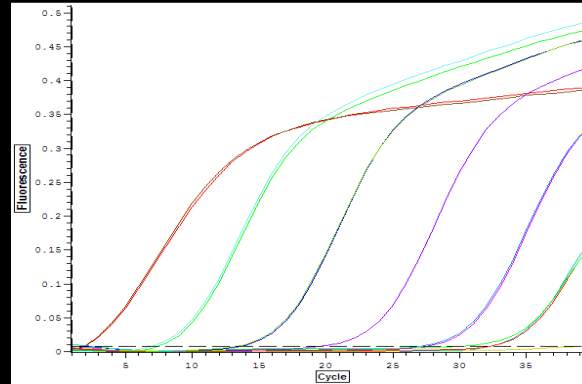
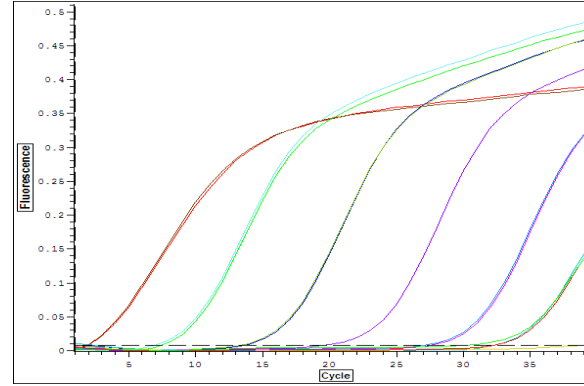




Real-Time PCR

David A. Palmer, Ph.D.
Technical Support, Bio-Rad Laboratories
Adjunct Professor, Contra Costa College



Real-Time PCR nedir? Ne için kullanılır?

Real-Time PCR nedir?

Işıma özelliğine sahip moleküller kullanarak PCR'ı oluşurken izleme ve miktar belirleme yöntemidir.

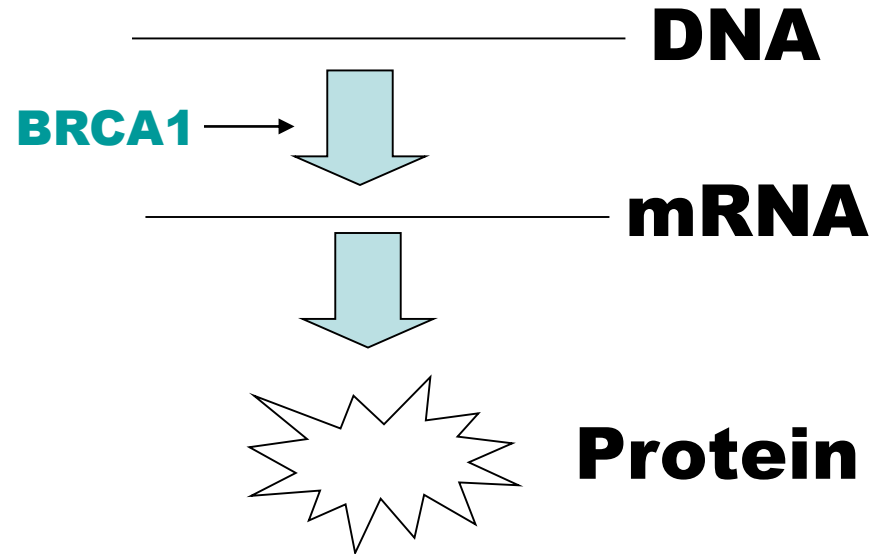
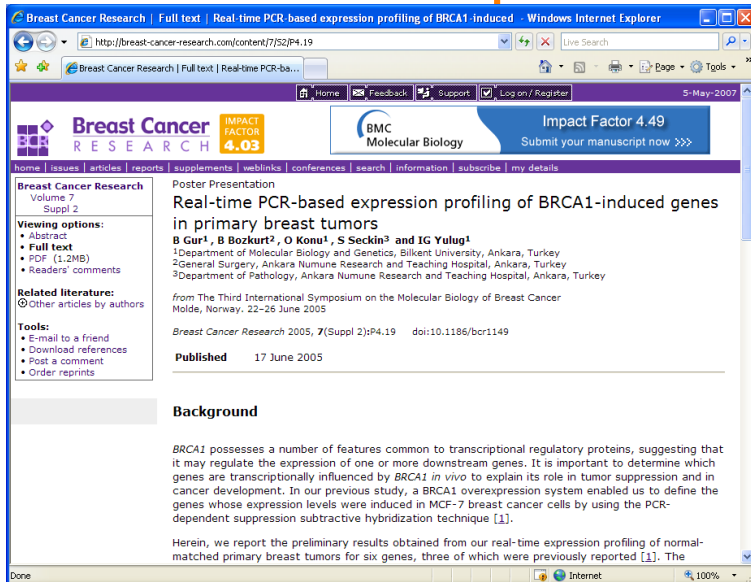
Real-Time PCR ne için kullanılır?

- **Gen ekspresyon analizlerinde**
 - Kanser araştırmasında
 - İlaç araştırmasında
- **Hastalık teşhisinde**
 - Virüs miktarının saptanmasında
- **Gıda testlerinde**
 - Gıdada bulunda GDO yüzdesini saptamada

Gen ekspresyon analizinde Real-Time PCR in

Örnek: BRCA1 Ekspresyon Profili

BRCA1, tümör supresyonunda rol oynayan bir gendir. BRCA1 diğer genlerin ekspresyonunu kontrol eder. BRCA1'in ekspresyon seviyesini izlemek için gerçek zamanlı PCR kullanılır.



Viral Hastalıklarda Real-Time PCR

Örnek: HIV teşhisi

HIV enfeksiyonu için ilaç tedavisi genellikle “viral yükün” izlenmesine bağlıdır. Gerçek Zamanlı PCR, hastadaki virüs RNA miktarının doğrudan ölçülmesine izin verir.

New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma

JCM Journal of Clinical Microbiology

Top 20 ASM Articles Viewed

Journal of Clinical Microbiology, October 2003, p. 4531-4536, Vol. 41, No. 10
0095-1137/03/508-00-0 DOI: 10.1128/JCM.41.10.4531-4536.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

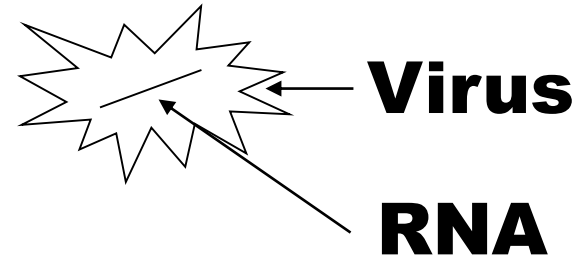
New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma

Sarah Palmer,^{1,2} Ann P. Wiegand,¹ Frank Maldarelli,¹ Holly Bazmi,² JoAnn M. Mican,³ Michael Polis,³ Robin L. Dewar,³ Angeline Plante,³ Shuying Liu,³ Julia A. Metcalf,³ John W. Mellors,² and John M. Coffin¹

HIV Drug Resistance Program, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, Maryland;¹ University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania;² Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland³

Received 27 March 2003/ Returned for modification 19 May 2003/ Accepted 10 July 2003

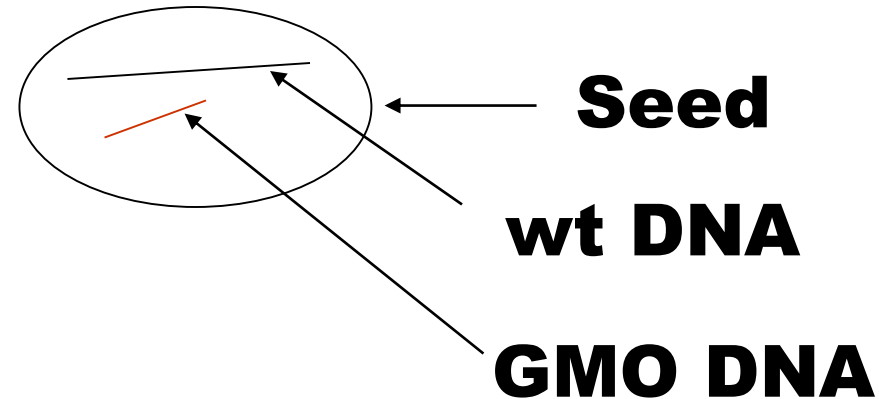
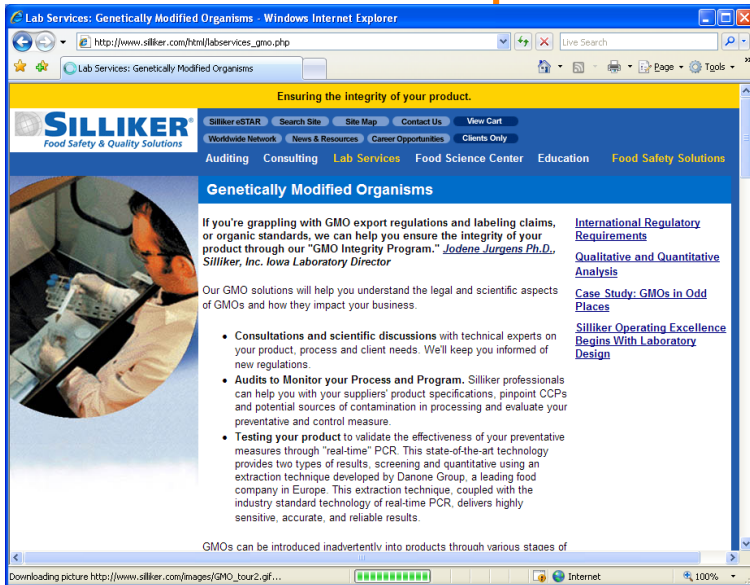
ABSTRACT



Gıda testlerinde Real-Time PCR

Örnek: **GDO'lu gıda içeriğinin yüzdesini belirleme**

Laboratuvarlar, transgenik ve yabancı tip DNA'nın miktarını ölçmek için Gerçek Zamanlı PCR kullanır.



Klasik PCR- Real-Time PCR

KLASİK PCR

→ PCR sonundaki ürünler (amplikonlar) saptanır; analiz edilir.

“REAL TIME PCR”

(GERÇEK ZAMANLI PCR)

→ PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır.

VS

Real Time PCR

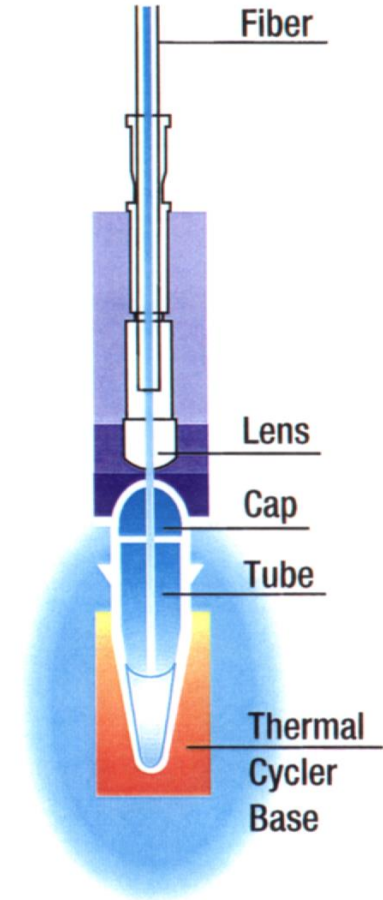
- **Kısa sürede sonuç elde edilir (yaklaşık 1 saat)**
- **PCR sonrası işlem yoktur.**
- **Mutajen olmayan floresan boyalar kullanılır.**
- **Kantitatif sonuç alınır.**
- **İlgili gene Spesifikliği yüksektir.**

Klasik PCR

- **Yaklaşık 4-5 saat sürede sonuç elde edilir.**
- **PCR sonrası elektroforezle görüntüleme yapılır**
- **Etidyum bromür mutajen boyası kullanılır.**
- **Kalitatif sonuç alınır.**
- **İlgili gene spesifikliği Real-Time PCR'ye oranla daha düşüktür.**

REAL-TIME PCR

- ❖ Tüp içinde oluşan fluorescence saptanır
- ❖ Amplifikasyon sırasında saptama yapılır



PRENSİP

• Real-time PCR'in Prensipleri

- ❖ Bir flöresan raportörün kantitasyonu ve tanısı üzerine kuruludur.
- ❖ PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (C_T - threshold cycle) hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılıdır.

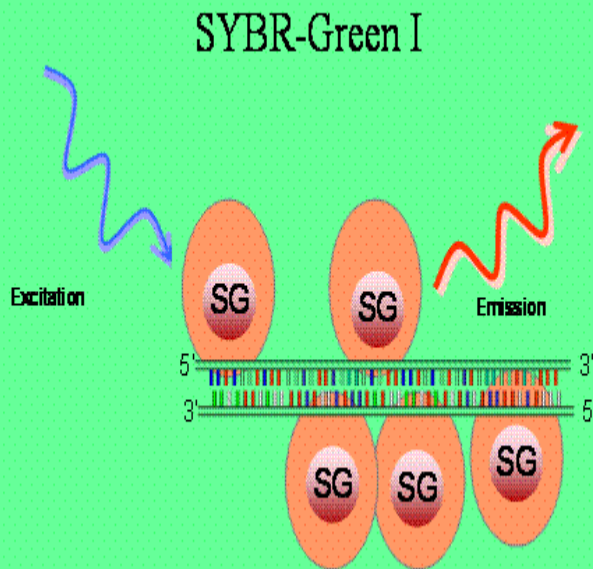
Floresan Prob Sistemleri

- ❖ **Hidrolizasyon problemleri**
 - **(TaqMan (PE Biosystem), Beacons, Scorpions)**
- ❖ **Hibridizasyon problemleri**
(Light Cycler (Roche))
- ❖ **DNA'ya bağlanan (binding) boyalar**
(SYBR Green)

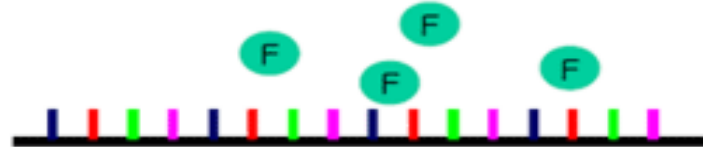
Sybr Green Floresan boya

- ☐ Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Cyber green I) kullanılarak, amlifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir.
- ☐ Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "cyber green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir.

