

KİM 458

Biyoteknolojinin Temelleri

Moleküler Tanı Sistemleri

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Moleküler Tanı

Moleküler tanı, hastalıkların tespit edilmesinde ve tedavisinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır.

Moleküler yöntemlerle hastalıklara tanı koymayı amaçlayan bir disiplindir.

Moleküler Tanının kullanım alanları

- **Mikrobiyoloji**
 - Hastalıklardan sorumlu parazitlerin, bakteri ve virüslerin tanımlanması
- **İmmünoloji**
 - İmmün fenotipleme, immün markırların yeri
- **Genetik**
 - Genetik mutasyonların yerlerini belirleme
 - Kalıtımsal sendromların yerlerinin belirlenmesi
 - *ör.* Duchenne Masküler Distrofisi

Moleküler tanı prosedürleri daha çok

- İlaçların test edilmesinde,
- Tek gen bozukluklarının
- Multi-faktöryel bozuklukların
- Bazı kanser türlerinin ve
- Enfeksiyöz hastalıkların tespit edilmesinde kullanılmaktadır.

Moleküler tanı ile suda, bitkilerde, toprakta ve insanlarda:

- Virüsler
- Bakteri
- Mantar
- Parazitler
- Proteinler gibi belirli yapılar tayin edilir.

Deteksiyon Sisteminin Özellikleri

İyi bir deteksiyon sistemi; **duyarlı**, **spesifik** ve **basit** olmalıdır.

- **Duyarlılık:** hedef, oldukça düşük miktarlarında bile belirlenebilmeli (*ortamda diğer moleküller varken*).
- **Spesifiklik:** test sadece hedef molekülü tespit etmeli.
- **Basitlik:** test rutin bir temelde verimli ve ucuz olmalı.

Genetik ve Biyokimyasal Belirteçler

- Belirteçler, spesifik bir yapının tespitini sağlar (*işaretçi, indikatör, markör*)
- Fenotipleri
 - Renk,
 - Özellik (ör:düz – engebeli)
 - Biçim (ör:yuvarlak-düzensiz) şeklinde olabilir.
- Biyokimyasal ya da genetik olabilirler.

Biyokimyasal Belirteçler

- Karbonhidratlar (Kan gruplarının belirlenmesi)
- Proteinler
 - İzozim analizleri (kalp krizi- kreatin kinaz ve alanin aminotransferaz)
 - Jel elektroferesi (S-hemoglobin)
- Antikorlar
- Sitolojik Belirteçler: Abnormal kromozom sayısı ya da morfolojisi kolaylıkla tespit edilebilir (Down Sendromu, Turner Sendromu).
- DNA Belirteçleri

DNA Belirteçleri

- En çok kullanılan belirteçleridir.
- Zaman aralığı: 2 saat-1 hafta
- Tek nükleotid farkını tesbit edebilirler (SNP - tek nükleotid polimorfizmi).

DNA Belirteç Çeşitleri:

- RFLP - Restriksiyon kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi
- AFLP - Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
- RAPD - Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
- VNTR - Değişken sayıdaki ardışık tekrarlar
- SSR - Basit dizin tekrarı

ELISA

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*): Antikor-antijenin reaksiyonunu ve bu reaksiyonu tesbit eden bir sistemdir.

- Test edilecek moleküle bağlanacak spesifik bir antikorun (primer antikor) ilavesi.
- Bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için yıkama.
- Primer antikorlara bağlanacak sekonder antikorların ilavesi.
- Sekonder antikor genellikle bir enzime bağlanır (alkalen fosfataz vb.)
- Bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için yeniden yıkama yapılır.
- En son olarak renksiz substrat ilave edilir. Substrat sekonder antikorla pozitif sonucu gösteren renkli bir reaksiyon verir.

Yöntemde mikrotitrasyon plakaları kullanılmaktadır.

