



IU
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing)
REAKSİYONU TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-023
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :1 / 3

1. AMAÇ

Bu talimat, Kanser Genetiği Laboratuvarlarındaki gen analizleri sırasında kullanılan moleküler biyolojik tekniklerden biri olan Dizi analizi (Sanger dizi analizi) işlemi için gerekli PZR ile çoğaltma işleminin (DTCS Reaksiyon prosedürü) dizi analizi metodu için tam ve doğru bir şekilde yapılması için oluşturulmuştur.

2. KAPSAM

Bu talimat, DTCS reaksiyonu ile ilgili gen bölgesinin tek iplik halinde PZR ile çoğaltılması işlemi ile PZR ürünün etanol ile çöktürme işlemini kapsamaktadır.

3. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvarı çalışanları

4. UYGULAMALAR

4.1. Bu işlemde, Kanser Genetiği Laboratuvarı'nda bulunan ve laboratuvarın demir başı olan Beckman Coulter CEQ8000 cihazı ile uyumlu kitler kullanılmaktadır. Kitler kullanım süresi boyunca -30°C'de saklanmaktadır. Bu işlem için **Beckman Coulter GenomeLab-Quick Start Kit** kullanılır. Kitin bileşenleri; 880 µL Quick Start Mix, 240 µL Sequencing Primer, 20 µL Control template, 110 µL Glikojen, 5mL Mineral yağ, 6 mL Sample Loading Solution' dan oluşmaktadır.

4.2. Bir DTCS Reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlanır:

DNA Template: 2 µL (Safleştirilmiş üründen 100-200 ng)

DTCS Quick Start Master Mix: 5 µL

Primer: 0,7 µL (Her bir fragment için uygun sekanslama primeri)

dH₂O: 11,8 µL

4.3. Reaksiyon karışımları ve her bir örnek için özel tüp hazırlanıp isimlendirildikten sonra, örnekler PZR cihazına PZR cihazı Kullanma talimatına uygun bir şekilde yüklenir ve daha önceden PZR cihazına azılmış olan CEQ DTCS isimli program kullanılarak DTCS reaksiyonu PZR işlemine tabi tutulur.

HAZIRLAYAN

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN

ONAYLAYAN

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



IU
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing)
REAKSİYONU TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-023
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :2 / 3

4.4. PZR CİHAZINDA CEQ DTCS PROGRAMI:

35 Döngü

96°C 20sn

55°C 20sn

60°C 4dk

4.5. Tüm bu işlemler her bir hasta için “**DTCS Reaksiyon İşlem Formu**” ile kayıt altına alınır.

4.6. CEQ DTCS programı sona erdikten sonra ürünler PZR cihazından çıkarılıp etanol çöktürme işlemine geçilir. Bu işlem “**Etanolle Çöktürme İşlem Talimatı**”na göre yapılır.

4.7. Bu işlem sonunda oluşabilecek her türlü kayıp “**Materyal Kayıp İzlem Formu**” ile kayıt altına alınır.

5. KAPİLER JEL ELEKTROFOREZİ

5.1. “Etonelle Çöktürme İşlem Talimatı’na göre işlenen ve 96’lık plakalara yüklenmiş örnekler, Kapiller jel elektroforez cihazına jel ve buffer yüklendikten sonra fragment uzunluklarına göre LFRa, LFRb, LFRc programlarında yürütülür.

5.2. Çıkan sonuçlar cihaz üzerindeki yazılım programı ile ön elemeyen geçirilerek her bir gene özgü gen haritası ile pikler karşılaştırılarak okunur.

5.3. Okunan sonuçlar her bir fragmente özgü “**Dizi Analizi Değerlendirme Formları**”na kaydedilir.

5.4. Çıkan sonuçlar değerlendirilemeyecek düzeyde olduğunda, durum “**Materyal Kayıp İzlem Formu**” ile kayıt altına alınır ve işlem kapiler elektroforez aşamasından ya da baştan tekrarlanır.

6. GÜVENLİK

DTCS reaksiyon kiti formamid ve %10’dan az metanol olmak üzere toksik maddeleri içermektedir. Formamid’ in deri ve gözle temasından sakınılmalıdır.

Metanol ise solunmamalı, göz ve deri ile temasından kaçınılmalıdır. Göz ve deri ile temas durumunda tema bölgeleri bol su ile tıkanmalıdır. Soluma ya da yanlışlıkla içme durumunda medikal müdahale gereklidir.

7. SAKLAMA KOŞULLARI

96’lık plakalara yüklenen örnekler kapiler elektroforez yapılmayacak ise ışık görmemesi için Alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C’ de 3 gün boyunca saklanabilir.

HAZIRLAYAN

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN

ONAYLAYAN

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



IU
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing)
REAKSİYONU TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-023
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :3 / 3

8. ATIK PROSEDÜRÜ

Bu işlem sırasında oluşan atık kimyasallar ve malzemeler kırmızı kapaklı sarı atık kutularında kapağı sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra “Çevre ve Atık Yönetim Talimatı”na göre laboratuvarından uzaklaştırılır.

9. İLGİLİ DÖKÜMANLAR

- 9.1. DTCS Reaksiyon İşlem Formu
- 9.2. Etanolle Çöktürme İşlem Talimatı
- 9.3. Dizi Analizi Değerlendirme Formları
- 9.4. Materyal Kayıp İzlem Formu
- 9.5. Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı

HAZIRLAYAN

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN

ONAYLAYAN

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM