



“Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları

Tuba GÜNEL¹

Kılıç AYDINLI²

¹Istanbul University Faculty of Science Department of Molecular Biology and Genetics, 34134, Vezneciler/Istanbul

²Istanbul University, Cerrahpasa Faculty of Medicine, Istanbul

*Corresponding Author

e-mail: gunel@istanbul.edu.tr

ÖZET

Adının da belirttiği gibi gerçek zamanlı PZR sistemi bir PZR reaksiyonu oluşurken monitörden izlenilmesidir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisi çok sayıda cihaz seçeneği ve floresan prob sistemi ile son zamanlarda gelişmiştir.

Gerçek zamanlı PZR teknolojisinin sahip olduğu teknik özellikler onu geniş bir uygulama alanında kullanım imkanı sağlamıştır. Kapalı bir tüpte gerçekleşen polimeraz zincir reaksiyonu için floresan yöntemlerinin geliştirilmesi nükleik asit miktarını belirlenme sürecini çok büyük ölçüde basitleştirmiştir. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu uygulamaları: kantitatif mRNA anlatım çalışmalarını, genomik veya viral DNA'ların DNA kopya sayısı ölçümlerini, allellerin ayırımını veya SNP genotiplerini, ilaç tedavisinde etkinliği, DNA hasar ölçümlerini içermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gerçek zamanlı PZR, floresan boyalar, uygulamalar

Real-Time PCR and Applications Area

ABSTRACT

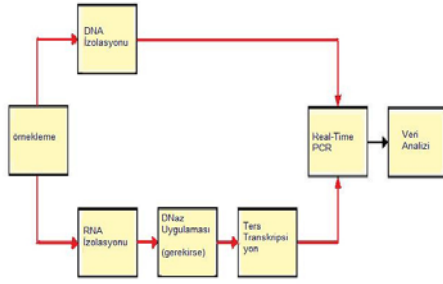
As the name suggest, real-time PCR is a technique used to monitor the progress of a PCR reaction in real-time. Quantitative real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) technology is many alternative instruments and fluorescent probe systems have been developed recently. The technique of real-time PCR has features that make its use advantageous in a wide range of applications. The development of fluorescent methods for a closed tube polymerase chain reaction has greatly simplified the process of nucleic acid quantification. Real-time PCR applications include: quantitative mRNA expression studies, DNA copy number measurements in genomic or viral DNAs, allelic discrimination assays or SNP genotyping, drug therapy efficacy, DNA damage measurement.

Key Words: Real-time PCR; fluorescent dyes; applications

GİRİŞ

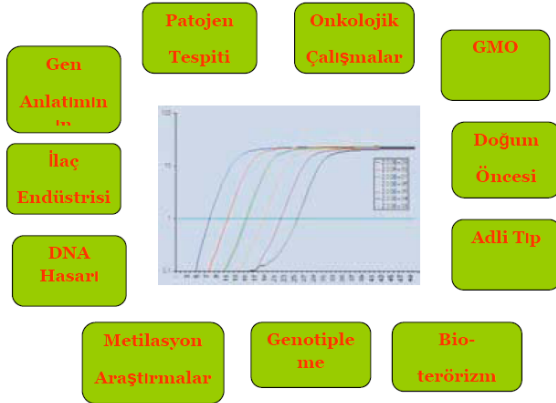
“Real-time PCR” teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir (Şekil 1). Floresan ışımaya tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen “PCR” geliştirilerek oluşturulan teknik gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır[1].

“PCR” çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla “Sayımsal Gerçek Zamanlı –Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)”, “İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)”, “Floresan Sayımsal RT-PZR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir [2].



Şekil1. Real-Time PCR çalışma akışı

Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşma ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir. Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyalle çalışırken çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç duyulur. "Real-time PCR" metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir. Gen anlatımlarının sayısal bir değerle belirtilmesi bir hücre topluluğundaki heterojeniteden dolayı bu teknolojinin keşfinden önce güvenilir değildi. Çok farklı hücre tiplerinden oluşmuş dokuların dış uyaranlara farklı şekilde yanıt verdiği ve hastalıklardan farklı şekillerde etkilendiği düşünülmektedir. Biyolojik fonksiyonların yanında karmaşık düzenleme mekanizmalarının arındaki fizyolojiyi tam olarak anlayabilmek için her hücre tipinin ayrı olarak çalışılması gerekmektedir. Hücrelerin bireysel olarak transkripsiyon aktivitesi ancak çok yüksek duyarlılık içeren yöntemler ile ortaya çıkarılmaktadır. "Real-time PCR" teknolojisinin son 5 yılda kullanımı muazzam bir şekilde artmıştır (Şekil 2).



Şekil2. Real-Time PCR'in uygulama alanları

Buna bağlı olarak primer ve prob çeşitlerinin artması ve kalitesinin iyileştirilmesini de söz konusudur. Ticari firmalar farklı floresan tespit stratejileri geliştirmekte ve oluşturulan kit sayısı hızla artmaktadır. Bu tekniklerin ve kullanılan kimyasal belirteçlerin çeşitlenmesi araştırmalara ve klinik çalışmalara da yansımaktadır[3].

"Real-time PCR" Teknolojisinin Uygulama Alanları

Patojenlerin Tespiti: Virüsler, bakteriler, bazı mantar türleri insanda, hayvanlarda ve bitkilerde patojenite yaratan çok önemli bir gruptur. Enfeksiyon hastalıklarında patojenlerin saptanmasında diziye özgü floresan problemler sayesinde "Real time PCR" klinik laboratuvarlarında tercih edilen ve rutin uygulamada kullanılan bir metod haline gelmiştir. Ayrıca viral genomun sayısal değerinin belirlenmesi hastalığın etki derecesinin saptanmasında ve tedavisinde çok büyük önem taşımaktadır. Yöntem kemik iliği nakillerinde ve organ transplantasyonunda özellikle cytomegalovirus (CMV), hepatit B, C ve HIV açısından taramalarda en güvenilir yöntem olarak kullanılmaktadır[4].

"Real-time PCR" teknolojisi ile çok sayıda önemli mikrobiyal patojen tanımlanmıştır. Antibiyotiklere dirençli olan bazı türlerin tespiti yapılmıştır. Vanamisine dirençli Enterococcus faecalis'den E. Faecium, çok yaygın bir patojenite etkeni olan Candida'nın bazı önemli türleri belirlenerek bu enfeksiyon ajanlarına özgü floresan primer ve problemler geliştirilmiş ve tanıda kullanılmaya başlanmıştır.

Besinlerin çeşitli patojenlerle kontaminasyonu önemli bir sağlık sorunudur. Hızlı ve güvenilir bir yöntemle besinlerde kontaminasyon varlığının belirlenmesi besin kalitesi için çok önemli kriterdir. Besin yoluyla bulaşan hastalıkların önlenmesinde bu yöntem yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Onkolojik Çalışmalar: "Real-time PCR" kanser araştırmalarında ve tanısında çok önemli bir yer kaplamaktadır ve önemi daha da artacaktır. Minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması lösemi ile çalışan kliniklere büyük katkı sağlamaktadır. Farklı çalışmalardan elde edilen özgün genlerin düzeylerinin belirlenmesi ile tedavi protokolleri değişmektedir. Bazı lösemi türleri kromozomlar arasındaki translokasyonlarla karakterizedir. 15. kromozomun üzerinde yer alan pml geni ve 17 kromozom üzerindeki RaRalpha geni arasındaki bir translokasyon sonucunda akut promiyelositik lösemi (APL) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu hastalığa neden olan mRNA saptanması APL hastalarının tedavisine hız kazandırmıştır [5].

Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GMO) : Marketlerde yer alan özellikle mısır buğday ve soya fasulyesi gibi besinlerin % 60'ının GMO olduğu tartışılmaktadır. Moleküler genetik yöntemlerle organizmalara istenilen çeşitli genlerin transferi yiyeceklerin raf ömrünü uzatabilmekte ve görüntülerini satış açısından daha cazip kılmaktadır. Ticari olarak mevcut olan "Real-Time PCR TaqMan" prob ve "FRET" prob kitleriyle transgenler başarılı bir şekilde özellikle mısırdaki ve soya fasulyesinde tanımlanabilmektedir[6].

Doğum Öncesi (Prenatal) Tanı Çalışmaları: Prenatal Tanı büyük oranda invaziv girişimler ile (amniyosentez, CVS, kordosentez, fetal cilt biyopsisi) elde edilen fetal doku örneklerinde yapılmaktadır. Bu girişimlerin çok az da olsa fetal kayıp (abortus), düşük riskleri vardır. Bir riski araştırırken sağlıklı bir bebeğin kaybına neden olunması aileleri ve doktorları sıkıntıya

sokmaktadır. Bu nedenler ile Prenatal Tanı'yı fetal kayıp riski olan invaziv bir girişim ile yapmak yerine , fetal kayıba yol açmayan ve aynı oranda güvenilir sonuç veren non-invaziv bir işleme yapabilmek konusu uzun yıllardır çok sayıda araştırmannın konusu olmuştur[7].

