

# REAL TIME (GERÇEK ZAMANLI) PCR

**Doç. Dr. Demet Cansaran DUMAN**

## PCR

- PCR, dizisi bilinen özgün bir DNA bölgesinin, in-vitro koşullarda enzimatik olarak çoğaltılması (amplifiye edilmesi) için kullanılan bir tekniktir.
- İlk kez 1985 yılında Karry Mullis ve Randall Saiki tarafından geliştirilmiştir.
- Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır.

## PCR

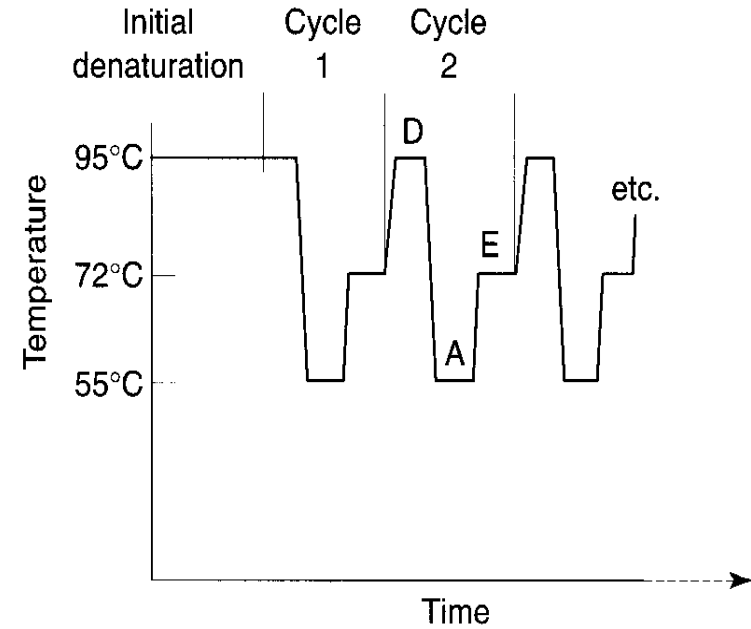
PCR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır.

- **1.Denatürasyon;** DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile (94-98 °C) birbirinden ayrılmasıdır.
- **2.Annealing (Hibridizasyon);** Sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanmasıdır. 37-65 °C' de gerçekleşir.
- **3.Elongasyon (Uzama);** Taq DNA polimeraz, kalıp DNA'ya primerlerin 3' ucundan başlayarak, ortamda bulunan serbest dNTP'lerden uygun olanları ekler. Böylece orijinal kalıp DNA'nın aynısı sentezlenmiş olur. 72 °C' de gerçekleşir.

# PCR

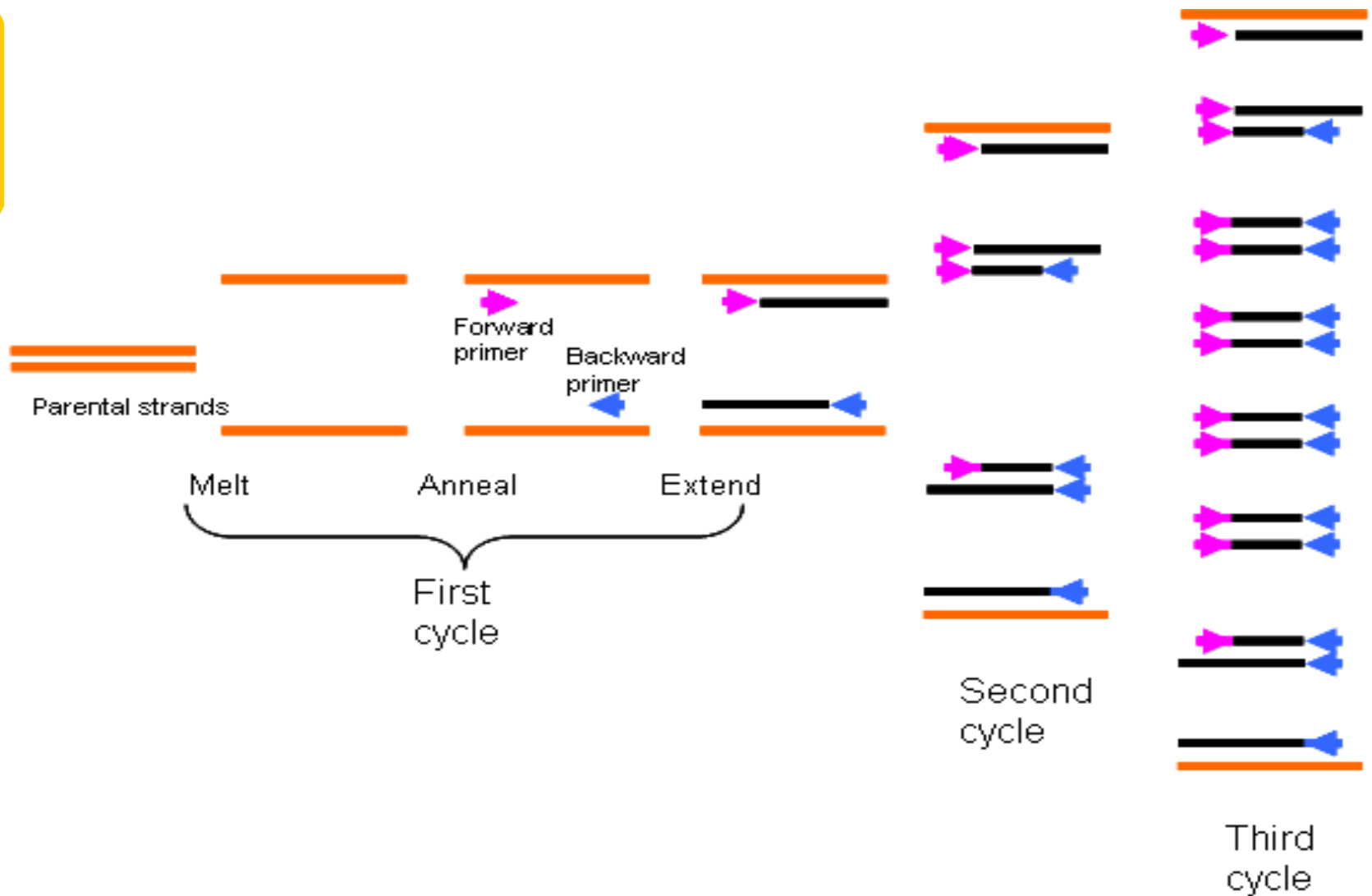
Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR reaksiyonu;

- 1. Denatürasyon ( $94^{\circ}\text{C}$ - $98^{\circ}\text{C}$ )
- 2. Annealing ( $37^{\circ}\text{C}$ - $65^{\circ}\text{C}$ )
- 3. Elongasyon (Uzama) ( $72^{\circ}\text{C}$ )



Bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına esasına dayanır.

# PCR



## PCR Amplifikasyonu

Başlangıçta ürün PCR siklusları ile eksponansiyel (üssel) olarak artış gösterir.

**P**: Ürün (**P**roduct)

**n**: Siklus sayısı

**T**: Başlangıçtaki DNA sayısı(**T**emplate)

$$P = (2)^n T$$

PCR ürünü başlangıçtaki DNA sayısına bağlıdır.

## PCR Verimliliği

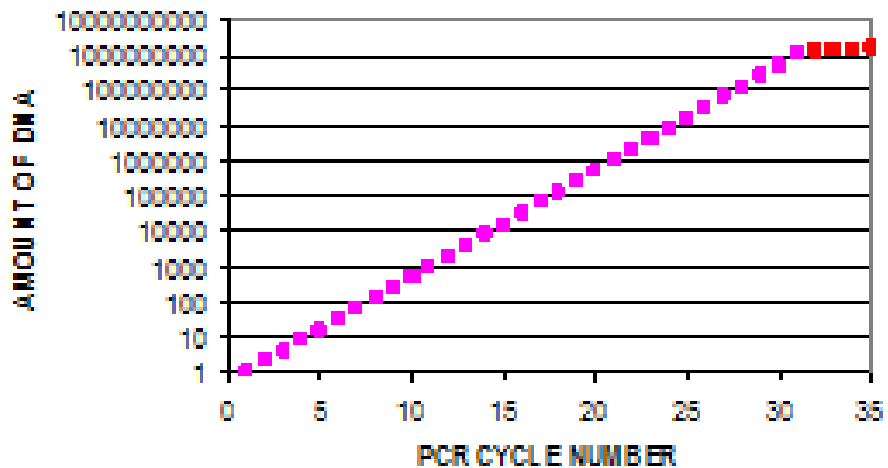
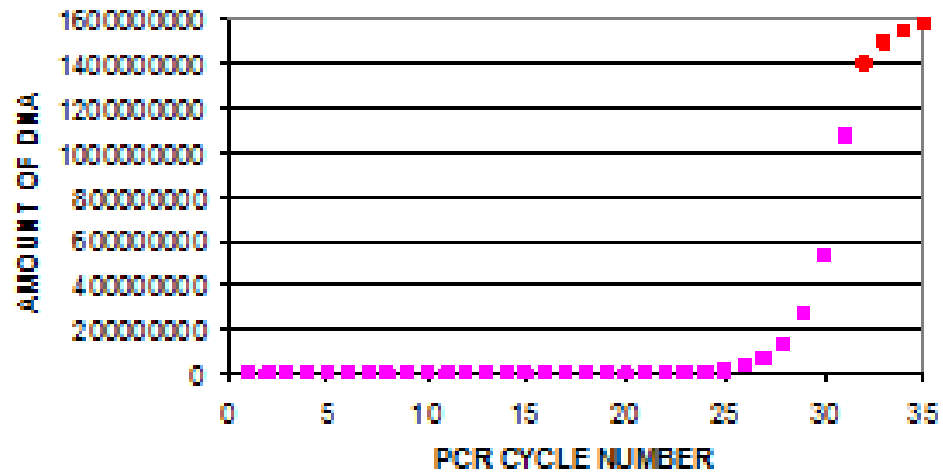
PCR ürünleri her bir siklusta tam olarak iki katına ulaşamazlar.

$$P = T(1 + E)^n$$

***E*** = PCR verimliliği (***E***fficiency)

- ✓ Verimlilik tipik olarak % 80-90'dır.
- ✓ Kısa PCR ürünleri daha yüksek verimle çoğalır.

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000





# PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

- PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenir.
- Reaksiyon tüplerinden alınan örnekler bromo fenol mavisini ile karıştırılarak etidyum bromür içeren agaroz jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenir.
- Elektroforez sonunda örnekler UV ışık altında gözlenir.

## PCR Varyasyonları

---

- Touchdown PCR
- Hot start PCR
- Multipleks PCR
- Nested PCR
- **Real-Time PCR**
- Kısmi Nested PCR
- Koloni PCR
- Arbitrary PCR
- Reverse Transcriptaz PCR

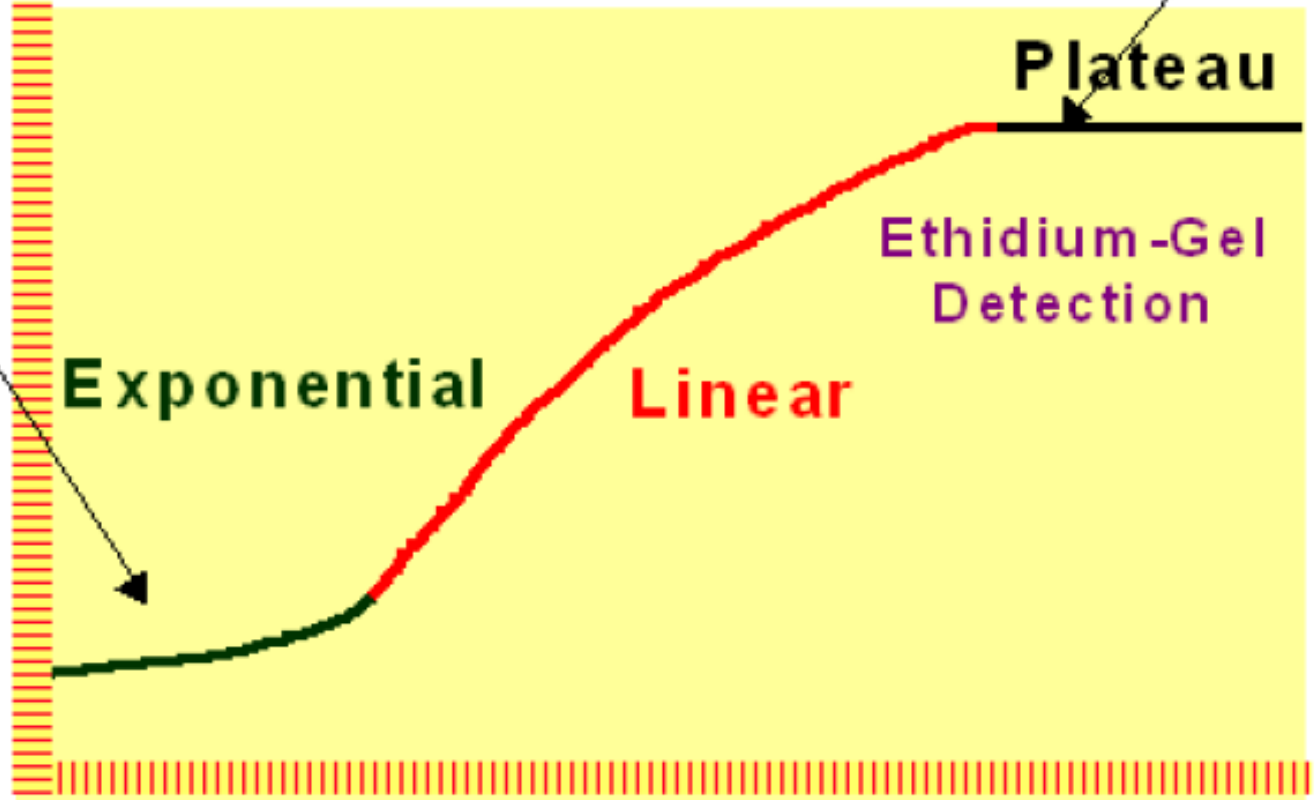
Klasik PCR için  
tespit bölgesi

Traditional  
PCR detection

qRT-PCR için tespit  
bölgesi

Area of Detection  
for Real-Time.

[DNA]



Cycle #

## Real Time PCR

PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan cihazların günümüz teknolojisi ile yeniden yapılandırılması sonucunda **Real-Time PCR** olarak adlandırılan yeni bir yöntem gelişmiştir.



*In vitro* Amplification

## Real-Time PCR

---

- PCR amplifikasyonunu görünür hale getirir ve moniterize eder.
- Floresan işaretli proplar veya interkalatör boyalar kullanılır.
- Oluşan DNA (amplikon) ile doğru orantılı floresan meydana gelir.
- On-line izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir.

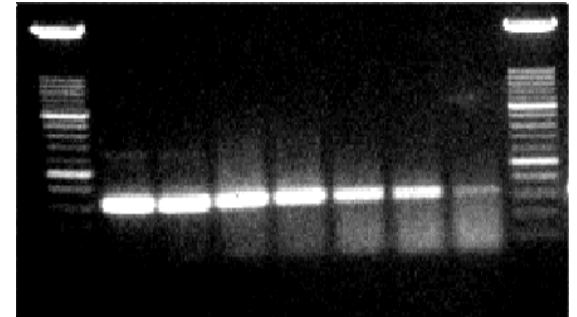
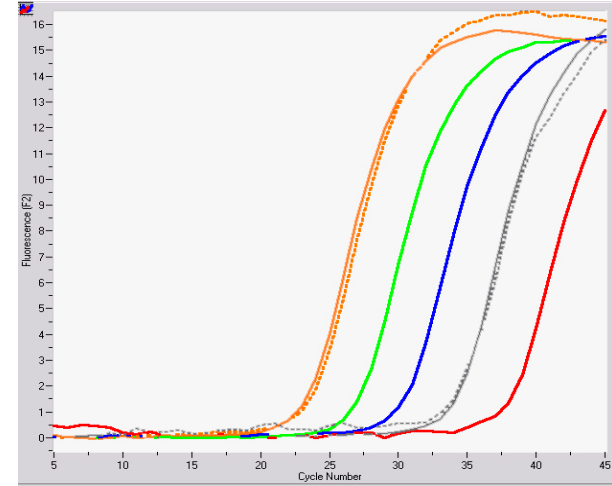
## Real Time PCR

---

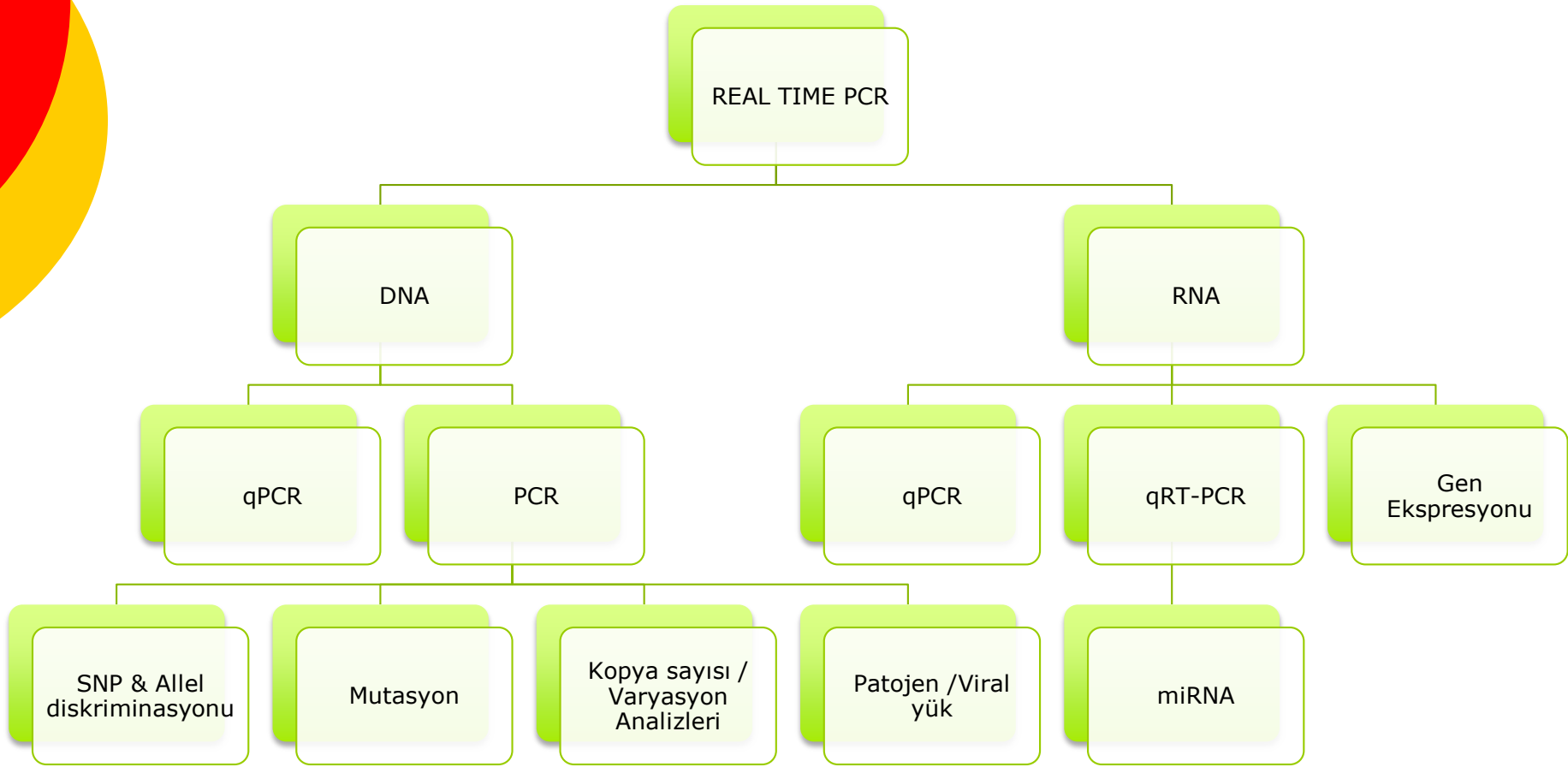
- Geleneksel PCR uygulama alanlarına göre daha geniş bir profil sağlar.
- DNA ve RNA örnekleri, kalitatif ve kantitatif olarak çok kısa sürede analiz edilebilir.
- Standardizasyon işlemlerini kolaylaştırır.

## Real Time PCR

- PCR ürünlerinin analizi reaksiyon sırasında eş zamanlı olarak yapılır.
- Agaroz jel elektroforezi, mor ötesi ışık kullanımı gibi ek uygulamaları elimine eder.
- Eş zamanlı PCR ile 2 kat gibi küçük ifade farklılıkları saptanabilirken, agaroz jelin rezolusyonu düşük olduğu için geleneksel PCR ile ancak 10 kat gibi farklılıklar belirlenebilir.

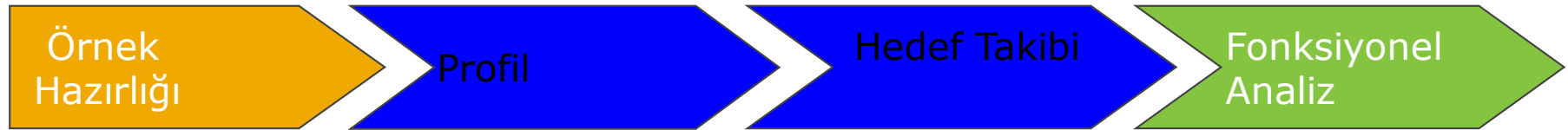
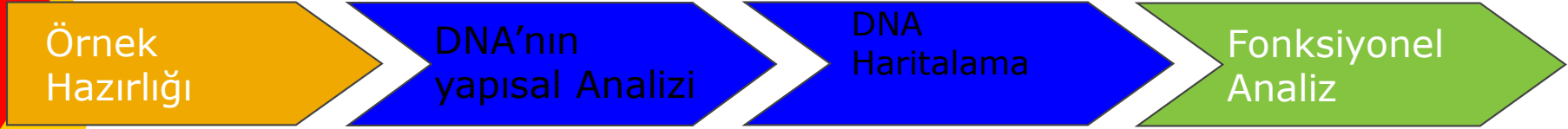


# Real-Time PCR Çalışma Alanları





# DNA Çalışma Akışı



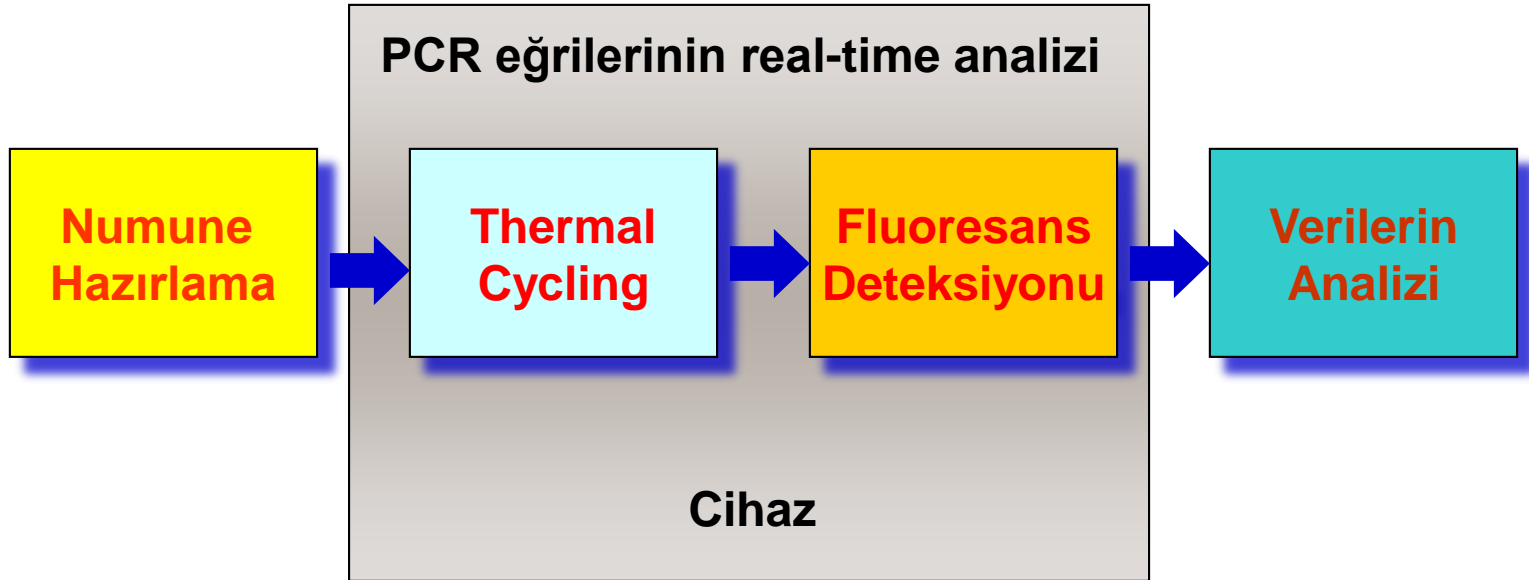
# RNA Çalışma Akışı

# Real Time Çalışması için Dikkat Edilmesi Gerekenler

---

1. Çalışılacak organizma?  
İnsan, sıçan, fare..
2. Çalışmanın tipi?  
Gen ekspresyonu, genotipleme vb...
3. Başlangıç materyali?  
Kan, Doku, Vücut sıvısı..
4. Tekrar sayısı;  
Dublike, triplike..
5. Reaktif tipi  
Sybr green, Taqman
6. Örnek sayısı

# Real Time PCR Çalışma Prensipli



## Real-Time PCR

Real Time PCR' da 2 floresan yöntemi mevcuttur.

➤ Interkalatör Boya Metodu

➤ Hidroliz Prob Metodu

TaqMan Prob

Molecular Beacon Prob

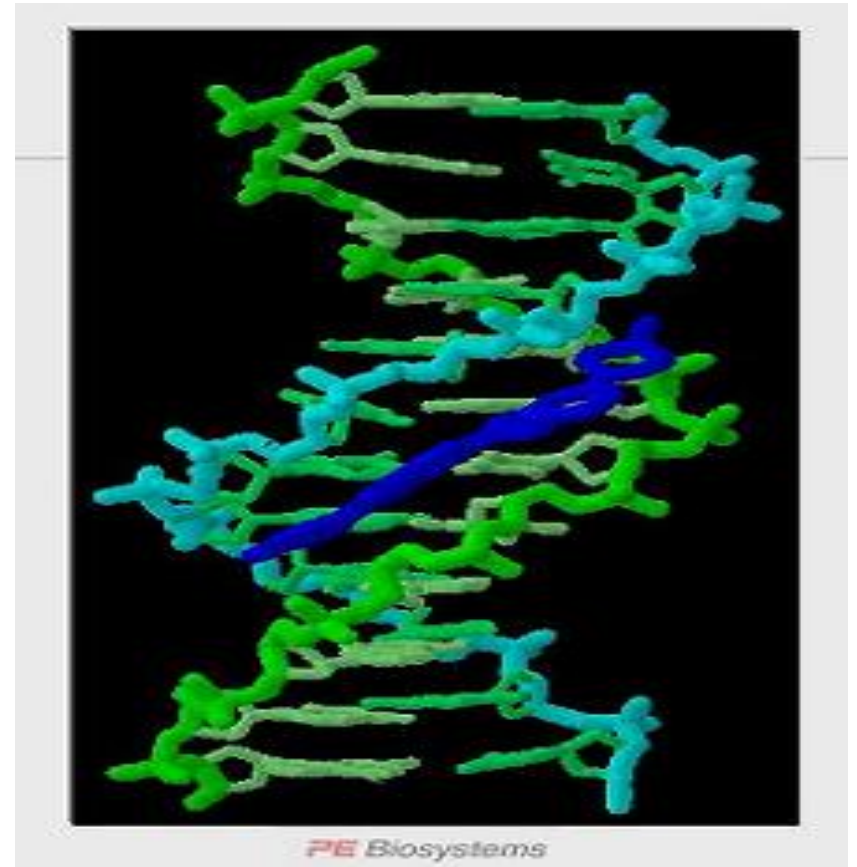
➤ Hibridizasyon Prob Metodu

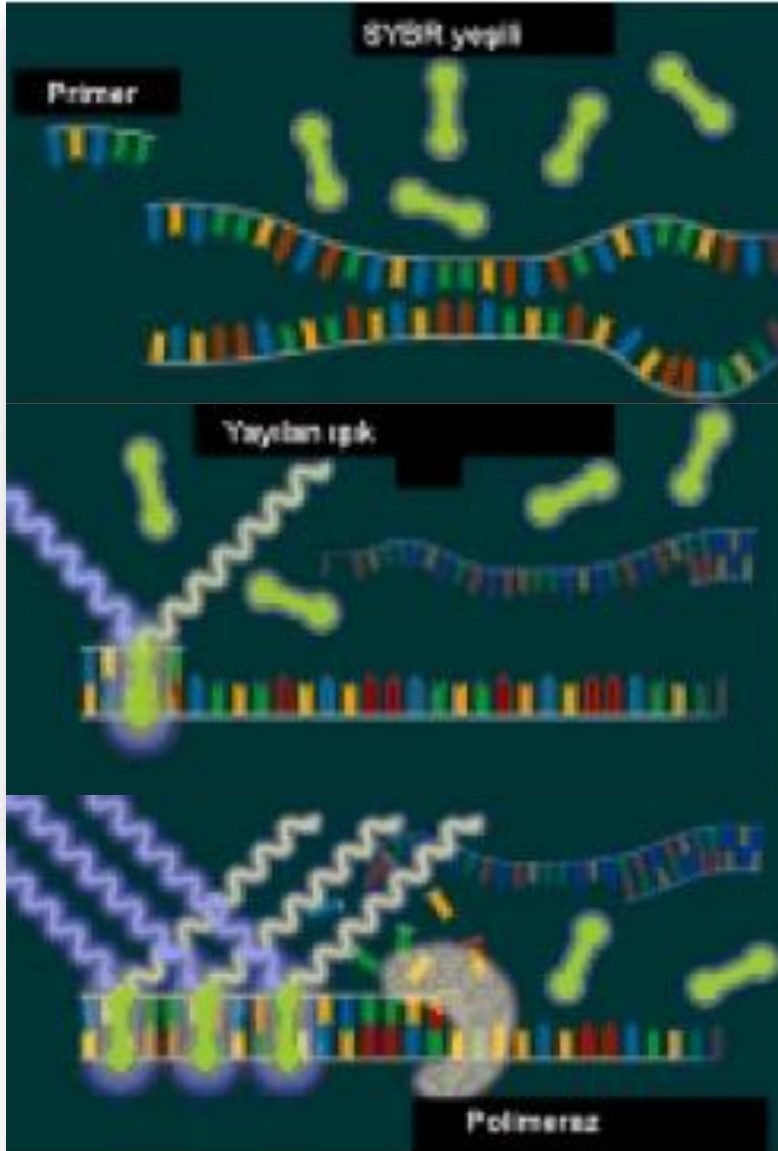
# Real-Time PCR

## Interkalatör Boya Metodu (DNA-binding dyes)

### SYBR GREEN

- SYBR green çift zincirli DNA'nın minor oluğuna bağlanır.
- Spesifik değildir.
- Maliyet düşüktür.
- Tarama amacıyla kullanılır

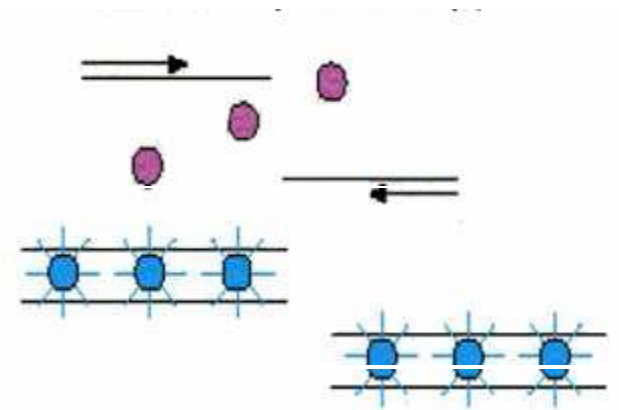




"SYBR Green" boya DNA çift iplikli olduğunda DNA'ya bağlanabilir.



DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrıldığında "SYBR Green" boya serbest hale geçer



Polimerizasyon tamamlandığında "SYBR Green" boya çift iplikli DNA'ya bağlanır ve floresan ışına yapar.



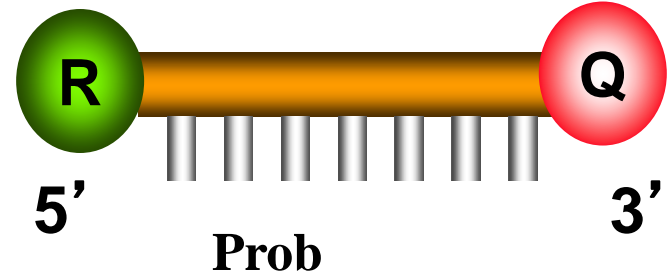
---

- **Primer dimerlerinin engellenebilmesi için dikkatli primer tasarımı yapılmalıdır.**

- **SPESİFİK DEĞİLDİR ANCAK HASSASTIR!!!**

# Real Time PCR

## Hidroliz Prob Metodu



**R** Reporter dye (Haber veren boya)

**Q** Quencher dye (Susturan boya)



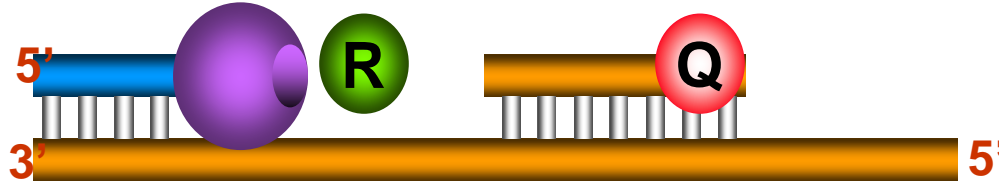
Hidroliz (TaqMan) Problar DNA polimeraz enziminin 5' nükleaz aktivitesini hidroliz için kullanan problardır. DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi çift zincire spesifiktir.



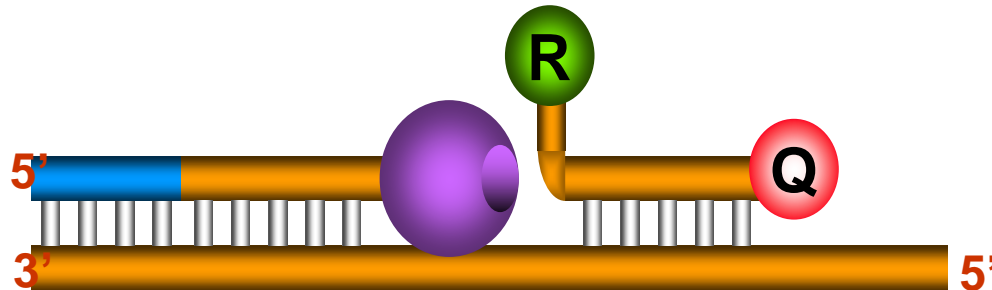
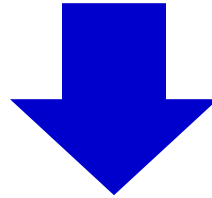
# Real Time PCR

## Hidroliz Prob Metodu

Taq



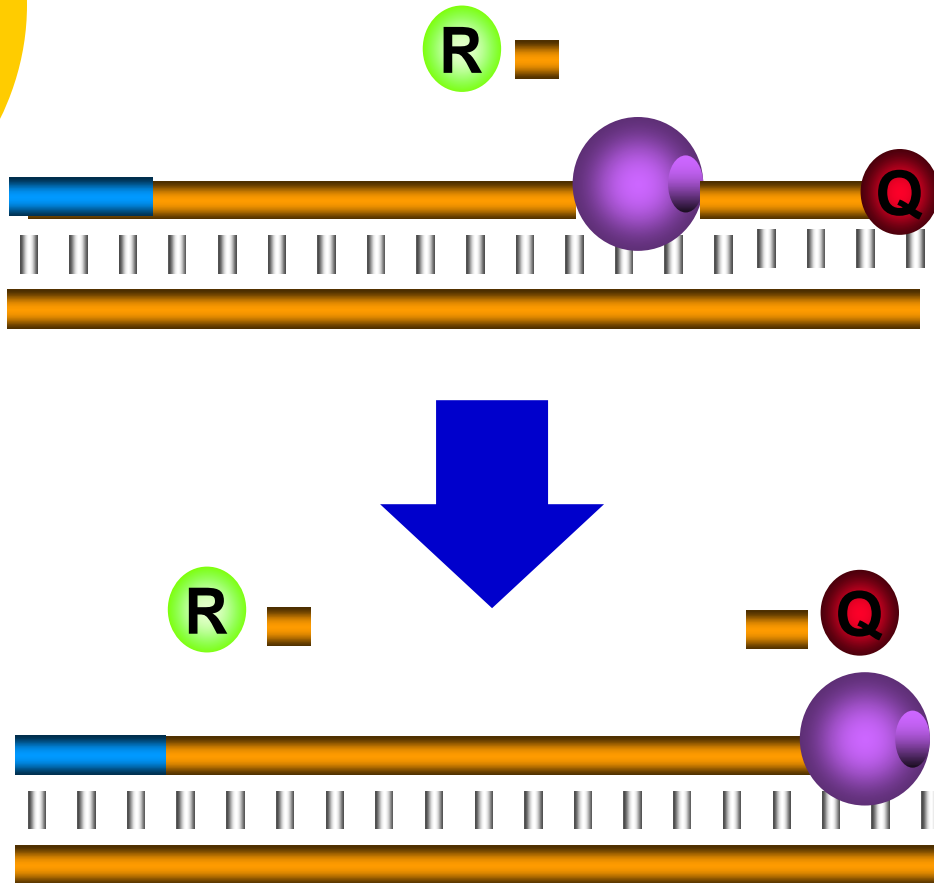
PCR sırasında prob hedef DNA dizisiyle hibridize olur.



Prob ekstansiyon sırasında polimerz enzimi ile uzaklaştırılır.


# Real Time PCR

## Hidroliz Prob Metodu



Reporter Quencher (Haber veren boya)'den polimeraz enziminin 5' 3' nükleaz etkisi ile ayrılır.

Serbest kalan reporter fluoresan ışık yayar.

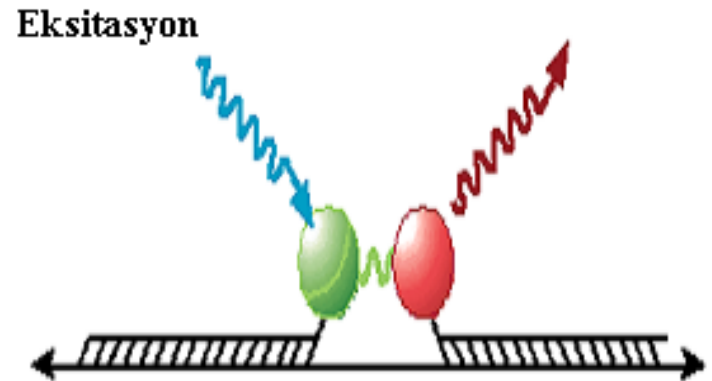
- 
- 
- En yüksek sinyali veren prob sistemidir
  - • Kantifikasyon ve alellik ayırım yapılabilir (SNP tespiti )
  - • Tasarlaması PrimerExpress™ ve BeaconDesigner gibi hazır bilgisayar programları ile çok kolaydır.
  - **SPESİFİKTİR AMA HASSAS DEĞİLDİR!!!**

# Real Time PCR

## Hibridizasyon Probu Metodu

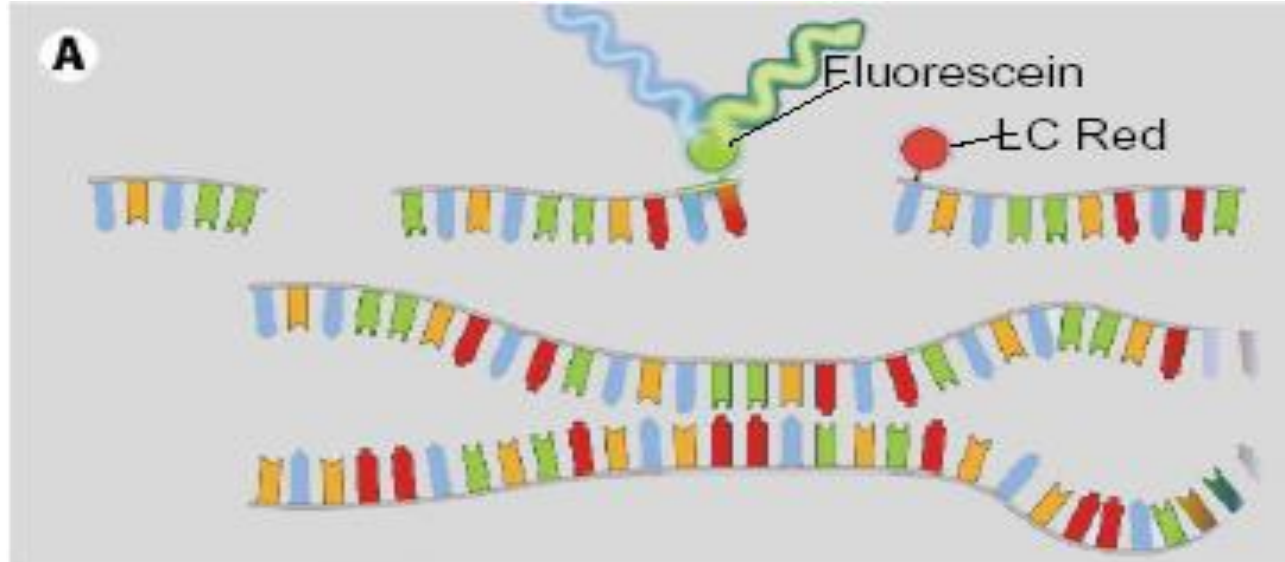
### FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

- Donör Fluorofor uygun dalgaboyu ile eksite edilir
- Donör enerjisi akseptör fluorofora aktarılır.
- Akseptör fluorofor daha uzun dalga boyunda emisyon yapar.



# Real Time PCR

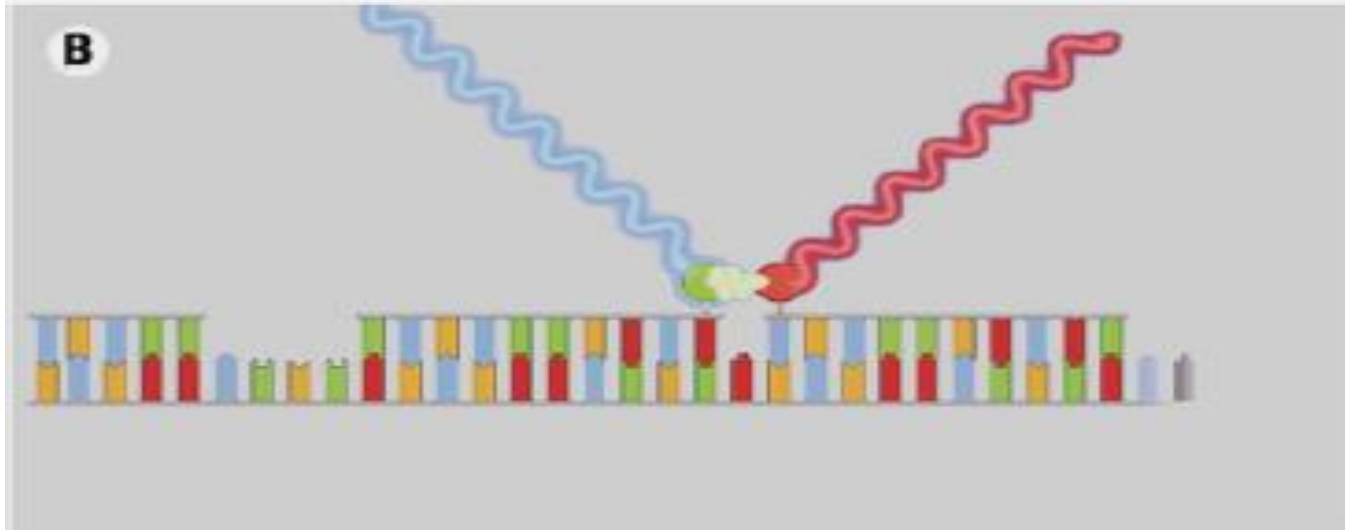
## Hibridizasyon Probu Metodu



(A) Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar.

## Real Time PCR

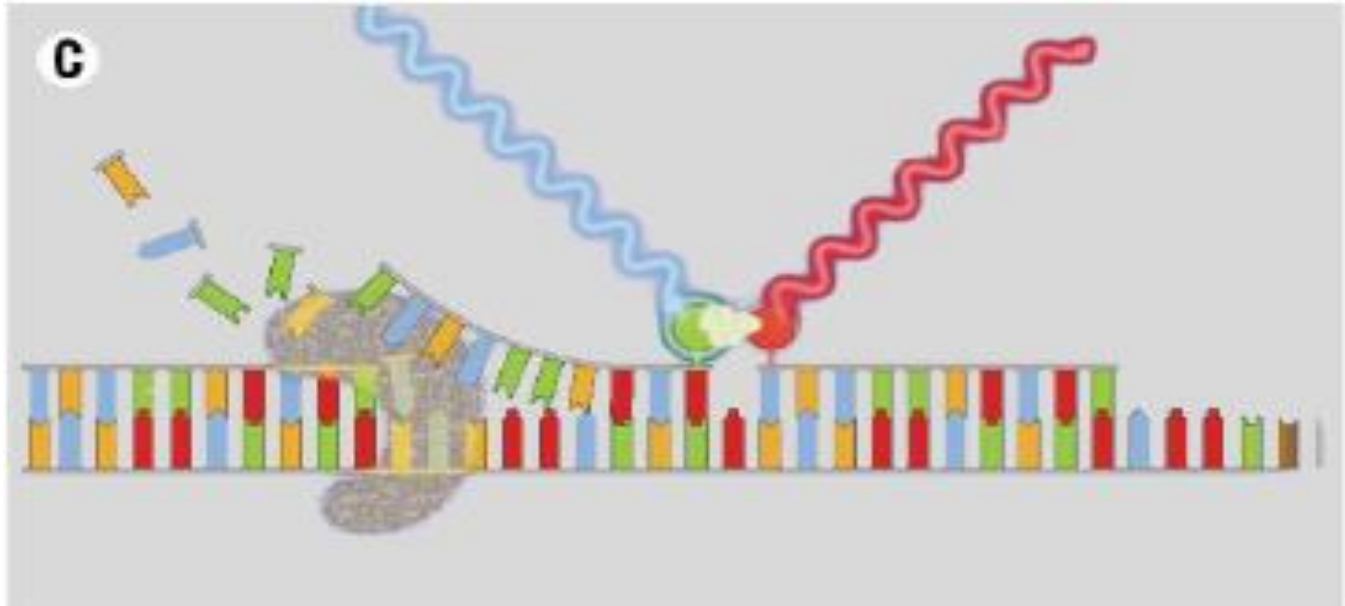
### Hibridizasyon Probu Metodu



(B) Annealing basamağında, probalar hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar.

# Real Time PCR

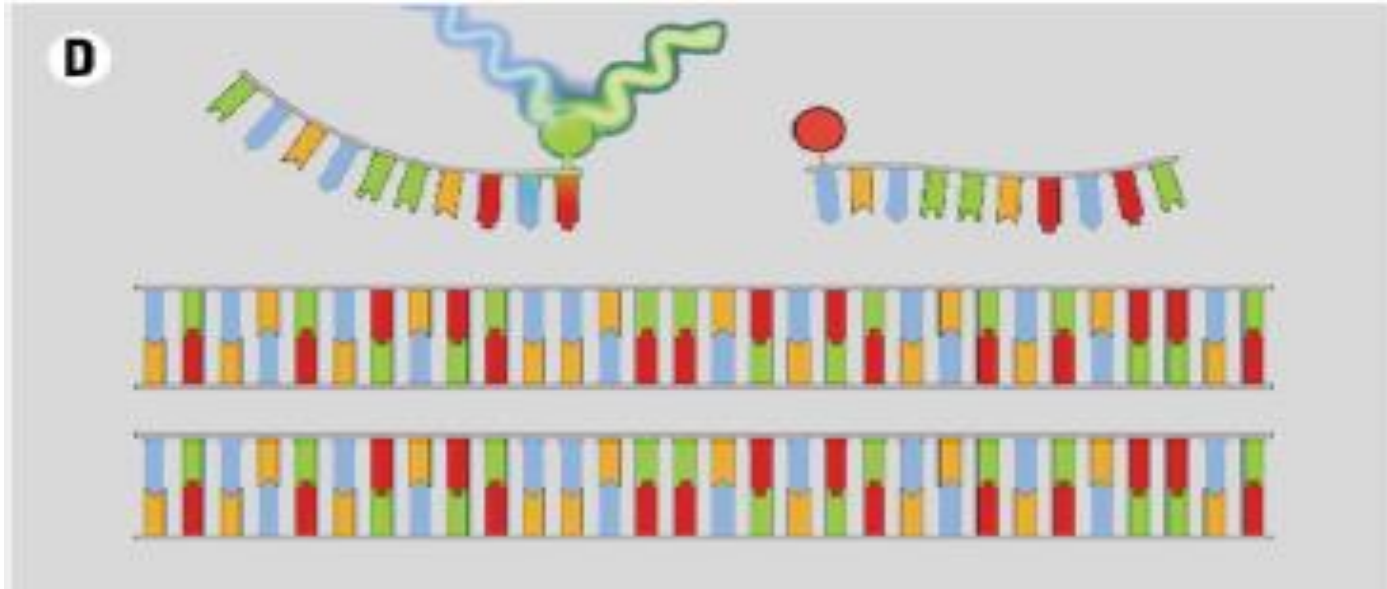
## Hibridizasyon Probu Metodu



(C) Ekstansiyon basamağında her iki prob tekrar hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlar.

# Real Time PCR

## Hibridizasyon Probu Metodu



(D) Polimerizasyon bitiminde probalar serbest hale dönerler



# Moleküler Boncuk

- TaqMan problardan geliştirilmiştir.
- DNA probları olan moleküler beaconlar stem-loop yapısındadır.
- Loop kısmındaki dizi hedefe, stem kısmındaki diziler ise birbirlerine komplementerdir.

Complementary to target DNA

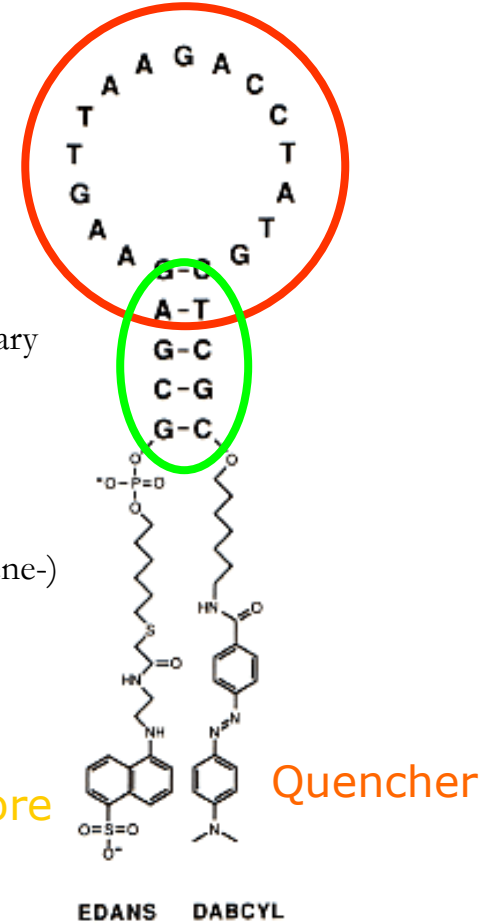
Self-complementary arm sequences

(Polymethylene-) Spacer

Reporter fluorophore

Quencher

EDANS DABCYL



# REAL TIME RT-PCR ÇALIŞIRKEN DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

---

- **Primer Dizayn**
- **Çoğalma Verimliliği**  
SYBR Green (100–200 bp uzunluğunda).
- **Referans Gen Seçimi**

# 1. PCR'da Primer Seçimi

---

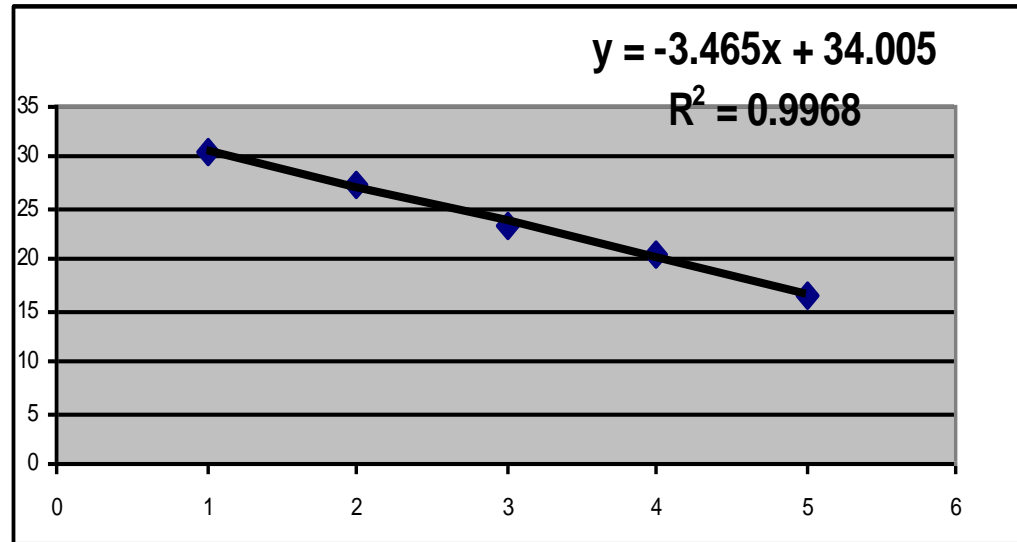
- spesifite
- Yüksek etkinlik
- primer-dimers oluşmaması
- DNA kontaminasyonunu bertaraf edebilecek primerler tasarlanmalı.
  - exon/exon sınırlarından
  - Araya uzun bir intron koyarak

## 2. Verimlilik Hesaplanması

$$\text{Eff} = 10(-1/\text{slope}) - 1$$

○ PCR verimliliği

90 - 100% ( $-3.6 > \text{slope} > -3.1$ )



$$10^{-(1/-3.4)} = 1.96$$

$$(1.96 - 1) * 100 = 96\% \text{ efficient}$$

# Referans Gen Seçimi (GAPDH, ACTB)

---

## **Normalizasyon İçin Doğru Referans Genin Seçilmesi**

- Referans gen araştırılan dokularda ya da hücrelerde değişiklik göstermemeli (kararlılık).
- En stabil olan minimum sayıda gen kullanılmalı.
- Kullanılan referans gen sayısı birden fazla ise ortalama değer almak yerine geometrik ortalama değer kullanılmalıdır.

# Normalizasyon İçin Doğru Referans Genin Seçilmesi



## [Introduction]

geNorm is a popular algorithm to determine the most stable reference (housekeeping) genes from a set of tested candidate reference genes in a given sample panel. From this, a gene expression normalization factor can be calculated for each sample based on the geometric mean of a user-defined number of reference genes.

The Microsoft Excel geNorm version from 2002 has been downloaded more than 15,000 times worldwide. Since 2010, a much improved geNorm module is integrated in the [qbase+](#) software (both basic and premium license) for real-time PCR data analysis in Windows, Mac and Linux (available from [Biogazelle](#)). The manual is available [here](#) (requires free login to the MyBiogazelle community).

The underlying principles and formulas are described in Vandesompele et al., *Genome Biology*, 2002, 'Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes'. The full article can be read at <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034/> [n° 8 in ranking of [all time most-viewed](#) articles published by BioMed Central]

In a follow-up paper we developed the global mean normalization method (also available in qbase+) that is especially useful for normalization of data coming from a large and unbiased set of genes, e.g. microRNA gene expression profiling: Mestdagh et al., *Genome Biology*, 2009, 'A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization'. The full article can be read at <http://genomebiology.com/2009/10/6/R64>

## [geNorm citations]

According to [Google Scholar](#), more than 5800 papers have cited the geNorm method.

## [Improved geNorm in qbase+ software]

The old geNorm for Microsoft Excel is no longer available for several reasons (no longer compatible with latest versions of Excel, slow, buggy, difficult to use).


The benefits of the new module in qbase+ are:

- fully automatic and expert result report
- handles missing data
- single best reference gene identification
- available for Windows, Mac and Linux
- much faster

The manual is available [here](#) (requires free login to the MyBiogazelle community).

## [How to get geNorm?]

# Normalizasyon İçin Doğru Referans Genin Seçilmesi



**Molecular Diagnostic Laboratory**  
Department of Molecular Medicine,  
Aarhus University Hospital Skejby

[2013](#) | [2012](#) | [2011](#) | [2010](#) | [2005 -2009](#) | [1996- 2004](#) | [Supplementary data](#) | [NormFinder](#) | [Graduations](#)




**About MDL**  
**Research**  
**Genetic Analysis**  
**NGS Core Center**  
**Microarrays**  
**Identicell**  
**Publications**  
**NormFinder**  
**Staff**  
**Contact**

**Free NormFinder software**  
NormFinder is an algorithm for identifying the **optimal normalization gene** among a set of candidates. It ranks the set of candidate normalization genes according to their expression stability in a given sample set and given experimental design.

NormFinder can analyze expression data obtained through any quantitative method e.g. real time RT-PCR and microarray based expression analysis.

"NormFinder.xla" adds the NormFinder functionality directly to Excel.  
The software is free for academic and commercial use.

Find more information in the [documentation](#), the [FAQ](#) and the original article below.

<p><a href="#">Download</a> MS Excel Add-in </p> <p>2005-jan-05 Version 0.953 2004-sep-14 Version 0.952 2004-aug-19 Version 0.93</p> <p><a href="#">Download</a> version for R </p> <p>updated 2005-02-16</p>	<p><a href="#">Documentation</a> </p> <p>Normfinder HowTo v20 updated May 2010</p> <p><a href="#">FAQ</a> updated January 2012</p> <p><a href="#">Example data</a> (Excel format) updated June 2009</p> <p>This dataset illustrates, how to plot your data, estimate variances and evaluate normalization genes in your dataset.</p>
--	---

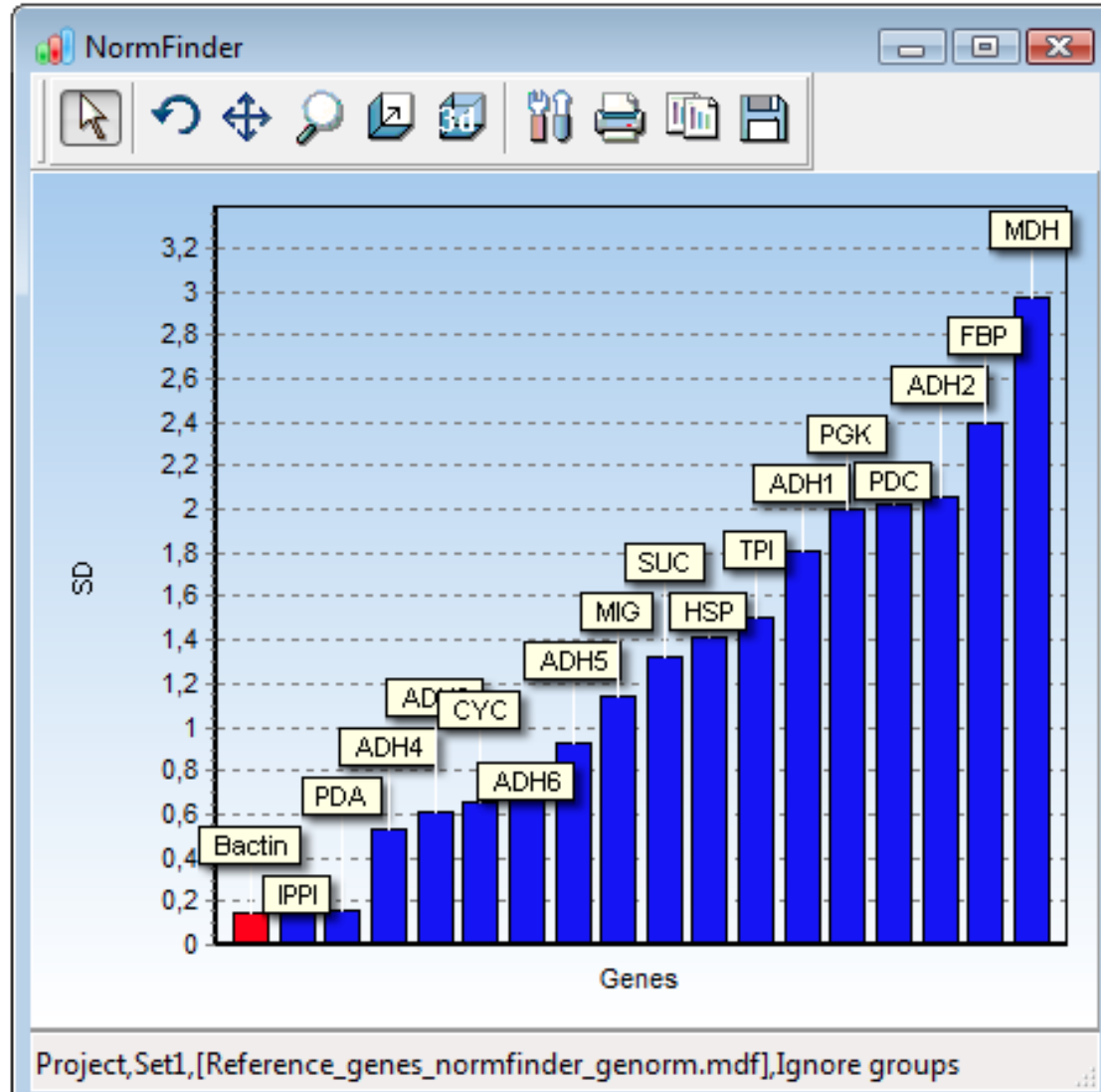
**Andersen C.L., Ledet-Jensen J., Ørntoft T.:** Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets.  
[Cancer Research](#). 2004 (64): 5245-5250 [PubMed](#) [Supplementary data](#)

Send your questions, comments or feedback to [normfinder@mdl.dk](mailto:normfinder@mdl.dk).

Several alternative normalization software is available, find more information [here](#).

# Normalizasyon İçin Doğru Referans

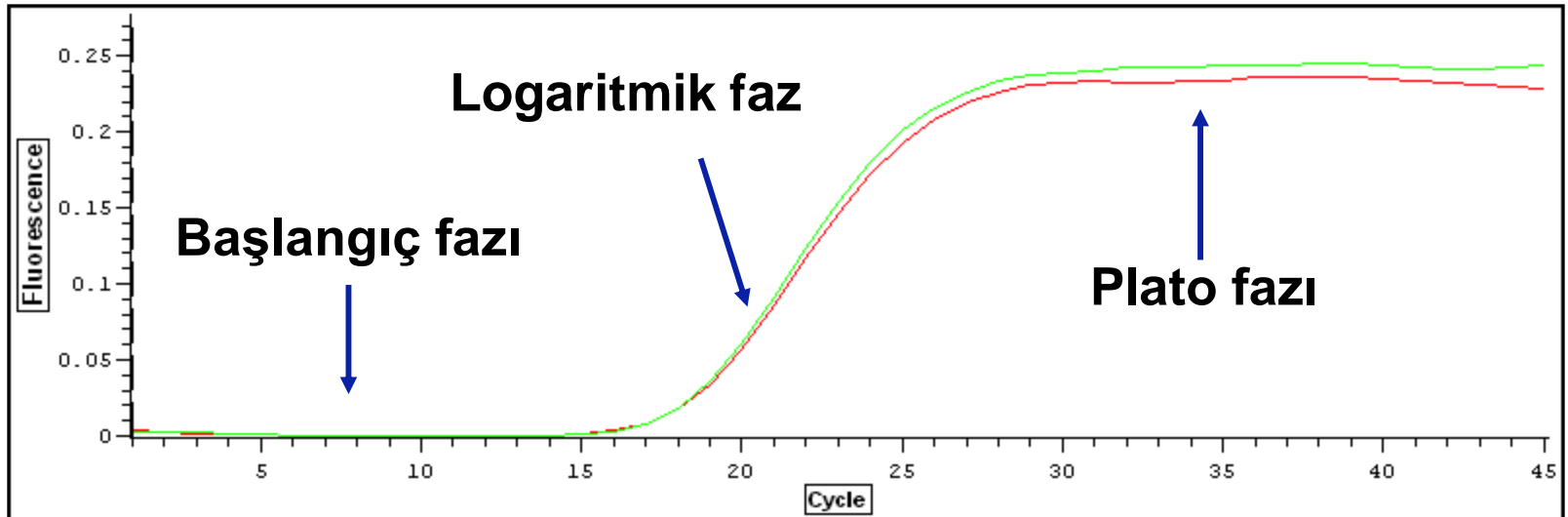
## Genin Seçilmesi





## Real Time PCR

- Real time PCR (qPCR) sırasında amplifikasyon farklı evreler meydana getirir.
  - Başlangıç fazı
  - Logaritmik faz
  - Plato fazı

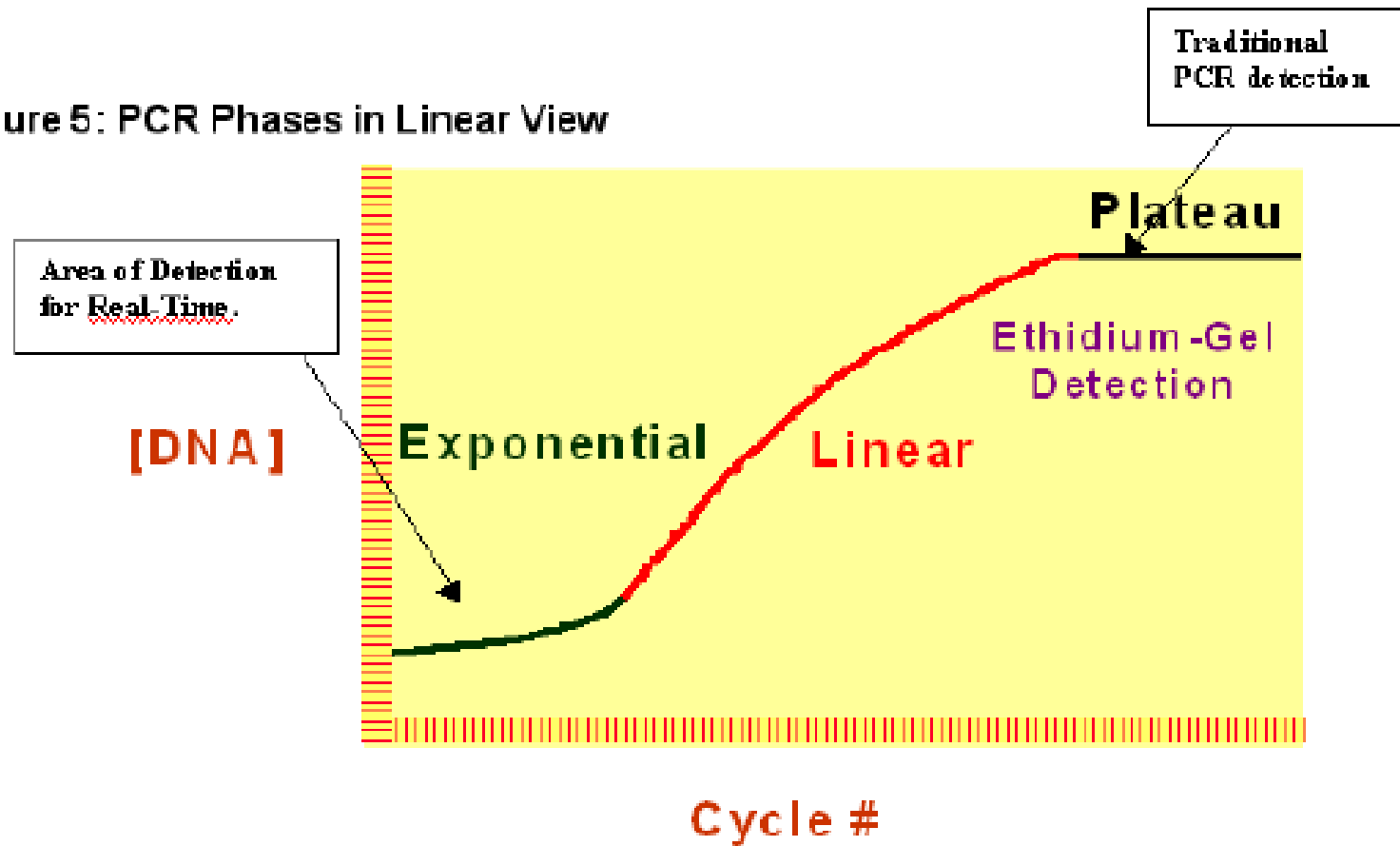


# Başlangıç Faz

---

- PCR ürün miktarı her döngüde tam olarak iki kat artar.
- Reaksiyon özgül ve tamdır
- Reaksiyonun Etkinliği %100 dür

Figure 5: PCR Phases in Linear View



# Logaritmik Faz (yüksek farklılık)

---

- Reaksiyonun komponentleri tükenmeye başlar.
- Reaksiyon yavaşlar.
- Oluşan PCR ürünleri degrade olmaya başlar.

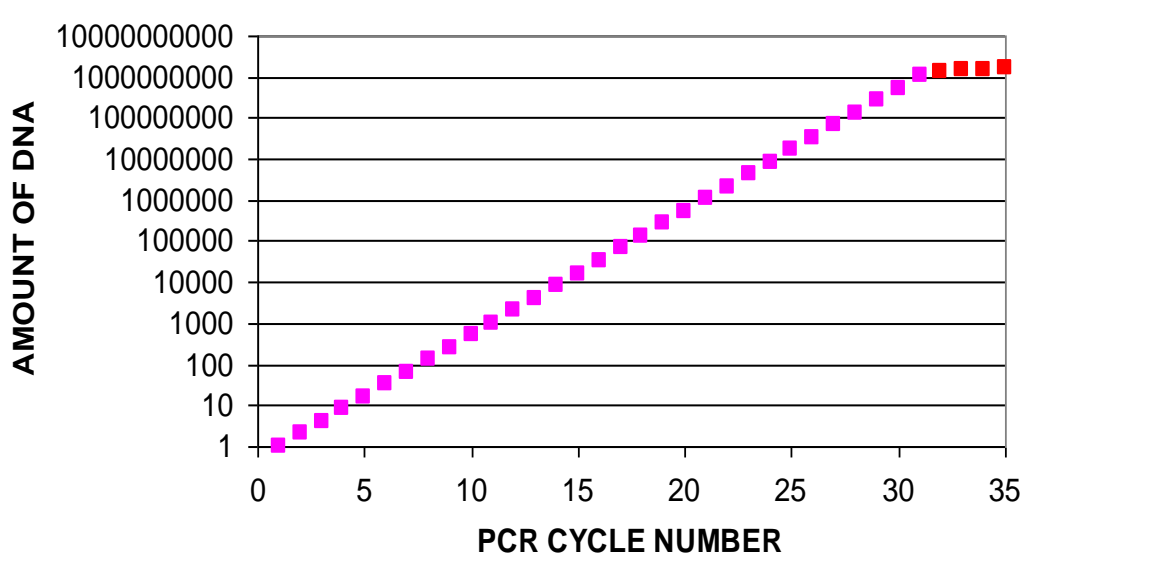
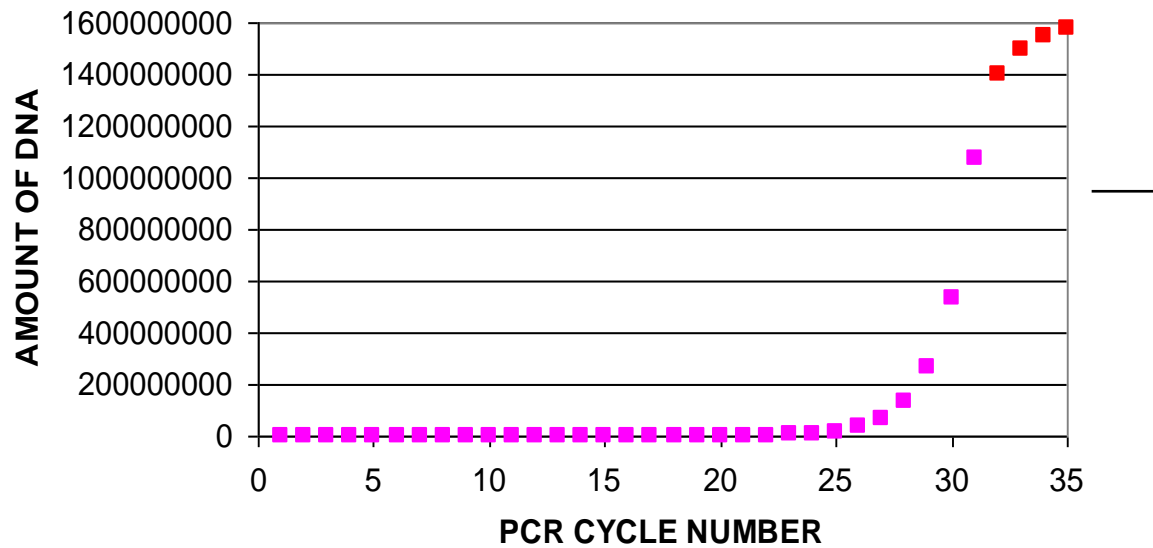


# Plato Faz (End-point)

---

- Geleneksel PCR'lerde jel bazlı tanı
- Reaksiyon sonlanmakta
- Yeni PCR ürünü oluşmama
- PCR ürünleri degrade olması artmaktadır.

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



# Real-Time PCR

## Kantitasyon

- Relatif kantitasyon
- Absolut kantitasyon
- Baseline correction
- Melting curve analiz
- Threshold cycle ile kantitasyon
- End point ölçüm

## Real-Time PCR

---

### Relative ve Absolute Kantitasyon

**Relatif Kantitasyon:** Hedef genin referans gene göre relatif ekspresyonuna dayanır. Gen ekspresyonundaki fizyolojik değişiklikleri araştırmak için relatif ekspresyon oranı çoğu durum için uygundur (İTERNAL KONTROL).

**Absolut Kantitasyon:** Bilinen konsantrasyonda standart DNA molekülüne (rekombinant plazmid DNA'sı, genomik DNA vs.) dayanan kalibrasyon eğrileri kullanılır. (EKSTERNAL KONTROL).



## Real-Time PCR

---

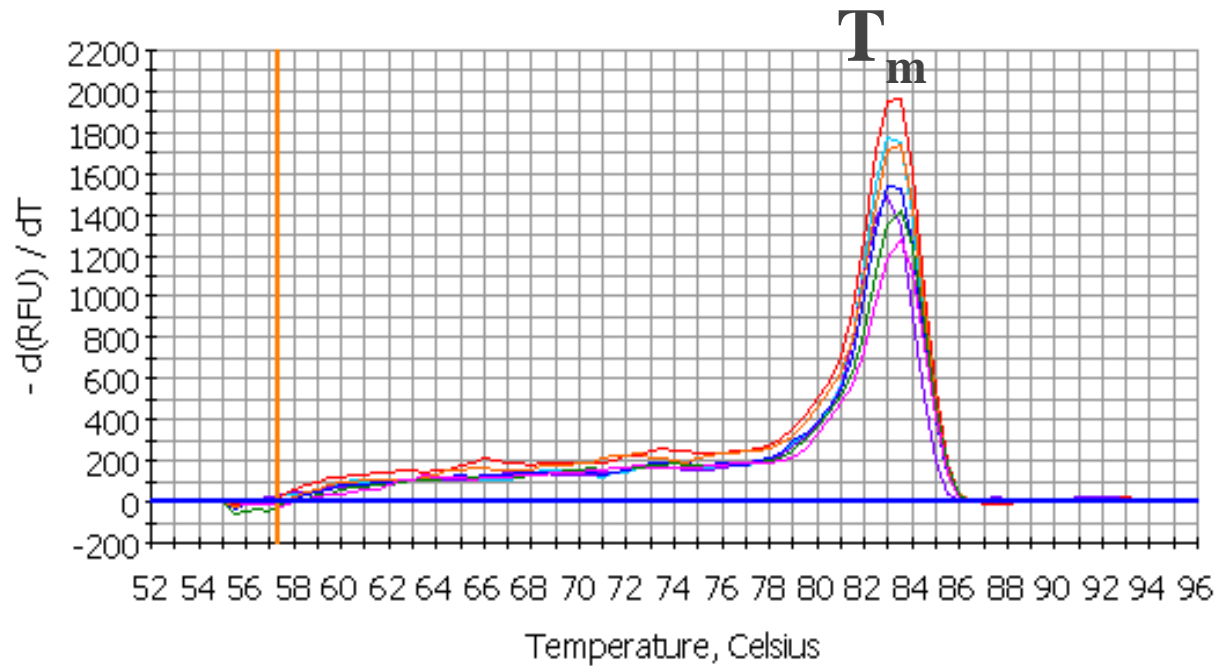
### Internal ve External Kontrol:

**Internal Kontrol:** İzole edilen tüm numunelerde bulunan DNA veya RNA dizeleridir. Bu amaçla nükleuslu tüm hücrelerde bulunan housekeeping genler ( $\beta$ -actin, GAPDH, 28s rRNA, 18s rRNA,  $\beta$ -globulin vs.) kullanılır.

**External Kontrol:** Her bir numune için bilinen konsantrasyonlarda RNA veya DNA kullanılır.

## Real-Time PCR

### Melting Curve Analizi:



Çift zincirli DNA'nın  $T_m$  noktasında DNA zincirleri ayrılır ve fluoresans hızla düşmeye başlar.

# Relatif Kantitasyon (Ana Hatlar)

---

- Kontrol örneğinden RNA izolasyonu
- cDNA eldesi
- 1/10 seğreltme (ör.106, 105, 104...)
- Eşik Değerleri (Ct) belirlenir
- Standart Eğri çizilir (Ct ye karşı ekspresyon miktarı(konsantrasyon))
- Ct ler arasında en az 3.3 döngü olması gerekir.



---

# DATA ANALİZ YÖNTEMLERİ



---

# **Kantifikasyon Metodunun Seçilmesi**

**(Veri Analiz Metodu)**



---

- **STANDARD CURVE METHOD**

- **Delta-Delta CT METHOD (An approximation method)**

- **PFAFFL METHOD**

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}$$



---

- **Kantitasyon Hesaplamaları**

- Log fazında amplifikasyon kinetiği için denklem

- $T^n = T^0 (E)^n$

- $T^n$ : n döngüsünde hedef dizinin ulaştığı miktar

- $T^0$ : hedefin ilk baştaki miktarı

- E: Amplifikasyon kinetiği (her döngüde ürün ikiye katlandığı için E en fazla 2 olabilir)

- n: döngü sayısı

# Eşik Deęerin Belirlenmesi

---

Eşik değer log faza (daha doğrusu geometrik faza) geğen amplifikasyon ürünlerine ait ölçülebilen en düşük floresan değeridir.

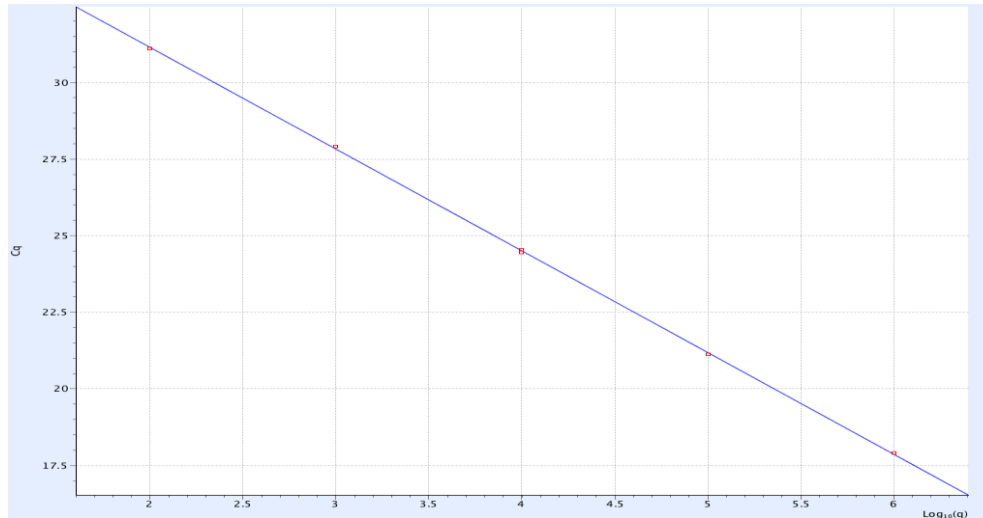
Amplifikasyon eğrisinin geometrik yani doğrusal artış fazına geğtiği en alt sınır, eşik değer olarak kabul edilir.

Eşik değeri saptamak için yatay (X) eksene paralel doğrusal izdüşümler alınır.

Yeni kullanılmaya başlanan real-time cihazlarında 'eşik değer' otomatik olarak belirlenir.



# Standart Eğri

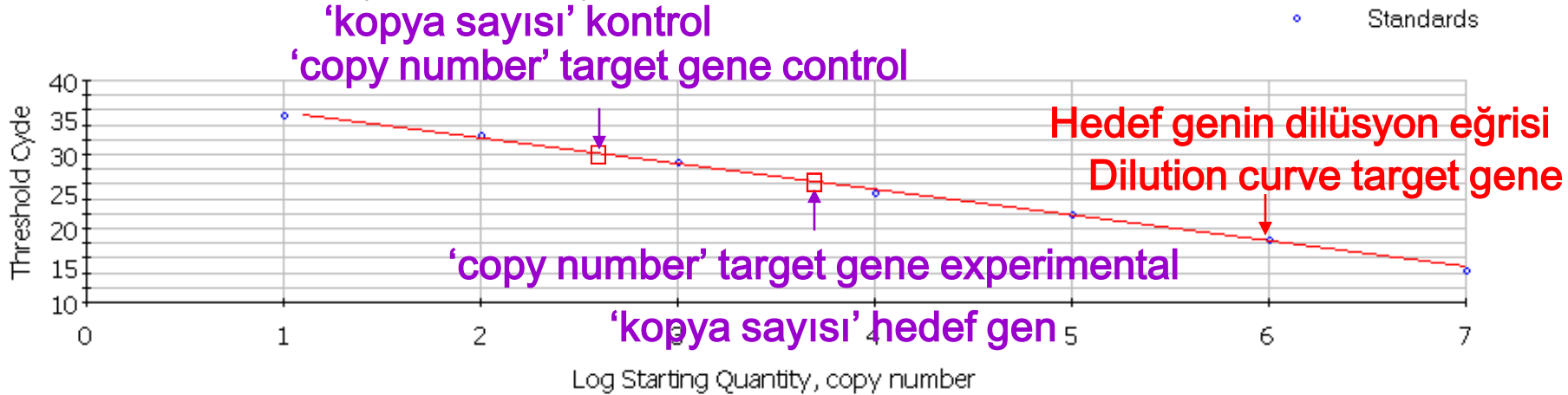


Standart eğrinin çizilmesi: Eşik değer, başlangıçta farklı sayıda hedef dizi içeren amplifikasyonların hepsinin aynı sayıda ürün içerdiği noktadır. Dolayısıyla başlangıçta az sayıda hedef içerenler daha çok döngü ile eşik değere ulaşırken, daha çok sayıda hedef içerenler daha az döngüyle eşik değere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

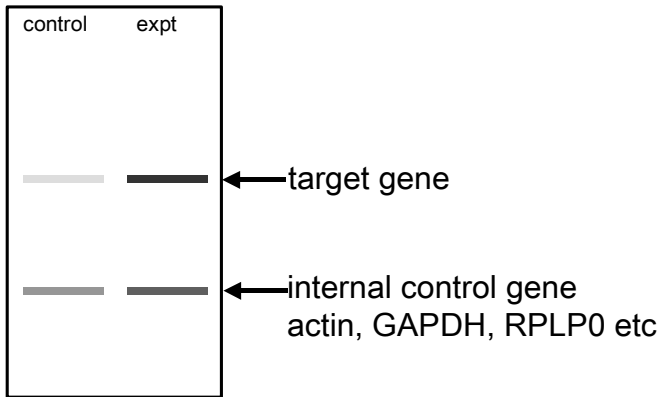
- 
- 
- Eşik değer başlangıçta farklı sayıda hedef içeren amplifikasyonların hepsinin aynı sayıda ürün içerdiği noktadır.

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns  
 ○ Standards



### NORTHERN



fold change in target gene =  
 $\frac{\text{copy number experimental}}{\text{copy number control}}$

Hedef gendeki kat-değişim =  
 $\frac{\text{Deney örneğinin kopya sayısı}}{\text{Kontrol kopya sayısı}}$

$$\text{Ratio experimental/control} = \frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$$

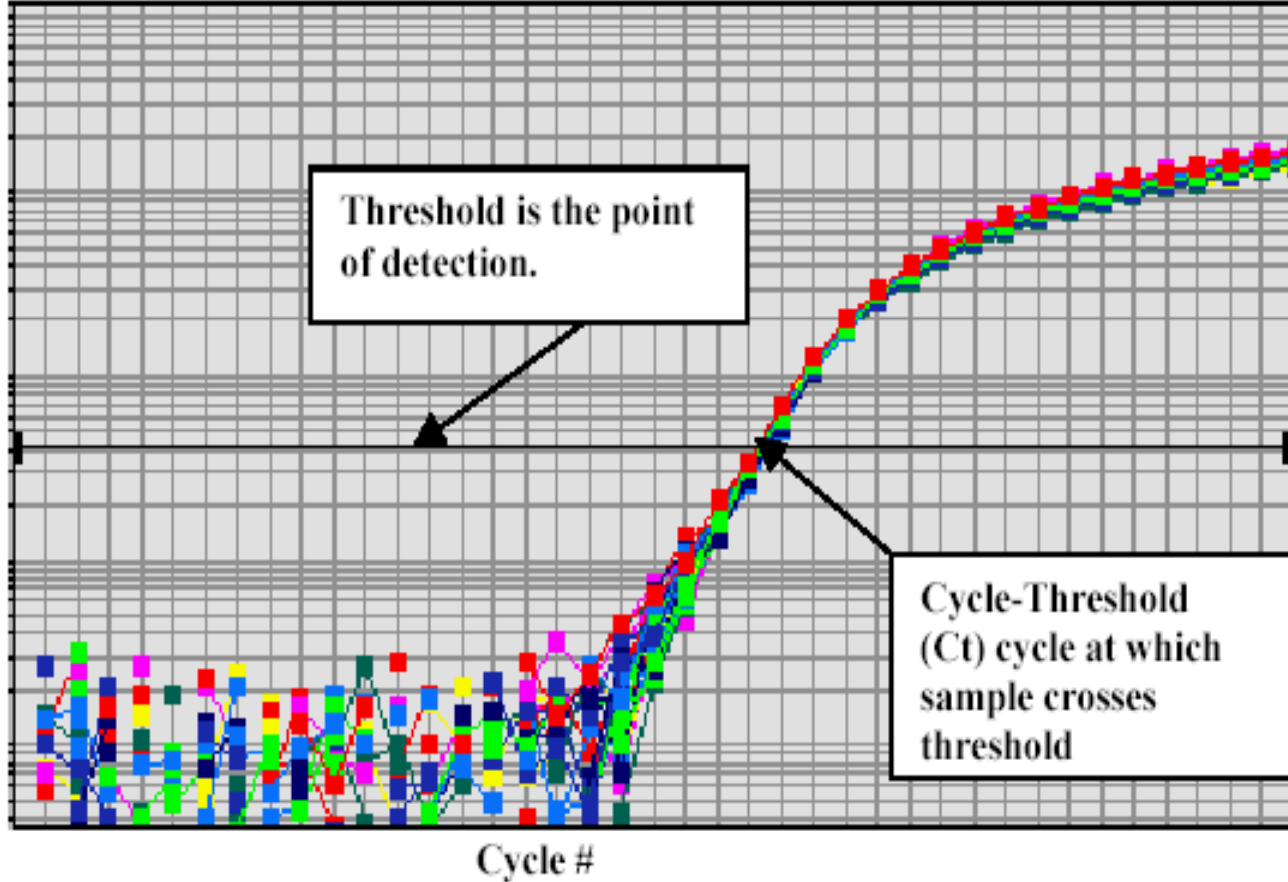
# Threshold Cycle

---

- ❖ threshold cycle veya CT değeri DRn de önemli artışın olduğu ilk siklusu ifade eder.

Ct (Treshold Cycle)  
ya da  
Cp (Crossing Point)  
Nedir ?

## nedir $C_T$ ?

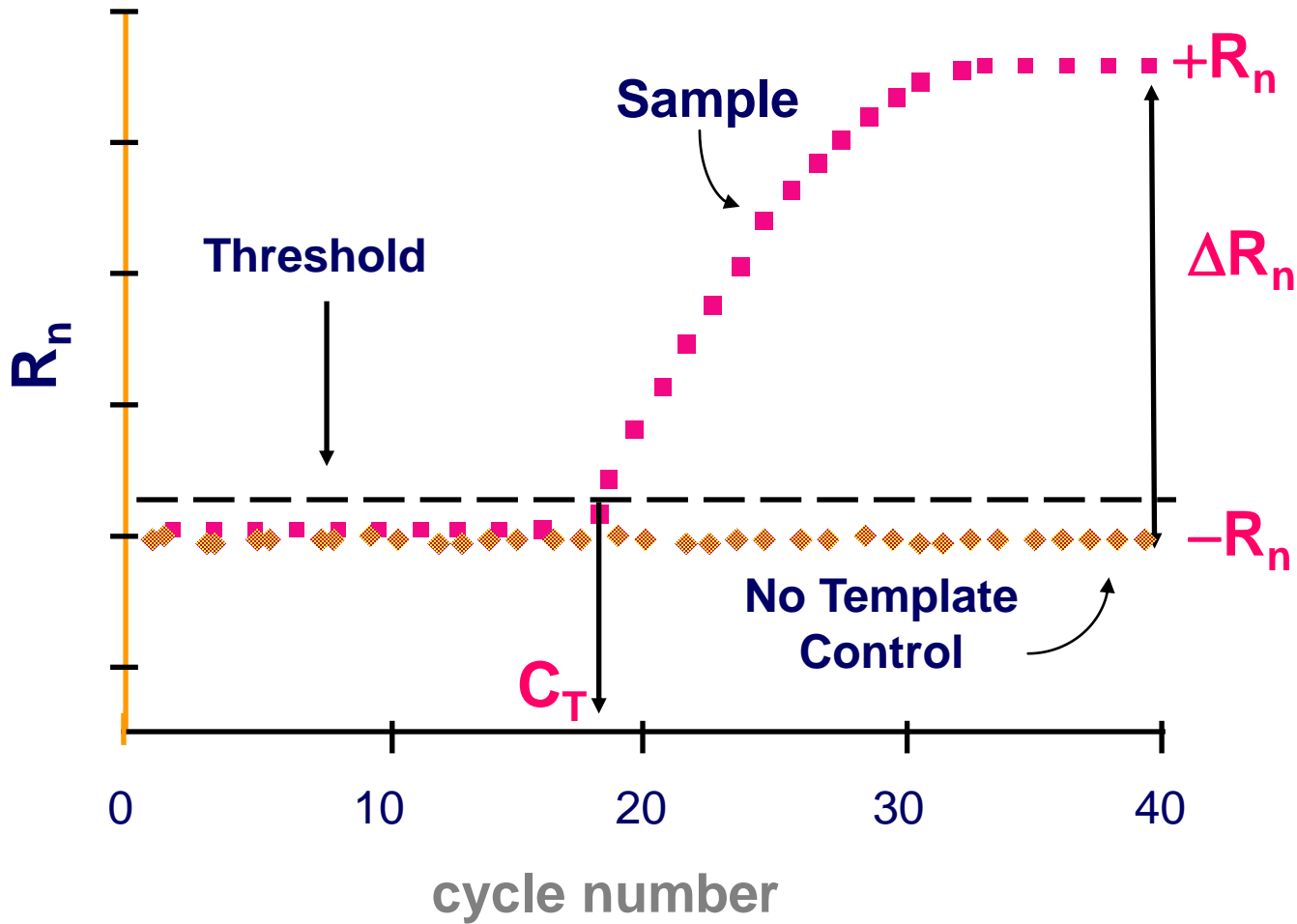


Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü ( $C_t$ ,  $C_p$ ) denir.

$C_t$  değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır.

40 döngünün üzerindeki bir  $C_t$  değeri çoğalma olarak adlandırılmaz ve hesaplara katılamaz.

# Nedir $\Delta R_n$ ?



# Erime Sıcaklığı Eğrileri

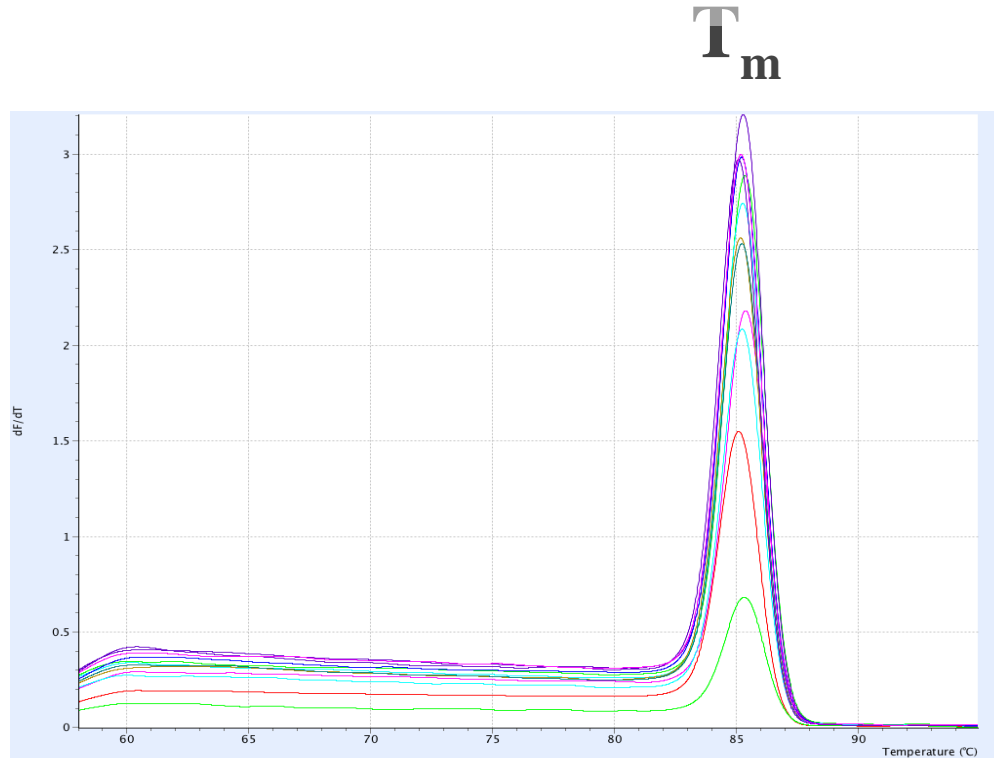
---

Bir primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir.