ELISA'nın Kullanıldığı Yerler

- Kanda viral kontaminasyonun izlenmesi: HIV-1 ve HIV-2, hepatit C, Hepatit B
- Hormon seviyelerinin ölçülmesi:
 - HCG (insan koryonik gonadotropini) (hamilelik için);
 - LH (luteinleştirici hormon, yumurtlama dönemlerinin belirlenmesi),
 - TSH (tiroid fonksiyonu için).Ayrıca sporcular tarafından yasa dışı olarak kullanılabilen bazı hormonların tesbitinde.
- Enfeksiyonların tespit edilmesi:
 - cinsel yolla bulaşan hastalıklar (ör. HIV, frengi),
 - hepatit B ve C, Toxoplasma gondii.
- Besinlerdeki ve ev tozlarındaki allerjenlerin tespiti
- Romatizmal faktörlerin tespiti
- Yasadışı uyuşturucu maddelerin tespiti
(ör. kokain, afyon, Δ -9-tetrahidrokannabinol: mariuananın aktif maddesi)

ELISA ile HIV Tesbiti

- Hasta kanı HIV antijeni ile kaplanmış mikroplaka kuyucuklarına konur, inkübe edilir ve daha sonra yıkanır.
- Kuyucuklar enzim konjugatları ile inkübe edilir, yıkanır ve substrat eklenir.
- Eğer hastanın kanı HIV antikoru içeriyorsa substratın rengi yeşile döner.

HCG'nin Tesbitine Dayanan ELISA (gebelik testi)

Gebelikte döllenme sonrası plasenta HCG (insan koryonik gonadotropini) hormonunu salgılar.

Normalde kanda ve idrarda eser miktarda bulunan bu hormonun arttığına çeşitli testlerle gösterilmesi (HCG salgılayan tümörlerin olduğu çok ender durumlar hariç) vücutta bir gebelik olduğunun kanıtıdır.



DNA Tanı Sistemleri

DNA Hibridizasyonu

DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturulması temeline dayanır.

Bu yöntemle;

- istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin belirlenmesi,
- bu parçaların nükleotid dizilerinin araştırılması,
- homoloji derecesine bakılarak farklı organizma gruplarına ait genlerin ya da DNA parçalarının nükleotid dizisi benzerlikleri araştırılarak, bu organizmaların yakınlık dereceleri moleküler düzeyde tespit edilebilir.

- Southern Blot  DNA
- Northern Blot  RNA
- Western Blot  protein

DNA hibridizasyon basamakları:

- Hedef nükleik asitle birleşecek bir **proba** ihtiyaç vardır.
- **Hedef** katı bir matrikse (örneğin membran) tutturulur.
- Prob ve hedef **denatüre** edilir.
- Denatüre edilmiş prob içerisinde hedefin bulunduğu bir çözeltiliye konur.
- Eğer hedef ve prob arasında **homolog sekanslar** varsa, prob hedefe bağlanır (yapışır) (**hibridizasyon**).
- Kolorimetrik, kemiluminesans ya da otoradyografi gibi yöntemlerle hibritleşmiş probun analizi yapılır.

Southern Blot

- DNA'nın izolasyonu ve restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılır.
- DNA fragmentleri elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilir (elektroforez).
- Jeldeki DNA'lar bir membrana aktarılır (blotlama).
- Özgül DNA dizilimlerinin yeri işaretli DNA ve RNA proplar kullanılarak belirlenir.

Northern Blot

Moleküler genetikte kullanılan hibridizasyon yöntemlerinden biridir. Bu teknik Southern blot'a çok benzer, ancak bu yöntemde DNA yerine mRNA veya virüs RNA'sı kullanılarak işlem yürütülür.

- **Dot/Slot Blotlama:** DNA veya RNA elektroforez yapılmaksızın destek materyale damlatılır, sabitlenir ve özgül dizilimleri belirlenir.
- ***In situ* Hibridizasyon:** Hücre ve doku içerisindeki hedef nükleik asitin lokalizasyonunun belirlenmesini sağlar. DNA/DNA, DNA/RNA ya da RNA/RNA hibritleşmeleri meydana gelir.
 - Dokunun işlenmesi (fiksasyon ve kesim)
 - Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi
 - Hibridizasyon
 - Yıkama
 - Görüntüleme

PCR (*Polimeraz Zincir Reaksiyonu*)

- DNA'nın aslına sadık kalarak *in vitro* da çoğaltma esasına dayalı bir tekniktir. Nükleik asit dizileri kalıp DNA' ya göre çoğaltılır.
- Polimeraz zincir reaksiyonları üç temel aşamadan oluşur.
 - DNA'nın denatürasyonu
 - Primer dizilerin DNA'nın tek zincirlerine bağlanması
 - DNA polimeraz tarafından zincir uzatma reaksiyonu
- Her reaksiyon çevriminde kalıp zincir sayısı logaritmik olarak artar çok sayıda istenilen geni taşıyan DNA parçası oluşur.

