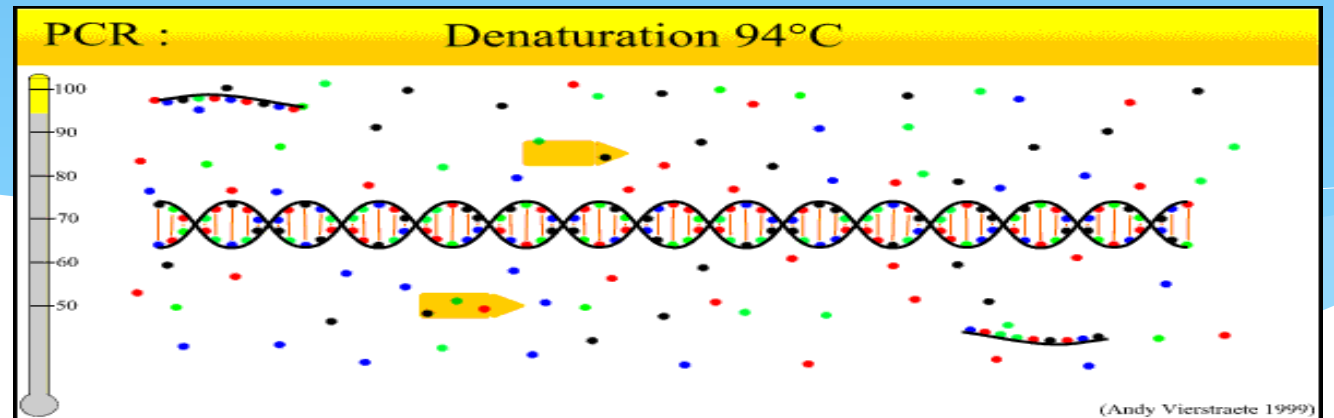




PCR ve PCR TIPLERİ

DOÇ.DR. DEMET CANSARAN DUMAN

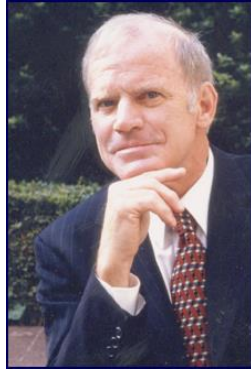


PCR

Hedef nükleik asit dizisinin, başlatıcı özelliği olan iki oligonükleotit primer kullanılarak enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanır.

- İlk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından bulunmuştur.

*1993 yılında da Kary Mullis NOBEL ödölünü kazanmıştır.



PCR 3 temel işlem basamağında gerçekleşir;

- **Denatürasyon:** İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.
- **Bağlanma (Annealing):** Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir.

- **Uzama (Extension-Elongation):** Uzama aşamasında ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.
- Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre değişir. 70-74 °C'de, 2 dakika

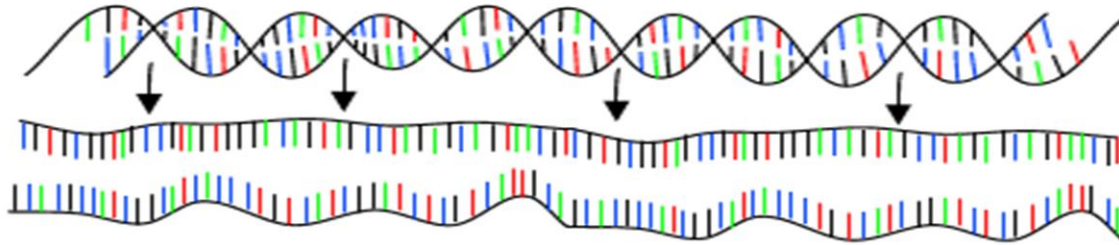


PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

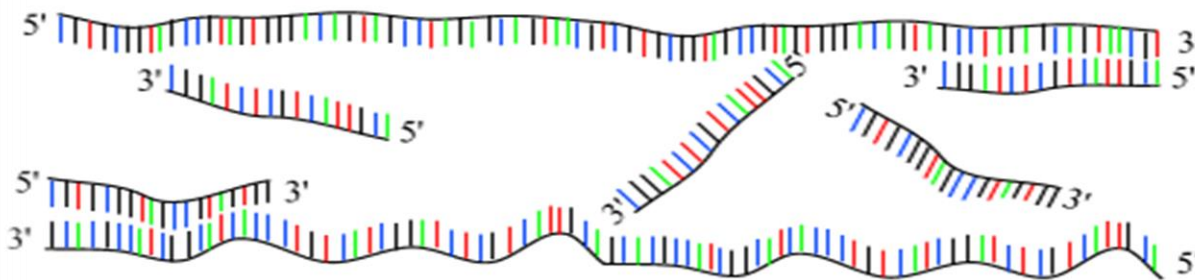
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

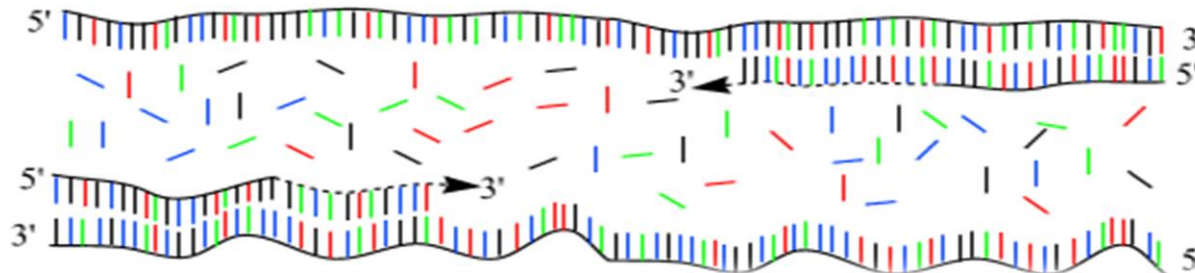
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



PCR 1. BASAMAK

Cycle 1

Step 1. Denature the template DNA

Raise temperature to 92–94°C

```
5' -CTAGAATATGAAACCTATAGGTACGGTGGCCATTCTATGTCTGATCCCGGTACTACCTACAGAA-3'  
  |||  
3' -GATCTTATACTTTGGATATCCATGCCACCGGTAGATACAGACTAGGGCCATGATGGATGTCTT-5'
```

PCR 2. BASAMAK

Cycle 1

5' -CTAGAATATGAACCTATAGGTACGGTGGCCATTCTATGTCTGATCCCGGTACTACCTACAGAA-3'

3' -GATCTTATACTTTGGATATCCATGCCACCGGTAGGATACAGACTAGGGCCATGATGGATGTCTT-5'

PCR 3. BASAMAK

Cycle 1

5'-CTAGAATATGAACCTATAGGTACGGTGGCCATTCTATGTCTGATCCCGGTACTACCTACAGAA-3'
|||||
3'-GGGCCATGATGG-5'

5'-ATGAACCTATAG-3'
|||||
3'-GATCTTATACTTTGGATATCCATGCCACCGGTAAGATACAGACTAGGGCCATGATGGATGTCTT-5'

Çoğalacak Bölge



5' ACTGCGCTAGGATCAGCCTAAAACGATGCTACGTA3'

3' CTACGATG5'

5' GCGCTAG3'

3' TGACGCGATCCTAGTCGGATTTTGCTACGATGCAT5'

5' -GCGCTAG-3' FORWARD PRIMER

5' -GTAGCATC-3' Reverse primer

Çoğalacak bölge



5- ' ACTGCGCTAGGATCAGCCTAAAACGATGCTACGTA -3 '

3' -TGACGCGATCCTAGT CGGATTTTG

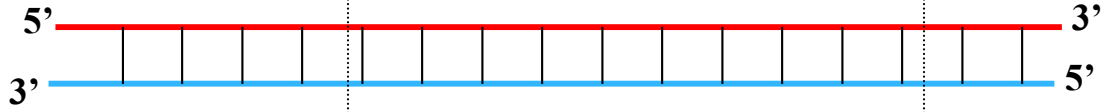
CTACGATG -5 '

GATCAGCCTAAAACGATGCTACGTA-3'

5' GCGCTAG

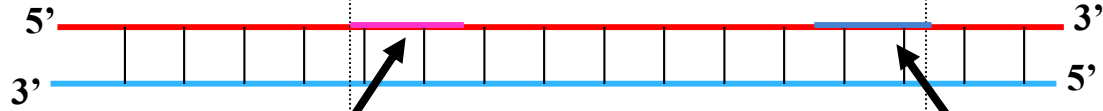
3- ' TGACGCGATCCTAGTCGGATTTTGCTACGATGCAT -5 '

Çift zincirli
Kalıp DNA



Çoğalacak bölge

Bu dizi bilgisine sahip dizayn edilmiş primerler



Bu dizinin
tıpa tıp
aynısı

Bu dizinin
ters eşi

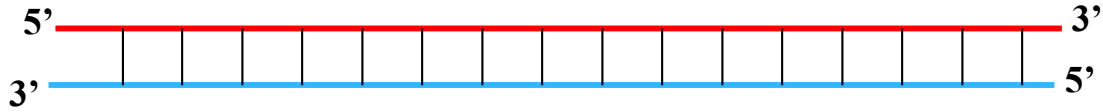
PCR DÖNGÜ 1

Primerler



Taq

Taq



PCR CYCLE 1

Denaturasyon
95°C
İpliklerin ayrılması

Primerler



Taq

Taq

5' ————— 3'

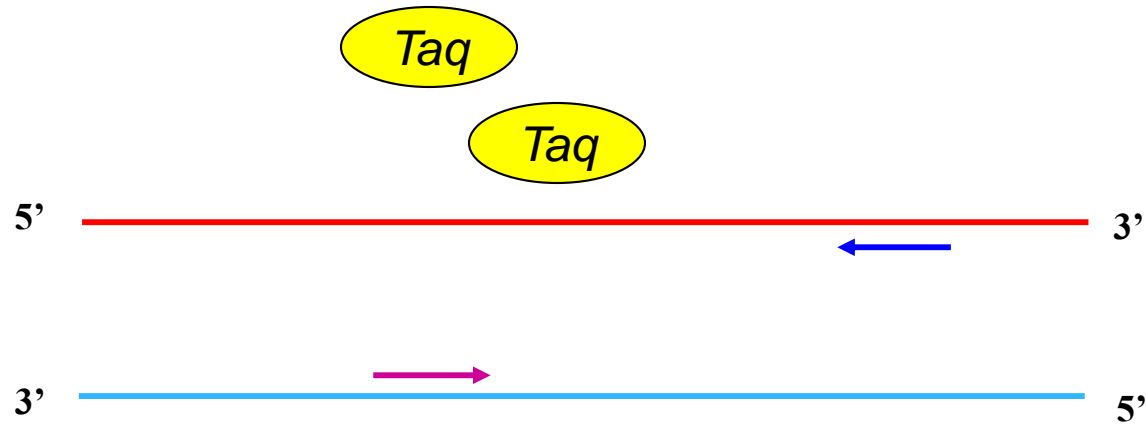
3' ————— 5'

PCR CYCLE 1

Bağlanma

~55°C

Primerlerin bağlanması



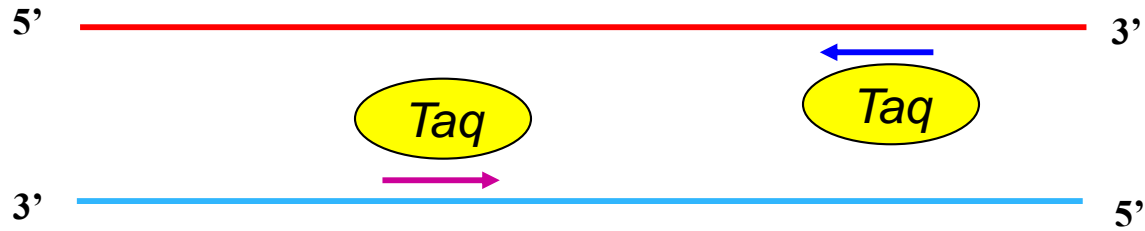
- Forward primer alttaki zincire bağlanıyor
- ← Reverse primer üstteki zincire bağlanıyor

PCR CYCLE 1

Bağlanma

~55°C

Taq iki kez bağlanıyor

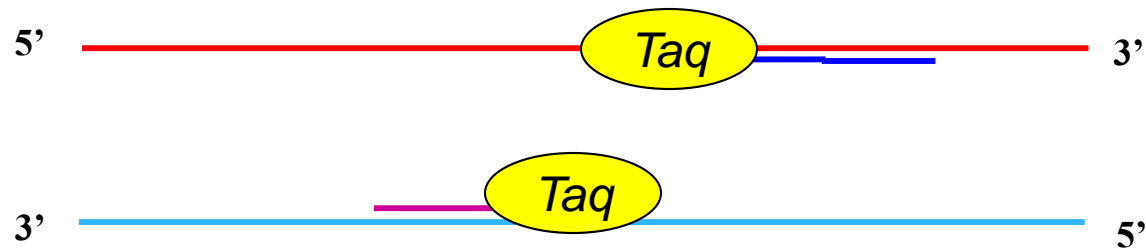


PCR CYCLE 1

Uzaman

72°C

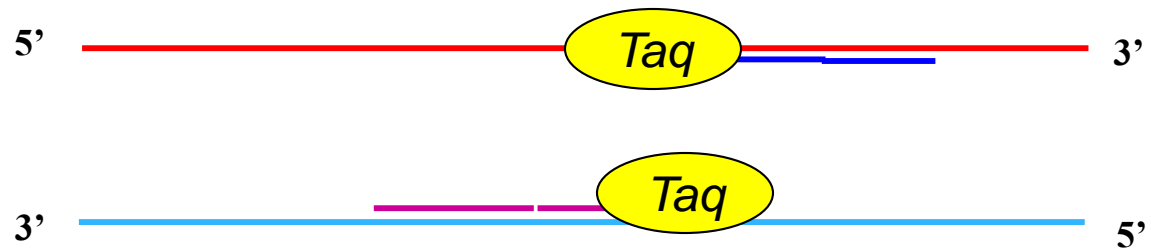
Taq DNA zincirini kopyalıyor
dNTPS



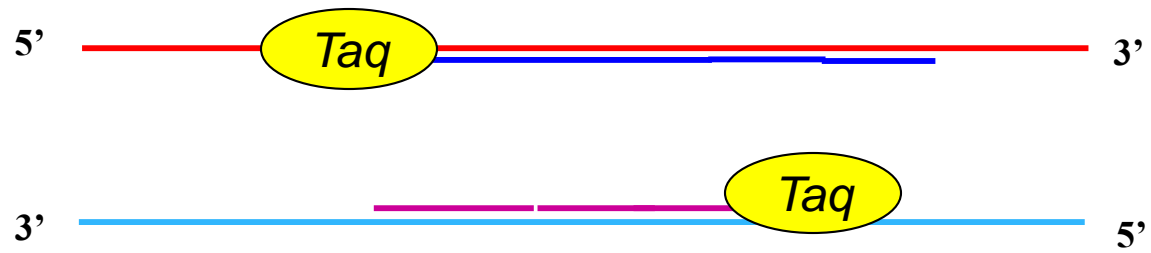
Taq DNA sentezi 5' 3' yönünde ilerler

PCR CYCLE 1

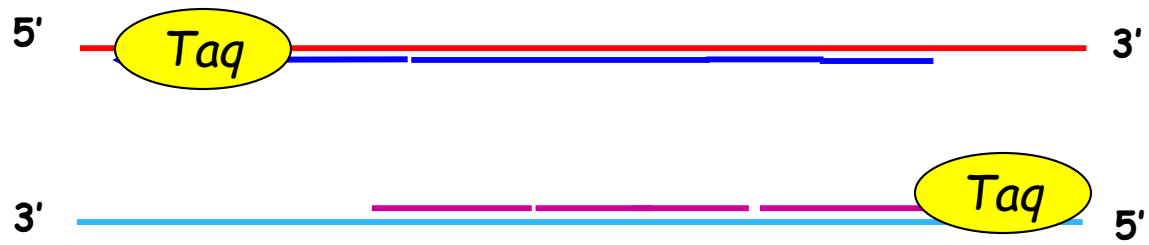
Uzama
72°C



PCR CYCLE 1

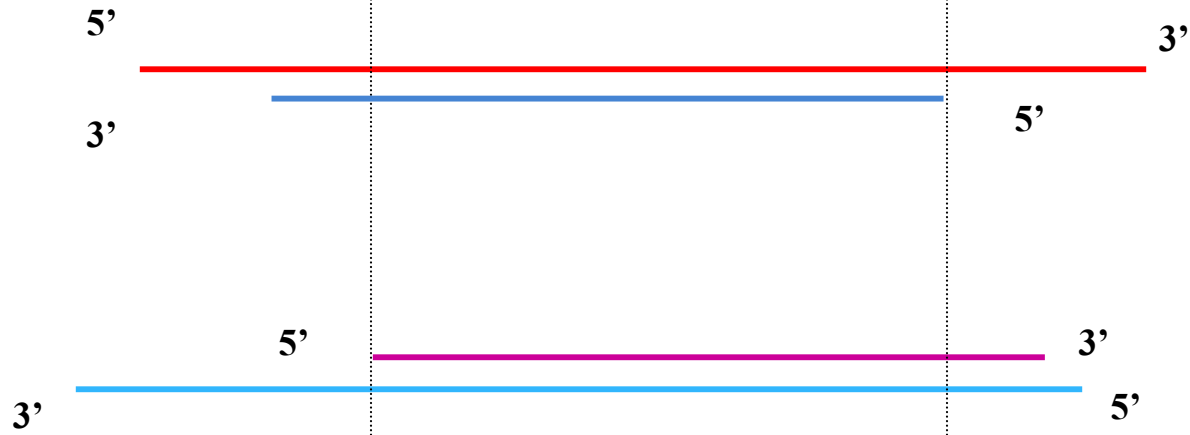


PCR CYCLE 1



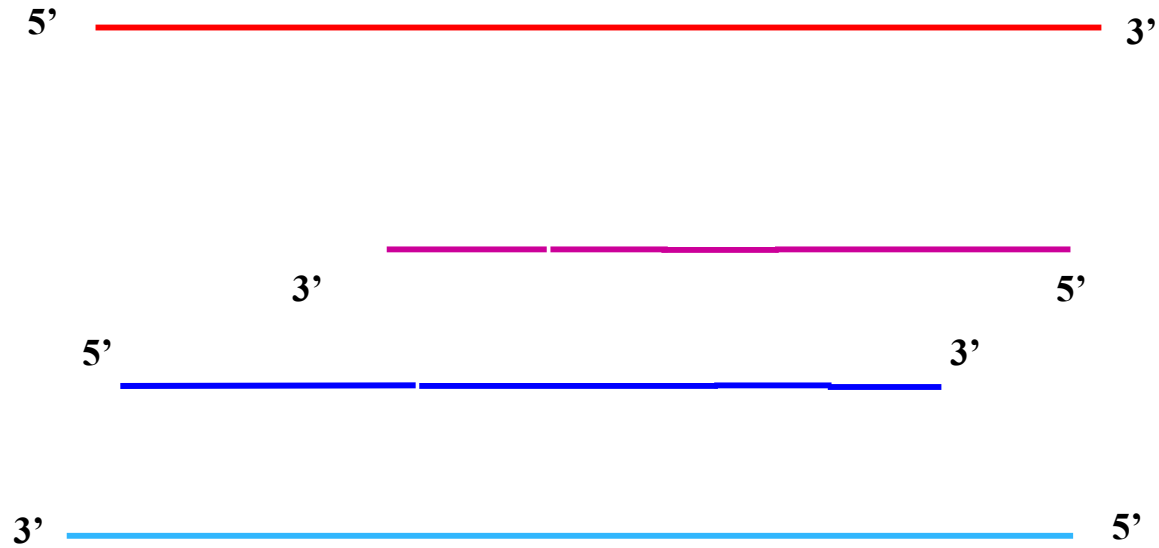
PCR CYCLE 1

1. Döngünün sonu

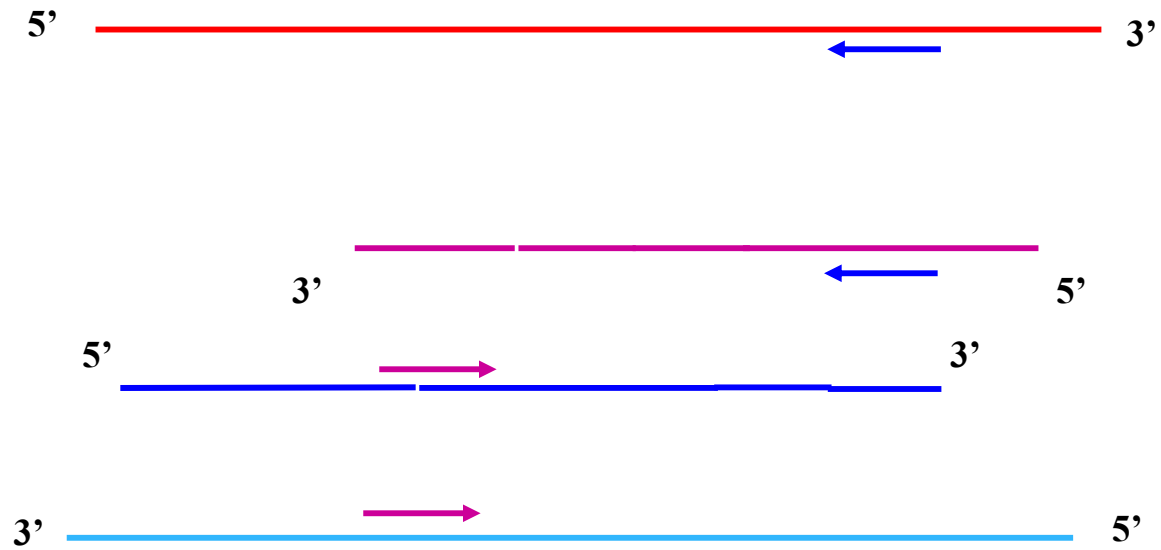


PCR CYCLE 2

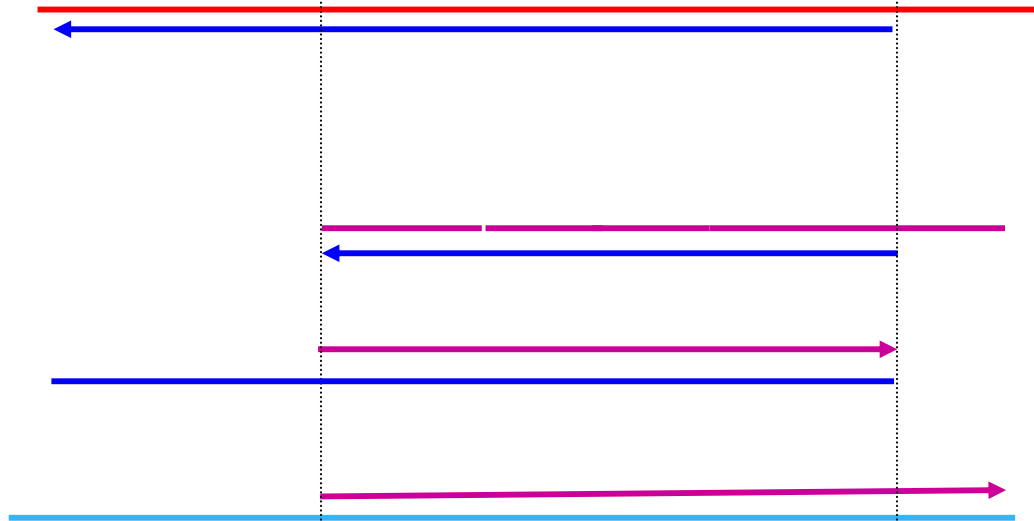
Denaturasyon
95°C
Zincirlerin ayrılması



PCR CYCLE 2

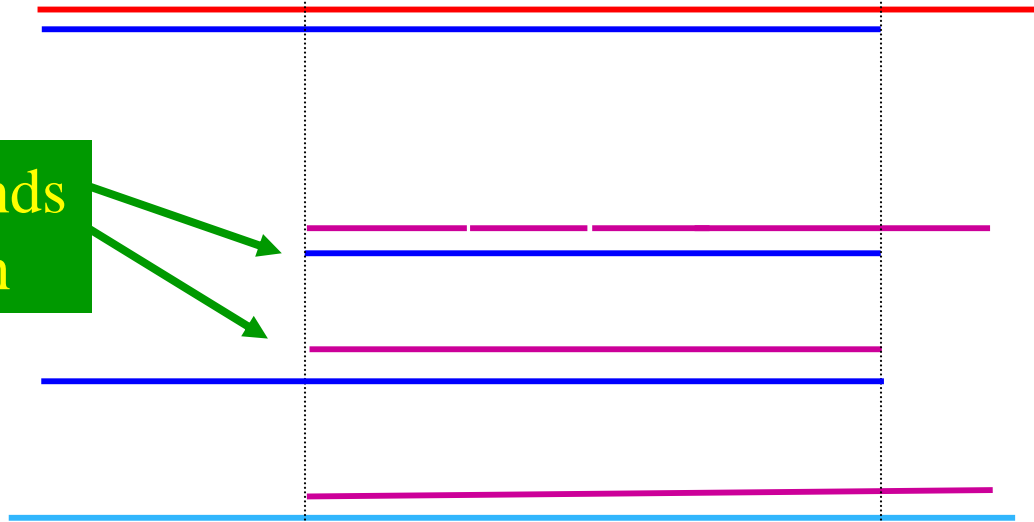


PCR CYCLE 2



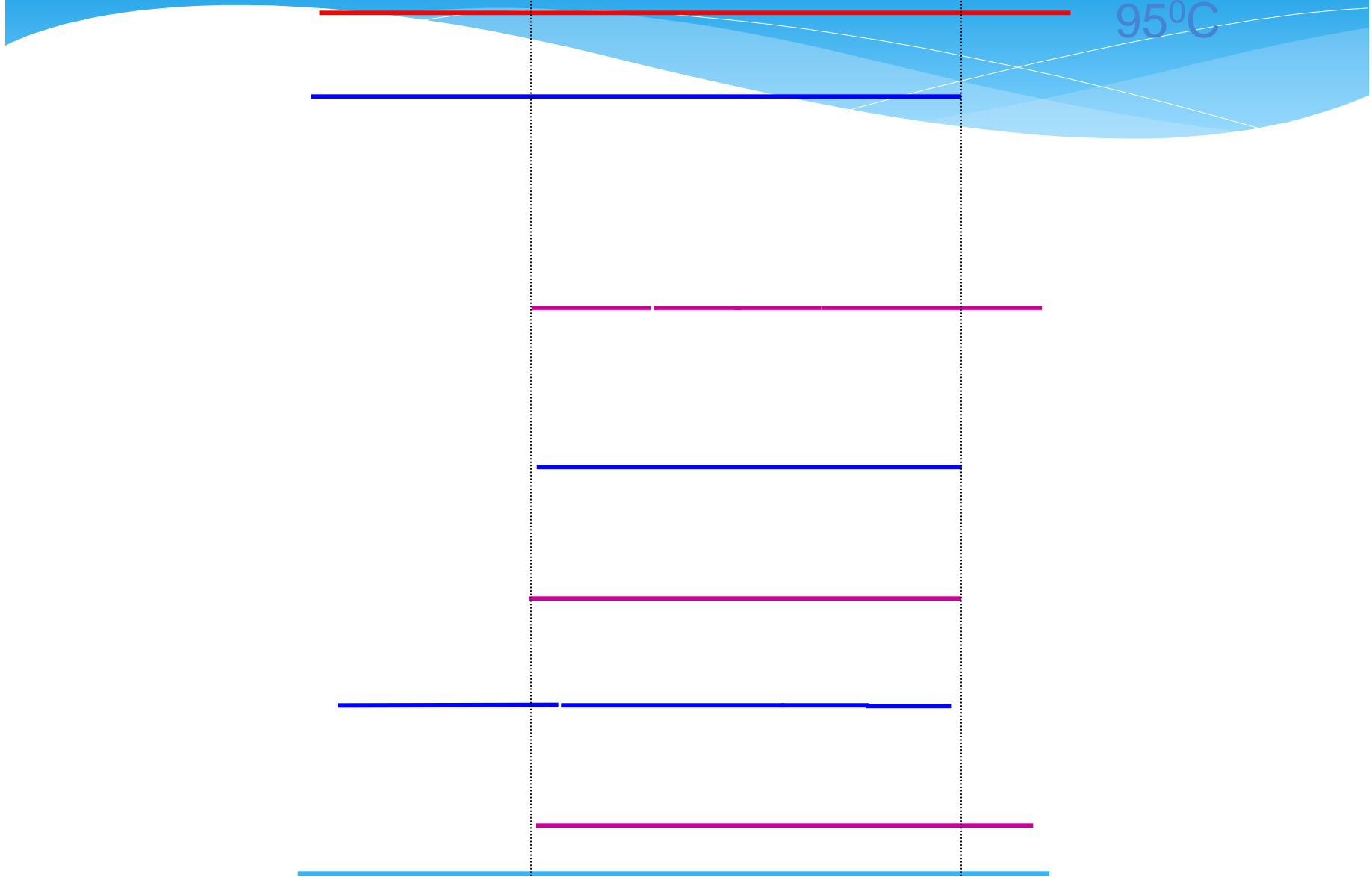
PCR CYCLE 2

Two single strands