Kontaminasyon, spesifik olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler.

Eş zamanlı PCR ile ürünleri agaroz jelde koşturmadan, erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür.

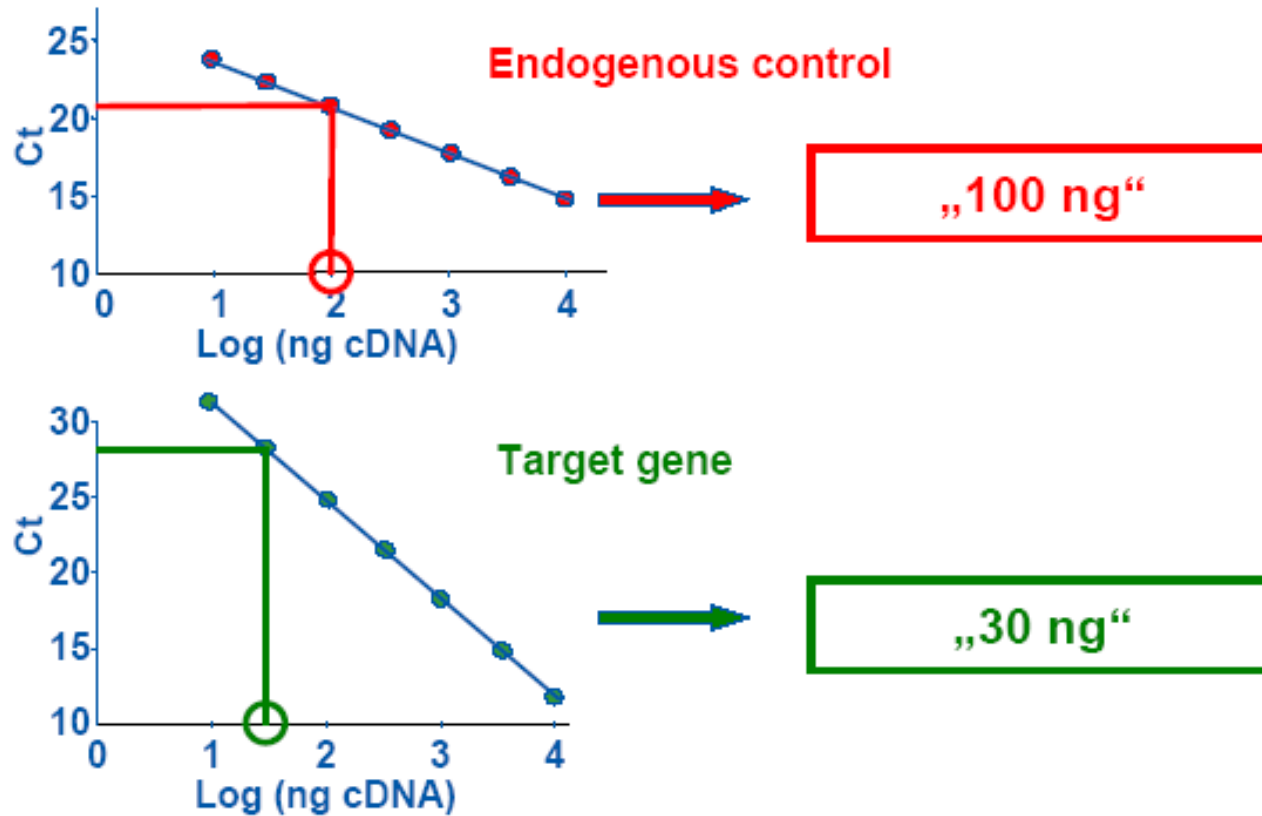
# Erime Eğrisi Analizi



Çift zincirli DNA'nın  $T_m$  noktasında DNA zincirleri ayrılır ve fluoresans hızla düşmeye başlar.



# Standard curve method




# 2<sup>-ΔΔct</sup> Metodu (Normalizasyon Metodu)

---

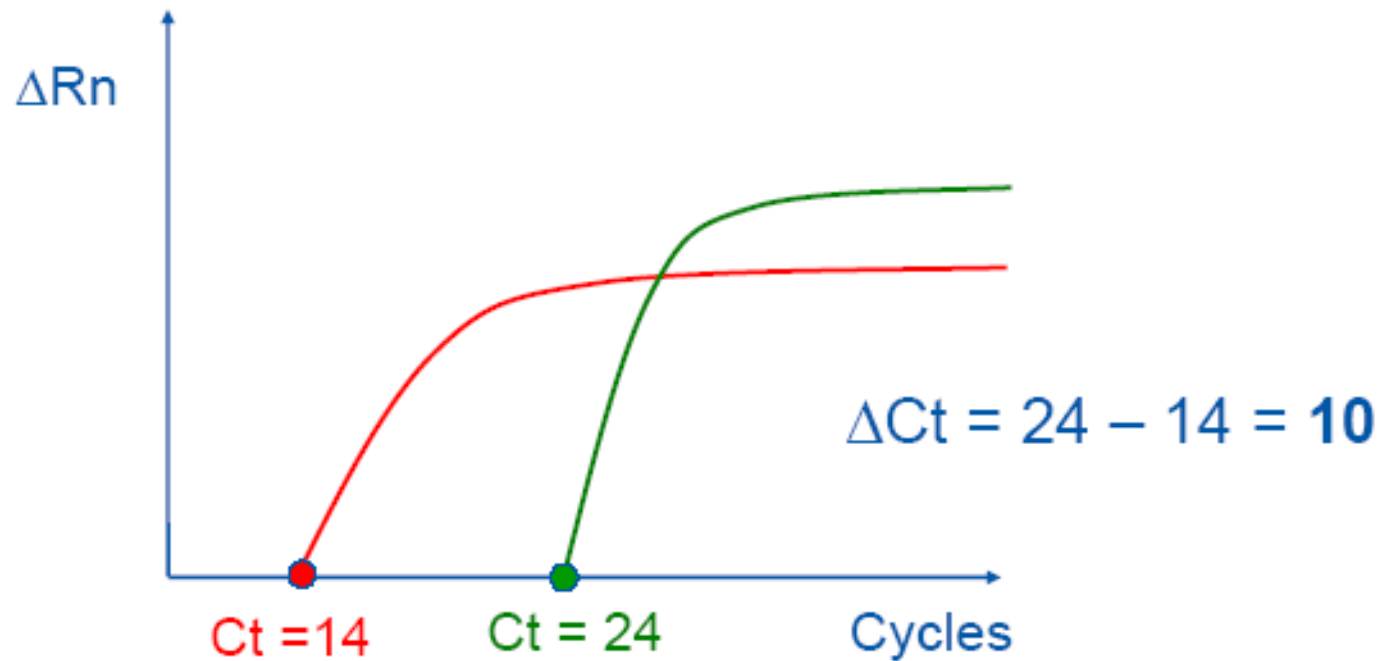
- ΔCt kontrol= hedef gen ct-housekeeping gen ct (a)
- ΔCt deney= hedef gen ct-housekeeping gen ct (b)
- ΔΔCt= Δct kontrol - Δct deney (c)  
(a)-(b)

Kuvvetli değer = 2<sup>-ΔΔct</sup>

= 2<sup>-c</sup> Kontrole ve housekeeping gene göre normalize değer

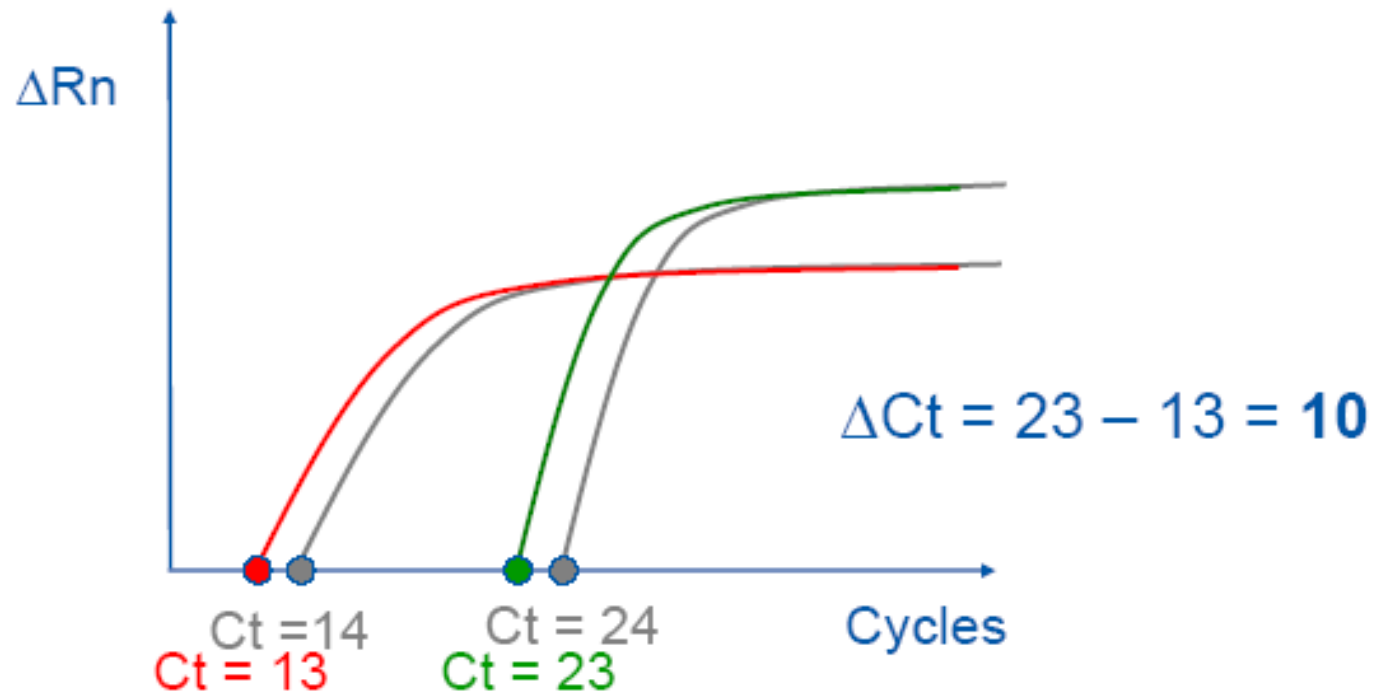
- 
- 
- SPSS
  - Tek yönlü ANOVA (Varyans analizi)
  - %95 güven aralığında sınırsız.
  - $p=0.05$  değerine göre
- $p<0.05$  anlamlı
- $p>0.05$  anlamsız

# Comparative Ct method



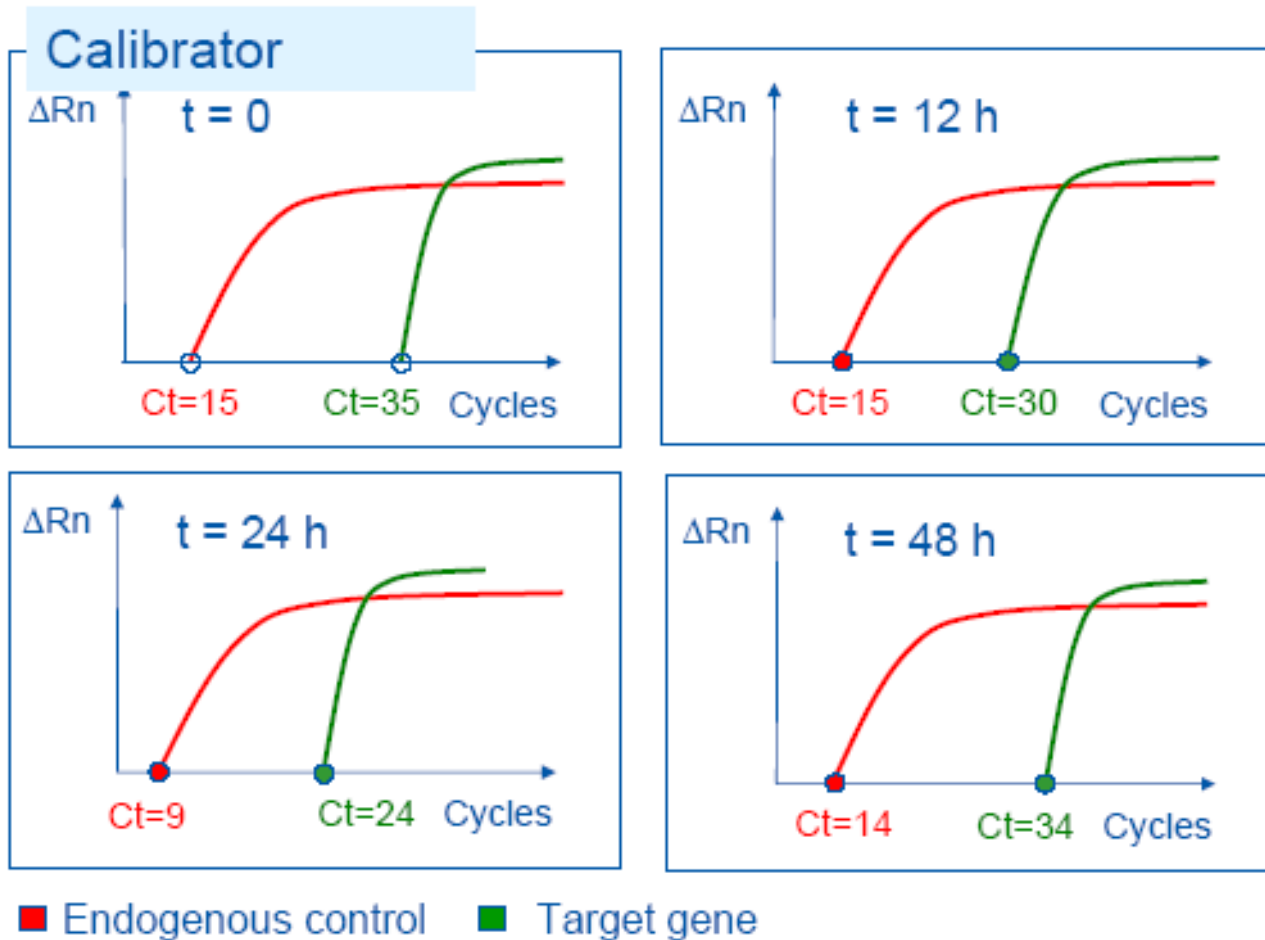
- Endogenous control
- Target gene

What if we add the double amount of cDNA?



- Endogenous control
- Target gene

# Comparative Ct method



# Calculation of expression Results

- First step

$\Delta\text{Ct}$ : Normalisation to Endogenous Control

- Second step

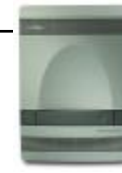
$\Delta\Delta\text{Ct}$ : Normalisation to Calibrator

- Third step

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$2^{-(-4)} = 16$$

# ABI Real Time PCR Cihaz



**1996**

ABI Prism® 7700

**1998**

LGeneAmp® 5700

**2000**

ABI Prism®  
7900

**2003**

ABI Prism®  
7000

**2005**

Applied  
Biosystems  
7300/7500  
7500F

**2007**

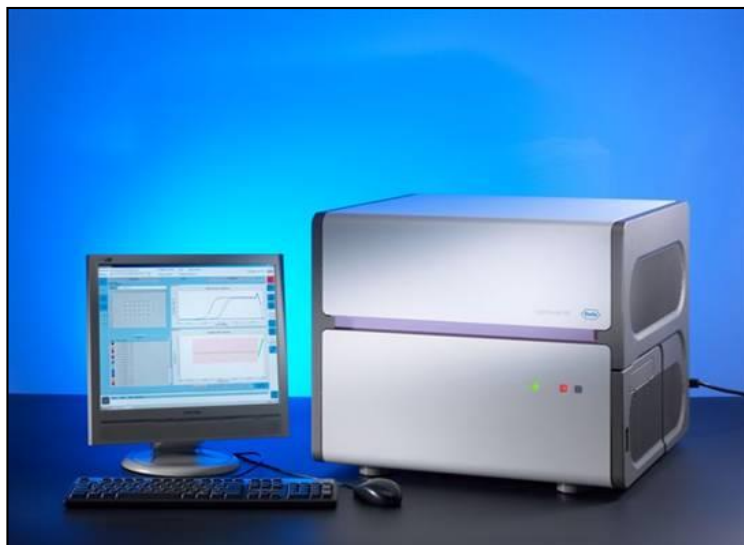
StepOne™ and  
StepOnePlus™



# Roche Applied Science

---

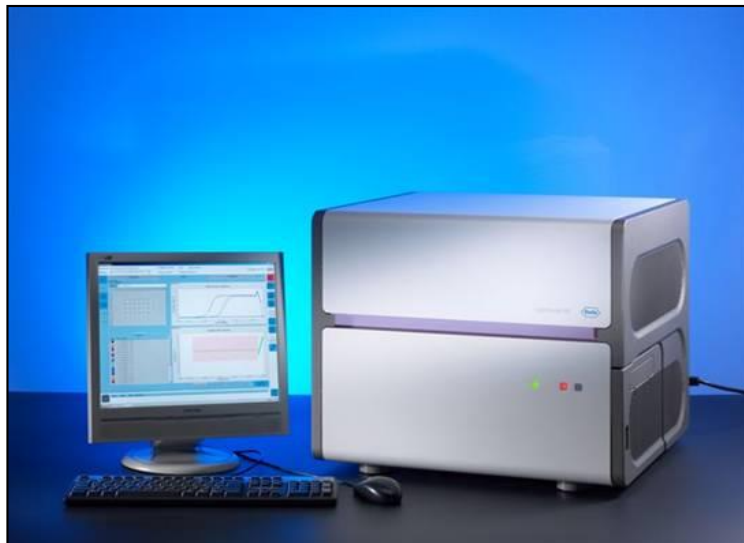
- LightCycler 1.5 & 2.0
- LightCycler 480
- LightCycler Nano vb.



# Real Time PCR

## ○ Roche Applied Science

- LightCycler 1.5 & 2.0
- LightCycler 480
- LightCycler Nano vb.



