

İLERİ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ (ADVANCED RESEARCH TECHNIQUES)

2020-21 BAHAR

DR. GÜNSELİ ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

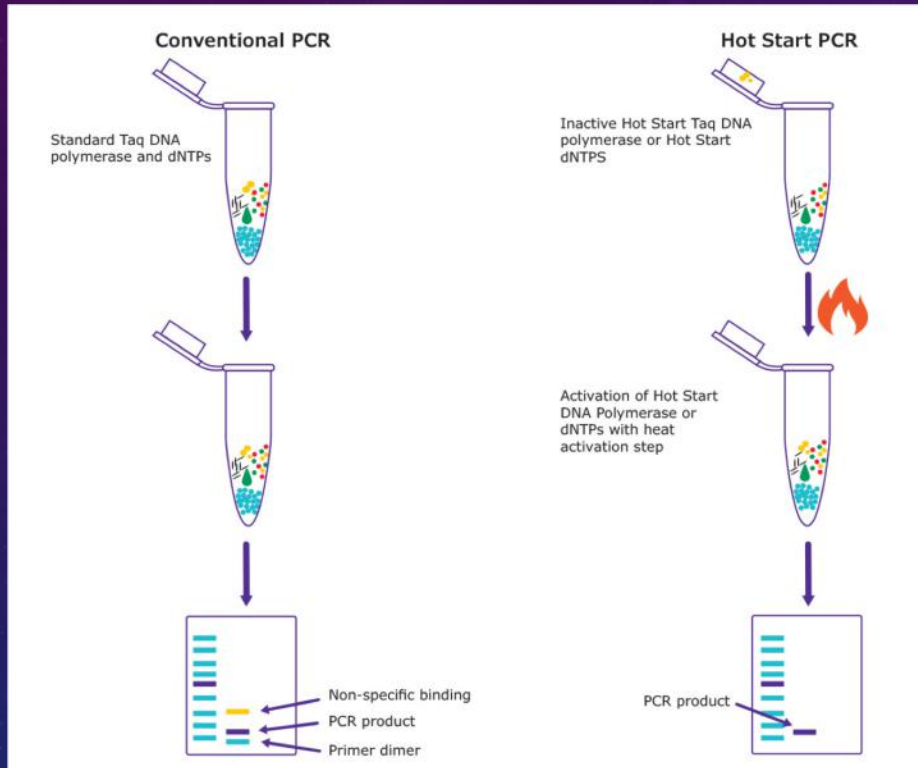
DERS 2

MART 2021

PCR UYGULAMALARI

- Polimorfizmlerin tespiti
- Genetik hastalık tanısı
- GDO tespiti
- Virüs, bakteri, parazit varlığı
- Sekanslamayla mutasyon araştırması, filogenetik
- Gen ekspresyonu
- İlgili ampikonla ileri tekniklerin uygulanması

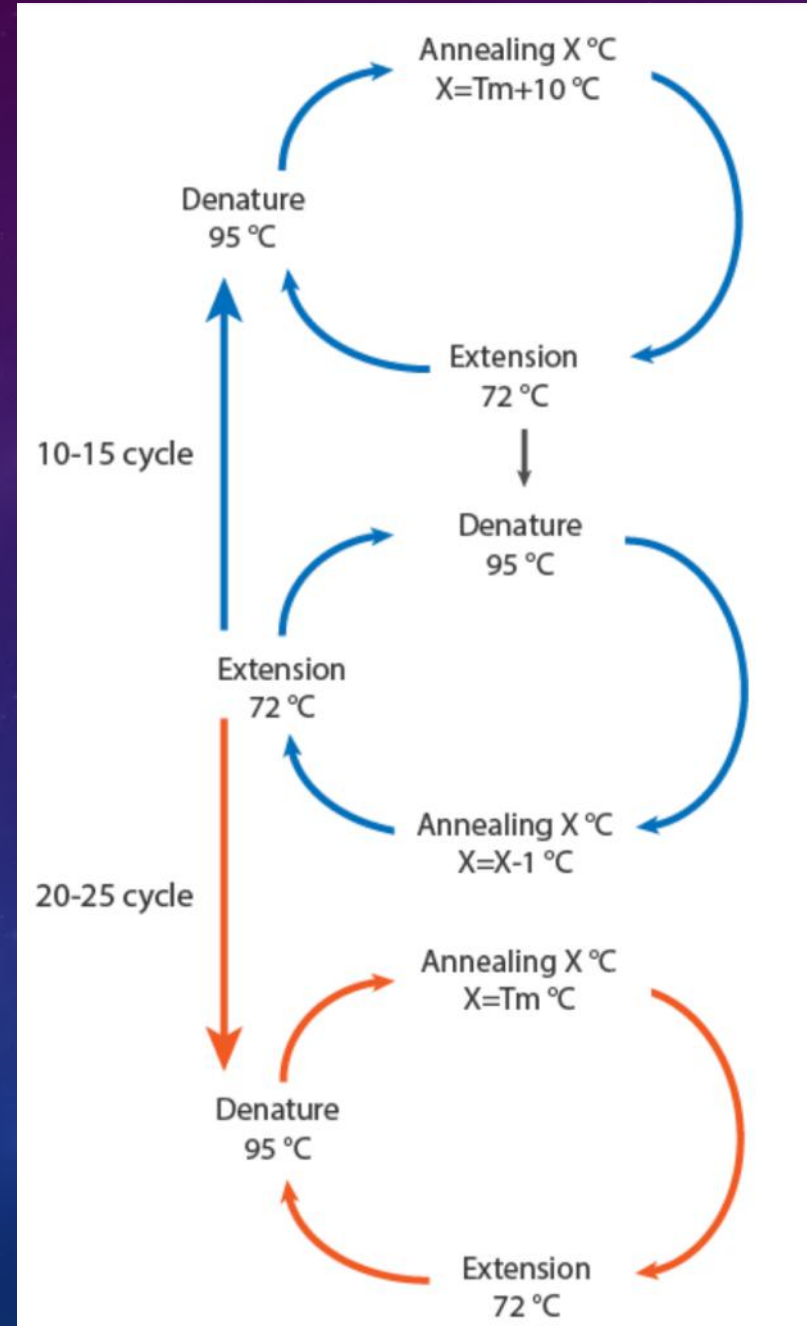
HOT START PCR



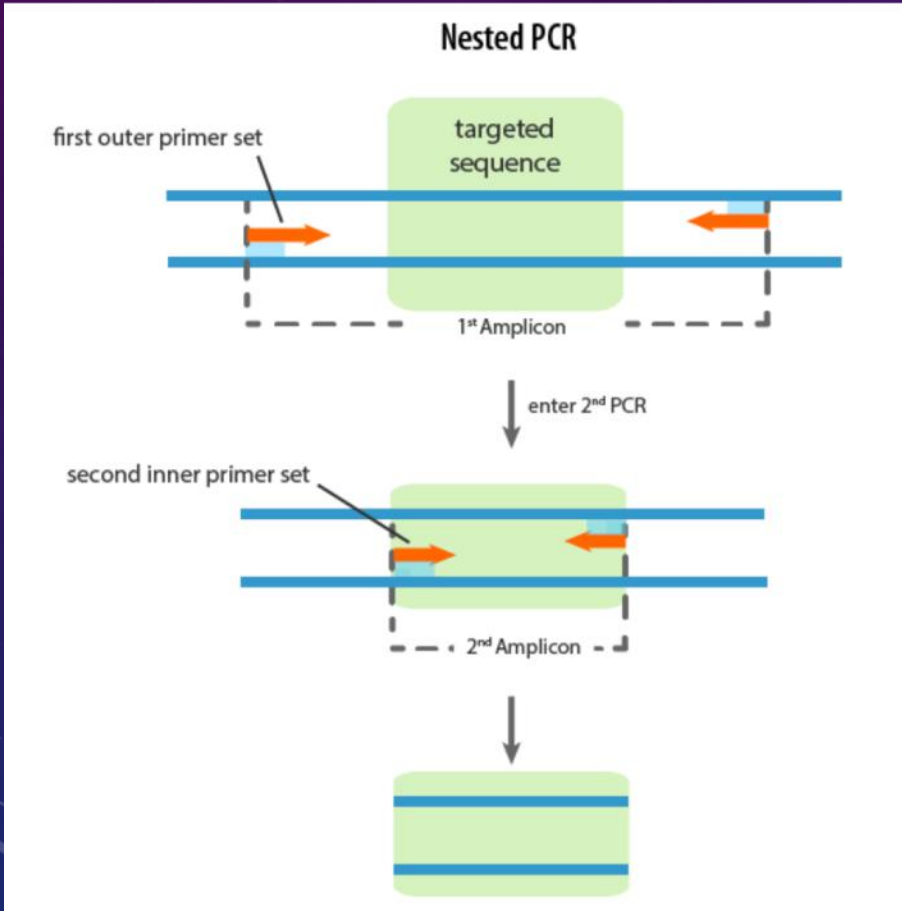
- sensitivite ve spesifiteyi artırmak için
- RT'da reaksiyonu inhibe eden ajanlar kullanılır
- Taq DNA pol ve dNTPler

TOUCHDOWN PCR

- Termal siklus kondisyonları değiştirilerek primer bağlanması etkinleştirilir. Spesifite artar.
- İlk sikluslarda T_a , T_m 'den birkaç derece yüksektir. İleri sikluslarda kademeli olarak düşürülür.



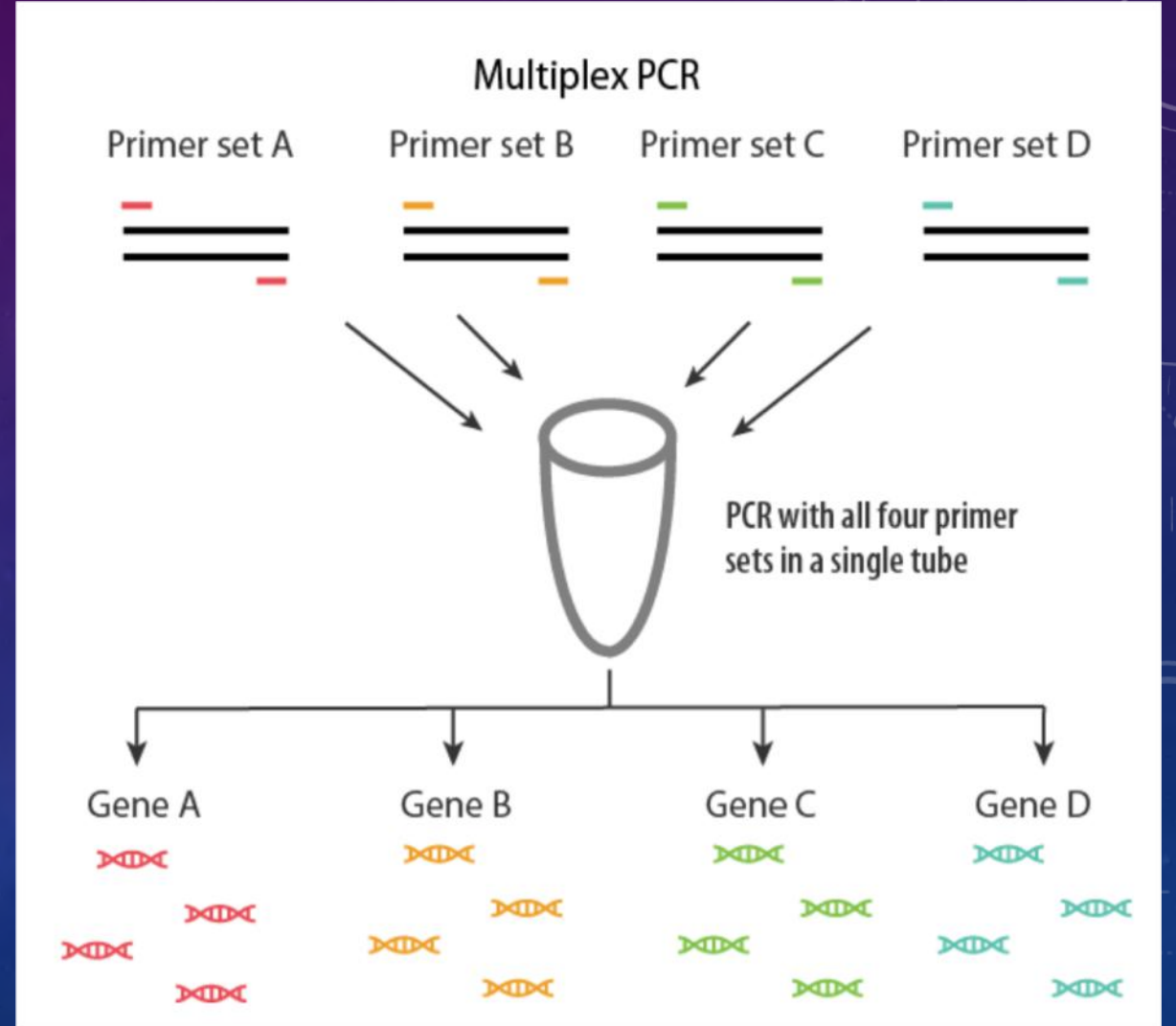
NESTED PCR



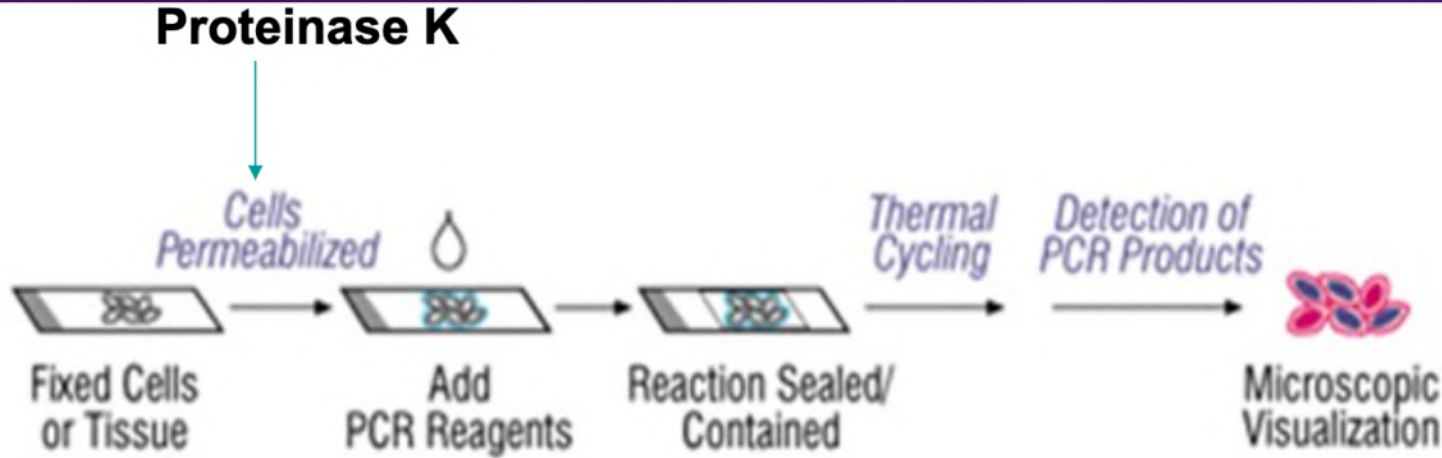
- Hassasiyeti artırmak için 2 çift primerle geliştirilmiş PCR tekniğidir. Hassasiyeti 10^4 kat artırır.
- Hedef DNA bölgesinin 2 aşamada amplifikasyonuna dayanır. 1.de dış primer çifti, 2.de iç primer çifti reaksiyonda yer alır.
- Non-spesifik bağlanları ortamdan uzaklaştırmak için kullanılan popüler yöntemlerden biridir.

MULTIPLEX PCR

- Birden fazla hedefin aynı reaksiyonda amplifikasyonunda
- Primer setlerinin T_m 'leri ile T_a optimizasyonu önemlidir.
- Amplikon büyüklükleri farklı tasarlanır veya floresan boyalı primerler kullanılabilir.

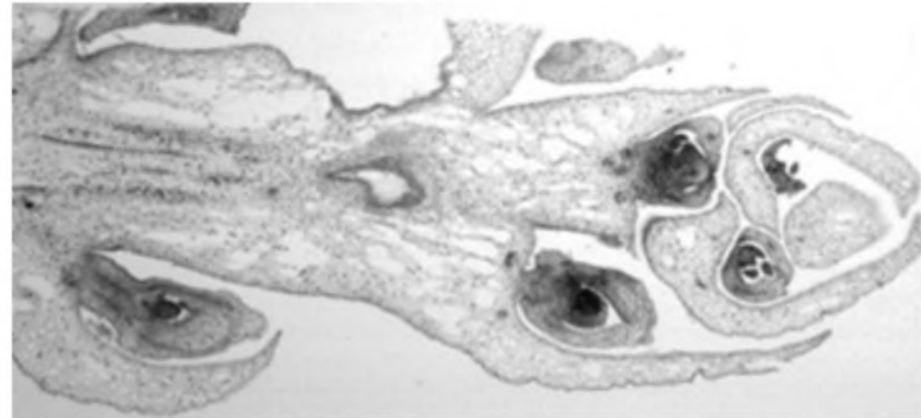


IN SITU PCR



**Formalin
paraformaldehyde**

**Denhardt's
solution**

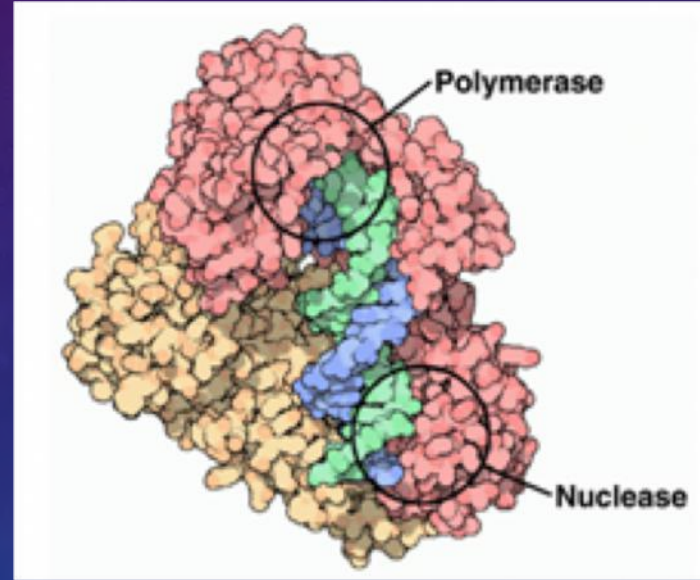


Hedef DNA veya RNA'nın hücre organellerinde doku kesitlerinde lokalizasyonunu sağlayan histolojik bir tekniktir.

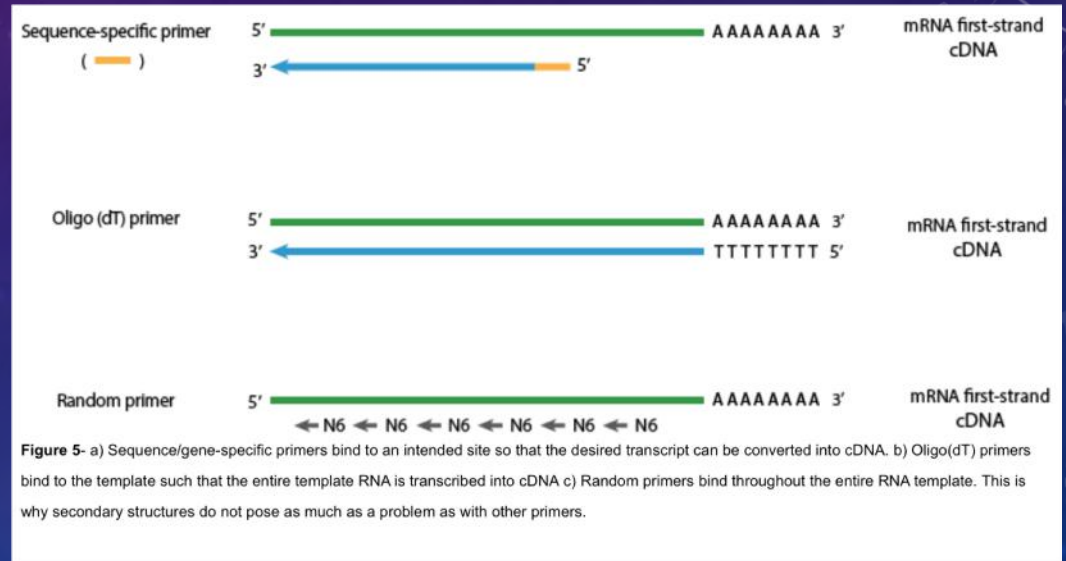
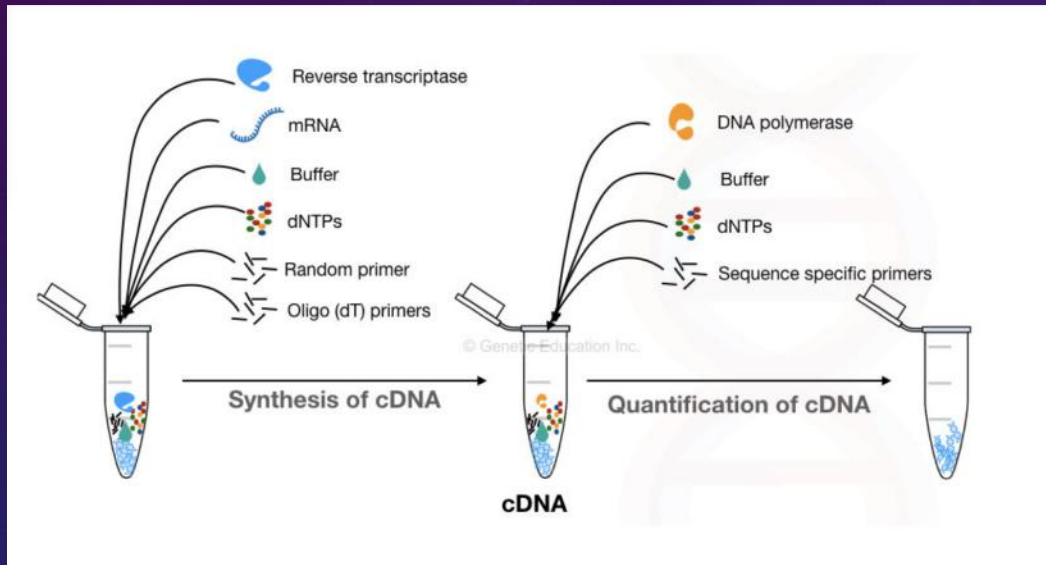
digoksinin etiketli nükleotitler (digoksinin-11-dUTP) kullanılır.

REVERS TRANSKRİPTAZ PCR= RT-PCR

- Retroviruslarda bulunan RTase enzimi RNA'yı kalıp olarak kullanarak cDNA sentezi yapar.
- Revers transkriptazın 3 enzimatik aktivitesi:
 - **RNA-bağımlı DNA polimeraz:** RNA'nın DNA'ya dönüşmesi
 - **DNA-bağımlı DNA polimeraz:** Tek iplikli DNA'nın çift iplikli DNA'ya dönüşmesi
 - **RNaz H:** RNA-DNA hibritinden RNA'nın selektif olarak uzaklaştırılması

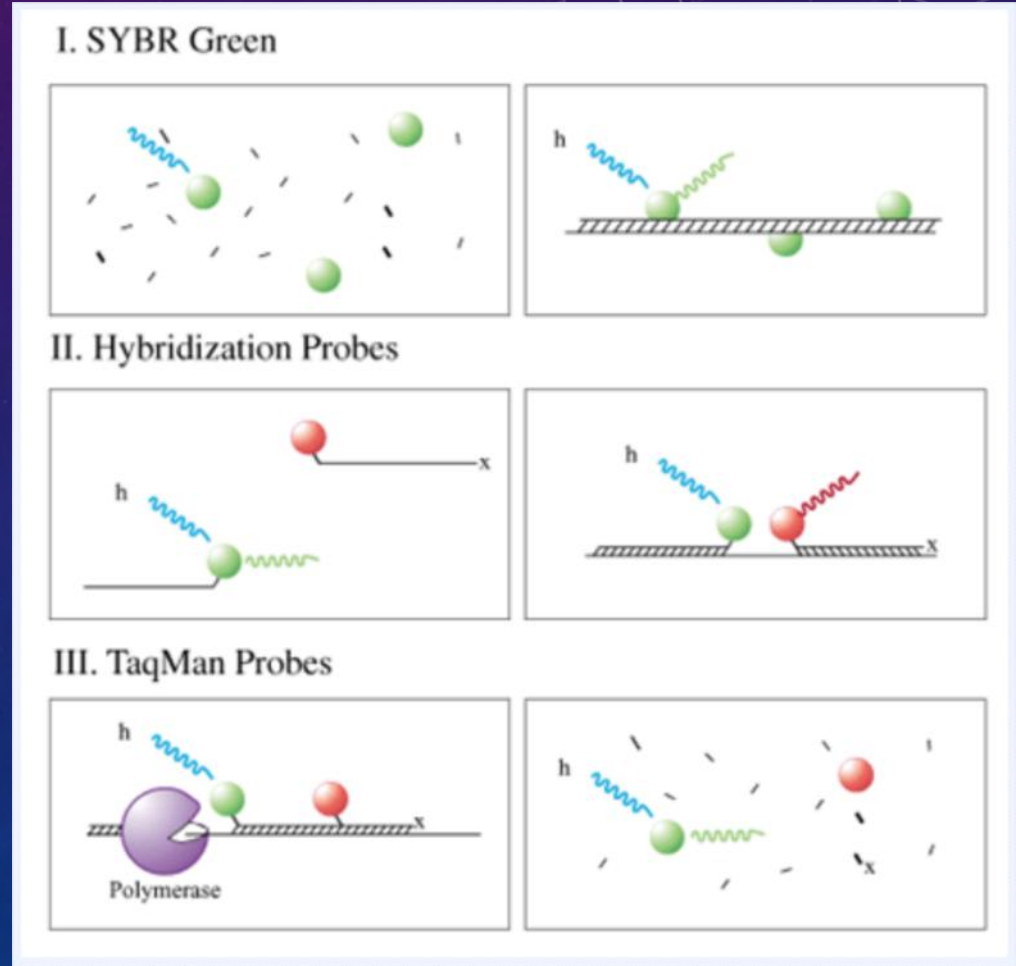


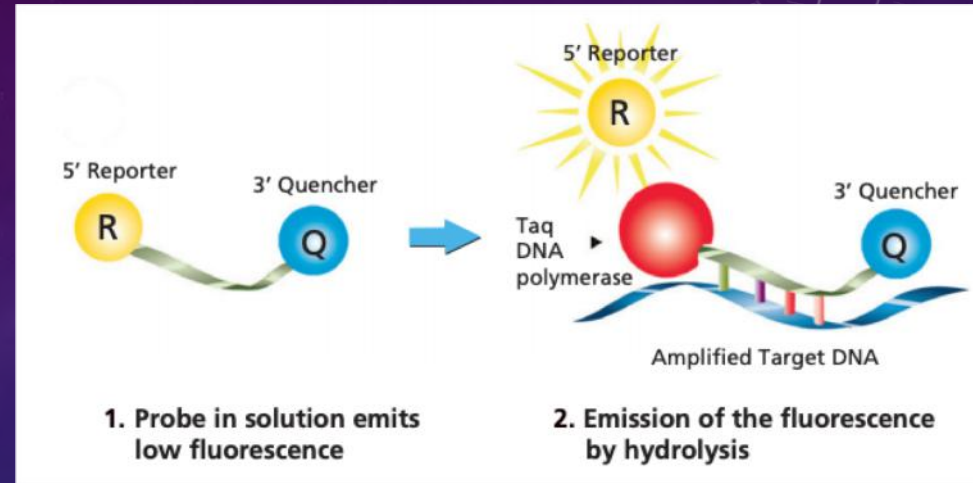
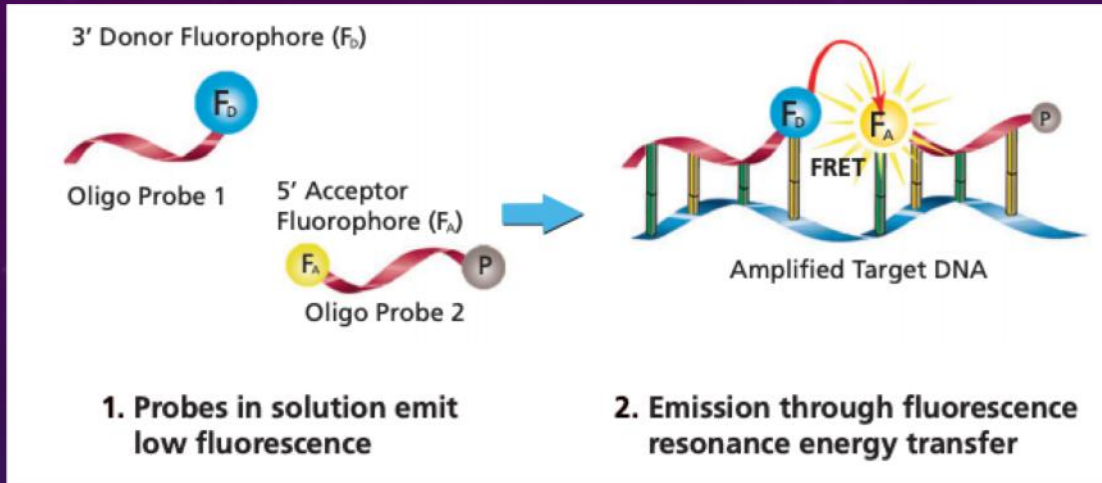
REVERS TRANSKRIPTAZ PCR= RT-PCR



KANTİTATİF REAL-TIME PCR= QPCR

- SYBR Green dsDNA floresan boyası.
- Hibridizasyon problemleri PCR ürünü üzerinde yan yana gelecek şekilde sekans spesifik tasarlanır. 3' uç floresan (Floresans Rezonans Enerji Transfer donörü) ile; 5' ucu LC Red gibi akseptör bir boya ile etiketlenir.
- TaqMan problemleri Taq'ın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle hidrolizinden gelen floresan sinyalle çalışır. Hidrolizle quencher boyadaki floresan ayrılır ve sinyal oluşturur.





