

# ÇOKLU RNA TRANSKRİPTLERİNİN ÖLÇÜMÜ KARŞILAŞTIRMASI

**Sema AKYÜREK\***  
**Müslüm AKGÖZ\*\***

TÜBİTAK UME, Barış Mah. Dr. Zeki Acar Cad. Pk54, 41470 Gebze/KOCAELİ

Tel: 0262 679 50 00

E-mail\* : [sema.akyurek@tubitak.gov.tr](mailto:sema.akyurek@tubitak.gov.tr)

E-mail\*\* : [muslum.akgoz@tubitak.gov.tr](mailto:muslum.akgoz@tubitak.gov.tr)

## ÖZET

Bu çalışmada, LGC şirketi (İngiltere) tarafından hazırlanan ve gönderilen örneklerin içerdiği RNA miktarları belirlenmiştir. Örneklerin içerdiği RNA miktarı, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (GZ-PZT) tekniği ve örneklerle birlikte gönderilen, kopya sayıları bilinen kalibrantlar kullanılarak belirlenmiştir. Ulusal Metroloji Enstitüleri ve katılımcı özel laboratuvarlar arasında yapılan bu karşılaştırma çalışması sonucunda örneklerin içerdiği RNA transkript oranlarının ölçümünün, yüksek tekrarlanabilirlik ve doğrulukta yapılabildiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** RNA, Gerçek Zamanlı PZT (RT-PCR), Miktar tayini.

## ABSTRACT

In this study, the measurements had been made to quantify RNA concentration in the samples that had been prepared and send by LGC company (England). The concentration of the RNA in the samples and calibrants was quantified by the Real Time Polymerase Chain Reaction Technique. As a result, this study that was made among National Metrology Institutes and private laboratories showed that all the RNA measurements were made with high reproducibility and accuracy.

**Key Words:** RNA, RT-PCR, Quantification.

## 1. GİRİŞ

Biyolojik araştırmalarda gen anlatım analizlerinin önemi günden güne artmaktadır. Gen anlatım mekanizmalarının anlaşılması sayesinde hastalıklarla ilgili genlerin tanımlanması mümkün olacaktır [1].

Gen anlatımı profil analizleri tipik olarak iki ya da daha fazla örnek içerisindeki ya da durumdaki haberci RNA'ların (mRNA) bağlı miktarlarının ölçülmesini içermektedir. Bu profil analizleri hastalıkların aşamalarının belirlenmesi ya da hücrelerin özel bir tedaviye nasıl yanıt verdiklerinin gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle RNA transkriptleri hastalıkların tanısı ve seyri için önemli biyobelirteçler olarak görülmektedirler. Ancak RNA ölçümleri için evrensel standartların olmayışı ve

kullanılan tekniklerin karşılaştırılmalarının zorlu oluşu nedeniyle RNA ölçüm yöntemleri uğraştırıcı ve karmaşıktır [2].

## 2. RNA TRANSKRİPTLERİNİN BAĞIL MİKTAR TAYİNİ

Bu çalışmada farklı oranlarda sentetik RNA transkriptleri (ERCC, External RNA Control Consortium) biyolojik örnekler üzerine eklenerek ölçümü yapılacak Örnek1 ve Örnek 2 oluşturulmuş ve kullanılan sentetik RNA'lara ait konsantrasyonları bilinen kalibrantlar ile birlikte katılımcı laboratuvarlara gönderilmiştir. Katılımcı laboratuvarlardan, uygun yöntemler kullanarak Örnek1 ve Örnek 2'nin içerdiği sentetik RNA'ların ölçümlerinin gerçekleştirilmesi ve bağıl oranlarının belirsizlikleri ile birlikte saptanması istenmiştir.

Çalışmada ölçümü yapılacak sentetik transkriptlere (ERCC Transkript) ait primer ve problemlerin dizileri Tablo 1'de, ERCC kalibrantların konsantrasyon bilgileri Tablo 2'de ve kullanılan ısıl döngü protokolü ise Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 1.** ERCC transkriptlerin primer ve probe dizileri

ERCC #	Forward Primer	Reverse Primer	Hydrolysis probe	Amplicon size (bp)
13	CGGACATGGTGT TGGTCAAG	TTGTTGGGCGGACC GTAA	TGCATGAGGACCCGCAAAT TCCTC	66
25	CGGTCGTGAACT GCTATAGGA	GGTAGTTTCGCTGGT TCGTT	AGCCTGATACGAGCGCAC AACA	67
42	AGAGAGCTTTTG GCAATCCT	TCATTTGCTAAGGCA GTTAAAGA	TCACCAGTTCCCATGAATG TTCCAC	73
99	TCGTCCATCCCTC AAGAGAGA	CGCAATCGCGTGTG AATG	CATGGAAAGAGCTCGACAA AATTTACTC	71
113	GCGACACCAACA TCGTTACG	CCGCGCGTGAGCAC TT	ACACACCGGACGCTTGA TCAGTG	65
171	TTAGTTTTCGTGCC GGGATTT	CACGAATCGCACGG ATGTT	AGGAAAAGTGGACTGTTC TTTAACC	67

**Tablo 2.** Kalibrantın içerdiği ERCC transkriptleri ve kopya sayıları

ERCC #	Transkriptin adı	Kopya/ul
1	ERCC13	948.000
2	ERCC25	1.000.000
3	ERCC42	1.000.000
4	ERCC99	986.000
5	ERCC113	938.000
6	ERCC171	939.000

**Tablo 3.** PCR Isıl döngü protokolü

Step	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
rt(reverse Transcription)	45C	10 min	1
rt inactivation / Taq activation	95C	10 min	1
PCR	95C	15 s	40
	60C	45 s	

### 3.1. DeneY Parametrelerinin Belirlenmesi

#### 3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkime cihazı

### 3.2. RNA Ölçümleri

Yapılan deneYlerde deneYin ölçüm büyüklüğü hedef genlerin kopya sayılarının oranı olarak hesaplanmıştır. Örnek 1 ve Örnek 2'nin içerdiği sentetik RNA'ların bağıl miktar tayinlerini yapabilmek için kopya sayıları bilinen kalibrantlar kullanılmıştır. Çalışma yapılacak cihaz için optimize edilmiş bir kit ile tek seferde hem RNA'dan cDNA sentezi hem de cDNA'ların çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir.

GZ-PZT cihazına ait yazılım, çalışma tamamlandığında örnekler ve kalibrantlar için bir Cq (eşik döngü sayısı) değeri belirlenmiştir. Kalibrantlar için girilen konsantrasyon değerinin logaritması ve cihazın verdiği Cq değerleri kullanılarak Excel üzerinde DOT fonksiyonu yardımıyla kalibrasyon eğrisi çizilip, eğrinin formülü belirlenmiştir. Bu formüllerden yararlanarak örneklerin içerdiği sentetik RNA kopya sayıları hesaplanmıştır. Örnek 1 ve Örnek 2'nin içerdiği sentetik RNA miktarları oranlanarak istenen bağıl miktar tayini yapılmıştır. Bunlara ek olarak sentetik transkriptlerin miktarı  $E^{-\Delta Cq(U1-U2)}$  formülü [3,4] ile de hesaplanmıştır.

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği gösterebilmek için deneYler üç ayrı günde, her bir sentetik transkript için üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

### SONUÇ

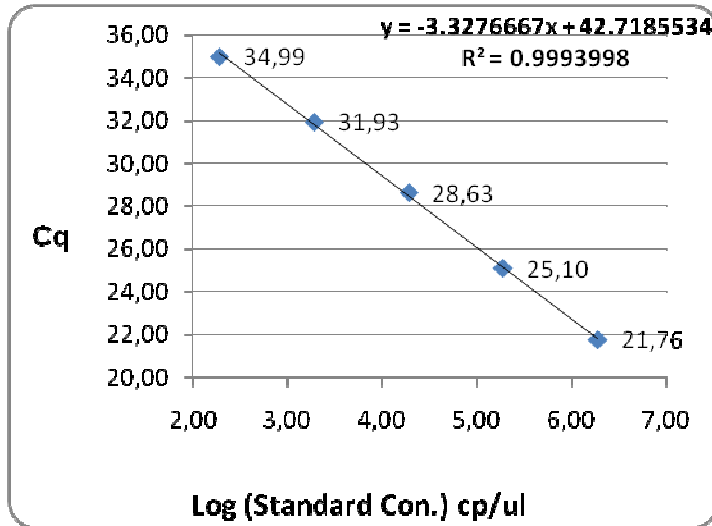
Örnek 1 ve Örnek 2'nin içerdiği sentetik RNA transkriptlerinin bağıl miktar tayini için yapılan çalışmaya ait örnek ölçüm sonuçları Tablo 4 ve 5'te, tüm katılımcılara ait ölçümü yapılan tüm sentetik RNA oranları Tablo 6'da; ERCC13 standardına ait örnek kalibrasyon eğrisi ise Şekil 1'de verilmiştir.

**Tablo 4.** ERCC transkriptlerine ait gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Örnek	Cq					Kopya sayısı(ul)					Slope ve intercept değerleri Excel üzerinde grafiklerden hesaplatılmıştır		
	Gün içi tekrar			Ortalama	Standart Sapma	Gün içi tekrar			Ortalama	Standart Sapma	slope (m)	intercept	R <sup>2</sup>
	1	2	3			1	2	3					
ERCC-13													
Örnek 1 /1.Gün	25.69	25.83	25.8	25.77	0.07	130998	118903	121397	123766	6386	-3.328	42.719	0.999
Örnek 1 /2.Gün	25.65	25.71	25.72	25.69	0.04	114456	109791	109032	111093	2937	-3.32	42.443	
Örnek 1 /3.Gün	25.65	25.71	25.75	25.7	0.05	132640	127366	123967	127991	4370	-3.405	43.093	
Örnek 2 /1.Gün	25.2	25.22	25.21	25.21	0.01	183872	181345	182604	182607	1264	-3.328	42.719	
Örnek 2 /2.Gün	25.2	25.18	25.18	25.19	0.01	156385	158570	158570	157841	1261	-3.32	42.443	
Örnek 2 /3.Gün	25.2	25.16	25.19	25.18	0.02	179818	184748	181038	181868	2568	-3.405	43.093	

**Tablo 5.** ERCC transkriptlerine ait belirsizlik hesaplamaları

ERCC13	Ortalama	Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik	Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik	Tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik	Birleştirilmiş belirsizlik	U1/U2	Genişletilmiş belirsizlik, k=2	% Belirsizlik
U1	120950	0.0306	0.0395	0.0399				
U2	174106	0.0315	0.0104	0.0466				
U1/U2	0.69							

**Şekil 1.** 1.Örnek, 1.gün, ERCC 13' e ait örnek standart eğri

**Tablo 6.** Sentetik RNA'lara ait Ö1/Ö2 kopya sayı oranları (Tüm katılımcılara ait sonuçlar)

ERCC-	00013		00025		00042		00099		00113		00171	
Laboratory	Ratio	MU <sup>2</sup>	Ratio	MU	Ratio	MU	Ratio	MU	Ratio	MU	Ratio	MU
1	0.78	0.21	1.01	0.17	0.16	0.09	0.96	0.02	3.27	0.03	6.06	0.04
2	0.72	0.16	0.98	0.09	0.17	0.02	0.99	0.25	3.01	0.58	5.23	1.01
3	0.69	0.22	1.01	0.28	0.14	0.04	0.88	0.33	2.88	0.95	5.11	1.73
4	0.75	0.07	0.95	0.13	0.13	0.03	0.90	0.06	2.78	0.48	6.15	1.02
5	0.66	0.03	0.98	0.03	0.13	0.01	0.93	0.07	2.91	0.09	4.84	0.39
6	0.69	0.12	0.91	0.16	0.13	0.02	0.92	0.13	3.13	0.34	5.19	0.66
7	0.67	0.21	0.93	0.14	0.10	0.02	0.89	0.17	2.74	0.34	5.15	1.14
8 <sup>3</sup>	0.677	0.028	0.953	0.046	0.124	0.014	0.943	0.049	2.94	0.19	4.61	0.22
9	0.77	0.08	1.05	0.13	0.14	0.01	0.93	0.14	3.21	0.39	5.62	0.73
10	0.71	0.11	1.03	0.16	0.25	0.10	1.14	0.20	1.91	0.80	3.41	1.40
11	0.84	+0.09 -0.08	1.15	+0.20 -0.17	0.67	+0.43 -0.28	1.06	+0.10 -0.09	3.05	+0.67 -0.53	9.07	+1.71 -1.36
12	0.68	0.06	0.96	0.07	0.13	0.01	0.96	0.10	2.99	0.29	5.86	0.54
13	0.66	0.15	0.94	0.08	0.09	0.03	0.98	0.04	2.83	0.53	5.28	0.37
14	0.79	0.15	ND <sup>3</sup>	ND <sup>4</sup>	0.11	0.03	0.96	0.36	2.40	0.76	5.64	1.41
Assigned <sup>5</sup>	0.67	0.14	1.00	0.20	0.143	0.029	1.00	0.20	3.00	0.60	5.0	1.0

## KAYNAKLAR

- [1] VANDESOMPELE J., PRETER K., PATTYN F., POPPE B., ROY N.V., PAEPE A., Accurate Normalization of Real Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes, *Genome Biology*, 3(7), 2002
- [2] BAKER SC, BAUER SR, BEYER RP, BRENTON JD, BROMLEY B, BURRILL J, CAUSTON H, CONLEY MP, ELESURU R, FERRO M, FOY C, FUSCOE J, GAO X, GERHOLD DL, GILLES P, GOODSÄID F, GUO X, HACKETT J, HOCKETT RD, İKONOMİ P, İRİZARRY RA, KAWASAKİ ES, KAYSSER-KRANİCH T, KERR K, KİSER G, KOCH WH, LEE KY, LIU C, LIU ZL, LUCAS A, MANOHAR CF, MIYADA G, MODRUSAN Z, PARKES H, PURİ RK, REİD L, RYDER TB, SALİT M, SAMAHA RR, SCHERF U, SENDERA TJ, SETTERQUİST RA, SHİ L, SHİPPY R, SORİANO JV, WAGAR EA, WARRİNGTON JA, WILLİAMS M, WİLMER F, WİLSON M, WOLBER PK, WU X, ZADRO R; External RNA Controls Consortium, *National Methods*, 2(10):731-4. 2005
- [3] BUSTIN S.A., BENES V., Garson J.A., HELLEMANS J., HUGGET J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITTEWER C.T., The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622, 2009.
- [4] PFAFFL M.W, "Real Time PCR", Taylor and Francis Group, 2007

## ÖZGEÇMİŞ

### Sema AKYÜREK

Lisans eğitimini İstanbul Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde 2002 yılında tamamladı. Mezuniyetini takiben 2002 yılında, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başlayan Akyürek, Prof. Dr. Mine Anğ Küçüker yönetimindeki "Salmonella Typhimurium ve Salmonella Enteritidis suşlarının bazı biyolojik özellikleri üzerine bir çalışma" başlıklı yüksek lisans tezini 2005 yılında tamamladı. Daha sonra sırası ile 2005-2007 yılları arasında TİBO'da (Tanısal İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu) proje sorumlusu, 2007-2010 yılları arasında Bio-Rad'da uygulama uzmanı ve teknik satış elemanı olarak görev yapan Akyürek, 2010 yılından beri TÜBİTAK, UME, Kimyasal Metroloji Laboratuvarları'nda çalışmaktadır. Mikrobiyoloji alanında yayımlanmış

uluslararası bir adet poster, Metrolojik alanda yayımlanmış uluslararası bir adet makalesi bulunmaktadır.

### **Müslüm AKGÖZ**

Lisans eğitimini Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde 1993 yılında ve Yüksek Lisans eğitimini Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde Nükleer Analitik alanında 1996 yılında "Çernobil Nükleer Reaktör kazasından sonra oluşan radyoaktif kirliliğin belirlenmesi" konusunda tamamladı. Mezuniyetini takiben kazandığı MEB doktora bursu ile 1996 yılında, ABD-Massachusetts-Worcester Polytechnic Institute'de Dr. Kriss WOBBE yönetiminde "Turp kıvrıkcık virüsü hareketlilik proteininin (p8) biyokimyasal karakterizasyonu" başlıklı doktora tezini Biyokimya alanında tamamladı. Daha sonra, ABD-Saint Louis-Washington Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2001-2004 yılları arasında doktora sonrası araştırma yaptı. 2004-2007 yılları arasında Kars Kafkas Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde öğretim üyesi olarak görev aldı. AKGÖZ, 2008 yılından beri TÜBİTAK-UME, Kimya Grubu Laboratuvarları Biyoanaliz Çalışma Grubu'nda çalışmaktadır. Moleküler Biyoloji ve Biyokimya alanlarında yayımlanmış 10 adet uluslararası makalesi ve bir adet patenti bulunmaktadır.