SYBR GREEN



1. Denaturation Step



2. Annealing Step

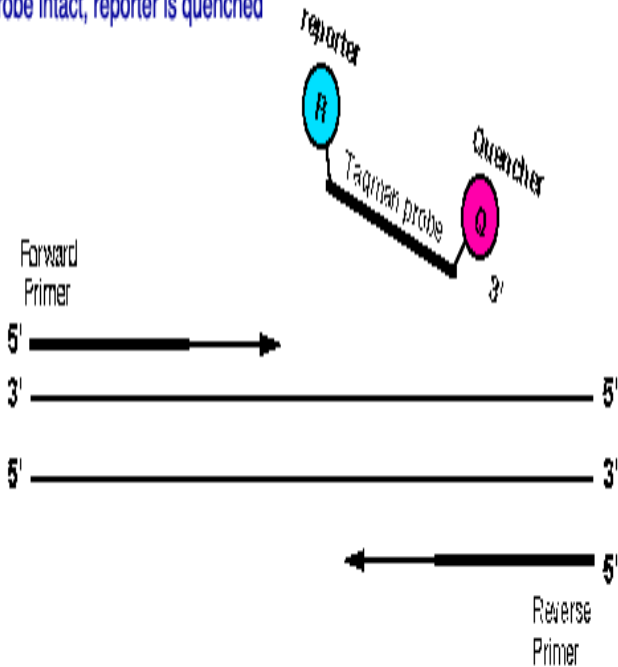


3. Extension Step



Taqman

Probe intact, reporter is quenched

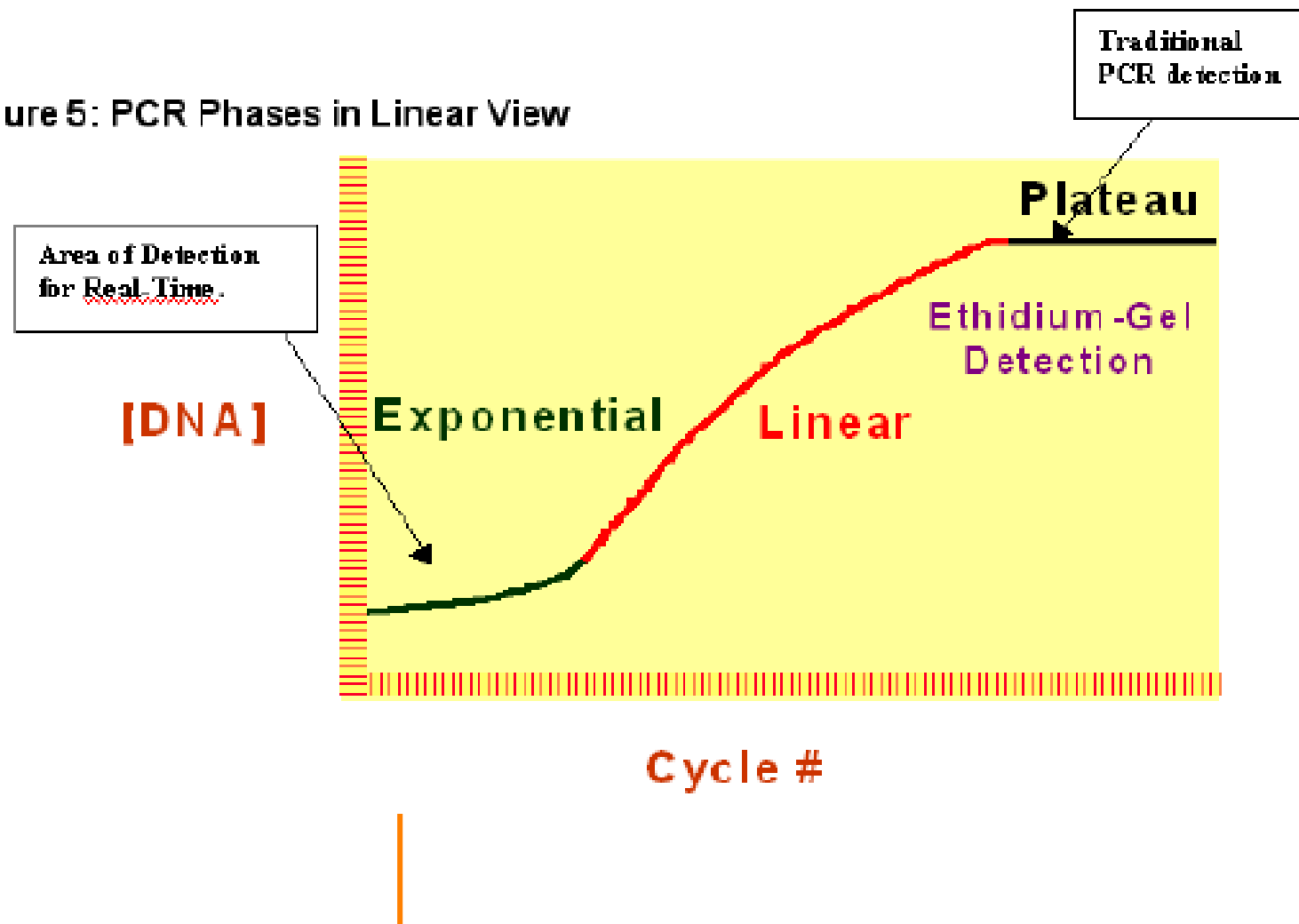


- TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır.
- Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır.
- Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir.
- Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur

PCR'in TEMEL FAZLARI

- ❖ **Exponential Faz**
- ❖ **Linear Faz (yüksek farklılık)**
- ❖ **Plateu Faz (End-point)**

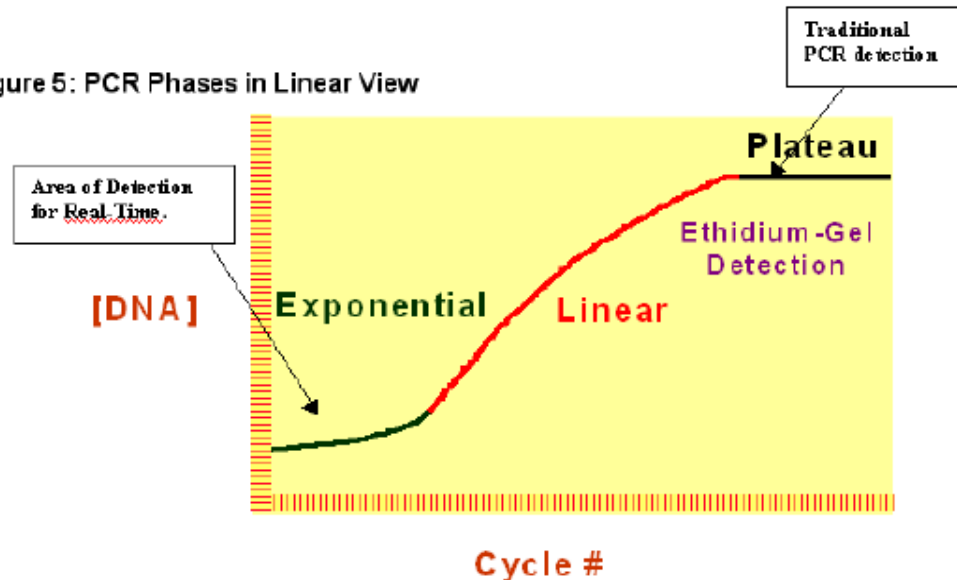
Figure 5: PCR Phases in Linear View



Exponential Faz

- ❖ PCR ürün miktarı her siklуста tam olarak iki kat artar
- ❖ Reaksiyon spesifik ve tamdır
- ❖ Reaksiyonun Etkinliği %100 dür
- ❖ Reaksiyonun tüm bileşenleri tazedir.

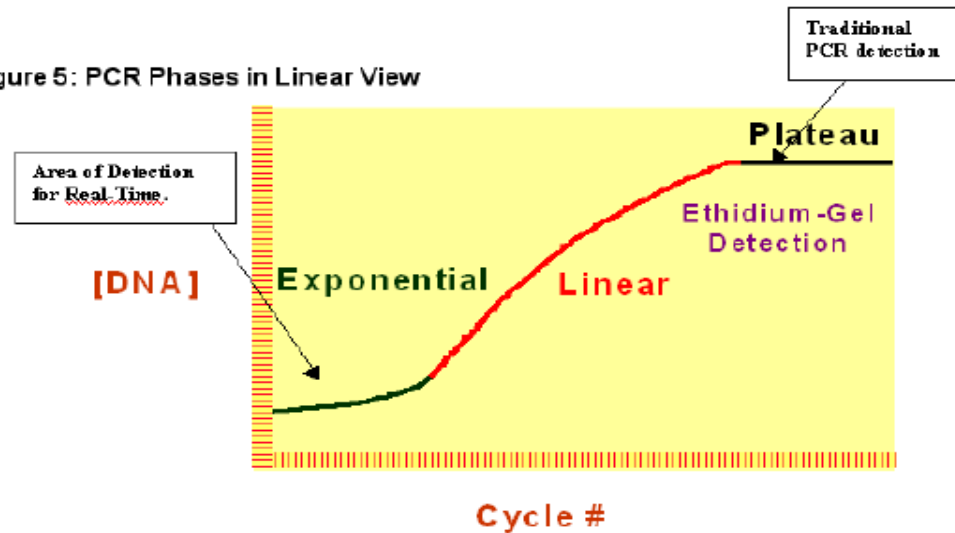
Figure 5: PCR Phases in Linear View



Linear Faz (yüksek farklılık)

