



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification Assay)
İŞLEM TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-026
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 2

1. AMAÇ

Kanser Genetiği Laboratuvarı'nda yapılan gen analizlerinde dizi analizi yöntemi ile tespit edilemeyen büyük gen delesyon / duplikasyonlarının saptanmasında kullanılan MLPA işleminin tam ve doğru olarak yapılması amacı hazırlanmıştır.

2. KAPSAM

MLPA analizi için gerekli reaksiyon işlemleri ile fragment analizi işlemlerini kapsamaktadır.

3. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvarı çalışanları

4. UYGULAMALAR

4.1. DENATÜRASYON

- Çalışılacak hastaya ait örnekler 5 µL hacim içinde 45ng DNA içerecek şekilde hazırlanır. Dilüsyon gerekli ise moleküler biyoloji seviyesinde su kullanılır.
- 5µL hacimde hazırlanan örnekler 0.2 mL'lik tüplere yerleştirilir. Thermalcycler'a yerleştirilen tüpler 98°C'de 8 dakika bekletilir, ardından sıcaklık 25°C'ye düşürülür.
- Kit içerisinde bulunan SALSA Probe Mix ile MLPA Buffer 1.5:1.5 oranında karıştırılarak tüp başına 3 µL karışım dağıtılır. Bu işlem 25°C'de gerçekleştirilir.
- Tüpler 95°C'de 1 dakika bekletildikten sonra 60°C'de 18 saat inkübasyona bırakılır

4.2. LİGASYON

- 60°C'deki inkübasyonun ardından thermalcycler 54°C'ye getirilir.
- Reaksiyon başına 3 µL Ligase Buffer A, 3 µL Ligase Buffer B, 25 µL moleküler seviyede H₂O ve 1 µL Ligase-65 enzimi içeren miks hazırlanır ve tüplere 32 µL dağıtılır.
- 54°C'de 15 dakika inkübasyon yapılır ve ardından 98°C'de 5 dakika bekletilir, 20°C de tüpler bekletilir.
- Ligasyon ürünleri 1 hafta boyunca 4°C'de saklanabilir.

4.3. PCR

- Reaksiyon başına 2 µL SALSA Primer mix, 7.5 µL moleküler seviyede H₂O ve 0.5 µL polimeraz karıştırılarak PZR karışımı hazırlanır. Polimeraz enzimi -20°C'den çıkarıldığında hemen pipetlenmesi enzime zarar verebilir, bu nedenle oda sıcaklığında biraz ısındıktan sonra pipetlenmelidir.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL
EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification Assay)
İŞLEM TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-026
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 2

• PZR karışımı tüplere dağıtıldıktan sonar 95°C 30sn, 60°C 30sn, 72°C 60sn sıcaklıklarında 35 döngü gerçekleştirilir. 35 döngünün bitiminde 72°C’de 20 dakika bekletilen tüpler, 15°C’ye soğutulur.

• Hazırlanan karışım kullanılana kadar buz içinde saklanmalıdır.

4.4. KAPİLER JEL ELEKTROFOREZİ

• PZR cihazından çıkan örneklerden 0.7µL alınır, reaksiyon başına 32 µL Sample Loading Solution ve 0.2 µL Size Standard 600 ile karıştırılarak kapiler jel elektroforezi gerçekleştirilecek kuyucuklara yüklenir.

• Kapiller jel elektroforezi cihazı yeterli miktarda jel ve buffer ile doldurulduktan sonra hazırlanan örnekler “Fragment Analysis” programında yürütülür.

• Çıkan sonuçlar Coffalyser isimli yazılım kullanılarak analiz edilir ve test sonuçlanır.

• Sonuçlar “**MLPA Analizi Değerlendirme Formu**”na kaydedilir.

• Çıkan sonuçlar değerlendirilemeyecek düzeyde olduğunda durum “**Materyal Kayıp İşlem Formu**” ile kayıt altına alınır ve süreç kapiler elektroforez aşamasından ya da baştan tekrarlanır.

4.5. GÜVENLİK

• Kontaminasyonun engellenmesi ve çalışan güvenliği açısından eldiven kullanmak gereklidir.

• Kit içeriklerinin deri ile temasından kaçınılmalıdır. Temas halinde temas noktaları bol su ile yıkanmalıdır.

4.6. SAKLAMA KOŞULLARI

İşlemede kullanılan kitler ve kimyasallar -30°C’ de, işlenmiş örnekler ise bir hafta boyunca 4°C’ de karanlıkta saklanabilir.

4.7. ATIK PROSEDÜRÜ

Reaksiyonda kullanılan tüm tüp ve uçlar, kırmızı kapaklı sarı tıbbi atık kutusuna atılır ve “**Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı**” na göre laboratuvardan uzaklaştırılır.

5. İLGİLİ DOKÜMAN

5.1. MLPA Analizi Değerlendirme Formu

5.2. Materyal Kayıp İşlem Formu

5.3. Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL
EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM