

***S.pyogenes* DNA İzolasyonu ve Q-PCR Tespit Kiti**

Kısa Uygulama Protokolü

- 1- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünün içerisine 400 µl DNA tamponu eklenir
- 2- Eküvyon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünün içine yerleştirilir, tüpten taşan kısım kesilir, tüpün kapağı kapatılır ve 1 dk 2500 RPM'de vorktekslenir.
- 3- Tüp 10 dak 95 °C'de inkübe edilir.
- 4- Tüp 14000 RPM'de 5 sn santrifüj edilir. Tüpte oluşan üst sıvı faz, bir sonraki adımda kalıp DNA olarak kullanılır.
- 5- Tablo 1'de belirtilen şekilde reaksiyonlar hazırlanır

Tablo 1. Q-PCR'in kurulması

Reaksiyon bileşeni	Rxn GAS	Rxn GAS +	Rxn -
Oligo GAS	8,9 µL	8,9 µL	8,9 µL
RXN	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL
PZT Kontrol		1 µL	
Kalıp DNA	1 µL	1 µL	
Toplam	10 µL	11 µL	9 µL

- 6- Q-PCR cihazı programlanır: Ön inkübasyon 1 x (1 dk 98 °C); Çoğalma 35 x (5 sn 95 °C, 25 sn 60 °C, tek floresan okuma); Erime eğrisi 1 x (76-90 °C, 0,5 °C/sn sürekli floresan okuma)
- 7- Sonuçlar Tablo 2'ye göre yorumlanır

Tablo 2. Q-PCR sonuçlarının yorumlanması

	Reaksiyon Tipi	82-85 °C arası Tm	Sonuç
Örnek 1	Rxn GAS	Evet	AGBHS +
	Rxn GAS +	Evet	
	Rxn -	Hayır	
Örnek 2	Rxn GAS	Hayır	AGBHS -
	Rxn GAS +	Evet	
	Rxn -	Hayır	
Örnek 3	Rxn GAS	Evet	DENEYİ TEKRARLA: Tüm reaksiyon bileşenlerinin yeni stoklarını kullan Yeni pipet seti ve filtreli uçları kullan
	Rxn GAS +	Evet	
	Rxn -	Evet	
Örnek 4	Rxn GAS	Hayır	DENEYİ TEKRARLA: Testi RXN bileşeni 0,2 µL DNA kalıbı 0,5 µL olacak şekilde tekrar et
	Rxn GAS +	Hayır	
	Rxn -	Hayır	