

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	1 / 62

- AMAÇ:** Moleküler Genetik laboratuvarında yapılan analiz işlemlerinin prosedürlerinin açıklanması ve sorumlulukların belirlenmesi.
- KAPSAM:** Moleküler Genetik Laboratuvarı ve işlemleri kapsar
- FAALİYET AKIŞI:** Aşağıdaki işlemler biyologlar tarafından gerçekleştirilir.

A. MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARI

Üniversitemiz MOLEKÜLER Laboratuvarı; Genetik Hastalıkların tanı ve takibi , bazı ilaçların toksitite yatkınlık testleri ile ihtiyaç duyulan yeni testlere moleküler anlamda çözüm üretmek için laboratuvar teknolojisi, denetçiler, genetik danışmanları ile tecrübeli çalışanları işbirliği içerisinde çalışmaktadır.

Laboratuvarımızda rutin olarak yapılan testler yanında moleküler düzeyde araştırma amaçlı testler de yapılmaktadır. Kontrol denetim uygulamaları ile verdiğimiz hizmetlerin kalite güvenliği sağlanmaktadır.

Misyonumuz; laboratuvarımızda uluslararası kalite standartlarına ve etik kurallara uygun olarak, bilimsel veriler ışığında, güvenilir, kaliteli, verimli bir hizmet sunmaktır.

Vizyonumuz; güven, saygınlık konusunda lider, referans ve ulusal standartlara uygun bir laboratuvar olmaktır.

Moleküler Testleri saat 08:00'de çalışılmaya başlanır. Laboratuvarımızda her biyolog ve kimyager yapacağı iş konusunda eğitilmiştir. Çalışmalar uluslararası yöntemlere uygun şekilde çalışılır.

B. MOLEKÜLER LABORATUVARI'NDA KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI:

1. İÇ (İTERNAL) KALİTE KONTROL:

İç kalite; sonuçları önceden bilinen normal ve patolojik kontrol örnekleri hasta örneği gibi aynı run ile analiz edilerek, kontrol örneklerinin sonuçlarının doğruluğu kontrol edilir. Bu süreçte sonuçlar hedeflenenden farklı ise hasta örnekleri ve başka kontrol örnekleri tekrar çalışılır. MOLEKÜLER Laboratuvarı'nda bulunan bütün cihazların aylık olarak kontrol ve bakımı uzman aplikasyoncular ile yapılır.

Testler, kontroller (negatif ve pozitif kontrol ile birlikte sonucu bilinen kontrol örneği kullanılır.) eşliğinde çalışılır, sonuçları eğitimli biyolog ve kimyager ile sorumlu uzman tarafından kontrol edilerek tüm örnekler değerlendirilir.

Sonuçlar kayıt altına alınır.

2. DIŞ (EKSTERNAL) KALİTE KONTROL:

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	2 / 62

Laboratuvarımız KRAS testleri için QUIP tarafından 2010 yılında gönderilen örneklerin sonuçları değerlendirilerek kuruma gönderilmiş ve olumlu geri bildirim alınmıştır.

C. MOLEKÜLER LABORATUVARI'NDA ÇALIŞILAN TESTLERİN İSTENMESİ:

Hastanemiz ilgili polikliniklerinin doktorları tarafından HBYS'ye(Hastane Bilgi yönetim Sistemi)girilerek tetkik adı veya tetkik kodu ile istem yapılır. Testlerin tam ve zamanında çıkması için test girişleri tam eksiksiz yapmalı, doğru materyal alınmalı ve bilgisi verilmelidir. Test girişleri onaylandıktan sonra test eklenmemelidir.

D.MOLEKÜLER LABORATUVARI'NDA ÇALIŞILAN TESTLERE AİT ÖRNEKLERİN ALINMASI:

1. KAN VE KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Gelen tüm hasta kan ve kemik iliği örnekleri hasta dosya ve isim karşılaştırması yapılarak alınır.

1.1. ACİL SERVİS VE YATAKLI BİRİMLERDE KAN VE KEMİK İLİĞİ

ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Yataklı birimlerde ve Acil Serviste kimlik doğrulaması yapıldıktan sonra kan ve/veya kemik iliği alma işlemi gerçekleştirilir. Hekim test taleplerini otomasyon sisteminde yapar. Klinik hemşiresi sistemde talepleri görür. Testlerin barkotlarını basar, tüplere yapıştırır. Barkotlarda hastanın kimlik tanımlayıcılarıyla birlikte, testin adı, testin hangi servisten istendiği, örneğin alınış tarihi ve saati yer alır.Böylece numune alım tarihi ve saati HBYS(Hastane Bilgi yönetim Sisteminden) ve buna entegre çalışan Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) kaydedilmiş olur.

1.2. POLİKLİNİKLERDEN KAN ve KEMİK İLİĞİ ALMA ÜNİTESİNE GELEN HASTALARDAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Kan Alma Ünitesine gelen hastayı, ünite sekreteri karşılar. Ünite sekreteri hastaya ait kimlik doğrulaması yapar. Hastanın test istemlerini otomasyon sisteminde görülür, testlere ait barkotları basar. Barkotlarda hastanın kimlik tanımlayıcılarıyla birlikte, testin adı, testin hangi poliklinikten istendiği, örneğin alınış tarih ve saati yer alır. Böylece örneğin alım tarihi ve saati HBYS (Hastane Bilgi yönetim Sisteminden) ve Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) kaydedilmiş olur. Sekreter, barkotları ilgili kan tüplerine yapıştırdıktan sonra, tüplerle birlikte hastayı kan ve/veya kemik iliği alma hemşiresine yönlendirir.

2.PARAFİN DOKU ORNEKLERİNİN ALINMASI

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	3 / 62

İstemi yapan hekim hastayı patoloji laboratuvarına blok numarası ile yönlendirir. Patalog istenilen bloktan 1 adet tumor bölgesi isaretili boyalı lam, 4 adet isaretsiz ve boyasız lam ve ependorf tüpe kesitler alır. Korunaklı bir şekilde unite sekreterine gelen materyal Moleküler laboratuvarı çalışanları tarafından kontrol edilerek kabul edilir.

3.AMNIYON SIVISI VE CVS ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Sitogenetik Laboratuvarı tarafından gerekli kontrolleri yapılarak alınan numunelerden 2 cc lik miktarı isimlendirilmiş steril ependorf tüplerine aktararak Moleküler Laboratuvarına Bizzat Sitogenetik personeli tarafından teslim edilir.

E . MOLEKÜLER LABORATUVARI'NDA TESTLERE AİT ÖRNEK TÜPLERİ:

1. MOR KAPAKLI TÜP(EDTA'LI):

(KAN VE KEMİK ILICI ÖRNEKLERİ İÇİN KULLANILIR.)



F.MOLEKÜLER LABORATUVARI'NA ÖRNEKLERİN TRANSFERİ VE AYRIŞTIRILMASI:

1. Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) test girişleri yapılırken testlerin aynı zamanda HBYS (Hastane Bilgi Yönetim Sisteminden)test girişleri ve kayıtları yapılmış olması gereklidir.
2. Kan örneklerinin üzerinde mutlaka barkot olmasına dikkat edilmelidir.
3. Poliklinik, Acil Servis ve yataklı birimlerden alınan tüm kan örnekleri testlere göre Genetik AD, Moleküler laboratuvarına bekletilmeden gönderilir.
4. Laboratuvara ulaşan örnekler laboratuvar teknisyenlerince düzenli olarak toplanır ve testlere göre gruplanır.
5. Testlere göre gruplanmış örneklerin, numune kabul kriterleri'ne göre uygunluğu kontrol edilir, kabul-ret kriterleri doğrultusunda barkot okuyucudan geçirilerek girişi yapılır.

G. MOLEKÜLER LABORATUVARI ÖRNEK KABUL KRİTERLERİ:

1. Örnekler analize uygun tüp (EDTA*LI) veya kaplara alınmış olmalıdır.
2. Örnekler hemolizli olmamalıdır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	4 / 62

3. Örnekler yeterli miktarda alınmış (tüpün yarısından fazlası dolu olmalıdır) olmalıdır.
4. Hastane bilgisayar sistemine girilen ve barkot etiketi kesilen örnekler kabul edilir. Barkot kesimi ile numune kabulü arasındaki süre 30 dakikayı geçmemelidir.
5. Acil testler için de, örnekler hastadan alındıktan ve barkot etiketleri kesildikten sonra, en geç 30 dakika içinde gönderilmiş olmalıdır.
6. Barkot etiketleri silik ve yırtık olmamalı, barkot etiketi tüpün etiketi üzerine denk gelecek şekilde düzgün yapıştırılmış olmalıdır.
7. Parafin doku örnekleri tumor bölgesi isaretili ve boyalı olmalı ve bununla uyumlu 4 adet boyasız kesit içeren lamalar hasta ismi ve blok numarası içermelidir.

H. MOLEKÜLER LABORATUVARI ÖRNEK RET KRİTERLERİ:

1. Analize uygun olmayan tüp veya kaplara alınmış olan örnekler ret edilir.
2. Hemolizli örnekler ret edilir.
3. Yetersiz miktarda alınan örnekler ret edilir.
4. Hastane bilgisayar sistemine girilmeyen ve barkot etiketi kesilmeyen örnekler ret edilir.
5. Acil testler için, hastadan alındıktan ve barkot etiketleri kesildikten sonra, en geç 30 dakika içerisinde gönderilmemiş örnekler ret edilir.
6. Barkot etiketleri silik ve yırtık örnekler, barkot etiketi tüpün etiketi üzerine düzgün şekilde yapıştırılmamış olan örnekler ret edilir.
7. Dondurulmuş örnekler ret edilir.

I. MOLEKÜLER LABORATUVARI SONUÇLARINA ERİŞİM VE SONUÇ TESLİM SÜRESİ:

Testler doğrudan hastaya veya birinci dereceden yakınlarına verilmektedir, güvenlik amacıyla sisteme verilmemektedir.

Test sonuçları 15 gün içinde verilir. Araştırılma yapılması gereken durumlarda süre uzayabilir.

İ. MOLEKÜLER LABORATUVARI PERSONELİNİN EĞİTİMİ

Personel eğitimi için her hafta bir adet olmak üzere ayda dört adet seminer yapılmaktadır.

J. MOLEKÜLER LABORATUVARI TEMİZLİK PROSEDÜRÜ

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	5 / 62

Her çalışma öncesi ve sonrası çalışmayı yapan laboratuvar personeli tarafından kullanılan her teçhizat ve sarf malzeme sırasıyla 1/10 dilüe edilmiş hipoklorik asit, saf etil alkol ve ultra saf su ile silinir. Ardından 15 dakika UV ışığına maruz bırakılır.

K. MOLEKÜLER LABORATUVARINDA YAPILAN TESTLER ve UYGULAMA PROSEDÜRLERİ

MOLEKÜLER laboratuvarında yapılan analizler; izolasyon, Multiplex PCR, Real Time PCR , DNA Sekans Analizleri , Mikroarray ve RLFP çalışmaları olmak üzere altı ana başlık altında toplanmaktadır.

1.İzolasyon

- 1.a. Manuel DNA İzolasyonu
- 1.b. Otomatik DNA İzolasyonu
- 1.c. Lökosit İzolasyonu
- 1.d. Manuel RNA İzolasyonu
- 1.e. cDNA İzolasyonu
- 1.f. Saklanması
- 1.g. Analizlerde Kullanılan Numuneler

2. Multiplex PCR Çalışmaları

- 2.a. Y-Mikrodelesyon mutasyon testi
- 2.b. Colyak Hastalığı Mutasyon Analizi

3. Real Time PCR Çalışmaları

- 3.a. Faktor V Cambridge
- 3.b. Faktor V 1299-FVR2
- 3.c. ACE I/D
- 3.d. Faktor XIII
- 3.e. PAI 4G/5G
- 3.f. JAK2 V617F
- 3.g. Hemakromatozis C282Y ve H63D
- 3.h. VKORC1
- 3.i. CYP2C9
- 3.j. CYP2C19
- 3.k. CYP2D6
- 3.l. APOE

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	6 / 62

3.m.APOB

3.n.Alfa Antitripsin Variant PI-S ve PI-Z

4.Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Çalışmaları

4.a.BCR-ABL

4.b.PML-RARA

4.c.AML-ETO

4.d.INV16

5.DNA Sekans Çalışmaları

5.a.Faktor II Protrombin

5.b.Faktor V Leiden

5.c.MTHFR C677T ve A1298C

5.d.K-RAS Kodon 12-13 ve 61

5.e.FMF

5.f.Beta Talasemi

5.g.Kistik Fibrizis

5.Mikroarray Çalışmaları

5.a.UGT1A1

5.b.5-FU

6.RLFP

6.a.FLT3

1.İZOLASYON ÇALIŞMALARI:

1.a. MANUEL DNA İZOLASYONU:

1.a.1.Kandan DNA İzolasyonu : Genel olarak rutin testlerimiz dışında kalan proje kapsamındaki çalışmalarda örneklere ait kanlardan manuel DNA izolasyonu yapılır.

Gerekli Ekipmanlar: Vorteks, Kuru Isı Blok, Santrifüj, Pipet ve Roche High Pure PCR Template Preparation kit

Başlarken:

*Kuru ısı bloğu 70°C ye getirilir.

*Proteinaz K, 4,5 mL distile su proteinaz K şişesine (pembe kapaklı kitin içinden çıkan) konularak bu çözülür. Böylece solüsyon hazır hale gelir.(ilk kit kullanımlarında yapılır)

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	7 / 62

*Inhibitör removal buffer, 20 mL saf etanol , inhibitör removal buffer (siyah kapaklı kitin içinden çıkan) şişesine konularak hafifçe karıştırılır. Böylece solüsyon hazır hale gelir. (ilk kit kullanımlarında yapılır)

*Wash buffer,80 mL saf etanol , wash buffer şişesine (mavi kapaklı) konularak hafifçe karıştırılır. Böylece solüsyon hazır hale gelir. (ilk kit kullanımlarında yapılır)

*Elution buffer, 2 tane 1,5 mL lik ependorf tüpüne elüsyon buffer konulur ve bu 72°C de kuru ısı bloğuna daha sonrasında kullanılmak üzere yerleştirilir.

*Tum santrifuj basamaklari oda sicakliginda yapilir.

Prosedür:

*Numune sayısı kadar 1,5 mL lik ependerf tüpler numaralandırılarak hazırlanır . (Dnaze ve Rnaze free)

*Numunelerin son olarak DNA larını koymak için kullanılacak olan Ependorf tüpler hem numaralandırılarak hem de isimlendirilerek hazırlanır.

*Numarali tuplere ilk olarak 200 ul. Tam kan ilave edilir.

*Tam kanin uzerine 200 ul. Binding buffer ve 40 ul. Proteinaz K ilave edilir.Karisim iyice vortexlenir.

*70°C ye ayarli Kuru isi bloguda 10 dakika inkube edilir.

*Inkubasyon sonrasi tum tuplere 100 ul. Saf isopropanol eklenir.Iyice vortexlenir.

*Tum karisim High Pure Filte iceren tuplere aktarilir.

*8000 rcf. 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrasi colection tupler atilir. Filtreler Temiz colection tuplere konulur.

*Filtrelere 500 ul. Inhibitor removal buffer ilave edilir.

*8000 rcf. 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrasi colection tupler atilir. Filtreler Temiz colection tuplere konulur.

*Filtrelere 500 ul. Wash buffer ilave edilir.

*8000 rcf. 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrasi colection tupler atilir. Filtreler Temiz colection tuplere konulur.

*Filtrelere 500 ul. Wash buffer ilave edilir.

*8000 rcf. 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrasi colection tupler atilir. Filtreler Temiz colection tuplere konulur.

* Hicbir ilave yapilmadan 13000 rcf. 10 saniye santrifuj edilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	8 / 62

* santrifuj sonrası collection tüpler atılır. İlk başta hazırlanan isimli ve numaralı ependorf tüplere filtreler aktarılır.

* Filtrelere 200 ul elution buffer (70°C de inkübe edilen) ilave edilir.

*8000 rcf. 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrası filtreler ile ependorf tüplerinin üzerindeki numaraların kontrolü yapılır ve filtreler atılır. Ependorf içinde kalan supernatant DNA içermektedir.

1.a.1.a.Kandan DNA İzolasyonu : Genel olarak rutin testlerimiz dışında kalan proje kapsamındaki çalışmalarda örneklere ait kanlardan manuel DNA izolasyonu yapılır.

Gerekli Ekipmanlar: Vorteks, Çalkalayıcı Kuru Isı Blok, Santrifüj, Pipet ve Stratec Invisorb Spin Blood Mini Kit (50)

Başlarken:

*Çalkalayıcı Kuru ısı bloğu 56°C ye getirilir.

*Proteinaz K(1,1mL distile su eklenir.), Pre-Wash ve Wash Buffer üzerlerinde yazıldığı gibi dilüe edilerek hazır hale gelir.(ilk kit kullanımlarında yapılır)

*Elution buffer, 2 tane 1,5 mL lik ependorf tüpüne elüsyon buffer konulur ve bu 56°C de kuru ısı bloğuna daha sonrasında kullanılmak üzere yerleştirilir.

*Tüm santrifuj basamakları oda sıcaklığında yapılır.

Prosedür:

*Numune sayısı kadar 1,5 mL lik ependorf tüpler numaralandırılarak hazırlanır . (Dnaze ve Rnaze free)

*Numunelerin son olarak DNA larını koymak için kullanılacak olan Ependorf tüpler hem numaralandırılarak hem de isimlendirilerek hazırlanır.

*Numaralı tüplere ilk olarak 200 ul. Tam kan ilave edilir.

*Tam kanın üzerine 200 ul. Lysis buffer ilave edilir.Karışım iyice vortexlenir.

*56°C ye ayarlı Kuru ısı blokunda 3 dakika çalkalanır

*20 uL Proteinaz K ilave edilir.Vortexlenir.

*56°C ye ayarlı Kuru ısı blokunda 5 dakika çalkalanır.

*200 uL Binding Buffer ilave edilir.ve vortexlenir.

*Karışım RTA Spin Filter Set e boşaltılır.kapakları kapatılır.

*1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

*13000 rcf.(12000rpm) 2 dakika santrifuj edilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	9 / 62

*RTA Spin Filter yeni RTA Receiver tüpe alınır

*Filtrelere 500 ul. Pre-Wash buffer ilave edilir.

*13000 rcf.(12000rpm) 1 dakika santrifuj edilir.

*RTA Spin Filter yeni RTA Receiver tüpe alınır

*Filtrelere 700 ul. Wash buffer ilave edilir.

*13000 rcf.(12000rpm) 1 dakika santrifuj edilir.

*RTA Spin Filter yeni RTA Receiver tüpe alınır

*Filtrelere 700 ul. Wash buffer ilave edilir.

*13000 rcf.(12000rpm) 1 dakika santrifuj edilir.

*RTA Spin Filter yeni RTA Receiver tüpe alınır

*13000 rcf.(12000rpm) 4 dakika santrifuj edilir.

*Filtreler isim yazılan ependorf tüplere alınır.

*Filtrelere 200 ul elution buffer (56°C de inkube edilen) ilave edilir.

*1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

*8000 rcf.(9500rpm) 1 dakika santrifuj edilir.

* santrifuj sonrası filtreler ile ependorf tüplerinin üzerindeki numaraların kontrolü yapılır ve filtreler atılır. Ependorf içinde kalan supernatant DNA içermektedir.

1.a.2. Parafin Dokudan DNA İzolasyonu : KRAS çalışması için parafin dokudan DNA izolasyonu yapılmaktadır.

Gerekli Ekipman : Etuv, Kuru isi blok, vortex, pipet, bisturi, santrifuj ve QIAamp DNA FFPE Tissue kiti

Baslarken:

*Ornekler oda sıcaklığına (15-25°C) getirilir.

*Kuru isi bloğu 56°C ve 90°C ye ayarlanır.

*Tüm kit elemanları oda sıcaklığında saklanılır.

*Buffer AW1 ve buffer AW2 ilk kullanım için üzerlerinde yazılan kadar saf etanol ilave edilerek kullanıma hazırlanır.

*Buffer AL içinde kristallenme varsa 56°C de inkube edilir.

*Etuv 75°C ye ayarlanır.

*Tüm santrifuj basamakları oda sıcaklığında yapılır.

Prosedür:

*Lam üzerindeki örnekler etuvde 75°C de 1 saat inkube edilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	10 / 62

*dort adet sale icerisine saf ksilen konur.Ilk uc sale icerisinde ornekler 2'ser dakika bekletilir.Dorduncu sale icerisinde ise 10 dakika bekletilir.

*dort adet sale icerisine saf etanol konur.Ilk uc sale icerisinde ornekler 2'ser dakika bekletilir.Dorduncu sale icerisinde ise 10 dakika bekletilir.Sure sonunda cikarilip kurumasi saglanir.

*Isaretli boyali lam ile karsilastirilarak yikanan lamlardaki tumorlu bolgeler isaretlenir.

*Isaretlenen bolgeler uzerine 1 damla su damlatilir; dikkatli bir sekilde bisturi ile kazinir ve temiz ependorfa alinir.

*Orneklerin alindigi ependorfa 180 ul buffer ATL ve 25 ul Proteinaz K ilave edilerek iyice vortexlenir.

*56°C deki kuru isi blogunda doku tamamen lize olana kadar inkube edilir.(genel olarak 1 gece) inkubasyon sirasinda ornek birkac kez iyi sekilde vortex yapılmalıdır.Gerekirse 1 gece daha inkube edilebilir.

*Iziz islemi tamamlaninca ornek kuru isi blogunda 90°C de 1 saat daha inkube edilir.

*Sure sonunda tup kapaklarinin ic kisimindeki damlaları tupun icine almak icin kisaca santrifuj (spin) edilir.

*200 ul buffer AL ve 200 ul saf etanol eklenir.10 sn vortexlenir.Spin edilir.

*Tuplerin icindeki karisim QIAamp MinElute spin kolona aktarilir.Tuplerin kapagi kapandiktan sonra 8000 rpm de 1 dakika santrifuj edilir.

*Spin kolonun yerlestigi collection tup atilir.Kolon Temiz collection tupe yerlestirilir.

*Kolon kapagi dikkatlice acilir ve icine 500 ul buffer AW1 eklenir.

*8000 rpm de 1 dakika santrifuj edilir.

*Spin kolonun yerlestigi collection tup atilir.Kolon Temiz collection tupe yerlestirilir.

*Kolon kapagi dikkatlice acilir ve icine 500 ul buffer AW2 eklenir.

*8000 rpm de 1 dakika santrifuj edilir.

*Spin kolonun yerlestigi collection tup atilir.Kolon Temiz collection tupe yerlestirilir.

*13000 rpm de 5 dakika bos santrifuj edilir.

*Spin kolonun yerlestigi collection tup atilir.Kolon 1,5 ml lik ependorf tuplere yerlestirilir.

*Kolon kapagi dikkatlice acilir ve 30 ul buffer ATE kolonun tam ortasina gelecek sekilde ilave edilir.Kolonun kapagi kapatilir.

*1 dakika oda sicakliginda inkube edilir.

*13000 rpm de 2 dakika santrifuj edilir.

*Kolon atilir. Ependorf icinde kalan supernatant DNA icermektedir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ Tıp Fakültesi Hastanesi	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	11 / 62

1.b.OTOMATİK DNA İZOLASYONU

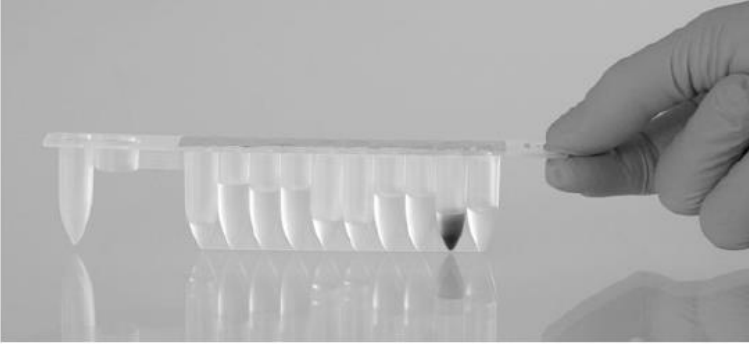
1.b.1. EZ1 Otomatik DNA İzolasyonu : EZ1 DNA Blood 200 µl Kit 'i kullanarak tam kandan DNA izole edilir.

Gerekli Ekipman : vortex, pipet ve QIAGEN EZ1 DNA Blood 200 uL kiti

Baslarken:

- *Ornekler oda sıcaklığına (15-25°C) getirilir.
- *Tüm kit elemanları oda sıcaklığında saklanılır.
- *İzolasyonu yapılacak örneklerin sırası ile isim listesi yapılır.Bu listeye göre örnekler sıralanır.
- *Tüm örnekler vortexlenerek homojen bir şekilde karışması sağlanır.

Prosedur:



*EZ1 DNA Blood 200 µl Kit (Bir örnek içindir.)



*Kartuş rafa reaktif Kartuşlar yüklenir.Yüklenmesi gereken yön bir ok ile etiketlenmiştir.

*Kartuşun her oyuğu manyetik parçacıklar, Lysis tampon, yıkama tamponu yada işlem tampon maddesi olarak belirli bir reaktif içermektedir. Cihazın işlem sırası aşağıda belirtilecektir.



1. Numaralı kuyucuklara 1,5 ml 'lik elution tüpler yüklenir.
2. Numaralı kuyucuklara pipet ucu ve tutucusu yüklenir.
3. Numaralı kuyucuklar boş bırakılır.
4. Numaralı kuyucuklara 2 ml kan numune tüpleri yüklenir.
5. Reaktif kartuşların raflara yüklenmesi.
6. Reaktif kartuşlar burada da mevcuttur.

*EZ1'nin ekran yönetimi

- ❖ Ekranı gelen menüden :
- ❖ **Start** : Protocols
- ❖ **Key**: Start

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	13 / 62

❖ **Select protocol** :Sample volume (200 µl Blood),Elution volume (200 µl)

*Otomatik izolasyon aşağıdaki işlem sırasıyla yürür. Ve işlem sonucunda 1 numaralı kuyucuklarda bulunan tüplerin içine DNA bırakılır.Cihazın kapağı yukarıya kaydırılarak açıldıktan sonra vakit kaybetmeden DNA ların kapakları kapatılır. Çalışma zamanına kadar +4 derecede saklanır.

1.b.2.MAGNA PURE Compact Otomatik DNA İzolasyonu : MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 'i kullanarak tam kandan DNA izole edilir. Bir çalışmada 1-8 numune çalışabilen tezgah üstü tam otomatik nükleik asit izolasyon cihazıdır.

Gerekli Ekipman : vortex, pipet ve MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit

Baslarken:

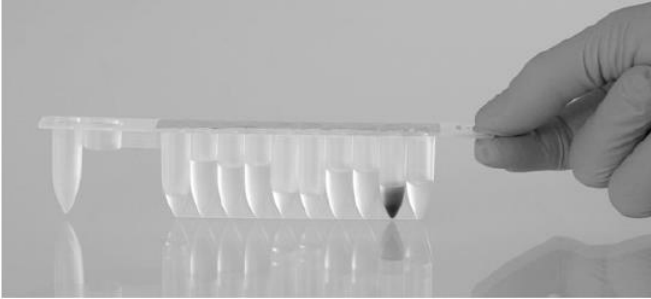
*Ornekler oda sıcaklığına (15-25°C) getirilir.

*Tum kit elemanlari oda sıcaklığında saklanilir.

*İzolasyonu yapılacak örneklerin sırası ile isim listesi yapılır.Bu listeye göre örnekler sıralanır.

*Tüm örnekler vortexlenerek homojen bir şekilde karışması sağlanır.

Prosedur:* MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Bir örnek içindir.)



	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	14 / 62

*Kartuş rafa reaktif Kartuşlar yüklenir.Yüklenmesi gereken yön bir ok ile etiketlenmiştir.

*Kartuşun her oyduğu manyetik parçacıklar, Lysis tampon, yıkama tamponu yada işlem tampon maddesi olarak belirli bir reaktif içermektedir. Cihazın işlem sırası aşağıda belirtilecektir.

- 1.Numaralı kuyucuklara 1,5 ml 'lik elution tüpler yüklenir.
2. Numaralı kuyucukara 2 ml kan numune tüpleri yüklenir.
- 3.Numaralı kuyucuklara pipet ucu ve tutucusu yüklenir.
- 4.Reaktif kartuşlar yüklenir.

* Magna Pure Compact Otomatik İzolasyon Cihazı Ekran Yönetimi:

Cihazın üzerindeki power on tuşuna basılarak açılır.

Ekranda run tuşuna basılır.

Şifre ekranına gelindiğinde ileri tuşuna basılır.

Reaktif kartuşlar barkod okutucu tarafından okutularak rafa yerleştirilir.

Cartridges inserted tuşuna basılarak onaylanır ve ileri tuşuna basılır.

Protokol seçilir. (DNA Blood 100-400 uL)

Sample volume 200 uL olarak seçilir.

Elution volume 200 uL olarak seçilir.

Tip traysler yerleştirilir.tip trays inserted tuşuna basılarak onaylanır ve ileri tuşuna basılır.

Klavye simgesi tıklanarak hastaların isimleri girilir ve done tuşuna basılır.

Sample inserted tuşuna basılarak onaylanır ve ileri tuşuna basılır.

Elution tüpler barkod okuyucu tarafından okutularak gözlere yerleştirilir.

Elution tubes inserted tuşuna basılarak onaylanır ve ileri tuşuna basılır.

Confirm data , drop catcher present tuşlarına onay verilince start simgesi aktif olur.

Start da basılarak otomatik DNA izolasyonu başlatılır.

1.c. MANUEL LOKOSIT İZOLASYONU

Gerekli ekipmanlar: Örnek (kemik iligi , tam kan gibi) , serum fizyolojik su yada PBS ve Red Blood Cell Lysis Buffer , High Pure RNA Isolation Kit (icinden cikan yesil kapakli Lysis/Binding Buffer)

Baslarken:

*Ornegin lokosit sayisi x 1000 = A ve 3 milyon lokosit sayisi/A = B hesapları yapılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	15 / 62

* Red Blood Cell Lysis Buffer +4 °C de saklanır.

* Ornegin taze olmasına dikkat edilir.

* Vortex asla kullanılmaz.

Prosedur:

* B miktar ornek (kan yada kemik ilgi) temiz 2 mL lik 2 ependorf tuplere alınir.

* Uzerine 750 ul. Red Blood Cell Lysis Buffer ilave edilir.

* Karisim alt ust yapilarak karistirilir ve +4°C de 10 dakika inkube edilir.

* Sure sonunda 13000 rpm de 30 sn santrifuj edilir.

*Supernetant dikkatli bir sekilde atilir. Uzerine 750 ul Red Blood Cell Lysis Buffer ilave edilir.

* Karisim alt ust yapilarak karistirilir ve +4°C de 10 dakika inkube edilir.

* Sure sonunda 13000 rpm de 30 sn santrifuj edilir.

*Beyaz hucreler tupun dibinde iyice belirginlesmistir. Supernetant dikkatli bir sekilde atilir. *Uzerine 750 ul serum fizyolojik yada PBS ilave edilir. Karisim alt ust yapilarak karistirilir.

* 13000 rpm de 30 sn santrifuj edilir.

*Supernetant dikkatli bir sekilde atilir. Uzerine 400 ul Lysis/Binding Buffer ilave edilir.

*Karisim vortexlenmeden parmak yardimi ile iyice karistirilir ve -20°C de saklanır. Veya Hemen RNA izolasyonu icin kullanılabilir.

1.d.MANUEL RNA IZOLASYONU

Gerekli ekipmanlar: izole edilmis lokositler, serum fizyolojik su yada PBS , High Pure RNA Isolation Kit , pipet , santrifuj , kabin , saf etil alkol

Baslarken:

*Lokositler -20°C den alinip oda sicakligina gelmesi beklenir.

*Kit icinden cikan Dnaze enzimi ,Wash Buffer I ve II uzerlerinde yazdigi gibi hazirlanir.

Prosedur:

*Lokositler spin yapilir. Kapaklari dikkatlice acilir ve uzerlerine 200 ul PBS ilave edilir.

*Karisim Kitin icinden Cikan Filtreli tuplere pipetaj yapilarak aktarilir.

*8000 rcf de 1 dakika santrifuj edilir.

*Collection tupler atilir. Yerine yenisi alinir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	16 / 62

*Ornek sayısı ile carpılarak hazırlanan : 10 ul Dnaze enzimi + 90 ul Dnaze incubation Buffer karışımı hazırlanır. Bu karışım her bir filtreye 100 ul olarak dağıtılır. Kapaklar kapatılır ve 15 dakika oda sıcaklığında dinlendirilir.

*Sure sonunda 500 ul Wash Buffer I filtreler üzerine ilave edilir.

*8000 rcf de 1 dakika santrifuj edilir.

*Collection tüpler atılır. Yerine yenisi alınır.

*500 ul Wash Buffer II filtreler üzerine ilave edilir.

*8000 rcf de 1 dakika santrifuj edilir.

*Collection tüpler atılır. Yerine yenisi alınır.

*200 ul Wash Buffer II filtreler üzerine ilave edilir.

*13000 rcf de 2 dakika santrifuj edilir.

*Collection tüpler atılır. Filtreler isim yazılı ependorf tüplere aktarılır.

*60 ul Elution Buffer filtrenin her yerini ıslatacak şekilde her bir filtreye eklenir.

*8000 rcf de 1 dakika santrifuj edilir.

*Santrifuj sonunda filtreler atılır ve ependorfların kapakları kapatılır ve RNA lar +4°C de dinlendirilir.

1.e. cDNA İZOLASYONU

1.e.1 LightCycler t(9:22) Quantification Kit ile cDNA izolasyonu:

Gerekli ekipmanlar: LightCycler t(9:22) Quantification Kit, RNA örnekleri,kabin,pipet takımı,santrifüj,soğuk blok,termal cyler cihazı

Baslarken:

*İşlem öncesi kabin , pipet takımı ve santrifüj %100 etanol ile silinerek RNase inaktive edilir.

*Eldivenler temizlikten sonra değiştirilir ve yüzeye dokunulmaz.

*0,2ml lik pcr tüpleri hazırlanır ve soğuk blok üzerine sıralanır.

*LightCycler t(9:22) Quantification Kit içinden cDNA senteziyle ilgili 3 çeşit standart ve pozitif kontrol ile su (11 nolu kapak) , rt-buffer (1 nolu kapak) , random primer (2) , Deoksinükleotid mix (3) , AMV Reverse Traskriptaz (4) ve RNase inhibitor (5) çıkarılır.Eridikten sonra spin yapılır.

Prosedür:

*RNA örnekleri , pozitif kontrol ve standartlar 10 'ar uL. Pcr tüplerine eklenir.Kapakları kapatılır ve termal cyler da 65 derecede 10 dakika denatüre edilir.

*Bu sırada kabinde cDNA sentez mixi hazırlanır.pcr tüplerimizin sayısı kadar aşağıdaki miktarlar hesaplanır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	17 / 62

Su (11) 4,4 ul.

Rt-buffer (1) 4 ul.

Random primer (2) 0,2 ul.

Dmix (3) 0,4 ul.

AMV (4) 0,4 ul.

RNase in. (5) 0,6 ul.

Toplam 10 ul.

*Termalcyclerdan alınan denatüre edilmiş RNA lar , pozitif kontrol ve standartlar üzerine 10'ar uL hazırlanan bu cDNA sentez mixinden pipetaj yapılarak ilave edilir.Tüplerin kapakları kapatılır.

*Termalcycler da aşağıdaki programda cDNA oluşturulur.

37 derecede 1 saat

65 derecede 10 dakika

8 derecede forever

*Termalcyclerdan çıkan cDNA lar hemen -20 dereceye kaldırılır veya hemen çalışmaya alınabilir.

1.e.2 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit ile cDNA izolasyonu:

T(9,22) hariç diğer tüm translokasyonların tespiti için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit ile cDNA izolasyonu yapılır.

Gerekli ekipmanlar: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, RNA örnekleri , kabin,pipet takımı,santrifüj,soğuk blok,termal cycler cihazı

Başlarken :

*İşlem öncesi kabin , pipet takımı ve santrifüj %100 etanol ile silinerek RNase inaktive edilir.

*Eldivenler temizlikten sonra değiştirilir ve yüzeye dokunulmaz.

*0,2ml lik pcr tüpleri hazırlanır ve soğuk blok üzerine sıralanır.

* Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit ve RNA lar oda sıcaklığına gelince spin yapıp soğuk blok üzerine alınır.

Prosedür :

*Herbir RNA örneğimiz için aşağıdaki karışım hazırlanır. Toplam hacim 13 uL dir.

10 uL RNA,2 uL Random Hexamer Primer (6) ve 1 uL steril su (kapak no 7 yada 9) *Termalcycler da 65 derecede 10 dakika denatüre edilir.

*Bu sırada kabinde cDNA sentez mixi hazırlanır.pcr tüplerimizin sayısı kadar aşağıdaki miktarlar hesaplanır.Aynı sıra ile ilave edilirler.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	18 / 62

Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (2)	4 uL
Protector RNase Inhibitor (3)	0,5 uL
Deoxynucleotide Mix (4)	2 uL
Transcriptor Reverse Transcriptase (1)	0,5 uL
Toplam	7 uL

*Termalcyclerdan alınan denatüre edilmiş RNA lar üzerine 7'er uL hazırlanan bu cDNA sentez mixinden pipetaj yapılarak ilave edilir.Tüplerin kapakları kapatılır.

*Termalcycler da aşağıdaki programda cDNA oluşturulur.

- 25 derecede 10 dakika
- 50 derecede 1 saat
- 85 derecede 5 dakika
- 8 derecede forever

*Termalcyclerdan çıkan cDNA lar hemen -20 dereceye kaldırılır veya hemen çalışmaya alınabilir.

1.f. TÜM İZOLE EDİLEN NUMUNELERİN SAKLANMASI:

Laboratuvarımıza ulaşan tüm materyaller izolasyon çalışmasına kadar +4 derecede muhafaza edilir.İzole edilen DNA ve RNA lar çalışmaları tamamlanincaya kadar +4 derecede saklanır. Çalışması biten bu örnekler kayıt altına alınarak -80 derecede özel kutularda saklanır.Lökosit ve cDNA örneklerimiz çalışmaları tamamlanincaya kadar – 20 derecede özel kutusunda muhafaza edilir.

1.g. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN NUMUNELER:

*Multiplex PCR ile Mikroarray calismalarinda kandan otomatik yontem ile izole edilmiş DNA kullanılır.

*Real Time PCR calismalarinda yapılacak teste gore ya kandan otomatik yontem ile izole edilmiş DNA yada kan ve/veya kemik iliginde manuel yontemle izole edilen lokositlerden elde edilen RNA ve CDNA kullanilir.

*DNA Sekans Analizlerinde yapılacak teste gore ya kandan otomatik yontem ile izole edilmiş DNA yada Parafin dokudan manuel yontem ile izole edilmiş DNA kullanilir.

2.MULTİPLEKS PCR ÇALIŞMALARI:

2.a. Y-MİKRODELESYON MUTASYON ANALİZ TESTİ:

Y kromozomundaki delesyon varlığının tespiti için kullanılan bir testir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	19 / 62

Gerekli Ekipmanlar : EuroClone YDEL Kiti , Taq DNA Polimeraz , pipet takımı , santrifüj , termalcycler

Başlarken :

*Kit +4 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

*Pcr tüpleri her bir örnek ve kontrol için 3 ayrı mixe göre isimlendirilir.

ÖRNEK MİX 1 , MİX 2 , MİX 3 (3 TÜP)

SAĞLIKLI KONTROL(XY) MİX 1 , MİX 2 , MİX 3 (3 TÜP)

* Her çalışmada mutlaka sağlıklı bir erkek örnek kontrol olarak 3 mix içinde çalışılır.

Prosedür :

*Örnekler ve sağlıklı kontrol sayısı kadar her bir mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

OM:Oligo Mix

	OM 1	OM 2	OM 3
Oligo mixden	10 uL	10 uL	5 uL
Amplikasyon mixi	10 uL	10 uL	5 uL
Taq DNA Polimeraz	0,25 uL	0,25 uL	0,25 uL
Toplam	20 uL	20 uL	10 uL

*Daha önceden hazırlanan pcr tüplerine OM1 ve OM2 den 20'er uL dağıtılırken OM3 den 10'ar uL dağıtılır.

*Her bir tüpe kendi örnek DNA sıندان 5 uL ilave edilir. Kapakları kapatılır.

*Termalcyclerda aşağıdaki program ile çoğaltılır.

94 derecede 10 dakika

30X

94 derecede 1 dakika

60 derecede 30 sn

72 derecede 60 sn

8 derecede FOREVER

*Program sonunda cihazdan çıkarılan pcr ürünleri ya +4 derecede muhafaza edilir yada hemen agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edilir.

*%2 lik agaroz jel(150 ml T.B.E ve 3gr agaroz jel) beherde eritilir. Etidiyum bromid damlatılır ve elektrofoez tankına dökülür. 20 dk soğuması beklenir.

* Tank elektroforeze yerleştirilip yükleme işlemi yapılır.

*PCR ürünleri loading solüsyonu ile boyanarak yüklenir.Yükleme sırası aşağıdaki gibidir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	20 / 62

Uygun leadder , ilk hastaların om1,om2 ve om3 ardından sağlıklı kontrolün om1,om2 ve om3 yüklenir.

*60 V da 2,5 saat yürütüldükten sonra UV Lamba ile gözlemlenir.

*Bantlar açılmadıysa 30 V da yarım saat daha yürütülür.

*Değerlendirme yapılması için jel görüntüleri çekilir.

2.b. ÇÖLYAK HASTALIĞI MUTASYON ANALİZ TESTİ:

Çölyak Hastalığı ile bağlantılı olan ve tanı koyabilen DQA1*02,05 ve DQB1*02,0302 allellerinin tespiti için kullanılan bir testir.

Gerekli Ekipmanlar : Olerup SSP Coeliac kiti , pipet takımı , termalcycler, santrifüj ve vortex

Başlarken :

* Olerup SSP Coeliac kiti – 20 dereceden çıkarılır.Kitin 16 numaralı kuyucuğu negatif kontrol olduğundan işaretlenir.

Prosedür :

*Öncelikle aşağıdaki karışım hazırlanır.16 numaralı negatif kontrol kuyusuna bu karışımdan 10 uL ilave edilir.

Master Mix (kittin içinden çıkar) 56 uL

Steril su 89 uL

Taq DNA Polimeraz 2 uL

*Bu karışıma enson 36 uL DNA ilave edildikten sonra vortex ve spin yapılır.

*Primerleri hazır ve 16 kuyucuk içinde olan kitimizin kalan 15 kuyucuuna hazırladığımız DNA içeren karışımı 10'ar uL şeklinde dağıtılır.

*8'li strip pcr kapakları ile kapatılarak termalciler da aşağıdaki programda çoğaltılır.

94 derecede 2 dakika

10X

94 derecede 10 sn

65 derecede 1 dakika

20X

94 derecede 10 sn

61 derecede 50 sn

72 derecede 30 sn

Store 8 derecede FOREVER

	T.C NECMEETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	21 / 62

*Program sonunda cihazdan çıkarılan pcr ürünü ya +4 derecede muhafaza edilir yada hemen agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edilir.

*%2 lik agaroz jel(150 ml T.B.E ve 3gr agaroz jel) beherde eritilir. Etidiyum bromid damlatılır ve elektrofoez tankına dökülür. 20 dk soğuması beklenir.

* Tank elektroforeze yerleştirilip yükleme işlemi yapılır.

*135 V 20 dakika yürütülür.

*Değerlendirme yapılması için jel görüntüleri çekilir.

*Ayrıca pozitif bantlar RUNSCORE programında değerlendirilerek sonuç belgesi alınır.

3.REAL TIME PCR ÇALIŞMALARI:

3.a. EUROCLONE FAKTÖR V CAMBRIDGE MUTASYON ANALİZ TESTİ: FV Cambridge yeni tespit edilen bir mutasyondur. Venöz tromboz riskini arttıran 1691 pozisyonundaki FV Leiden mutasyonuna ek olarak, 1091 pozisyonunda arjinin – treonin dönüşümüne neden olan tek nokta mutasyonu (G>C) Cambridge olarak adlandırılmıştır. Bu mutasyon daha hafif bir APC rezistansı yaratır.

Gerekli Ekipmanlar : EuroClone Faktor V R306T Cambridge GENOTYPING Kiti , Taq DNA Polimeraz , pipet takımı , santrifüj , Rotor-Gene Q real time pcr cihazı

Başlarken :

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

*Pcr tüpleri her bir örnek ve kontroller için isimlendirilir.

* Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan C1 Normal Kontrol , C2 Mutant Kontrol ve her iki kontrolü eşit oranda ayrı bir tüpde kullanacağımız kadar karıştırarak oluşturacağımız Hetero Kontrol ile Negatif Kontrolleri olarak çalışılır.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Oligo mixden 10 uL

Amplikasyon mixi 10 uL

Taq DNA Polimeraz 0,25 uL

Toplam 20 uL

*Daha önceden hazırlanan pcr tüplerine mixden 20'er uL dağıtılır.

*Her bir tüpe kendi örnek DNA sıندان vortex yapılarak 5 uL ilave edilir. Kapakları kapatılır.

* Rotor plağına tüpler yerleştirilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	22 / 62



*Plak rotor-gene Q real time pcr cihazına yerleştirilir.Cihaz arka açma kapama tuşuna basılarak açılır.



*Cihazın bağlı olduğu bilgisayarın masa üstündeki rotor-gene Q series software programı çift tıklanır.

*New Run penceresinden protokol çift tıklanarak seçilir.(EuroClone Faktör V Cambridge)

*yeni açılan pencereden kullandığımız plaka seçilir.(kırmızı yada mavi)

*Operator kısmına çalışanın adı soyadı baş harfleri yazılır ve next e tıklanır.

*New Run Wizard penceresinde next e tıklanır.

*Start Run a tıklanır.

*Testi kaydediceği yeri sorar.(ATQ dosyası içinde rt analiz pcr klasörüne kaydedilir.)

*Daha sonra isim listesi doldurulur ve Finish and lock tıklanır. Test başlamıştır.

* PCR Programı aşağıdaki gibidir.

95 derecede 10 dakika

45X

95 derecede 15 sn

60 derecede 60 sn Fluorescent Acquisition

* Test bitince değerlendirme için tüm iç ekranlar kapatılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	23 / 62

*Analiz ,Other , Allelic Discriminant , alt menüde görülen green ve yellow segmelerinin ikisinde ctrl ile seçilir ,show tıklanır.Gelen ekrandan tüm kontroller tıklanır, slope correct ile auto-scale tıklanır ve Threshold ayarlanır.Bu işlemden sonra hastalar tek tek değerlendirilir.

3.b. NLM FAKTÖR V (H1299R) MUTASYON ANALİZ TESTİ: FV H1299R yeni tespit edilen bir mutasyondur. Venöz tromboz riskini arttıran 1691 pozisyonundaki FV Leiden mutasyonuna ek olarak, 1299 pozisyonunda histidin – arginin dönüşümüne neden olan tek nokta mutasyonu (4070 . nükleotidde A>G) FV R2 olarak da adlandırılmaktadır. Bu mutasyon daha hafif bir APC rezistansı yaratır.

Gerekli Ekipmanlar : NLM Faktor V H1299R Real Time Fret Kiti , Taq DNA Polimeraz , pipet takımı , santrifüj , Rotor-Gene Q real time pcr cihazı

Başlarken :

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

*Pcr tüpleri her bir örnek ve kontroller için isimlendirilir.

* Her çalışmada mutlaka bir önceki çalışmada tespit edilmiş hasta örneklerinden Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

MIX 1	10 uL
MIX 2 FV (H1299R)	10 uL
Taq DNA Polimeraz	0,25 uL
Toplam	21 uL

*Daha önceden hazırlanan pcr tüplerine mixden 21'er uL dağıtılır.

*Her bir tüpe kendi örnek DNA sıdan vortex yapılarak 4 uL ilave edilir. Kapakları kapatılır.

* Rotor plağına tüpler yerleştirilir.

*Plak rotor-gene Q real time pcr cihazına yerleştirilir.Cihaz arka açma kapama tuşuna basılarak açılır.

*Cihazın bağlı olduğu bilgisayarın masa üstündeki rotor-gene Q series software programı çift tıklanır.

*New Run penceresinden protokol çift tıklanarak seçilir.(NLM FV1299)

*yeni açılan pencereden kullandığımız plaka seçilir.(kırmızı yada mavi)

*Operator kısmına çalışanın adı soyadı baş harfleri yazılır ve next e tıklanır.

*New Run Wizard penceresinde next e tıklanır.

*Start Run a tıklanır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	24 / 62

*Testi kaydedeceği yeri sorar.(ATQ dosyası içinde rt analiz pcr klasörüne kaydedilir.)

*Daha sonra isim listesi doldurulur ve Finish and lock tıklanır. Test başlamıştır.

* PCR Programı aşağıdaki gibidir.

95 derecede 2 dakika

40X

95 derecede 17 sn

62 derecede 30 sn Acquiring to Cycling A (fret 1)

25 derecede 10 dakika

95 derecede 1 dakika

MELT

55 derecede 90 sn

80 derecede 8 sn Acquiring to Melt A (fret 1)

* Test bitince değerlendirme için tüm iç ekranlar kapatılır.

*Analiz ,Melt, alt menüde görülen green ve yellow segmelerinin ikiside ctrl ile seçilir ,show tıklanır.Gelen ekrandan tüm kontroller tıklanır, her pike bir BİN atanır.Genotyping segmesine BİN isimleri ile genotipler eşleştirilir.Artık her hastanın pikine göre genotiplendirmeyi program otomatik yapar.Bu işlemten sonra hastalar tek tek değerlendirilir.

3.c. TIB MOLBIOL ACE POLİMORFİZM ANALİZ TESTİ: Renin-Angiotensin sistemi (RAS) kan basıncı ve böbrek fonksiyonları açısından önemli bir sistemdir. Yapılan çalışmalar, bu sistemdeki olası genetik değişikliklerin damar hastalıklarında önemli olduğunu tespit etmiştir. Angiotensin Converting Enzyme-I (ACE) RAS sisteminin en önemli elemanlarından birisidir. Bu enzimi kodlayan gendeki İnsersiyon/Delesyon mutasyonları, plazma ve doku içerisindeki ACE miktarını doğrudan etkilemektedir.

Gerekli Ekipmanlar : TIB MOLBIOL ACE POLİMORFİZM Real Time Kiti , LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapıışkanı

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Her kitin içinden çıkan product descriptionlar takip edilerek aşağıdaki gibi ancak kite göre değişebilen sulandırım yapılır.

VEGF for

Ana stok: 20 µM için 250 µl distile su

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	25 / 62

Ara stok: 10 µM ara stok için, 1/2 dilusyon, 10 µl primer + 10 µl su

VEGF rev

Ana stok: 20 µM için 250 µl distile su

Ara stok: 10 µM ara stok için, 1/2 dilusyon, 10 µl primer + 10 µl su

*Her çalışmada mutlaka bir önceki çalışmada tespit edilmiş hasta örneklerinden Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . 1a'dan 1b'ye 10 uL eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	9,6 uL
Mg	2,4 uL
Master Mix	2 uL
For	1 uL – 0,5 uM konsantrasyon
Rev	1 uL – 0,5 uM konsantrasyon
Toplam	16 uL+ 4 uL DNA

*Özel plate mixden 16'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 4 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*PCR programı:

95 derecede 10 dakika

45X

95 derecede 10 sn

55 derecede 4 sn

65 derecede 13 sn

72 derecede 20 sn single

MELT

95 derecede 30 sn

60 derecede 2 dakika

98 derecede continous

40 derecede 30 sn

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	26 / 62

Cihazın yönetimi:

Bilgisayar açılır.Şifre ekranına OPERATOR-LC480 yazılır.

Cihaz arka tarafında bulunan açma kapama tuşundan açılır.

Ekran masaüstünde bulunan Lightcycler 480 SW 1.5 adlı program çift tıklanır.

Şifre ekranına ADMIN-LightCycler480 yazılır.Böylece program açılmış olur.

Ekranın sol üst köşesinde Initializing yazması gerekir.ve cihazın ön konsolunda bulunan çift ışıklardan birinin yanıp sönüyor olması gerekir.eğer bu şartlar sağlanmadıysa cihaz ve bilgisayar kapatılıp tekrar açılır.

Ekranın sol üst köşesinde Initializing- standby ' a dönene kadar cihaza plate yüklenmemeli ve herhangi bir çalışma yapılmamalıdır.standby konumunda ışıklardan biri yeşil diğeri kırmızı ve sabit olacaktır.

Test başlatımı:

Overview sayfasından New Experiment From Template tıklanır.Açılan pencereden uygun protokol seçilir.(ACE SYBR GREEN I) PCR programı kontrol edilir.

Ekranın solunda subset editor tıklanır.Sol alttaki + işareti tıklanır.Bu sayede yeni plate aktif olur.Plate üzerinde çalıştığımız yerler işaretlenerek sağ altta bulunan Apply tıklanır.

Experiment sayfasına geri dönülerek aktif olan Start Run tıklanır.Test aynı isimli donyaya tıklanır.

Ekranın sol üstündeki sample editor tıklanır.Subsetden plate'imiz seçilir.Ve isim listemiz girilir.

Experiment sayfasına geri dönülerek an be an pcr programı izlenebilir.

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastalar onların piklerine göre değerlendirilir.

3.d. TIB MOLBIOL LightMix Kit Human Factor XIII A V34L MUTASYON ANALİZ TESTİ: FXIII'ü kodlayan gen bölgesinde meydana gelen G>T translokasyonu, Valin'in (V) Lösin'e (L) dönüşümüne yol açmakta ve bu mutasyon sonucunda FXIII'ün aktivite edilmesi engellenmektedir. FXIII Val34Leu olarak adlandırılan bu mutasyonun tromboza karşı koruyucu etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : TIB MOLBIOL LightMix Kit Human Factor XIII A V34L Real Time Kiti , LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkanı

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	27 / 62

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer probalar 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	7,4 uL
Mg	1,6 uL
Reagent Mix (primer-probe)	4 uL
Master Mix	2 uL
Toplam	15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

95 derecede 10 sn

60 derecede 5 sn single

72 derecede 13 sn

MELT

95 derecede 30 sn

40 derecede 60 sn

85 derecede continous

40 derecede 30 sn

*Cihaz Yönetimi,test Başlatımı ve Değerlendirme prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	28 / 62

3.d.1 EUROCLONE Factor XIII A V34L GENOTYPING ANALİZ TESTİ:

Gerekli Ekipmanlar : EuroClone Factor XIII A V34L Genotyping Kiti , Taq DNA Polimeraz , pipet takımı , santrifüj , Rotor-Gene Q real time pcr cihazı

Başlarken :

- *Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.
- *Pcr tüpleri her bir örnek ve kontroller için isimlendirilir.
- * Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan C1 Normal Kontrol , C2 Mutant Kontrol ve her iki kontrolü eşit oranda ayrı bir tüpde kullanacağımız kadar karıştırarak oluşturacağımız Hetero Kontrol ile Negatif Kontrolleri olarak çalışılır.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Oligo mixden	10 uL
Amplikasyon mixi	10 uL
Taq DNA Polimeraz	0,25 uL
Toplam	20 uL

- *Daha önceden hazırlanan pcr tüplerine mixden 20'er uL dağıtılır.
- *Her bir tüpe kendi örnek DNA sıندان vortex yapılarak 5 uL ilave edilir. Kapakları kapatılır.
- * Rotor plağına tüpler yerleştirilir.
- *Plak rotor-gene Q real time pcr cihazına yerleştirilir.Cihaz arka açma kapama tuşuna basılarak açılır.
- *Cihazın bağlı olduğu bilgisayarın masa üstündeki rotor-gene Q series software programı çift tıklanır.
- *New Run penceresinden protokol çift tıklanarak seçilir.(EuroClone fvcambridge)
- *yeni açılan pencereden kullandığımız plaka seçilir.(kırmızı yada mavi)
- *Operator kısmına çalışanın adı soyadı baş harfleri yazılır ve next e tıklanır.
- *New Run Wizard penceresinde next e tıklanır.
- *Start Run a tıklanır.
- *Testi kaydediceği yeri sorar.(ATQ dosyası içinde rt analiz pcr klasörüne kaydedilir.)
- *Daha sonra isim listesi doldurulur ve Finish and lock tıklanır. Test başlamıştır.
- * PCR Programı aşağıdaki gibidir.