- ❖ Reaksiyonun komponentleri tükenmeye başlar
- ❖ Reaksiyon yavaşlar
- ❖ Oluşan PCR ürünleri değrade olmaya başlar

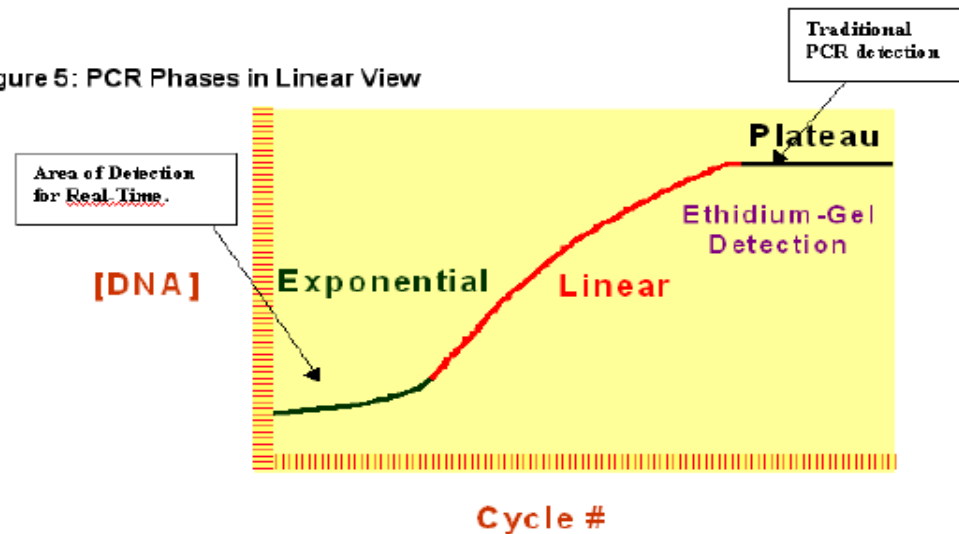
Figure 5: PCR Phases in Linear View



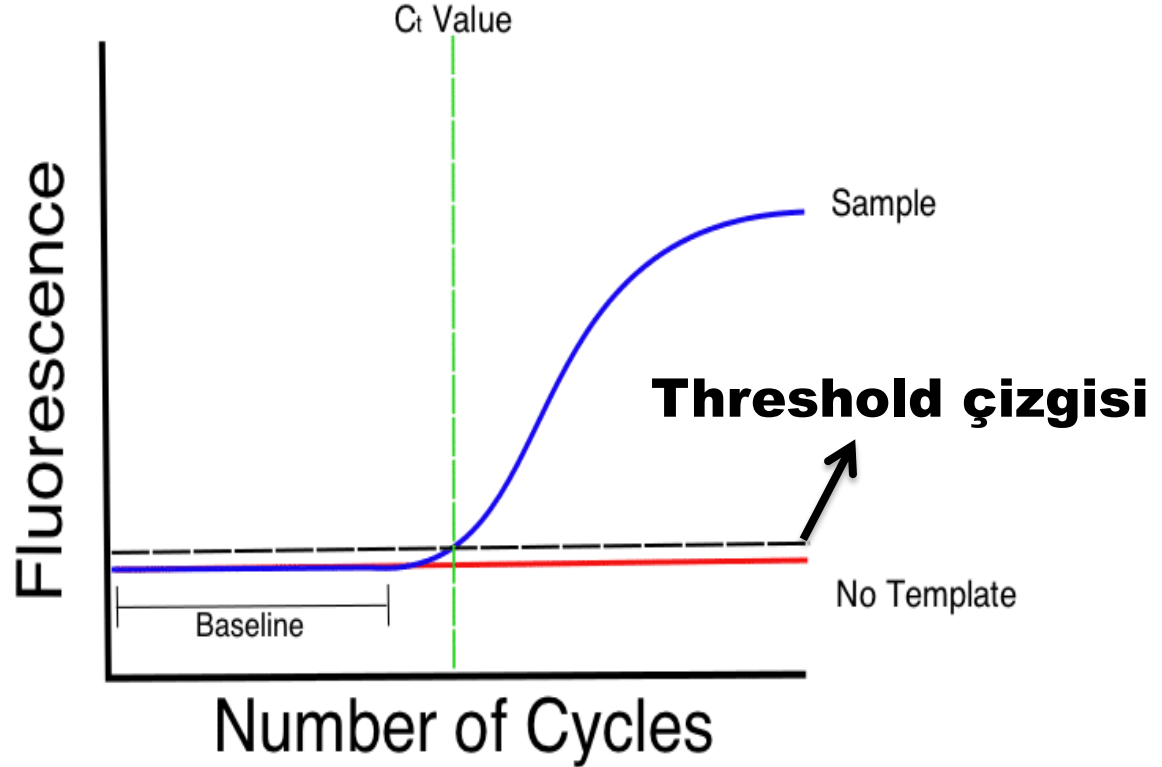
Plateau Faz (End- point)