PCR Tekniđinin Kullanım Alanları

- Tanı ve teşhis
- Genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti
- Moleküler klonlama (DNA klonlaması)
- DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi
- Genetik akrabalık tesbiti ve adli tıp vakalarının tesbiti

- PCR hedef DNA'yı çoğaltmak için spesifik oligonükleotid primerler kullanır.
- Uygun çoğaltılmış parça uzunluğu hedefin varlığını doğrular.
- Bakteri (*E. coli*, *M. tuberculosis*), virüs (HIV) ve mantarların belirlenmesi için kullanılabilen spesifik primerler söz konusudur.
- PCR ile spesifik DNA parçacıklarının çoğaltılması sağlanarak DNA polimorfizmi belirlenebilir. Bunun için son yıllarda **RFLP**, **AFLP**, **SSR** ve **RAPD** gibi moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir.

DNA Parmak İzi (*DNA Fingerprinting*) (I)

- DNA Parmak izi **minisatellit** denen DNA tekrar dizilerinin sayısındaki farklılıktan doğar.
- Minisatellit dizileri 2 ile 100 nükleotid uzunluğundaki DNA bölgeleridir. Örneğin;
GGAAGGGAAGGGAAGGGAAG baz dizisi,beş nükleotidlik **GGAAG** dizisinin dört tekrarından oluşmaktadır.Tipik olarak her bir tekrardaki nükleotid sayısı 14'ten 100 nükleotide kadar değişebilir ve her bölgedeki tekrar sayısı 2 ile 100'den fazla olabilir.
- Bu bölgeler değişken sayıdaki ardışık tekrarlar(variable-number of tandem repeats,VTNR) olarak bilinir. Belirli bir bölgedeki tekrar sayıları farklılık gösterir. Her farklı tekrar sayısı bir VTNR allelini oluşturur.VTNR dizileri, restriksiyon enzimleri ile kesilip görüntülenir. Elde edilen bant profiline **DNA Parmak İzi** denir.

DNA Parmak İzi (II)

DNA parmak izi;

- Restriksiyon Parça uzunluk Polimorfizmi (RFLP)
- PCR

yöntemleri ile analiz edilir.

Kullanım alanları:

- Kriminal amaçlı
- Babalık testinde
- Moleküler arkeoloji
- Kalıtsal hastalıkların tanısında
- Genetik çeşitlilik belirlemede kullanılmaktadır.

BİYOSENSÖRLER

Biyosensör

- Bünyesinde biyolojik bir algılayıcı bulunan ve bir fizikokimyasal dönüştürücüyle (çeviriciyle) birleştirilmiş analitik cihazlardır.
- Bir veya bir grup analitin miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.

Biyosensör Bileşenleri

Biyolojik Bileşen (biyoaktif tabaka): Analiz edilecek madde ile spesifik etkileşime girer.

Oldukça spesifik olmalı

Saklama koşullarında stabil kalmalı

İmmobilize olmalı

- Mikroorganizmalar
- Doku kesitleri
- Hücreler
- Organeller
- Nükleik Asitler
- Enzimler
- Reseptörler
- Antikorlar
- İyonoforlar

Hatalı Sinyal Kaynakları

- Homojen olmayan örnek
- Çözeltide baloncuk oluşması
- Sıcaklık
- Elektromanyetik girişim
- Elektronik stabilitenin olmaması
- Çip (algılayıcı) /dedeksiyon tabakasının stabil olmaması

Biyosensör Bileşenleri

Fizikokimyasal Dönüştürücü

Reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Oluşan biyokimyasal reaksiyona göre dönüştürücü seçilir.

Elektrokimyasal (elektrik dağılımı)

- Potansiyometrik
- Amperometrik
- Konduktometrik
- Transistörler

Kütle Değişimi

- Piezoelektrik

Optik (ışık şiddeti)

- Fotometri
- Florimetri
- Luminesans

Sıcaklık Değişimi

- Termistörler

Dedektör (*Algılayıcı*)

Dönüştürücüden gelen sinyaller bir mikroprosesöre gelir.

Mikroprosesörde sinyaller artırılır ve analiz edilir.

Data daha sonra konsantrasyon ünitesine dönüştürülür ve bir göstergeye ya da data depolama aygıtına transfer edilir.

