıktıların saklanması için çalışma dosyası kayıt edilerek sonuçların analizi için altta verilen prosedür izlenilir:

1. Oluşan amplifikasyon eğrileri bütün örnekler için görüntülenir.
2. Base Line ve Threshold (C_t) değerleri belirlenir.
3. Hedef gen boyası (FAM) ve IPC (JOE) ile elde edilen amplifikasyonlar belirlenir. Amplifikasyon oluşma durumuna bağlı olarak hedef gen ve IPC sonuçları pozitif (+) veya negatif (-) olarak değerlendirilir. Elde edilen sonuçların analizi için alttaki tablo temel olarak kullanılabilir:

FAM Boyası ile elde edilen Sinyal (hedef gen)	JOE Boyası ile elde edilen Sinyal (IPC)	Sonuç
+	+, -	Pozitif
-	+	Negatif
-	-	PCR reaksiyonu çalışmamıştır