

Listeria *Monocytogenes* Real-time PCR Tespit Kiti
Protokol

PD-LM001-01

50 Reaksiyon

İnternal Pozitif Kontrol (IPC):




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

GİRİŞ

- *Listeriaceae* familyası üyelerinden olan *Listeria monocytogenes*, toprak, su ve kümes hayvanları ve sığırlar gibi bazı hayvanlarda bulunan bir bakteridir. Bu bakteri ham süt ve çiğ süttten yapılan gıdalarda mevcut olabilir. Ayrıca gıda işleme tesislerinde de yaşayan bu patojen, çeşitli işlenmiş et ürünlerini kirletebilir.
- **BM *Listeria monocytogenes* PCR Tespit Kiti** *hly* genine özgü olarak, bütün *Listeria monocytogenes* türlerinin spesifik ve hassas tespiti için tasarlanmıştır. Kite kullanılan primer seti gelişmiş biyoinformatik analizler ile geniş kapsamlı referans DNA dizileri ile %100 benzerlik göstermektedir.

KITIN İÇERİĞİ:

- *Listeria monocytogenes* Real-Time PCR tespit Kiti 50 örneğin testi için tasarlanmıştır.

Bileşen	Tüp Rengi	Hacim (µl)	Tüp Sayısı
qPCR Master Mix (PMM)		250	1
<i>Listeria monocytogenes</i> 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 ve DNA izolasyonu




- Aseptik şartlarda 25 gram gıda stomacher poşetlerine tartılarak üzerlerine 225 ml half-fraser broth eklenerek 30°C derecede 18-24 saat tutulur
- Daha sonra stomacher'dan 0,1 ml alınıp steril koşullarda 10mL Fraser Broth içeren tüplere eklenir ve 37°C derecede 18-24 saat tutulur.
- Ertesi gün her numuneden 1 ml alınarak bakteri DNA izolasyon kiti DNA ekstraksiyonu yapılır.

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 Cy5 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. Altta tablo örnek alınarak PCR master mikisin hazırlanır:

Bileşen	Tüp Rengi	Bir Örnek için	NTC Örneği için
qPCR Master Mix (PMM)		5 µl	5 µl
<i>Listeria monocytogenes</i> Probe Mix (HPM)		4 µl	4 µl
DNA (5-100 ng/µl)		1-5 µl	-
PCR Grade Water (NC)		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 (Cy5) 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:

Cy5 Boyası ile elde edilen Sinyal (hedef gen)	JOE Boyası ile elde edilen Sinyal (IPC)	Sonuç
+	+, -	Pozitif
-	+	Negatif
-	-	PCR reaksiyonu çalışmamıştır