Biyosensör Özellikleri

- Algılayıcı birim bazen küçük ve biyouyumlu olmalıdır (biyoçipler).
- Biyoaktif bileşen spesifik ve kararlı olmalıdır.
- Düşük analit seviyesinde bile dedeksiyon olmalıdır.
- Reaksiyon fiziksel parametrelerden olabildiğince az etkilenmelidir.
- Cevap doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olmalıdır.
- Cevap zamanı kısa olmalıdır
- Ölçüm ünitesi taşınabilir olmalıdır.
- Düşük maliyette seri olarak büyük miktarlarda üretilibilmelidir.
- Cihazın kalibrasyonu kolay olmalıdır.

Kullanılan Dönüştürücüye göre Biyosensörler

- Piezo-Elektrik Biyosensörler
- Elektrokimyasal Biyosensörler
- Optik Biosensörler
- Kalorimetrik Biyosensörler

Piezoelektrik Biyosensörler

Genel anlamda karakteristik **rezonans frekansındaki farkı** belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu osilasyonun frekansı kristalin kalınlığı ve kesimine bağlıdır.

Elektrokimyasal Biyosensörler

- Amperometrik biyosensörler → akım
- Potensiyometrik → voltaj
- Kondüktometrik → özdirenç

Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörlerde iki elektrot arasına bir potansiyel uygulandığında oluşan akımdan yararlanır.

Akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır.

Optik Biyosensörler

- İletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek hazırlanır.
- **Kolorimetrik Biyosensörler (Renk)**: Analit ürüne dönüşürken meydana gelen ışık absorpsiyonu değişimleri ölçülür.
- **Fotometrik Biyosensörler (ışık şiddeti)**: luminesans veya floresans olaylarının fotoçoğaltıcı tüpler kullanılarak belirlenen sistemlerdir.
- **Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörleri**: SPR, biyomoleküler etkileşimleri gerçek zamanlı ve etiketleme yapmaya gerek olmadan ölçen güçlü bir tekniktir.

Potansiyometrik Biyosensörler

Uygulanan potansiyel doğrudan analit konsantrasyonu ile orantılıdır.

pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar,

anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar

karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlar

Kalorimetrik Biyosensörler

- Enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonu belirlenir.
- Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanır.
- Reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.

Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Çevresel (hava, toprak ve su) İzleme

- petrol sızıntılarının
- yer altı sularındaki uranyum miktarlarının
- zehirli atıkların
- kanserojenlerin
- içme sularını kirleten mikroorganizmaların (konsantrasyonlarını) belirlenmesi.
- Hızlı Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOD) testleri
- Atık su testleri: göller, nehirler, dereler, koylar vb...
- Hızlı toksik kirlenmenin belirlenmesi

Medikal (Klinik ve Laboratuvar Uygulamaları)

- Tıpta tümör hücrelerinin kemoterapik ilaçların hassasiyetini ölçmek için biyosensör olarak kullanılması.
- Optik biyopsi sensörleri sayesinde ağrısız, iyileşme süresi kısa operasyonlarla kanserli dokular teşhis edilmekte.
- İlaçların ve yapay organların üretimi.
- Medikal telesensörler olarak adlandırılan çipler; vücut ısısını, nabızı, kan basıncını, kandaki şeker ve oksijen miktarlarını ölçebilmekte.

Diyabet: kan glukoz metreleri, yapay pankreas

Diğer medikal tesler: kan gazı, laktat, kreatinin...

Kolera toksin biyosensörü: antijen - antikor - toksin - lipozom - enzim kombinasyonu

Tay Sachs biyosensörü: DNA – avidin – biotin – lipozom - enzim

Endüstriyel proses kontrolü:

- Sıcaklık basınç ve asitliğin ölçümü ile proses kontrolü.

Besin kalite kontrolü:

- Gıda kalite ve güvenliği
Kalite: bazı fiziksel özellikler ve kimyasal bileşenlerin miktarları,
güvenlik: zararlı mikroorganizmaları veya onların toksinlerini ve diğer
allerjen ve toksik bileşenlerin miktarlarını saptamak.
- Proses kalitesi
- Besinde meydana gelen bozulmaların tespiti

Askeri:

- Muhtemel bir biyolojik saldırının önceden belirlenmesi
- Askerlerin savaş sırasında fizyolojik durumlarını belirleyen ve bu bilgileri hem yaralılara müdahale edecekleri hem de strateji belirleme konumundaki birimlere ileten sistemlerde kullanılır.
- Askerlere temiz su, yiyecek ve güvenli araç-gereç sağlanması