- Geleneksel PCR larda jel bazlı tanı
- Reaksiyon sonlanmakta
- PCR ürünleri değrade olması artmakta

Figure 5: PCR Phases in Linear View



Ct değerleri, numunenizdeki nükleik asit miktarının ters ilişkilidir. Düşük Ct değerleri yüksek miktarda hedeflenen nükleik asidi gösterirken, yüksek Ct değerleri hedef nükleik asidin daha düşük (ve hatta çok az) miktarlarını ifade eder. Tipik olarak, 29 döngünün altındaki Ct değerleri bol nükleik asit gösterir ve 38 döngünün üzerindeki Ct değerleri minimum miktarları gösterir.



Imaging Real-Time PCR

Measuring Quantities



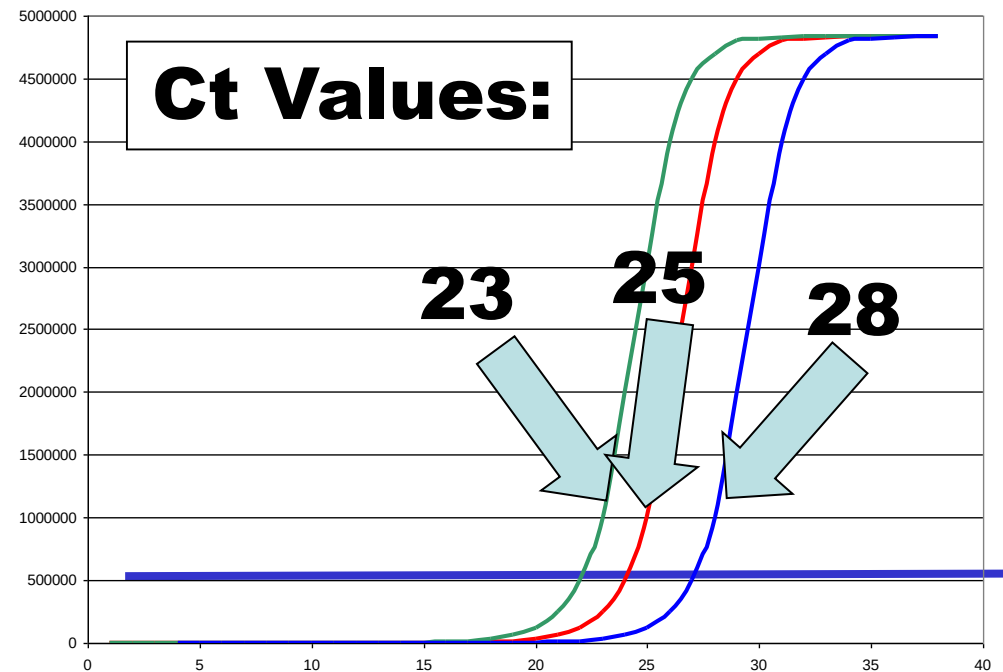
**4 units
Ct=23**



**1 unit
Ct=25**



**1/8 unit
Ct=28**



Imaging Real-Time PCR

Measuring Quantities

What if YOU started with EIGHT times LESS DNA template than I did?

Cycle 25 →

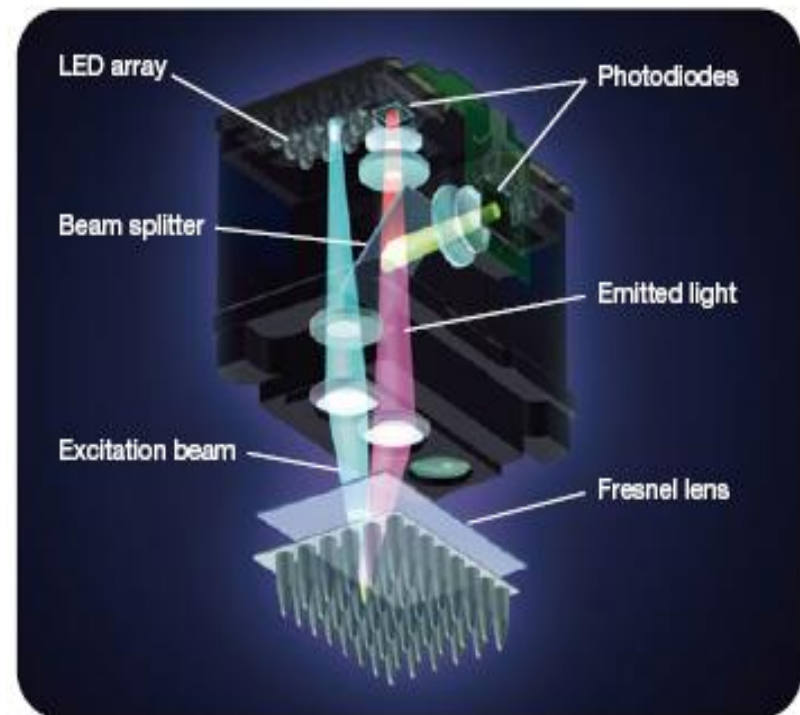


Cycle	Me	You
25	1,000,000	125,000
26	2,000,000	250,000
27	4,000,000	500,000
28	8,000,000	1,000,000

Gerçek Zamanlı PCR ile Ne Tür Cihazlar Kullanılır?