95 derecede 10 dakika

45X

95 derecede 15 sn

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	29 / 62

60 derecede 60 sn Fluorescent Acquisition

* Test bitince değerlendirme için tüm iç ekranlar kapatılır.

*Analiz ,Other , Allelic Discriminant , alt menüde görülen green ve yellow segmelerinin ikiside ctrl ile seçilir ,show tıklanır.Gelen ekrandan tüm kontroller tıklanır, slope correct ile auto-scale tıklanır ve Threshold ayarlanır.Bu işlemten sonra hastalar tek tek değerlendirilir.

3.e. TIB MOLBIOL LightMix Kit Human PAI-1 4G/5G POLİMORFİZM ANALİZ TESTİ: PAI, pıhtılaşma mekanizmasında görevlidir. Plazminojen, aktivatörü sayesinde plazmine dönüşür, ortamdaki plazminojen aktivatörleri, inhibitörleri sayesinde düzenlenir. Bu mekanizmada olabilecek bir mutasyon Koroner Arter hastalıklar açısından önemlidir. Bu mutasyonlar içinde en önemlisi, promotor bölgedeki -675 de 4G/5G insersiyon/delesyondur.

Gerekli Ekipmanlar : TIB MOLBIOL LightMix Kit Human PAI-1 4G/5G Real Time Kiti , LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkanı

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer probler 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	9,4 uL
Mg	1,6 uL
Reagent Mix (primer-probe)	2 uL
<u>Master Mix</u>	<u>2 uL</u>
Toplam	15 uL+ 5 uL DNA

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	30 / 62

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sıندان vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*PCR Programı

95 derecede 10 dakika

40X

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 30 sn

40 derecede 2 dakika

85 derecede continous

40 derecede 30 sn

*Cihaz Yönetimi, test Başlatımı ve Değerlendirme prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

3.f. METABION JAK2 V617F MUTASYON ANALİZ TESTİ: JAK2 proteini, hücre içinde hematopoetik büyüme faktörü olarak görev almaktadır. Bu nedenle kanser oluşumunda, özellikle kan kanserinde önemi olabileceği düşünülmektedir. JAK2 mutasyonu, proteinini kodlayan genin 1849 pozisyonunda yer alan tek nokta baz değişimi (G>T) ile gerçekleşmekte ve valin'in, fenilalanin'e dönüşümüne (V617F) neden olmaktadır.

Gerekli Ekipmanlar : METABION JAK2 V617F Real Time Kiti , LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Her kitin içinden çıkan product descriptionlar takip edilerek aşağıdaki gibi ancak kite göre değişebilen sulandırım yapılır.

JAK2 for

Ana stok: 100 µM için 334 µl distile su

Ara stok: 50 µM ara stok için, 1/2 dilusyon, 10 µl primer + 10 µl su

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	31 / 62

Ara stok2: 2 µM ara stok için, 1/25 dilüsyon 20 µl primer + 480 µl su

JAK2 rev

Ana stok: 100 µM için 317 µl distile su

Ara stok: 10 µM ara stok için, 1/10 dilusyon, 10 µl primer + 90 µl su

JAK2 SENSOR

Ana stok: 20 µM için 50 µl distile su

Ara stok: 4 µM ara stok için, 1/5 dilusyon, 6 µl probe + 24 µl su

JAK2 ANCHOR

Ana stok: 20 µM için 50 µl distile su

Ara stok: 4 µM ara stok için, 1/5 dilusyon, 6 µl probe + 24 µl su

*Her çalışmada mutlaka bir önceki çalışmada tespit edilmiş hasta örneklerinden Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	6,6 uL
Master Mix	2 uL
For	1 uL – 0,1 uM konsantrasyon
Rev	1 uL – 0,5 uM konsantrasyon
Sensor 1	1 uL – 0,2 uM konsantrasyon
Anchor 2	1 uL – 0,2 uM konsantrasyon
Mg	2,4 uL
Toplam	15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

*LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45X

95 derecede 1 sn

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	32 / 62

55 derecede 10 sn single

72 derecede 10 sn

MELT

95 derecede 30 sn

37 derecede 1 dakika

80 derecede continuous

40 derecede 30 sn

*Cihaz Yönetimi, test Başlatımı ve Değerlendirme prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

3.g.EUROCLONE HAEMOCHROMATOSİS H63D ve C282Y GENOTYPING ANALİZ TESTİ:

Hemokromatozis, vucutta aşırı demir depolanması ile karakterize bir hastalıktır. Klasik hemokromatozis, hemokromatozis (HFE) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan otozomal resesif bir hastalıktır. HFE geninde 40'tan fazla mutasyona rastlanmıştır. Ancak yapılan araştırmaların neredeyse tamamı en çok rastlanılan iki mutasyondan bahsetmektedir. Bunlar, Sistemimizin de içeriğinde bulunan H63D (Histidin 63 Aspartik Asit) ve C282Y (Sistein 282 Tirozin) mutasyonlarıdır.

Gerekli Ekipmanlar : EuroClone Haemochromatosis H63D ve C282Y Genotyping Kiti , Taq DNA Polimeraz , pipet takımı , santrifüj , Rotor-Gene Q real time pcr cihazı

Başlarken :

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

*Pcr tüpleri her bir örnek ve kontroller için isimlendirilir.

* Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan C1 Normal Kontrol , C2 Mutant Kontrol ve her iki kontrolü eşit oranda ayrı bir tüpde kullanacağımız kadar karıştırarak oluşturacağımız Hetero Kontrol ile Negatif Kontrolleri alarak çalışılır.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar her iki mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

	<u>H63D</u>	<u>C282Y</u>
Oligo mixden	10 uL	10 uL
Amplikasyon mixi	10 uL	10 uL
<u>Taq DNA Polimeraz</u>	<u>0,25 uL</u>	<u>0,25 uL</u>
Toplam	20 uL	20 uL

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	33 / 62

- *Daha önceden hazırlanan pcr tüplerine mixden 20'er uL dağıtılır.
- *Herbir tüpe kendi örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir. Kapakları kapatılır.
- * Rotor plağına tüpler yerleştirilir.
- *Plak rotor-gene Q real time pcr cihazına yerleştirilir.Cihaz arka açma kapama tuşuna basılarak açılır.
- *Cihazın bağlı olduğu bilgisayarın masa üstündeki rotor-gene Q series software programı çift tıklanır.
- *New Run penceresinden protokol çift tıklanarak seçilir.(EuroClone Heamochromatosis)
- *yeni açılan pencereden kullandığımız plaka seçilir.(kırmızı yada mavi)
- *Operator kısmına çalışanın adı soyadı baş harfleri yazılır ve next e tıklanır.
- *New Run Wizard penceresinde next e tıklanır.
- *Start Run a tıklanır.
- *Testi kaydediceği yeri sorar.(ATQ dosyası içinde rt analiz pcr klasörüne kaydedilir.)
- *Daha sonra isim listesi doldurulur ve Finish and lock tıklanır. Test başlamıştır.
- * PCR Programı aşağıdaki gibidir.

95 derecede 10 dakika

45X

95 derecede 15 sn

60 derecede 60 sn Fluorescent Acquisition

- * Test bitince değerlendirme için tüm iç ekranlar kapatılır.
- *Analiz ,Other , Allelic Discriminant , alt menüde görülen green ve yellow segmelerinin ikisinde ctrl ile seçilir ,show tıklanır.Gelen ekrandan tüm kontroller tıklanır, slope correct ile auto-scale tıklanır ve Threshold ayarlanır.Bu işlemten sonra hastalar tek tek değerlendirilir.

3.h.LightMix for the detection of human VKORC1 C1173T and VKORC1 G1639A ANALİZ TESTİ:

Günümüzde bazı ilaçlar için farmakogenetik analizler yapılmaya başlanmıştır. Warfarin (Kumadin), Klopidoğrel (Plavix) ve antipsikotik ilaçların tedavide kullanılmasından önce analizler yapılarak ilaç toksitesi önceden belirlenebilmektedir. Testler sonrasında toksite oluşturacağı saptanan ilaçlar yerine tedavi için alternatif ilaçların tercih edilmesi hastaların istenmeyen yan etkilerden korunması sağlanabilmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of human VKORC1 C1173T and VKORC1 G1639A Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	34 / 62

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer probler 66 uL kontroller ise 80 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	8,2 uL
Mg	0,8 uL
Reagent Mix (primer-probe)	4 uL
<u>Master Mix</u>	<u>2 uL</u>
Toplam	15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 20 sn

40 derecede 20 sn

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	35 / 62

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.color comp on yapılır.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların VKORC1 G1639A bölgesi değerlendirilir. Sonra Filter Comp segmesinden 510 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların VKORC1 C1173T bölgesi değerlendirilir.

3.1.LightMix for the detection of human CYP2C9*2 and CYP2C9*3 ANALİZ TESTİ: Günümüzde bazı ilaçlar için farmakogenetik analizler yapılmaya başlanmıştır. Warfarin (Kumadin), Klopidoğrel (Plavix) ve antipsikotik ilaçların tedavide kullanılmasından önce analizler yapılarak ilaç toksitesi önceden belirlenebilmektedir. Testler sonrasında toksite oluşturacağı saptanan ilaçlar yerine tedavi için alternatif ilaçların tercih edilmesi hastaların istenmeyen yan etkilerden korunması sağlanabilmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of human CYP2C9*2 and CYP2C9*3 Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer proplar 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	7,8 uL
Mg	1,2 uL
Reagent Mix (primer-probe)	4 uL
<u>Master Mix</u>	<u>2 uL</u>

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	36 / 62

Toplam 15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 20 sn

40 derecede 20 sn

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.color comp on yapılır.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2C9*3 bölgesi değerlendirilir. Sonra Filter Comp segmesinden 510 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2C9*2 bölgesi değerlendirilir.

3.j. LightMix for the detection of human CYP2C19*2 and CYP2C19*3 ANALİZ TESTİ: Günümüzde bazı ilaçlar için farmakogenetik analizler yapılmaya başlanmıştır. Warfarin (Kumadin), Klopidoğrel (Plavix) ve antipsikotik ilaçların tedavide kullanılmasından önce analizler yapılarak ilaç toksitesi önceden belirlenebilmektedir. Testler sonrasında toksite oluşturacağı saptanan ilaçlar yerine tedavi için alternatif ilaçların tercih edilmesi hastaların istenmeyen yan etkilerden korunması sağlanabilmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of human CYP2C19*2 and CYP2C19*3 Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	37 / 62

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer proplar 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su 7,4 uL

Mg 1,6 uL

Reagent Mix (primer-probe) 4 uL

Master Mix 2 uL

Toplam 15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 20 sn

40 derecede 20 sn

85 derecede continuous

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	38 / 62

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.color comp on yapılır.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2C19*3 bölgesi değerlendirilir. Sonra Filter Comp segmesinden 510 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2C19*2 bölgesi değerlendirilir.

3.k. LightMix for the detection of human CYP2D6*3 and CYP2D6*4 ANALİZ TESTİ: Günümüzde bazı ilaçlar için farmakogenetik analizler yapılmaya başlanmıştır. Warfarin (Kumadin), Klopidoğrel (Plavix) ve antipsikotik ilaçların tedavide kullanılmasından önce analizler yapılarak ilaç toksitesi önceden belirlenebilmektedir. Testler sonrasında toksite oluşturacağı saptanan ilaçlar yerine tedavi için alternatif ilaçların tercih edilmesi hastaların istenmeyen yan etkilerden korunması sağlanabilmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of human CYP2D6*3 and CYP2D6*4 Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer proplar 66 uL kontroller ise 80 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	9,4 uL
Mg	1,6 uL
Reagent Mix (primer-probe)	2 uL

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	39 / 62

Master Mix 2 uL

Toplam 15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 30 sn

40 derecede 2 dakika

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.color comp on yapılır.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2D6*4 bölgesi değerlendirilir. Sonra Filter Comp segmesinden 510 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2D6*3 bölgesi değerlendirilir. Filter Comp segmesinden 660 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların CYP2D6*5/5 delesyon bölgesi değerlendirilir.

3.I.LightMix Kit For Detection ApoE C112R ve R158C ANALİZ TESTİ: Apolipoprotein E (ApoE) lipoproteinlerin ve kolesterolün yıkımında önemli rol oynar.ApoE 'den sorumlu 3 önemli allel ; ApoE3(112C 158R,normal fonksiyon) , ApoE2 (112C 158C , Tip III hiperlipidemi) , ApoE4 (112R 158R , Artmış kolesterol seviyesi). Ayrıca homozigot ApoE4(112R/R 158R/R) Alzheimer hastalığı için yüksek risk faktörüdür.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	40 / 62

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of ApoE Kiti, LightCycler FastStart DNA Master

HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer probler 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su	6,2 uL
Mg	1,6 uL
Reagent Mix (primer-probe)	4 uL
DMSO	1,2 uL
<u>Master Mix</u>	<u>2 uL</u>
Toplam	15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	41 / 62

95 derecede 30 sn

40 derecede 2 dakika

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.color comp on yapılır.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların ApoE R158C bölgesi değerlendirilir. Sonra Filter Comp segmesinden 510 seçilir. Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların ApoE C112R bölgesi değerlendirilir.

3.m.LightMix Kit For Detection ApoB-100 R3500Q ANALİZ TESTİ: Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) kolesterolün yıkımında önemli rol oynar.ApoB-100 , kanda kolesterolün eriyebilirliğinden ve dolaşımdan uzaklaştırılmasından sorumludur.En önemli polimorfizm olan R3500Q , ApoB-100'ün LDL'ye yatkınlığını azaltır ve sonuç kanda yükselmiş kolesterol seviyesidir.Bunun sonucu da Arteriosklerotic vasküler hasardır

Gerekli Ekipmanlar : LightMix for the detection of ApoB Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer proplar 66 uL kontroller ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

Steril Su

7,8 uL

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	42 / 62

Mg 1,2 uL
 Reagent Mix (primer-probe) 4 uL
 Master Mix 2 uL
 Toplam 15 uL+ 5 uL DNA

*Özel plate mixden 15'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 5 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 15 sn

MELT

95 derecede 30 sn

40 derecede 2 dakika

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Tm Calling tıklanır.Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 640 seçilir.Calculate tıklanır.Önce kontrollere bakılır.Uygunlarsa hastaların ApoB-100 R3500Q polimorfizmi değerlendirilir.

