



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 6

1. AMAÇ

Bu talimat, Kanser Genetiği Laboratuvarlarındaki gen analizleri sırasında kullanılan moleküler biyolojik tekniklerden biri olan Yeni Nesil Dizi analizi (NGS) işlemi için gerekli PZR ve diğer işlemlerin tam ve doğru bir şekilde yapılması için oluşturulmuştur.

2. KAPSAM

Bu prosedür, Kanser Genetiği Laboratuvarı'nda yeni nesil dizileme sistemi ile çalışma için yapılan tüm işlemleri kapsar.

3. KISALTMALAR

- PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Bilim Dalı Başkanı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Biyolog/ Moleküler Biyolog, Genetik Uzmanı, Genetik Danışman, Laborant/Teknisyen

5. UYGULAMALAR

5.1. DNA Örneklerinin Hazırlanması

5.1.1. DNA "DNA İZOLASYONU TALİMATI" na göre izole edilir.

5.1.2. İzole edilen DNA' nın konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile ölçülür. Konsantrasyon ≥ 20 ng/ μ l olmalıdır. Aynı zamanda DNA' nın saflığı da Nanodrop' ta kontrol edilmelidir. OD260/280 ve OD260/230 değerleri ≥ 1.8 olmalıdır.

5.1.3. DNA' nın saflamığı "DNA/PZR/SAFLAŞTIRMA KALİTE KONTROL TALİMATI" na uygun olacak şekilde %1' lik agaroz jelde kontrol edilmelidir.

5.2. MASTR PZR' in Hazırlanması

5.2.1. Tüm PZR mix içeren tüpler oda sıcaklığına çıkarılmalı, çözünmesi sağlandıktan sonra vortekslenmeli ve çalışmadan 10 sn. önce santrifüjlenmelidir.

5.2.2. PZR tüpleri isimlendirilir ve beş adet olan master mixlerin her biri "BRCA Mastr PZR Formu" na uygun olacak şekilde hazırlanır.

5.2.3. PZR plakası hazırlanır, hangi kuyucuğa hangi örneğin koyulacağı belirlenir.

5.2.4. Her kuyucuğa 10 μ l mastr mix ve 5 μ l DNA eklenmelidir.

5.2.5. Hazırlanan plaka "PZR cihazı kullanma talimatı" na uygun olacak şekilde makinaya yüklenir ve Illumina Mastr PZR programında çalıştırılır.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



**İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI**

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi : 06.10.2017
Revizyon No : 00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 6

5.2.6. Illumina Mastr PZR Programı içeriği şu şekilde olmalıdır:

# döngü*	Sıcaklık	Süre
1	98°C	10 dak.
20	95°C	45 sn.
	60°C	45 sn.
	68°C	2 dak.
1	72°C	10 dak.
1	4°C	< 1 sa.

* Bütün ısıtma ve soğutma adımları için PCR döngüsünün yükselme hızını 1 ile 2°C/sn olarak ayarlayın.

5.2.7. Program bittikten sonra ürünler %2' lik agaroz jelde kontrol edilir. Her örnekten 5 µl yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenir. 250bp ve 450 bp arasında bantlar görülmelidir.

5.2.8. Kalan PZR örnekleri 1000 kat dilüe edilmelidir. Bu dilüsyon iki basamak şeklinde, birbirini takip eden 1/50 ve 1/200 seri dilüsyonları şeklinde olmalıdır. Stok PZR ürünleri mutlaka -20°C' de saklanmalıdır.

5.3. UNIVERSAL PZR' in Hazırlanması

5.3.1. MID primer kombinasyonları "**MID Seçim Formu**" na göre düzenlenir ve plaka dizaynı yapılır.

5.3.2. Universal PZR mix, Mastr kit içinde bulunan Amplification Reagent (AR), MID primerler ve Taq polimeraz buz üzerinde çözünmeye bırakılır.

5.3.3. Taq polimeraz haricindeki her tüp vortekslenir ve 10 sn. santrifüjlenir.

5.3.4. Her bir örnek için daha önceden belirlenmiş MID primerleri içeren mixler "**BRCA Universal PZR Formu**" na göre hazırlanır. İçerik her bir tüp için şu şekilde olmalıdır:

Reaktifler	Hacim
Universal PCR Mix	10 µl
Amplification Reagent	10 µl
MID P7 primer	2 µl
MID P5 primer	2 µl
Taq DNA polymerase*	0,125 µl

*Çözelti ağdalı olduğundan, 0,5 µl Taq DNA polimerazdan düşük pipetleme yapmayın. Gereken Taq DNA polimerazı 0,5 µl değerinden azsa, Taq DNA polimerazı 1:10 moleküler biyoloji sınıfı suda seyreltin (örn. 1 µl Taq DNA polimerazını 9 µl suda); kısa bir vorteks yapın ve ardından 10 sn süreyle 12.000 x g santrifüj uygulayın.

5.3.5. Her mix 2-3 sn. vortekslenir ve ardından 10 sn. santrifüjlenir. Her bir kuyucukta 24 µl Universal mix ve 1 µl Mastr PZR ürünü bulunmalıdır. Plate hazırlandıktan sonra folyo bant ile kapatılır ve 2-3 sn. vortekslenir ardından 1 dk. santrifüjlenir.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 3 / 6

5.3.6. Hazırlanan plaka “PZR cihazı kullanma talimatı” na uygun olacak şekilde makineye yüklenir ve Illumina Universal PZR programında çalıştırılır.

5.3.7. Illumina Universal PZR programı içeriği şu şekilde olmalıdır:

Döngü sayısı*	Sıcaklık	Süre
1	98°C	10 dak
20	95°C	45 sn
	64°C	45 sn
	68°C	2 dak
	72°C	10 dak
1	4°C	Maks. 12 saat**

* Bütün ısıtma ve soğutma adımlarında PCR makinesinin yükselme hızını 1 ile 2°C/sn olarak ayarlayın.

5.3.8. Program bitiminde ürünler hemen kullanılmıyacaksa -20° C’ de saklanabilir.

5.3.9. Hazırlanan ürünler %2’ lik agaroz jelde kontrol edilir. Her örnekten 5 µl yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenir. 350bp ve 550 bp arasında açıkça görünen fakat dağınık bantlar elde edilmelidir.

5.4. Kütüphane Hazırlama Ve Pürifikasyon

5.4.1. Her bir DNA örneğine ait çoklu amplikonlar birbirinden ayrı tüplerde aşağıda belirtilen şekilde birleştirilir:

Pleks	Hacim
Pleks 1	8 µl
Pleks 2	11 µl
Pleks 3	13 µl
Pleks 4	8 µl
Pleks 5	10 µl

5.4.2. Tüpler kısa süreli vortekslenir (2-3 sn) ve 10 sn süreyle 12.000 x g’de santrifüj uygulanır.

5.4.3. Manyetik boncukların içinde bulunduğu Agencourt AMPure XP şişesini hafifçe çalkalayarak, çökelti meydana getirmiş olabilecek manyetik boncukların yeniden asılı duruma geçmesini sağlanır.

5.4.4. 40 µl amplikon kütüphanesi 34 µl Agencourt AMPure XP ile birleştirilir.

5.4.5. Reaktif ve amplikon kütüphanesi 10 kere pipetleme yapılarak iyice karıştırılır. Maksimum sonuç için bu karışım 5 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 4 / 6

5.4.6. Boncukları çözeltiden ayırmak için tüpler 2 dakika süreyle bir manyetik boncuk ayırıcıya koyulur. Arıtılmış çözelti reaksiyon plakasından aspire edip atılır.

5.4.7. Örnek plakası, manyetik boncuk ayırıcı üzerindeyken, her bir kuyucuğa taze hazırlanmış 200 µl % 70'lik etanol koyulur ve örnek plakası oda sıcaklığında 30 sn süreyle inkübe edilir. Etanol pipet yardımıyla uzaklaştırılır.

5.4.8. Bu yıkama adımı bir kez daha tekrarlanır.

5.4.9. Pelet kurumaya bırakılır.

5.4.10. Örnek plakası manyetik boncuk ayırıcı'dan alınıp her kuyucuğa 20 µl moleküler biyoloji sınıfı su eklenir; pipetle 10 kez karıştırılır.

5.4.11. Boncukları çözeltiden ayırmak için plaka 1 dakika süreyle bir manyetik boncuk ayırıcıya yerleştirilir.

5.4.12. Üst sıvı gerektiği şekilde etiketlenmiş yeni bir tüpe koyulur; bu, saflaştırılmış amplikon kütüphanesidir.

5.5. Picogreen Ölçümü

5.5.1. Hazırlanan her bir kütüphane örneği “**Florimetrik Kantitatif DNA Ölçüm Talimatı**” na uygun şekilde picogreen floresan boyası ile kantitatif DNA ölçümü' ne tabi tutulur.

5.5.2. Elde edilen sonuçlarla DNA konsantrasyonu hesaplanır ve uygun miktarda TE ile amplikon kütüphaneleri 10 nm' a dilüe edilir.

5.5.3. Dilüe edilen amplikon kütüphanelerinden eşit miktarda karıştırılarak havuz oluşturulur. Bu amplikon havuzu -20°C' de saklanabilir.

5.6. Amplikon Havuzunun Hazırlanması

5.6.1. HT1 (Hibridizasyon Tamponu 1) oda sıcaklığına getirilir.

5.6.2. 1 ml 0.2 N NaOH hazırlanır. (800µl su, 200µl stok 1.0 N NaOH' e eklenir.)

5.6.3. 10 nM DNA örneği, 4 nM' a dilüe edilir. (2 µl DNA + 3 µl TE). Daha sonra 4 nM DNA' dan 5 µl alınarak 5 µl 0.2 N NaOH' la karıştırılır. Vortekslenir ve 280 g' de 1 dk. santrifüjlenir.

5.6.4. Denatürasyon için oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilir.

5.6.5. 990 µl HT1, 10 µl of denatüre DNA' ya eklenir, bu şekilde 20 pM denatüre kütüphane 1 mM NaOH içinde elde edilmiş olur. Bu solüsyon buz üzerinde saklanmalıdır.

5.6.6. 20 pM denatüre DNA 240 µl 360 µl HT1' e eklenir. Bu şekilde 8 pM DNA solüsyonu elde edilir. Birkaç kez ters çevirilerek karışması sağlanır, Miseq kartuşuna yüklenene kadar buzda saklanmalıdır.

5.7. PhiX Kütüphanesinin Hazırlanması

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



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 5 / 6

5.7.1. 2 µl 10 nM PhiX kütüphanesi, 3 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 (0.1% Tween 20 içeren)ile karıştırılır ve 4 nM PhiX kütüphanesi elde edilir.

5.7.2. 5 µl, 4 nM PhiX kütüphanesi, 5 µl 0.2 N NaOH ile karıştırılır. Vortekslenir ve 280 g' de 1 dk. santrifüjlenir.

5.7.3. Denatürasyon için oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilir.

5.7.4. 990 µl HT1, 10 µl of denatüre PhiX kütüphanesine eklenir, bu şekilde 20 pM denatüre kütüphane 1 mM NaOH içinde elde edilmiş olur. Bu solüsyon buz üzerinde saklanmalıdır.

5.7.5. 225 µl HT1, 375 µl PhiX ile karıştırılarak 12.5 pM PhiX solüsyonu elde edilir. Birkaç kez ters çevirilerek karıştırılır.

5.8. MiSeq Kartuşa Yükleme

5.8.1. Her çalışma öncesinde cihaza “ **llumina MiSeq Cihazı Kullanma Talimatı**” na uygun şekilde Maintenance yıkama yapılmalıdır.

5.8.2. Kütüphanelerin Illumina MiSeq tabanlı dizilemesi için gerekli iki isteğe uyarlanabilir dizileme primeri ve bir isteğe uyarlanabilen indeks primeri seyreltilir. Bu üç primer, 100 µM'lik bir stok çözeltisi olarak sağlanır ve MID Dx for Illumina MiSeq kitinin amplifikasyon kutusunda bulunabilir. Üç Primer Karışımı şöyle adlandırılmıştır:

- Read1 Primer Mix (R1)
- Index Primer Mix (I)
- Read2 Primer Mix (R2)

Her Primer Mix için, Primer Mix 3 µl, 597 µl HT1'e ekleyerek 0,5 µM son konsantrasyonda 600 µl isteğe uyarlanabilir primer hazırlanır. 2-3 sn vorteksleyerek iyice karıştırılır.

5.8.3. 570 µl DNA kütüphanesi ile 30 µl PhiX (%5 PhiX)

5.8.4. Hazırlanan isteğe uyarlanabilir primerler ve son dizileme örneği Illumina reaktif kartuşuna eklenir.

5.8.5. Temiz bir pipet ucuyla ilgili giriş (aşağıda listelenmiştir) kapatan folyo kapağını delinir. Reaktif kartuşunun 17. pozisyonunda, Yükleme Örnekleri rezervuarına son dizileme örneğinden 600 µl pipetlenir. Örnekler dağıtılırken kartuşun folyo kapağına dokunmaktan kaçınılmalıdır. Aşağıdaki girişlere, her bir isteğe uyarlanabilir primerden 600 µl yüklenir. Read 1 isteğe uyarlanabilir primer, kartuş konumu 18'e, Index isteğe uyarlanabilir primer, kartuş konumu 19'a, Read 2 isteğe uyarlanabilir primer, kartuş konumu 20'e eklenir. Primeri dağıtırken kartuşun folyo kapağına dokunmaktan kaçınılmalıdır. Hava kabarcığı olmadığından emin olmak için kartuş tabanını dikkatle incelenmelidir. Kabarcıkları kartuşa hafifçe vurarak giderilir.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
YENİ NESİL DİZİLEME İŞLEMİ TALİMATI

Doküman No : OE-GEN-PR-001/TL-031
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 6 / 6

5.9. Flow Cell Hazırlama

5.9.1. Flow cell kutusundan pens yardımıyla çıkarılır.

5.9.2. Üzerinde bulunan siyah noktaya değmeyecek şekilde tutularak cam bölge ve plastik kısım moleküler biyoloji seviyesindeki su ile yıkanır.

5.9.3. Toz bırakmayan peçete yardımıyla yine siyah bölgeye dokunulmadan cam bölge kurutulur.

5.9.4. Daha sonra alkol emdirilmiş peçete ile cam bölge parmak izi, çizik ve toz kalmayacak şekilde silinir.

5.9.5. Temiz ve kuru bir toz bırakmayan peçete ile alkolün kuruması sağlanır.

5.10. “Illumina MiSeq Cihazı Kullanma Talimatı” na uygun şekilde Control Software (MCS) arabirimi kullanarak doğrudan işlem kurulum adımlarına geçilir.

5.11. Cihaza örnekler “MiSeq yükleme formu” kullanılarak tanıtılır ve çalışma başlatılır.

5.12. Çalışma yaklaşık olarak 36 saat sürmektedir. İşlem bittiğinde deney sonuçları cihazdan alınır ve “Sophia Genetics Analiz Programı Talimatı” na uygun olacak şekilde yüklenerek analiz edilir.

6. İLGİLİ DOKÜMANLAR

6.1. Illumina MiSeq Cihazı Kullanma Talimatı

6.2. DNA İzolasyonu Talimatı

6.3. DNA/ PZR/ Saflaştırma Kalite Kontrol Talimatı

6.4. BRCA Mastr PZR Formu

6.5. BRCA Universal PZR Formu

6.6. PZR cihazı kullanma talimatı

6.7. MID Seçim Formu

6.8. MiSeq yükleme formu

6.9. Florimetrik Kantitatif DNA Ölçüm Talimatı

6.10. Sophia Genetics Analiz Programı Talimatı

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM