



UYGULAMALI COVID-19 PCR AKADEMİSİ

Moleküler Tanı Yöntemi

Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Nedir, Nasıl Uygulanır?

Doç. Dr. Mahmut Çerkez Ergören, PhD

Tıp Fakültesi | Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

DESAM Enstitüsü | Moleküler Tıp Laboratuvarı | Nadir Hastalıklar Araştırma Grubu

Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi | Tıbbi Genetik Tanı Laboratuvarı

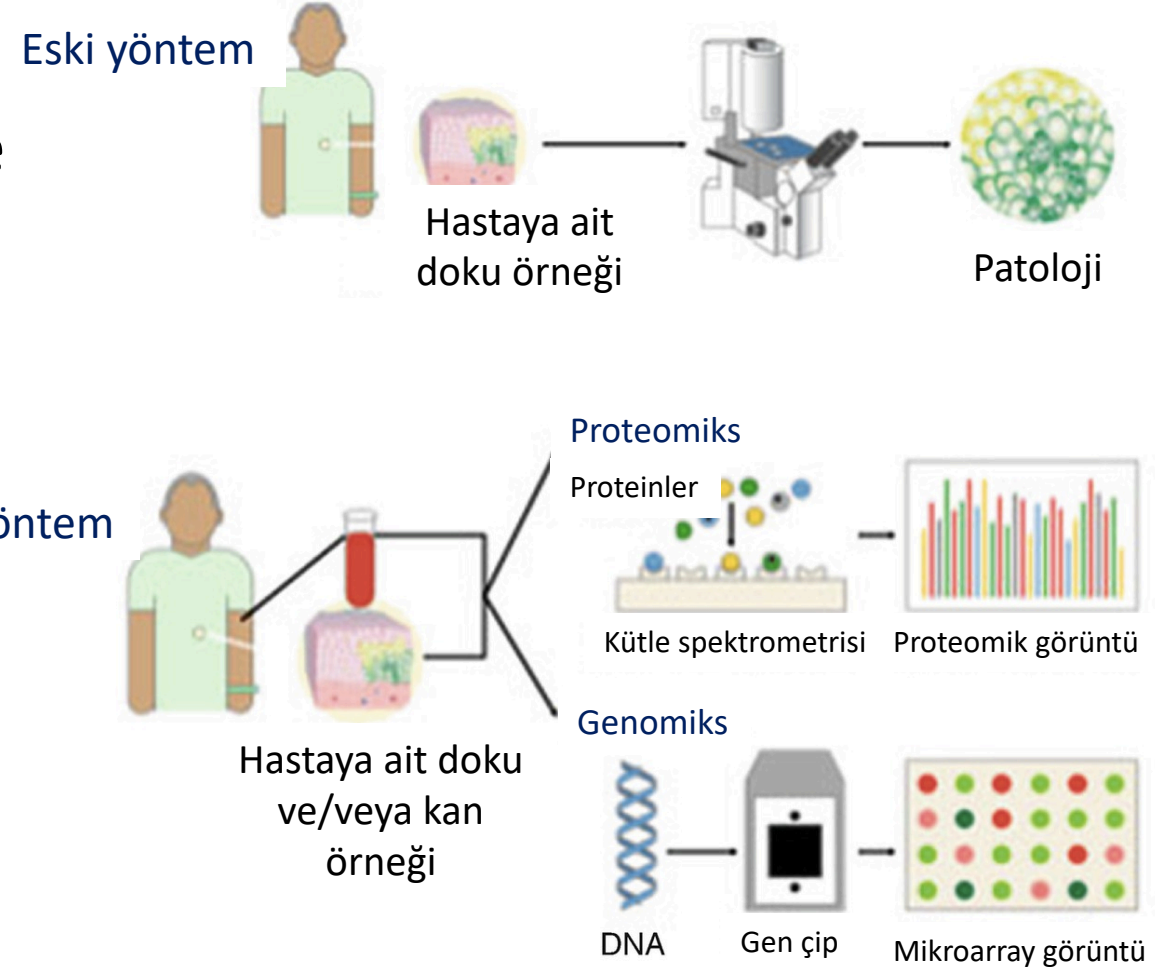
Moleküler Tanı

Genom ve proteomdaki biyolojik belirteçleri analiz etmek için, moleküler biyoloji yöntemlerinin tıp alanında uygulanmasıdır.

hem analitik hem de klinik değerlendirme

Kullanım alanları

1. Mikrobiyoloji/ Enfeksiyon hastalıkları
2. Genetik
3. İmmünoloji
4. Kanser/ Onkoloji
5. Farmakoloji
6. Adli bilimler



Moleküler Tanı Sistemlerinin Özellikleri (3S Kuralı)

Duyarlılık (Sensitivity)

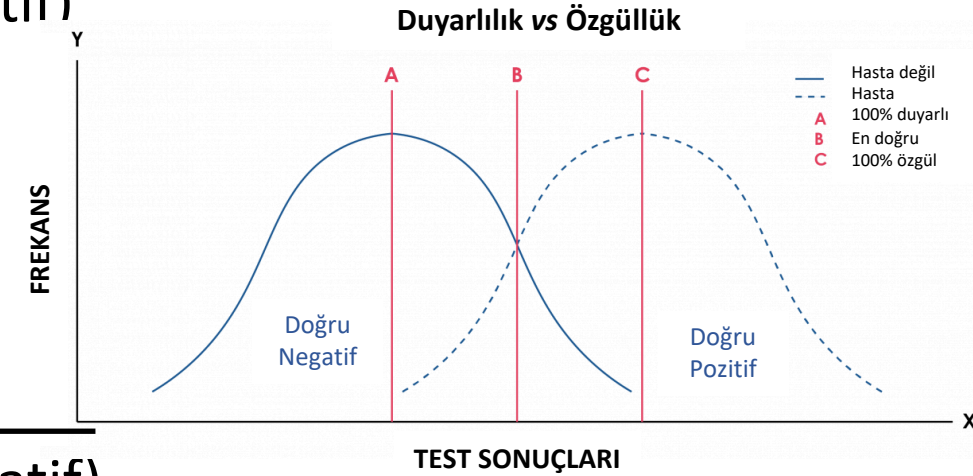
Hedef, ortamda diğer moleküller varken oldukça düşük miktarlarında bile belirlenmelidir.

$$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{Toplam Gerçek Pozitif}}{(\text{Toplam Gerçek Pozitif}) + (\text{Toplam Gerçek Negatif})}$$

Özgüllük (Specificity)

Uygulanan test sadece hedef molekülü tespit etmelidir.

$$\text{Özgüllük} = \frac{\text{Toplam Gerçek Negatif}}{(\text{Toplam Gerçek Pozitif}) + (\text{Toplam Gerçek Negatif})}$$



Basitlik (Simplicity)

Uygulanan test rutin bir temelde verimli ve ucuz olmalıdır.

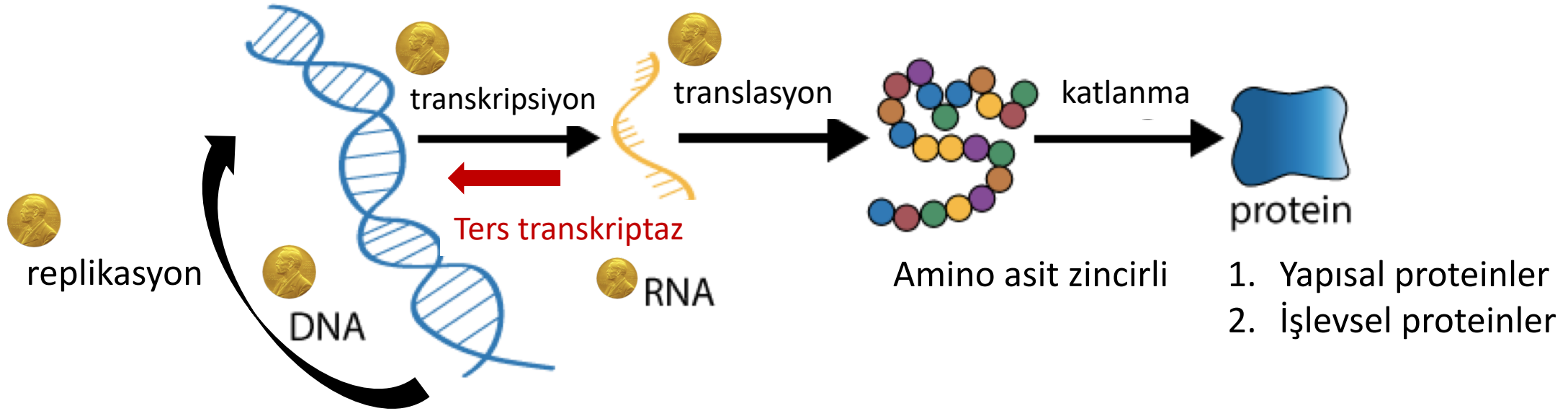
Sıklıkla kullanılan moleküler tanı yöntemleri:

Düşük konsanstrasyonda küçük molekülleri tespit ederler.

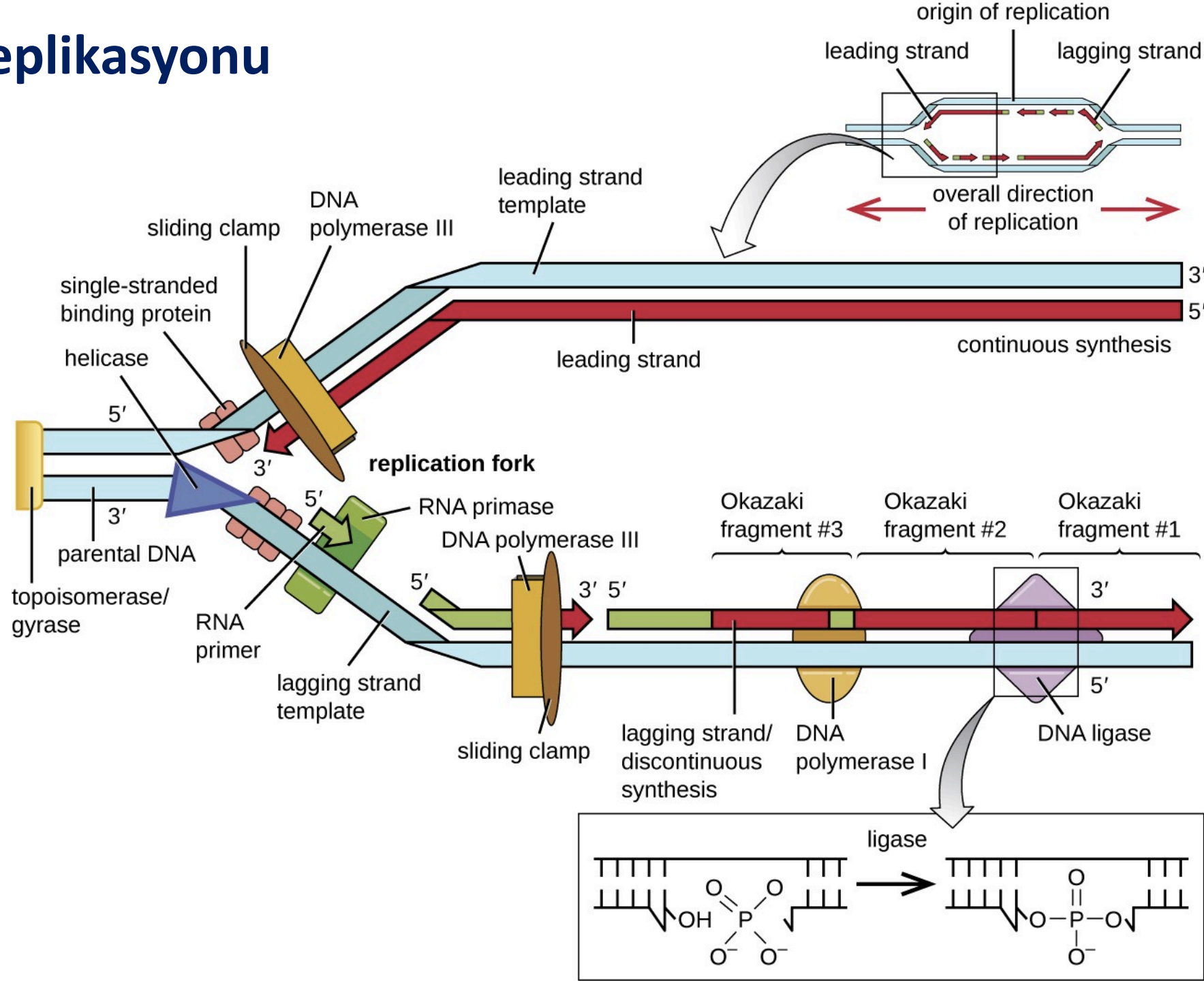
- PCR tabanlı enzim-bağlı immunsorbent çalışmalar (PCR-ELISA)
- Florasan *in situ* hibridizasyon (FISH)
- PCR
- Doğrudan dizileme (Sanger DNA dizileme)
- Mikroarrayler
- Yüksek-verimli DNA dizileme (Yeni Nesil Dizileme, NGS)

Genom-tabanlı tanı

Moleküler Biyoloji'nin “Santral Dogma”sı



DNA Replikasyonu



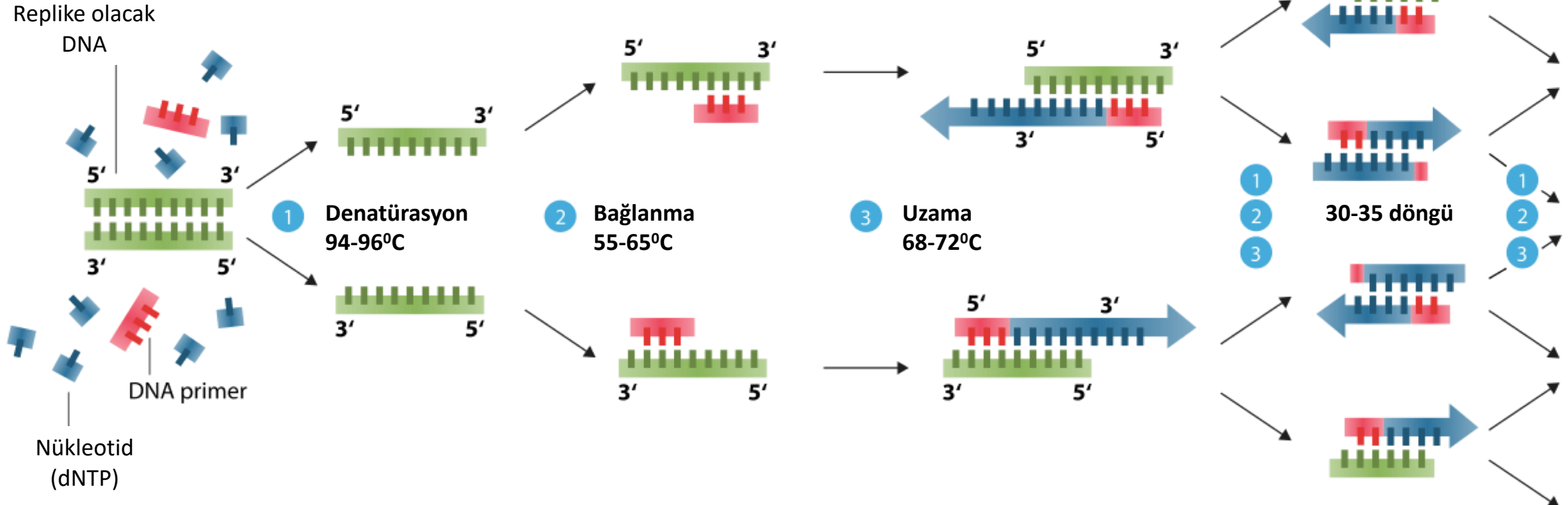
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

