



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
KANSER GENETİĞİ LABORATUVARI
MUTASYON DOĞRULAMA İŞLEM
TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-032
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 3

1. AMAÇ

Bu talimat, yeni nesil dizileme işlemi ile BRCA1-2 gen testi yapılmış olan örneklerde bulunan değişikliklerin doğrulanması ve mutasyonlu ailelerde ilgili bölgeyi sağlıklı kişilerde tarama işlemi yapmak amacıyla hazırlanmıştır.

2. KAPSAM

Bu prosedür, mutasyon doğrulama işlemi sırasında yapılan tüm basamakları ve kullanılan cihazları kapsar.

3. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvarı çalışanları

4. UYGULAMALAR

4.1. Preanalitik İşlemler:

4.1.1. “Yeni Nesil Dizileme İşlem Talimatı” na uygun olacak şekilde yapılan analizler sonucunda mutasyon saptanan hastalar için mutlaka mutasyon doğrulama işlemi yapılmalıdır.

4.1.2. Mutasyon saptanması durumunda sonuçtan emin olabilmek amacıyla hastanın ilk geldiğinde **“Whatman FTA Kullanma Talimatı”** na göre yeni DNA örneği hazırlanır ve örnekte mutasyonun tespit edildiği nokta 5’ucu ve 3’ ucu yönünde olmak üzere çift yönlü olarak Sanger dizi analizi işlemine tabi tutulur. CNV şeklinde bulunan mutasyonlar ise yine yeni DNA örneği ile MLPA düzeyinde tekrarlanır.

4.1.3. DNA izolasyon işlemi **“DNA İzolasyonu Talimatı”**na uygun şekilde yapılır.

4.1.4. DNA kalite kontrol işlemleri **“DNA/PZR/Safılaştırma Kalite Kontrol Talimatı”** na göre yapılır.

4.1.5. Uygun kalitedeki örnekle test işlemine başlanır.

4.1.6. İlgili gen bölgeleri her bir test için uygun olan **“PZR İşlemleri Talimatları”** na göre çoğaltılır. Her bir gen için aynı **“PZR İşlemleri Talimatları”** geçerlidir.

4.1.7. PZR ile çoğaltılan örnekler, **“DNA/PZR/Safılaştırma Kalite Kontrol Talimatı”**na göre kontrol edilir.

4.1.8. Uygun örnekler için safılaştırma işlemine geçilir. Uygun olmayan örnekler için PZR işlemi tekrarlanır, yine başarısız olunursa DNA izolasyon işlemi ve bunu takip eden süreçler tekrarlanarak kayıplar **“Materyal Kayıp İzlem Formu”** na işlenir.

4.1.9. Safılaştırma işlemi **“Safılaştırma Talimatı”** na göre yapılır. Safılaştırma işlemi **“Safılaştırma İşlem Formu”** ile kayıt altına alınır.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
KANSER GENETİĞİ LABORATUVARI
MUTASYON DOĞRULAMA İŞLEM
TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-032
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 3

4.1.10. Saflaştırılan örnekler “**DNA/PZR/Saflaştırma Kalite Kontrol Talimatı**”na göre tekrar kontrol edilir. Saflaştırma sırasında kaybolan örnekler için PZR işlemi ve bunu takip eden süreçler tekrarlanır.

4.1.11. Saflaştırması tam olan örnekler, “**DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Reaksiyonu Talimatı**” na uygun olarak dizi analizi reaksiyonuna sokulur.

4.1.12. Dizi analizi reaksiyonları “**Etanolle Çöktürme Talimatı**”na göre çöktürülür ve küçük hacimlerde (40 mikrolitre) çözülür.

4.1.13. Bu örneklerin tamamı Dizi Analizi Cihazına yüklenir. Yükleme işlemi materyal numarası ile “**Dizi Analizi Cihazı-CEQ8000 Kullanma Talimatı**” ve **Dizi Analizi Cihazı-GeXP Kullanma Talimatı**” na göre yapılır.

4.1.14. Örnekler uygun programda dizi analizi cihazı yardımıyla kapilller elektroforeze tabi tutulur.

4.1.15. Elektroforez işlemi biten örnekler cihaza özel bilgisayar programları aracılığıyla analiz edilir. Sonuçlar “**Dizi Analizi Değerlendirme Formu**” na kaydedilir.

4.1.16. Dizi analizi yöntemi ile tespit edilemeyen büyük gen delesyon / duplikasyonlarının saptanmasında MLPA işlemi kullanılır. Bu işlem “**MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification Assay) İşlem Talimatı**” uyarınca yapılır. Sonuçlar “**MLPA Analizi Değerlendirme Formu**” na kaydedilir.

4.2. Analitik İşlemler

4.2.1. Programlar aracılığıyla analiz edilen sonuçlar, ilgili uzman Biyolog ve Moleküler Biyolog tarafından cihaz üzerindeki analiz program ile ön taramadan geçirilerek okunur ve değerlendirilir. Bu değerlendirme işlemi her bir gene özgü gen haritaları kullanılarak ve bire bir karşılaştırma yoluyla yapılır.

4.2.2. Her bir değerlendirme “**Dizi Analizi Değerlendirme Formu**” ile “**MLPA Analizi Değerlendirme Formu**” na materyal numarası, tarih, cihazın ismi, plaka numarası, okunan fragment tipi ve okuyan kişinin inisiyallerini içerecek şekilde not edilir.

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

4.3. Post-Analitik İşlemler

4.3.1. Hasta/bireye ait sonuç raporu “**Dizi Analizi Değerlendirme Formu**” ile “**MLPA Analizi Değerlendirme Formu**”na kayıtlı bilgiler “**Analiz Sonuçları Giriş Talimatı**” na göre bir araya getirilerek “**Analiz Sonuçları Formu**” oluşturulur.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
KANSER GENETİĞİ LABORATUVARI
MUTASYON DOĞRULAMA İŞLEM
TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-032
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 3 / 3

4.3.2. “Analiz Sonuçları Formu”na bakarak her bir hasta için “Genetik Rapor Oluşturma Talimatı” doğrultusunda “Genetik Rapor Formu” hazırlanır.

4.3.3. “Genetik Rapor Formu” hazırlanan hastaların Medin Sistem girişleri yapılır.

4.3.4. Medin sistemine giriş yapılan hastalar sonuçlarının almak üzere Kanser Genetiği Polikliniği’ne telefon ile davet edilir. Kanser Genetiği Polikliniği’ne gelen hastalar “Kanser Genetiği Polikliniği İşleyiş Talimatı”na uygun olarak bilgilendirilerek ve genetik danışma eşliğinde sonuçları verilir.

5. İLGİLİ DOKÜMANLAR

- 5.1. Kanser Genetiği Laboratuvarı Kan Alma Talimatı**
- 5.2. Yeni Nesil Dizileme İşlem Talimatı**
- 5.3. Whatman FTA Kullanma Talimatı**
- 5.4. DNA İzolasyonu Talimatı**
- 5.5. DNA/ PZR/ Safaştırma Kalite Kontrol Talimatı**
- 5.6. PZR İşlemleri Talimatı**
- 5.7. DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Reaksiyonu Talimatı**
- 5.8. Safaştırma Talimatı**
- 5.9. Safaştırma İşlem Formu**
- 5.10. Etanolle Çöktürme İşlem Talimatı**
- 5.11. MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification Assay) İşlem Talimatı**
- 5.12. Dizi Analizi Cihazı-CEQ8000 Kullanma Talimatı**
- 5.13. Dizi Analizi Cihazı-GeXP Kullanım Talimatı**
- 5.14. Kanser Genetiği Polikliniği İşleyiş Talimatı**
- 5.15. Dizi Analizi Değerlendirme Formu**
- 5.16. MLPA Analizi Değerlendirme Formu**
- 5.17. Analiz Sonuçları Giriş Talimatı**
- 5.18. Analiz Sonuçları Formu**
- 5.19. Genetik Rapor Oluşturma Talimatı**
- 5.20. Genetik Rapor Formu**
- 5.21. Materyal Kayıp İzlem Formu**

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM