



REAL-TIME PCR KURSU

04-05 Haziran 2012

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARI

DÜZENLEYENLER:

**DOÇ. DR. ALPASLAN ALP
DOÇ. DR. AHMET PINAR
DOÇ. DR. ÖZGEN ESER
DOÇ. DR. ZEYNEP SARIBAŞ
DOÇ. DR. KORAY ERGÜNAY**

04 HAZİRAN 2012

SAAT	DERS/PRATİK	ANLATAN/SORUMLU
09:00-09:30 (TEORİK)	PCR ve Real-time PCR yöntemleri konusunda genel bilgi	Doç. Dr. Ahmet Pınar
09:30-10:00 (TEORİK)	Klinik örnek toplama, işleme, hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemleri	Doç. Dr. Özgen Eser
10:00-10:30 (TEORİK)	Real-time PCR problemleri ve floresan kimyası	Doç. Dr. Alpaslan Alp
10:30-11:00	ÇAY-KAHVE MOLASI	
11:00-11:30 (TEORİK)	Kantitatif real-time PCR	Doç. Dr. Ahmet Pınar
11:30-12:00 (TEORİK)	İç ve dış kalite kontrolleri	Doç. Dr. Koray Ergünay
12:00-13:00	ÖĞLE ARASI	
13:00-14:30 (PRATİK)	A, B, C Grubu: Otomatize sistemle DNA izolasyonu	Doç. Dr. Özgen Eser
14:30-15:00	ÇAY-KAHVE MOLASI	
15:00-16:30 (PRATİK)	A Grubu: Real time PCR uygulaması: Multipleks BK-JC Virus Kantitasyonu	Doç. Dr. Koray Ergünay
	B Grubu: Real time PCR uygulaması: Multipleks CMV, Adenovirus, EBV Kantitasyonu	Doç. Dr. Alpaslan Alp
16:30-18:00 (PRATİK)	A Grubu: Real time PCR uygulaması: Multipleks CMV, Adenovirus, EBV Kantitasyonu	Doç. Dr. Alpaslan Alp
	B Grubu: Real time PCR uygulaması: Multipleks BK-JC Virus Kantitasyonu	Doç. Dr. Koray Ergünay

05 HAZİRAN 2012

SAAT	DERS/PRATİK	ANLATAN/SORUMLU
09:00-9:30 (TEORİK)	Real-time PCR ile mutasyon saptanması	Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
09:30-10:00 (TEORİK)	Klinik laboratuvarında real-time PCR deneyimi	Doç. Dr. Alpaslan Alp
10:00-10:30	ÇAY-KAHVE MOLASI	
10:30-11:30 (PRATİK)	A Grubu: Tam otomatize nükleik asit izolasyon ve kantitatif real-time PCR uygulaması	Doç. Dr. Ahmet Pınar
	B Grubu: Tarama testlerinde real-time PCR uygulamaları: HPV	Doç. Dr. Alpaslan Alp
11:30-12:30	A Grubu: Tarama testlerinde real-time PCR uygulamaları: HPV	Doç. Dr. Alpaslan Alp
	B Grubu: Tam otomatize nükleik asit izolasyon ve kantitatif real-time PCR uygulaması	Doç. Dr. Ahmet Pınar
12:30-13:00	Kursun Kapanışı ve Sertifikaların Dağıtılması	
13:00	Swissotel'e Transfer	

PCR VE REAL-TIME PCR HAKKINDA GENEL BİLGİ

DOÇ. DR. AHMET PINAR

04 HAZİRAN 2012, 09:00-09:30

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmasından sonra nükleik asit amplifikasyon yöntemleri hızla tanı laboratuvarlarına girmiştir. Hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor ya da imkansız mikroorganizmaları saptayabilmesi ve yüksek duyarlılığı nedeniyle klinik mikrobiyoloji alanında önemli bir tanısal yöntem haline gelmiştir.

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asitlerinin varlığının saptanmasıdır. PCR yöntemi, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını ve böylece yüksek duyarlılıkta saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. Bu amaçla, bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilir. Bakteri replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasıdır. Bakterilerde bu işlem helikaz enzimi tarafından gerçekleştirilirken, PCR yönteminde 94°C gibi yüksek bir ısı uygulanarak, zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Bakterilerde primaz enzimi ile gerçekleştirilen DNA üzerinde polimerazın bağlanacağı RNA dizisi yerine sentetik olarak oluşturulmuş yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda DNA primer dizileri kullanılır. Bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılırken, PCR yönteminde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır.

Buradan anlaşılacağı gibi PCR'ın gerçekleşmesi için reaksiyon tüpünde aranan mikroorganizmaya özgül primer dizileri, DNA zincir sentezinde kullanılacak nükleotitler (A, G, C, T), nükleotitlerin komplementer bağlanması için bir ko-faktör olan Mg iyonları, *Taq* polimeraz enzimi ve enzimin tamponu bulunmalıdır. Buna ek olarak içinde nükleik asit aranacak örnek de eklenmelidir. In vitro DNA çoğaltması için

gerekli sıcaklık kontrolü "thermal cyclers" denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur ve 94°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70°C arasındadır. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72°C'ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır. Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık altında görüntülenir.

Anlaşılabacağı gibi konvansiyonel PCR yönteminin bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Konvansiyonel PCR'in avantajları:

- 1- Oldukça duyarlıdır.
- 2- Ucuzdur.
- 3- Protokol standardize edildikten sonra uygulanması kolaydır.
- 4- Duyarlık ve özgüllüğü artırmak için "nested PCR" ya da hot-start PCR", RNA çoğaltmak için "rt-PCR", çok sayıda mikroorganizmayı aynı tüpte saptamak için "multipleks PCR", genel enfeksiyon varlığını saptamak için "broad-range PCR" gibi modifikasyonlar yapmak mümkündür.

Konvansiyonel PCR'in dezavantajları:

- 1- Kontaminasyon riski yüksektir.
- 2- Emek yoğunudur.
- 3- Zaman alıcıdır.

- 4- Analitik özgüllüğü düşük olabilir.
- 5- Çok sayıda hasta örneğinin çalışılmasına uygun değildir.
- 6- Sağlıklı kantitasyon yapmak mümkün değildir.

Konvansiyonel PCR'ın dezavantajlarının ortadan kaldırmak için 1990'ların ikinci yarısında çeşitli teknolojik ilerlemeler kaydedilmiştir. Elektroforez aşamasının ortadan kaldırılarak işlem süresinin kısaltılması ve PCR'ın kapalı bir sistem içinde daha az kontaminasyon riskine maruz bırakılması amacıyla yarı otomatize "Cobas Amplicor" sistemi geliştirilmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemde cihaz içinde işaretli primerler ile gerçekleştirilen PCR sonrası çoğaltılan ürünler ELISA formatıyla saptanmaktadır.

Konvansiyonel PCR ve PCR+ELISA formatlarında yapılan kantitasyon "end-point kantitasyon" şeklindedir (Bkz. Kantitatif Real-time PCR). Bu yöntem ilk örnekteki mikroorganizma miktarını saptamakta çok sağlıklı bir yaklaşım değildir. Sağlıklı kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, hızla sonuca ulaşmak, özgüllüğü yükseltmek ve çok sayıda klinik örneği çalışabilmek için real-time PCR formatı geliştirilmiştir.

Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır. Real-time PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir. Bunlardan birincisi özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I'dir. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Çoğaltılan hedefin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli prob kullanılır. Prob formatları

arasında en sıklıkla FRET (Fluorescens Resonance Energy Transfer), Taqman ve “Molecular Beacons” yer almaktadır (Bkz. Real-time PCR Probları ve Floresan Kimyası).

Bu kursta, katılımcıların hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemlerinden başlamak üzere, real-time PCR problemleri ve floresan kimyası, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan real-time PCR testlerinde internal ve eksternal kontroller, kantitatif real-time PCR, real-time PCR ile mutasyon saptanması ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı denetiminde yürütülen real-time PCR testleri konusunda teorik bilgi edinilmesi yanında laboratuvar uygulamaları ile pratik donanım kazandırılması amaçlanmıştır.

SLAYTLAR



REAL-TIME PCR KURSU



Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları
04-05 Haziran 2012



PROGRAM

04 HAZİRAN 2012, PAZARTESİ

11:00-11:30	Kantitatif real-time PCR <i>Doç. Dr. Ahmet PINAR</i>
11:30-12:00	Internal ve eksternal kontroller <i>Doç. Dr. Koray Ergünay</i>
12:00-13:00	ÖĞLE ARASI



REAL-TIME PCR KURSU

DÜZENLEYENLER

Doç. Dr. Alpaslan ALP
Doç. Dr. Ahmet PINAR
Doç. Dr. Özgen ESER
Doç. Dr. Koray ERGÜNAY
Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ



PROGRAM

04 HAZİRAN 2012, PAZARTESİ

13:00-14:30	LABORATUVAR UYGULAMASI
14:30-15:00	ÇAY KAHVE MOLASI
15:00-18:00	LABORATUVAR UYGULAMASI

LABORATUVAR UYGULAMALARI:
1-Otomatize sistemle DNA izolasyonu
2-Real-time PCR uygulaması: Multiplex BK-JC Virus Kantitasyonu
3-Real-time PCR uygulaması: Multiplex CMV, Adenovirus, EBV Kantitasyonu



PROGRAM

04 HAZİRAN 2012, PAZARTESİ

09:00-09:30	PCR ve Real-time PCR yöntemleri konusunda genel bilgi <i>Doç. Dr. Ahmet PINAR</i>
09:30-10:00	Klinik örnek toplama, işleme, hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemleri <i>Doç. Dr. Özgen ESER</i>
10:00-10:30	Real-time PCR problemleri ve floresan kimyası <i>Doç. Dr. Alpaslan ALP</i>
10:30-11:00	ÇAY KAHVE MOLASI



PROGRAM

05 HAZİRAN 2012, SALI

09:00-09:30	Real-time PCR ile mutasyon saptanması <i>Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ</i>
09:30-10:00	Klinik laboratuvarlarda real-time PCR deneyimi <i>Doç. Dr. Alpaslan ALP</i>
10:00-10:30	ÇAY KAHVE MOLASI



PROGRAM

05 HAZİRAN 2012, SALI

10:30-12:30 LABORATUVAR UYGULAMASI

12:30-13:00 Sertifikaların Dağıtılması

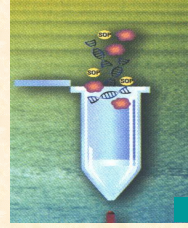
LABORATUVAR UYGULAMALARI:

- 1-Tam otomatize nükleik asit izolasyon ve kantitatif PCR uygulaması
- 2-Tarama testlerinde real-time PCR uygulamaları: HPV



Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Isı döngüleri ve polimeraz yardımıyla hedef dizi amplifikasyonu sağlar



REAKSİYON KARIŞIMI

- > Hedef DNA
- > Oligonükleotidler (Primerler)
- > Deoksiniükleotidler (dNTP)
- > Reaksiyon tamponu
- > Isıya dayanıklı DNA Polimeraz
- > Magnezyum iyonu



REAL-TIME PCR KURSU

PCR ve Real-time PCR Yöntemleri
Konusunda Genel Bilgi

04 Haziran 2012

09:00 – 09:30

Doç. Dr. Ahmet PINAR

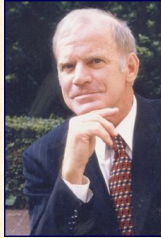


Polimeraz Zincir Reaksiyonu

"Thermal cycler" (Isı Döngü Cihazı)



1993 NOBEL ÖDÜLÜ

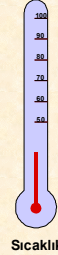


1985 "Kary Mullis" Polimeraz zincir reaksiyonu: PCR



Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çift Zincirli DNA



Sıcaklık

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Denaturasyon

94°C

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Geometrik amplifikasyon

1. dōngü
2. dōngü
3. dōngü
4. dōngü

2¹ = 2 kopya
2² = 4 kopya
2³ = 8 kopya
2⁴ = 16 kopya

2³⁵ = 34 milyar kopya

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimerleşme

72°C

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ürün Saptanması:
Amplifiye edilmiş diziler agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve boyama sonrası görülebilirler. Amplifiye edilen dizinin tanımlanması uzunluğuna göre yapılmaktadır.

1800 bp
1500 bp

M 1 2 3 4 5 6

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İki adet çift zincirli DNA

72°C

Konvansiyonel PCR'nin Avantajları

- Duyarlılığı yüksek
- Ucuz
- Protokol standardize edildikten sonra uygulaması kolay
- Duyarlılık ve özgüllüğü artırmak için "nested-PCR" ya da "hot-start PCR", RNA çoğaltmak için "rt-PCR", birden çok sayıda mikroorganizmayı aynı tüpte saptamak için "multiplex-PCR", genel enfeksiyon saptanması için "broad-range PCR" uygulamaları mümkün.



Konvansiyonel PCR'in Dezavantajları

- Zaman alıcı
- Emek yoğun
- Özgüllüğü düşük
- Kontaminasyon riski yüksek
- Çok sayıda örnek çalışmak için uygun değil
- Sağlıklı kantitasyon yapmak mümkün değil



SORUN!!

- SAĞLIKLI KANTİTASYON
- DAHA OTOMATİZE SİSTEMLER
- DAHA ÇOK ÖRNEĞİN AYNI ANDA ÇALIŞILABİLMESİ



PCR dezavantajlarının azaltılması

- 1- Süreyi kısaltmak
- 2- Kontaminasyonu azaltmak
- 3- Daha az emek harcamak
- 4- Çok sayıda örneğin çalışılmasına olanak sağlamak
- 5- Sağlıklı kantitasyon yapabilmek



Real-time PCR

PCR sonucu oluşan nükleik asit ürünlerin çift zincirli DNA arasına giren floresan bir boya ya da floresan ile işaretli probler aracılığıyla reaksiyon sırasında izlenebilmesidir.

Sinonimleri: Homogenous PCR
Kinetik PCR
qPCR



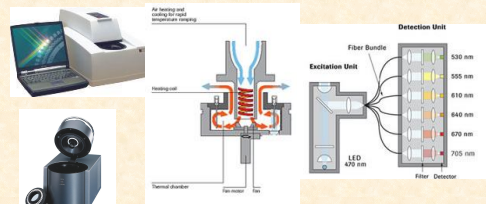
COBAS Amplicor

- PCR + ELISA
- Elektroforez ortadan kalktığı için süre kısaldı.
- Kapalı sistem olduğu için kontaminasyon riski azaldı.
- Yarı otomatize bir sistem olduğu için emek azaldı, çok sayıda örnek çalışılabilir.



Real-time PCR

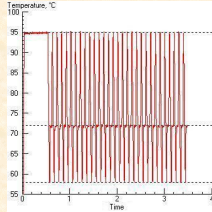
- Termal döngü cihazı ve florimetre aynı cihaz üzerinde bulunur.



6

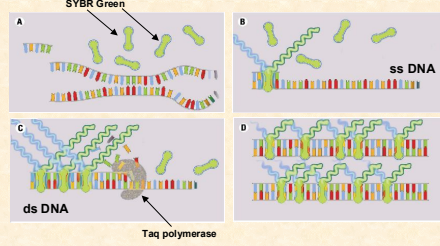
Real-time PCR

- Bilgisayar programı ile sıcaklık döngüleri ayarlanır ve izlenir.



6

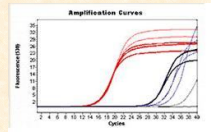
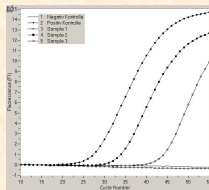
SYBR Green I ile Saptama



6

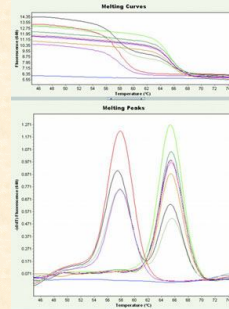
Real-time PCR

- PCR ürünü ile floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır.



6

Erime Eğrisi



6

Real-time PCR'da Ürün Saptanması

- (i) Floresan boyalarla diziye özgül olmayan saptama

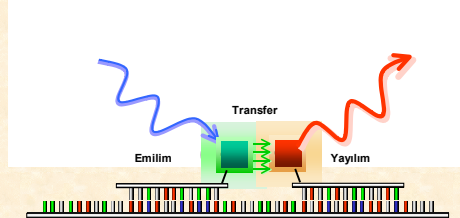
SYBR Green I

- (ii) Diziye özgül probalar

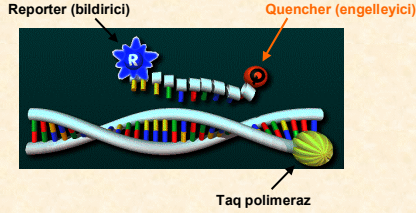
HybProbes (FRET)
Dual-Labeled Probes (TaqMan probes)
Molecular Beacons

6

Floresan rezonans enerji transferi (FRET) probaları ile saptama



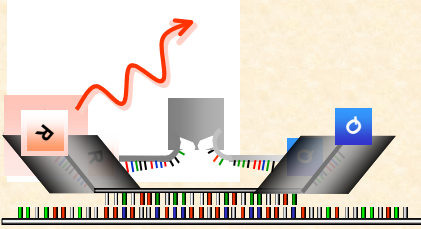
6 Dual-labeled (TaqMan) probaları ile saptama



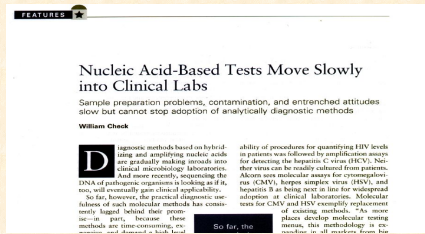
6 Real-time PCR'in Avantajları

- 4- Kapasitesi artırılmış cihazlarla çok sayıda örnek çalışmak mümkündür.
- 5- Kullanılan probalar yardımıyla özgüllük oldukça artırılmıştır.
- 6- "Log faz analizi" ile kantitasyon daha sağlıklı ve daha geniş bir aralıkta yapılabilmektedir.
- 7- Rekabet nedeniyle ucuzlamıştır.

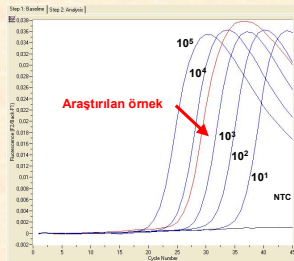
6 Molecular beacons aracılığı ile saptama



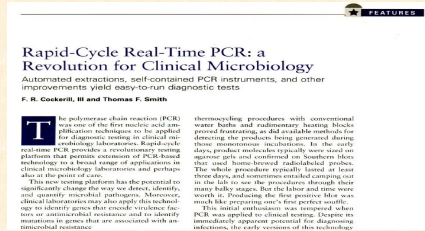
6 ASM News: Kasım 2001



6 Kantitasyon



6 ASM News: Şubat 2002



6 Real-time PCR'in Avantajları

- 1- Döngülerin hızlı uygulanması ve saptamanın floresan ölçümü yardımıyla eş zamanlı yapılabilmesi nedeniyle toplam test süresi kısaltılmıştır.
- 2- Test için gereken emek azalmıştır.
- 3- Çoğaltma ve saptamanın aynı tüp içinde gerçekleşmesi nedeniyle kontaminasyon riski azaltılmıştır.

6 Kurs Amaçları

Hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemlerinden başlamak üzere, real-time PCR probaları ve floresan kimyası, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan real-time PCR testlerinde internal ve eksternal kontroller, kantitatif real-time PCR, real-time PCR ile mutasyon saptanması ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı denetiminde yürütülen real-time PCR testleri konusunda teorik bilgi edinilmesi yanında laboratuvar uygulamaları ile pratik donanım kazandırarak.

KLİNİK ÖRNEK TOPLAMA, İŞLEME, HÜCRE PARÇALAMA VE NÜKLEİK ASİT SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

DOÇ. DR. ÖZGEN ESER

04 HAZİRAN 2012, 09:30-10:00

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında yapılacak testlerin uygulanacağı örneğin hazırlanması sırasında kullanılacak yöntemin seçimi, optimal bir teknik için gerekli olan malzemelere, klinik örneğe ve seçilen hedef bölgeye bağlıdır. Hedef mikroorganizmanın belirlenmesinin ardından infeksiyon patogenezinde rol oynayan etkenin çok sayıda bulunduğu düşünülen klinik örneğin seçilmesi gerekmektedir. Tekniğe ait istenilen duyarlılığa ulaşılması için test edilecek klinik örnek yeterli hacimde olmalıdır. Örnek hazırlama yönteminin seçimi sırasında; seçilen yöntemin yeterli duyarlılığa sahip olması, hedef bölgenin çoğaltılma etkinliği, örnek üzerinde uygulanacak test sayısı, hedef nükleik asitin stabilize edilmesi, toksik çözeltilerin ve santrifüjasyonların önlenmesi, ortaya çıkan inhibitörlerin uzaklaştırılması gibi bazı diğer kriterler de göz önüne alınmalıdır.

Klinik örneklerden bakteriyel ve viral nükleik asitlerin saflaştırılması amacıyla birçok yöntem kullanılabilmektedir. Ancak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında her örnek tipi için kullanılabilecek genel otomatize bir yöntem bulunmamaktadır. Tanı amacıyla yapılacak moleküler teste kullanılan klinik örnekte aranan mikroorganizmanın miktarı, hücre yapısı, uygulanan yöntemle hassasiyeti kullanılan yöntemin seçilmesinde önemli parametrelerdir. Araştırılacak mikroorganizma türü nükleik asit izolasyonunda seçilecek yöntemin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hedef molekülün tipi de kit seçimine doğrudan etki eden bir faktördür. Molekülün RNA ya da DNA olması, DNA'nın çift ya da tek zincirli saflaştırılacak olması, RNA'nın DNA kontaminasyonu olmadan saflaştırılma gerekliliği önemli değişkenlerdir. DNA göreceli olarak daha dayanıklıyken RNA, klinik örneğin saklanması, hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma işlemleri ve daha sonraki saklama sırasında kaybedilebileceğinden dayanıklılığı düşüktür.

Bu bölümde moleküler bir yöntem için ideal bir örneğin hazırlanması amacıyla gerekli optimal basamakların neler olabileceği hakkında bilgi

verilmektedir. Nükleik asitlerin elde edilmesinde hedefe yönelik dört basamak yer almaktadır. Bunlardan birincisi nükleik asitin serbestleştirilmesidir. İkinci basamak nükleik asitin dayanıklılığının artırılması, bunu takip eden üçüncü basamak inhibitörlerin uzaklaştırılmasıdır. Son basamak ise nükleik asitin yoğunlaştırılarak sıvı ortama yerleştirilmesidir. Nükleik asit izolasyonunda temel prensiplerin anlaşılması amacıyla konvansiyonel yöntemler ile bakteri hücre DNA'sının ekstraksiyonu örnek olarak anlatılacaktır.

1.1 Hücre kültürünün hazırlanması

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde öncelikle bakteri sıvı besiyerinde üretilir. Besiyeri esansiyel besin maddeleri içermelidir. Bu amaçla iki farklı besiyeri tercih edilmektedir. LB (Luria-Bertani) ve M9 besiyerlerinin içerikleri tabloda verilmektedir.

LB besiyeri

	g/l
Trypton	10
Yeast extract	5
NaCl	10

M9 besiyeri

	g/l
Na ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1.0
MgSO ₄	0.5
Glukoz	2.0
CaCl ₂	0.015

M9 besiyeri inorganik besinler içerir. Nitrojen, magnezyum, kalsiyum gibi esansiyel elementler yanısıra karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz bulundurmaktadır. LB besiyeri ise aminoasit ve küçük peptit kaynağı olarak tripton ve nitrojen, glukoz, organik/inorganik besin kaynağı olarak maya ekstresi içermektedir.

Hücrelerin hazırlanması basamağında DNA ekstraksiyonu yapılacak bakteri LB agara tek koloni ekilir. Bir gece 37 °C'da inkübe edilir. Ertesi gün tek bir koloni alınarak LB buyyona ekim yapılır. LB buyyona ekilen bakteri 150-250

rpm'de horizontal platforma sahip bir çalkalayıcıda 37 °C'da inkübe edilir. Bakteri, 18 saat sonra geç logaritmik veya erken durağan faza geldiğinde ve bakteri konsantrasyonu $2-3 \times 10^9$ hücre/ml'ye ulaştığında ekstraksiyona hazırdır. Bakteri konsantrasyonu bakteri süspansiyonunun optik dansitesi okunarak da belirlenebilir. Bu amaçla bakteri süspansiyonu OD 600 nm'de okunur. 1 OD ünitesi = 0.8×10^9 hücre/ml'dir. 2-3 OD ünitesine sahip olan bakteri süspansiyonu hücre ekstraksiyonu için uygun kabul edilir. Daha sonra hücreler 1500-3000xg'de santrifüj yapılarak çöktürülür.

1.2 Hücre parçalama yöntemleri

Hücre parçalama yöntemleri iki tiptir.

1.2.1 Enzimlerle parçalama yöntemleri: Hücre kimyasal maddelerle parçalanır. Bakteri hücre parçalanmasında en çok tercih edilen yöntemdir.

1.2.2 Fiziksel parçalama yöntemleri: Hücre mekanik güçlerle parçalanır.

1.2.1 Hücreleri enzimlerle parçalama yöntemleri:

Hücre parçalanma yönteminde ilk basamak hücre duvarının zayıflatılmasıdır. Bu işlem enzimlerle yapılabilir. Enzimler özellikle hücre duvarında yer alan peptidoglikan tabakayı zayıflatmaya yönelik işlev görürler. Enzimlerle hücrelerin parçalanmasında en sıklıkla kullanılan enzim lizozimdir. Gram-negatif (ör: *Escherichia coli*) ve gram-pozitif bakteri hücrelerinin hücre duvarına etkili bir enzimdir. Hücre duvarına sertlik veren polimerik bileşikler parçalar. Peptidoglikan tabakada yer alan muramik asit arası çapraz bağları kırar. Yumurta beyazı, gözyaşı ve tükürükte doğal olarak bulunur. pH 4-10 arasında enzim iyi aktivite göstermesine rağmen optimum pH aralığı 6,7-8.0'dir. Soğukta iyi çalışır. Bu nedenle lizozim konulduğunda işlem buz üzerinde yapılmalıdır. Lizostafin ise gram-pozitif bakterilere özellikle stafilokoklara etkili bir enzimdir. Mantarlardan elde edilir ve pahalıdır.

Hücrenin parçalanması sırasında ikinci basamak dış membran geçirgenliğinin artırılmasıdır. EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), hücre duvarında bulunan magnezyum iyonlarını bağlayarak ortamdan uzaklaştırır. DNA'yı sindiren hücresel enzimleri (DNaz) inhibe eder. TRIS ise tampon görevi görür. pH ayarı yapar. Membran stabilitesini bozar. Ortam ozmolaritesini artırarak da hücre membranını parçalamak mümkündür. %10 süzkroz bu amaçla kullanılabilir. Yumuşak bir şekilde hücreyi patlatır. Bu nedenle, DNA ve organeller korunur.

Hücrenin parçalanması sırasında üçüncü basamak iç membranın parçalanmasıdır. -80°C’de dondurma ve 37°C’de çözme, kuru buzlu etanol banyosu, sonikasyon veya deterjanlar ile yapılabilir. Deterjanlar bu amaçla en sık kullanılan kimyasal maddelerdir. Deterjan orijinal kültür hacminin 1/10’u kadar eklenir. Bu amaçla iyonik (ör; sodium dodecyl sulphate, SDS) veya non iyonik (ör; Triton X100) deterjanlar kullanılabilir. SDS 100ml’ye 20g kadar tartılarak %20 stok çözelti hazırlanır, son konsantrasyon %1 olacak şekilde kullanılır. TritonX100 ise lipid molekülleri ayırıp hücrenin lizisine neden olur.

1.2.2 Hücreleri fiziksel parçalama yöntemleri

Hücreleri fiziksel parçalama yöntemlerinde mekanik güç kullanılmaktadır. Bunlar üçe ayrılmaktadır.

1. Basınçla Patlatma (French pressure): Pistonlu bir silindir kullanılır. On ton basınç uygulanır. Geniş alandan dar alana geçen hücreler kenarlara ve birbirlerine sürtünerek parçalanır.

2. Sonikasyon (ultrasonik ses dalgaları): Sonikatör kullanılır. Sıvıda kavitasyonlar oluşur, çok hızlı hareket eden kabarcıklar hücreleri parçalar.

3. Cam boncukla parçalamak: Gram-pozitif bakterilere etkilidir, gram-negatiflere zarar verir. Kullanılan cam boncuklar 100 µm büyüklüğündedir.

Fiziksel parçalama yöntemlerinin avantajları kimyasallara gerek olmaması, büyük miktarlarda DNA elde edilebilmesi, bakteri türleri arasında farklılık göstermemesi ve ekonomik olmasıdır. Dezavantajları ise işlem sırasında ısı açığa çıkması, oluşan oksidasyon nedeniyle aşırı köpürmenin meydana gelmesi, bunların neden olduğu denatürasyondur. Bu durumdan kurtulmak amacıyla ortamın soğutulması veya redüktan madde eklenmesi yararlı olabilir.

1.3 DNA dışı hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması

Hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında kullanılan kimyasal maddelerden biri fenoldür. Fenol tehlikeli organik bir çözücüdür. Her zaman eldiven kullanılarak çalışılmalı, temas halinde soğuk su ile eller yıkanmalıdır. Fenol içeren çözeltilerin ortadan kaldırılması için özel işlemler gereklidir. Fenol genellikle tamponlanmış halde bulunur. Çözelti iki tabakalıdır. Üst tabaka tampon fazlası, alt tabaka ise doymuş fenoldür. Fenol kullanımı sırasında pH önemli bir basamaktır. Saflaştırma basamağında fenol nötral pH’da olmalıdır, asidik pH DNA’nın fenol içinde çözünmesine neden olmaktadır. Fenol proteinleri denatüre

ederken bu proteinleri interfazın alt kısmında beyaz koagüle olmuş bir kütle halinde çöktürür. Kloroform fenol benzeri görev görür, ayrıca aköz ve organik tabaka arasında stabil olmayan bağları sabitleştirir.

Sıklıkla kullanılan nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinden biri fenol-kloroform yöntemidir. Bu yöntemde nükleik asit karışımı içine eşit hacimde fenol konarak nazıkçe vortekslenir. Mikrosantrifüjde 2 000 rpm'de 5 dakika veya 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA içeren aköz faz organik fazdan ayrıştırılır. Aköz faz dikkatle yeni bir tüpe aktarılır. Eşit hacimde 24:1 (v/v) kloroform-izoamil alkol eklenir. DNA'yı çöktürmek için 0.1 hacim 3M sodyum asetat, pH 5.5 ve 2 hacim saf etanol eklenir. Daha sonra -20 °C'da bir gece veya daha kısa süre ile -80 °C'da inkübe edilir. 10 000 rpm'de 5-15 dakika santrifüj yapılarak DNA çöktürülür. Etanol dikkatle uzaklaştırılır ve çökelti 50 ° C'da 5 dakika kurumaya bırakılır. %70'lik etanol ile ek yıkama yapılarak çökeltide bulunan tuz fazlalığı uzaklaştırılır. Kuruyan DNA üzerine steril TE, pH 5.0 veya su eklenir. Kısa süreli olarak 4 °C'da veya uzun süreli olarak -20 °C'da saklanır. Bu işlem ile nükleik asitin kontamine ve denatüre eden proteinlerle ilişkisi engellenir.

Fenol ve kloroform ekstraksiyon yönteminde işlemin 2-3 kez tekrarlanması halinde daha saf nükleik asit elde edilebilmektedir. Ancak, bu tekrarlar nükleik asit kaybına neden olabilir ve yıkım artar. Bu nedenle yöntem sırasında ek bir basamak olarak bir proteazın kullanılması proteinleri daha küçük peptitlere parçalayarak fenolün görevini kolaylaştırabilir ve nükleik asit yıkımı önler. Bu amaçla Pronaz veya Proteinaz K kullanılabilir. Proteinazlar yüksek sıcaklıkta çalışır. Bu nedenle hem lizozim hem de proteinaz birlikte kullanılacaksa 37 °C optimal sıcaklık tercih edilebilir. Bunun yanısıra lizozim için 4 °C'da inkübasyonu takiben 50-60 °C'da proteinaz K ile inkübasyon daha doğru bir yaklaşım olabilir. DNA izolasyonunda RNA'nın özellikle mRNA'nın uzaklaştırılması gerekebilir. DNA saflaştırılması sırasında RNA aköz fazda birikir. Bu amaçla ribonükleaz kullanılarak RNA'nın ribonükleotit altünitelerine ayrılması sağlanmalıdır.

1.4 DNA'nın yoğunlaştırılması

Bazı hücre ekstraksiyon yöntemleri nükleik asit yoğunlaştırma basamağını gerektirmeyebilmekle birlikte bazen örnekteki DNA miktarını artırmak amacıyla uygulanmaları daha doğru bir yaklaşım olur. Bu amaçla en sık kullanılan yoğunlaştırma yöntemi etanol presipitasyonudur. DNA'nın etanol ile presipitasyonu sıcaklık, süre ve DNA miktarı ile ilişkilidir. Tuz varlığında ve

sıcaklık -20 °C veya daha az olduğunda saf etanol DNA'yı çöktürmede iyi bir seçenektir. DNA %65 üzerinde etanol konsantrasyonlarında presipite olmaktadır. Yoğun bir DNA örneğinde etanol ile çöktürme sonucu nükleik asit bir cam pipet yardımıyla toplanabilir. Daha düşük konsantrasyonda DNA içeren örneklerde ise etanol DNA'ya 2.5:1 oranında eklenerek DNA çöktürülür ve kısa bir santrifüj sonrasında üst sıvıda kalan DNA toplanabilir. Santrifüj sonrasında DNA %70 etanol ile yıkanmalıdır. Etanol presipitasyonu sonrası çözelti içinde kısa zincirli ve monomerik nükleik asit bileşikler kalır. Bu nedenle, ribonükleaz eklenen örneklerde ribonükleotitler bu basamakla uzaklaştırılabilir.

DNA'nın yoğunlaştırılmasında kullanılan diğer bir ajan amonyum asetatıdır. DNA'nın etanol içinde presipitasyonuna yardımcı olur. NaCl de DNA'nın negatif yükünü nötralize ederek yoğunlaştırıcı etki gösterir. Tuz su ile etkileşime girer. İzopropanol RNA'nın içinde çözünür halde kalmasından dolayı genellikle DNA'ya özgül seçici presipitasyona neden olur. DNA, %50'nin üzerinde yoğunluğa sahip izopropanol ile presipite olur.

1.5 Nükleik asit kantitasyonu

Bazı moleküler yöntemlerin uygulanması sırasında test edilecek örnekteki nükleik asit miktarını bilmek gerekebilir. Nükleik asit miktarı ultraviyole (UV) absorbansı gösteren spektrofotometri ile okunabilmektedir. UV absorbans okuma ile DNA/RNA miktarı saptanabilir. Halka yapılar UV dalgaları absorbe eder. Nükleik asitler dışında, proteinler, organik maddeler, deterjanlar ve lipidler de halka yapıya sahiptir. Ör: DNA ve RNA ~ 260nm and ~280nm'de en iyi absorbans gösterirler. Proteinler ve bazı amino asitler de ~ 260nm and ~280nm'de iyi absorbans gösterirler. pH değişiklikleri de absorbansı etkiler, bu yüzden spektrofotometrik ölçümler sırasında DNA dilüsyonları TE tamponu ile yapılmalıdır. Nükleik asitlerin saflığı A260/A280 oranı ile de saptanabilir.

$$\text{DNA A260/A280} \sim 1.8$$

$$\text{RNA A260/A280} \sim 2.0$$

Bu oranlar iyi ise, nükleik asit kantitasyonu yapılabilir. Oran 1.8'in altında olduğunda örnek protein veya fenol ile kontamine kabul edilmelidir. Absorbsiyon

oranları ile nükleik asit miktarının belirlenmesi için, 260nm'de okunan değer DNA için 50µg/ml, RNA için 40µg/ml ile çarpılır.

1.6 Ticari kitler ve otomatize sistemler

Ticari kitler ve otomatize sistemler, konvansiyonel sistemlerde olduğu gibi nükleik asitin organizmadan çıkartılması ve serbestleşen nükleik asitlerin stabilizasyonu ile beraber inhibitörlerin uzaklaştırılması aşamalarını gerçekleştirmektedirler. Nükleik asitlerin organizmadan çıkartılması için kitler daha çok guanodin tiosiyanat, lizozim, proteinaz K, SDS gibi kimyasal yöntemleri içermektedirler. Nükleik asitlerin saflaştırılması ve inhibitörlerin uzaklaştırılması aşaması ise tris, proteinaz K, guanidin-HCl gibi kimyasal yöntemlerle yapılabildiği gibi vakum ya da spin-kolon ve nükleik asitin silika ya da manyetik boncuklara yapıştırılması şeklinde fiziksel yöntemlerle de yapılabilmektedir.

Ticari olarak bulunan manuel kitlerden IsoQuick nükleik asit izolasyon kiti (Orca), Puregene izolasyon kiti (Gentra) ve Master Pure ekstraksiyon kiti (Epicentre) tamamen kimyasal yöntemleri kullanırken, QIAmp (QIAGEN) ve High Pure saflaştırma kitleri (Roche) spin-kolon, Nuclisens izolasyon kiti (bioMerieux Suisse) ise silika boncuklara yapıştırma yöntemlerini kullanmaktadırlar. Spin-kolon yönteminde nükleik asitler santrifüjle bir membran filtreye tutturularak saflaştırılmaktadır. Boom silika yönteminde ise nükleik asitler silika boncuklara tutturularak saflaştırılmaktadır.

Manuel kitlerin işlem süresi 1 saat 55 dakika ile 4 saat 39 dakika arasında değişmektedir. Bu kitler konvansiyonel yöntemlere göre uygulanması daha kolay ve duyarlılığı daha yüksek sistemler olsalar da otomatize sistemlere göre daha emek-yoğun ve kontaminasyona açık sistemlerdir.

Piyasada bulunan otomatize cihazlardan ABI 6700 (PE Biosystems Genomics), BioRobot (QIAGEN), Nuclisens Extractor (bioMerieux Suisse), X-Tractor Gene (Sigma-Aldrich), tüp içindeki nükleik asitin vakum altında membran ya da silika ortama bağlanması prensibi ile çalışmaktadırlar. MagNa Pure (Roche), BioRobot (QIAGEN) ve Nuclisens miniMag (bioMerieux Suisse) ise nükleik asitin manyetik boncuklara bağlanması prensibi ile çalışmaktadır.

MagNa Pure LC Cihazı (Roche) 1-32 farklı örneğin aynı anda çalışılmasına imkan veren bir sistem olup 32 örnek 50-180 dakika içinde işleme tabi tutulmaktadır. Tam kan, serum/plazma, kan-kültür hücreleri, insan ve hayvan dokusu, bakteri veya mantar örneklerinde tüm nükleik asit, DNA, RNA, mRNA izolasyonu yapılabilmektedir. Tamamen kapalı bir sistem içerisinde otomatik olarak çalışan MagNa Pure LC cihazı filtrasyon, santrifügasyon ve diğer tüm

manuel basamaklardan arındırılmış durumdadır. Örnekler arasındaki çapraz kontaminasyon riski son derece düşüktür.

QIAGEN otomatize sistemleri içinde yer alan BioRobotM48 manyetik boncukla ayırım prensibine sahip olan ve her testte 6-48 örnek çalışma imkanı veren ve RNA hücre-doku, DNA kan-doku ve viral nükleik asit izolasyonu yapabilen otomatize bir sistemdir. Altı örneği 20 dakikada, 48 örneği 2.5-5 saatte çalışabilme imkanına sahiptir. Hepa filtrasyonu ve UV sterilizasyonu ile kapalı bir sistem olup çapraz kontaminasyona izin vermemektedir. BioRobotMDx (QIAGEN) ise aynı test içinde 96 örnek çalışabilmekte ve testi 2.5 saat içinde tamamlayabilmektedir.

Cobas AmpliPrep Cihazı (Roche) ise 72 örnek çalışabilme kapasitesi, 4 farklı testi aynı anda uygulayabilme ve kalitatif-kantitatif sonuç verebilme özelliği ile yine kolay örnek hazırlayan, güvenilir, kapalı otomatize bir sistemdir.

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında örnek hazırlamada kullanılan otomatize sistemlerde işlem süresi 20 dakika ile 2 saat arasında değişmektedir. Otomatize örnekleme sistemleri, uygulamada emek-yoğun olmamaları ve kontaminasyon riskini en aza indiren kapalı sistemler olmaları gibi avantajlara sahiptirler. Bu nedenle, pahalı sistemler olmalarına rağmen, yoğun iş yüküne sahip tanı laboratuvarlarında kullanılmaları güvenilirlik ve hızlı tanı açısından önem taşımaktadır.

1.7 İnfeksiyon hastalıklarının moleküler tanısında örnek hazırlama yöntemlerinin temel prensipleri

İnfeksiyon hastalığının tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi için alınan klinik örnek tipi genel olarak moleküler yöntemler için de en uygun örnektir. Amplifikasyona dayalı moleküler tanı yöntemlerinde klinik örnekte patojene ait hedef genin bulunduğu tek bir kopya dahi tanı için yeterli olabilmektedir. Genel olarak, klinik örneğin yüksek hacimde alınması enfeksiyon hastalığının tanı şansını artırmak açısından doğru bir yaklaşımdır. Ne var ki, moleküler yöntemlerde kullanılan örnek hacmi 100 µl'yi geçmediğinden, hedef bölgenin yoğunlaştırılması aşamasında karmaşık basamakların kullanılması ile duyarlılığın düşürülmesi arasında bir seçim yapılması gerekmektedir. Uygun örnek hazırlama yöntemiyle büyük hacimlerdeki örneklerde hedefi çoğaltıp göstermek mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte bazı diğer faktörler de göz ardı edilmemelidir. Örneğin, pürülan bir balgam ml'de 14 mg DNA içerebilmektedir. Bu durum, büyük örnek hacimlerinde ekstraksiyon sırasında

DNA'nın yüksek miktarda bulunmasına bağlı olarak özgül olmayan primer bağlanması dolayısıyla duyarlılığın düşmesine neden olabilmektedir.

 rnek hacmi, infeksiyon etkeni olan mikroorganizma sayısının test hacmi başına düşük olduğu durumlarda önem kazanmaktadır. Uygulanan moleküler yöntemin duyarlılığına bağlı olarak, bir moleküler mikrobiyoloji laboratuvarı infeksiyon etkenine ait tek kopya sayısını saptayabilmekteyken, diğer bir laboratuvar 20-50 kopyadan daha azını saptayamamaktadır. Bu durum, uygulanan yöntemler optimal koşullara sahip olmasına rağmen, farklı laboratuvarlara ait sonuçlar arasında uyumsuzluğa neden olabilmektedir.

İnfeksiyon hastalıklarının tanısında en uygun örnek hazırlama yöntemini belirlemek için gerekli koşullar örnek, mikroorganizma ve hedef nükleik asitin özelliklerine göre geliştirilmelidir.  rnek tipi (kan, serum, plazma, balgam, beyin omurilik sıvısı, vs.), örnek hacmi, örneğin fiziksel özellikleri (sıvı, doku, sürüntü, vs.), örneğin vizkozitesi, amplifikasyon inhibitörlerinin varlığı örnek hazırlama yönteminde dikkate alınması gereken özelliklerdir.  rnekte bulunan mikroorganizma yükü yani birim örnek hacmi içinde bulunan patojen mikroorganizma sayısı, etkenin hücre duvar yapısı, etkenin kendiliğinden hücresel lizise uğraması gibi özellikler yöntem sırasında değerlendirilmesi gereken diğer unsurlar arasında bulunmaktadır. Hedef nükleik asitin özellikleri  rneğin; RNA veya DNA olması, çift zincirli veya tek zincirli oluőu, DNA kontaminasyonu olmaksızın RNA izolasyonu gerekliliği uygun örnek seçiminde önem kazanmaktadır.

1.8 İnfeksiyon hastalıklarında moleküler tanı için alınan klinik örneklere yaklaşım

Kan  rneği: Kan  rnekleri tam kan, plazma, serum ve lökosit fraksiyonu şeklinde olabilir. Plazma  rnekleri ise EDTA, heparin veya sitrat içerebilir. Bunlar PCR için inhibitör maddelerdir. Heparin Taq DNA polimeraz inhibitörüdür. EDTA içeren tüplerde EDTA konsantrasyonu kan örneğinde 1-2 mg/ml'yi geçmemelidir. Heparin içeren tüplerde ise heparin konsantrasyonu 0.1-0.2 mg/ml'yi aşmamalıdır. Tam kan da içerdiği hem ve/veya porfirin nedeniyle Taq DNA polimerazı inhibe etmektedir.

Kan  rnekleri için eritrositlerin parçalanması sonrasında DNA'nın izole edildiği birçok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu amaçla tam kan 0.32 M sükroz,

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, %1 Triton X-100 içeren bir lizis tamponu ile işlem gördükten sonra santrifüj edilir. Tampon çözelti tüm hücreleri nükleuslarını bozmadan parçalar. Santrifüj sonrası elde edilen çökelti daha sonra lizis tamponu ile iki kez daha yıkanarak iyonsuz deterjan ve proteinaz K içeren PCR tamponu ile süspanse edilir. Amplifikasyon öncesi örnek kaynatılarak teste hazır hale getirilir.

Plazma ve serum örneği: Moleküler yöntemde hedef mikroorganizma hücre dışı yerleşimli olduğunda tam kan örneği yerine plazma veya serum tercih edilmelidir. Örneğin; Hepatit B (HBV) DNA, Hepatit C (HCV) RNA, HIV RNA örnekleri plazma veya serumdan hazırlanmalıdır. HCV hedef RNA'nın izolasyonu için plazma örneğinin fenol, fenol-kloroform-izoamil alkol ve/veya kloroform-izoamil alkol ile etanol presipitasyonunu uygun olmaktadır. Örneğin oda sıcaklığında saklanması HCV izolasyon şansını azaltmaktadır. Aynı şekilde örneğin tekrarlayan dondurulması ve çözündürülmesi de izolasyon olasılığını azaltmaktadır. Parçalanmış hücrelerde kontamine DNA'nın miktarı da saklama ve ekstraksiyon şekline göre değişiklik göstermektedir.

İdrar örneği: İdrar örneğinin saklanması sırasında oluşan çözünmeyen amorf tuzların çökmesi nedeniyle nükleik asidin saflaştırılması zorlaşabilir. Santrifüj işlemi sırasında bu tuzlar bakteri veya hücreler ile birlikte çöker. İdrarın depolanması sırasında yine bazı bakteriler parçalanabilir. Bu durum, ekstraksiyon işleminin başında yapılan bir santrifüj işlemi sırasında nükleik asitlerin üstte kalan sıvı ile birlikte atılmasına yol açabilir. Normal idrar örnekleri ile yapılan çalışmalar idrarda bulunan inhibitörlerin insandan insana hatta aynı insanda günden güne farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu durum diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında idrarda negatif moleküler tanı sonuçlarının yüksek olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle tekrarlayan negatif sonuçlar çıktığında testler mutlaka pozitif kontrol örneği eklenerek tekrarlanmalıdır.

Beyin omurilik sıvısı örneği (BOS): Herpes simpleks virus, enterovirus B, *Borrelia burgdorferi*, sitomegalovirus, *Treponema pallidum* ve bazı bakterilerin BOS'dan izolasyonunda moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. BOS 10 µl veya altında olduğunda amplifikasyonda doğrudan kullanılabilir. Ekstraksiyon yöntemi olarak standart fenol-kloroform yöntemi, etanol presipitasyonu, cam matriks kullanımı kullanılabilir.

Endoservikal sürüntü örneği: Özellikle *Chlamydia trachomatis*'in endoservikal örnekten izolasyonunda basit ve hızlı bir yöntem kullanılmaktadır. Deterjan içeren çözelti içine alınan sürüntü örneği laboratuarda ikinci bir deterjan ile karıştırılarak 5 dakika bekletilir. Örnek PCR için hazır hale gelmiş olur. Örneğin içerdđđ kan ve mukus genellikle yöntemi etkilememektedir.

SLAYTLAR

KLİNİK ÖRNEK TOPLAMA, İŞLEME, HÜCRE PARÇALAMA VE NÜKLEİK ASİT SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Özgen ESER, MD/PhD
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD



Uygun Örneklemeye Yönteminin Seçiminde Önemli Noktalar

NÜKLEİK ASİTLE İLİŞKİLİ

- ✓ RNA veya DNA
- ✓ Çift zincirli veya tek zincirli olması
- ✓ DNA kontaminasyonu olmaksızın RNA izolasyonu gereksinimi

Uygun Örneklemeye Yönteminin Seçiminde Önemli Noktalar

ÖRNEKLE İLİŞKİLİ

- ✓ Örnek tipi (kan, plazma, serum, BOS, idrar)
- ✓ Örnek prosesi
- ✓ Örnek hacmi
- ✓ Örneğin fiziksel özellikleri (sürüntü, sıvı, doku, viskozite)
- ✓ Amplifikasyon inhibitörlerinin varlığı

Uygun Örnek Hazırlama Yöntemi KRİTERLER

- ✓ Uygun klinik örneğin seçimi
- ✓ Yöntemin duyarlılığı
- ✓ Örneğin hacmi
- ✓ Çoğaltılacak hedef bölgenin etkinliği
- ✓ Örneğe uygulanacak farklı test sayısı
- ✓ Örneğin toplama ve işleme sırasında hedefin stabilizasyonu

Uygun Örneklemeye Yönteminin Seçiminde Önemli Noktalar

MİKROORGANİZMA İLE İLİŞKİLİ

- ✓ Örnekte bulunan bakteri yükü
- ✓ Lizise karşı hücre duvarının dayanıklılığı
- ✓ Mikroorganizmanın spontan lizise yatkınlığı
- ✓ Örnek hazırlama sırasında örneğin sterilizasyonu

Uygun Örnek Hazırlama Yöntemi KRİTERLER

- ✓ Toksik çözeltilerin uzaklaştırılması
- ✓ Santrifüjasyonun engellenmesi
- ✓ Amplifikasyon inhibitörlerinin uzaklaştırılması
- ✓ Örnek miktarının minimuma indirilmesi
- ✓ Özgül ekipman gerektiren işlemlerin olmaması

Nükleik asit eldesi

1. Nükleik asitin serbestleştirilmesi
2. Nükleik asitin dayanıklılığının sağlanması
3. İnhibitörlerin uzaklaştırılması
4. Yoğunlaştırma ve sıvı ortama yerleştirme

Enzimlerle Parçalama Yöntemleri

- ✓ Dış membranın geçirgenliğinin artırılması:
 - ✓ EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
 - ✓ Hücre duvarında bulunan magnezyum iyonlarını bağlar, ortamdan uzaklaştırır.
 - ✓ DNA'yı sindiren hücre enzimleri(DNAse) inhibe eder.
 - ✓ TRIS: Tampon görevi görür. pH ayarı yapar.
 - ✓ Membran stabilitesini bozar.
- ✓ Ortam ozmolaritesinin artırılması:
 - ✓ %10 süroz
 - ✓ Yumuşak bir şekilde hücreyi patlatır.
 - ✓ DNA ve organeller korunur.

Hücre Parçalama Yöntemleri

1. Enzimlerle parçalama yöntemleri
 - Hücre kimyasal maddelerle parçalanır
 - Bakteri hücre parçalamasında en çok tercih edilen yöntem
2. Fiziksel parçalama yöntemleri
 - Hücre mekanik güçlerle parçalanır

Enzimlerle Parçalama Yöntemleri

- İç membranın parçalanması:
 1. Dondurma-çözme: -80°C ve 37°C'de
 2. Kuru buzlu etanol banyosu
 3. Sonikasyon
 4. Deterjanlar: (orijinal kültür hacminin 1/10 kadarı)
 1. İyonik (SDS=Sodium dodecyl sulphate)
(%20 stok çözeltiden-100 ml'ye 20 g- %1 konsantrasyon olacak şekilde eklenir)
 2. Non iyonik (Triton X100)
Lipid molekülleri ayırıp hücrenin lizisine neden olur.

Enzimlerle Parçalama Yöntemleri

- Lizozim
 - ✓ Gram negatif (ör: *E.coli*)
 - ✓ Hücre duvarına sertlik veren polimerik bileşikler parçalar
 - ✓ Peptidoglikan tabakada muramik asit arası bağları kırar.
 - ✓ Yumurtada beyazında, göz yaşı/tükürükte.
 - ✓ pH: 4-10, optimum:6,7-8,6.
 - ✓ Soğukta iyi çalışır. Buz üzerinde çalışılmalıdır.
- Lizostafin
 - ✓ Gram pozitif bakteriler; stafilokoklar
 - ✓ Mantarlardan elde edilir.
 - ✓ Pahalıdır.

Fiziksel Parçalama Yöntemleri

1. Basınçla Patlatma (French pressure)
 - ✓ Pistonlu bir silindir kullanılır.
 - ✓ 10 ton basınç uygulanır.
 - ✓ Geniş alandan dar alana geçen hücreler kenarlara ve birbirlerine sürtünerek parçalanır.
2. Sonikasyon (ultrasonik ses dalgaları)
 - ✓ Sonikatör kullanılır.
 - ✓ Sıvıda kaviteasyonlar oluşur, çok hızlı hareket eden kabarcıklar hücreleri parçalar.
3. Cam boncukla parçalamak
 - ✓ Gram-pozitiflere etkili, gram-negatiflere zarar verir.
 - ✓ 100 µm cam boncuklar kullanılır.



Fiziksel Parçalama Yöntemleri

Avantajları:

- ✓ Kimyasallara gerek yoktur.
- ✓ Ekonomiktir.
- ✓ Büyük miktarlarda DNA elde edilebilir.
- ✓ Türler arasında yöntemin farkı yoktur.

Dezavantajları:

- ✓ Isı
- ✓ Oksidasyona neden olan köpürme
- ✓ Denatürasyon
- ✓ Önlemek için ortam soğutulabilir ve redüktan eklenebilir

DNA kantitasyonu

Spektrofotometrik okuma

DNA ve RNA ~ 260nm ve ~280nm



TE tamponu ile yapılmalıdır

Nükleik asitlerin saflığı A260/A280 oranı ile de saptanabilir.

DNA A260/A280 ~1.8

RNA A260/A280 ~2.0

Absorbsiyon oranlarının DNA miktarına çevrilmesi

260nm'de okunan değer 50µg/ml DNA,

260nm'de okunan değer 40µg/ml RNA ile çarpılır.

İnhibitörlerin Uzaklaştırılması

- Fenol
- Kloroform
- Proteaz (Pronaz veya proteinaz K)
- Nükleik asitlerin silika ya da manyetik boncuklara bağlanması
- Ribonükleaz

Nükleik asit saflaştırma yöntemleri

- Konvansiyonel yöntemler
- Ticari kitler
- Otomatize sistemler

DNA Presipitasyonu

- Amonyum Asetat
- Sodyum klorür
- Etanol
- İzopropanol
- Cam pastör pipeti
- Santrifüj



Konvansiyonel yöntemler

- Kaynatma yöntemi
- Fenol-kloroform yöntemi
- CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)

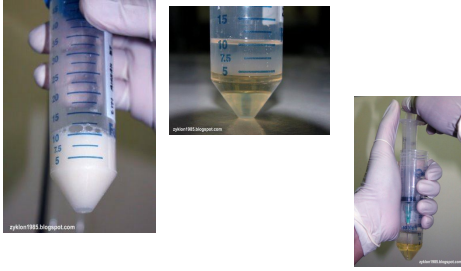
Kaynatma Yöntemi

1. Bir gece sıvı besiyerinde inkübasyon
2. 3000xg'de santrifüj
3. TE eklenmesi
4. Vorteks
5. 12000xg'de santrifüj ve üst sıvının uzaklaştırılması
6. 3-5 üç kez tekrar
7. TE eklenmesi.
8. Kaynatma-10-15 dakika
9. 12000xg'de 5 dakika santrifüj
10. Üst sıvının toplanması
11. -20°C'da saklama

CTAB Yöntemi-II (Cetyltrimethylammonium bromide)

6. Üst kısım temiz bir tüpe aktarılır, Fenol/kloroform/izoamilalkol (24:23:1) eşit hacimde eklenir. 5 dakika spin vorteks yapılır.
7. Üst kısım temiz bir tüpe aktarılır. 0.6 hacim izopropanol eklenir.
8. 10 dakika spin vorteks ile nükleik asit çöktürülüp %70 etanol ile yıkanır.
9. 5 dakika santrifüj sonrası çökelti 2.5 saat kurutulur.
10. 100 µl TE içinde çözündürülür
11. -20°C'da saklama

Fenol-kloroform yöntemi



Ticari Kitler

- IsoQuick nükleik asit izolasyon kiti(Orca)
- Puregene izolasyon kiti (Gentra)
- Master Pure ekstraksiyon kiti (EPICENTRE)
- QIAmp (QIAGEN)
- High Pure PCR saflaştırma kitleri (Roche)
- NucliSENS izolasyon kiti (BioMerieux)



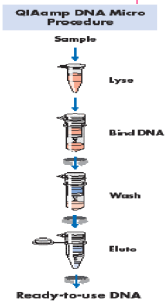
CTAB Yöntemi-I (Cetyltrimethylammonium bromide)

1. Bir plak yüzeyinde üreyen koloniler 400 µl TE içine alınır
2. 30 µl %10 SDS ve 3 µl 20mg/ml proteinaz K eklenir.
3. Bir gece inkübe edilir
3. 100 µl 5M NaCl eklenir ve vortekslenir.
4. 100 µl CTAB/NaCl eklenir. 65 °C'da 10 dakika inkübe edilir.
5. Eşit miktarda kloroform/izoamil alkol eklenir, 1600 rpm'de 4-5 dakika spin vorteks yapılır.

High Pure PCR saflaştırma kiti



1. Bir gece sıvı besiyerinde inkübasyon
2. Lizozim
3. Bağlama tamponu ve proteinaz K, 70°C
4. İzopropanol
5. Santrifüj, 1 dk 8000 rpm
6. İnhibitör uzaklaştırma tamponu
7. Santrifüj, 1 dk 8000 rpm
8. Yıkama tamponu, 2 kez
9. Santrifüj, 1 dk 8000 rpm
10. Elüsyon tamponu, 70 °C'da
11. Santrifüj, 1 dk 8000 rpm
12. -15/-25°C'da saklama.



Örnek hazırlamada otomasyon sistemleri

Tüp içindeki nükleik asitin vakum altında membran ya da silika ortama bağlanması prensibi ile çalışır.

ABI 6700

X-Tractor Gene

Nucleixs Extractor

BioRobot 9604

Sample
↓
Vacuum
↓
Vacuum
↓
Vacuum
↓
Vacuum
↓
Vacuum
↓
Vacuum



BioRobot EZ1/EZ1 DSP



BioRobot EZ1/EZ1 DSP

- Manyetik boncukla ayırım prensibi
- 1-6 örnek

Avantajları

- Kolay kullanımı
- Standart
- Hızlı ve güvenilir

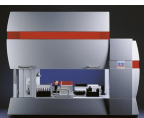
Uygulanım alanı

- RNA hücre ve dokuları
- RNA üniöersal doku
- gDNA kan ve doku
- Viral nükleik asit

Örnek hazırlamada otomasyon sistemleri



BioRobot EZ1 **BioRobot M48** **BioRobot MDx**



1 6 48 96 # örnek

Nükleik asitin manyetik boncuklara bağlanması prensibi ile çalışır



A B C D E F G H

BioRobot EZ1/EZ1 DSP





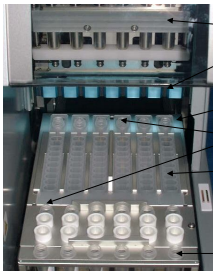
BioRobot EZ1

1. EZ1 program kartının yüklenmesi
2. Kartujların yüklenmesi
3. Disposable malzemenin yüklenmesi
4. Örneklerin yerleştirilmesi
5. Kapsımın kapatılıp "START" düğmesine basılması

The diagram shows the BioRobot EZ1 robot with the following labeled components:

- Power ON Blinking Red Lamp: Error
- Liquid Crystal Display
- Operation Panel
- EZiCard Inlet
- Door
- Using pre-filled and sealed Reagent Cartridges

BioRobot® EZ1



The image shows the BioRobot EZ1 liquid handling robot. It is a white, compact device with a transparent front panel. Inside, there are several components labeled with arrows: the syringe/nozzle unit at the top, the magnetic unit below it, the heating block in the center, the sample tips on the right, the reaction cards in the middle, and the elution tips at the bottom. The robot is designed for automated liquid handling in laboratory settings.

Labels and components:

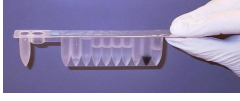
- Syringe/ Nozzle ünitesi
- Manyetik ünite
- Isı bloğu
- Örnek Tipleri
- Reaksiyon kartları
- Elüzyon tipleri



The Qiagen logo consists of a 4x6 grid of blue dots of varying shades, with the word "QIAGEN" in bold, black, sans-serif capital letters below it.

Kartuj ve Program Kartları

BioRobot EZ1



- Basit ve kolay
- Güvenli
- Hızlı



- Protokoller önceden programlanmış kartlarda hazır olarak mevcut
- Ek bir bilgisayara ihtiyaç yok

BioRobot M48 Pipetleme ve Manvetik Ayırım



BioRobot M48 Platform



BioRobot M48

- Manyetik boncukla ayırım prensibi
- Her test sırasında 6 - 48 örnek çalışabilmekte

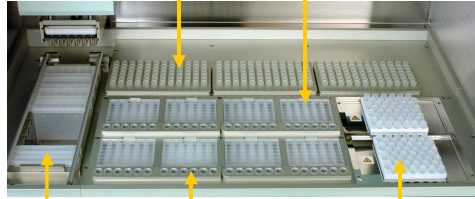
Avantajları

- Geniş protokol ve kit imkanı

Uygulama Aralığı

- RNA hücre ve dokuları
- RNA universal doku
- gDNA kan ve dokuları
- Viral nükleik asitler

BioRobot M48



Tampon yükleme kapları

Örnek tüpleri

Elüsyon tüpleri

BioRobot M48 Platform



Nükleik asit izolasyonu için gerekli süre

- 20 dakika/6 örnek
- 2.5 - 5 saat /48 örnek

Güvenlik özellikleri

- Filtreli uçlar
- UV sterilizasyon
- Hepa filtre
- Çapraz kontaminasyon olmaması

BioRobot M48 Kullanılabilir Kitler



BioRobot M48

[DNA Mini M48 kit](#)

[DNA Blood M48 kit](#)

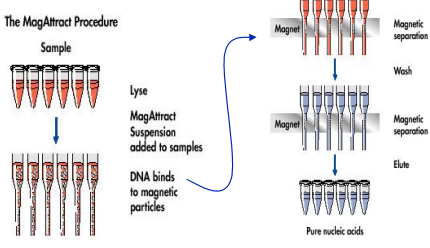
[RNA M48 kit](#)

[Virus Mini M48 kit](#)



The MagAttract Virus Mini M48 Procedure Bind, Wash, Elute

The MagAttract Procedure







Cobas AmpliPrep Cihazı



Cobas AmpliPrep

- Kolay örnek hazırlanımı

Avantajları

- Güvenilir
- Basit ve standardize
- 72 örnek çalışabilme kapasitesi
- 4 farklı test aynı anda çalışabilir
- Kalitatif ve kantitatif sonuç verebilme
- 6 basamaklı işlem

Uygulanım Aralığı

- RNA
- DNA
- Viral nükleik asit (plazma, serum, vücut sıvıları)



MagnaPure LC Cihazı



MagnaPure LC

- Nükleik asitin manyetik boncuklara bağlanması prensibi ile çalışır.

Avantajları

- Yüksek güvenilirlik
- Basit ve standardize
- 32 nükleik asit 50-180 dakikada
- 8 nükleik asit 20-40 dakikada izole edilebilir

Uygulanım Aralığı

- Viral bakteriyel, fungal total nükleik asit, DNA, RNA veya mRNA izolasyonu



MagnaPure Compact



BioRobot MDx



BioRobot MDx

- 96 örnek kapasiteli

Avantajları

- Güvenilir
- Basit ve standardize
- 2.5 saatte 96 örnek çalışabilme kapasitesi

Uygulanım Aralığı

- PAXgene RNA
- gDNA (tam kan)
- Viral nükleik asit (plazma, serum, vücut sıvıları)
- Real time PCR setup

REAL-TIME PCR PROBLARI VE FLORESAN KİMYASI

DOÇ. DR. ALPASLAN ALP

04 HAZİRAN 2012, 10:00-10:30

Real-time PCR yöntemi çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılabilmektedir. Real-time PCR yöntemini, daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır: Birincisi, real-time-PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise, PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemin bulunması gereğidir. Bu nedenle özellikle uygun prob seçimi, real-time PCR işleminin verimliliğini etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Probun işlevi, cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olan çoğaltma işleminin, gözle görülür hale getirilmesidir. Prob kullanılmadan da, PCR tüpü içerisinde uygun primerlerin, dNTP'lerin ve enzimin kullanımıyla PCR işlemi gerçekleşecektir. Ancak prob kullanılmadan sonucun real-time PCR cihazının bilgisayarında görüntülenmesi mümkün olmayacaktır.

Problar, florofor denen ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir. Genel olarak bakıldığında prob dizileri, PCR tüpü içerisinde çoğaltma işlemi gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef DNA zincirlerine bağlanarak floresan ışımaya oluşmasına neden olurlar. Bu işlemin gerçekleşebilmesi için problemler, hedef DNA'nın belirli bir dizisine komplementer olacak şekilde dizayn edilmelidirler. Prob, tek zincirli hedef DNA üzerinde komplementer olduğu bölgeye bağlandıktan sonra, real-time PCR cihazının ışık kaynağı, PCR tüpü içine uyarıcı kısa dalga boylu ışık gönderir. Kısa dalga boylu ışığın absorpsiyonu sonrasında, uzun dalga boylu ışık salınımı oluşur. Böylece gerçekleşen floresan ışımaya, cihaz tarafından algılanır. PCR tüpü içerisinde ne kadar çok hedef DNA varsa o kadar çok prob bağlanacak ve floresan ışımaya miktarı da o derecede fazla olacaktır.

Real-time PCR işlemi ile çoğaltılmış olan hedef dizilerin görüntülenebilmesi amacıyla kullanılan çeşitli problemler mevcuttur. Buradaki temel amaç, çoğaltılmış olan PCR ürünleriyle, kullanılan probun etkileşime girmesinin sağlanmasıdır.

Bunun sonucunda hedef DNA'ya floresan veren boyaların bağlanmasıyla DNA kantitasyonu mümkün olabilmektedir.

Real-time PCR yönteminde floresan kimyası, iki sınıf altında incelenebilir: Jenerik (genel) yöntemler ve zincire özgül yöntemler. Jenerik yöntemlerde DNA'ya özgül olmadan bağlanan proplar kullanılır. Bir başka deyişle bu yöntemde kullanılan proplar PCR tüpü içerisindeki her çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan oluşmasına neden olurlar. Zincire özgül yöntemlerde kullanılan proplar ise, primer bağlanma bölgeleri arasındaki hedef DNA'nın komplementer bir bölgesine bağlanarak floresan ışımaya neden olurlar. Bu yöntemlerin avantajı, primer-dimer bağlanması gibi özgül olmayan çoğaltma ürünlerinin floresan ışımayla sonuçlanmamasıdır. Bu nedenle özgüllükleri daha yüksektir ve daha iyi sinyal oluşumu sağlarlar.

DNA'ya Özgül Olmadan Bağlanan Boyalarla Jenerik Saptama

Bu yöntemde, çift zincirli DNA'ya özgül olmadan bağlanan özel boyalar prob görevi görürler. Bu amaçla en sık kullanılan boya molekülleri "SYBR Green I" ve "SYBR Gold"dur. Bu boyaların çift zincirli DNA arasına girerek bağlanması sonucunda 20-100 katlık bir floresan ışıma artışı olur ve bu ışıma real-time PCR cihazı tarafından algılanır.

Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR green" miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir. "SYBR green", yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan veren bir boyadır. Ancak floresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü ortamda hedef DNA bulunmadığı durumlarda "SYBR green", primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda bu yapılara katılarak floresan oluşumuna neden olabilmektedir. Böyle durumlarda elde edilen floresan ışımının istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Her çift sarmal DNA kendine özgü "melting temperature, T_m " (çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonu sonrasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresan miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başlayınca "SYBR green" boyası serbest kalır ve floresan miktarı azalmaya başlar. Erime eğrisinden yararlanılarak T_m

derecesi hesaplanır. Klinik örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak PCR sonucu elde edilen ürünün özgül ürün olup olmadığına karar verilir. Tm dereceleri aynı ise, aranan hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş demektir. Farklı Tm dereceleri saptanması durumunda, elde edilen amplifikasyonun özgül olmayan bir ürüne ait olduğu sonucuna varılır.

DNA'ya Özgül Olarak Bağlanan Problarla Saptama

Bu tür yöntemlerde prob, çoğaltılmış olan ürünün tamamına değil, ürün içindeki özgül bir bölgeye bağlanır. Bir başka deyişle, floresan ışımaya oluşması aslında tam olarak hedef bölgenin değil, hedef bölge içindeki proba komplementer dizinin varlığını göstermektedir. Böylece hedef bölgenin varlığı dolaylı yoldan gösterilmiş olmaktadır. Bu yöntemde problemlerin verimliliği çok önemlidir. Kullanılan problemler, çoğaltma işleminin başlangıç aşamasındaki az sayıdaki hedef bölge varlığını da saptayabilmelidir. Farklı şekilde işlev gören değişik problemler mevcuttur.

Özgül problemler kullanılarak real-time PCR ile amplifikasyonun saptanması (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer): Özgül problemlerden biri 3' ucundan floresan boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlidir. Bu tür problemlere dual hibridizasyon problemleri adı verilir ve uzunlukları 30 nükleotide kadar olabilir. Lineer hibridizasyon problemleri kullanılarak real-time PCR ile amplifikasyonun saptanması, direkt hibridizasyon esasına dayanır. Bağlanma sonrasında ikinci probun 5' ucundan sentez olmaması için bu uca bir fosfat bağlanmıştır. Problemler hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotid uzaklıkta) bağlanır ve işaretli uçlar yanyana gelmiş olur. İki boyanın yanyana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna neden olur. Oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine (PCR ile oluşan ürün miktarına) bağlı olarak artar. Her PCR döngüsünün düşük sıcaklık basamaklarında prob hedef DNA'ya bağlanarak ışımaya sağlar, yüksek sıcaklık basamaklarında hedeften ayrılır. Her döngüde, problemlerin bağlanabileceği hedef DNA miktarı arttığı için, sinyal miktarı da artar.

TaqMan problemleri kullanılarak real-time PCR ile amplifikasyonun saptanması (5' ekzonükleaz aktivitesi): Bu sistemde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanılır ("dual labelled probe"). Probun 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Prob, tek sarmal

hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturmaması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenir. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken nokta, ısımanın probun DNA'ya bağlanmasıyla oluşmadığı, probun kırılarak ayrılmasını sağlayan 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile oluştuğudur. Bu nedenle bu tür problara hidroliz probları adı verilir.

Gerek hibridizasyon probları kullanıldığında, gerekse hidroliz probları kullanıldığında, her PCR döngüsünde oluşan floresan ışıma miktarı artar. Ancak floresan sinyali oluşumu, hibridizasyon problarında hedef DNA'ya bağlanma sonucunda oluşurken, hidroliz problarında hedef DNA'dan ayrılma sonucunda oluşur. Hibridizasyon probları özellikle mutasyonların saptanmasına yönelik erime eğrisi analizi için uygunken, hidroliz probları erime eğrisi analizinde kullanılamazlar.

"Molecular beacon" ve diğer konformasyonel problar kullanılarak real-time PCR ile amplifikasyonun saptanması: *Konformasyonel problarla PCR ürününün saptanması, DNA'ya bağlandıktan sonra meydana gelen yapısal değişiklik sonucunda ışıma oluşması esasına dayanır. "Molecular beacon" yapıları, TaqMan problarından geliştirilmiştir. Bu nedenle kimyasal yapısı, 5' ve 3' uçlarında raportör ve baskılayıcı florokrom bulunması nedeniyle 5' nükleaz aktivitesinde kullanılan problara benzerdir. Ancak saptama aşaması, probun kırılmasıyla ısımanın oluşması esasına dayanmaz. Bu yapılar 5' ve 3' uçları bir firketenin iki ucunu oluşturacak şekilde, bükülmüş bir yapıda dizayn edilmişlerdir. Raportör ve baskılayıcı moleküllerin komşuluğunda birbirine komplementer diziler vardır. "Molecular beacon" yapısının komplementer olduğu hedef DNA'ya tam olarak bağlanabilmesi için, bu yapının doğrusal olarak açılması ve bu şekilde bağlanması gereklidir. Bu açılarak bağlanma sonucunda iki florokrom birbirinden uzaklaşır ve baskılayıcı etki ortadan kalacağı için ışıma oluşur.*

SLAYTLAR

REAL-TIME PCR PROBLARI ve FLORESAN KİMYASI

Doç.Dr. Alpaslan Alp
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

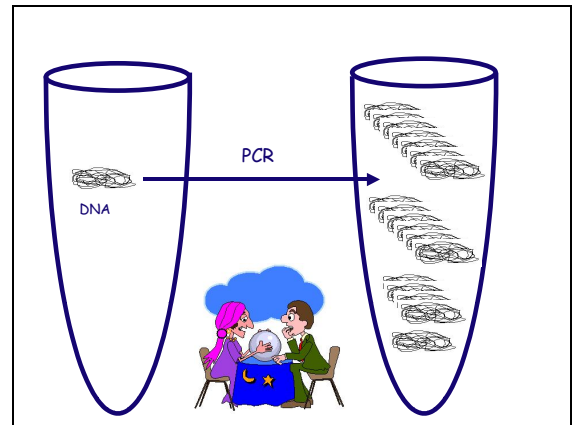
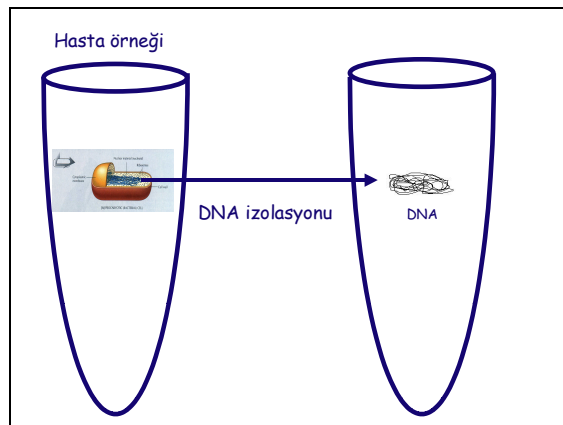
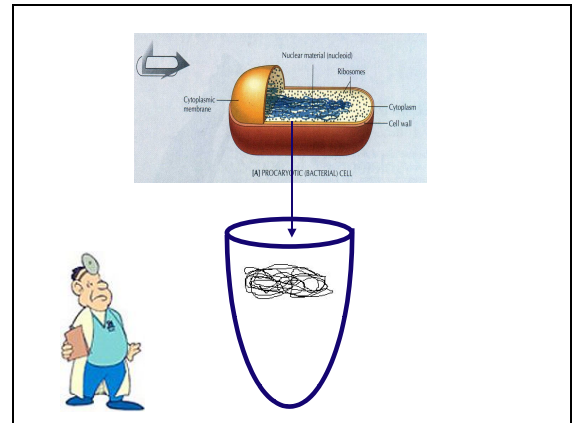
DNA İzolasyonu

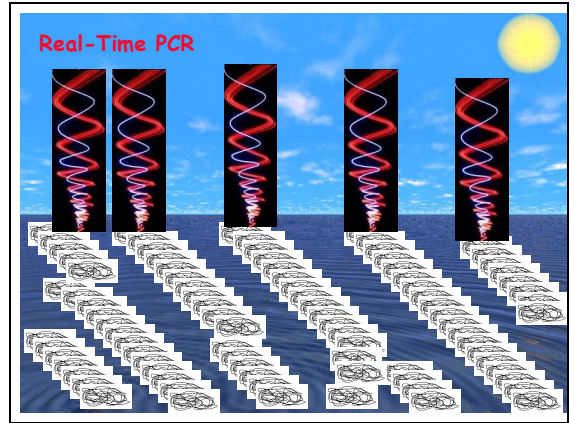
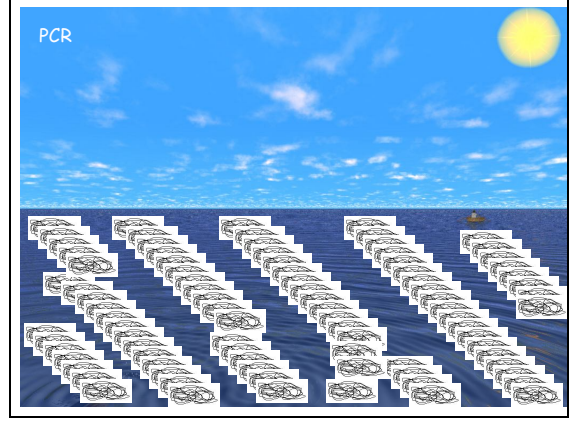
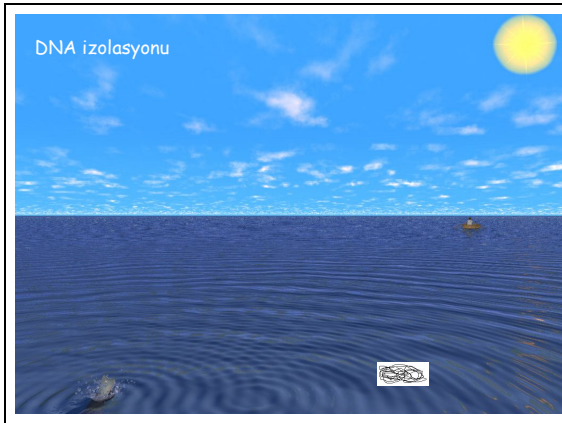
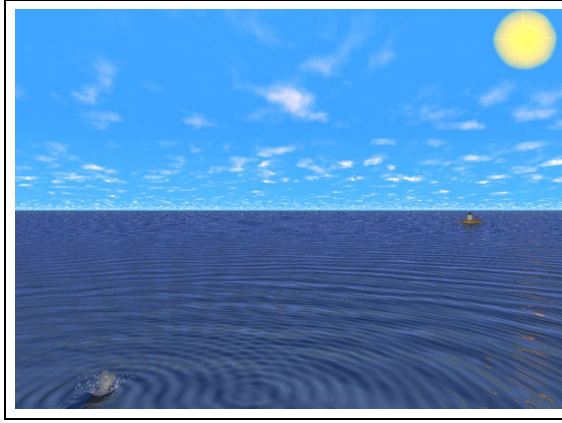
- Isı etkisiyle
- Kimyasal madde etkisiyle

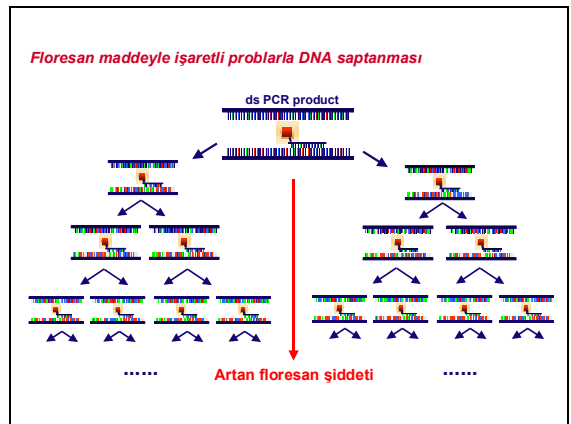
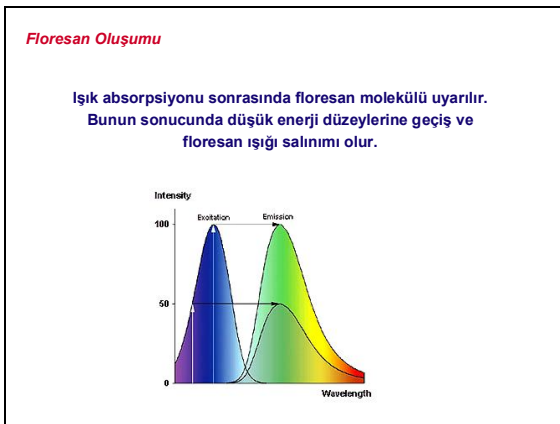
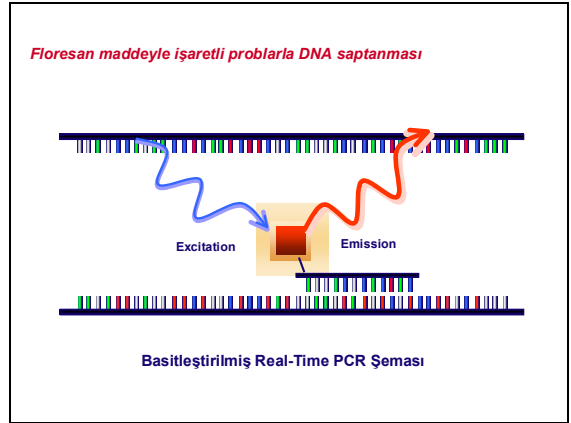
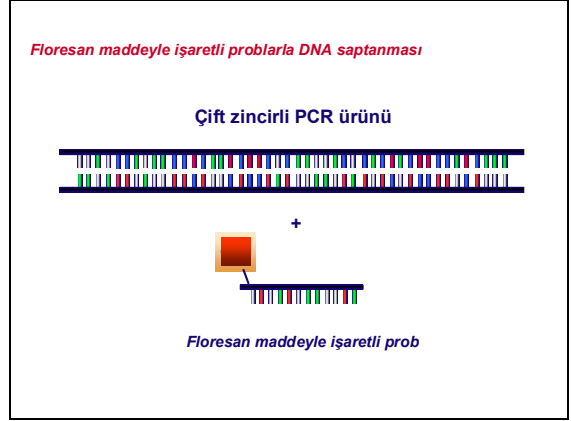
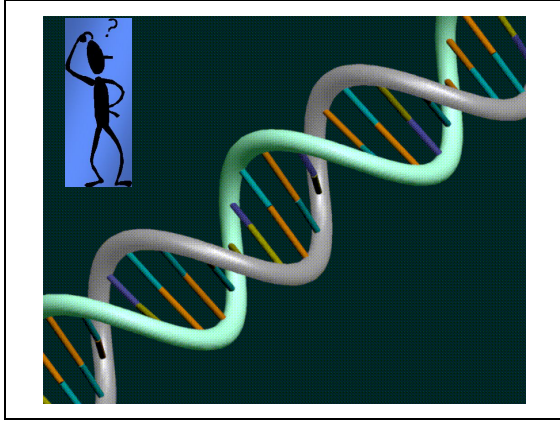


Real-Time PCR

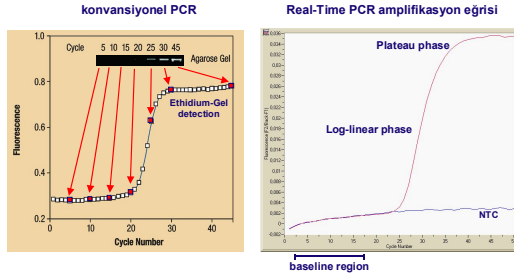
- Real-Time PCR, PCR sonucu oluşan nükleik asit ürünlerinin çift zincirli DNA arasına giren floresan bir boya ya da floresan ile işaretli probalar aracılığıyla reaksiyon sırasında izlenebilmesidir.
- Termal döngü cihazı ve florimetre aynı cihaz üzerinde bulunur.
- PCR ürünü ile floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır.







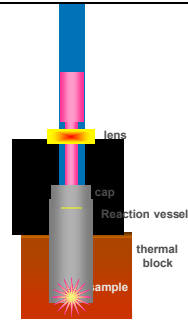
Real-Time PCR ile amplifikasyonun izlenmesi



Real Time PCR'da PCR Ürünü Saptanması

- I. 'SYBR green' boyası kullanılarak amplifikasyonun saptanması (diziye özgül değil)
- II. Özgül hibridizasyon problemleri kullanılarak amplifikasyonun saptanması (FRET: Fluorescence resonance energy transfer)
- III. Taqman problemleri kullanılarak amplifikasyonun saptanması

Real-Time PCR'da Floresan Işımanın Saptanması

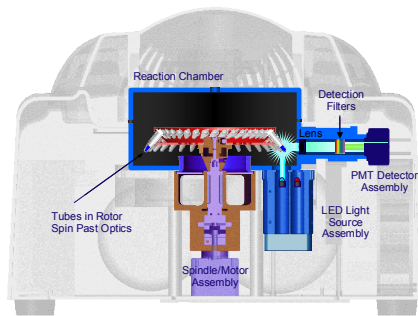


SYBR Green I

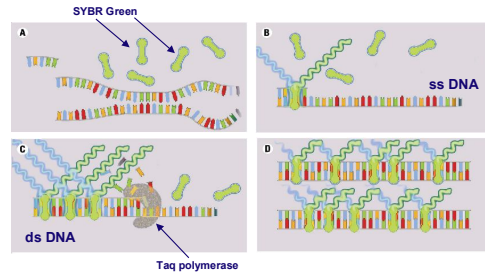
- ⊕ Jenerik, çift zincirli DNA arasına girince ışık veren boya



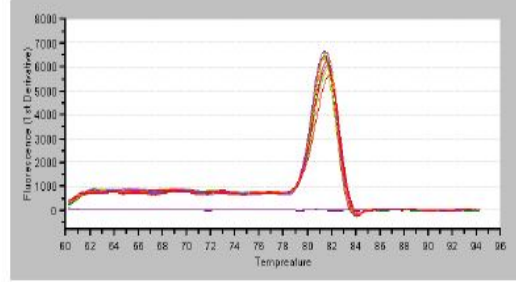
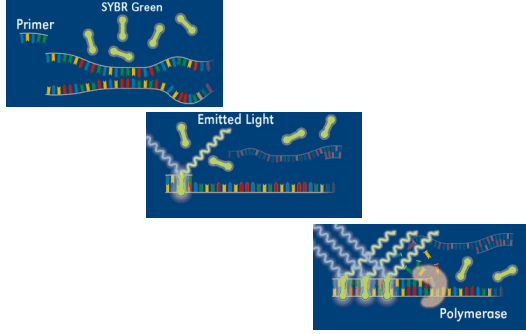
Real-time PCR cihazı kesiti



"SYBR Green" ile PCR ürünü saptanması



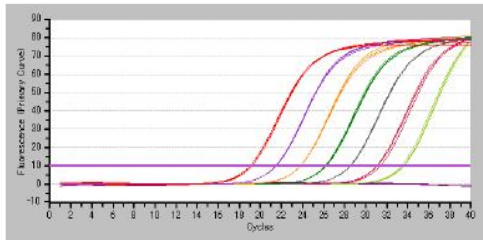
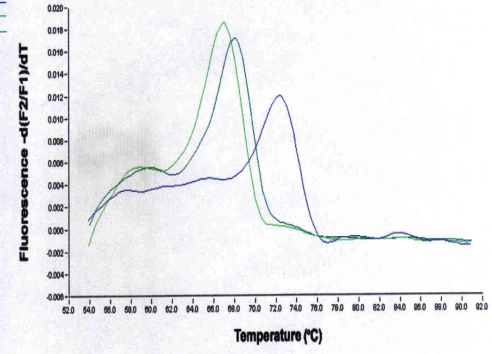
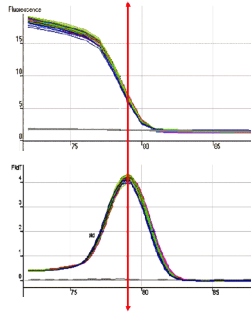
SYBR Green Boyası Kullanılarak Amplifikasyonun Saptanması



SYBR Green Boyası Kullanılarak Amplifikasyonun Saptanması

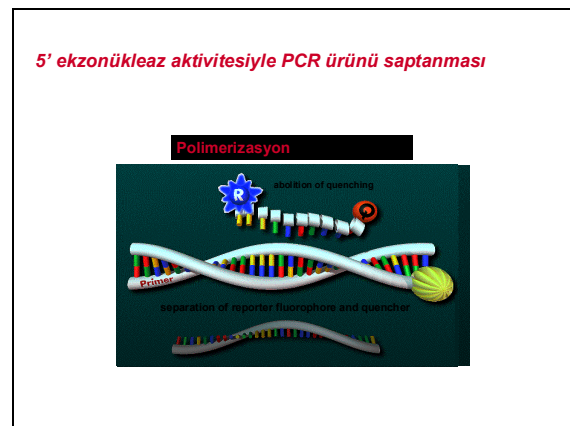
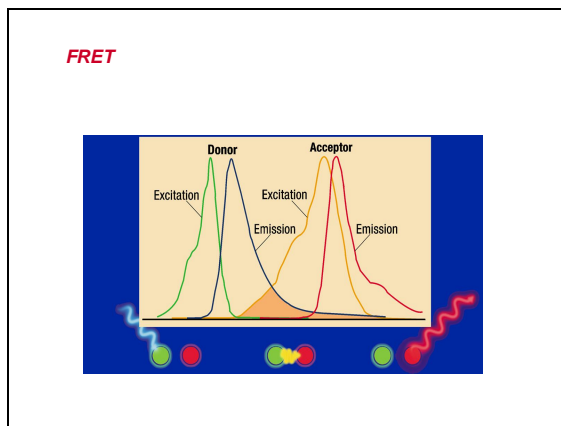
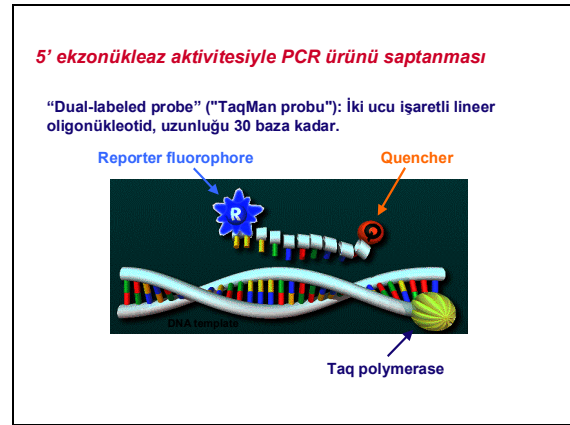
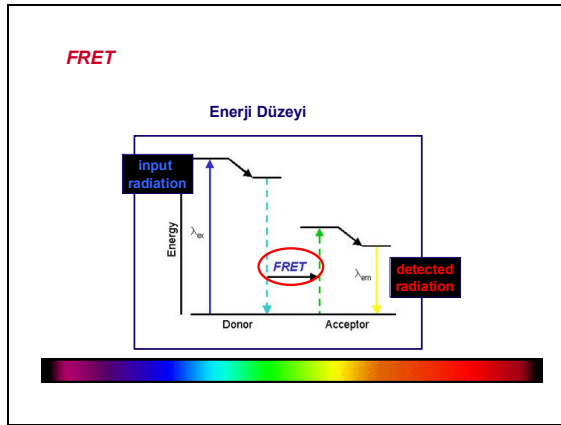
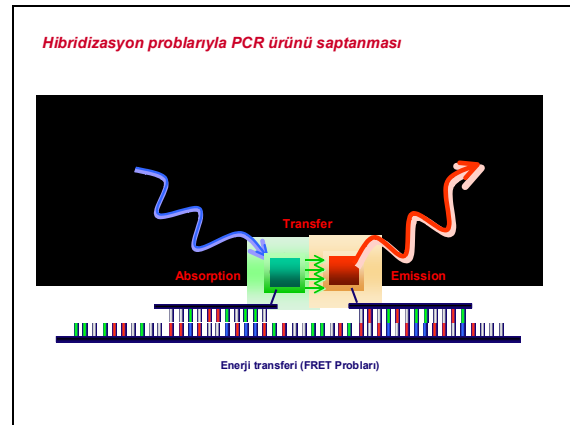
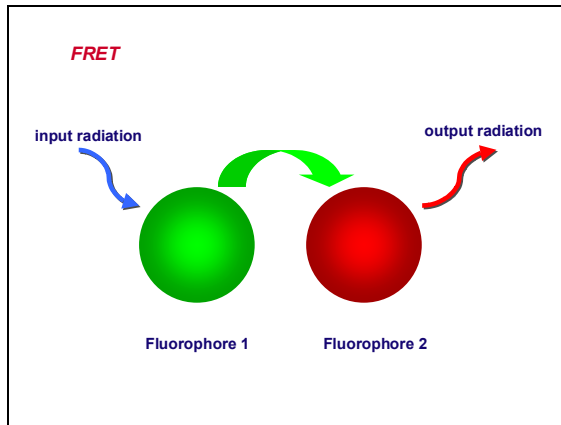
Ham veri
DNA eridikçe floresan azalır.

Derivatif veri
Eğrinin tepe noktası: T_m
(erime sıcaklığı)

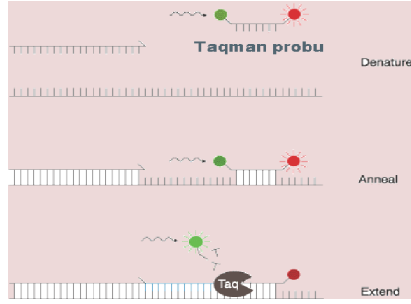


FRET : Floresan Rezonans Enerji Transferi

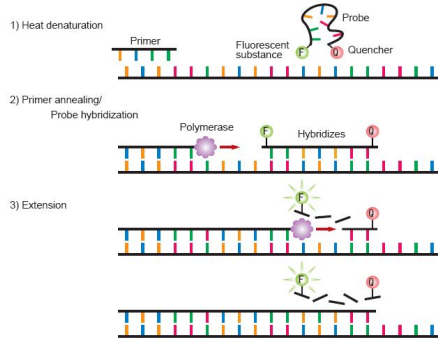
Işık enerjisinin verici florofoz molekülünden
alıcı florofoz molekülüne
transferi



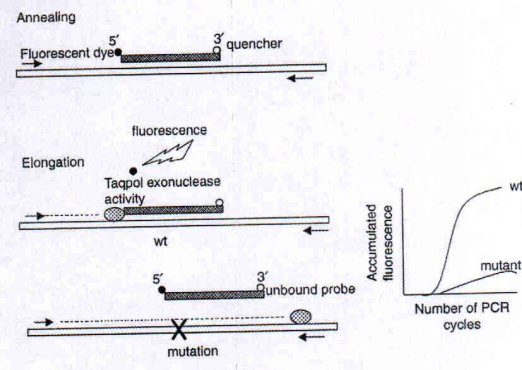
5' ekzonükleaz aktivitesiyle PCR ürünü saptanması



5' ekzonükleaz aktivitesiyle PCR ürünü saptanması



TaqMan probes



Hibridizasyon ve Hidroliz Problemlerinin Karşılaştırılması

1. Hibridizasyon Problemi



Her döngüde floresan ışımı artar
Sinyal **hibridizasyona bağlı**
Erime eğrisi analizi için ideal (mutasyon analizi)

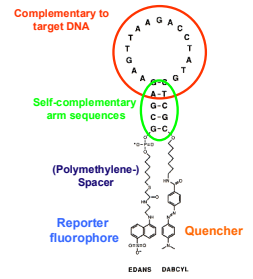
2. Hidroliz Problemi (TaqMan)



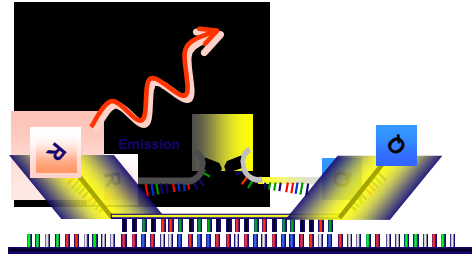
Her döngüde floresan ışımı artar
Sinyal hibridizasyon sonrasındaki **hidrolize bağlı**
Erime eğrisi analizi için uygun değil

"Molecular Beacons"

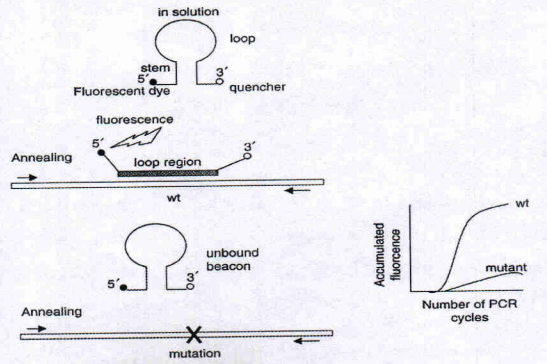
- ✓ TaqMan problemlerinden geliştirilmiş
- ✓ Farklı konfigürasyonu: raporör ve baskılayıcı moleküllerin komşuluğunda birbirine komplementer uçlar
- ✓ Multiplex PCR için uygun



"Molecular Beacons"



Molecular beacons



KANTİTATİF REAL-TIME PCR

DOÇ. DR. AHMET PINAR

04 HAZİRAN 2012, 11:00-11:30

Keşfedildiği 1985 yılından sonra çoğu araştırma laboratuvarının önemli bir yöntemi haline gelen PCR, 1990'lı yıllarda tanısıl amaçla da kullanılmaya başlandı. Yöntemin yüksek duyarlılığı nedeniyle kalitatif tanı koyma yeteneği oldukça üstündü. Öte yandan yüksek duyarlılık nedeniyle kontaminasyon sonucu yalancı pozitiflik oranlarının yüksekliği ve nükleik asit amplifikasyon yöntemi olduğu için ölü ve latent mikroorganizmaları da gösterme yeteneği, yöntemin dezavantajları olarak gündeme geldi.

Klinik örnekte bulunan mikroorganizma sayısının bilinmesi, izleyen örneklerde canlı ile ölü ve latent mikroorganizmaların ayrılması ve tedavinin izlenmesi, prognozun belirlenmesi gibi olanaklar sağlamaktadır. Klasik PCR yöntemiyle kantitasyon yapılması ilk önceleri bir "oksimoron" (zıt anlamlı kavramların birlikte kullanılması) olarak değerlendirilmiştir. Üslü nükleik asit çoğaltması yapan PCR, doğası gereği kantitasyon için uygun bir yöntem gibi görünmemiştir. Amplifikasyon etkinliğinin örnekler arasında çok küçük değişimler göstermesi, sonuçlarda çok büyük farklara neden olmaktadır. Herşeye rağmen 1991-1998 yılları arasında kantitatif PCR yayınlarında 10 kat artış olmuştur. Bunun nedeni PCR duyarlılığının en iyi hibridizasyon yöntemlerinden 5 kat fazla olması, dinamik aralığının da 10 kat fazla olmasıdır.

PCR sırasında üç ayrı faz görülür. Birinci faz birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün ortaya çıkmadığı arkaplan fazıdır. İkinci faz üslü çoğalma (log) fazıdır. Ürün miktarının saptanabilir en alt düzeye gelmesiyle başlar. Bu fazda ürünler üslü şekilde çoğalırlar. Üçüncü faz ise plato fazıdır. Bunun nedeni reaksiyon ortamında enzim, primer ve nükleotitlerin tükenmesi, ürünlerin birbiriyle eşleşerek yapışması, yüksek sıcaklıklar nedeniyle hidroliz ve egzonükleaz aktivitesi nedeniyle bir kısım ürünün kaybedilmesidir.

Konvansiyonel PCR ile kantitasyonda plato fazında elde edilen ürün miktarı standartlarla karşılaştırılarak ilk baştaki kopya sayısı tahmin edilmeye çalışılır ("end-point" kantitasyon). Bu nedenle örnekteki inhibitör miktarına, amplifikasyonun etkinliğine ve reaksiyon koşullarına bağımlı ve hatalara oldukça açık bir yöntemdir.

Daha doğru kantitasyon amacıyla PCR kinetiğini düzeltmek için iki yaklaşım vardır:

- 1- Kompetitif PCR: Kantitasyon yapılacak hedef ile aynı primer bağlanma bölgelerine sahip ve miktarı bilinen başka bir dizi de reaksiyona katılır. PCR tamamlandıktan sonra her iki ürünün miktarları karşılaştırılarak daha sağlıklı bir kantitasyon bilgisine ulaşılır. Aranılan hedefin ilk miktarı ile kompetitif dizinin ilk miktarı birbirine yakınsa daha doğru sonuçlara ulaşılır. Aradaki fark büyükse kantitasyonun doğruluğu azalır.
- 2- Real-time PCR: Bu yöntemle klasik PCR'in tersine amplifikasyonun log fazına göre kantitasyon yapmak mümkündür. Log faz kantitasyonun yararı, sonucun PCR döngüleri tamamlanmadan henüz log fazın başında yapılması, bu nedenle inhibitör miktarından, reaksiyon koşullarından ve amplifikasyon etkinliğinden daha az etkilenmesidir. Saptama yöntemi olarak oldukça duyarlı floresan sinyalinin kullanılması bir diğer avantajıdır.

Kantitasyon Hesaplamaları:

Üslü çoğalma (log) fazında amplifikasyon kinetiği şu denkleme uygun olarak ilerler:

$$T_n = T_0(E)^n$$

Burada T_n n döngüsünde hedef dizinin ulaştığı miktarı, T_0 hedefin ilk baştaki miktarını ve E amplifikasyon etkinliğini göstermektedir. PCR etkinliği en fazla 2 olabilir. Bu durumda her döngüde ürünlerin iki katına çıktığı anlaşılır. En az 1 olabilir. Bu durumda döngülerde hiç ürün artışı olmadığı, yani amplifikasyon olmadığı anlaşılır. Kısa ürünler veren reaksiyonlarda etkinlik 2'ye yaklaşır. Uzun ürünlerde etkinlik düşer.

Real-time PCR'da her döngü sonunda floresan ölçümü yapıldığından PCR döngüleri bittiğinde amplifikasyonun log fazı kolayca anlaşılır. Log fazı sırasında reaksiyonun başındaki kalıp sayısının $\log_{10}$ değeri ile ürünlerin belli bir eşik değerini aştığı döngü sayısı arasında doğrusal bir ilişki vardır. Başlangıçta içerdiği hedef sayısı bilinen standartlar çalışılarak bu doğrusal ilişki yardımıyla "standart eğri" çizilir.

Standart eğrinin çizilmesi: Eşik değer, başlangıçta farklı sayıda hedef dizi içeren amplifikasyonların hepsinin aynı sayıda ürün içerdiği noktadır. Dolayısıyla başlangıçta az sayıda hedef içerenler daha çok döngü ile eşik değere ulaşırken, daha çok sayıda hedef içerenler daha az döngüyle eşik değere ulaşırlar. Eğer eşik

değerdeki PCR ürün sayısına K ve buraya ulaşmak için gereken döngü sayısına C_p dersek yukarıdaki denkleme göre:

$$K = T_0(E)^{C_p}$$

Bunun doğrusal gösterimi için:

$$\log K = \log T_0 + C_p \cdot \log E$$

Başlangıçtaki hedef miktarını (T_0) bildiğimizden ve eşik değere ulaşmak için geçen döngü sayısını (C_p) ölçtüğümüzden dolayı denklemini şu şekilde yazabiliriz:

$$C_p = - (1/\log E) \cdot \log T_0 + (\log K / \log E)$$

Bu denklem standart eğri denklemdir. Başlangıçtaki hedef miktarının logaritması yatay eksen, eşik değerin aşıldığı döngü sayısı dikey eksen üzerinde gösterilir. Eğrinin eğimi PCR etkinliğini göstermektedir.

Standartlarla çizilen bu eğri üzerindeki pozisyonuna göre bilinmeyen örnekte başlangıçta bulunan hedef miktarı saptanabilir.

Eşik değerin belirlenmesi: Eşik değeri log fazda geçen amplifikasyonda ölçülebilen en düşük floresan değeri olmalıdır. Amplifikasyon eğrisinin doğrusal artış fazına geçtiği en alt sınır, eşik değeri olarak kabul edilir. Bu amaçla doğrusal izdüşümler alınarak eşik değeri saptanabilir. Kullanımda olan yeni real-time cihazlarında bu eşik değeri otomatik olarak belirlenmektedir.

Standart ve Kontroller

İnhibisyon Kontrolleri: Örneklerden gelen inhibitörler yoğun miktarda olduklarında kantitasyon sonuçlarını etkilerler. Az miktarda inhibitör bulunması real-time kantitasyonu etkilemez. Bunun nedeni real-time kantitasyonun log faz analizi ile yapılması ve log fazı başında belirlenmiş eşik değeri nedeniyle reaksiyon tüpü içinde henüz inhibitörlerin etkisini göstermeyecek kadar çok enzim, nükleotit, vb. bulunmasıdır. Her ne olursa olsun klinik sonuç verilecek kantitasyonlarda inhibisyon kontrolü yapılmalıdır. Bu amaçla iki tür kontrol kullanılır:

1- Eksternal kontroller

Bunlar hedeflenen dizi ile aynı koşullarda amplifiye olan dizilerdir. Bilinmeyen örneğin eklendiği tüpe ek olarak bir başka tüpe örnek ile birlikte bu eksternal kontrol dizileri de eklenir. Aranan hedef dizi ile eksternal kontrol dizilerinin aynı olması durumunda kontaminasyonun farkedilmesi mümkün değildir. Bu nedenle eksternal kontrollerin aranan hedef dizide insersiyon, delesyon ya da ufak dizi değişiklikleri oluşturularak tasarlanması daha mantıklı bir yaklaşım olacaktır. Eksternal kontrollerin avantajı örneğin

çalışıldığı reaksiyonun koşullarını değiştirmemesidir. Dezavantajı ise her örnek için iki reaksiyona gereksinim duyulmasıdır.

2- İnternal kontroller

İnternal kontroller örneğin çalışıldığı reaksiyon tüpüne eklenen, aynı koşullarda amplifiye olan, fakat aranan hedeften farklı dizilerdir. Amplifikasyondan sonra iki farklı ürün, farklı problemlerle saptanır. Burada dikkat edilecek nokta internal kontrolün saptanabilecek en az miktarda olmasıdır. Aksi durumda aranan hedefle etkileşime girerek onun amplifikasyonunu baskılayabilir. Aynı durum aranan hedef miktarının çok olması durumunda internal kontrol için de geçerlidir. Ancak bu durumda aranan hedef amplifiye olacağından internal kontrolün amplifikasyonuna gerek kalmaz.

Eksternal Kantitasyon Kontrolleri: Kantitasyonun sağlıklı yapılabilmesi ve standart eğrinin çizilebilmesi için ne kadar hedef içerdiği baştan bilinen eksternal kantitasyon kontrollerine gerek vardır. Bu kontrollerin dizileri aranan hedef bölgeyle aynı olmak durumundadır. Ancak bir kontaminasyon durumunu ayırtabilmek için özellikle probun bağlanma bölgesinde küçük dizi modifikasyonları yapılabilir.

Real-time ile kantitasyonun doğruluğu çizilen standart eğrinin kalitesine bağlıdır. Çalışılan standartlardaki kopya sayısı, klinik örneklerde beklenen kopya sayısını içerecek dağılımda olmalıdır. Standart eğrinin yukarı ya da aşağı uzatılması sonuçların yanlış verilmesine neden olabilir. Çalışılan standartların içerdikleri kopya sayıları arasındaki fark $\log_{10}$ 'u aşmamalıdır. Sağlıklı bir standart eğri en az 4 standart kullanılarak çizilebilir.

Her çalışmada 4 standart da çalışmak pratik ve ekonomik olmayabilir. Belli aralıklarla standartların çalışılması ve standart eğri çizilmesi, her çalışmada ise bir tek standart çalışarak varyasyonların denetlenmesi daha pratik olabilir.

Problar

Kantitatif real-time PCR SYBR Green I gibi çift zincirli DNA'ya bağlanan boya ile da uygulanabilir. Ancak boya artefaktları kopya sayısı gibi algılandığından sonuçlar doğru olmayabilir. Bu sorun işaretli problemler ile çözülmüştür.

Çift zincirli DNA boya ile yapılan kantitasyonun avantajı sinyalin çok yüksek olmasıdır. Dolayısıyla sinyal/arkaplan gürültüsü oranı yüksektir. Bu da sonuçların daha doğru alınmasını sağlar. Kantitasyonda kullanılan prob

sistemlerinin de bu yüzden yüksek sinyal üretecek şekilde tasarlanması gereklidir (Bkz. Real-time PCR problemleri ve floresan kimyası).

Kantitasyon için kullanılacak problemlerin tasarımı sırasında dikkat edilecek noktalar şunlardır:

- 1- Problemlerin bağlanacakları bölgenin primerlerden uzakta olması tercih edilmelidir. Primer bölgesinden amplifikasyon başladığı sırada probun bağlanacağı hedef bölgesi kapatılabilir.
- 2- Problemlerin T_m değerleri primerlerin T_m değerlerinden 5-10°C yüksek olmalıdır. Eğer problemlerle primerlerin bağlanma değerleri aynı olursa primerler problemlerden daha hızlı bir bağlanma gösterirler.
- 3- Problemlerin T_m değerleri "annealing" değerinden yüksek olmak zorundadır. Sinyal "annealing" sırasında okunduğundan daha önce probun bağlanması gereklidir.
- 4- Problemlerin T_m değerleri primerlerden başlayan yeni DNA sentezi (amplifikasyon) sıcaklığını aşmamalıdır. Bağlı kalan problemler sentezi engelleyebilir.

Dinamik Ara (Dynamic Range)

Real-time yöntemiyle oldukça geniş bir aralıkta doğru kantitasyon yapılabilir. Saptanabilen üst sınır PCR ürün birikimi başlamadan önce saptanan floresan düzeyine bağlıdır. Çok yüksek miktarda bulunan hedef DNA, prob bağlayarak yüksek floresan sinyaline neden olduğu için kantitasyon güvenilir olmayabilir. Saptanabilen alt sınır ise PCR duyarlılığına bağlıdır. PCR duyarlılığı nested-PCR yöntemiyle pre-amplifikasyon uygulanarak artırılabilir. Bu ön amplifikasyon log fazı aşmayacak şekilde sınırlı sayıda döngü ile uygulanmalıdır. Hangi yöntemle olursa olsun çok düşük hedef sayıları, klinik örnek varyasyonları nedeniyle güvenilir kantitasyon yapılmasına izin vermez.

Doğruluk (Accuracy)

Real-time kantitasyonda iki ana hata kaynağı vardır:

- 1- Eşik değeri: Burada hatalar sinyal/arkaplan gürültü oranına bağlıdır. Arkaplan gürültü arttığında eşik değeri amplifikasyon eğrisinin üst kısımlarına yükseltilir. Bu da güvenilir kantitasyonu riske atar. Bu hataları en aza indirmek için yüksek sinyal üreten problemlerle çalışılması gereklidir.

- 2- Klinik örnek varyasyonları: Klinik örnekten kaynaklanan nedenlerle eşik değerin bir döngü sonra ya da önce aşılması kantitasyonda iki kat yukarı ya da aşağı sonuçların alınmasına neden olur.

Hatalar örneklerin tekrar tekrar çalışılmasıyla fark edilebilir. Aynı örneğin minimum 3 kez çalışılmasıyla hatalar saptanabilir. Aynı hastaya ait tekrarlayan örneklerdeki sonuçların takip edilmesi, yöntem hatalarının fark edilmesi için iyi bir yoldur.

Sonuç olarak günümüzde real-time ile kantitasyon özellikle bazı virus enfeksiyonlarının tanısı, tedavisi ve prognozunu belirlemede çok önemli görevler üstlenmiştir. Hastalığın ilk tanısında viral yükün ne olduğu, verilen tedaviye yanıtın ne olduğu, relaps ve reinfeksiyonların izlenmesi ve viral yüke göre prognoz tahmin edilmesi konularında bize eşsiz bilgiler sağlamaktadır. Daha iyi bir yöntem bulununcaya kadar real-time kantitasyon yöntemi yaygın kullanım alanı bulmaya devam edecektir.



REAL-TIME PCR KURSU

Kantitatif Real-time PCR

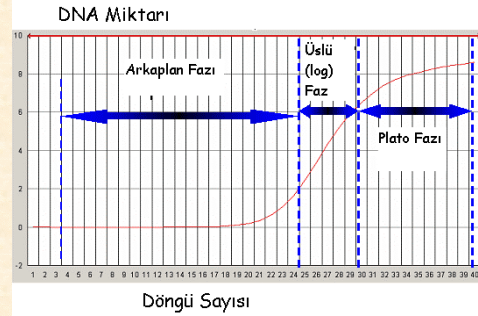
04 Haziran 2012

11:00 – 11:30

Doç. Dr. Ahmet PINAR



PCR Fazları



Kantitasyon Neden Gerekli?

- Özellikle virus enfeksiyonlarında çok önemli bir parametre.
- Enfeksiyonun başlangıcında belirlenen virus yükü prognoz hakkında bilgi verebilir.
- Tedavi verilen hastalarda tedaviye yanıt izlenebilir.
- Reinfeksiyonlar ve alevlenmeler takip edilebilir.



Konvansiyonel PCR

"End-point" Kantitasyon

- Plato fazındaki ürün miktarı standartlarla karşılaştırılarak ilk baştaki kopya sayısı tahmin edilir.
- Örnekteki inhibitör miktarına, amplifikasyon etkinliğine ve reaksiyon koşullarına bağlıdır.



Kantitasyon nasıl yapılır?

- **Kültür yöntemleriyle**
 - Kültürü yapılamayan mikroorganizmalar?
- **Hibridizasyon yöntemleriyle**
 - Duyarlılığı düşük, dinamik aralığı dar.
- **PCR yöntemiyle**
 - En iyi hibridizasyon yöntemine göre 5 kat daha iyi duyarlılığa sahip. Dinamik aralığı daha geniş.



Çözüm

•Kompetitif PCR

- Kantitasyon yapılacak hedef ile aynı primer bağlanma bölgelerine sahip ve miktarı bilinen başka bir dizi de reaksiyona katılır.
- PCR tamamlandıktan sonra her iki ürünün miktarları karşılaştırılarak kantitasyon yapılır.

•Real-time PCR

- "Log faz" kantitasyon

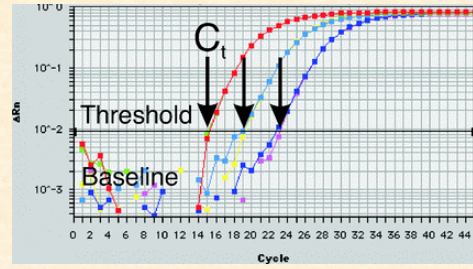


“Log faz” Kantitasyon

- Kantitasyon log fazın başında yapılır.
- Örnekteki inhibitör miktarından, reaksiyon koşullarından ve amplifikasyon etkinliğinden daha az etkilenir.
- Kapalı sistem içinde floresan yardımıyla oldukça duyarlı saptama yapılır.



Standart Eğri Çizilmesi



Kantitasyon Hesaplamaları

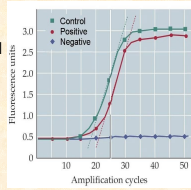
Log fazında amplifikasyon kinetiği denklemi:

$$T_n = T_0(E)^n$$

T_n : n döngüsünde hedef dizinin ulaştığı miktar

T_0 : hedefin ilk baştaki miktarı

E : amplifikasyon etkinliği



Standart Eğri Çizilmesi

Standart eğri çiziminde kullanılan denklem:

$$K = T_0(E)^{C_p}$$

K : eşik değerdeki PCR ürün sayısı

C_p : eşik değere ulaşmak için gereken döngü sayısı

Doğrusal gösterim için:

$$\log K = \log T_0 + C_p \cdot \log E$$



Standart Eğri Çizilmesi

- Log fazı sırasında reaksiyonun başındaki hedef sayısının $\log_{10}$ değeri ile ürünlerin belli bir eşik değeri aştığı döngü sayısı arasında doğrusal bir ilişki vardır.
- Eşik değer başlangıçta farklı sayıda hedef içeren amplifikasyonların hepsinin aynı sayıda ürün içerdiği noktadır.



Standart Eğri Çizilmesi

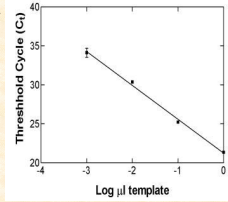
- Reaksiyonda hedef miktarını bildiğimiz standartlar kullandığımızdan T_0 değerini biliyoruz.
- Eşik değere ulaşmak için gereken döngü sayısını (C_p değeri) cihazda ölçüyoruz.

$$C_p = - (1/\log E) \cdot \log T_0 + (\log K / \log E)$$



Standart Eğri Çizilmesi

- Başlangıçtaki hedef miktarının logaritması yatay eksen, eşik değerin aşıldığı döngü sayısı dikey eksende gösterilerek standart eğri grafiği çizilir.

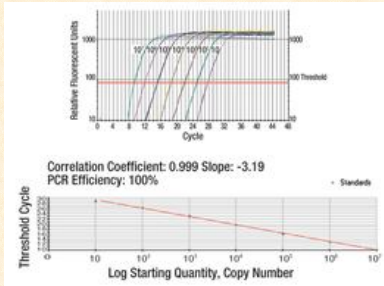


Standart ve Kontroller

- İnhibisyon Kontrolleri:
 - Eksternal Kontroller:
 - Hedeflenen dizi ile aynı koşullarda amplifiye olur.
 - Bilinmeyen örnekle birlikte farklı tüpte amplifiye edilir.
 - Avantajı: Sadece örneğin çalışıldığı tüpte reaksiyon koşullarını etkilemez.
 - Dezavantajı: Her örnek için iki ayrı tüpte çalışılması gerekir.



Standart Eğri Çizilmesi



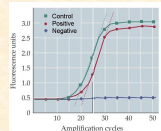
Standart ve Kontroller

- İnhibisyon Kontrolleri:
 - İnternal Kontroller
 - Örnekle aynı tüpe eklenen, aynı koşullarda amplifiye olan, ancak farklı dizilere sahip kontroller.
 - Amplifikasyon sonrası iki farklı ürün farklı problemlerle saptanır.
 - Avantajı: Tek tüpte hem arana hedef hem de kontrol amplifiye edilir.
 - Dezavantajı: Reaksiyon koşullarını etkileyebilir.



Eşik Değerin Belirlenmesi

- Eşik değeri log faza geçen amplifikasyonda ölçülebilen en düşük floresan değeri olmalıdır.
- Amplifikasyon eğrisinin doğrusal artış fazına geçtiği en alt sınır, eşik değeri olarak kabul edilir.
- Cihazların çoğu eşik değeri otomatik olarak belirlemektedir.

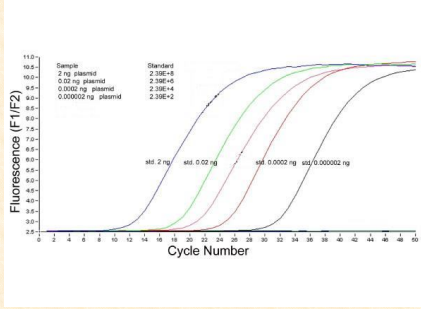


Standart ve Kontroller

- Kantitasyon Kontrolleri (Standartlar):
 - İçindeki hedef miktarı bilinen standartlardır.
 - Aranan hedef ile aynı diziye sahiptir.
 - Standartlardaki kopya sayıları, klinik örneklerde beklenen kopya sayısını içerecek dağılımda olmalıdır.
 - Standartların içerdikleri kopya sayıları arasındaki fark $\log_{10}$ 'u aşmamalıdır.
 - Standart eğri en az 4 standart ile çizilmelidir.



Kantitasyon Standartları



Kantitasyon Probu Tasarlanırken Dikkat Edilecek Noktalar

- 3-Probaların T_m değerleri “annealing” değerinden yüksek olmak zorundadır. Sinyal “annealing” sırasında okunduğundan daha önce probun bağlanması gereklidir.
- 4-Probaların T_m değerleri primerlerden başlayan yeni DNA sentezi (amplifikasyon) sıcaklığını aşmamalıdır. Bağlı kalan probalar sentezi engelleyebilir.



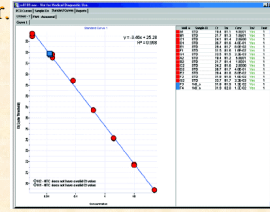
Problar

- Kantitasyonda ana sorun sinyal miktarı ile arakaplan floresan gürültü miktarı oranının düşük olması durumunda ortaya çıkar.
- Çift zincirli DNA boyaları ile uygulanan kantitasyonda bu oran yüksektir, ancak boya artefaktları da kopya sayısı olarak algılanır.
- Bu sorun yüksek sinyal miktarına sahip problemlerle çözülmüştür.



Dinamik Ara (Dynamic Range)

Sağlıklı kantitasyon yapılabilen hedef aralığını belirlemektedir. Real-time PCR’da geniş bir dinamik arada kantitasyon yapılabilir.



Kantitasyon Probu Tasarlanırken Dikkat Edilecek Noktalar

- 1-Probaların bağlanacakları bölgenin primerlerden uzakta olması tercih edilmelidir. Primer bölgesinden amplifikasyon başladığı sırada probun bağlanacağı hedef bölgesi kapatılabilir.
- 2-Probaların T_m değerleri primerlerin T_m değerlerinden 5-10°C yüksek olmalıdır. Eğer problemler primerlerin bağlanma değerleri aynı olursa primerler problemlerden daha hızlı bir bağlanma gösterirler.



Sınırlar

- 1- Kantitasyonla saptanabilen üst sınır log faza geçilmeden önce saptanan arkaplan floresan miktarına bağlıdır. Çok yüksek miktarda bulunan hedef DNA, prob bağlayarak yüksek floresan sinyaline neden olduğu için kantitasyon güvenilir olmayabilir.



Sınırlar

2-Saptanabilen alt sınır PCR duyarlılığına bağlıdır. PCR duyarlılığı nested-PCR yöntemiyle pre-amplifikasyon uygulanarak artırılabilir. Bu ön amplifikasyon log fazı aşmayacak şekilde sınırlı sayıda döngü ile uygulanmalıdır. Hangi yöntemle olursa olsun çok düşük hedef sayıları, klinik örnek varyasyonları nedeniyle güvenilir kantitasyon yapılmasına izin vermez.



Doğruluk (Accuracy)

Aynı örneğin minimum 3 kez çalışılmasıyla hatalar saptanabilir. Aynı hastaya ait tekrarlayan örneklerdeki sonuçların takip edilmesi, yöntem hatalarının fark edilmesi için iyi bir yoldur.



Doğruluk (Accuracy)

Real-time kantitasyonda iki ana hata kaynağı vardır:

1-Eşik değeri: Burada hatalar sinyal/arkaplan gürültü oranına bağlıdır. Arkaplan gürültü arttığında eşik değeri amplifikasyon eğrisinin üst kısımlarına yükseltilir. Bu da güvenilir kantitasyonu riske atar.



SONUÇ

Daha iyi bir yöntem bulununcaya kadar real-time kantitasyon yöntemi yaygın kullanım alanı bulmaya devam edecektir.



Doğruluk (Accuracy)

2-Klinik örnek varyasyonları: Klinik örnekten kaynaklanan nedenlerle eşik değeri bir döngü sonra ya da önce aşılması kantitasyonda iki kat yukarı ya da aşağı sonuçların alınmasına neden olur.

İÇ VE DIŞ KALİTE KONTROLLERİ

DOÇ. DR. KORAY ERGÜNAY

04 HAZİRAN 2012, 11:30-12:00

Moleküler yöntemlerin sorunları – Yalancı pozitiflik ve negatiflik

Tüm moleküler tanı testlerinde olduğu gibi Gerçek Zamanlı (Real-time, GZ) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli testlerde de yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlar, testin güvenilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Moleküler testlerdeki yalancı pozitiflikler testlerin sahip olduğu yüksek duyarlılığının olumsuz bir sonucu olup çoğu kez amplifikasyon ürünleri ya da başlangıç örnekleri ile kontaminasyona bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Moleküler test uygulamaları için önerilen standart kural ve bazı önlemler ile (saflaştırma, çoğaltma ve saptama basamaklarının fiziksel olarak ayrılması, bariyerli pipet ucu kullanma, eldiven/önlük vb. kişisel koruyucular, UV, urasil glikozilaz sistemi vb.) yalancı pozitiflikler en aza indirilebilmektedir. Gerçek zamanlı PZR, çoğaltım ve analiz basamaklarını birleştiren kapalı bir sistem olmasının avantajı ile standart koşullarda yüksek duyarlılık ve daha düşük kontaminasyon riski taşıyan bir yöntemdir. Otomatize saflaştırma yöntemlerinin tanısız moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygınlık kazanması da kontaminasyon ve yalancı pozitifliğin önlenmesinde katkıda bulunmaktadır. Buna karşın gerekli önlem ve uygulamaların aksaması durumunda GZ-PZR testlerinde de yalancı pozitiflik önemli bir sorun olarak ortaya çıkabilmektedir.

Moleküler tanı testlerinde yalancı negatiflik de hem varlığının saptanması hem de en aza indirilmesi gereken bir sorundur. Yalancı negatiflik sebepleri arasında teknik ve/veya cihaz hataları, uygun olmayan örnek alımı/saklanması/iletimi, hedef primer dizilerinde varyasyon/mutasyonlar, örnekte düşük kopya sayısında hedef nükleik asit varlığı, nükleik asitlerin izolasyon sırasında kaybedilmesi, DNaz/RNazlarla hedefin parçalanması gibi nedenler sayılabilir. Ancak sorun çoğu kez amplifikasyonu sağlayacak DNA Polimerazı inhibisyonuna neden olacak heparin, hemoglobin, etanol gibi maddelerin ortamda bulunmasıdır. Bu durumları önlemek için antikoagülan olarak heparinin kullanımından kaçınılması, kan örneklerinin dondurulmaması ve organik çözücülerin nükleik asitlerden kullanılan saflaştırma yöntemi ile etkin biçimde

uzaklaştırılması gereklidir. Tüm bu önlemlere rağmen inhibisyon görüldüğünde (- ki düşük bir oranda da olsa belirli sayıda çalışmada mutlaka görülecektir), bunun saptanması ve testin uygun koşullarda yeniden çalışılması güvenilir sonuç için gereklidir.

İnternal Kontrol (İK): Tanım ve Genel Özellikler

Tanısal ya da araştırma amaçlı moleküler yöntemlerde reaksiyon karışımındaki inhibisyonun ortaya konulması amacıyla İnternal Kontrol (İK) yaklaşımı kullanılmaktadır. İK aynı tüpte hedef nükleik asit gibi amplifiye olan ancak ondan ayırt edilebilen ikinci bir hedeftir. İdeal bir İK, hedef nükleik asitlere uygulanan saflaştırma, amplifikasyon vb. tüm aşamalardan geçmeli, pozitif sonuç vererek tüm bu basamakların inhibisyona neden olmadığını ortaya koymalı, aynı zamanda da testin duyarlılığını etkilememelidir. GZ-PZR floresan bazlı saptama yaklaşımı ile aynı tüpte çoklu amplifikasyonlara imkan vermesi sayesinde İK'ların kullanımını çok kolaylaştıran bir sistemdir. Günümüzde hemen her ticari GZ-PZR cihazı en az iki hedefin kalitatif/kantitatif amplifikasyon ve saptamasını sağlayacak teknik donanıma sahiptir. Ancak İK'ların dizaynı ve reaksiyonun optimizasyonu her sistem ve hedef için özellik göstermektedir. Yine ticari olarak pazarlanan tanısal kit sistemlerinin neredeyse tamamı, yöntem için seçilmiş ve optimize edilmiş; kullanıcıya belirli bir kalite güvencesi garanti eden İK'lara sahiptir. Bunun dışında kalan araştırma amaçlı ve/veya laboratuvarın kendi geliştirdiği tanısal sistemlerde uygun İK geliştirilmesi ve kullanılması söz konusudur. Kantitatif testlerde, kalitatiflerde olduğu gibi İK kullanımı gereklidir ancak İK'nın test şartları ve ortamının hedefin saptanmasına uygunluğunu saptaması amaçlandığından kalitatif olması yeterlidir.

İK'lar hedef bölgeleri ve yapılarına göre homolog-heterolog ve endojen-ekzojen olarak gruplanabilir. Bu tanımlamada İK olarak kullanılan nükleik asitlerin kaynağı ve hedefe benzerliği belirleyici olmaktadır. Endojen İK olarak, çalışılan örnekteki hücrelerde bulunan "housekeeping" genleri hedef seçilmektedir. "Housekeeping" genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve hücre içeren klinik örneklerde saflaştırma sonrasında seçilen hedef gene özgül primerlerle amplifiye edilerek saptanırlar. Kullanılan gen bölgeleri arasında albumin, β -globin, 18S/28S rRNA, β -aktin, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Genellikle hücre/doku örneklerinde uygulanan araştırma amaçlı PZR'lerde hedef alınan "housekeeping" genlerin endojen olmaları dolayısıyla örneğe eklenmesi

gerekmez, ayrıca örnekteki nükleik asitlerin durumu konusunda daha gerçekçi bilgi sağlarlar. Ancak amplifikasyonda hedefin yanı sıra seçilen bölgeye uygun ek primer ve/veya prob seti gerektirirler. Ek olarak tüm deneysel koşullarda optimal çalışan tek bir "housekeeping" gen yoktur; bunların farklı koşullarda farklı etkinlikte amplifiye olduğu gösterilmiştir.

Eksojen İK ise, örnekte doğal olarak bulunmayan, dolayısıyla dışarıdan eklenen kontrol nükleik asitlerini tanımlar. Eksojen İK, homolog veya heterolog özellikte olabilir. Heterolog İK, örneğe eklendikten sonra endojen İK gibi hedeften farklı bir primer seti ile çoğaltılan ve saptanan DNA'lardır. Neomisin fosfotransferaz geni ve bakteriyofaj DNA'sı bu amaçla kullanılan nükleik asitler arasında yer alır. Homolog İK ise, hedef nükleik asitleri çoğaltmak için kullanılan primerlerle amplifiye olur, ancak amplikon dizileri hedeften farklılık içerir ve molekülün farklı işaretli prob vb. ile seçici olarak saptanmasını mümkün kılar. Ticari tanısal GZ-PZR sistemlerin birçoğu, saflaştırma aşamasından örneklerle birlikte işleme giren sentetik homolog İK'lar içerir. Bunlar, PZR için hedefle aynı primer bağlanma dizilerini taşıyarak hedefle birlikte amplifiye olurlar ancak primerlerin arasında kalan bölgede, İK sinyalinin seçici olarak saptamaya yarayacak, çoğu kez farklı işaretli ikinci bir probun bağlanacağı dizi farklılıkları taşırlar. İstenilen patojeni hedefleyen bir test için sentetik homolog İK geliştirilmesi mümkündür. Bu amaçla hedef amplikonların bir vektöre yerleştirilerek istenilen delesyon/insersiyonların oluşturulması, "site-directed" mutagenез, üst üste binen ve "tailed" PZR gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmakla birlikte homolog İK geliştirilmesi ve validasyonu genellikle tanısal moleküler mikrobiyoloji laboratuvarının olanaklarını üzerindedir. Bununla birlikte birçok araştırma ve deneysel çalışmada endojen/heterolog İK'lar sonuçların güvenilirliğini garantilemek için kullanılmakta, ayrıca gereklilik halinde hedef ve yöntemine uygun olacak şekilde homolog İK'lar geliştirilmektedir.

İK Negatifliği: Nedenleri ve Yapılması Gerekenler

Test sonuçları değerlendirilirken İK'nın negatif olarak izlenmesi, klasik olarak tüp içerisindeki reaksiyonun herhangi bir nedenle inhibisyona uğradığını ifade eder. Bu durum sıklıkla aşağıda belirtilen faktörlerden birisi veya birkaçına bağlıdır:

- *Amplifikasyonu engelleyen teknik sorun varlığı:* "Thermal cycler" işleyişi/programlama, reaksiyon karışımında yer alan kimyasallar veya uygun olmayan saflaştırma bağılı olarak İK negatif olarak izlenebilir. Bu gibi durumlarda

İK test kalite kontrolü etmeni olarak görev alır ve teknik şartlardaki olumsuzluğun ortaya konulmasını sağlar.

- *Hedef fazlalığı:* Reaksiyon karışımında hedefe yönelik primerlerle amplifiye olan İK'nın (homolog İK) kullanıldığı durumlarda; hedef DNA'nın miktarının fazlalığı (örn. yüksek virus yükü), hedef ve İK amplifikasyonu arasında bir yarışma durumu ortaya çıkarıp İK sinyalinin negatif olarak izlenmesine neden olabilir. Bu gibi durumlarda eğer hedef sinyali pozitif ise, negatif İK sinyali gözardı edilerek örnek için kalitatif/kantitatif sonuç rapor edilir. Ancak birden fazla hedefin amplifiye edildiği multipleks bir test söz konusu ise, sadece pozitif sonuç alınan hedef rapor edilir, diğer hedefler için yorum yapılmaz.

- *İnhibitör varlığı:* Birçok kimyasal madde hedef/İK amplifikasyonun baskılanmasına neden olabilir. Bunlar arasında saflaştırma basamağından kaynaklanabilecek etanol, SDS gibi çözücüler/deterjanlar, klinik örnekteki hemoglobin, heparin, bazı hormonlar, reaksiyona havadan karışan partiküller vb. sayılabilir.

İK'nın negatif olması durumunda, aynı çalışmada elde edilen diğer örneklerle ait sonuçlarla geneli etkileyecek teknik sorunlar ekarte edilebiliyor ve örnekteki negatif sonucun inhibitör varlığına bağlı olduğu düşünülüyorsa, yapılması gereken testin tekrarlanmasıdır (aksi halde önce teknik sorunun saptanması ve çözülmesi gerekir). Bu yaklaşımda; örnekteki inhibitörlerin az miktarda ve/veya eşit olarak dağılmamış durumda bulunduğu varsayılarak; ikinci bir reaksiyonda inhibitör dağılımı/düşük miktarına bağlı olarak inhibisyonun ortadan kalkacağı beklenmektedir. Ek olarak örneklerin dilüe edilmesi (1:5–1:20) de inhibitörlerin etkilerinin ortadan kaldırılmasında etkili olabilmektedir. İnhibitörlerin bir bölümün dayanıksız olduğu gözlemi, bazı araştırmacıların ısıtma, dondurma/çözme, oda ısısında bekletme vb. yöntemleri de önermesine katkıda bulunmuştur. Ancak tüm bu uygulamaların hedef nükleik asitleri de etkileyeceği akılda tutulmalı, en uygun yaklaşım duruma göre seçilmelidir. Bir diğer yaklaşım ise saflaştırma aşamasının aynı veya farklı bir yöntemle tekrarlanmasıdır. Bu durumda da kararlar, kullanılan testin özellikleri ve laboratuvarın deneyimlerine göre alınmalıdır.

Eksternal Kontroller ve Kullanımı

Eksternal kontrol (EK)'ler, çalışmada değerlendirilen örneklerin haricinde testin değerlendirilmesi amacıyla çalışmaya alınan; kullanılan yöntemin referans nükleik asitleri etkin bir şekilde saptama yeteneğini ve/veya hedef DNA

içermeyen örnekler üzerindeki etkilerini ortaya koyan kontrollerdir. Klasik olarak kullanılan pozitif ve negatif kontroller, ayrıca referans DNA'lar ve kantitasyon için kullanılan standartlar da EK kapsamına girmektedir.

Moleküler çalışmalarda negatif kontrol olarak sıklıkla reaksiyon karışımını içeren ancak nükleik asit örneği yerine su ya da tampon eklenen "batch, blank" kontroller kullanılmaktadır. Bu yaklaşım reaksiyon karışımından köken alan kontaminasyonların ortaya konulmasında faydalı olmakla birlikte, örnek kaynaklı sorunlar veya non-spesifik amplifikasyonların saptanmasına katkısı sınırlıdır. Tanısal testlerde kullanılması önerilen optimal negatif kontrol, hedef nükleik asidin bulunmadığı gösterilmiş hasta örneğidir. Bunun dışında örneklerden aynı yöntemle saflaştırılarak test sonucu negatif olarak bulunan nükleik asitler de sonraki çalışmalarda negatif kontrol olarak kullanılabilir. Ancak bu yaklaşım, doğal olarak saflaştırma işlemlerinden kaynaklanan kontaminasyonların saptanmasında yetersiz kalacaktır. Yukarıdakilere ek olarak "blank" negatif kontroller de ayrıca çalışmaya eklenebilir. Standart PZR uygulamalarında kontaminasyonun takibi için önerilen "her beş örneğe bir" negatif kontrol yaklaşımı, kapalı sistem GZ-PZR için gerekli olmayabilir.

Pozitif kontrol olarak ideal örnek ise, tanısal testte kullanılan örnek tipi (serum, doku vb.) içerisinde etkene ait nükleik asidi bulunduran, diğer bir deyişle diğer bir hastaya ait pozitif örnektir. Ancak çoğu kez bu uygulama çeşitli nedenlerle pratik olmamaktadır. Çalışmalarda sıklıkla negatif örneklerin referans mikroorganizma veya hedef nükleik asitleri taşıyan plazmid vb. ile inoküle edilmesi ile hazırlanan pozitif kontroller tercih edilmektedir. Bu yaklaşımın da mümkün olmadığı durumlarda referans organizmadan/pozitif örnekten saflaştırılmış nükleik asit örneği veya PZR amplikonları pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Genel olarak çalışmada kullanılan pozitif kontrolün içerdiği hedef nükleik asit miktarı, kullanılan testin alt saptama sınırına sınırına yakın olması tercih edilmelidir. Böylece hem testin duyarlılığı her çalışmada sınanmış olacak, hem de düşük miktarda inhibitörlerin varlığı saptanarak yalancı negatiflikler azaltılmış olacaktır.

Tanım olarak standart veya kantitasyon standartları, içerdiği hedef nükleik asit miktarı ve/veya özellikleri bilinen örneklerdir. Kantitasyon standartları sıklıkla her kantitatif PZ-PZR çalışmasında örnekler ve negatif kontrollerle birlikte çalışmaya alınır, içerdiği hedef miktarları GZ-PZR'ın logaritmik faza geçtiği döngü

sayısına göre hesaplanır ve bu şekilde elde edilen grafik sayesinde örneklerdeki nükleik asit miktarları saptanır.

Tanısal amaçla kullanılan kalitatif veya kantitatif testler için İK'ya ek olarak özellikleri bilinen veya referans özelliği taşıyan EK'ların da mutlaka kullanılması önerilmektedir. Moleküler tanı testlerinde standardizasyon ve kalite kontrolü, özellikle son yıllarda güncellik kazanan bir konudur. Günümüzde moleküler tanı testlerinde kullanılmak üzere özellikleri ve/veya miktarları standardize edilmiş EK'lar veya serum panelleri görece az sayıda olmasına karşın, geliştirme çalışmaları hızla ilerlemektedir. Birçok ticari sistemde de, standart olarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) veya başka kuruluşlar tarafından geliştirilen referans nükleik asitler kullanılmaktadır.

SLAYTLAR

İnternal ve Eksternal Kontroller



Doç. Dr. Koray Ergünay
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Moleküler Testlerde Yalancı Negatiflik :

Nedenler :

- Primer tanıma bölgelerinde mutasyon, varyantlar/alttipler
- Teknik (pipetaj vb.) hatalar, cihaz hataları
- Uygunsuz örnekleme/saklama/taşıma
- Düşük kopya sayısı / saflaştırma sırasında kayıp
- DNaz / RNaz kontaminasyonu

Saptama :

- Testte uygun pozitif kontrollerin kullanımı
- Testte uygun İnternal Kontroller (İK)'in kullanımı

Önleme :

- İnhibitörlerin etkin olarak uzaklaştırılması
- Uygun saflaştırma yönteminin uygulanması

Moleküler Tanı Yöntemleri

Avantaj	Dezavantaj	Gereken...
Yüksek duyarlılık	Yalancı pozitiflik	Eksternal ve İnternal Kontroller ✓
Hassas, enzimatik çoğaltma / saptama	Yalancı negatiflik	

İnternal Kontrol (İK):



Hedef DNA/RNA gibi işlemlere alınır.

Hedef DNA/RNA ile aynı tüpte amplifiye olur, farklı sinyal oluşturur.

Testin duyarlılığını belirgin olarak değiştirmez.

Her tüp için yalancı negatiflik / inhibisyon varlığını gösterir...

Moleküler Testlerde Yalancı Pozitiflik :

Nedenler :

- Pozitif örnek ile kontaminasyon
- Amplifikasyon ürünleri ile kontaminasyon
- Non-spesifik amplifikasyonlar

Saptama :

- Testte uygun negatif kontrollerin kullanımı
- Ürünlerin spesifite kontrolü

Önleme :

- PZR öncesi / sonrası işlemlerin fiziksel olarak ayrılması
- Kontaminasyon önleyici genel tedbirlerin uygulanması
- Urasil glikozilaz sistemi
- Kapalı sistemler / otomatizasyon

Kaynak ve özelliklerine göre İnternal Kontroller:

Endojen İK: Çalışma örneğinde bulunan diğer nükleik asitler

↓

“Housekeeping” genler...

Albumin, β -globin, 18S/28S rRNA, β -aktin, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz vb....

- ⚠ Örneğe eklenmeleri gerekmez
- ⚠ Ayrı primer / prob seti gerektirir
- ⚠ Örnekteki nükleik asitlerin durumunu daha iyi gösterir
- ⚠ Her deneye uygun, optimal bir bölge yoktur...

Kaynak ve özelliklerine göre İnternal Kontroller:

Endojen İK: Çalışma örneğine dışarıdan eklenen nükleik asitler

“Homolog” ya da “Heterolog” özellikte olabilir

Heterolog İK: Hedeften farklı bir primer seti ile çoğaltılır
Örnek: Neomisin fosfotransferaz geni, bakteriyofaj DNA’sı

Homolog İK: Sıklıkla hedefle aynı primerlerle çoğaltılır
Amplikonlar hedeften farklıdır, farklı prob ile saptanır

- ⚠ Sıklıkla sentetik olarak imal edilirler
- ⚠ Çoğu ticari sistemde homolog İK kullanılır

İnternal Kontrol Negatifliği		
Teknik Sorunlar	İnhibitör Varlığı	Hedef Fazlalığı
↓ "Thermal Cycler" Saflaştırma yöntemi Reaksiyon karışımı ↓ Sorun tanımlanır ve çözülür ↓	↓ Klinik örnekten... Saflaştırmadan... Çevreden... ↓ Örneğin dilüe edilmesi Yeniden saflaştırma ↓	↓ Homolog İK ve yüksek hedef yükü ↓ Hedef pozitifse sonuç rapor edilir ↓ Çoklu PZR veya şüpheli durumlar ↓
Testin Tekrarı		

“Homolog” Internal Control - LightCycler™ :

The diagram illustrates the 'Homolog' Internal Control - LightCycler™ assay. It shows two DNA templates: the target DNA (Hedef DNA) and the internal control DNA. Both templates have a gap (Amplifikasyon Bölgesi) flanked by Primer 1 and Primer 2. A probe with a 5' fluorophore (green) and 3' quencher (red) is shown binding to the target DNA. The internal control DNA also has a similar gap, flanked by primers, and a probe with a 5' fluorophore (green) and 3' quencher (red) binding to it. The labels indicate the target DNA, the amplification region, the primers, the probes, and the resulting positive and internal control signals.



Eksternal Kontrol (EK):

- Teste klinik örneklerin dışında, ayrı örnek olarak eklenir.
- Testin referans nükleik asitleri çoğaltma etkinliğini ve hedef içermeyen örneklerdeki sonuçlarını gösterir
- Pozitif / negatif kontroller, referans / standart nükleik asitleri içerir

İnternal Kontrol Negatifliği

↓

Reaksiyonun herhangi bir nedenle inhibisyonu

↓

Eksternal Kontroller – 1:

Pozitif Kontrol: Testin referans nükleik asitleri çoğaltma etkinliğini gösterir

İdeal PK: Testte kullanılan örnek tipinde hedef nükleik asidi içeren örnek ... pozitif hasta örneği

Alternatifler: Negatif örneklerin referans suşla inoküle edilmesi
Referans suşa saflaştırılmış nükleik asit
PZR ürünleri

 Nükleik asit miktarı testin saptama alt sınırına yakın olmalı

Eksternal Kontroller – 2:

Negatif Kontrol: Hedef nükleik asidi içermeyen, non-spesifik amplifikasyonlar/ kontaminasyonu saptama amacı taşıyan kontrol...

İdeal NK... Testte kullanılan örnek tipinde hedef nükleik asidi içermeyen örnek ... negatif hasta örneği

“Blank”, “Batch” kontrol: Yalnızca reaksiyon karışımını içeren, nükleik asit içermeyen negatif kontrol

SONUÇ



Tanısal amaçla kullanılan kalitatif veya kantitatif testler için İK'ya ek olarak özellikleri bilinen veya referans özelliği taşıyan EK'lar da mutlaka kullanılmalıdır

Moleküler testlerde kalite kontrol programları, standardize EK'lar/paneller ve DSÖ standartları yaygınlaşmaya başlamıştır

Eksternal Kontroller – 3:

Standart / Referans Nükleik Asit:

Miktarı / Özellikleri bilinen nükleik asitler...

Kantitasyon standartları

Genotip / alttiplere ait standart nükleik asitler

Belirli direnç mutasyonlarını taşıyan nükleik asitler

REAL-TIME PCR İLE MUTASYON SAPTANMASI

DOÇ. DR. ZEYNEP SARIBAŞ

05 HAZİRAN 2012, 09:00-09:30

Real-time PCR günümüzde yaygın kullanım alanı bulan, ucuz, kolay, hızlı, güvenilir bir yöntemdir. Amplifikasyon ürünün gözlenmesinin yanısıra kantitatif PCR sonucu alınmasına olanak sağlaması, mutasyonların gösterilebilmesi yöntemin önemli avantajlarıdır. Mutasyonların saptanması, hastalıkların tanısında, diziler arası farklılıkların gösterilmesiyle epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde, tür ayrımı yapılmasında, dirençli mikrrorganizmaların saptanmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılmış çok sayıda çalışma sonucunda, real-time PCR ile mutasyon saptanmasıyla elde edilen sonuçlar duyarlı ve özgül bulunmuştur. Real-time PCR, PCR sonrası herhangi bir işleme gerek kalmadığı için kontaminasyon oranı düşük, otomatize bir yöntemdir.

Mutasyon saptanması amacıyla hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri, moleküler firketeler (beacon), akrep (scorpion) primerler ve minor oluğa bağlanan (minor groove binding=MGB) problemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, nokta mutasyonları, translokasyonlar, inversiyonlar, eklenme ve eksilme mutasyonlarının saptanması mümkün olmaktadır.

Hibridizasyon problemleri:

Hibridizasyon problemleri kullanılarak floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemiyle mutasyon saptanmaktadır. Saptama ve bağlama problemleri kullanılır. Saptama probu, mutasyon olduğu düşünülen bölgeyi hedef alır. 15-30 baz büyüklüğündedir. 3'ucu floresanla işaretlidir. Bağlama probu, saptama probundan 1-3 baz uzaklığında olacak şekilde tasarlanır. Bağlama probunun erime sıcaklığı, saptama probu ve primerleri erime sıcaklıklarından 5-10°C yüksektir. 5'ucu Red640 veya Red705 gibi floresan bir boya ile işaretlenir. LightCycler cihazının verdiği mavi ışıkla saptama probu direkt olarak uyarılamaz. Bağlama probunun uyarılması ve FRET ile enerjinin saptama probuna aktarılması gerekir. Bu şekilde uyarıldıktan sonra, saptama probundan daha uzun dalga boyunda (640nm veya 705nm) ışık saçılır. Bu gözlenen floresanın miktarı elde edilen PCR ürünü, dolayısıyla DNA miktarıyla doğru

orantılıdır. Bu aşamadan sonra mutasyon saptanması için erime sıcaklığı hesaplanması ve erime tepesi elde edilmesi işlemine geçilir. Bunun için önce erime sıcaklığından 5-10°C düşük sıcaklık sağlanır. Sonra 0.1-0.2°C/s olacak şekilde sıcaklık yavaş artırılır ve bu arada floresan miktarı devamlı izlenir. Saptama probunun %50'sinin ayrıldığı, dolayısıyla floresan miktarının belirgin azaldığı sıcaklık, erime sıcaklığı olarak belirlenir. Floresan miktarının azalmasıyla elde edilen eğri, erime eğrisi adını alır. Bu eğrinin daha kolay yorumlanabilmesi için negatif türevi alınarak erime tepesi elde edilir. Mutasyon varlığında saptama probu kalıp DNA dizisiyle tam eşleşmediği için, mutasyon olmayan örneğe göre daha düşük bir sıcaklıkta ayrılacaktır ve elde edilen erime tepesi mutasyon olmayan örneğinkinden farklı olacaktır. LightCycler cihazı kullanıldığında, birden fazla dalga boyunda floresan alınabilir. Böylece birden fazla prob çifti kullanılarak birden fazla bölgede mutasyon saptanabilir.

Hidroliz problemleri:

Hidroliz problemleriyle mutasyon saptanması için iki prob gereklidir. Biri mutasyon olmadığı bilinen kalıp DNA'yı hedeflerken diğeri mutasyon olduğu düşünülen örneği hedefler. Problemlerin 5' ucunda floresan rapörtör molekül, 3' ucunda ise floresan salmayan baskılayıcı (quencher) molekül bulunur. Bu şekilde prob floresan ışığı saçmaz. Taq polimeraz 5'→3' yönünde polimerizasyon yaparken ekzonükleaz aktivitesiyle probu keser. Baskılayıcı molekülden ayrılan prob floresan saçar. Mutasyon varlığında, probun hibridizasyonu tam olarak gerçekleşmez. Taq polimeraz probu kesmez ve floresan açığa çıkmaz. Hidroliz problemleri, 20-40 nükleotid uzunluğunda, G-C içeriği %40-60 olan, tekrarlayan dizi içermeyen, erime sıcaklığı kullanılan primerlerin erime sıcaklığından en az 5°C yüksek olarak tasarlanan problemlerdir.

Moleküler (beacon) firketeler:

Firkete şeklinde olan bu problemlerin 5' ucunda floresan boya, 3' ucunda ise baskılayıcı molekül bulunur. Baskılayıcı, proba yakın olduğu bu durumda floresan açığa çıkmaz. Probun ilmek şeklindeki kısmı, mutasyon olduğu düşünülen DNA bölgesine komplementer olarak sentezlenir. Prob hedef dNA bölgesiyle eşleşince baskılayıcı molekülün etkisi ortadan kalkar. Floresan açığa çıkar. Moleküler firketeler, ilmek

kısmı 18-25 baz; kenar kısımları 5-7 baz büyüklüğünde tasarlanır. İlmeğin orta kısmı mutasyon bölgesiyle eşlecek şekilde sentezlenir.

Akrep (scorpion) primerler:

Firkete şeklindeki bu probun 5'ucunda florofofor, 3'ucunda is baskılayıcı molekül bulunur. Primer ve PCR reaksiyonu durdurucu eklenmiştir. Bağlanma aşamasında primer bağlandıktan sonra, uzama aşamasında prob aynı DNA zincirindeki komplementer bölgeye bağlanır. Baskılayıcı molekülün etkisinden kurtulan florofofor floresan ışık salar. Akrep primerlerin mutasyon saptama kullanımı daha hızlı ve daha iyi sonuç vermesi yöntemin avantajlarıdır.

Minor oluğa bağlanan problar:

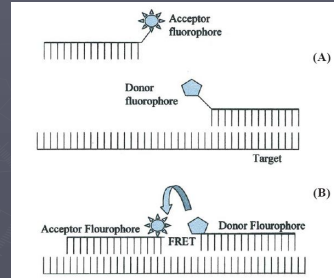
14-15 baz uzunluğunda oligonükleotidlerdir. 5'ucunda floresan boya, 3'ucunda floresan olmayan baskılayıcı molekül ve minor oluğa bağlanan prob bulunur. Taq polimeraz, polimerizasyon aşamasında, ekzonüleaz aktiviteyle 5' ucu keser ve baskılayıcı molekülün etkisinin ortadan kalkmasıyla floresan açığa çıkar.

SLAYTLAR

Real-time PCR

- ? Hızlı, duyarlı, özgül, ucuz
- ? PCR sonrası işleme gerek yok (agaroz jel elektroforezi gibi)
- ? Özellikle bilinen mutasyonların saptanmasında kullanılır
- ? Hastalık tanısı
- ? İlaç direnci, ilaç geliştirilmesi
- ? Epidemiyoloji

Hibridizasyon probları



Real-time PCR

dsDNA'ya özgül boyalar:

- ? YOYO-I
- ? TOTO-I
- ? BEBO
- ? SYBR Green I
- ? LC Green

Hibridizasyon probları

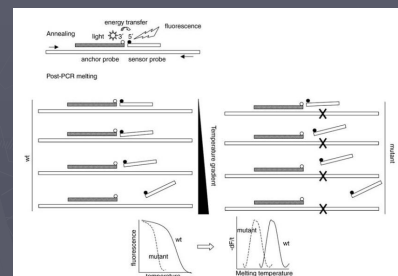
- ? Saptama probu (detection prob) (sensor prob)(alıcı prob): mutasyonu hedefleyen prob. 5' ucu Red640 veya Red705 işaretli
- ? Bağlama probu (anchor prob) (verici prob): 3' ucu floresanla işaretli .
Mavi ışık floresan tarafından absorbe edilir. Yeşil floresan ışık salınır. Bu yeşil ışık Red640 ve Red705'i uyarır. Daha büyük dalga boyunda ışık salınır.

Real-time PCR

Floresan salmayan baskılayıcı moleküller (quencher)

- ? TAMRA
- ? DABCYL
- ? Black-hole quencher (BHQ)

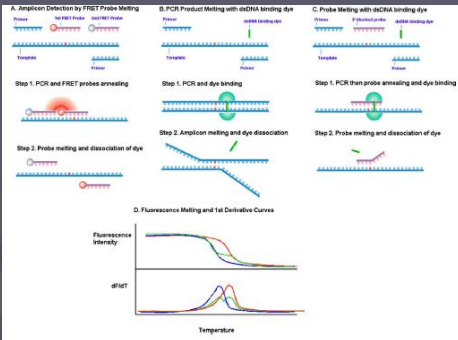
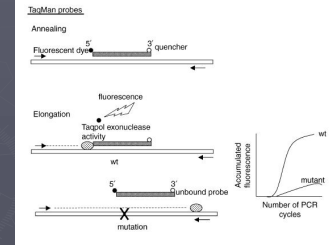
Hibridizasyon probları, erime eğrisi



Erime sıcaklığı/eğrisi:

- ? Bağlama probunun T_m değeri saptama probu ve primerlerinkinden 5-10°C yüksek.
- ? PCR sonrası sıcaklık artırılınca önce saptama probu ayrılır. Floresan azalır.
- ? T_m : Probu'nun %50'sinin ayrıldığı sıcaklık

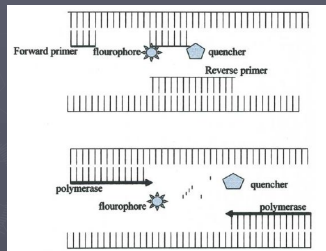
Hidroliz probu (Taqman)



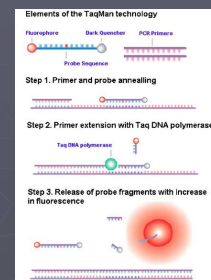
Hidroliz probu (Taqman)

- ? 5' uçta floresan raportör molekül
- ? 3' uçta baskılayıcı molekül
- ? 5' → 3' yönünde eklenirken Taq polimerazın ekzonükleaz aktivitesi probu keser. Baskılayıcı molekülünden ayrılan raportör molekül floresan sağlar.

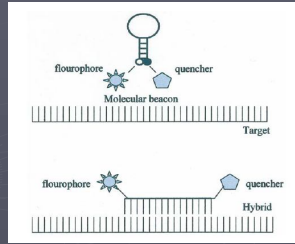
Hidroliz probu



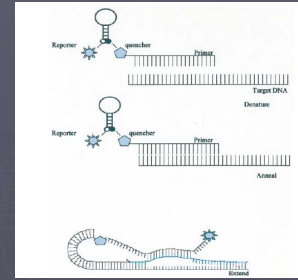
Hidroliz probu (Taqman)



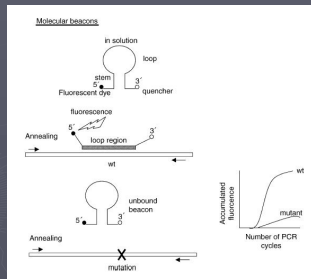
Moleküler firkete (beacon)



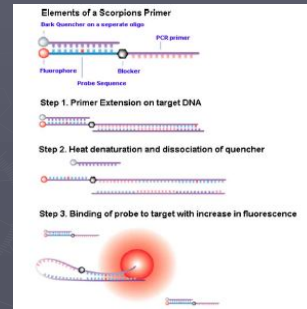
Akrep (scorpion) primer



Moleküler firkete (beacon)



Akrep (scorpion) primer



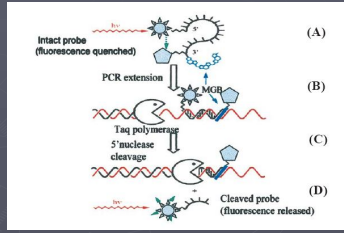
Moleküler firkete (beacon)

- ? Hibridizasyon probu
- ? Hedefe bağlanmamışken baskılayıcı molekül floresan işaretli moleküle yakın: floresan yok
- ? Prob hedef moleküle tutununca floresan açığa çıkar.

Akrep (scorpion) primer

- ? Moleküler firketeye benzer yapı
- ? 5'ucunda florofor, 3'ucunda is baskılayıcı molekül bulunur. Primer ve PCR reaksiyonu durdurucu eklenmiştir.
- ? Uzama aşamasında prob aynı DNA zincirindeki komplementer bölgeye bağlanır. Baskılayıcı molekülün etkisinden kurtulan florofor floresan ışık salar.

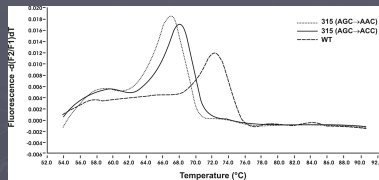
Minör oluğa bağlanan prob (MGB)



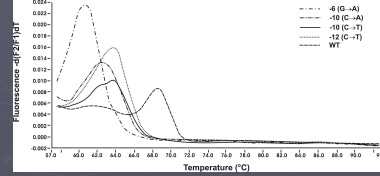
Minör oluğa bağlanan prob (MGB)

- ? 5'uçta floresan boya
- ? 3'uçta baskılayıcı molekül ve MGB prob
- ? Ekstansiyonda Taq polimerazın 5'ekzonükleaz aktivitesiyle 5'uç kesilir. Floresan açığa çıkar.

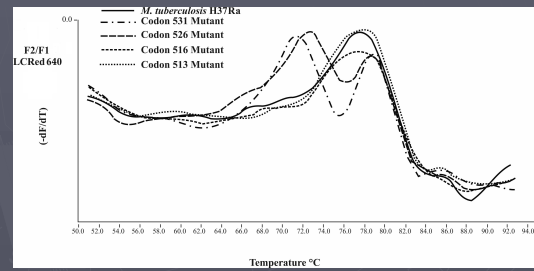
M.tb'de *katG* mutasyonları



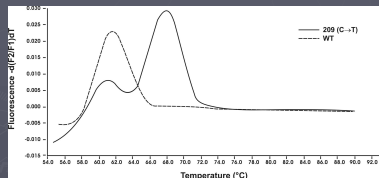
M.tb'de *ahpC* mutasyonları



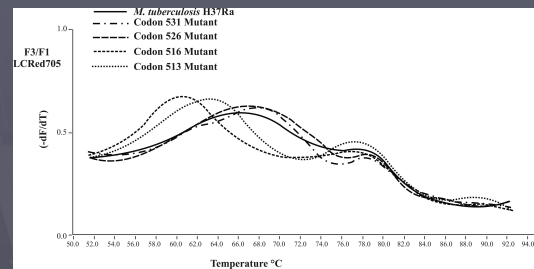
M.tb'de *rpoB* mutasyonları



M.tb'de *inhA* mutasyonları



M.tb'de *rpoB* mutasyonları



KLİNİK LABORATUVARDA REAL-TIME PCR DENEYİMİ

DOÇ. DR. ALPASLAN ALP

05 HAZİRAN 2012, 09:30-10:00

Son yirmi yıllık süreç içerisinde enfeksiyon hastalıklarının rutin tanısında moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlaması önemli bir dönüm noktası olmuştur. Çeşitli boyama yöntemleri sonrasında mikroskopik inceleme ve bunun yanısıra kültür yöntemleri, günümüzde halen vazgeçilmez standart tanı yöntemleri olma özelliklerini korumaktadırlar. Ancak mikroskopik inceleme duyarlılığının bazı mikroorganizmalar için düşük olması, kültür yöntemlerinin de zaman alıcı ve kimi zaman yetersiz kalabilmesi nedeniyle, moleküler yöntemler rutin kullanıma girmeye başlamışlardır. Moleküler yöntemler özellikle viral etkenlerin saptanmasında ve enfeksiyonların takibinde vazgeçilmez yöntemler haline gelmektedir.

Laboratuvar sonuçlarının kliniğe faydalı olabilmesi için, sonucun hızlı olarak ve güvenilir bir şekilde elde edilebilmesi şarttır. Günümüzde yaygın kullanım alanları bulmaya başlamış olan real-time PCR, bu gereksinimlere cevap verebilecek verimliliğe ulaşmıştır. Öncelikle, konvansiyonel PCR yöntemlerine göre daha çabuk bir şekilde sonuç alınabilmektedir. Bunun yanısıra, standart PCR yöntemlerine göre, uygulayıcıdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riski daha azdır. Ayrıca real-time PCR yöntemiyle kantitasyon çok daha hassas bir şekilde yapılabilmektedir. Bütün bunlara ek olarak, fazla sayıda örnek akışı olan laboratuvarlar düşünüldüğünde, real-time PCR yöntemlerinin rutin uygulama için uygun seçenekler olduğu daha net olarak ortaya çıkmaktadır.

Birçok araştırmada bakteriyel ve viral "in-house" real-time PCR protokolleri tanımlanmıştır. Bunun yanında, rutin klinik laboratuvar uygulamaları için geliştirilmiş birçok bakteriyel ve viral real-time PCR kiti mevcuttur.

Real-time PCR ile rutin laboratuvarda çalışılabilecek ve kliniğe somut faydası olabilecek bakteriyel PCR parametreleri arasında Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori, MRSA (metisilin dirençli Staphylococcus aureus), VRE (vankomisin dirençli Enterokok) sayılabilir.