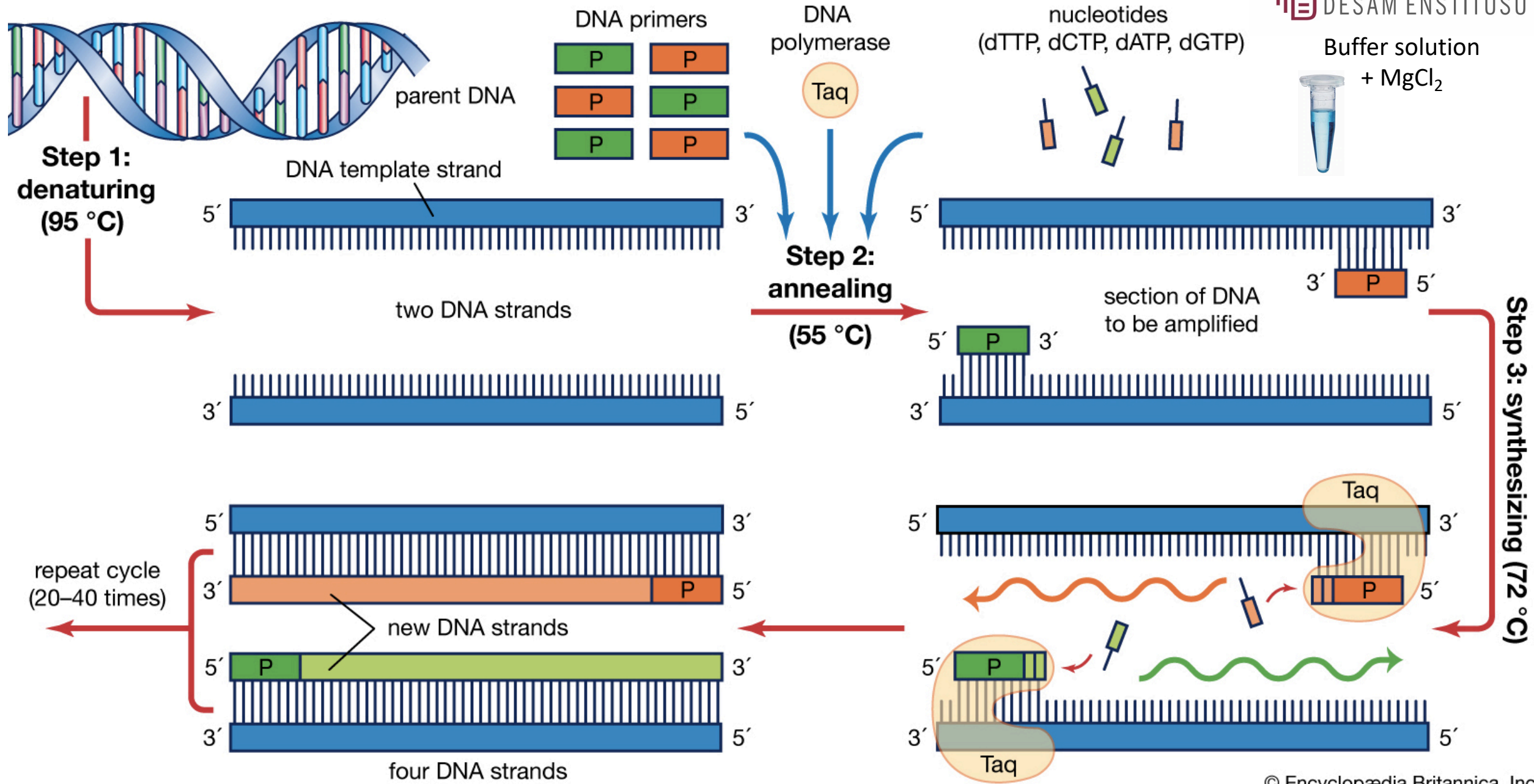


DNA replikasyonunun *in vitro* tasarlanmış şeklidir.

Moleküler biyolojinin en güçlü teknolojisidir.

DNA ve cDNA'yı kalıp olarak kullanarak istenilen hedef bölgeye ait dizinin milyonlarca kat kopyası yapılır.