of correct length



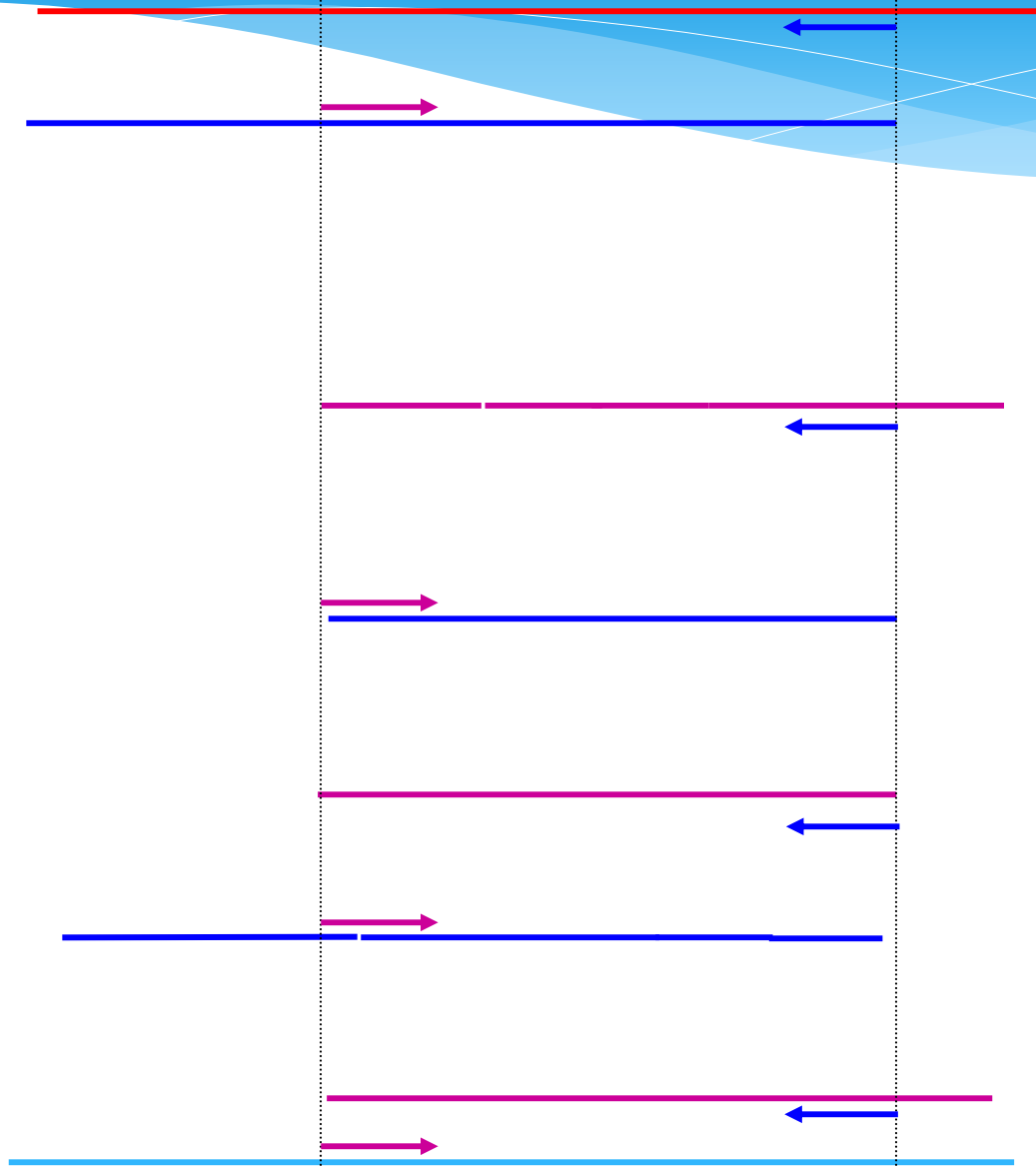
PCR CYCLE 3

Denaturation
95°C



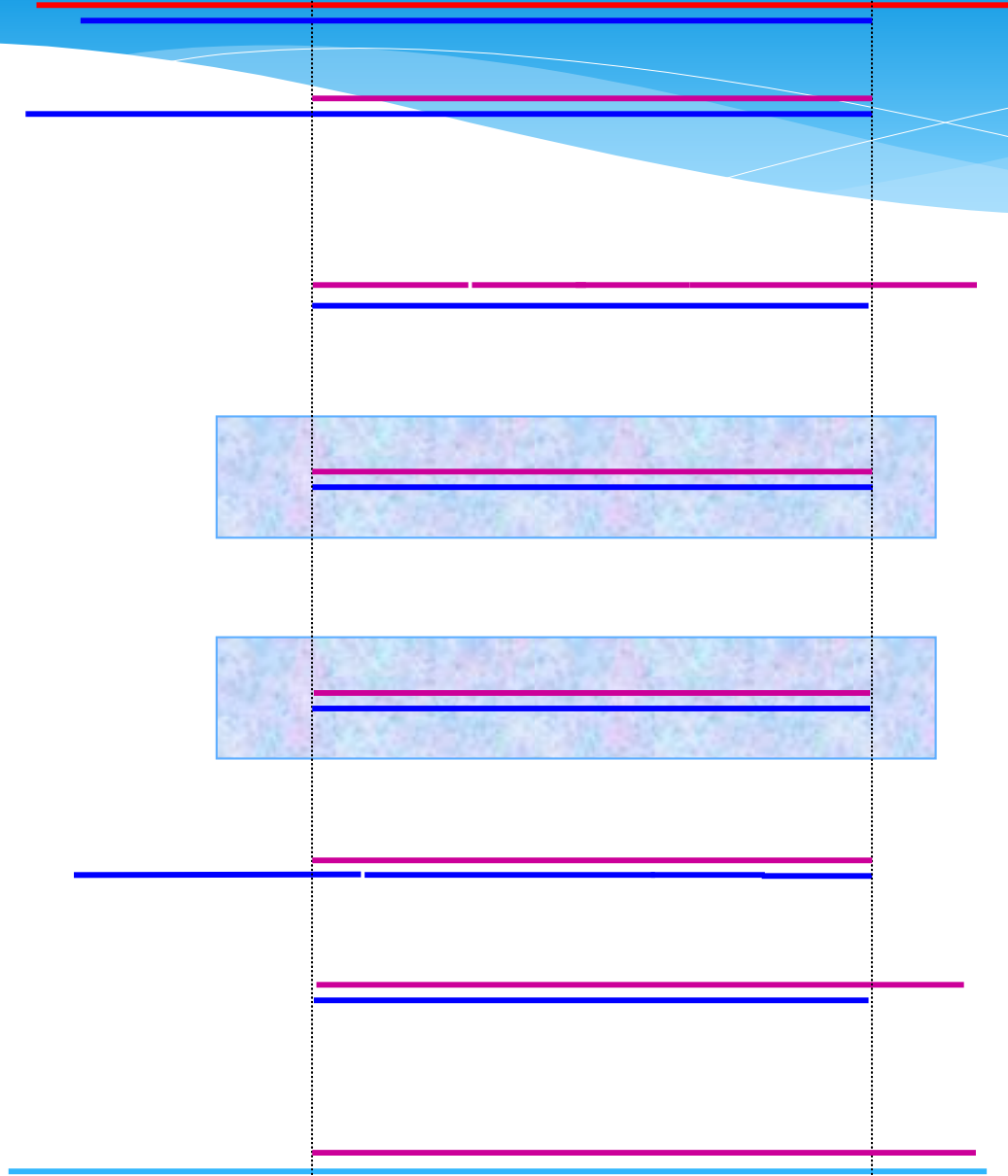
PCR CYCLE 3

Annealing
55°C



PCR CYCLE 3

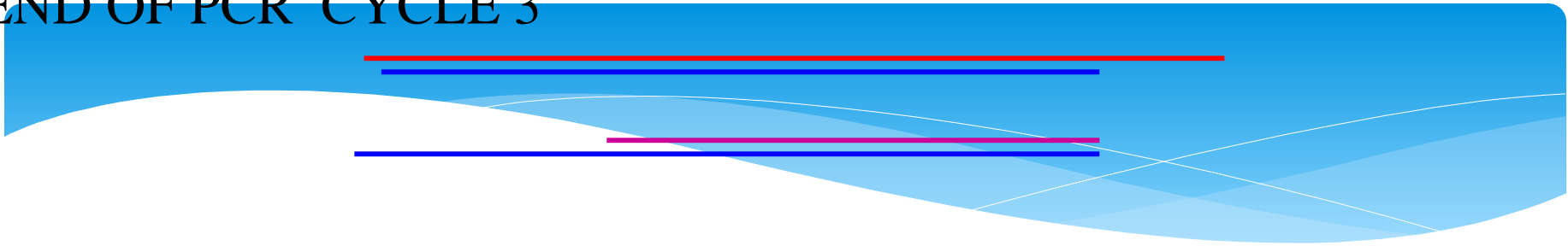
Extension
72°C



Amplimer 1

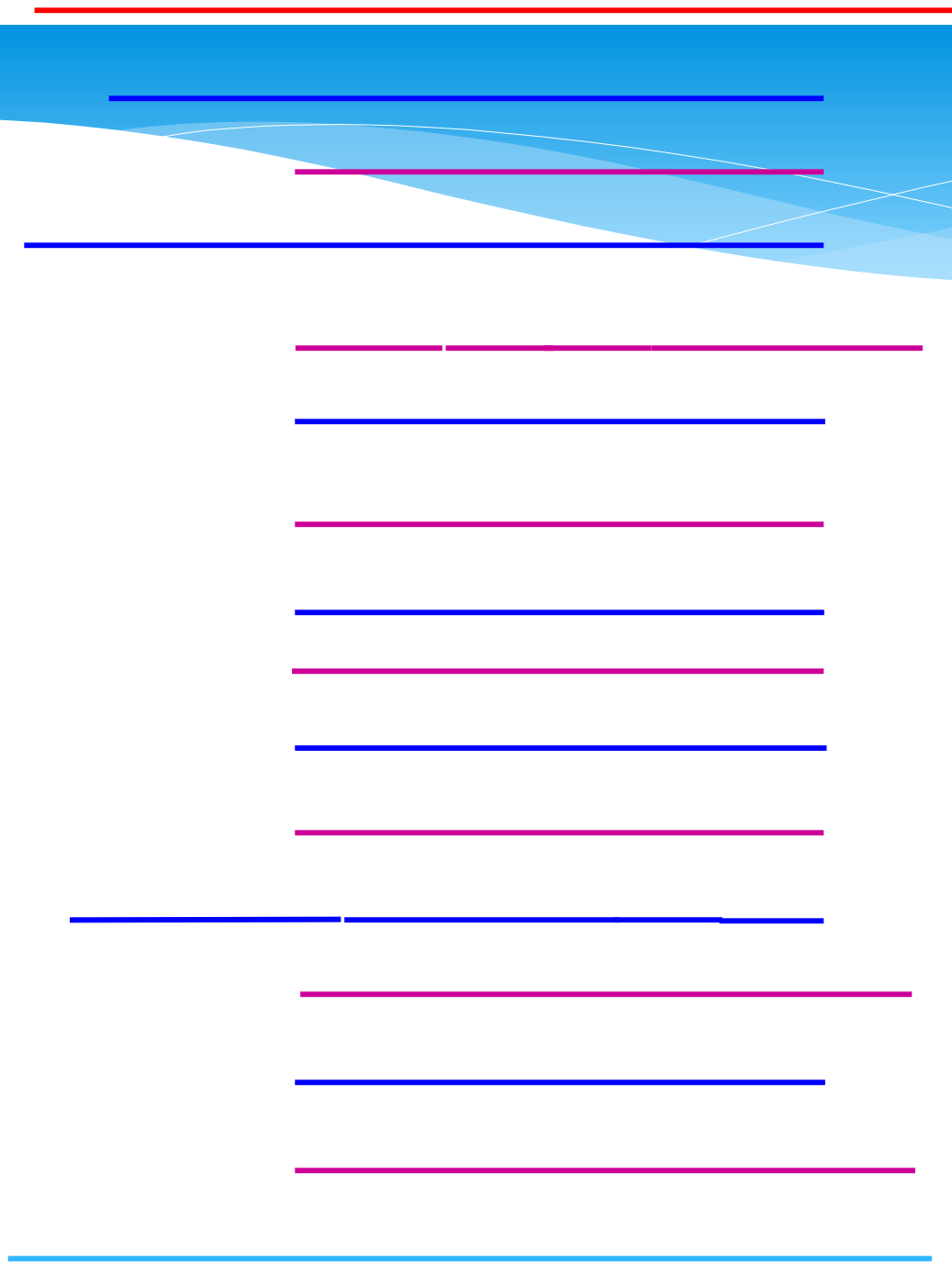
Amplimer 2

END OF PCR CYCLE 3

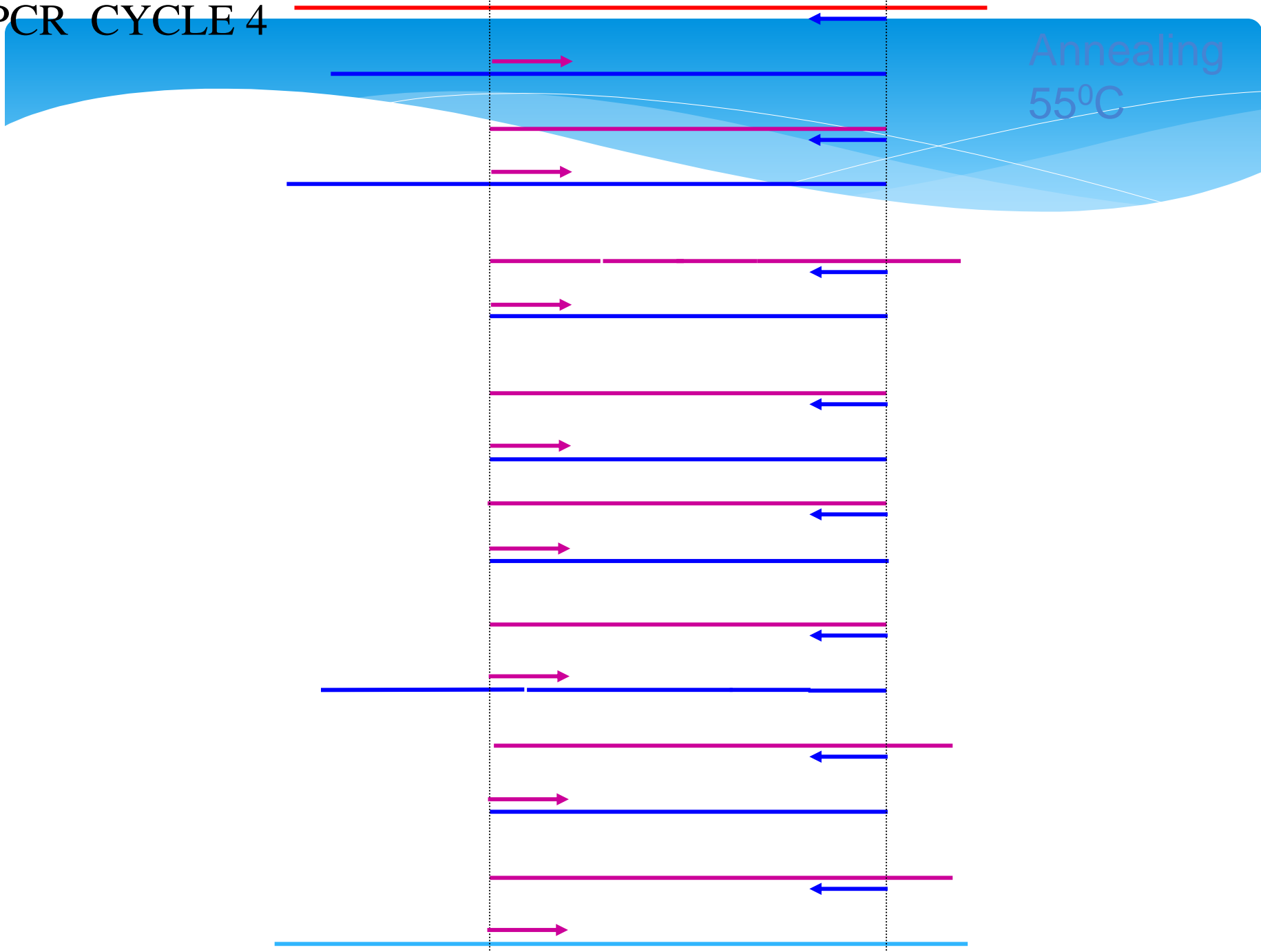


PCR CYCLE 4

Denaturation
95°C



PCR CYCLE 4

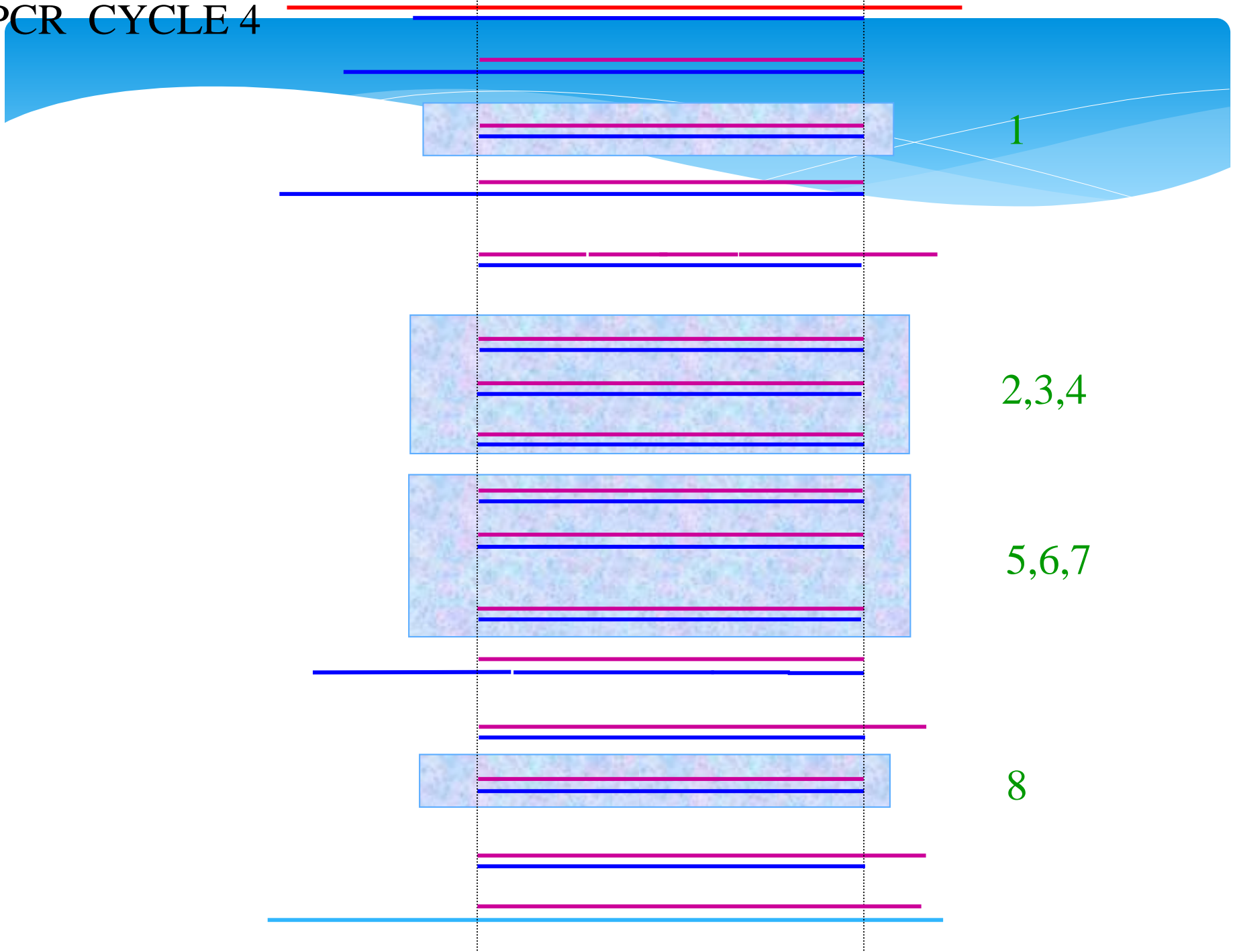


PCR CYCLE 4

Extension
72°C



PCR CYCLE 4



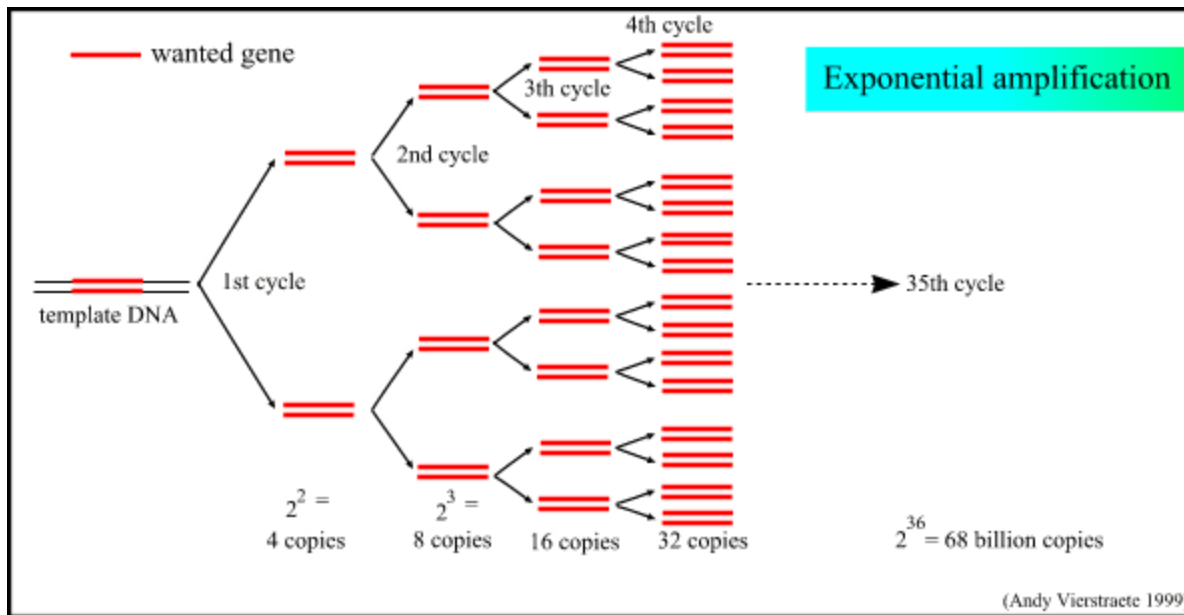
1

2,3,4

5,6,7

8

PCR DÖNGÜLERİ



Verimli bir PCR için ;

- Denatürasyon,
- Primerlerin bağlanması,
- Primerlerin uzaması,
- Döngü sayısı,
- Thermal cyclers'in iniş-çıkış sürelerinin, optimizasyonu ve standardizasyonu yapılmalıdır.

* **PCR Bileşenleri**

- * DNA (ng veya seyreltme)
- * Primer (pmol=mM)
- * dNTP (mM)
- * Enzim=Taqqolimeraz
- * $MgCl_2$ (mM)
- * Tamponlar (10x veya 5X -1x)

Toplam hacim 10-50 ul

Kalıp DNA

Arkeolojik, patolojik, histolojik materyaller, dokulardan izole edilmiş bütünlüğünü korumuş veya degrade olmuş DNA örnekleri ile RNA (cDNA elde edilir) kalıp olarak kullanılabilir.

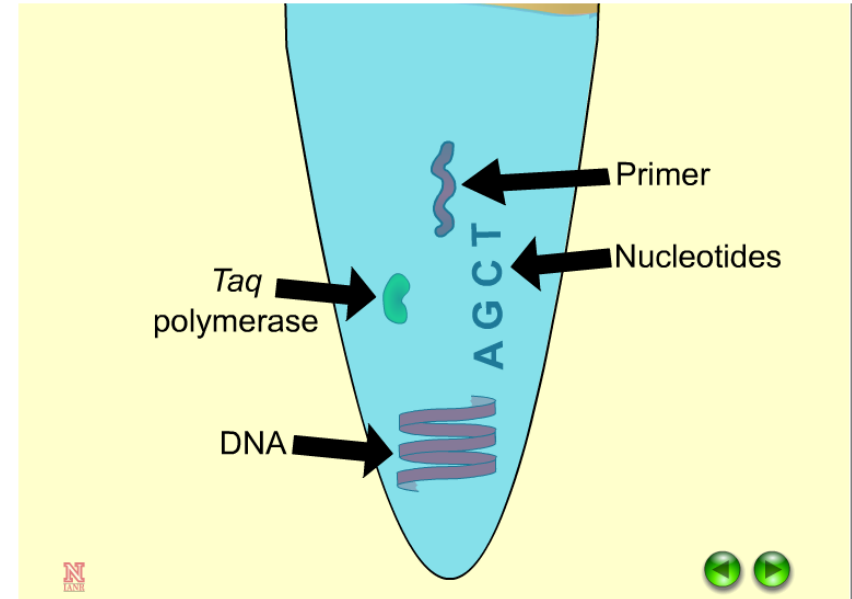


dNTP'ler

- * Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dÖrtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır.
- * *Taq* DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 μ M) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla beraber, normal koşullarda PCR 100 μ M dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir.

Optimal dNTP konsantrasyonu;

- * MgCl₂ konsantrasyonuna,
- * Reaksiyon koşullarına,
- * Primer konsantrasyonuna,
- * Çoğaltılmış ürünlerin (amplikonların) boyuna,
- * PCR döngü sayısına,



Mg+2

- Mg+2 iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturarak, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikçikli DNA'nın Tm değerini arttıırırlar.
- **Düşük** Mg+2 konsantrasyonu ürün oluşumunda **azalmaya** neden olurken yüksek Mg+2 konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürünlerin **birikimine** neden olur.
- MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle beraber genellikle 0.5-5.0 mM'lık değerler arasında çalışır.

Primerler

• **17-30 nükleotid uzunluğunda hedef diziye komplementer spesifik dizilerdir.**

• **İdeal primer yapısında;**

* %50 G+C bulunması

* Polipürin, polipirimidin ve tekrar bölgelerinin olmaması

* Sadece bir bölgeye spesifik olmaları

* Erime ısısı çok düşük olmamalıdır.

T_m (Temperature melting: Erime sıcaklığı) değerini hesaplamada;

$$[(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

- * (20 nükleotid olan primerler için geçerlidir)
- * Çoğu zaman bu formülle hesaplanan T_m değerinin 3-5°C altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve daha sonra optimum sıcaklık değeri denenerek saptanır.

Dejenere Primerler

- * Amino asit sekanslarından primer sekanslarının tahmin edilmesinde,
- * Bilinen bir gen ailesinin yeni üyelerinin araştırılmasında,
- * Türler arasındaki homolog genlerin araştırılmasında, kullanılmaktadır.

Nested Primerler

- * Orijinal olmayan ürünlerin daha ileri düzeyde amplifikasyonunu en düşük seviyeye indirmek için nested primerler kullanılabilir.

Primer Tasarımı

Primer Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Özellikler

Oligonükleotid çiftleri dimer oluşumuna neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalı.

Oligonükleotidlerin uzunluğu 18-24 baz aralığında olmalıdır.

Oligonükleotid çiftlerinin T_m 'leri birbirine denk veya yakın olmalıdır.

Oligonükleotid dizilimleri için üçden fazla tekrar eden baz olmamalıdır.

PRİMER TASARIMINDA KULLANILABİLECEK YAZILIMLAR

- * **Primer Pearl:** İnternette ücretsiz indirilebilir.
- * - **GCG:** Accelrys, ICBR
- * **Primer3:** MIT, web uygulama
- * http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
- * **BioTools:** BioTools, Inc. Lisans ICBR
- * **Diğerleri:** GeneFisher, Primer!, Web Primer, NBI oligo program.

* **TM HESAPLAMALARI İÇİN:**

* - BiOMATH:

[HTTP://WWW.PROMEGA.COM/BIOMATH/CALC11.HTM](http://www.promega.com/biomath/calc11.htm)

* PRIMER PEARL: İNTERNETTEN ÜCRETSİZ İNDİRİLEBİLİR.

* PRIMER DESIGNER

* PRIMER3: MIT, WEB UYGULAMA

* [HTTP://WWW-GENOME.WI.MIT.EDU/CGI-BIN/PRIMER/PRIMER3_WWW.CGI](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

Verimli Bir PCR Reaksiyonu İçin;

Tablo 1: PCR Optimizasyonunda Önemli Değişkenler

Değişkenler	
PCR'da sıcaklık profili	Primerlerin bağlanması Uzama Denatürasyon Bir evreden diğerine geçiş zamanı Döngü sayısı
Magnezyum iyonunun konsantrasyonu	
Primer tasarımı ve konsantrasyonu	
Kalıp DNA kalitesi ve konsantrasyonu	
PCR tamponu	
dNTP konsantrasyonu	
PCR arttırıcı eklenmesi	
PCR inhibitörleri	

PCR optimizasyonu nasıl yapılır?

	Optimizasyon 1	2	3	4	5	6
DNA(ng veya seyreltme)						
Primer 1 (pmol=uM)						
Primer 2 (pmol=uM)						
dNTP(uM)						
Enzim=Taqpolimeraz						
MgCl ₂ (mM)						
Enzim bufferı(10x-1x)						
Toplam hacim 10-50ul						

PCR Tipleri;

- Multipleks PCR
- Hot-Start PCR
- Nested ve Semi-Nested PCR
- RNA'nın Amplifikasyonu (RT-PCR)
- Touchdown PCR
- In-Situ PCR
- Invers (Tersine dönmüş) PCR
- Asimetrik PCR
- qRT PCR

Touchdown PCR

- Optimal primer bağlanma sıcaklığını saptamak amacı ile geliştirilen bu yöntemde, bağlanma sıcaklığı, sikluslar arasında $1-2^{\circ}\text{C}$ düşürülerek uygun derece belirlenmekte ve bu sıcaklıkta amplifikasyon yapılmakta,
 - * İlk siklusta hesaplanan T_m derecesinin 15°C üzeri bağlanma derecesi olarak kullanılmakta,
 - * Takip eden sikluslarda ısı $1-2^{\circ}\text{C}$ düşürülerek T_m derecesini takriben 5°C üzerine kadar gelinmektedir.
 - * Sonuç olarak hedef bölgeye özgü ampliconlar elde edilmektedir.

Moleküler Biyolojide PCR Uygulamaları

- Bakteriyolojide PCR uygulamaları,
- Virolojide PCR uygulamaları,
- Mikolojide PCR uygulamaları,
- Genetik hastalıkların tanısında PCR kullanımı,
- Moleküler parazitolojide PCR uygulamaları.

Mikoloji“de PCR Uygulamaları

Cryptococcus neoformas,
Histoplasma capsulatum,
Blastomyces dermatidis,
Pneumocystis carini,
Candida albicans,
Coccoides immitis

Genetik Hastalıkların Teşhisinde PCR Uygulamaları-Orak hücre anemisinin tanısında

-Hemofilia

-Cystic fibrozis

-Genetik hastalıkları doğum öncesi tespitinde - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PCR uygulamaları birlikte genetik hastalıkları teşhisinde başarılı sonuçlar vermiştir.