Gerçek zamanlı PCR cihazları ÜÇ ana bileşenden oluşur:

- 1. Termal Döngüleyici (PCR makinesi)**
- 2. Optik Modül (çalışma sırasında tüplerdeki floresanı tespit etmek için)**
- 3. Bilgisayar (floresan verilerini anlamlı sonuçlara çevirmek için)**



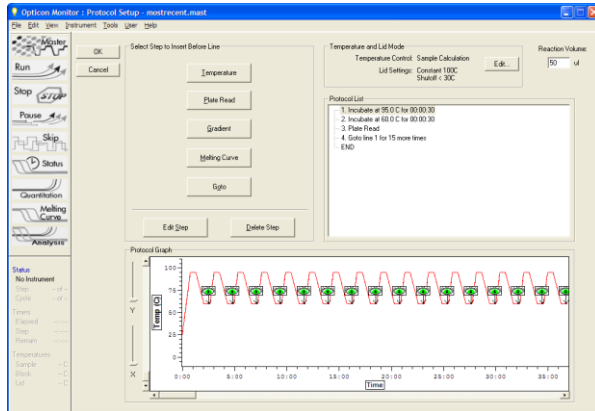
Gerçek Zamanlı PCR ile Ne Tür Yazılım kullanılır?

Gerçek zamanlı yazılım, her kuyucuktaki floresan sinyalleri anlamlı verilere dönüştürür.

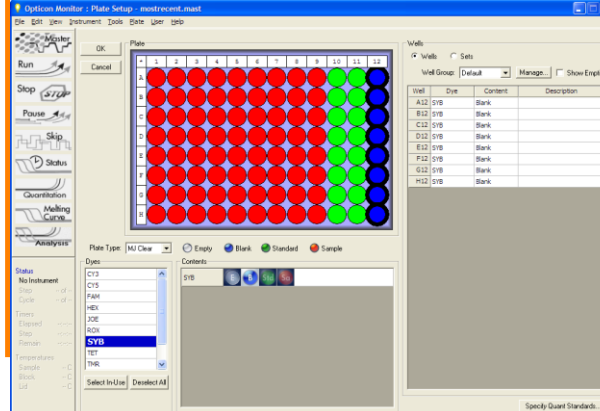
1. PCR protokolünü ayarlama.
2. Plaka düzenini ayarlama.
3. Veri toplama.
4. Veri analizi.



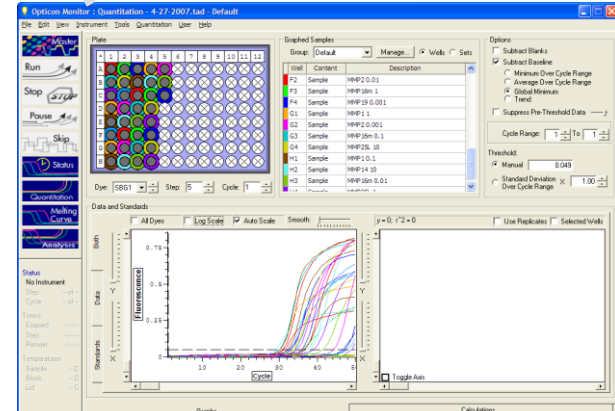
1

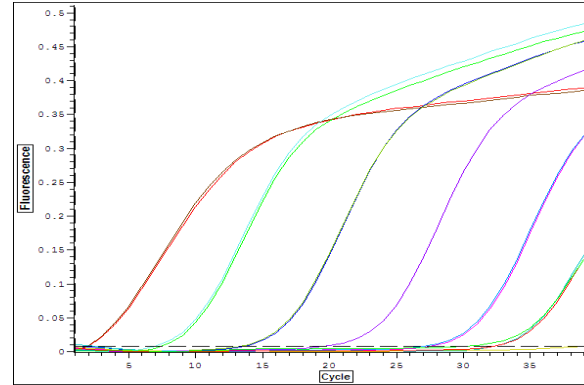


2



3,4





Gerçek zamanlı veriler neye benziyor?

Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek Veriler

- Bu grafik gerçek zamanlı PCR çalışmasından elde edilen bazı gerçek verilerdir.
- Bunun gibi veriler, bir seyreltme DNA dizisi hazırlanarak kolayca üretilebilir.