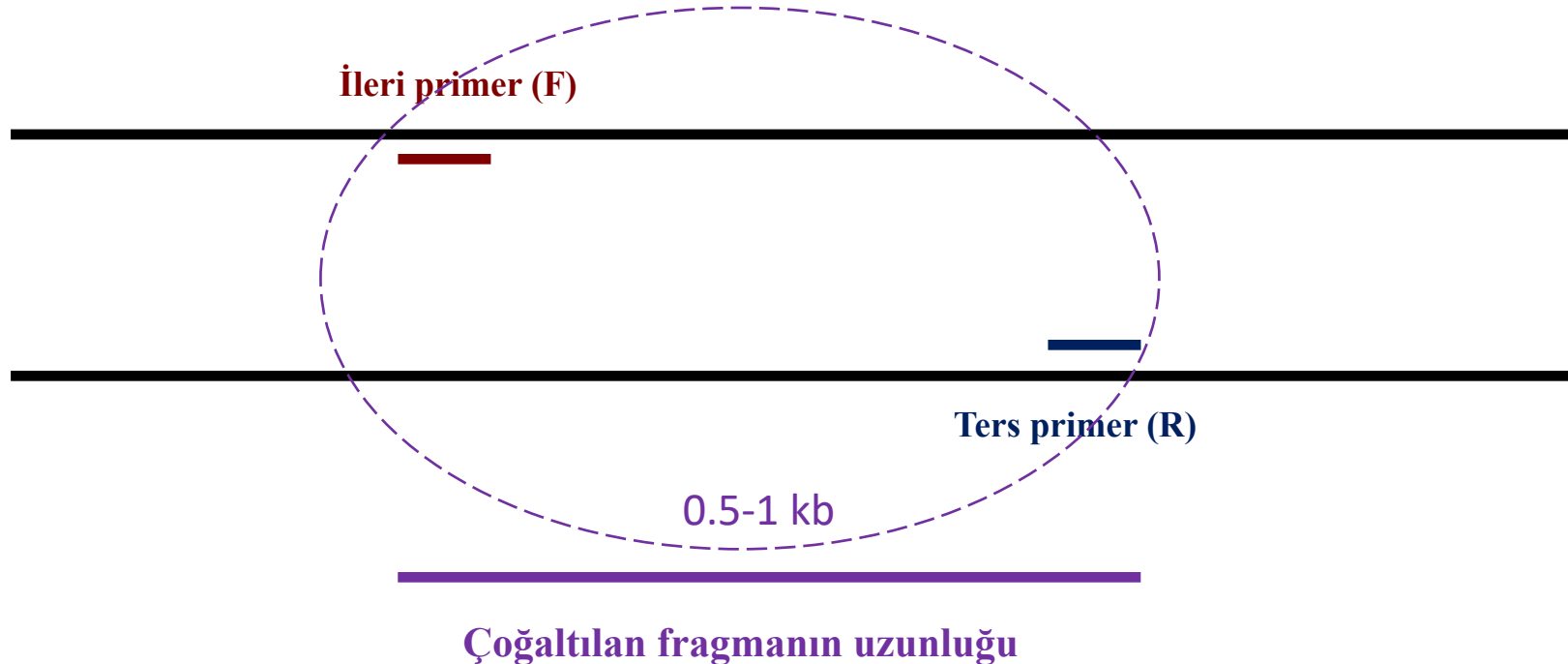


PCR ile istenilen gen bölgesi çoğaltılabilir

PCR ile iki primer arasında kalan DNA bölgesi çoğaltılır.

Bu bölgenin spesifik olması ve primerlerin genom üzerinde başka bir DNA bölgesine bağlanmamaları gerekir.

PCR amplifiasyonu için referans DNA dizisinin bilinmesi önemlidir.



PCR Çeşitleri

- Allele-specific PCR
- Assembly PCR (Polymerase Cycling Assembly)
- Asymmetric PCR
- Convective PCR
- Dia-out PCR
- Digital PCR
- Helicase-dependent amplification
- Hot start PCR
- *in silico* PCR
- Intersequence-specific PCR (ISSR)
- Inverse PCR
- Ligation-mediated PCR
- Methylation-specific PCR (MSP)
- Miniprimer PCR
- Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)
- Multiplex PCR
- Nanoparticle-Assisted PCR (nanpoPCR)
- Nested PCR
- Overlap-extension PCR (Splicing by overlap extension (SOEing))
- PAN-AC
- quantitative PCR (Real Time-PCR; RT-qPCR)
- Reverse transcription PCR (RT-PCR)
- Rnase H-dependent PCR(rhPCR)
- Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR)
- Solid Phase PCR
- Suicide PCR
- Thermal asymmetric interlaced PCR(TAIL-PCR)
- Touchdown PCR (Step-down PCR)
- Universal Fast Walking

Gerçek Zamanlı-PCR (RT-PCR)

Kantitatif PCR

Geleneksel PCR'da, amplifiye edilmiş sekansın tespiti ve kantifikasyonu ancak **son PCR döngüsünden sonra** ve **jel elektroforezi** gibi görüntü analizi ile gerçekleştirilebilir.

Geleneksel PCR'dan farklı olarak, RT-PCR'da, DNA miktarı PCR ile çoğaltılan moleküllerin sayısı ile **doğru orantılı olarak artan floresan** sinyali veren floresan boyalar aracılığıyla her döngüden sonra ölçülür.

