

Patoloji Tanı Teknikleri

Moleküler Patoloji

- Multidisipliner  moleküler biyoloji, genetik ve patoloji
- Nükleik asitlerdeki (DNA-RNA) değişikliklerin belirlenmesi
- Nükleik asit-protein-enzim yapılarının detaylandırılması
- Görevleri ve aralarındaki etkileşimlerin anlaşılması
- DNA, RNA ve protein yapılarında meydana gelen değişikliklerin araştırılması



Moleküler Patoloji

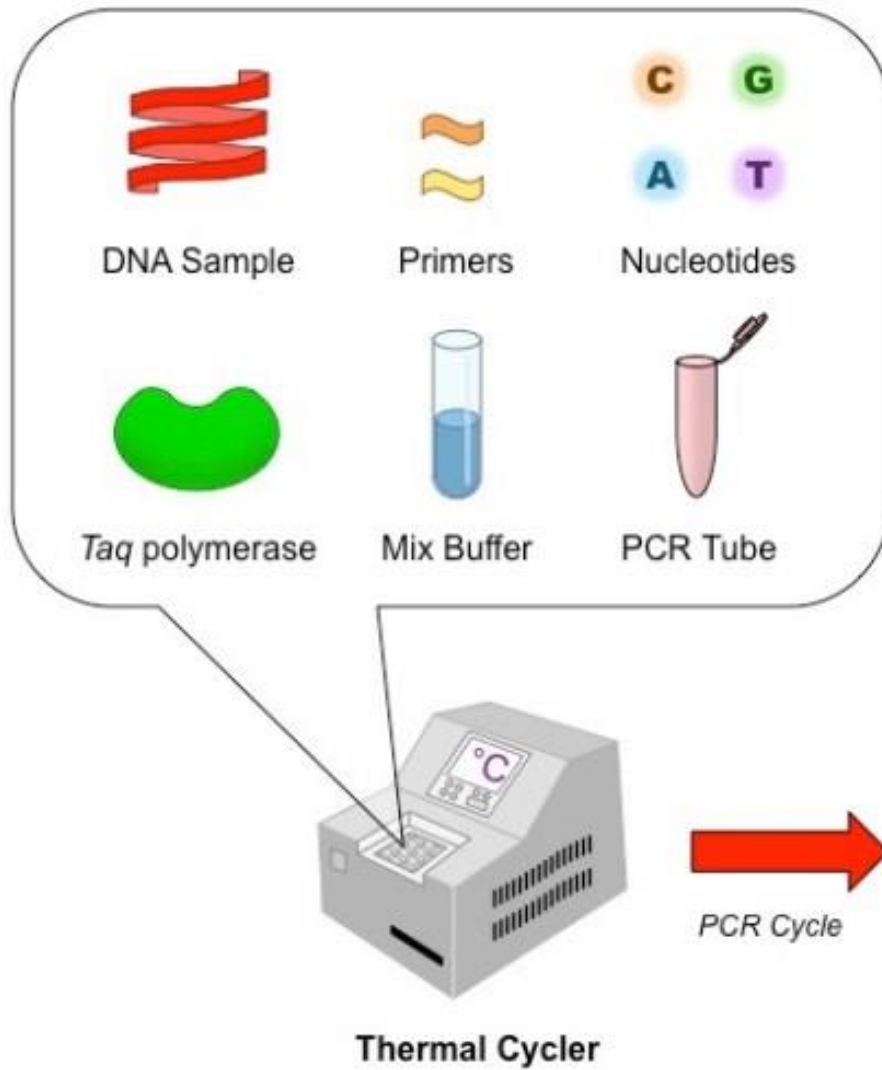
- Hastalıkların tanısında ve tedavisinde önemli rol oynar.
- Sıvı örnekleri, **taze veya taze dondurulmuş dokular**, parafin bloklar (DNA✓ RNA×), iğne biyopsi örnekleri, kan, kemik iliği vb.
- Tespitte önemli olan dokunun moleküler yapısının korunmasıdır. (paraformaldehid, formalin ve gluteraldehit)
- Çalışmalarda *laminar flow* kabinler kullanılmalıdır.



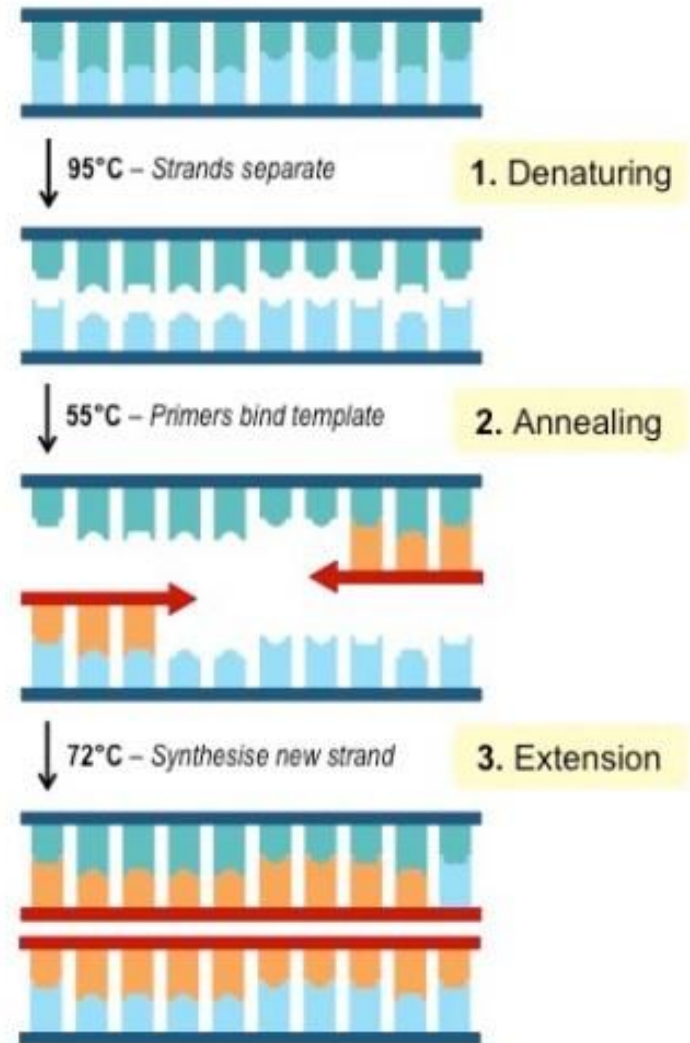
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- Belirli bir DNA dizisinin *in-vitro* koşullarda kopyalanması, çoğaltılması ve elde edilen ürünlerin gözle görülebilir bir hale getirilerek saptanması prensibine dayanan *hızlı*, *sensitivitesi* ve *spesifitesi* yüksek bir yöntemdir.
- Genetik ve infeksiyöz hastalıkların tanısı, adli tıp analizleri, ilaç uygulamaları, gıda teknolojisi, ziraat alanı

PCR Components



PCR Process (ONE Cycle)



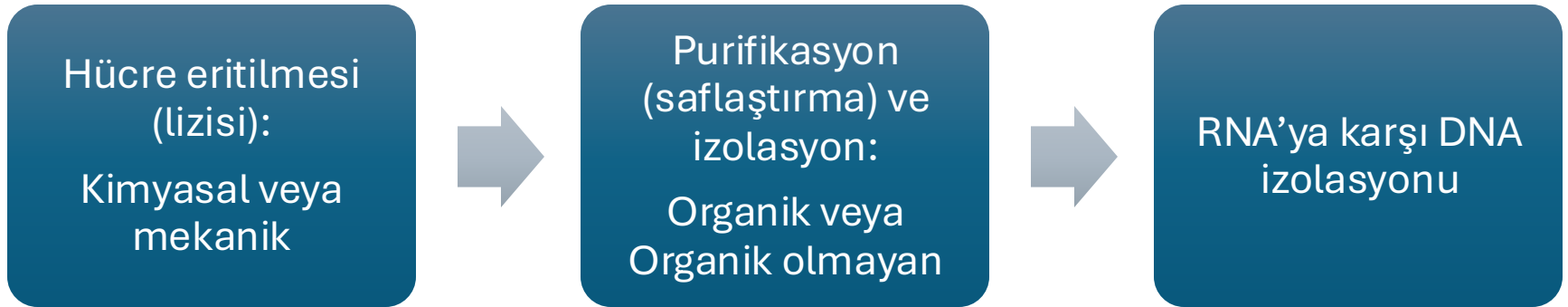
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri

- “Reverse Transcription” PCR (RT-PCR)
- Real time PCR
- Multiple PCR
- “Nested” PCR
- İn-situ PCR (*Direkt-indirekt*)
- “Competitive” PCR
- “Single-cell” PCR

İn Situ Hibridizasyon (ISH)/Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH)

