

Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”

QUANTITATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION “REAL-TIME PCR”:
SCIENTIFIC LETTER

Dr. Tuba GÜNEL^a

^AMoleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), İSTANBUL

Özet

Gerçek zamanlı kantitatif PCR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. Bu teknoloji “kinetic PCR” ve “homogenous PCR” isimleriyle de tarif edilmektedir. “Real-time PCR”da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA’ya bağlanan “SYBR-Green I” floresan boya en basit metottur. “SYBR-Green I” boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metottur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar “TaqMan @ probe” veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. “Real-time PCR”ın kullanımında birçok avantajlar vardır. “Real-time PCR”ın tipik kullanım alanları patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda “real-time” immüno PCR ile protein belirlemesidir. Ticari olarak satılan birçok “real-time” cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasitele-ridir. “Real-time PCR” teknolojisinin, kullanıcılar tarafından tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır. Gen ekspresyo-nunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken olması tercih edil-mesinin sebebidir.

Anahtar Kelimeler: Polimerize zincir reaksiyonu;
sayısal analiz

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27:763-767

Abstract

Real-time quantitative PCR is the current method of choice for quantifying nucleic acids. Other descriptions of this technology include “kinetic PCR” and “homogeneous PCR”. In real-time PCR, the amount of product formed is monitored during the course of the reaction by monitoring the amount of fluorescence from stains or the amount of probes introduced into the reaction, that increase proportional to the amount of product formed and the number of amplification cycles required to obtain a particular amount of DNA molecules is registered. The simplest method involves the detection of DNA-binding fluorescent stain, such as SYBR Green. This stain binds to any double-stranded DNA in the reaction. Although SYBR Green detection works very well, it may give rise to fluorescence signal in the presence of any double stranded DNA including primer-dimers product. The other three methods rely on the hybridization of fluorescence-labeled probes to the correct amplicon. These include real-time amplicon detection technologies such as Taqman or hydrolysis probes, molecular beacon technology and hybridization probes. Real-time technology has a number of advantages. Typical uses of real-time PCR include pathogen detection, gene expression analysis, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, analysis of chromosome aberrations, and most recently protein detection by real-time immuno PCR. There are currently several real-time thermocyclers on the market. The main differences between them are the excitation and emission wavelengths that are available, speed, and the number of reactions that can be run in parallel. The importance of real-time PCR is increasing in various fields of investigation. The major reason of choice is that it is one of the most sensitive, efficient, rapid, and reproducible methods of measuring gene expression.

Key Words: Polymerase chain reaction;
quantitative structure-activity relationship

Real-Time PCR

Real-time PCR DNA’nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygula-

maya konulan popüler bir metottur.¹ Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilen yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir.²

Geliş Tarihi/Received: 19.10.2006 Kabul Tarihi/Accepted: 06.12.2006

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Tuba GÜNEL
İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik
Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, İSTANBUL
Moleküler Biyoloji ve Genetik,
gunel@istanbul.edu.tr

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27

763

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur.³

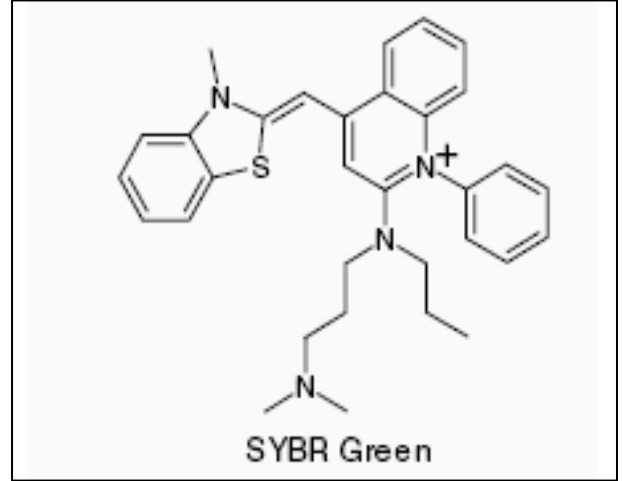
Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; "Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000", "Applied Biosystems 7300 ve 7500", "Chromo4", "Smart Cycler", "Rotor-Gene", "LightCycler" en fazla kullanılanlardır.⁴

Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green I

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder (Şekil 1).³

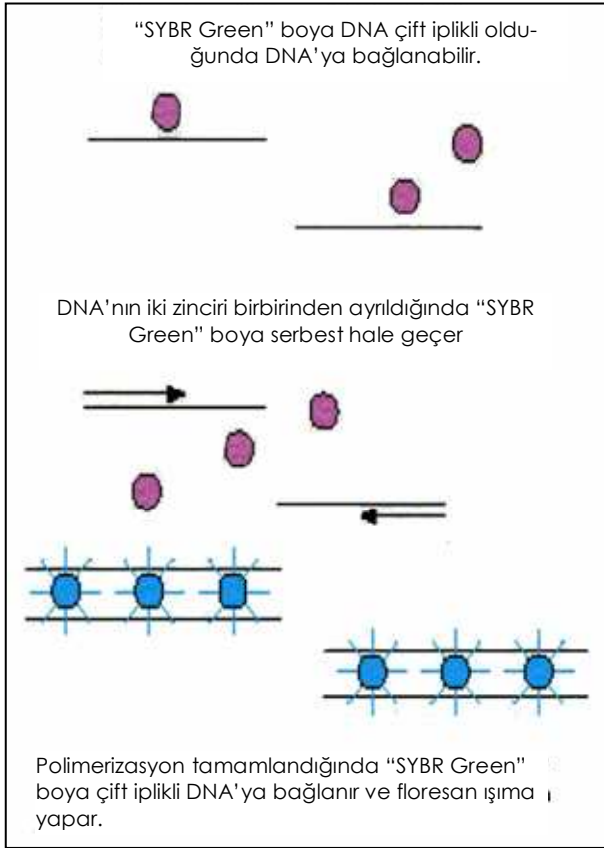
Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir.³

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Flo-



Şekil 1. Asimetrik siyanin boya SYBR Green I'in kimyasal yapısı.³

san işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığına primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacaktır. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Şekil 2).⁵



Şekil 2. "SYBR Green I" yöntemi.⁵

Özgül Belirleme Sistemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli probler kullanılır. Bu tekniklerin başında "TaqMan" prob, "Molecular beacon", "Light-up" prob, hibridizasyon prob ve "Scorpion" primer gibi floresan işaretli probler kullanılarak yapılanlardır.

"TaqMan® Probe" Yöntemi

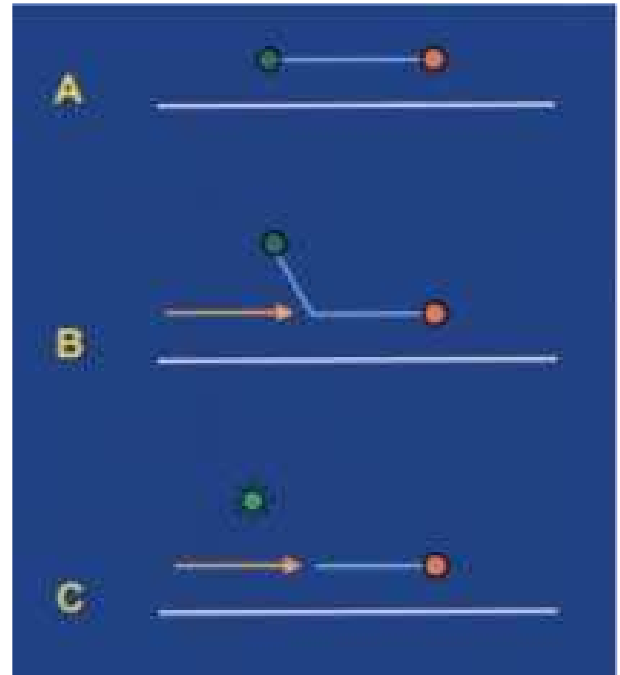
"TaqMan® probe" yöntemi "Double-Dye Oligonucleotide", "dual labeled probe" veya "5' nuclease probe" olarak da adlandırılmaktadır. "TaqMan® probe" yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA). 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyası-

nın sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında "Taq Man" probler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder (Şekil 3).⁶

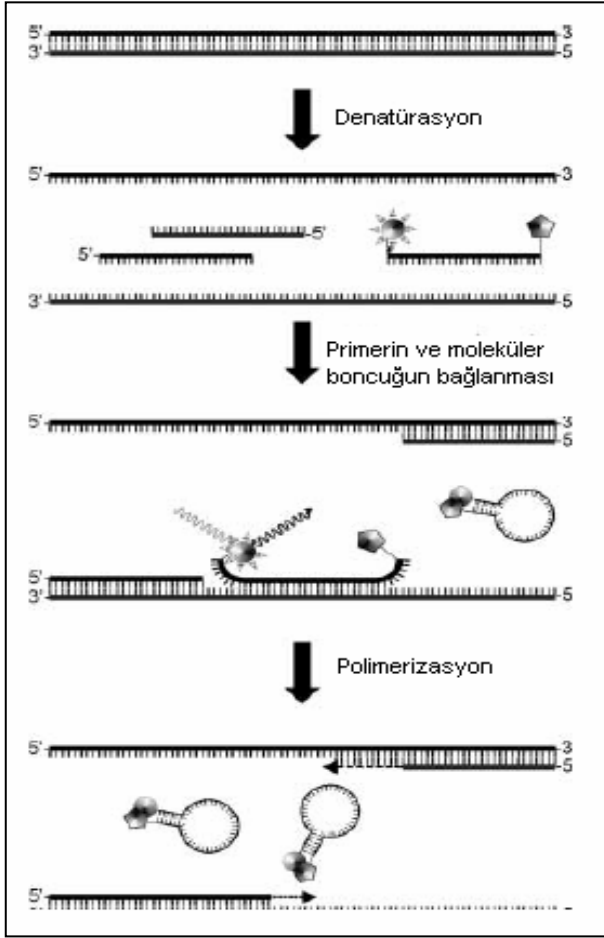
"TagMan® probe" yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşabildiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır.⁷

Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile "TagMan® probe" ve "SYBR Green I" yönteminden çok farklıdır.^{2,8} Saç tokası

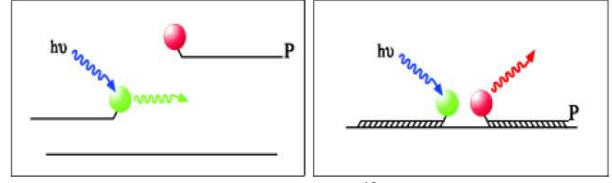


Şekil 3. TaqMan prob yöntemi.⁶



Şekil 4. Moleküler boncuk yöntemi.⁸

şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışığa yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Bu teknikte oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 4).⁸



Şekil 5. Hibridizasyon prob yöntemi¹⁰

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalarıdır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışımaya elde edilemez.^{2,8}

Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından "LightCycler®" PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir.^{9,10} İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donör), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji "donör" boyadan "acceptor" boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (Şekil 5).⁹

KAYNAKLAR

1. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
2. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
3. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
4. Kubista M, A Stalberg A, Bar T. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari R, Tan W, eds. *Genomics and Proteomics Technologies*. 1st ed. Proceedings of SPIE; 2001.p.53-8.
5. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.

6. Cacherill FR, Uhl JR. Applications and challenges of Real-Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications. 1st ed. Germany: Heidelberg; 2001. p.11.
7. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. J Virol Methods 1999;77:37-46.
8. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol 1996;14:303-8.
9. Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCyclerTM hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. Biochemica 1999;1:5-8.
10. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 1997;22:130-1, 134-8.