

PCR ÇEŞİTLERİ:

- KLASİK PCR
- MULTİPLEX PCR
- NESTED PCR
- REVERS TRANSKRİPSİYON PCR
- REAL TIME PCR

PCR TİPİ	HEDEF	UYGULAMA
KLASİK	DNA	DNA dizisinin amplifikasyonu ve araştırılması
REAL TIME	DNA	Hedef nükleik asit dizisinin kopya sayısının tespiti ile quantifikasyon
MULTİPLEX	DNA	İki veya daha fazla sayıdaki farklı DNA dizisinin aynı anda amplifikasyonu (Klasik ve Real time 'de uygulanır)
NESTED	DNA	External ve internal primer takımları kullanılarak
REVERSE TRANKRİPTAZ	rRNA mRNA Viral RNA	RNA 'nın amplifikasyonu ve araştırılması

REAL TIME PCR

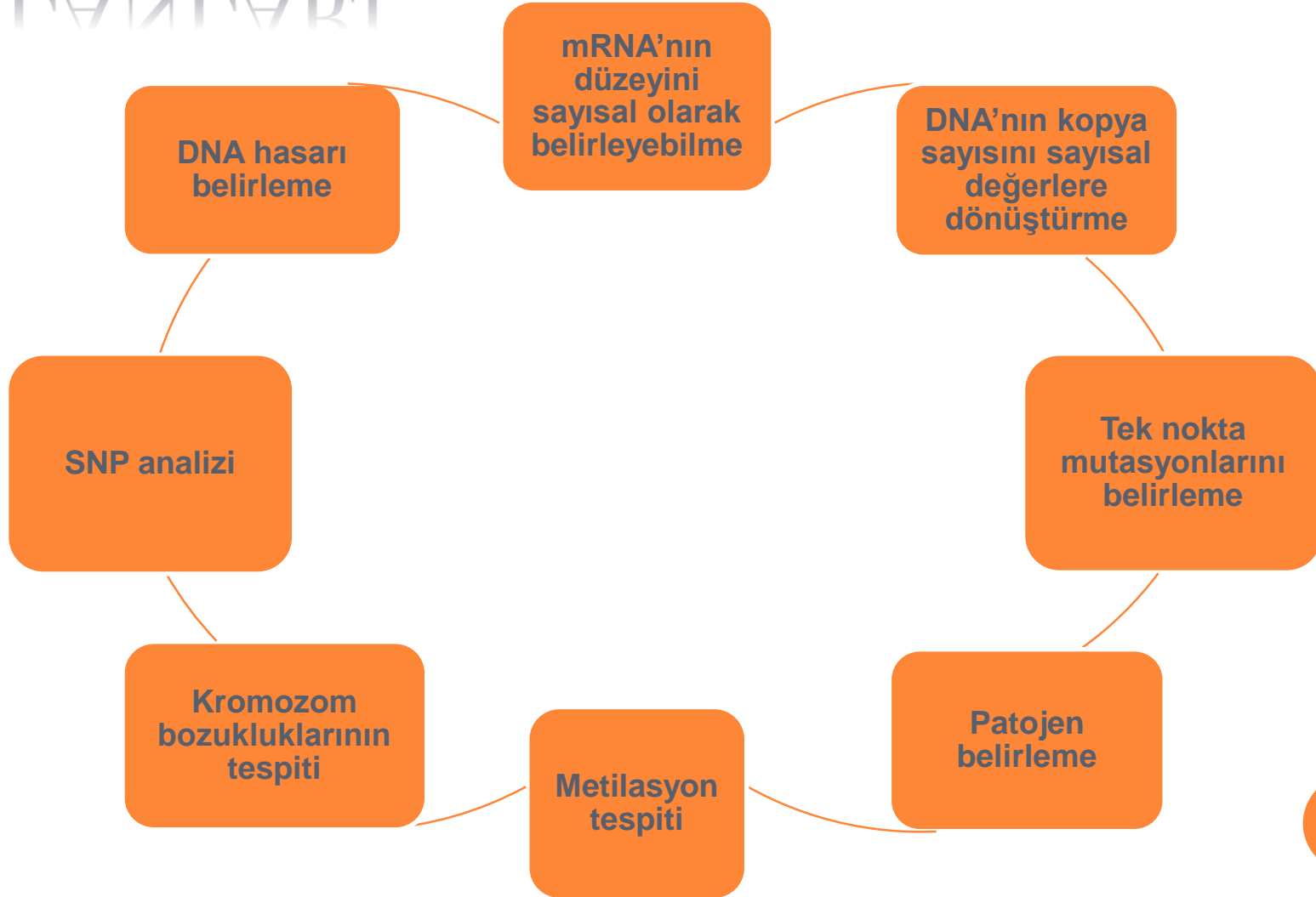
- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir.
- dsDNA'ya bağlandıkları zaman floresans veren boyalar (örneğin, SYBR green-I) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı floresans miktarı ile ölçülmektedir.

- Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır.
- Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.



<http://www.uoguelph.ca/crifs/node/16>

REAL-TIME PCR KULLANIM ALANLARI



REAL-TIME PCR AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

Avantajları

- Eşzamanlı amplifikasyon
- Analize özgü reaktifler (ASR'ler)
- Kitlerin bulunabilirliği
- Geliştirilmiş standardizasyon
- Esnek
- PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
- Floresan tespiti (jel temelli değil)
- Hızlı (30-40 dakika)
- Nicel

Dezavantajları

- Yüksek ekipman ihtiyacı
- Beceri ve tecrübe
- Teknik donanım

FLORESAN PROB SİSTEMLERİ:

a) Özgül Floresan İşaretli Problar:

❖ FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

❖ Taqman

❖ Molecular Beacons

❖ Scorpion Primerleri

❖ Hibridizasyon Probları

Kullanılan boyalar:

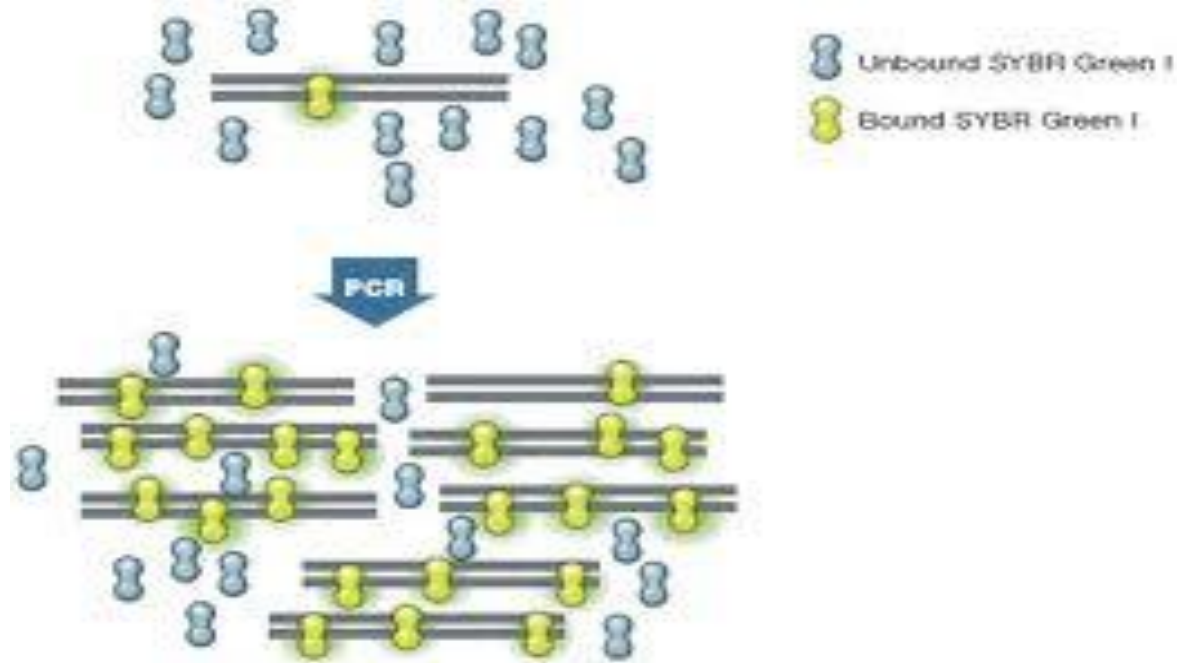
❖ SYBR Green I

❖ Etidyum Bromid

LİGHY CYCLER:

- Sıcak hava akımıyla ısınan bir kapalı sistemdir.
- Performans olarak hem duyarlılığı hem özgüllüğü ABI 7700 sistemine eşit olarak bildirilmiştir.
- Yirmi dakikaya kadar inebilen RT-PCR olanağına karşın yalnızca 32 reaksiyon gerçekleştirebilen bir sistemdir.

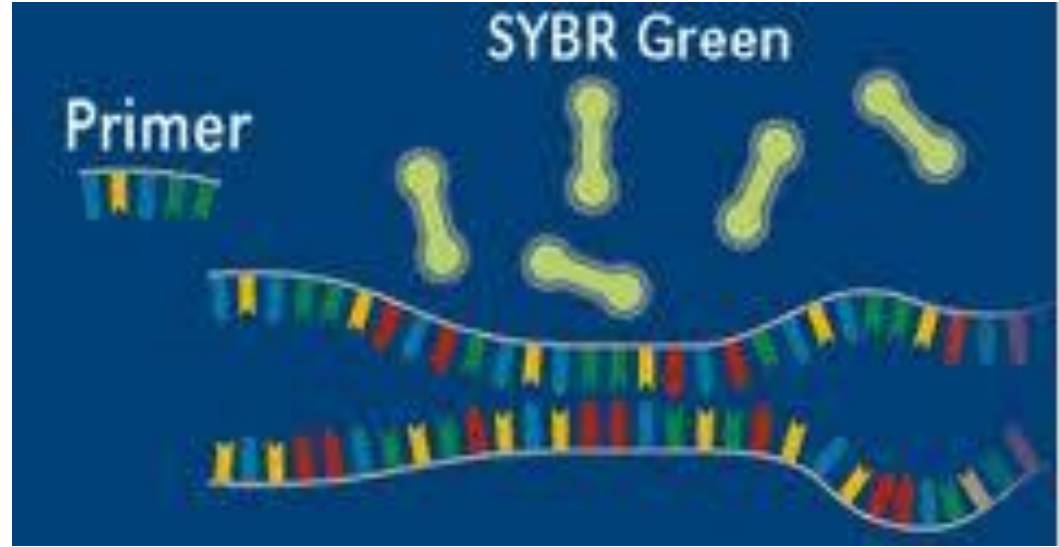
- Üç foto saptama ucuyla farklı dalga boylarına yayılabilen bir görsellik avantajı vardır.
- PCR döngülerinin her biri sonunda ekrana bilgi yansımalarıyla gerçek bir “eş-zamanlı” yöntemidir.



http://www.google.com.tr/imgres?q=sybr+green+pcr+amplifikasyon&start=98&um=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbn=isch&tbnid=p1o-48bwFeZLrM:&imgrefurl=http://www.bio-rad.com/evportal/en/US/LSR/Solutions/LUSOJW3Q3/PCR_Primer_and_Probe_Chemistries&docid=c8BqhmzTkA6dM&imgurl=http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/gene_expression/pcr/technology_detail/gxt28_img1.gif&w=506&h=366&ei=k8d0T-b-Oon74QS2s5WnDg&zoom=1&iact=rc&dur=272&sig=109219116955681988051&page=7&tbnh=108&tbnw=149&ndsp=18&ved=1t:429,r:0,s:98&tx=60&ty=80

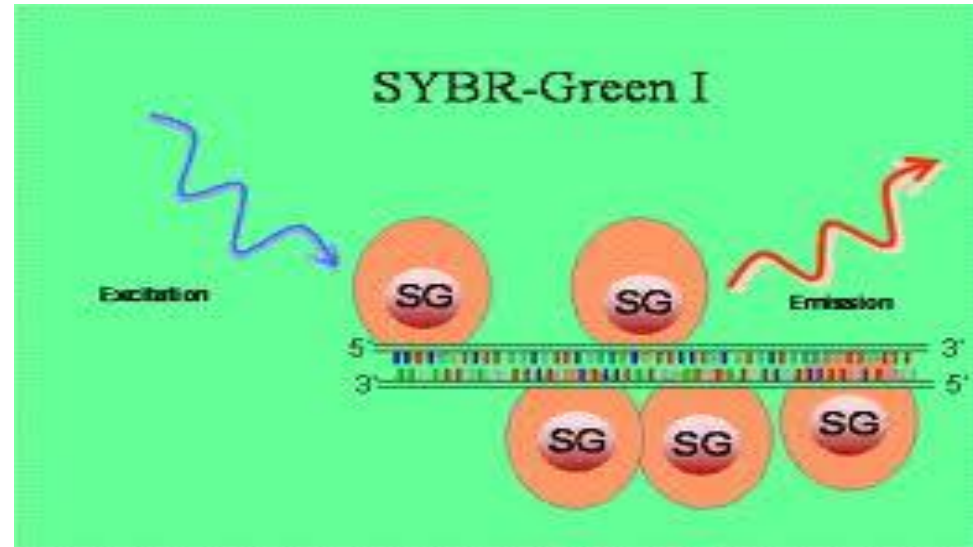
SYBR GREEN I:

❖ Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBR Green I) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir.



http://www.google.com.tr/imgres?q=sybr+green+pcr+amplifikasyon&um=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbm=isch&tbnid=tKIy3zrU7bZQHM:&imgrefurl=http://dyes.gene-quantification.info/&docid=lpPo7camtDa57M&imgurl=http://www.gene-quantification.de/sybr1.gif&w=310&h=151&ei=McJ0T9_MLYfP4QShv7mTDg&zoom=1&iact=rc&dur=43&sig=109219116955681988051&page=1&tbnh=72&tbnw=148&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:10,s:0&tx=66&ty=61

- Primerin bağlanması takiben uzama aşamasında;
- Hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR green" miktarı artmakta, buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir.



http://www.google.com.tr/imgres?q=sybr+green+pcr+amplifikasyon&um=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbn=isch&tbnid=LmhQlEhJ2e_uWM:&imgrefurl=http://www.genome-diagnostics.com/real-time-pcr.htm&docid=UXRSUmFMHbd4XM&imgurl=http://www.genome-diagnostics.com/images/real-time-pcr_clip_image002_0003.gif&w=469&h=347&ei=McJ0T9_MLYfP4QShv7mTDg&zoom=1&iact=rc&dur=221&sig=109219116955681988051&page=4&tbnh=108&tbnw=146&start=45&ndsp=17&ved=1t:429,r:9,s:45&tx=67&ty=90

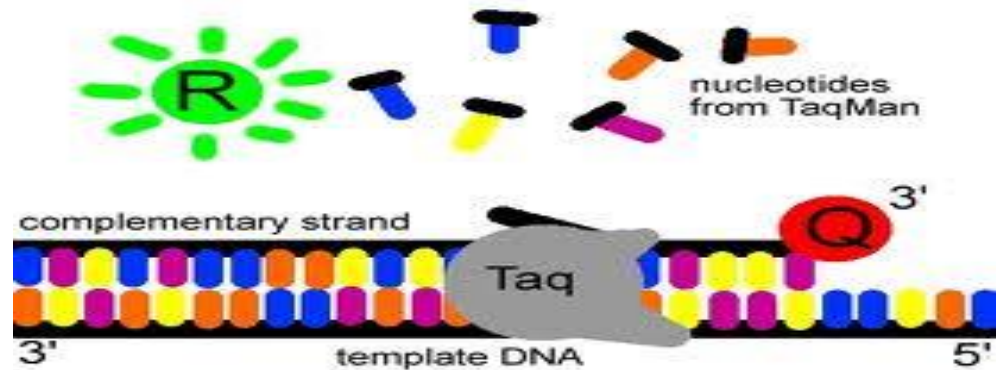
- ❖ Çift zincirli DNA ya bağlanmaktadır,
- ❖ Çift zincirli DNA ya bağlandıkları sürece floresan emisyonu olmaktadır,
- ❖ Spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleşmektedir,
- ❖ Yoğun optimizasyona ihtiyacı yoktur.

TAQMAN:

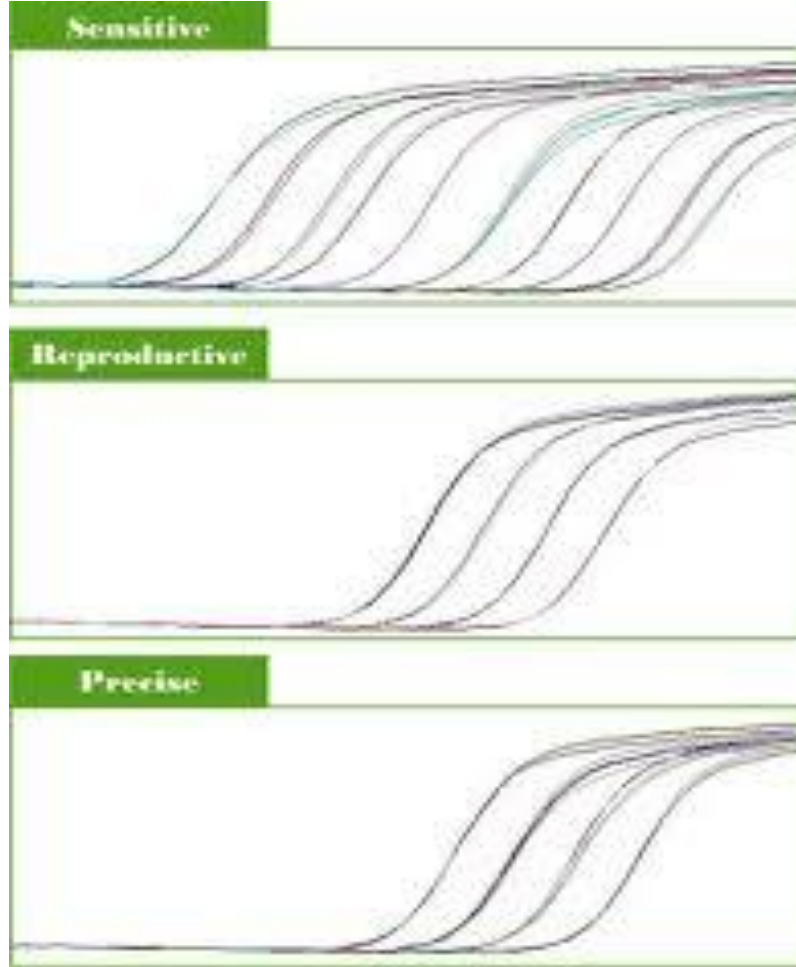
Taq DNA Polimeraz:

- ❖ *Thermus aquaticus* YT-1(1)'den izole edilmiş ısıya dayanıklı bir enzimdir.
- ❖ 5u/ μ l konsantrasyona sahiptir, DNA'yı 72°C'de çoğaltma özelliğindedir.
- ❖ Enzim ortamda magnezyum iyonlarının varlığında 5'-3' yönünde aktivite göstermektedir, ayrıca 5'-3' ekzonukleaz aktivitesine de sahiptir.

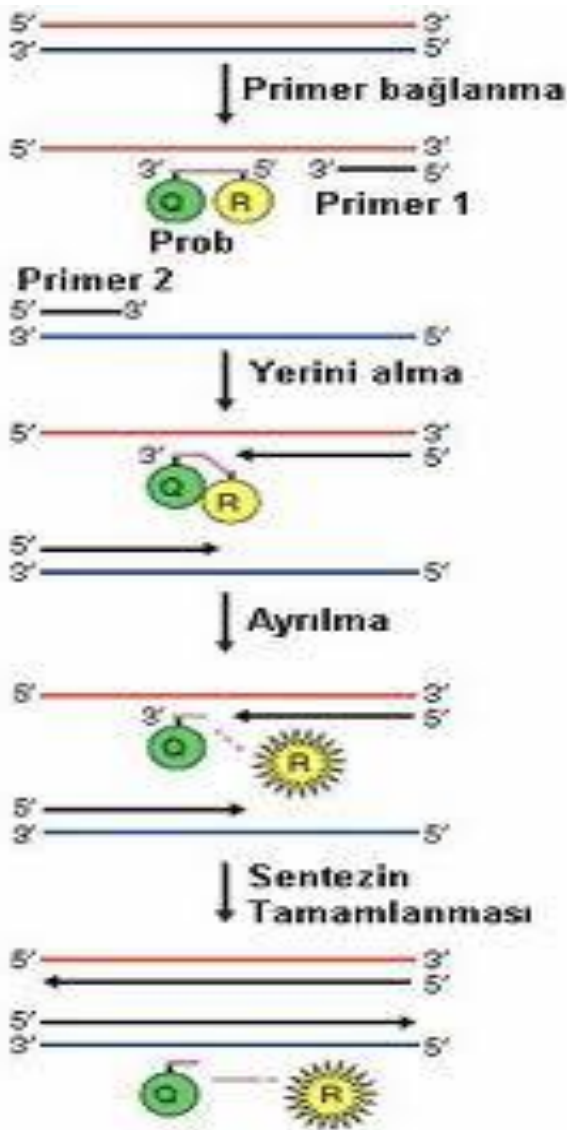
- ❖ RTA Real-Time PCR Kitlerinde bulunan;
- ❖ Reaktifler,
- ❖ Enzimler,
- ❖ Nükleik asitlerin spesifik amplifikasyonu ve tespitine yönelik tasarlanmış problemler ile güvenilir patojenlerle ilgili kalitatif ve/veya kantitatif data sağlanır.



Kit ile birlikte gelen kantifikasyon standartları ve spesifik IC Real-Time PCR sisteminde etkin kantifikasyonu ve normalize amplifikasyonu mümkün kılırlar.



[http://www.google.com.tr/imgres?q=IC+Real-Time+PCR+sisteminde+etkin+kantifikasyonu+ve+normalize+amplifikasyonu+m%C3%BCm+k%C3%BCn+k%C4%B1lar&num=10&um=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbnm=isch&tbnid=hke0FDYnmvOlxM:&imgrefurl=http://www.rtalabs.com.tr/urun.php%3Furun%3D78%26lang%3Dtr&docid=QpxwnAtkRhN-dM&imgur\]=http://www.rtalabs.com.tr/assets/urunler/RealTimePCRmethod_alt_En.jpg&w=650&h=848&ei=qst0T4SpDc_Dswap6unIDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=82&vpy=54&dur=550&hovh=256&hovw=196&tx=93&ty=214&sig=109219116955681988051&sqi=2&page=1&tbnh=104&tbnw=80&start=0&ndsp=3&ved=1t:429,r:0,s:0](http://www.google.com.tr/imgres?q=IC+Real-Time+PCR+sisteminde+etkin+kantifikasyonu+ve+normalize+amplifikasyonu+m%C3%BCm+k%C3%BCn+k%C4%B1lar&num=10&um=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbnm=isch&tbnid=hke0FDYnmvOlxM:&imgrefurl=http://www.rtalabs.com.tr/urun.php%3Furun%3D78%26lang%3Dtr&docid=QpxwnAtkRhN-dM&imgur]=http://www.rtalabs.com.tr/assets/urunler/RealTimePCRmethod_alt_En.jpg&w=650&h=848&ei=qst0T4SpDc_Dswap6unIDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=82&vpy=54&dur=550&hovh=256&hovw=196&tx=93&ty=214&sig=109219116955681988051&sqi=2&page=1&tbnh=104&tbnw=80&start=0&ndsp=3&ved=1t:429,r:0,s:0)

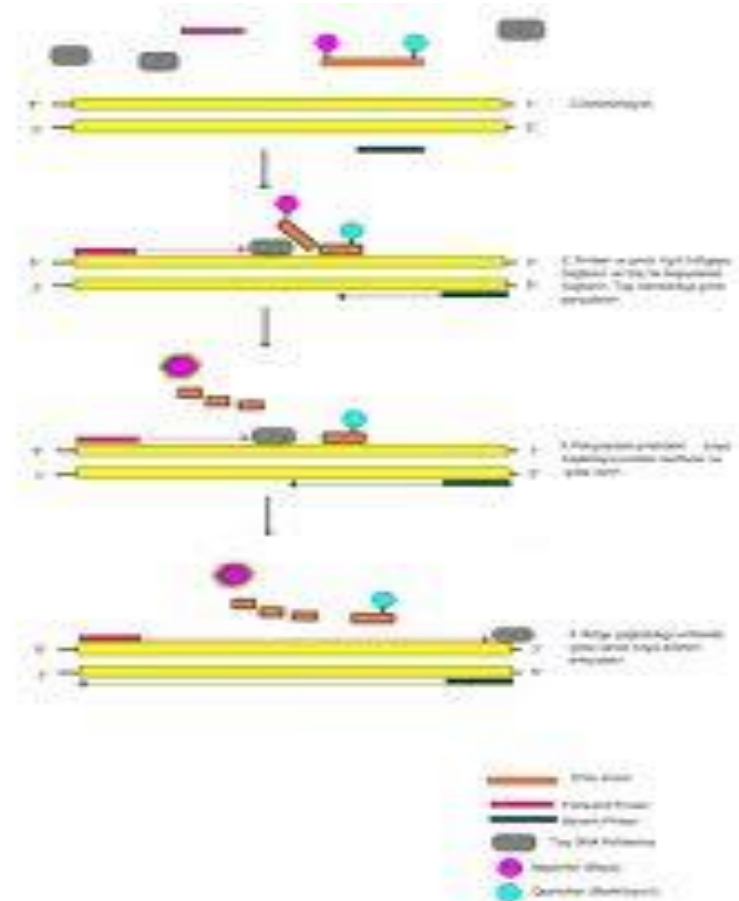


- ❖ Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır.
- ❖ Problemlerden biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir.
- ❖ Problemler hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana

- ❖ İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır.
- ❖ “Fluoresance resonance energy transfer, (FRET)” olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı;
- ❖ Ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

- ❖ TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır.
- ❖ Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM),
- ❖ 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunur.
- ❖ Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır.

- ❖ Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması,
- ❖ 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir.



http://www.google.com.tr/imgres?q=TaqMan+sisteminde+5%E2%80%99+ve+3%E2%80%99+u+C3%A7lar%C4%B1ndan&u=m=1&hl=tr&biw=1024&bih=421&tbn=isch&tbnid=ANLyh-IPKNw5hM:&imgrefurl=http://www.drzeydanli.com.tr/index.php%3Fpage%3Dicerikgoster%26menuID%3D30&docid=VVOzP0J7rPsJ7M&imgurl=http://www.drzeydanli.com.tr/images/image/TAqMan-Alternatif.JPG&w=943&h=1261&ei=4NB0T9y9N4_otQawi_nYDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=341&vpy=50&dur=15554&hovh=260&hovw=194&tx=73&ty=157&sig=109219116955681988051&page=1&tbnh=106&tbnw=67&start=0&ndsp=15&ved=1t:429,r:3,s:0

- ❖ Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde,
- ❖ Sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar.
- ❖ Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur.
- ❖ Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır

C_T nedir?

C_T (cycle threshold), gerçek zamanlı PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) verilen addır.

MELT CURVE ANALYSIS/ERİME EĞRİSİ ANALİZİ NEDİR?

Erime eğrisi analizi, SYBR-Green vb. floresan boyaların kullanıldığı analizlerde, çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla kullanılır.

Kendi aralarında sekonder yapılar oluşturmayan primerler seçilmesi, ya da primer sekonder yapıların (dimer) T_m 'inin üzerinde bir sıcaklıkta ölçüm alınması yoluyla yalnızca PCR ürününe bağlı artışın gözlemlenmesi mümkündür.

- Erime eğrisi analizinde, ikili sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur.
- Floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan tepecikler aracılığıyla, DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrılmaları gözlemlenir.

NEGATİF KONTROL NEDİR?

- Negatif kontrol, içinde test edilen madde hariç bütün reaksiyon içeriğini barındıran kontrole verilen addır.
- Her Real-Time PCR çalışmasına bir adet negatif kontrol; yani içinde her malzemeyi barındırıp sadece test edilen genetik materyal bulunmayan bir reaksiyon tüpü, dahil edilmelidir.
- Bu, olası bir kontaminasyonun varlığının kontrol edilmesini sağlar, pozitif hasta sonuçlarının anlamlı olduğunu kanıtlar.

POZİTİF KONTROL NEDİR?

- Pozitif test sonucu vereceği bilinen ve pozitif sonuç vermesi beklenen reaksiyon kontrolüdür.
- Pozitif kontrol, uygulamadaki veya kullanılan malzemelerdeki olası aksaklıkların ortaya çıkarılmasını sağlar.
- Pozitif kontrol pozitif sonuç vermezse, o deneyin sağlıklı olmadığı anlaşılır.
- Doğru sonuçların verildiğinden emin olmak için deney tekrarlanır.

ÇİFTE İŞARETLİ PROB VE SYBR-GREEN TABANLI KİTLERDE, FLORESAN ÖLÇÜMÜ VE ÜRÜNÜN SAPTANMASIYLA İLGİLİ FARKLILIKLAR VAR MIDIR?

- Evet. Çifte işaretli hidroliz problemleri kullanan (TaqMan temelli) kitlerde floresans ölçümü, PCR'ın Taq Polimerazın probu kestiği “annealing+elongation” evresinde, (genellikle 50-60°) alınır.
- SYBR-Green diziye özgü olmadığı için primer dimerleri vb. gibi hedef ürünün dışındaki çift zincirli DNA yapılarını da görüntüler.

- Bu nedenle SYBR-Green bazlı kitlerde, primer dimerlerinin tek zincirli olduğu, hedef PCR ürününün ise çift zincirli olduğu bir sıcaklıkta ölçüm yapılmalıdır.
- Bu sıcaklık da yaklaşık olarak ürünün T_m 'ine, ya da bir-iki derece altına denk gelir.
- Böylece, mümkün olduğunca, primer dimerlerden kaynaklanan floresans artışlarından kurtulmuş olunur ve spesifik olarak ürünün artışı izlenir.

- Çifte İşaretli Prob temelli kitlerde PCR ürünü baz dizisi o ürüne özgü floresan işaretli problarla görüntülenir, bu yüzden çoğalan ürün spesifik biçimde saptanmış olur.
- SYBR-green kullanılan kitlerde ise, SYBR-green dizi ayrımı yapmaksızın tüm çift zincirli DNA'lara bağlandığı için PCR ürünü spesifik olarak görüntülenemez.

T_m (Erime sıcaklığı) nedir?

- Erime sıcaklığı (T_m), DNA molekülünün yarısının tek sarmal haline geldiği belirli sıcaklığa verilen addır.
- Erime sıcaklığını büyük ölçüde baz dizisi belirler ve farklı dizilere sahip DNA moleküllerinin T_m değerleri birbirinden farklı olur.

- Gerçek DNA amplifikasyonunu ölçmek için amplifikasyon ürünlerinin “melting curve”(erime eğrisi) analizi yapılmalıdır.
- Her dsDNA kendine özgül T_m değerine sahiptir.
- Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile tüpteki floresans miktarı kayıt edilir.
- dsDNA denatüre olmaya başlayınca boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı düşmeye başlar.
- Böylece elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun T_m derecesi saptanabilir.

PCR VERİMİ NASIL HESAPLANIR?

PCR verimi standart eğrinin eğimi ile doğru orantılıdır ($\text{Verim} = [10(-1/\text{eğim})] - 1$). Buna göre -3.332'lik bir eğim %100'lük bir verime karşılık gelir.

Ancak PCR ürününün spesifik olarak saptanması erime eğrisi analizi (melt curve analysis) yoluyla kesinlikle sağlanabilir.

Verimin mutlak değerinin 3.332'den büyük olması verimin %100'den düşük olduğunun, küçük olması ise %100'den büyük olduğunun göstergesidir ki, her iki durumda da reaksiyonun optimize edilmesi gerekir.

- %100'lük verimde template her döngüde 2'ye katlanır. Gerçekte hiçbir PCR reaksiyonunun bu değere erişmediği bilinmektedir.
- Çoğaltılan bölgenin (amplicon) uzunluğu, sekonder yapılar ve primer kalitesi gibi faktörler PCR verimini etkileyebilir.