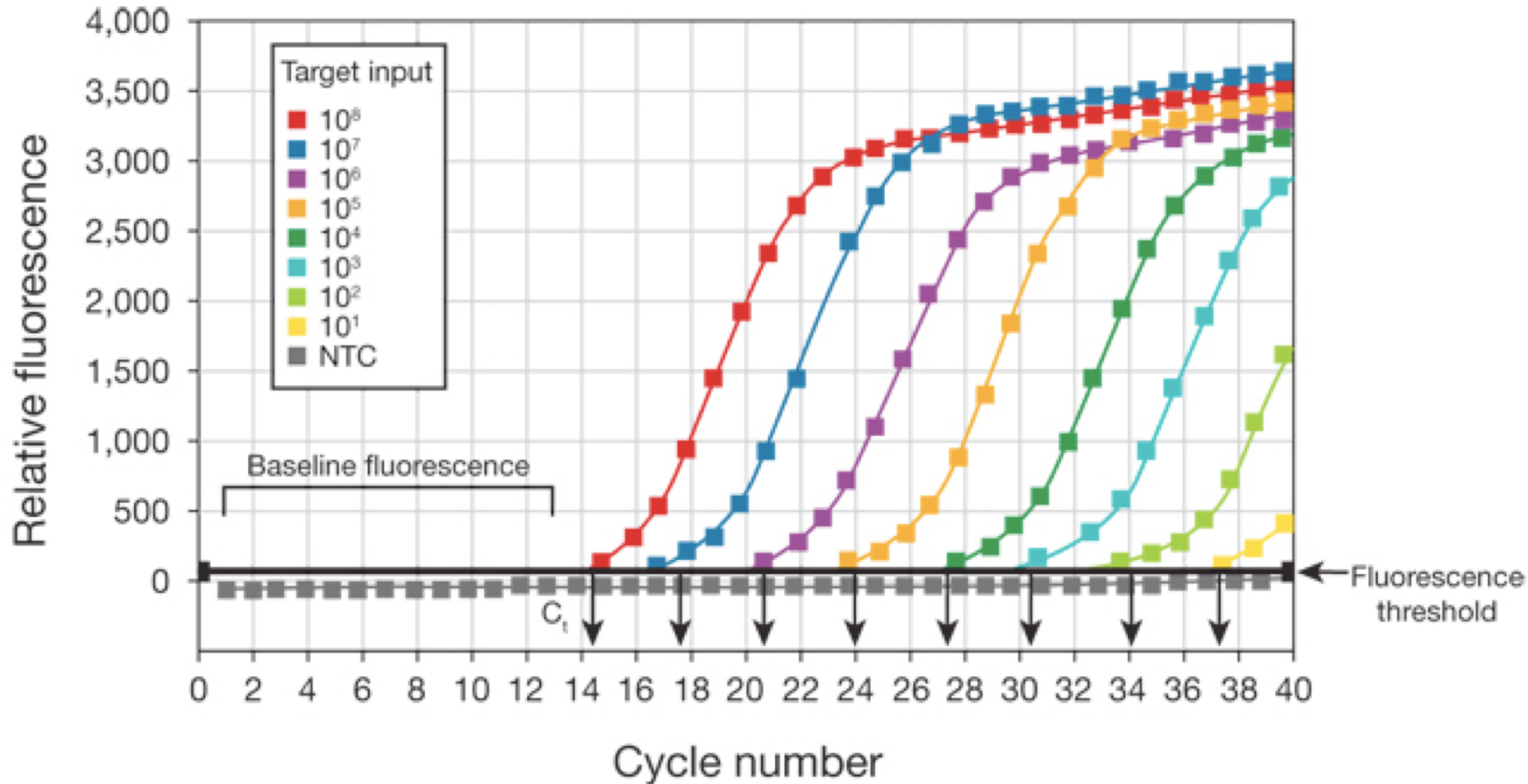
Unutmayın! PCR DNA'yı eksponansiyel olarak çoğaldır (2^n)

Reaksiyonun eksponansiyel aşamasında toplanan veriler, amplifikasyon hedefinin başlangıç miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.

RT-PCR'Da kullanılan floresan belirleyiciler, **çift-zincir DNA bağlayıcı boyaları** veya amplifikasyon sırasında PCR ürünü ile hibridize **olan PCR primerlerine/ problemlerine** bağlanan boya moleküllerini içerir.

Reaksiyonun seyri boyunca floresandaki değişim, termal döngüyü floresan boya tarama özelliğiyle birleştiren bir cihazla ölçülür.

Floresan miktarının döngü sayısına göre grafiğini çizerek, tüm PCR reaksiyonu süresince ürün birikimini temsil eden bir amplifikasyon grafiği oluşturur.



RT-PCR' ın avantajları

- ✓ Gerçek zamanlı olarak meydana gelen PCR reaksiyonunun ilerleyişini izleme kapasitesi
- ✓ Her döngüde ampikon miktarını kesin olarak ölçebilme özelliği
(numunelerdeki başlangıç materyali miktarının oldukça doğru bir şekilde ölçülmesine olanak tanır).
- ✓ Artırılmış dinamik algılama aralığı
- ✓ Amplifikasyon ve tespit tek bir tüpte gerçekleşir, böylece PCR sonrası manipülasyonları ortadan kaldırır.

Real-Time PCR basamaklarına Genel Bakış

1. Denatürasyon (94-96⁰C)
2. Bağlanma (primerlerin çözünme sıcaklığından (T_m) 5⁰C aşağısı)
3. Uzama (68-72⁰C)

saniyede 100 baz uzar ve küçük ampliconlarda 60⁰C alınır.