3.n.Genes-4U α1 Antitrypsin PI-Z and PI-S ToolSet for LightCycler ANALİZ TESTİ: Alfa-1 antitripsin (A1AT) karaciğerde sentezlenen ve salınan bir proteaz inhibitörüdür. A1AT eksikliği; sıklığı 1/2000 olan genetik bir bozukluktur. A1AT eksikliği çocuklardaki karaciğer hastalıklarının en yaygın genetik nedenidir, neonatal kolestaz ve kronik karaciğer hastalığına neden olabilir. Ayrıca akciğerde elaztaz inhibe edilemediğinden, elastin gittikçe azalır ve amfizeme yatkınlık oluşur. 14. kromozomda bulunan AAT geninin farklı enzim aktivitelerine yol açan 75 varyantı vardır. MM genotipi normal, ZZ genotipi ise en

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	43 / 62

düşük aktiviteye sahip enzimi göstermektedir. ZZ den sonra en düşük aktiviteye yol açan SS genotipidir. ZZ genotipine sahip bireylerin %12'sinde karaciğer hasarı ve %75'inde amfizem gelişir.

Gerekli Ekipmanlar : Genes-4U α1 Antitrypsin PI-Z and PI-S ToolSet for LightCycler Kiti, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe , pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı OligoTool tüpüne Solvent'den 50 uL , yeşil kapaklı kontrol tüplerine ise solvent'den 20 uL eklenir.

*Her çalışmada mutlaka kitin içinden çıkan Normal Kontrol , Mutant Kontrol , Heterozigot kontrol ile Negatif Kontrol olarak çalışılır.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür :

*Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar iki mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

	<u>PI-Z</u>	<u>PI-S</u>
OligoTool	2,8 uL	2,8 uL
Solvent	9,6 uL	9,6 uL
Mg	1,6 uL	
<u>Master Mix</u>	<u>2 uL</u>	
Toplam	16 uL+ 4 uL DNA	

*Özel plate mixden 16'er uL dağıtılır.

*Herbir kuyuya örnek DNA sından vortex yapılarak 4 uL ilave edilir.Özel yapışkan kapatılır.

* LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

45x

95 derecede 2 sn

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	45 / 62

Kısaltmalar:

ST1,2,3: standart 1,2,3

PCR: pozitif kontrol referans

PCT: pozitif kontrol target

NCR: negatif kontrol referans

NCT: negatif kontrol target

HR: hasta cDNA sı referans

HT: hasta cDNA sı target

*Yukarıdaki çalışma planına göre Örnekler ile kontrollerin toplam sayısı kadar iki ayrı mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

	TARGET t(9,22) 3x	REFERANS housekeeping G6PDH 6x
t(9,22) Detection Mix (7)	18,6 uL	-
Steril Saf Su (11)	20,4 uL	55,2 uL
Reaction Mix (6)	6 uL	12 uL
G6PDH Detection Mix (8)	-	22,8 uL
Toplam	15 uL	15 uL + 5 uL cDNA

*Hazırlanan iki mix de asla vortexlenmez.

*Mixler yerleşim planındaki yerlerine göre 15'er uL olarak dağıtılır.

* Standartlar , hastalara ait cDNA lar ve kontroller 5'er uL olarak dağıtılır.

*Özel yapışkan ile capiller plate üzeri kapatılır.

*LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 30 sn

45X

95 derecede 5 sn

64 derecede 15 sn single

72 derecede 30 sn

40 derecede 1 dakika

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	46 / 62

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde sample editor sayfasına gidilir.Eğer daha önce yazılmadıysa subset'den çalışmanın plate'i seçilir ve hasta listesi yazılır.Step1 segmesinden Abs Quant işaretlenir.Select Filter Combinations segmesinden sadece 498-640 işaretli bırakılır.Diğerlerinin işareti kaldırılır.Hasta listesinin yanında yeni tablolar çıkar.Bu tablolardan Hastalar unknown,standartlar standart,kontroller de pozitif ve negatif olarak seçilir.Standartların yanında yine tablo çıkar.Kullandığımız kitin standart değerleri bu tabloya girilir.Ve ekranın sağ kenarında bulunan kayıt et simgesi tıklanır.

Ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Abs Quant/2nd Derivative Max seçilir. Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 498-640 seçilir.Use Efficiency simgesi açılır.Std Curve (in run) seçilir.Calculate tıklanır.Önce kontrollere ve standartlara bakılır.Sonra hastaların Housekeeping piklerine bakılır.Uygunlarsa zaten hastaların housekeeping ve bcr-abl değerleri vardır.BCR-ABL / G6PDH değerleri pozitif hastalar için hesap edilir. BCR-ABL değeri olmayan hastalar ki zaten pikleri de yoktur. Bu durumda hastalar negatiftir.

Eğer standart curve penceresinde bir eğri grafiği oluşmuyor ise kullandığımız standartlar çalışmamış demektir.Standartlar tek tek ve beraber incelenir.Amplifikasyon piki oluşmamış standartlardan ikisi kapatılır.Tek bir standart seçili olarak Std Curve (in run) açılır.yerine Std Curve (External) tıklanır.açılan pencereden anyı standart değerlerine sahip diğer bir çalışma seçilir.Ve bu şekilde standart curve penceresinde bir eğri grafiği oluşturulur. Calculate tıklanır. Artık hastalarımızın housekeeping ve BCR-ABL değerleri mevcuttur.

4.b. LightCycler PML-RAR t(15;17) Quantification ANALİZ TESTİ : bcr1,bcr2 ve bcr3 tiplerinden kaynaklanan PML-RAR füsyon kopyalarının nispi quantifikasyonu için kullanılan bir real time pcr kitidir.

Gerekli Ekipmanlar : LightCycler t(15;17) Quantification Kit , LightCycler Human ABL1 Quantification Kit , LightCycler FastStart DNA Master HybProbe ,pipet takımı , santrifüj , LightCycler 480 II real time pcr cihazı ve 96 lık plate ile yapışkan

Başlarken :

*Hasta listesi çıkarılarak cDNA örnekleri sıralanır.Adı geçen iki kitinde içinde hazır olan standartları da cDNA dır.Spin yapılır.

*Kit – 20 dereceden çıkarılır.Spin yapılır.

Kit yeni sıfır bir kit ise ozaman sulandırım yapmamız gerekir.Buna göre kırmızı kapaklı primer probler 66 uL standartlar ise 40 uL saf su ile sulandırılır.

*Çalışma ortamı kontaminasyonu önlemek için RNA çalışılan mekandan uzak çalışılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	47 / 62

*Tüm kullanılacak alet ve cihazlar %100 saf etanol ile silinir.

*- 20 dereceden çıkartılmış soğuk akünün üzerine capiller plate konularak soğuması sağlanır.

*Her çalışmada mutlaka 2 ayrı standart ve negatif kontrol çalışmaya dahil edilmelidir.

* LightCycler FastStart DNA Master HybProbe in hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Kitin için 1a ve 1b tüpleri çıkmaktadır . Az olanı çok olana tamamen eklenerek Master Mix oluşturulur.

Prosedür:

Capiller plate yerleşim planı: 1 ADET HASTA ÖRNEĞİ İÇİN

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stdA	stdA	HA	NCA							
B	stdT	stdT	HT	NCT							
C											
D											

Kısaltmalar:

stdA: ABL standardı

stdT: 15;17 standardı

HA:ABL primerli hasta cDNA sı

HT: 15;17 primerli hasta cDNA sı

NCA: ABL negatif kontrol

NCT: 15;17 negatif kontrol

*Yukarıdaki çalışma planına göre Örnekler ile standartların toplam sayısı kadar iki ayrı mix için aşağıdaki miktarlar hesap edilir.

	TARGET	REFERANS
	t(15,17)	housekeeping ABL1
	4x	4x
Steril Saf Su	26,4 uL	26,4 uL
Mg solüsyonu	9,6 uL	9,6 uL
Reaction Mix (6)	16 uL	16 uL
<u>Master Mix</u>	<u>8 uL</u>	<u>8 uL</u>
Toplam	15 uL	15 uL + 5 uL cDNA

*Hazırlanan iki mix de asla vortexlenmez.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	48 / 62

*Mixler yerleşim planındaki yerlerine göre 15'er uL olarak dağıtılır.

* Standartlar , hastalara ait cDNA lar ve kontroller 5'er uL olarak dağıtılır.

*Özel yapışkan ile capiller plate üzeri kapatılır.

*LightCycler 480 II real time pcr cihazına yerleştirilir.

*Cihaz Yönetimi ve test Başlatımı prosedürü sayfa 21-22 de ACE testinin altında ayrıntılı anlatılmıştır.

*PCR Programı:

95 derecede 10 dakika

50X

95 derecede 5 sn

60 derecede 10 sn single

72 derecede 20 sn

MELT

95 derecede 30 sn

40 derecede 1 dakika

85 derecede continuous

40 derecede 30 sn

Değerlendirme:

Pcr programı bittiğinde sample editor sayfasına gidilir.Eğer daha önce yazılmadıysa subset'den çalışmanın plate'i seçilir ve hasta listesi yazılır.Step1 segmesinden Abs Quant işaretlenir.Select Filter Combinations segmesinden sadece 498-640 işaretli bırakılır.Diğerlerinin işareti kaldırılır.Hasta listesinin yanında yeni tablolar çıkar.Bu tablolardan Hastalar unknown,standartlar standart,kontroller de pozitif ve negatif olarak seçilir.Standartların yanında yine tablo çıkar.Kullandığımız kitin standart değerleri bu tabloya girilir.Ve ekranın sağ kenarında bulunan kayıt et simgesi tıklanır.

Ekranın solundaki Analysis tıklanır.Açılan pencereden Abs Quant/2nd Derivative Max seçilir. Açılan pencereden subset bölümünden plate seçilir.Ekranın altında bulunan Filter Comp segmesinden 498-640 seçilir.Tüm PML-RAR standartları inaktif yapılır. Bu durumda sadece ABL1 ait standartlar ve hastalar ile negatif kontrolü aktiftir.Use Efficiency simgesi açılır.Std Curve (External) seçilir. açılan pencereden anyı standart değerlerine sahip diğer bir çalışma seçilir.Ve bu şekilde standart curve penceresinde bir eğri grafiği oluşturulur. Calculate tıklanır.Tüm hastaların ABL1 (Housekeeping) değerleri not edilir. Sonra tüm

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	49 / 62

bu işlemler sırası için PML-RAR kuyuları için yapılır. PML-RAR / ABL1 değerleri pozitif hastalar için hesap edilir. PML-RAR değeri olmayan hastalar ki zaten pikleri de yoktur. Bu durumda hastalar negatiftir.

4.c. LightCycler AML-ETO t(8;21) Quantification ANALİZ TESTİ :AML alttipi M2 füsyon kopyalarının nispi quantifikasyonu için kullanılan bir real time pcr kitidir.

Testin tüm aşamaları PML-RAR testi ile birebir aynıdır.PML-RAR testini takip ediniz

4.d. LightCycler INV(16) Quantification ANALİZ TESTİ : CBFb-MYH11 füsyon kopyaları AML ‘ NİN M4E0 alttipi ve inversiyon 16 (p13q22) / t(16;16) kromozomal anormalliklerde ifade edilir. Ve bu kit CBFb-MYH11 füsyon kopyalarının nispi quantifikasyonu için kullanılan bir real time pcr kitidir.

Testin tüm aşamaları PML-RAR testi ile birebir aynıdır.PML-RAR testini takip ediniz.

5.DNA SEKANS ANALİZLERİ:

5.a.Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Testi: Protrombin G20210A: pıhtılaşma mekanizmasında önemli rol oynar. Faktör II geni kromozom 11 üzerinde lokalizedir. Genin translayona uğramayan bölgesindeki 20210. pozisyondaki G nükleotidinin yerine A nükleotidinin geçmesi sonucu plazmada protrombin düzeyi yükselir ve tromboz riski artar.

Gerekli Ekipmanlar : Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Kiti, PYROMARK PCR Kiti, pipet takımı , santrifüj , termalcycler cihazı ,8’li strip PCR tüpü ve kapakları , PYROMARK Binding Buffer , saf su , Streptavidin Sepharose , EuroClone 96’lık plate karıştırıcı , EuroClone Plate ısıtıcı , PYROMARK Annealing Buffer , PYROMARK Denaturation Solution , PYROMARK Wash Buffer 10x , %70 lik etanol , PYROMARK Work Station ve PYROMARK Q24 Cihazı

Başlarken:

*Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.

* – 20 derecedeki Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Kiti içinden PCR primerleri ile PYROMARK PCR Kiti içinden master mix ve su çıkarılır.Oda sıcaklığına gelince hafif vortexlenir ve Spin yapılır.

*8’li strip PCR tüpü ve kapakları hazırlanır

* Reaksiyonu hazırlamaya başlamadan önce bütün bileşenler hafifçe vortekslenmeli ve santrifüjlemelidir.

* PYROMARK Q24 Cihazı çalışmanın olduğu gün sabahdan açılır.

* Kartuşlar ultra saf su ile dörtder kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

Hibridizasyon aşamasına gelindiğinde:

* Assay dosyaları hazırlanır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	50 / 62

Pyromark Q24 software araç çubuğundan NEW RUN ikonuna tıklayınız.

Plate setup kısmında Q24 plate in şeması yer almaktadır. İsteddiğiniz assayları sol yandaki Example Files kısmından kopyalayıp plate üzerine yapıştırarak veya assay üzerine tıklayıp çekerek ve getirip plate üzerine bırakarak yerleştiriniz. Plate kutucukları üzerindeki ilk satırda assay ismi belirecektir.

Plate kutucukları üzerindeki ikinci ve üçüncü satırlara örnek numarası(isim soyisim) ve not yazılabilir.

Pre Run information report çıktısı alınır.

Hazırlanan bu program ilgili dosyamıza ve özel USB 'ye kaydedilir.

USB PYROMARK Q24 Cihazına takılır.

*– 20 derecedeki Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Kiti içinden sekans primerleri çıkarılır.

*PYROMARK Wash Buffer 10x dileü edilir.

* PYROMARK Work Station üzerinde isimleri yazılı olan solüsyonlar küvetlere eklenir.

* Filter prob el ünitesini ultra saf su içeren kaba daldırarak vakum pompasını ve ünitenin vakum anahtarını açıp Bu şekilde kaptaki 70 ml suyu çektiyerek ünite yıkanır.

*Isı bloğunu 80 dereceye ayarlayıp üzerine plate holder yerleştirilir.

* Solüsyonları, nükleotitleri, enzim ve substratı ve PCR reaksiyonlarını oda sıcaklığına çıkarılır.

*Enzim ve substrat yeni ise üzerinde yazdığı gibi dilüe edilir.

Prosedür:

* DNA hariç bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon miks aşağıdaki gibi hazırlanır.

Pyromark PCR Mastermix 12,5 uL

PCR primer çifti 1 uL

Su 6,5 uL

Toplam 20 uL

*Hazırladığımız PCR tüplerine 20'er uL dağıtılır.Üzerine 5 uL DNA' lar ilave edilir.Kapakları kapatılır.

*Termalcyclerda aşağıdaki program ile çoğaltılır.

95 derecede 15 dakika

45X

94 derecede 30 saniye

60 derecede 30 saniye

72 derecede 30 saniye

72 derecede 10 dakika

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	51 / 62

8 derecede FOREVER

*Termalcyclardan çıkan PCR ürünleri +4 derecede 1 hafta saklanabildiği gibi hemen hibridizasyon aşamasına da geçilebilir.

*Hibridizasyon aşaması için gerekli hazırlıklar yapılır.

* Aşağıdaki gibi mastermix hazırlayınız. Mastermix miktarı toplam reaksiyon sayısı için gereken miktardan yaklaşık %10 daha fazla olmalıdır.

Streptavidin sepharose bilyeler 2 uL

Binding Buffer 40 uL

Su 28 uL

Toplam 70 uL

*24 kuyucuklu PCRcostar plate 'in her bir kuyucuğa 70 µl mastermix koyulur.

* Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürününü eklenir

*Üzerini özel yapışkan ile kapatılır.

* Plate çalkalayıcıya konulur ve oda sıcaklığında 1400 rpm de10 dakika çalkalanır.

*Q24 plate 2,5 µl sekans primerine 22,5 µl annealing buffer mixinden 25 uL her bir kuyusuna eklenir.

* PCR plate veya striplerini ve Q24 plate 'i aynı pritasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilir.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını açılır.

* Filtre problemlerini PCR plate 'in (çalkalayıcıdan alınan) dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırılır ve 15 saniye kadar tutarak bilyeler çekilir.

* El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Denaturasyon Solution' içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Washing Buffer ' içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilir.

* El ünitesini dikey biçimde 90 dereceyi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlar.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını kapatılır.

* El ünitesinin problemlerini Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeleri sekans primerlerini içeren buffer'a bırakılır.

* El ünitesini su içeren kaba daldırarak yıkanması sağlanırken Q24 plate 'i önceden 80 dereceye getirilmiş plate holder üzerine koyarak 2 dk tutulur.

* Q24 plate'i plate holder üzerinden kaldırarak oda sıcaklığında en az 5 dk bekletilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	52 / 62

*Bu sırada Kartuşu ultra saf su ile bir kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

* Pre Run information report’da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve susbtratu kartuşa eklenir.

* Kartuşu yuvasına etiket size bakacak şekilde yerleştirilir ve emniyet tutacağı kapatılır.

* Plate tutacağını açılır, Q24 plate ‘i bloğa yerleştirip plate tutacağı tekrar kapatılır.

* Menüden ok tuşlarıyla run dosyasını seçilip ‘OK’ basılır. Run işlemi yaklaşık 14 dakika sürecektir.Run bittikten sonra kaydedilir.

* USB’yi çıkarılıp kartuş dört kez yıkanır.

Değerlendirme:

* USB ‘yi bilgisayara takılır.

*Çalışılmış RUN dosyasını ‘Analiz’ klasörüne kopyalanır.

*Dosyaya çift tıklayarak açılır. Analiz için sağ üst köşedeki ‘Analyze’ bölümünden ‘Analyze all well’ veya ‘Analyze selected wells’ butonuna basılır. Sonuçlar prosedüre göre değerlendirilir.

5.b.Faktör V Leiden PYROSEQUENCING Testi: Faktör V (FV) gen loküsü kromozom 1 (1q24.2) üzerinde lokalize edilmiştir. FV mutasyonu, bu genin 1691. pozisyonundaki G nükleotidinin yerine A nükleotidinin geçmesi ve FVa molekülünün üç ayrı APC açıklık bölgesinden birinde tek bir aminoasidin yer degistirmesidir. Trombofili, aktive olmuş APC'ye karşı gelişen zayıf antikoagülan cevap ve venöz tromboembolizm riskinde artış görülür. Ayrıca bu mutasyonu taşıyan bireylerde venöz tromboz, periferel vasküler hastalıklar, felç, tekrarlayan düşük, pulmoner embolizm ve kalp krizi görülme riski arttırdığı düşünülmekte ve bu konularda çalışmalar devam etmektedir.

Gerekli ekipmanlar,başlarken,prosedür ve değerlendirme 5.a.Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Testi başlığı altında anlatılmıştır.

5.c.MTHFR C677T ve A1298C PYROSEQUENCING Testi: MTHFR geni 1 numaralı kromozomun 1p36 bölgesine lokalize edilmiştir. MTHFR geninde sık gözlenen iki mutasyon mevcuttur. Bunlar; 677C>T, Alanin'in (Ala-222) Valin'e ve 1298A>C, Glutamin'in (Glu-429) Alanin'e dönüşümü ile ortaya çıkar. İlk mutasyon ılımlı hiperhomosisteinemi ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörüdür. C677T için heterozigot taşıyıcı veya homozigot mutant kadınların gebeliklerinde hiperhomosisteinemi nedeniyle nöral tüp defektleri açısından risk mevcuttur.

Gerekli ekipmanlar,başlarken,prosedür ve değerlendirme 5.a.Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Testi başlığı altında anlatılmıştır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	53 / 62

Faktör V Leiden , Faktör II Protrombin , MTHFR C677T ve MTHFR A1298C testleri hepbirlikte ve karışık olarak çalışılabilen ve aynı run ile analiz edilebilmektedir.Önemli olan platelere ve programa doğru olarak yerleştirmektir.

5.d.K-RAS Kodon 12-13 ve 61 PYROSEQUENCING Testi: Kolorektal Kanserde (CLC) %30-40, Non-Small Cell Akciğer Kanserde (NSCLC) %10-30, pankreas kanserlerinde ise %90 oranında Kras gen mutasyonları saptanmıştır. Saptanan mutasyonlar; Tirozin Kinaz İnhibitör (TKI) ve Monoklonal Antikor (MAB) tedavisi gibi Anti-EGFR tedavilerine kötü yanıt verirler. Bu nedenle Kras mutasyon analizi hastaların tedavisinde belirleyici rol oynamaktadır.

Kras geni 12. kromozomun kısa kolu (12p12.1) üzerinde yer alır ve 7 ekzondan oluşur. Mutasyonlar sıklıkla ekzon 1 içerisinde yer alan kodon 12 (%80) ve 13 (%15) ile ekzon 2 içerisinde yer alan kodon 61'de bulunmaktadır. Hastalarda en sık Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Val, Gly13Asp mutasyonları gözlenir.

Gerekli ekipmanlar: K-RAS PYROSEQUENCING Kiti, PYROMARK PCR Kiti, pipet takımı , santrifüj , termalcycler cihazı ,8'li strip PCR tüpü ve kapakları , PYROMARK Binding Buffer , saf su , Streptavidin Sepharose , EuroClone 96'lık plate karıştırıcı , EuroClone Plate ısıtıcı , PYROMARK Annealing Buffer , PYROMARK Denaturation Solution , PYROMARK Wash Buffer 10x , %70 lik etanol , PYROMARK Work Station ve PYROMARK Q24 Cihazı

Başlarken:

*Hasta listesi çıkarılarak daha önceden parafin dokudan izole edilmiş DNA örnekleri sıralanır.Spin ve vortex yapıp nanodrop ölçümleri yapılır.17 ul/ng olacak şekilde ayarlanır.

* – 20 derecedeki K-RAS PYROSEQUENCING Kiti içinden PCR primerleri , kontrol DNA sı ile PYROMARK PCR Kiti içinden master mix ve su çıkarılır.Oda sıcaklığına gelince hafif vortexlenir ve Spin yapılır.

*Kontrol DNA sı 1/5 oranında her çalışma için yeni hazırlanır.

*Kapaklı PCR tüpleri hazırlanır.

* PYROMARK Q24 Cihazı çalışmanın olduğu gün sabahdan açılır.

* Kartuşlar ultra saf su ile dörtde kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

Hibridizasyon aşamasına gelindiğinde:

* Assay dosyaları hazırlanır.

Pyromark Q24 software araç çubuğundan NEW RUN ikonuna tıklayınız.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	54 / 62

Plate setup kısmında Q24 plate in şeması yer almaktadır. İstedğiniz assayları sol yandaki Example Files kısmından kopyalayıp plate üzerine yapıştırarak veya assay üzerine tıklayıp çekerek ve getirip plate üzerine bırakarak yerleştiriniz. Plate kutucukları üzerindeki ilk satırda assay ismi belirecektir.

Plate kutucukları üzerindeki ikinci ve üçüncü satırlara örnek numarası(isim soyisim) ve not yazılabilir.

Pre Run information report çıktısı alınır.

Hazırlanan bu program ilgili dosyamıza ve özel USB 'ye kaydedilir.

USB PYROMARK Q24 Cihazına takılır.

*– 20 derecedeki K-RAS PYROSEQUENCING Kiti içinden sekans primerleri çıkarılır.

*PYROMARK Wash Buffer 10x dileü edilir.

* PYROMARK Work Station üzerinde isimleri yazılı olan solüsyonlar küvetlere eklenir.

* Filter prob el ünitesini ultra saf su içeren kaba daldırarak vakum pompasını ve ünitenin vakum anahtarını açıp Bu şekilde kaptaki 70 ml suyu çektirerek ünite yıkanır.

*Isı bloğunu 80 dereceye ayarlayıp üzerine plate holder yerleştirilir.

* Solüsyonları, nükleotitleri, enzim ve substratı ve PCR reaksiyonlarını oda sıcaklığına çıkarılır.

*Yeni Enzim ve substrat üzerinde yazdığı gibi dilüe edilir.

Prosedür:

* DNA hariç bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon miks aşağıdaki gibi hazırlanır.

Pyromark PCR Mastermix	12,5 uL
PCR primer çifti	1 uL
<u>Su</u>	<u>6,5 uL</u>
Toplam	20 uL

*Hazırladığımız PCR tüplerine 20'er uL dağıtılır.Üzerine 5 uL DNA' lar ilave edilir.Kapakları kapatılır.

*Termalcyclerda aşağıdaki program ile çoğaltılır.

95 derecede 15 dakika

42X

95 derecede 20 saniye

53 derecede 30 saniye

72 derecede 20 saniye

72 derecede 5 dakika

8 derecede FOREVER

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	55 / 62

*Termalcyclardan çıkan PCR ürünleri +4 derecede 1 hafta saklanabildiği gibi hemen hibridizasyon aşamasına da geçilebilir.

*Hibridizasyon aşaması için gerekli hazırlıklar yapılır.

* Aşağıdaki gibi mastermix hazırlayınız. Mastermix miktarı toplam reaksiyon sayısı için gereken miktardan yaklaşık %10 daha fazla olmalıdır.

Streptavidin sepharose bilyeler 2 uL

Binding Buffer 40 uL

Su 28 uL

Toplam 70 uL

*24 kuyucuklu PCRcostar plate 'in her bir kuyucuğa 70 µl mastermix koyulur.

* Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürününü eklenir

*Üzerini özel yapışkan ile kapatılır.

* Plate çalkalayıcıya konulur ve oda sıcaklığında 1400 rpm de10 dakika çalkalanır.

*Q24 plate 0,8 µl sekans primerine 24,2 µl annealing buffer mixinden 25 uL her bir kuyusuna eklenir.

* PCR plate veya striplerini ve Q24 plate 'i aynı pritasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilir.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını açılır.

* Filtre problemlerini PCR plate 'in (çalkalayıcıdan alınan) dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırılır ve 15 saniye kadar tutarak bilyeler çekilir.

* El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Denaturasyon Solution' içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Washing Buffer ' içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilir.

* El ünitesini dikey biçimde 90 dereceyi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlar.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını kapatılır.

* El ünitesinin problemlerini Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeleri sekans primerlerini içeren buffer'a bırakılır.

* El ünitesini su içeren kaba daldırarak yıkanması sağlanırken Q24 plate 'i önceden 80 dereceye getirilmiş plate holder üzerine koyarak 3 dk tutulur.

* Q24 plate'i plate holder üzerinden kaldırarak +4 derecede en az 15 dk bekletilir.

*Bu sırada Kartuşu ultra saf su ile bir kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	56 / 62

- * Pre Run information report’da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve susbtratu kartuşa eklenir.
- * Kartuşu yuvasına etiket size bakacak şekilde yerleştirilir ve emniyet tutacağı kapatılır.
- * Plate tutacağını açılır, Q24 plate ‘i bloğa yerleştirip plate tutacağı tekrar kapatılır.
- * Menüden ok tuşlarıyla run dosyasını seçilip ‘OK’ basılır. Run işlemi yaklaşık 17 dakika sürecektir.Run bittikten sonra kaydedilir.
- * USB’yi çıkarılıp kartuş dört kez yıkanır.

Değerlendirme:

- * USB ‘yi bilgisayara takılır.
- *Çalışılmış RUN dosyasını ‘Analiz’ klasörüne kopyalanır.
- *Dosyaya çift tıklayarak açılır. Analiz için sağ üst köşedeki ‘Analyze’ bölümünden ‘Analyze all well’ veya ‘Analyze selected wells’ butonuna basılır. Sonuçlar prosedüre göre değerlendirilir.

5.e.FMF-VER2 PYROSEQUENCING Testi:Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever,FMF) Akdeniz toplumlarında görülen otozomal resesif bir hastalıktır.İnflamasyon atakları,tekrarlayan ateş,karın ağrısı gibi belirtileri olan FMF,böbrek amiloidozuna sebebiyet verebilir.Türk toplumunda taşıyıcılık oranı %20 olduğu gösterilmiştir.

FMF-VER2 PYROSEQUENCING Testi ile E148Q,S675N,G678E,M680I(G>C), M680I(G>A), M680L,T681I,I692del,M694V,M694I,M694L,K695R,K695M,R717S,I720M,V722M,V726A mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmektedir.

Gerekli Ekipmanlar : FMF-VER2 PYROSEQUENCING Kiti, pipet takımı , santrifüj , termalcycler cihazı , PYROMARK Binding Buffer , saf su , Streptavidin Sepharose , EuroClone 96’lık plate karıştırıcı , EuroClone Plate ısıtıcı , PYROMARK Annealing Buffer , PYROMARK Denaturation Solution , PYROMARK Wash Buffer 10x , %70 lik etanol , PYROMARK Work Station ve PYROMARK Q24 Cihazı

Başlarken:

- *Hasta listesi çıkarılarak DNA örnekleri sıralanır.Spin yapılır.
- * – 20 derecedeki FMF-VER2 PYROSEQUENCING Kiti içinden hasta sayımızın yarısı kadar stripler çıkarılır.Oda sıcaklığına gelince numaralandırılır.(hazır kitdir.8 li stripin ilk dört kuyusu 1 hasta eder.içinde pcr için gerekli herşey mevcuttur.sadece DNA ilave edilir.)
- * PYROMARK Q24 Cihazı çalışmanın olduğu gün sabahdan açılır.
- * Kartuşlar ultra saf su ile dörtder kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

Hibridizasyon aşamasına gelindiğinde:

- * Assay dosyaları hazırlanır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	57 / 62

Pyromark Q24 software araç çubuğundan NEW RUN ikonuna tıklayınız.

Plate setup kısmında Q24 plate in şeması yer almaktadır. İstedığınız assayları sol yandaki Example Files kısmından kopyalayıp plate üzerine yapıştırarak veya assay üzerine tıklayıp çekerek ve getirip plate üzerine bırakarak yerleştiriniz. Plate kutucukları üzerindeki ilk satırda assay ismi belirecektir.

Plate kutucukları üzerindeki ikinci ve üçüncü satırlara örnek numarası(isim soyisim) ve not yazılabilir.

Pre Run information report çıktısı alınır.

Hazırlanan bu program ilgili dosyamıza ve özel USB 'ye kaydedilir.

USB PYROMARK Q24 Cihazına takılır.

*– 20 derecedeki FMF-VER2 PYROSEQUENCING Kiti içinden sekans primerleri çıkarılır.

*PYROMARK Wash Buffer 10x dileü edilir.

* PYROMARK Work Station üzerinde isimleri yazılı olan solüsyonlar küvetlere eklenir.

* Filter prob el ünitesini ultra saf su içeren kaba daldırarak vakum pompasını ve ünitenin vakum anahtarını açıp Bu şekilde kaptaki 70 ml suyu çekterek ünite yıkanır.

*Isı bloğunu 80 dereceye ayarlayıp üzerine plate holder yerleştirilir.

* Solüsyonları, nükleotitleri, enzim ve substratı ve PCR reaksiyonlarını oda sıcaklığına çıkarılır.

*Enzim ve substrat yeni ise üzerinde yazdığı gibi dilüe edilir.

Prosedür:

* DNA hariç bütün bileşenleri içeren striplerin kapakları açılır ve üzerine 5 uL DNA' lar ilave edilir.Kapakları kapatılır.

*Termalcyclerda aşağıdaki program ile çoğaltılır.

95 derecede 15 dakika

45X

94 derecede 30 saniye

60 derecede 30 saniye

72 derecede 30 saniye

72 derecede 10 dakika

8 derecede FOREVER

*Termalcyclerdan çıkan PCR ürünleri +4 derecede 1 hafta saklanabildiği gibi hemen hibridizasyon aşamasına da geçilebilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	58 / 62

*Hibridizasyon aşaması için gerekli hazırlıklar yapılır.

* Aşağıdaki gibi mastermix hazırlayınız. Mastermix miktarı toplam reaksiyon sayısı için gereken miktardan yaklaşık %10 daha fazla olmalıdır.

Streptavidin sepharose bilyeler 2 uL

Binding Buffer 40 uL

Su 28 uL

Toplam 70 uL

*24 kuyucuklu PCRcostar plate 'in her bir kuyucuğa 70 µl mastermix koyulur.

* Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürününü eklenir

*Üzerini özel yapışkan ile kapatılır.

* Plate çalkalayıcıya konulur ve oda sıcaklığında 1400 rpm de10 dakika çalkalanır.

*Q24 plate 2,5 µl sekans primerine 22,5 µl annealing buffer mixinden 25 uL her bir kuyusuna eklenir.

* PCR plate veya striplerini ve Q24 plate 'i aynı pritasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilir.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını açılır.

* Filtre problemlerini PCR plate 'in (çalkalayıcıdan alınan) dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırılır ve 15 saniye kadar tutarak bilyeler çekilir.

* El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Denaturasyon Solution' içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletilir.

* El ünitesini 'Washing Buffer ' içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilir.

* El ünitesini dikey biçimde 90 dereceyi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlar.

* Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını kapatılır.

* El ünitesinin problemlerini Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeleri sekans primerlerini içeren buffer'a bırakılır.

* El ünitesini su içeren kaba daldırarak yıkanması sağlanırken Q24 plate 'i önceden 80 dereceye getirilmiş plate holder üzerine koyarak 2 dk tutulur.

* Q24 plate'i plate holder üzerinden kaldırarak oda sıcaklığında en az 5 dk bekletilir.

*Bu sırada Kartuşu ultra saf su ile bir kere yıkanır ve kurumaya bırakılır.

* Pre Run information report'da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve susbtratu kartuşa eklenir.

* Kartuşu yuvasına etiket size bakacak şekilde yerleştirilir ve emniyet tutacağı kapatılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	59 / 62

* Plate tutacağı açılır, Q24 plate 'i bloğa yerleştirip plate tutacağı tekrar kapatılır.

* Menüden ok tuşlarıyla run dosyasını seçilip 'OK' basılır. Run işlemi yaklaşık 40 dakika sürecektir.Run bittikten sonra kaydedilir.

* USB'yi çıkarılıp kartuş dört kez yıkanır.

Değerlendirme:

* USB 'yi bilgisayara takılır.

*Çalışılmış RUN dosyasını 'Analiz' klasörüne kopyalanır.

*Dosyaya çift tıklayarak açılır. Analiz için sağ üst köşedeki 'Analyze' bölümünden 'Analyze all well' veya 'Analyze selected wells' butonuna basılır. Sonuçlar prosedüre göre değerlendirilir.

5.f.BETA-THALASSEMİA PYROSEQUENCING Testi: Akdeniz anemisi, hemoglobin beta zincirinin azalmış sentezine bağlı mikrositik hipokromik anemi ve düşük HBA düzeyleri ile karakterizedir. Talasemi majorlül hastalarda ağır derecede anemi ve hepatosplenomegali nedeniyle genellikle doğum sonrası ndaki ilk iki yıl içerisinde medikal tedavi gerekir.HBB gen bölgesi 11 numaralı kromozomun kısa koluna (11p15.4) lokalize olup 3 ekzondan oluşmaktadır. Bugüne kadar HBB gen bölgesinde 200'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarda ülkemizde en sık gözlenen mutasyon IVS-I 110 (G>A) olarak saptanmıştır. Diğer sık gözlenen mutasyonlar ise IVS-I 1 (G>A/T), IVS-I 6(T>C), Cod 39(C>T), -30(T>A), IVS-II 1(G>A), IVS-II 745(C>G),-87(C>G),Cod 5 (-CT),Cod 6(-A),Cod 8(-AA),Cod 8/9(+G),Cod 30(G>C), IVS-I 5(G>C),IVS-I 116(T>G),IVS-I 130(G>C),Cod 36/37(-T),Cod 44(-C)'dir.

Gerekli ekipmanlar,başlarken,prosedür ve değerlendirme 5.e.FMF-VER2 PYROSEQUENCING Testi başlığı altında anlatılmıştır.

Dikkat edilmesi gereken en önemli nokta 1 strip (hazır kitdir.8 li strip 1 hasta eder.içinde pcr için gerekli herşey mevcuttur.sadece DNA ilave edilir.) 1 hasta içindir.

5.g.Kistik Fibrozis PYROSEQUENCING Testi: Kistik fibroz pyro testi ile CFTR genindeki delF508, delI507, G542X, G544S, 2789+5 G>A, Q1281X, W1282R, W1282X, ve W1282C mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmektedir. Genetik olarak otozomal resesif geçişli hastalık olan KİSTİK FİBROZİS hastalığı doğuştan itibaren var olan bir hastalıktır. 7. Kromozomun uzun kolunda 31. bölgesinde lokalize olan gen kistik fibrozis ile ilişkilidir. Ailede kistik fibrozisli bir çocuk var ise %25 oranında doğacak çocuklarda da kistik fibrozis gelişme olasılığı vardır. Kistik fibrozis birden fazla vücut sistemini tutabilen bir

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	60 / 62

hastalıktır. Solunum sistemi, sindirim sistemi bu hastalıktan en çok etkilenen sistemlerdir.%85 Olguda pankreas tutulur.Hastalık genler ile geçtiği için belirtiler ve hastalığın ağırlık derecesi ile ilişkilidir.

Gerekli ekipmanlar,başlarken,prosedür ve değerlendirme 5.a.Faktör II Protrombin PYROSEQUENCING Testi başlığı altında anlatılmıştır.Yalnız dikkat edilmesi gereken en önemli nokta 1 hasta için dört pcr reaksiyonu ve hibridizasyonu yapılmaktadır.

6.MİKROARRAY ÇALIŞMALARI

UGT1A1 ve 5-FU testleri şuan için laboratuvarımızda çalışılmamaktadır.Ancak yeni ihale döneminde çalışmaya başlandığı zaman eklenecektir.

7.RLFP ÇALIŞMALARI

FLT3 yeni çalışmaya başlanmıştır.Test optimizasyonundan sonra eklenecektir.

RT-PCR

TRANSLOKASYONLAR T(9;22) P2;10 ; + (15;17)

1. AMAÇ

Çocuk ve erişkin hematoloji bilim dalından gönderilen hematolojik malignansilerde, sitogenetik ve/veya moleküler sitogenetik yöntemlerle belirlenememiş olan translokasyonların, RT-PCR yöntemi ile gösterilmesi.

2. KAPSAM

Moleküler Genetik Laboratuvarı.

3. UYGULAMA

Aşağıdaki işlemler asistanlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

3.1. Hastadan 10ml periferik kan K3EDTA içeren steril tüplere alınır.

3.2. Lökosit miktarına göre ne kadar kan kullanılacağına karar verilerek (ortalama 1.5ml kandan) buz üstünde QIAamp® RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapılır.

3.3. Elde edilen RNA -80°C' de saklanır.

3.4. Taranacak olan her translokasyon için en az bir pozitif ve bir negatif kontrol taranan örneklerle birlikte kullanılır.

3.5. Roche Titan One Tube RT-PCR sistemi kullanılarak RT-PCR ve İlk PCR reaksiyonları tek basamakta yapılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	61 / 62

3.6. Elde edilen ürünlere inner primerlerle nested PCR yapılır

3.7. Translokasyonların varlığı ya da yokluğu % 4'lük agaroz jelde örnekler yürütülerek, ve ultraviyole ışık altında kontrol edilerek saptanır.

3.8. Klinisyenin yönlendirilmesine göre RT-PCR ile bakılabilen translokasyonlar aşağıda verilmektedir.

Translokasyonlar t(9;22) p2;10 ; + (15:17)

MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ

1.AMAÇ Moleküler Genetik Laboratuvarları hizmetlerinin her zaman aynı standart da gerçekleştirilebilmesi için gerekli sistemi, yetki ve sorumlulukları açıklamak.

2. KAPSAM Moleküler Genetik Laboratuvarı ve işlemleri kapsar.

3. KISALTMALAR

CVS :Koryonvillus örnekleme veya koryonvillus biyopsisi

4. TANIMLAR

5. SORUMLULAR

- Sorumlu öğretim üyeleri
- Biyologlar

6. FAALİYET AKIŞI

6.1.Tetkik İstemi

6.1.1 Hekimler tarafından tıbbi genetik anabilim dalı moleküler genetik istek formu ile tetkik istemi yapılır.

6.1.2 Yapılmış olan tetkik istemi formunun Anabilim Dalı (AD.) sekreteri tarafından tahakkuk işlemlerinin yapıp yapılmadığı bilgisayar ortamında ve istem üzerinde kontrol edilir.

6.1.3 Tetkik türüne göre AD. sekreteri hastaya randevu verir veya ilgili yerlere yönlendirir.

6.2.Örnek Alımı

6.2.1 Hastanın hikayesi alınır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.08
		YAYIN TARİHİ	01.04.2013
		REVİZYON NO	03
	MOLEKÜLER LABORATUVARI İŞLEYİŞ PROSEDÜRÜ	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	62 / 62

6.2.2 Gerekğinde örnek ya direkt hastadan teknisyen tarafından alınır, ya da ilgili hekim tarafından alınıp hasta yakını ile gönderilir.

6.2.3 Amniosentez, kordosentez, CVS veya değişik doku örnekleri yapılacak ise numune ilgili hekim tarafından alınır.

6.3.Örneklerin Dağılımı

6.3.1 Örnekler laboratuvar görevlileri tarafından çalışma konularına göre alınır.

6.3.2 Örnek işlemi çalışma konusuna göre yapılır.

6.4.Örnek Çalışması

6.4.1 Moleküler genetik laboratuvarındaki görevli numuneyi teslim alır. Laboratuvar defter ve bilgisayar ortamına kayıt işlemini yapar.

6.4.2 İlgili analiz talimatına göre analizler gerçekleştirilir. Örneğin türüne göre ve istenilen tetkik türüne göre laboratuvar çalışması yapılır.

6.5.Sonuçlar

6.5.1 Tetkik raporları bizzat testin çalışanı tarafından yazılır.

6.5.2 Çalışma sonuçları ilgili öğretim üyesi tarafından kontrol edilerek imzalanır.

6.5.3 İmzalanan sonuçlar AD. sekreteri tarafından hastalara teslim edilir.

6.5.4 Kullanılan malzemelerin temizliği, dezenfeksiyonu göre gerçekleştirilir.

6.5.5 Rapor örnekleri bölümün arşivleme tekniğine göre arşivlenir.

6.5.6 Arşivlerde saklama süresi sonsuzdur.

7. İLGİLİ DOKÜMANLAR