



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FLUORİMETRİK KANTİTATİF DNA ÖLÇÜM
TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-034
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 2

1. AMAÇ

Picogreen isimli floresan boya ile yapılan fluorimetrik DNA ölçüm işleminin doğru bir şekilde yapılmasını sağlamak amacı ile bu talimat hazırlanmıştır.

2. KAPSAM

Bu talimat ile fluorimetrik DNA ölçüm işleminin yönteminin tüm aşamalarını içermektedir.

3. SORUMLULAR

Kanser Genetiği Laboratuvarı çalışanları.

4. UYGULAMALAR

4.1. Prosedür :

4.1.1. 20X TE'yi 1:20 dilüe ederek 1X TE solüsyonu hazırlanır (steril, distile Dnase-free su ile).

4.1.2. Kitten çıkan Lambda DNA standardı 1X TE ile 1:50 dilute edilir Bu şekilde. 2µg/ml dsDNA solüsyonu elde edilmiş olur.

4.1.3. Daha önceden hazırlanan ve ölçümü yapılacak olan örnekleri 1X TE ile 1:50 dilüe edilir.

4.1.4. Picogreen ile çalışma solüsyonu hazırlanır: Picogreen boyası'ı 1:200 dilute edilir. Ör: 10 µl picogreen + 1990ul 1X TE.

4.1.5. Standart eğri için standart dilüsyonlar hazırlanır:

4.1.5.1. 1 µg/ml: 1:50 dilüe edilmiş stok DNA (bunun konsantrasyonu 2 µg/ml, ölçüm sırasında eşit hacimde çalışma solüsyonu eklenince son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak)

4.1.5.2. 100 ng/ml: stok DNA'yı 1:10 dilüe edilir. (1X TE ile).

4.1.5.3. 10 ng/ml: 100 ng/ml DNA'yı 1:10 dilüe edilir.

4.1.5.4. 1 ng/ml: 10 ng/ml DNA'yı 1:10 dilüe edilir.

4.1.5.5. Blank olarak 1X TE kullanılır.

4.1.6. 5 standart siyah floresan ölçüm plakasının kuyucuklarına 100'er µl olacak şekilde dağıtılır.

4.1.7. Örnekler plaka kuyucuklarına 100'er µl olacak şekilde dağıtılır.

4.1.8. Standartlara ve örneklere 100'er µl çalışma solüsyonu eklenir, pipetlenerek karıştırılır.

4.1.9. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilir.

4.1.10. Plaka, floresan okuma yapabilen cihaza "**Spektral Tarayıcı Kullanma Talimatı**" na uygun olacak şekilde yüklenir (örn. Varioskan Flash Multimode Reader). Cihazın çalkalama özelliği yoksa çalışma solüsyonu ile DNA örnekleri tüplerde karıştırılıp vortekslenebilir, sonra plakalara dağıtılır.

4.1.11. Ham datadan konsantrasyon hesaplama:

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



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FLUORİMETRİK KANTİTATİF DNA ÖLÇÜM
TALİMATI

Doküman No:OE-GEN-PR-001/TL-034
İlk Yayın Tarihi :06.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 2

- 4.1.11.1.** Absorbans değerleri excel dosyasına aktarılır. Standartların ortalama değerleri alınır.
- 4.1.11.2.** Blank absorbans değeri (ortalama) tüm değerlerden çıkarılır.
- 4.1.11.3.** Standartlar için her bir absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon yazılır (ng/µl olarak) ve eğri çizilir. (y-ekseni: konsantrasyonlar, x-ekseni absorbans). (R^2 değeri > 0.95 olmalıdır.)
- 4.1.11.4.** Grafikte çıkan formül kullanılarak örneklerin konsantrasyonu hesaplanır. Her bir örneğin absorbans değeri formülde x'e koyulur ve y değeri hesaplanır.
- 4.1.11.5.** 1:50 dilüsyon yapıldığı için konsantrasyon değerleri 50 ile çarpılır.
- 4.1.11.6.** ng/µl konsantrasyon değerleri kullanılarak formül ile molarite hesaplanır.
- 4.1.11.7.** Buna göre kütüphane oluşturmada kullanılacak örnek miktarları hesaplanır ve örnekleri karıştırılmaya başlanır.
- 4.1.12.** Sonuçlar "**Picogreen Ölçüm Formu**" na kaydedilir.
- 4.1.13.** Bu işlem sonunda oluşabilecek her türlü kayıp "**Materyal Kayıp İzlem Formu**" ile kayıt altına alınır.

4.2. Güvenlik

- 4.2.1.** Muhakkak eldivenle çalışılmalıdır.
- 4.2.2.** Kimyasalların deri ile temasından kaçınılmalıdır.
- 4.2.3.** Çalışma esnasında uzun kollu önlük giyilmelidir.
- 4.2.4.** Deri ile temas eden maddeler madde türüne göre su ya da uygun solüsyonlarla temizlenmelidir.

4.3. Saklama Koşulları

Kütüphane için hazırlanan örnekler -30°C' de muhafaza edilir.

5. ATIK PROSEDÜRÜ

DNA içeren plakalar ve DNA bulaşan malzemeler ise "**Çevre ve Atık Yönetim Talimatı**"na göre ve kırmızı kapaklı sarı kutulara atılarak uzaklaştırılır.

6. İLGİLİ DOKÜMAN

- 6.1.** Çevre ve Atık Yönetim Talimatı
- 6.2.** Picogreen Ölçüm Formu
- 6.3.** Materyal Kayıp İzlem formu

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