100-150 bp uzunluğunda ampliconlar tercih edilir.

İki basamaklı RT-qPCR

1. Basamak: Ters transkriptaz ile cDNA oluşturulur. cDNA sentezi oligo(d)T, gene-spesifik primerler ya da random primerler kullanılarak gerçekleştirilir.
2. Basamak: Sentezlenen cDNA'nın %10'u ayrı bit tüpe RT-PCR işlemi için transfer edilir.

Tek basamaklı RT-qPCR

Tek tüpte cDNA sentezi ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir.

cDNA sentezi için burada gene-spesifik primerler non-spesifik ürünler oluşturmadıkları için önerilir.

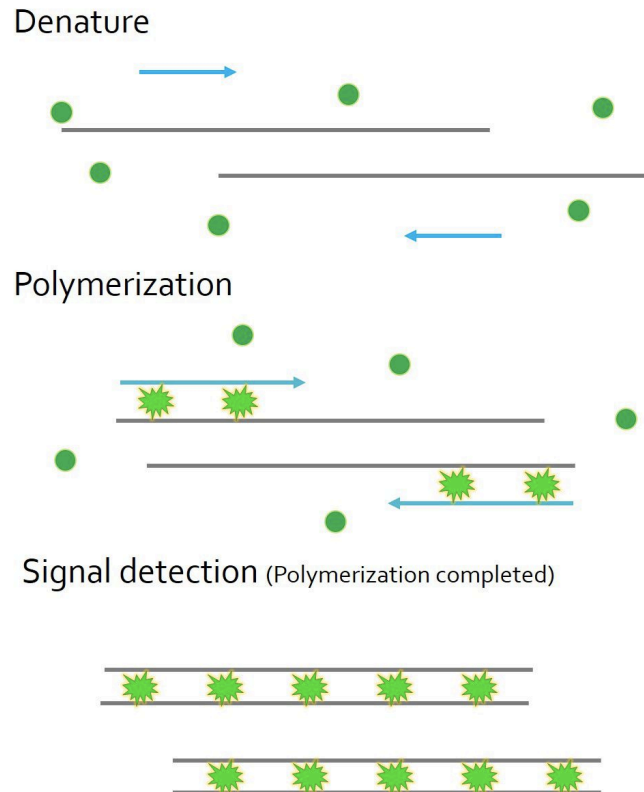
PCR reaksiyonu için gerekli olan komponentler:

1. DNA polimeraz
2. Ters transkriptaz
3. dNTP'ler
4. $MgCl_2$ (3-6 mM)
5. DNA kalıbı (*100 pg -1 μ g gDNA veya cDNA -1 pg – 100 ng RNA'dan üretilmiş-*)
6. Primer
 - a. *50-150 bç amplikon çoğaltılacak şekilde %50 GC oranına sahip 18-24 bç'lik primerler*
 - b. *Her bir primer için final konsantrasyonu 200 nM*
 - c. *Sadece çoğaltılmak istenilen bölgeye özel olmalı (BLAST taraması yapılmalı)*
7. İyi laboratuvar tekniği

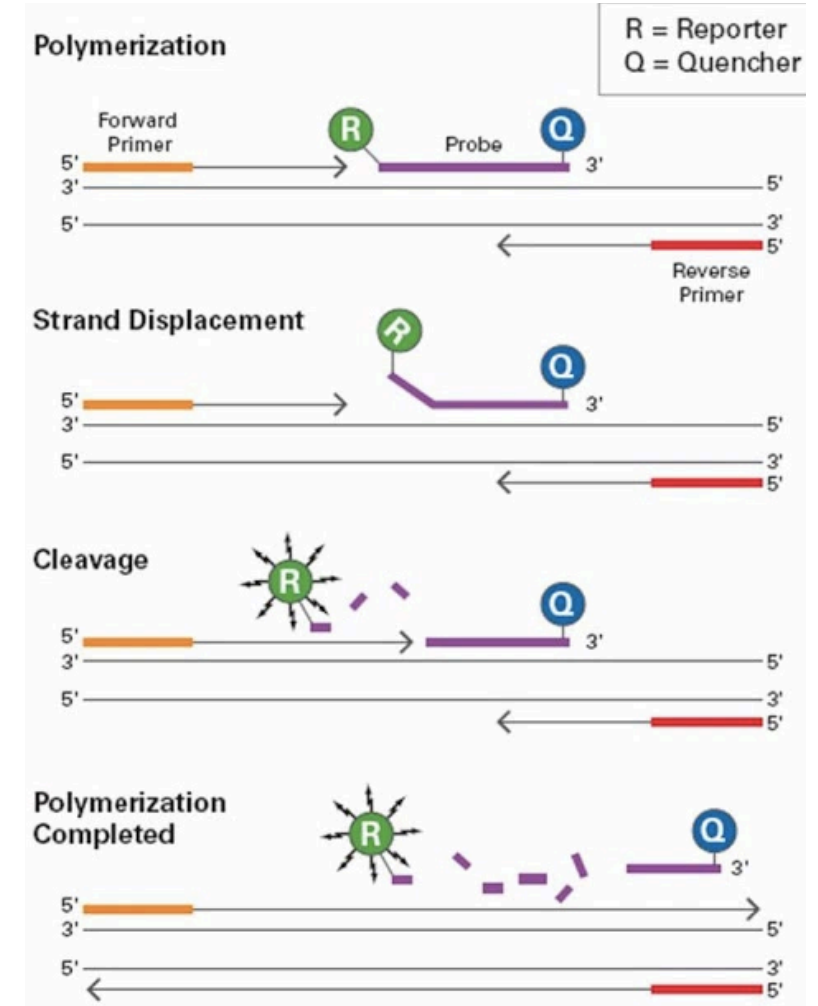
RT-PCR tekniği, PCR ürününü tespit etmek için kullanılan kimyasala göre sınıflandırılır.

1. Spesifik olmayan tespit etme tekniği

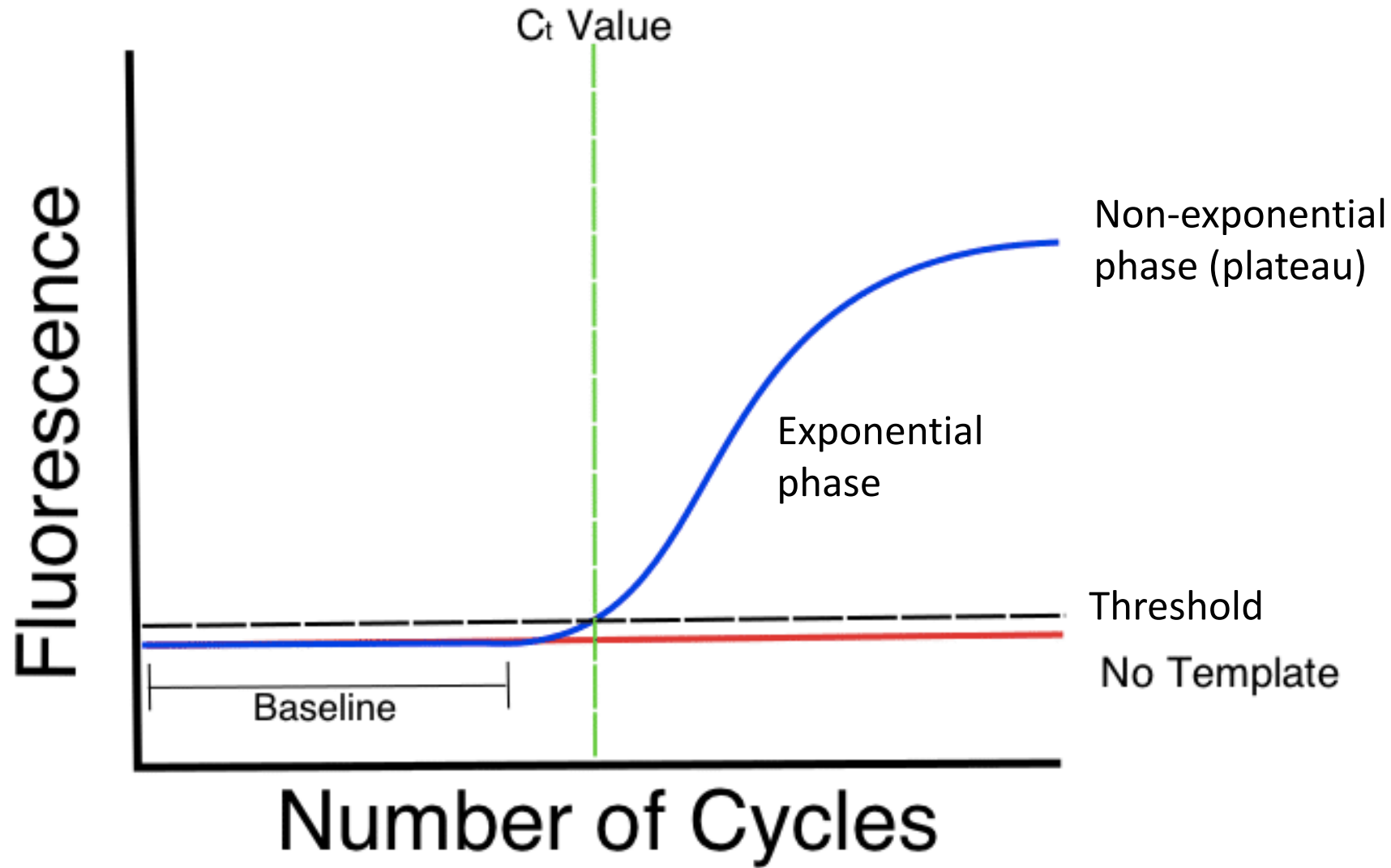
DNA bağlayıcı boya (SYBR Green, 497 nm) ile PCR'da tüm ds-DNA'ya bağlanarak boyanın floresan kuantum verimini artırır.



2. Spesifik tespit etme tekniği (floresan raportör prob yöntemi)



RT-PCR analizi



RT-PCR Uygulamaları

- ✓ Gen ekspresyon kuantifikasyonu
- ✓ Klinik kuantifikasyon ve genotipleme
- ✓ Genetik modifiye organizmaların tespiti
- ✓ Fitopatojenlerin tespiti
- ✓ Klinik mikrobiyolojik tanı (ör: SARS-CoV-2)