## Real Time PCR

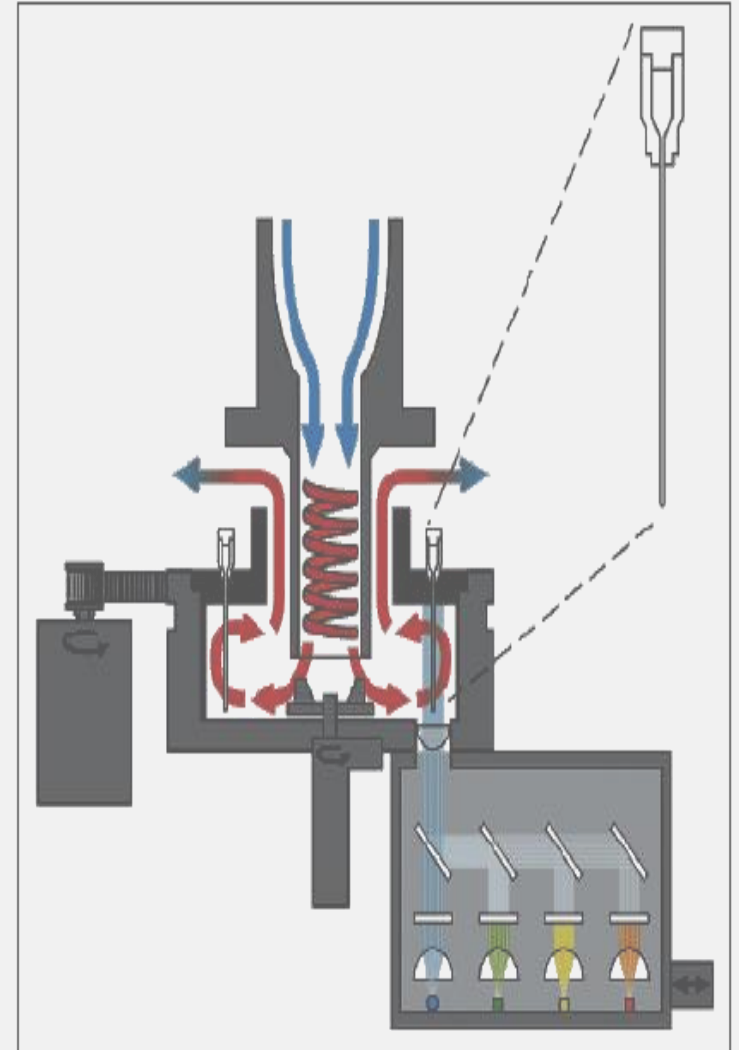
- LightCycler 1.5 & 2.0
  - LightCycler (LC) dünyadaki ilk kalitatif ve kantitatif PCR sistemidir ve sizlerin yapmayı planladığınız çalışmalar kadar çok yönlü ve esnektir



## Real Time PCR

### ○ Light Cyclers 1.5 & 2.0

- 20° C/sn' de ısı değişimi sağlayan hava sistemi ile normal PCR'dan 10x hızlıdır.
- Tüm çalışmalarda, boroslikat yapıdaki özel kapiller tüpler kullanılır.



## Real Time PCR

### ○ Light Cyclers 1.5 & 2.0

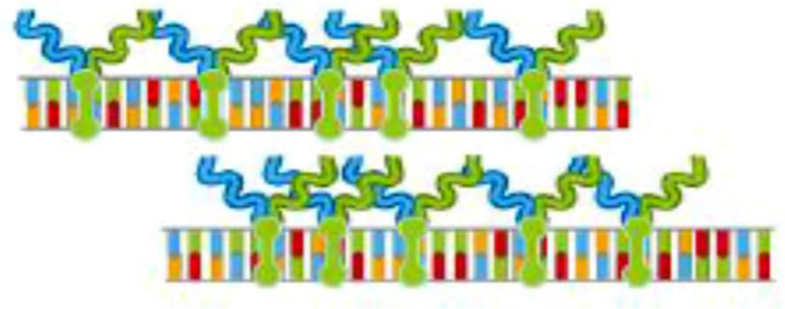
- 32 adet kapiller tüp yerleştirilebilen carousel, bir tam dönüşünü 5 sn de tamamlarken, bir örnek ölçümü 20 milisaniyede gerçekleşir
- Örnek hacmi ve yüzey oranı, deteksiyon işlemlerinin optimize gerçekleşmesini sağlar.



# Real Time PCR

## ○ Light Cycler Assay Format

- SYBR Green I  
Channel 530  
Karakterizasyon &  
Kantitasyon
- HybProbe Probes  
Channel 640 & 710  
Kantitasyon & Mutasyon  
Analizi



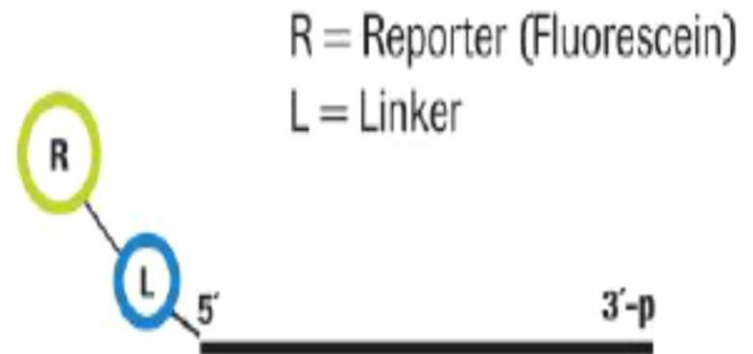
# Real Time PCR

## ○ Light Cycler Assay Format

- TaqMan Probes  
Channel 530  
Kantitasyon & Mutasyon  
Analizi



- SimpleProbe Probes  
Channel 530  
Mutasyon Analizi



# Real Time PCR

## ○ Light Cycler Assay Format

Assay Format	Detection Channel	Reporter Dye	Application	LightCycler®	
				1.5	2.0
SYBR Green I	530	SYBR Green I	Product Characterization Quantification	X	X
HybProbe Probes	610	LightCycler® RED 610	Quantification	-	X
	640	LightCycler® RED 640	Mutation Analysis	X	X
	670	LightCycler® RED 670		-	X
	710	LightCycler® RED 705		X	X
TaqMan Probes	530	FAM	Quantification	X	X
	560	VIC, HEX	Mutation Analysis	-	X
SimpleProbe Probes	530	Fluorescein	Mutation Analysis	X	X



## Real Time PCR

### ○ Light Cycler Software

Tüm veri ve reaksiyonların kontrolünü sağlayan, hızlı ve kullanımı kolay bir software



## Real Time PCR

### ○ Light Cyclers 480

Orta ve çok örnekli  
(high-throughput)  
real-time PCR  
uygulamalarında  
sıra dışı doğruluk,  
çok yönlülük ve hız...



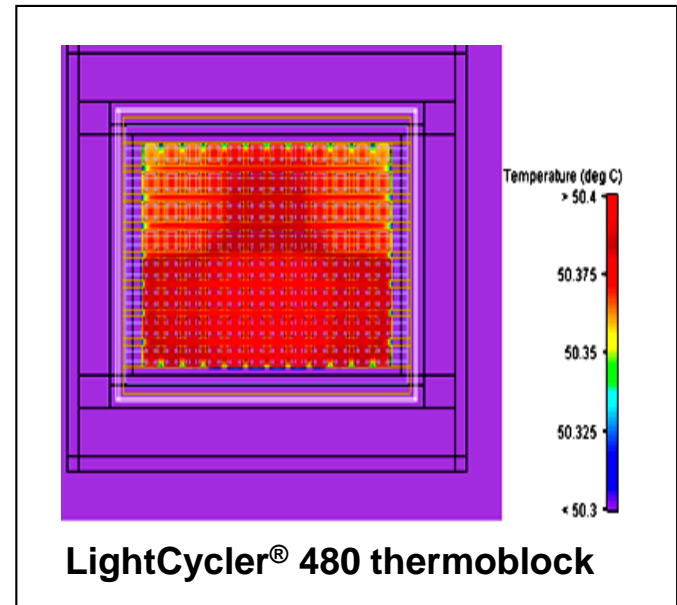
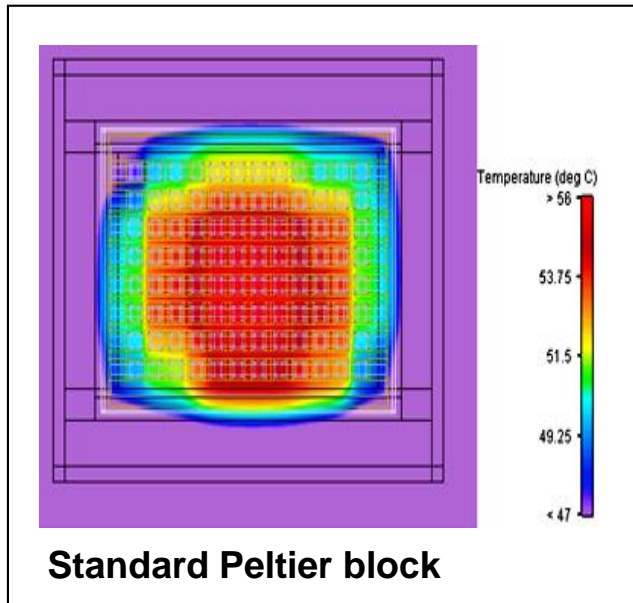
## Real Time PCR

### ○ Light Cyclers 480

- Kaynakları maksimumda kullanarak **40 dk'da 40 döngü**
- Pasif referans boyalarına veya normalizasyon plate'lerine gerek kalmadan işlenmemiş data analizi
- Yaratıcı "**pinhole teknolojisi**" ile her örnekten ayrı ayrı data toplama imkanı
- **96 veya 384 well plate'leri** seçme ve 2-3 dk içerisinde basit bir şekilde değiştirme kolaylığı
- Sistem **LIMS** software ara fazı ve/veya otomatik plate yükleme robotu ile lab iş akışına uyum rahatlığı

# Real Time PCR

## ○ LightCycler 480



Orijinal “termal blok cycler” teknolojisi ile  
***plate'in her noktasında,***  
eş şartlarda reaksiyon...

# Real Time PCR

## ○ Light Cyclers 480



Assay format	Excitation (nm)	Detection (nm)	Dyes	Application
SYBR Green I	483	530	SYBR Green I	Qualitative detection Characterization Quantification
HybProbe Probes	483	533/ 610 533/ 640 533/ 670	Fluo - LC <sup>®</sup> RED 610 Fluo - LC <sup>®</sup> RED 640 Fluo - Cy5	Quantification SNP Analysis
Hydrolysis Probes	450 558 483 615 523	500 533 568 610 640 670	LC <sup>®</sup> CYAN500 FAM VIC/HEX LC <sup>®</sup> RED 610 LC <sup>®</sup> RED 640 Cy5	Quantification
SimpleProbe Probes	483	533	Fluorescein	SNP Analysis



**Software**

Select an instrument and an experiment template file to run a new experiment. Load the reaction plate into the instrument, then click **Start Run**.

### Select Instrument

 FOSSANTAREPL01 READY	 FOSSANTAREPL01 READY	 FOSSANTAREPL02 READY
--	--	--

### Enter Experiment Name and Location

\* Experiment Name:  Location:

Barcode (Optional):  Comments (Optional):

User Name (Optional):

### Select Experiment Template

\* Experiment Template File:

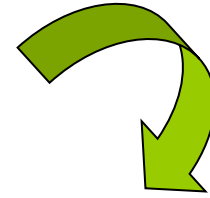
### Samples

Sample
Sample 1

You may import a plate setup file or a sample definition text file. Alternatively, you may directly edit the sample names in the table to the left, or copy and paste sample names from a spreadsheet.

# Bilgi Aktarım Kapasitesi

- Excelden direk örnek isimleri aktarımı
- Ekstra örnek bilgileri aktarımı



Well	Sample Name	ID	Age	Sex	Weight	HairColor	Smoker
1	Sample 1	1	22	Female	25	black	Yes
2	Sample 2	2	25	Male	26	brown	No
3	Sample 3	3	45	Female	50	blonde	Yes
4	Sample 4	4	31	Male	33	red	Yes
5	Sample 5	5	29	Female	46	grey	No

Plate Layout Well Table

Show in Wells Select Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

**Sample:** Sample 1  
**Custom Property:**  
**ID:** 1  
**Age:** 22  
**Sex:** Female  
**Weight:** 25  
**HairColor:** black  
**Smoker:** Yes





---

# Gen Ekspresyonu

# Tek Platede TaqMan® ve SYBR® Assays Çalıştırabilme İmkkanı

## ViiA™ 7 Softwarede Filtre Seçme Özelliği

Run Method

Reaction Volume per Well:   $\mu$ L

Graphical View **Optical Filters**

PCR Filter

Load Save Revert to Defaults

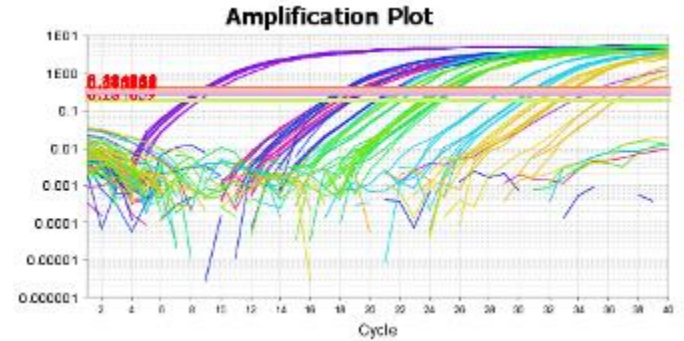
Excitation Filter	Emission Filter			
	FAM	VIC	Dye3	ROX
FAM	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
VIC	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dye3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ROX	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Melt Curve Filter

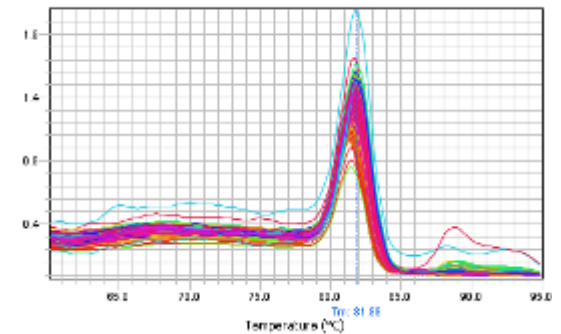
Load Save Revert to Defaults

Excitation Filter	Emission Filter			
	FAM	VIC	Dye3	ROX
FAM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
VIC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dye3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ROX	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## TaqMan Assay ve SYBR Assay Çalışması

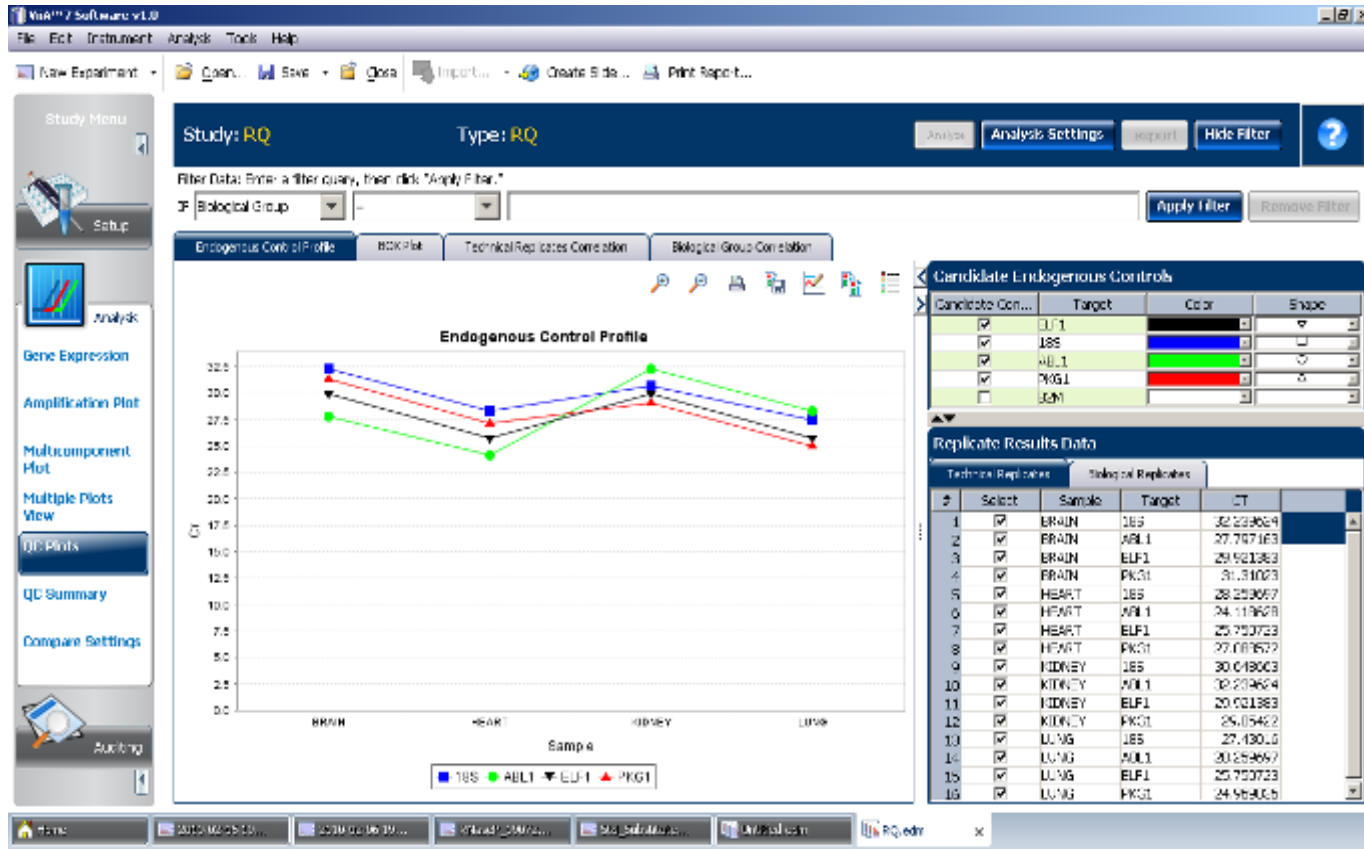


### Derivative Melt Curve



# Endojen Kontrol Seçimi

- En iyi housekeeping geni belirlemedeki yardımcınız.
- Örneklerin genelinde genlerin genel CT dağılımını değerlendirin





# Genotipleme

# Genotipleme Optimizasyonu

- Ortadaki Kümelenmeler için İdeal Döngüleri
- Scrol Barı Kullanılarak Optimal Kümelenme Belirleme
- Kazanç: Optimize Protokoller