Anne kanından bebeğe ait (fetal) hücre ve DNA'ların elde edilerek Prenatal Tanı'nın bu hücre ve DNA'larda koyulması bu alandaki büyük başarılarından biridir. Anne kanında dolaşan bebeğe ait genetik materyalin invaziv yöntemlere göre daha kolay elde edilebilmesi ve moleküler yöntemlerle incelenebilmesi bir takım genetik hastalıkların erken dönemde risksiz bir şekilde tanınabilmesinin yolunu açmıştır[8].

"Real-Time PCR" ile maternal kandaki serbest fetal DNA'da Y kromozoma özel gen dizilerinden oluşan floresan problemler ile fetal cinsiyet tayini güvenilir bir şekilde yapılmaktadır. Özellikle cinsiyete bağlı hastalıkların tanısında yöntem kullanılmaktadır. Özellikle anne kanındaki fetal hücrenin sayısal değerinin belirlenmesi ile bazı gebelik komplikasyonları arasında bağlantı kurulmuştur. Anne ve bebek ölümlerinin en sık sebeplerinden biri olarak görülen preeklamside anne kanındaki fetal hücre artışına neden olduğu bir çok çalışmayla ortaya koyulmuştur. Bu teknoloji sayesinde gebelerde preeklamsi gelişip gelişmeyeceği hakkında ön bilgi edinilebilmektedir[9].

Son yıllarda, Rh uyumsuzluğunun doğum öncesi tanısında da gelişmeler olmuştur. Real-time PCR'nin geliştirilmesiyle, fetüsün RhD genotipinin hızlı, güvenilir ve hassas olarak belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Yeni doğanın hemolitik hastalığı (eritroblastosis fetalis), anne ve babanın kan gruplarının Rh antijeni yönünden uyumsuzluğuna bağlı olarak çocuklarında gelişen klinik bir tablodur. 1. kromozomda bulunan RhD tarafından şifrelenen RhD antijeni, kişilerin Rh (-) negatif ya da Rh (+) pozitif olmasını belirlerken, bu uyumsuzluk, fetüsün anne rahminde ölmesi, anemi veya sarılıklı olarak doğması sonuçlarını doğurabilir.

Real-time PCR analizi, eşi RhD geni bakımından heterozigot olan Rh antijenine duyarlı olan Rh (-) negatif gebe kadınların tedavisi için çok yararlıdır. Bu test sonucunda, fetüsün Rh (-) negatif çıkması durumunda, Rh immunizasyonu açısından risk altında olmadığını saptanabilir. Diğer taraftan, fetüsün Rh (+) pozitif çıkması durumunda, tıbbi açıdan yapılacak uygulamalar planlanır. Testin çok kısa sürede sonuç veriyor olması, zamanla yarışılan gebelik periyodunda bir avantajdır [10].

KAYNAKLAR

- [1] Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. Trends Mol. Med., 8: 257-260.
- [2] Kubista., 2008. M. Emerging real-time PCR applications. Drug Discovery Word summer, 57-66.
- [3] Bustin SA, Mueller R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and potential use in clinical diagnosis. Clin. Science 109, 365-379.

[4] Brunk C.F., Li J., Avani-Aghajani E. 2002, Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction. Curr Issues Mol Biol.4: 13-18.

[5] van der Velden, VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ., 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches and laboratory aspects. Leukemia, 17: 1013-1034.

[6] Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H., 1999. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. Journal of virological methods. 77: 37-40.

[7] Ganong, WF., 2005. Review of Medical Physiology, 22nd ed., McGraw-Hill, USA, 0-07-144040-2.

[8] Cacherill FR, Uhl JR., 2001. Applications and challenges of realtime PCR for the clinical laboratory., In: Reischl U., Wittwer C., Cockerill F.R., eds., Rapid cycle real-time PCR, Methods and applications, 1st ed., Germany: Heidelberg, p.11.

[9] Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W., 2008. Genes and the preeclampsia syndrome. J Perinat Med. 36(1):38-58.

[10] Goebel JC, Soergel P, Pruggmayer M, Mühlhaus K, Stuhmann M, Scharf A. 2008. Prenatal diagnosis of the Rhesus D fetal blood type on amniotic fluid in daily practice. Arch Gynecol Obstet. 277: 155-160.