Spectral Properties Table

Dye	Max. EX (nm)	Max. EM (nm)	Compatible Quencher
6-FAM™	494	515	BHQ-1, TAMRA
JOE™	520	548	BHQ-1, TAMRA
TET™	521	536	BHQ-1, TAMRA
Cal Fluor® Gold 540 ¹	522	541	BHQ-1
HEX™ ²	535	555	BHQ-1, TAMRA
Cal Fluor Orange 560 ²	540	561	BHQ-1
TAMRA™	555	576	BHQ-2

¹JOE/TET alternative
²VIC alternative

³Cyanine 3 alternative
⁴TAMRA alternative

⁵Cyanine 5 alternative

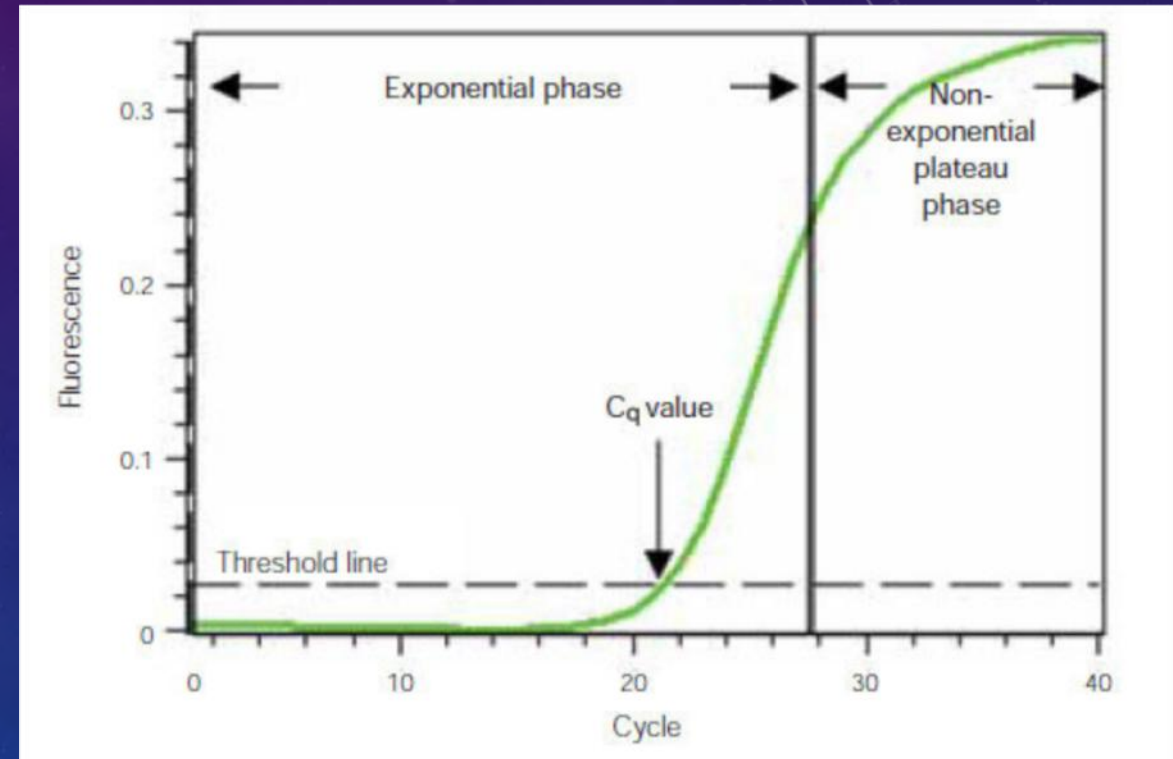
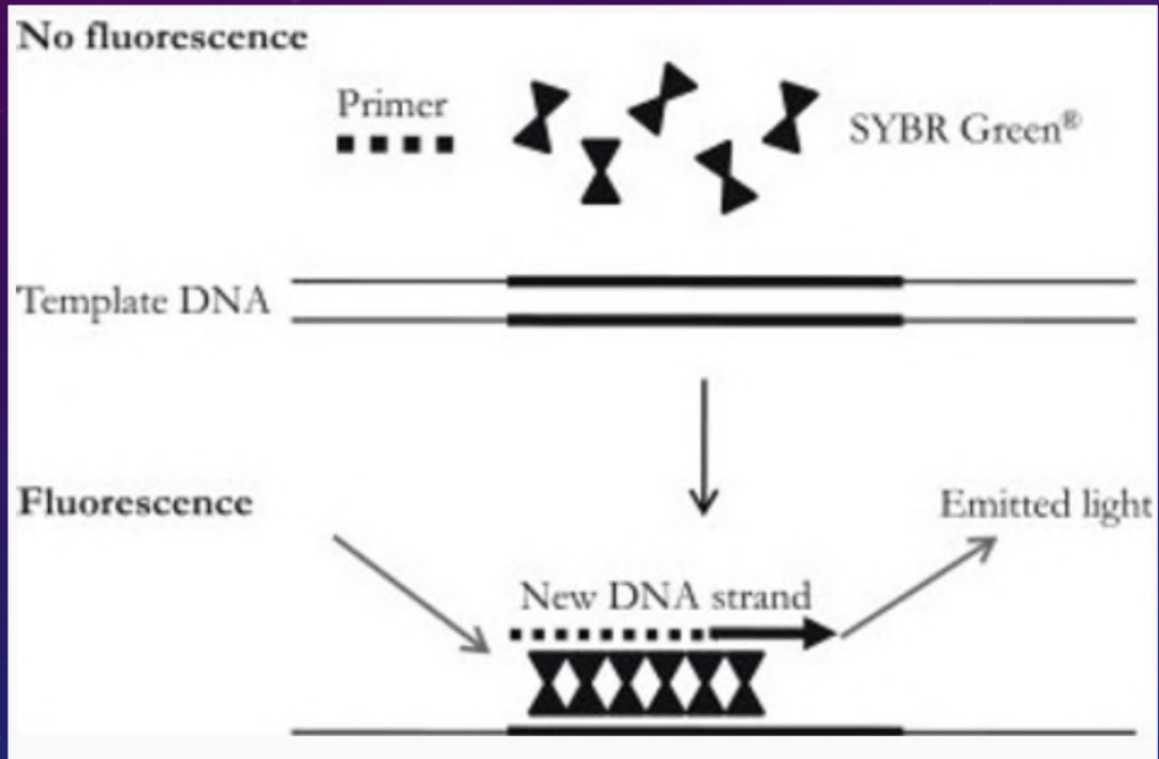
Dye	Max. EX (nm)	Max. EM (nm)	Compatible Quencher
Cyanine 3	550	570	BHQ-2
Quasar® 570 ³	548	566	BHQ-2
Cal Fluor Red 590 ⁴	565	588	BHQ-2
ROX™	573	602	BHQ-2
Texas Red®	583	603	BHQ-2
Cyanine 5	651	674	BHQ-3
Quasar 670 ⁵	647	667	BHQ-3
Cyanine 5.5	675	694	BHQ-3