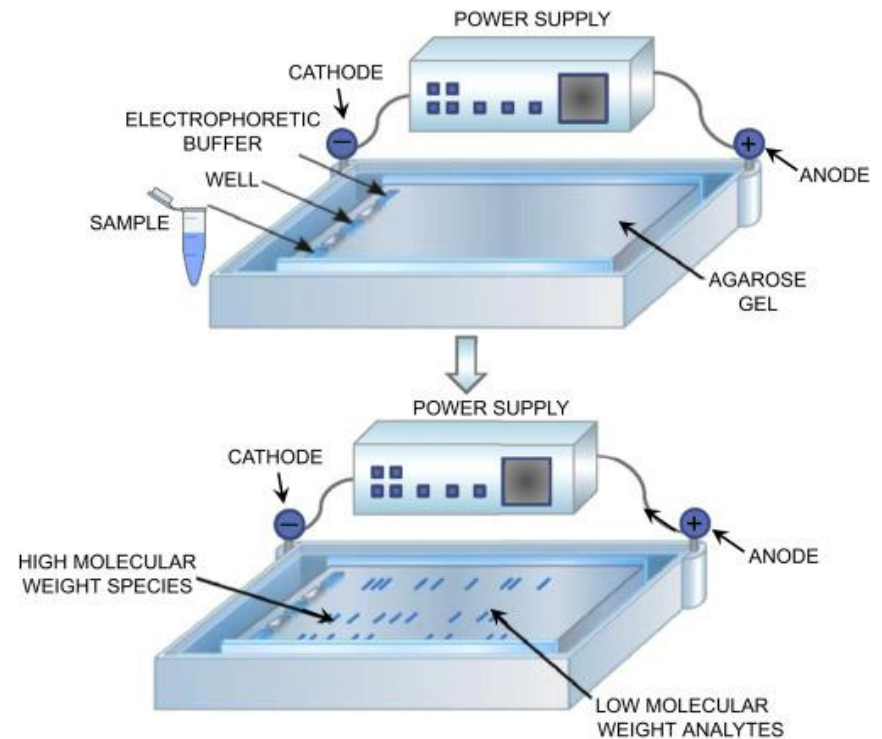
- Birbirini bütünleyen iki DNA zincirinin biraraya gelerek ikili sarmal biçimindeki molekülü oluşturmaya **hibridizasyon** denir.
- **ISH**; doku veya kromozomda bulunan özel DNA veya RNA dizilerine bağlanabilen, işaretli ve tamamlayıcı DNA/RNA nükleik asit ipliklerinin kullanıldığı bir yöntemdir.
- **FISH**; genomik sekansı belirlemek amacıyla floresan ile işaretli oligonükleotid probu kullanılır.
- Kromozom delesyonları, translokasyonları ve gen amplifikasyonları çalışmalarında yaygın olarak kullanılır.

Nükleik asit izolasyonu



Elektroforez ve DNA'nın gösterilmesi

- Matriks içerisinde makromolekülleri, elektrik alanı altında hareket hızına göre ayırır.
- Agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi, kapiller elektroforez, immunoelektroforez



Blotting yöntemleri

	Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
Hedef molekül	DNA	RNA	Protein
Örnek hazırlama	DNA izolasyonu ve enzimatik parçalanma	RNA izolasyonu	Protein izolasyonu
Ayırma	Elektroforez	Elektroforez	Elektroforez
Membran materyali	Naylon	Naylon	Nitrosellüloz veya PVDF (Polyvinylidene Fluoride)
Prob	Hedef molekülün homolog kısmı ile nükleik asit	RNA, DNA veya oligodeoksinükleotid	Primer antikor
İşaretleme	Radyoaktif, enzim	Radyoaktif, enzim	Enzim
Görüntüleme	X-ray film	X-ray film	Film, soğutmalı CCD, kamera, LED veya kızılötesi

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

- Genellikle biyolojik materyallerdeki antijen, antikor, protein ve glikoprotein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan immunolojik bir testtir.
- Antijen tespiti için enzim ile işaretli antikorlar kullanılır.
- Direkt, indirekt, sandviç ve kompetitif (yarışmalı) ELISA çeşitleri bulunmaktadır.



Spektrofotometri

- Numune çözeltisinden geçtikten sonra emilen foton miktarını (ışık yoğunluğu) ölçen bir alettir.
- Tespit edilen ışığın yoğunluğu ölçülerek bilinen bir kimyasal maddenin miktarı (konsantrasyonu) belirlenebilir.



Thermo Scientific™
GENESYS™ 140/150 Vis/UV-Vis Spectrophotometers

DNA mikroarray

- Belirli bir bireyden gelen DNA'nın genlerde bir mutasyon içerip içermediğini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir.
- Hastalıklarla ilişkili olan gen dizilerindeki değişiklikleri tanımlamak için de kullanılır.