## Allelic Discrimination Plot

### Plot Settings

SNP Assay: SNP Assay 1

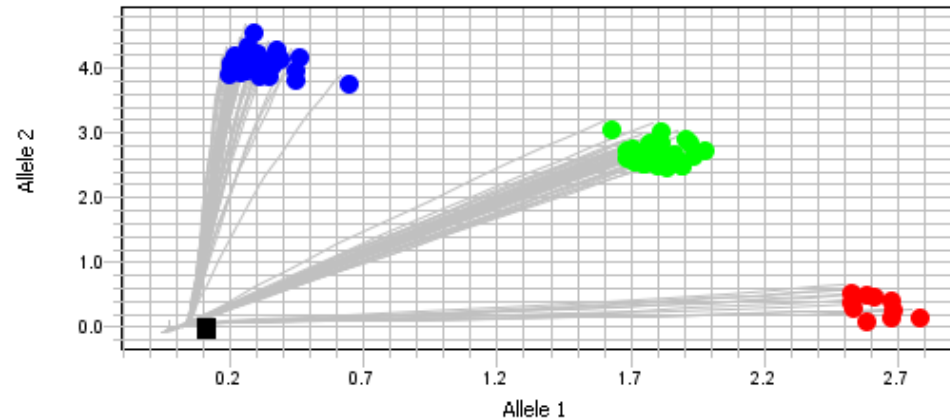
Apply Call: Undetermined

Plot Type: Cartesian

2 SNP Assay Flags Found!



### Allelic Discrimination Plot



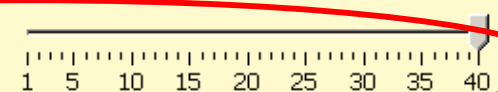
### Legend

- Homozygous Allele 1/Allele 1
- Homozygous Allele 2/Allele 2
- Heterozygous Allele 1/Allele 2
- ⊗ Undetermined

### Options

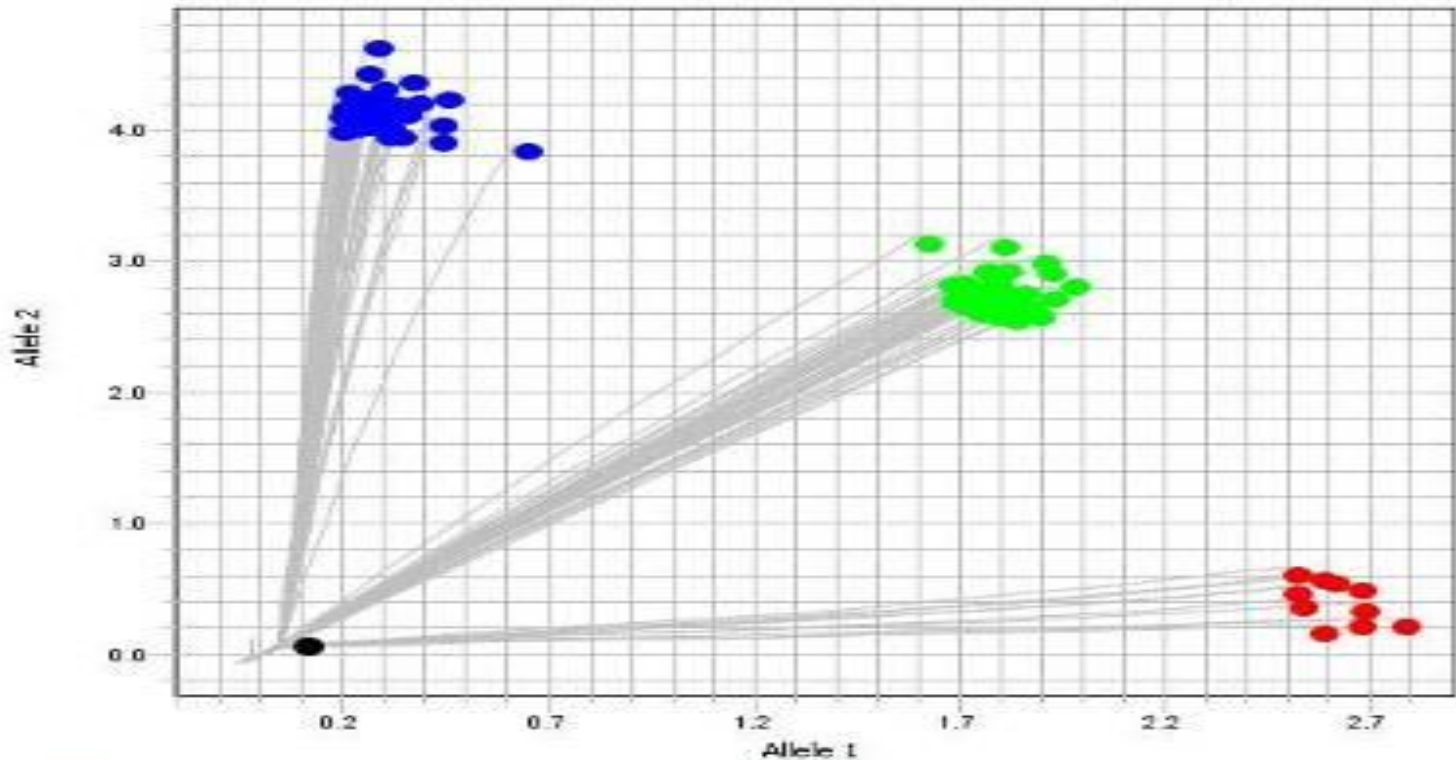
Reveal Traces

Show Cycle: 40



# Gerçek Zamanlı Genotyping

Allelic Discrimination Plot

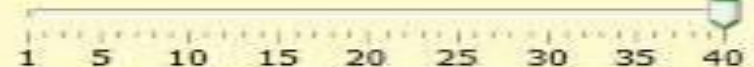


Legend

- Homozygous Allele 1/Allele 1
- Homozygous Allele 2/Allele 2
- Heterozygous Allele 1/Allele 2
- ✕ Undetermined

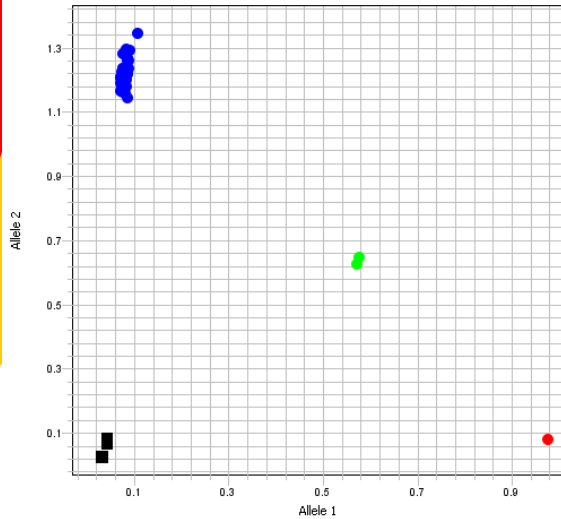
Options

Reveal Traces Show Cycle: 40

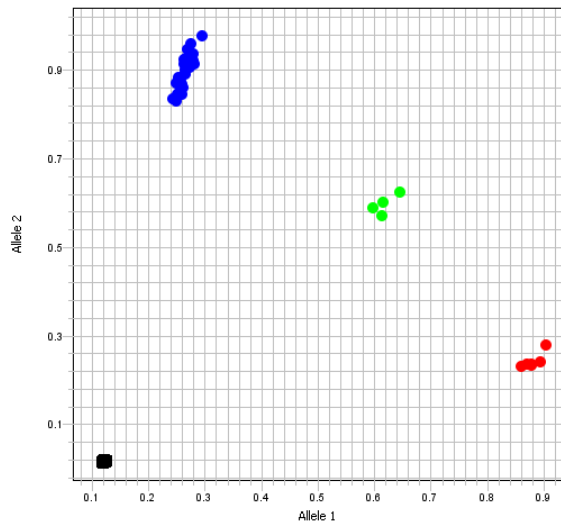


# Çoklu SNP Genotyping!

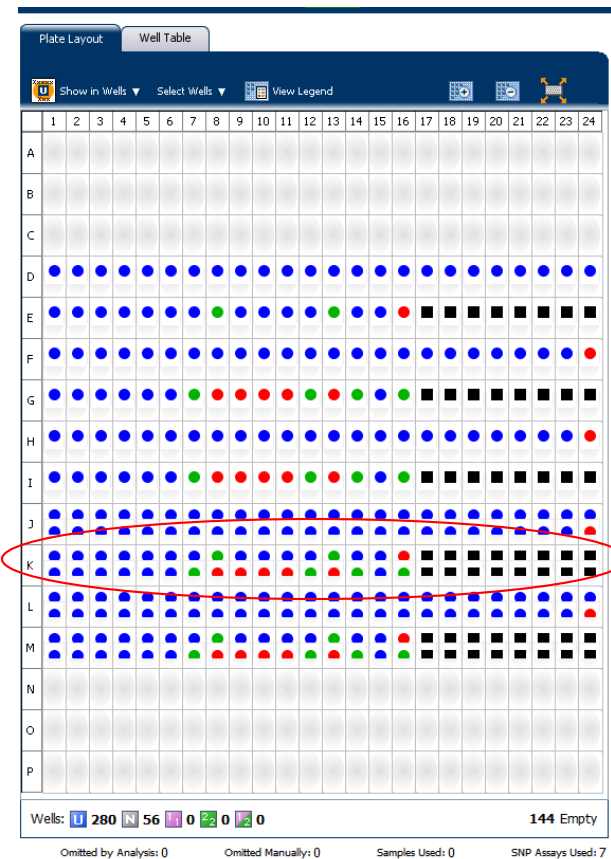
Allelic Discrimination Plot



Allelic Discrimination Plot



239	J23	SNP Assay 1 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2
239	J23	SNP Assay 2 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2
240	J24	SNP Assay 1 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2
240	J24	SNP Assay 2 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2
241	K1	SNP Assay 1 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2
241	K1	SNP Assay 2 Multi nonMGB	Unknown	Allele 1	Allele 2

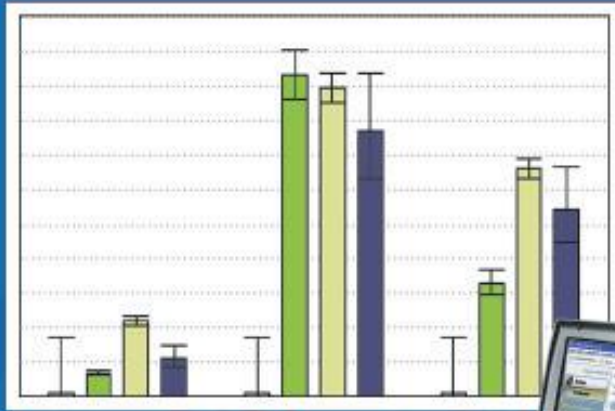


# TaqMan® SNP Genotyping Assays:

Assay Type	Description
TaqMan® <u>Pre-Designed</u> SNP Genotyping Assays	4,500,000 human SNP assays designed <i>in-silico</i> 160,000 population-validated SNP assays 70,000 assays that target gene-coding regions
Mouse TaqMan® <u>Pre-Designed</u> SNP Genotyping Assays	> 10,000 Mouse SNP assays designed <i>in-silico</i>
TaqMan® <u>Drug Metabolism</u> Genotyping Assays	> 2,600 assays that target SNPs in > 220 genes known to be part of drug metabolism pathways
<u>Custom</u> TaqMan® SNP Genotyping Assays	Custom assays designed around customer's SNP of interest – any possible SNP, any genome



# The 7500 Serisi Real-Time PCR Sistemleri



# The 7500 Serisi Real-Time PCR Sistemleri

---

	Easy-to-use software	GEX Study	Service install	Fast PCR	HRM	21 CFR part 11 module*	5 colours
7500	Evet	Evet	Evet			Evet	Evet
7500FAST	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet

\*requires SDS Software 1.4

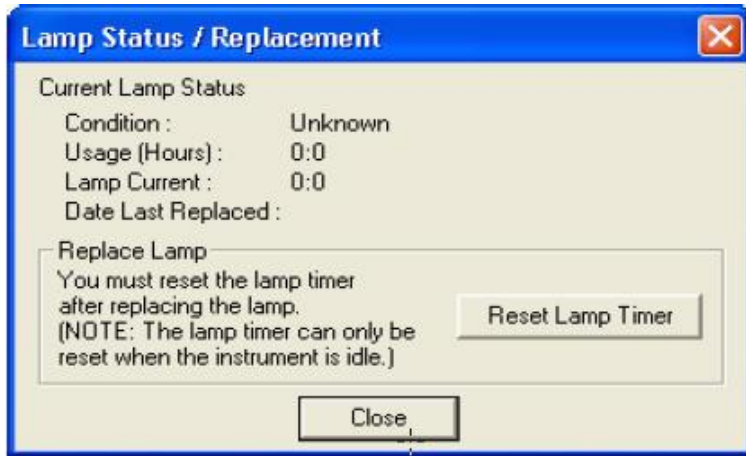
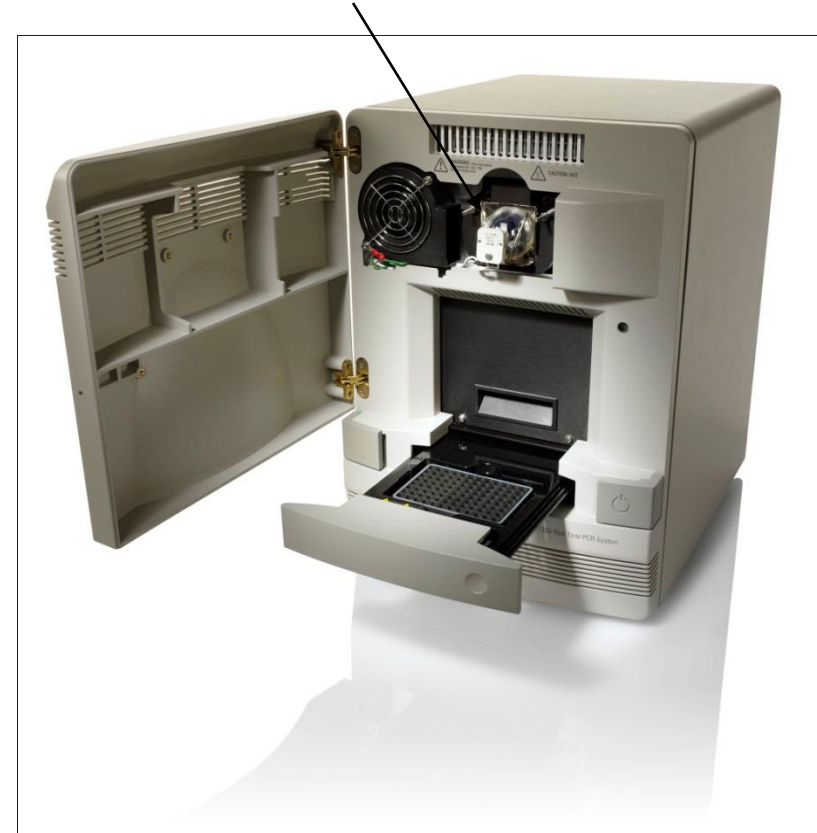
# 7500 Ailesi

## Cihazın Kullandığı Lambalar

Tungsten Halojen Lamba

### Tungsten Halojen Eksitasyon Lambası:

- 2,000 Saat Çalışma Süresi
- Kullanıcı Kolay Değiştirebilir



# Yüksek Performanslı Boya Aralıkları

Standard Boyalar:	
<b>SYBR<sup>®</sup> Green 1 Dye</b>	<b>528 nm</b>
<b>FAM<sup>™</sup></b>	<b>530 nm</b>
<b>TET<sup>™</sup></b>	<b>540 nm</b>
<b>VIC<sup>®</sup></b>	<b>554 nm</b>
<b>JOE<sup>™</sup></b>	<b>554 nm</b>
<b>NED<sup>™</sup></b>	<b>576 nm</b>
<b>TAMRA<sup>™</sup></b>	<b>582 nm</b>
<b>ROX<sup>™</sup></b>	<b>610 nm</b>

	IVD	CEIVD kits	Sample Setup flexibility	Open Software	Security features	Time to Result	Service & Support
7500 Fast	😊	BCR/ABL1 Quant (CE-IVD) from Asuragen	Tube strips 96-well plates 😊😊😊	😊	😊	Standard (90 min) Fast (30 min) 😊😊😊	On-site Dx service, 😊😊😊
Roche LC2.0	😊	😊	Capillaries Only 😊	😊	-	Fast (30 min) 😊😊	Standard RUO service 😊😊
Roche LC480	😞	Only on it's MDx brother, the z480: K-RAS	plates only 😊😊	😊	😊	Standard (90 min) Fast (60 min) 😊😊	Standard RUO service available (onsite) 😊😊
Cepheid GeneXpert	😊	😊	Cartridges Only 😊😊	😊	😞	Fast (40 min) 😊	Limited service team 😊
Abbott m2000rt	😊	😊	Tubes, strips 96-well plates 😊😊😊	😞	😞	Standard (90 min) 😊	Standard diagnostic service available 😊😊

# Real Time PCR

Assay format	Excitation (nm)	Detection (nm)	Dyes	Application
<b>SYBR Green I</b>	<b>483</b>	<b>530</b>	<b>SYBR Green I</b>	<b>Qualitative detection Characterization Quantification</b>
<b>HybProbe Probes</b>	<b>483</b>	<b>533/ 610 533/ 640 533/ 670</b>	<b>Fluo - LC<sup>®</sup> RED 610 Fluo - LC<sup>®</sup> RED 640 Fluo - Cy5</b>	<b>Quantification SNP Analysis</b>
<b>Hydrolysis Probes</b>	<b>450 558 483 615 523</b>	<b>500 533 568 610 640 670</b>	<b>LC<sup>®</sup> CYAN500 FAM VIC/HEX LC<sup>®</sup> RED 610 LC<sup>®</sup> RED 640 Cy5</b>	<b>Quantification</b>
<b>SimpleProbe Probes</b>	<b>483</b>	<b>533</b>	<b>Fluorescein</b>	<b>SNP Analysis</b>

# Real Time PCR

## ○ Light Cyclers Avantajları

- Hızlı PCR performansı (1 saat)
- Günlük çalışılabilen yüksek örnek miktarı (~200 numune/gün)
- Duyarlı (< 5 kopya)
- Tekrarlanabilir (CV < % 2.0)
- Esnek ve geliştirilebilir çalışma sahası
- Geniş dinamik aralık (10 - 10<sup>10</sup> kopya)
- Kullanışlı ve estetik dizayn

# Real Time PCR

---

## ○ Light Cyclers Çalışma Sahaları - I

### ○ Gen Deteksiyonu

- Spesifik DNA/RNA deteksiyonu (onkoloji, vs.)
- Spesifik türlerin deteksiyonu (bakteri, virus, vs.)
- Patojen deteksiyonu (legionella, anthrax, vs.)
- Antibiyotik direnç taraması (MRSA, VRE, vs.)
- Su kalite monitörizasyonu

### ○ Gen Ekspresyonu

- Minimal residual hastalıklar (MRD)
- mRNA ekspresyon seviyelerinin deteksiyonu (sitokin, kemokin, vs.)
- Dozaj bağımlı gen defektlerinde kantitasyon (kromozomal bozukluklar)



# Real Time PCR

---

- Light Cyclers Çalışma Sahaları - II
  - **Genotiplendirme**
    - Kanserde mutasyon deteksiyonu
    - Farmakogenetik
    - Genetik Tarama
    - Evrim çalışmaları
  - **Gıda Güvenlik Testleri**
    - GMO deteksiyonu
    - Gıda Patojenleri (Salmonella, E. coli, vs. )
    - Maya bozulmalarında tarama
  - **Gen knockdown**
    - Genin susturulmasında siRNA çalışmaları

**Tesekkürler...**