



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
SAFLAŞTIRMA TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-028
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :1 / 3

1. AMAÇ

Elde edilen PZR ürününü içerisinde bulunan ve reaksiyon sonrasında işlem dışı kalan enzimler, tampon maddeler ve diğer kimyasallardan uzaklaştırıp, sekanslama işlemi için saf PZR ürünü haline getirmek amacıyla bu işlem uygulanır.

2. KAPSAM

- Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilen bir ürün, içerisinde ekstra olarak kalan tuzlar, mineral yağlar, enzimler ve proteinleri bulundurur. Bu maddeleri reaksiyon ürününden uzaklaştırmak için ürünler, pH dengesi sağlanmış çeşitli kimyasal malzemeler ile koyun yünü içeren kolonlardan geçirilir.
- Saflaştırılmış DNA içinde 100bp 'den küçük DNA fragmentleri yoktur.
- Bağlanma Tamponu: PZR ürününün kolondaki filtreye bağlanmasını sağlar.
- Yıkama Tamponu: PZR ürününün içinde bulunan harici maddelerin uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla kullanılır.
- Elüsyon Tamponu: Filtreye tutunmuş olan DNA'nın kolondan ayrılarak tüp içerisine alınmasını sağlar.

3. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvar çalışanları

4. UYGULAMALAR

4.1. İşlem Basamakları

- 2 mL'lik tüpe önce en fazla 6 ürün olacak şekilde ve birbiri ardına gelmeyen ekzonları içerecek şekilde PZR ürünleri ardından reaksiyon hacminin 5 katı olacak şekilde Bağlanma Tamponu eklenir. PZR ürünleri aşağıda yazılan şekilde birleştirilir. Bu işlemler "**Saflaştırma İşlem Formu**" ile kayıt altına alınır.

EXON11 HARİCİ ÜRÜNLERDE BRCA1 İÇİN:

- (EX2+EX3+EX5+EX7+EX8+EX9) birleştirilir,
- (EX10+EX12+EX13+EX14+EX15+EX16) birleştirilir,
- (EX17+EX18+EX19+EX20+EX21+EX22+EX24) birleştirilir.

EXON11 HARİCİ ÜRÜNLERDE BRCA2 İÇİN:

- (EX2+EX12+EX4+EX5,6,7+EX8+EX9) birleştirilir,
- (EX3+EX13+EX14+EX15+EX16+EX23) birleştirilir,
- (EX18+EX19+EX20+EX21+EX22+EX17) birleştirilir,

HAZIRLAYAN:	GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:	ONAYLAYAN:
SÜREÇ SORUMLUSU	KALİTE TEMSİLCİSİ	BAŞHEKİM



IÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
SAFLAŞTIRMA TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-028
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :2 / 3

➤ (EX24+EX25+EX26+EX27A) birleştirilir.

• EXON11 ÜRÜNLERİ İÇİN, Birbiri ardına gelen fragmentler overlap bölgeleri içerir ve dizilemede problem yaratır. Bu nedenle PZR ürünleri aşağıdaki şekilde birleştirilmelidir.

➤ (B1EX11.1+ B1EX11.3+ B1EX11.5+ B1EX11.7+ B1EX11+B2EX10A) birleştirilir,

➤ (B1EX11.2+ B1EX11.4+ B1EX11.6+ B1EX11.8+ B2EX11.1+ B2EX10B) birleştirilir,

➤ (B2EX11.2+B2EX11.4+B2EX11.6+B2EX11.8+B2EX11.10+B2EX11.12) birleştirilir,

➤ (B2EX11.3+B2EX11.5+B2EX11.7+B2EX11.9+B2EX11.11+B2EX10C) birleştirilir.

• Hazırlanan ürün ve bağlanma tamponu karışımı, daha önceden kodlanmış kolonlara koyulur. 14000 rpm' de 3 dk santrifüjlenir alt sıvı dökülür.

• 500 µL yıkama tamponu kolona eklenir.

• 14000 rpm' de 3 dk santrifüjlenir ve alt sıvı dökülür.

• 200 µL yıkama tamponu eklenir.

• 14000 rpm 3 dk santrifüjlenir. Kolonun altında bulunan toplama tüpü atılır.

• Kolonlar daha önceden kodları yazılmış 1.5 mL' lik tüplere yerleştirilir.

• Üzerine 10 µL elüsyon tamponu koyulur.

• 14000 rpm' de 3dk santrifüj yapılır.

• Sonra tekrardan kolondaki exon sayısı kadar elüsyon tamponu eklenir.

➤ 1exon: 8 µL

➤ 2exon:12 µL

➤ 3exon:15 µL

➤ 4exon:18 µL

➤ 5exon:22 µL

➤ 6exon:25 µL

➤ 7exon:27 µL eklenir.

• 14000 rpm' de 3dk santrifüj yapılır.

• Kolon atılır ve ürünler % 1,5' lik agaroz jele yüklenerek kontrolü gerçekleştirilir.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL
EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



**İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
SAFLAŞTIRMA TALİMATI**

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-028
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No :3 / 3

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

4.2. Güvenlik

- Saflaştırma yapmadan önce kolonların doğru bir şekilde kodlanmasına dikkat edilmelidir.
- Çalışan kişi mutlaka eldiven ile ve koruyucu diğer önlemleri alarak çalışmalıdır.

4.3. Saklama Koşulları

Ürünler +4°C' de kapaklı rakların içerisinde saklanır.

4.4. Atık Prosedürü

İşlem sırasında kullanılan tüpleri, kolonlar ve DNA bulaşan malzemeler **“Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı”**na göre ve kırmızı kapaklı sarı kutulara atılarak uzaklaştırılır.

5. İLGİLİ DOKÜMAN

- Saflaştırma İşlem Formu
- Materyel Kayıp İzlem Formu
- Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL
EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM