



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İŞLEMLERİ TALİMATI

Doküman No: OE-GEN-PR-001/ TL-033
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 3

1. AMAÇ

Bu talimat, Polimeraz Zincir reaksiyonu (PZR) işleminin doğru bir şekilde yapılması amacıyla oluşturulmuştur.

2. KAPSAM

Bu talimat, PZR işlemlerini kapsar.

3. TANIM

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki farklı 20-25 bp uzunluğunda oligonükleotid primer bağlanması ve uzaması esasına dayalıdır.

Oligonükleotid primerler kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıklarda denatüre edildikten sonra tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. Bu spesifik olan hedef dizilere bağlanma düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü denatürasyon primer bağlanması ve uzama olarak üç aşamadan oluşur.

4. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvar çalışanları.

5. UYGULAMALAR

5.1. İşlem Basamakları

- PZR işleminde kimyasal olarak PZR Reaksiyon Tamponu, dNTP, MgCl₂, çoğaltılacak her bölgeye özgü dizayn edilen primerler, Taq Polymerase ve moleküler biyoloji derecesinde saf su kullanılmaktadır.
- Reaksiyonlarda kullanılan Taq Polimeraz çeşitleri ve içerikleri aşağıda verilmektedir:
- DreamTaq DNA Polimeraz: 6kb kadar uzun DNA bölgelerinin çoğaltılmasına yarayan, optimize edilmiş reaksiyon tamponu, yeşil renkli yükleme boyası, MgCl₂ içerikli enzimdir.
- SapphireAmp Fast PCR Mastermix: 6kb kadar uzun DNA bölgelerinin çoğaltılmasına yarayan, mavi renkli yükleme boyası içeren, optimize edilmiş 2X yoğunlukta kullanıma hazır reaksiyon tamponu, her biri 2.5mM dNTP ve 2mM MgCl₂ içerikli enzimdir.
- EmeraldAMP Max HS Master Mix: G-C veya A-T bazları açısından zengin fragmentlerin çoğaltılmasında kullanılan, 15kb kadar uzun DNA bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan, yeşil renkli yükleme boyası içeren, optimize edilmiş 2X yoğunlukta kullanıma hazır reaksiyon tamponu, her biri 2.5mM dNTP ve 2mM MgCl₂ içerikli enzimdir.

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



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İŞLEMLERİ TALİMATI

Doküman No: OE-GEN-PR-001/ TL-033
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 3

- PrimeStar GXL DNA Polimeraz: G-C bazları açısından zengin fragmentlerin çoğaltılmasında kullanılan, 30kb kadar uzun DNA bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan, optimize edilmiş 2X yoğunlukta kullanıma hazır reaksiyon tamponu, her biri 2.5mM dNTP ve 2mM MgCl₂ içerikli enzimdir.
- BRCA1 geninde toplam 30 fragment, BRCA2 geninde ise toplam 39 fragment çalışılmaktadır.
- PZR cihazın'da, daha önceden reaksiyon koşulları cihaza tanıtılmış olan SS5535 isimli program kullanılır. Program koşulları aşağıdaki gibidir:

PZR PROGRAMI: SS5535

Heated lid:105°C

In. denat :95°C

Döngü 1	Döngü 2	Döngü 3
Siklus sayısı:2	Siklus sayısı:2	Siklus sayısı:35
94°C 20sn	94°C 20sn	94°C 20sn
65°C 20sn	60°C 20sn	55°C 20sn
72°C 40sn	72°C 40sn	72°C 40sn

Fin Extn: 72 °C, 10 dk

Fin Hold: 4°C

- Bu işlemler “**BRCA1-2 PZR İşlem Formları**” ile kayıt altına alınır.
- Bu işlem sonunda oluşabilecek her türlü kayıp “**Materyal Kayıp İzlem formu**” ile kayıt altına alınır.

5.2. Güvenlik

- PZR işlemi sırasında kullanılan tüm kimyasallarda -30°C derin dondurucularda saklanmalı, reaksiyon hazırlanması esnasında ise buzda bekletilmelidir.
- Herhangi bir kontaminasyonu önlemek için steril sarf malzemeleri ile çalışmalı reaksiyon dikkatli hazırlanmalıdır.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN/KONTROL
EDEN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İŞLEMLERİ TALİMATI

Doküman No: OE-GEN-PR-001/ TL-033
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 3 / 3

- Çalışan güvenliği için mutlaka eldiven kullanılmalıdır.

5.3. SAKLAMA KOŞULLARI

- PZR işleminde kullanılan tüm kimyasallar son kullanma tarihleri dikkate alınarak -30°C derin dondurucularda saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında reaksiyon hazırlanırken kimyasallar buz kaplarında bekletilmelidirler.

6. ATIK PROSEDÜRÜ

PZR işleminde kullanılan sarf malzemeleri kırmızı kapaklı sarı tıbbi atık kutusuna atılır ve “**Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı**”na göre laboratuvardan uzaklaştırılır.

7. İLGİLİ DÖKÜMAN

- 7.1. Materyal Kayıp İzlem Formu
- 7.2. BRCA1-2 PZR İşlem Formları
- 7.3. Çevre ve Atık Yönetimi Talimatı

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