Klinik örneklerden *M. tuberculosis* saptanabilmesi amacıyla geliştirilmiş çeşitli real-time PCR protokolleri mevcuttur. Ancak günümüz şartlarında tüberküloz

tanısında kültür yöntemleri ve özellikle de daha hızlı tanı sağlayan sıvı kültür sistemleri, vazgeçilmez yöntemler olarak görünmektedirler. Moleküler yöntemler ise tanı konma sürecini belirgin derecede kısaltabilmelerine rağmen, mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin yerini alamamışlardır. Bugün geline aşamada moleküler yöntemlerin tüberküloz tanısında kültür yöntemlerinin yerini alması sözkonusu değildir. Bununla birlikte, moleküler yöntemlerin tamamlayıcı testler olarak kullanılmaları daha uygun görünmektedir. Tüberkülozun laboratuvar tanısı amacıyla PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, kullanılan yöntem ve incelenen örneğin türü gözönünde bulundurulmalı, özellikle solunum yolu dışındaki örneklerde ve yayma negatif örneklerde duyarlılığın daha düşük olabileceği unutulmamalıdır. Bunun yanı sıra PCR sonuçları kültür ve mikroskopik inceleme sonuçları ile bir bütün olarak yorumlanmalıdır. Klasik kültür yöntemlerinin yanında, identifikasyon, genotiplendirme ve ilaç direnci saptanmasında moleküler yöntemlerin kullanımı en uygun seçenek olarak görünmektedir. *M. tuberculosis*'in özellikle rifampin, izoniazid, etambutol ve kinolonlara karşı direncinin FRET problemleri kullanılarak real-time PCR yöntemiyle saptanabildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

İlaç direncinin real-time PCR ile saptanması, dirence sıklıkla neden olan mutasyonların bakteri genomunun belirli yerlerinde kümelenmesi durumunda faydalı olmaktadır. Böyle durumlarda mutasyon bölgelerini kapsayacak şekilde dizayn edilmiş FRET problemleri veya diğer problemlerle mutasyonun ve dolayısıyla ilgili ilaca karşı direncin saptanabilmesi mümkün olmaktadır. Test sonucunda duyarlı suşlar ile dirençli mutant suşların erime sıcaklıkları farklı olmakta ve bu farka bakılarak test edilen izolatın ilgili ilaca karşı duyarlı veya dirençli olduğu söylenebilmektedir. Bu strateji *M. tuberculosis*'te çeşitli ilaçlara karşı direncin saptanması yanında, *Helicobacter pylori*'de klaritromisin direnci ve *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin saptanması amacıyla rutin laboratuvarlarda kullanım alanı bulmaya başlamıştır. Ayrıca, vankomisin dirençli enterokok taşıyan hastaların belirlenmesi amacıyla da benzeri stratejiyle geliştirilen rutin real-time PCR uygulamaları kullanıma girmeye başlamıştır.

Klinik laboratuvar uygulamalarında rutin olarak kullanılmakta olan parametreler arasına son yıllarda *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma*

pneumoniae ve *Legionella pneumophila* tanısı için geliştirilmiş çeşitli “in-house” ve ticari real-time PCR yöntemleri de girmeye başlamıştır.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında moleküler yöntemlerin rutin olarak kullanılmaya başlaması, özellikle viral enfeksiyonların tanısında önemli bir dönüm noktası oluşturmıştır. Hedef dizilerin hastada genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle, nükleik asit ve hedef sinyal amplifikasyonu yöntemleri moleküler virolojide büyük önem kazanmıştır. Yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara dayanarak yapılan yorumlar, PCR yöntemlerinin hücre kültürlerinde virus izolasyon yöntemlerinden daha duyarlı ve daha özgül olduğu konusunda birleşmektedir. Bugün geline nokta hasta örneklerinden, bilinen birçok insan virusu saptanabilmekte ve tiplendirilebilmektedir. Böylece elde edilen bilgiler profilaktik tedavi, tedavinin şekillendirilmesi ve hastanın takibi konusunda belirleyici olabilmektedir.

Bugün geline aşamada moleküler yöntemlerin bakteriyel kültür yöntemlerinin yerini alması sözkonusu değildir. Moleküler yöntemlerin kültür yöntemlerine tamamlayıcı testler olarak kullanılmaları daha uygun görünmektedir. Ancak viral enfeksiyonların tanısı için durum farklıdır. Moleküler yöntemler özellikle HIV, HBV, HCV, CMV, HSV, EBV ve Parvovirus enfeksiyonlarının tanısında rutin kullanıma girmişlerdir. Ancak PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde her zaman, kullanılan yöntem ve incelenen örneğin türü gözönünde bulundurulmalı, tedaviye yönelik kararın alınmasında klinik değerlendirmeler ışığında yorum yapılmalıdır.

Viral moleküler tanı amacıyla rutin laboratuvarlarda en sık test edilen viruslar HBV ve HCV’dir. HBV ve HCV tanısı amacıyla geliştirilmiş çeşitli “in house” ve ticari real-time PCR kitleri rutin olarak kullanılmaktadır. Bunlar içinde Taqman problemleri veya hibridizasyon problemleriyle saptama yapabilen farklı testler bulunmaktadır. HBV ve HCV’nin moleküler tanısı klinik açıdan çok büyük önem taşımaktadır. Önemli olan nokta real-time PCR ile klinik örnekte virusun saptanmasının ötesinde, viral kantitasyonun yapılabilmesidir. HBV ve HCV viral yükünün kantitasyonu, özellikle bu viruslarla enfekte hastaların tedavilerinin izlenmesi açısından çok önemlidir. Verilen tedavinin başarılı olup olmadığının anlaşılmasında en dikkate değer laboratuvar sonucu, viral yük tayini haline gelmiştir.

HIV enfeksiyonu tanısının yapılabilirdiği rutin moleküler tanı laboratuvarlarında da, real-time PCR yöntemleri vazgeçilmez testler haline

almaya başlamışlardır. Günümüzde eğer bir rutin laboratuvarda klinik örneklerden moleküler yöntemlerle HIV saptanacaksa, bunun real-time PCR yöntemleriyle yapılması neredeyse bir zorunluluk haline gelmiştir. Hassas ve doğru bir kantitasyon sonucu elde edilebilmesi için en uygun seçenek real-time PCR olarak görünmektedir. HIV viral yükünün kantitatif olarak saptanması da, özellikle verilen tedaviye cevabın anlaşılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle bu tür hastalara, tavsiye edilen belirli aralıklarla viral yük tayini rutin olarak yapılmaktadır.

Real-time PCR ile rutin moleküler tanı Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex virus tip 1 ve 2 (HSV-1 ve 2), İnsan Papilloma Virusu (HPV) ve Parvovirus B19 tanısı amacıyla da birçok merkezde rutin olarak uygulanmaya başlamıştır. HSV 1 ve 2'nin tek bir reaksiyonla tanısını sağlayan multipleks PCR uygulamaları çeşitli merkezlerde kullanılmaktadır. Hem HPV tanısını, hem de HPV genotiplendirilmesini sağlayan real-time PCR uygulamaları da kullanım alanı bulmaktadır.

Real-time PCR yöntemlerinin rutin laboratuvarlarda kullanımı konusunda EBV tanısı ayrı bir öneme sahiptir. EBV viral yükünün real-time PCR ile kantitatif olarak belirlenmesi, moleküler viral tanının sağlanmasıyla kalmamakta, özellikle nazofarinks karsinomalı hastaların tedavi takibinde de kullanılmaktadır. Yapılan son çalışmalarda EBV viral yük tayininin, tanı ve tedavi takibindeki faydalarının yanısıra, nazofarinks tümör gelişiminin erken bir habercisi olabileceği de bildirilmektedir.

SLAYTLAR

KLİNİK LABORATUVARDA REAL-TIME PCR DENEYİMİ

Doç. Dr. Alpaslan Alp
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

Rutin Moleküler Tanıdaki Sorunların Kaynakları

1. Mekan
2. Yöntem
3. Cihaz
4. Uygulayıcı

Rutin Laboratuvarda Real-Time PCR

- Hızlı tanı
- Kantitasyon
- Yüksek özgüllük
- Yüksek duyarlılık



Moleküler Tanı Laboratuvarı

- Moleküler yöntem kullanımına karar verme aşaması
- Hangi yöntem kullanılsın?
- Yalancı negatif/pozitif sonuçlarla mücadele
- Kalite kontrolü

Moleküler Tanı Laboratuvarı

- Ayırıcı mekan
- Yöntem seçimi
- Uygulayıcı deneyimi
- Cihaz kullanımı
- Klinik yorum

Moleküler Tanı Laboratuvarı

Haftalık Test Sayısı ile Rutin PCR Uygulaması Arasındaki İlişki:

- Örnek akışı fazla olan laboratuvarlarda rutin PCR uygulaması daha ekonomik.

Hazır ticari kitlerle haftada iki kez çalışılabilir.

Hangi tür PCR yöntemi?

- "In house" yöntemler:
 - Optimizasyona açık
 - Ucuz
- Hazır ticari kitler (çoğunlukla real-time PCR):
 - Düşük kontaminasyon riski
 - Standardizasyon imkanı
 - Pahalı

Rutin Laboratuvarında Real-Time PCR

Testlerde kullanılan cihazların kalibrasyonları belirli aralıklarla kontrol edilmeli, bakımları yapılmalıdır:

Alım aşamasında,
periyodik bakım anlaşması.

Rutin Laboratuvarında Real-Time PCR

- Uygulaması kolay,
- Kısa sürede sonuç alınır,
- Kantitasyon sonuçları daha güvenilirdir,
- Kontaminasyon olasılığı düşüktür,
- Test protokolleri üzerinde değişikliğe imkan verdiğinden, araştırmalara açık sistemlerdir,
- Pahalı sistemlerdir.

Rutin Laboratuvarında Real-Time PCR

- Sonuçların doğru yorumlanması

Doğru yapılmış bir testle yanlış sonuç verilebilir!

- Sürekli eğitim ve güncelleme

Rutin Laboratuvarında Real-Time PCR

Hazır ticari kitler kullanılıyorsa:

- Son kullanım tarihlerine,
 - Uygun saklama koşullarına,
- dikkat edilmeli.

H. Ü. Moleküler Tanı Laboratuvarı

* Hepatit B virusu (HBV)	* Hepatit C virusu (HCV)
* HIV	* Cytomegalovirus (CMV)
* Herpes simpleks virus 1 & 2	* Parvovirus
* Epstein-Barr virus (EBV)	* Human Papillomavirus (HPV)
* Adenovirus	* Influenza virus A & B
* Parainfluenza virus 1, 2, 3	* Coronavirus
* Rhinovirus	* RSV
* Bocavirus	* Enterovirus
* Mycobacterium tuberculosis	* Chlamydia pneumoniae
* Legionella pneumophila	* Mycoplasma pneumoniae
* Streptococcus pneumoniae	* Haemophilus influenzae
* Helicobacter pylori	* VRE
* Translokasyonlar	

Tüberküloz Laboratuvar Tanısı

- Mikroskopik inceleme
- Kültür yöntemleri
 - Sıvı
 - Katı
- Moleküler yöntemler
 - Mikobakteriyel DNA'nın saptanması

PCR duyarlılığını etkileyen faktörler

- İnhibitör maddeler:
 - Solunum yolu örneklerinde: % 4
 - Solunum yolu-dışı örneklerde: % 18

Boddinghaus B et al: Removal of PCR inhibitors by silica membranes. J Clin Microbiol 2001, 39:3750-3752.

Tüberküloz Laboratuvarında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı

- Tüberküloz tanısı
- Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması
- *M. tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi
- *M. tuberculosis*'e karşı ilaç direncinin saptanması

PCR duyarlılığını etkileyen faktörler

İnhibitör maddelerden kurtulmak mümkün mü?

- Kaynatma yöntemiyle DNA izolasyonu
- Albumin eklenmesi
- DNA'nın silikon membranlara bağlanması
- Örneğin 1/10 dilüsyonu

PCR duyarlılığını etkileyen faktörler

- Nükleik asit izolasyon yöntemi
- İnhibitör maddeler
- Basil atılımının az olması

Tüberküloz tanısında hangi tür PCR yöntemi?

- "In house" yöntemler
 - Optimizasyona açık
 - Ucuz
- Hazır ticari kitler
 - Standardizasyon imkanı
 - Solunum yolu örnekleri için optimize edilmiş
 - Pahalı

Hangi tür PCR Yöntemi?

- Birçok çalışmada "in house" yöntemlerle hazır ticari kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri arasında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir:

Huang TS et al: Comparison of the Amplicor assay and Digene system with in house PCR... J Clin Microbiol 1996, 34:3092-3096.

Yuen KY et al: Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR... J Clin Microbiol 1997, 35:1385-1389.

Cohen RA et al: Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum... Am J Respir Crit Care Med 1998, 157:156-161.

İlaç Direnci Saptanmasında Real-Time PCR

Rifampin direncine neden olan mutasyonların görüldüğü gen bölgeleri:

- RNA polimeraz β ünitesine bağlanır
- Hızlı bakterisidal etki
- RNA polimeraz β ünitesini kodlayan *rpoB*'de mutasyon: DİRENÇ
- Mutasyonların %96'sı, 507-533. kodonlar arasındaki 81 baz çiftlik bölgede
- En sık mutasyon: 531, 526, 516. kodonlar

M. tuberculosis'te direnç saptanmasında kullanılan yöntemler

• Fenotipik Yöntemler:

- Kültür yöntemleri
 - Löwenstein-Jensen besiyeri
 - Middlebrook agar
- Hızlı tanı sistemleri
 - Bactec 460
 - MGIT 960

• Genotipik Yöntemler:

- Mutasyon saptama yöntemleri
 - Heterodupleks analizi
 - Real-time PCR
 - DNA dizi analizi

İlaç Direnci Saptanmasında Real-Time PCR

İsoniazid direncine neden olan mutasyonların görüldüğü gen bölgeleri:

- *katG*: Katalaz-peroksidaz (%60)
- *inhA*: Yağ asidi uzaması (enoil redüktaz: %30)
- *ahpC*: Alkil hidroksiperoksit redüktaz
- *oxyR*: Oksidatif stres regülasyonu

M. tuberculosis'te direnç saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler

- Elektroforez esaslı yöntemler
 - SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)
 - Heterodupleks analizi
- DNA dizi analizi
- Hibridizasyon esaslı yöntemler
 - Real-time PCR
 - FRET probaları
 - TaqMan probu
 - "Molecular beacon"

İlaç Direnci Saptanmasında Real-Time PCR

Etambutol direncine neden olan mutasyonların görüldüğü gen bölgeleri:

- Hücre duvarı sentezini bozar:
Mikolik asitlerin peptidoglikana bağlanmalarında köprü görevi üstlenen arabinogalaktanın hücre duvarına eklenmesini engeller,
- Trehaloz mono ve dimikolatlar birikir.
- Esas hedef: Arabinosil transferaz;
embA, *embB*, *embC*
- *embB* 306. kodonda mutasyon (%70-90): DİRENÇ

İlaç Direnci Saptanmasında Real-Time PCR

Kinolon direncine neden olan mutasyonların görüldüğü gen bölgeleri:

- Nalidiksik asitin sentetik deriveleri olan siprofloksasin ve ofloksasin
- DNA giraz inhibisyonu; bakterisidal etki
- Direnç: A ve B ünitelerini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* de mutasyonlar
- Mutasyonların %85'i 40 aa'lık *gyrA* bölgesinde

HIV Viral Yük Tayininin Önemi

- Tedaviye başlandıktan sonraki süreç:
 - 1-4 hafta: HIV RNA seviyesinde hızlı düşüş.
 - Daha uzun süreli (birkaç ay), fakat daha yavaş bir düşüş.
 - Maksimum antiviral etki 4-6 ayda sağlanır.

Tedavi etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılan en önemli parametre:

Kantitatif HIV RNA ölçümü = Viral Yük Tayini

J Infect Dis 2002; 185:178.

• Viral yük saptanmasının önemi

- Tanı
- Tedavi etkinliğinin izlenmesi
- Tümör belirteci olarak kullanım olasılığı?



Tedavi Etkinliğinin HIV Viral Yük Ölçümü ile İzlenmesi

- HIV RNA;
 - Tedaviye başlarken,
 - 3-4 aylık aralıklarla, bakılmalı.
 - Anlamlı değişim: Viral yükte en az %50 azalma.
- Tedavi başarısı:
 - 24-48 haftada viral yükün 50 kopya/ml'nin altına düşürülmesi.

Scand J Infect Dis 2003; 35:155.

HBV ve HCV Moleküler Tanısı

- Klinik örneklerden tanı ve kantitasyon
- Tedavi etkinliğinin takibi
- Doğru ve hassas kantitasyon için:
 - Verimli nükleik asit izolasyonu
 - Real-time PCR

Tedavi Etkinliğinin HIV Viral Yük Ölçümü ile İzlenmesi

- Lancet 2003; 362:679

- Altı ay süreyle HAART uygulanan 9323 hastada,
- Klinik düzelmenin en önemli göstergeleri, CD4 sayısı ve viral yük.

HIV ile Enfekte Hastaların Değerlendirilmesi

- Avrupa AIDS Klinik Birliği (EACS) Kılavuzu:

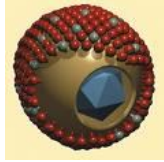
➤ HIV Viral Yüğü;

- ✓ İlk vizitte,
- ✓ Tedavi almayan asemptomatik hastalarda 6 ayda bir,
- ✓ Tedaviye başlarken,
- ✓ Tedavi sürerken 3 ayda bir, bakılmalı.

Transplantasyon Hastalarında CMV Enfeksiyonu

- Transplantasyon hastalarında organ reddini önlemek amacıyla uygulanan immünsupresif tedavi, CMV enfeksiyonu gelişme riskini artırır.
- İmmünsupresyon derecesi arttıkça, CMV enfeksiyonu gelişme oranı da artar (kemik iliği transplantasyonunda en yüksek)

Sitomegalovirus (CMV) Enfeksiyonları Tanısında Real-Time PCR



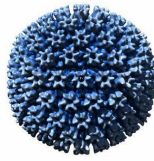
- Dünya nüfusunun büyük çoğunluğu CMV ile enfekte olmuş durumda (%60-100)
- Bütün Herpesvirus ailesi üyelerinde olduğu gibi, CMV de akut enfeksiyon sonrasında vücutta latent olarak kalabilir.

CMV: Moleküler Tanı

- Kalitatif PCR ile aktif ve latent enfeksiyon ayrımı yapılamıyor.
- Kantitatif PCR: Real-time PCR ile viral yük tayini.

Hastalığın takibinde önemli.

Sitomegalovirus Enfeksiyonları Tanısında Real-Time PCR

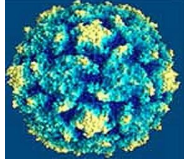


- En sık rastlanan fırsatçı patojen
- İmmünsupresif hastalarda tehlikeli enfeksiyonlar:
 - Organ transplantasyonları sonrasında: Böbrek, karaciğer, kalp, akciğer, kemik iliği.

• Viral yük saptanmasının önemi

- Tanı
- Tedavi etkinliğinin izlenmesi
- Tümör belirteci olarak kullanım olasılığı: EBV örneği
 - EBV kantitasyonunda "Real-time PCR"

**Epstein-Barr Virus (EBV)
Enfeksiyonları Tanısında
Real-Time PCR**



- Primer EBV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatiktir.
- Neden olduğu hastalıklar:
 - Akut infeksiyöz mononükleozis
 - Nazofaringial karsinom
 - Burkitt lenfoma ve diğer lenfomalar
 - İmmüsupresif kişilerde diğer lenfoproliferatif hastalıklar

Örnek Hasta-1:

- 56 yaşında erkek hasta.
- Evre III nazofarinks karsinoma.
- Kemo-radyoterapi uygulanmış ve tam cevap alınmış.
- Tedaviden 2 yıl sonra, real-time PCR sonucu: 518 kopya/ml EBV DNA saptanmış.
- Laboratuvar bulguları normal.
- PET-CT: Mediastinal, mezenterik, preaortik lenf nodu metastazları ile hepatik, pankreatik ve kemik metastazları saptanmış.
- Kombine kemoterapi başlanmış.

**Epstein-Barr Virus (EBV) Enfeksiyonları
Tanısında Real-Time PCR**

- Dünya nüfusunun %90'dan fazlası EBV ile enfekte olmuştur.
- Sağlıklı EBV taşıyıcılarında EBV DNA: 1-50 EBV genomu/10⁶ mononükleer hücre (çoğunluğu B lenfositler)

Örnek Hasta-2:

- 57 yaşında erkek hasta.
- Evre IV nazofarinks karsinoma.
- Kemo-radyoterapi uygulanmış ve parsiyel cevap alınmış.
- Tedaviden 9 ay sonra, real-time PCR sonucu: 180 kopya/ml EBV DNA saptanmış.
- Laboratuvar bulguları normal.
- İki hafta önceki MR sonucu normal.
- PET-CT: Servikal lenf nodu metastazı saptanmış.
- Kombine kemoterapi başlanmış.

**Epstein-Barr Virus (EBV) Enfeksiyonları
Tanısında Real-Time PCR**

- Kalitatif PCR ile aktif ve latent enfeksiyon ayrımı yapılamıyor.
 - Kantitatif PCR: Real-time PCR ile viral yük tayini.
- Özellikle EBV-ilişkili tümörlerin takibinde çok önemli.

Klinik Örneklerden

EBV Saptanmasında Real-time PCR

- Nazofarinks karsinomlu hastalarda plazma EBV DNA izlenmesi, invaziv olmayan, hızlı sonuç veren ve güvenilir bir tümör belirteci olarak kullanılabilir.
- Plazma EBV DNA (-) hastalıkta prognoz daha iyi olabilir.
- Tedavi sonrasında EBV DNA saptanması kötü prognoz işaretidir.

KAYNAKLAR

1. Bernard PS, Reiser A, Pritham GH. Mutation Detection by Fluorescent Hybridization Probe Melting Curves. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, p. 11-19. 2001. Springer Verlag Berlin Heidelberg Newyork, Germany.
2. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med 2000; 38(2):87-91.
3. Chudy M, Hewlett I, Saldanha J et al. Technical considerations for the performance of Nucleic acid Amplification Technology (NAT). Biologicals 2003; 31:153-159.
4. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): design and applications. Biotechniques. 2001; 31:1106-1121.
5. Dimech W, Bowden DS, Brestovac B et al. Validation of assembled nucleic acid- based tests in diagnostic microbiology laboratories. Pathology 2004; 36(1):45-50.
6. Edwards KJ, Logan JMJ. Mutation Detection by Real-Time PCR. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) *Real-Time PCR, An Essential Guide*, p. 185-210. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
7. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1):165-256.
8. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta 2006; 363:32-47.
9. Kocagöz T, Sarıbaş Z, Alp A. Rapid Determination of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by real-time PCR. J Clin Microbiol 2005; 43: 6015-6019.
10. Landt O. Selection of Hybridization Probes for Real-Time Quantification and Genetic Analysis. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, p. 35-41. 2001. Springer Verlag Berlin Heidelberg Newyork, Germany.
11. Lee MA, Leslie DL, Squirrell DJ. Internal and External Controls for Reagent Validation. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) *Real-Time PCR, An Essential Guide*, p. 85-101. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
12. Lee MA, Squirrell DJ, Leslie DL, Brown T. Homogeneous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) *Real-Time PCR, An Essential Guide*, p. 31-70. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
13. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial resarch. Indian J Med Res 2006;124:385-398.

- 14.** Persing DH, Hayden RT, Wittwer CT, Kusukawa N, Mitchell PS, Germer JJ, Patel R, Shepley DP, Wolk DM. Nucleic Acid Amplification Methods. In Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds.) *Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice*, p. 39-132. 2004. ASM Press, Washington DC, USA.
- 15.** Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, p. 21-34. 2001. Springer Verlag Berlin Heidelberg Newyork, Germany.
- 16.** Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY et al. An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 191-197.
- 17.** Sarıbaş Z, Yurdakul P, Alp A, Günalp A. Use of fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9:181-187.
- 18.** Saunders NA. An Introduction to Real-Time PCR. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) *Real-Time PCR, An Essential Guide*, p. 1-11. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- 19.** Saunders NA. Quantitative Real-Time PCR. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) *Real-Time PCR, An Essential Guide*, p. 103-123. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- 20.** Thelwell N, Millington S, Solinas A, booth J, Brown T. Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:3752-3761.
- 21.** Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *J Clin Virol* 2002; 25(S):13-21.
- 22.** Wittwer C. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, p. 1-8. 2001. Springer Verlag Berlin Heidelberg Newyork, Germany.