Sigma® is a licensed supplier of a variety of dyes and quenchers and continually adds to its portfolio of new chemistries. For assistance in the design of your probe and/or assays, visit sigma.com/probedesignonline.

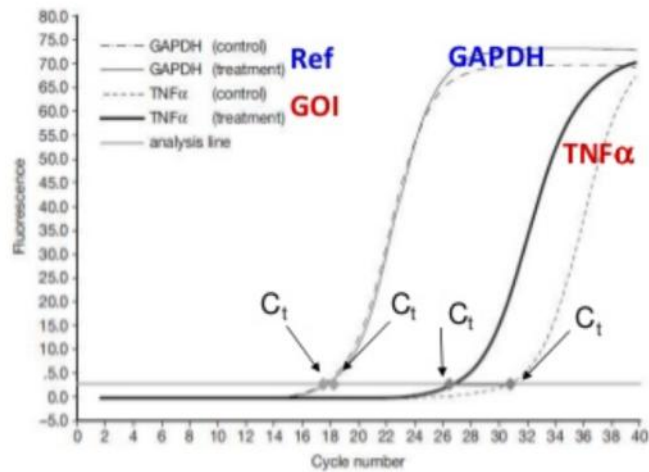
Platform	SYBR® Green I	FAM	HEX	JOE	ROX	TET	Cyanine 3	Cyanine 5	TAMRA	Texas Red	LC Red 640	LC Red 705
ABI 7900HT	•	•	•	•	•	•			•			
ABI 7300	•	•	•	•	•				•			
ABI 7500	•	•	•	•	•		•	•	•	•		
ABI 7700	•	•	•	•		•			•			
ABI 7000	•	•	•	•					•			
ABI StepOne™	•	•	•	•	•		•		•			
ABI StepOnePlus™	•	•	•	•	•		•		•			
Bio-Rad iQ™ 5	•	•	•	•	•	•	•		•	•		
Bio-Rad Opticon™ 2	•	•	•			•			•			
Bio-Rad Chromo4™	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Bio-Rad MyiQ™	•	•										
Bio-Rad MiniOpticon™	•	•										
Bio-Rad CFX96™	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Bio-Rad SFX384™	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Agilent Mx4000®	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Agilent Mx3000P®	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Agilent Mx3005P®	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Roche LightCycler®	•	•									•	•
Roche LightCycler 2	•	•	•								•	•
Roche LightCycler 480	•	•	•					•			•	•
Cepheid SmartCycler®	•	•				•	•			•		
Cepheid SmartCycler II	•	•				•	•	•		•		
Qiagen Rotor-Gene® 6000	•	•		•	•	•	•	•	•	•		
Eppendorf Mastercycler® ep <i>realplex</i>	•	•	•	•	•				•	•		

Note: Not all qPCR instruments or reporters are listed.
Contact the instrument manufacturer for details on compatible reporters.

KANTITATIF REAL-TIME PCR= QPCR



KANTITATIF REAL-TIME PCR= QPCR



$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (TNF\alpha_{treat} - GAPDH_{treat}) - \Delta Ct (TNF\alpha_{control} - GAPDH_{control})$$

The fold change = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

single data ($n = 1$) e.g. array results:

$$\text{relative expression} = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Cp_{\text{target}} (\text{control} - \text{sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Cp_{\text{ref}} (\text{control} - \text{sample})}}$$

Pfaffl, Nucleic Acids Research 2001

multiple data ($1 < n < 16$) e.g. experimental groups:

$$\text{relative expression} = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Cp_{\text{target}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Cp_{\text{ref}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}$$

Pfaffl et al., Nucleic Acids Research 2002

KANTITATIF REAL-TIME PCR= QPCR

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}
