

# Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

---

# PCR'ın Hikayesi

- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgün bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan bir teknik olup ilk olarak Cetus firmasının insan genetiği departmanında çalışan araştırmacı Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuştur.
- Polimeraz zincir tepkimesini keşfinden ötürü 1993 yılında Michael Smith ile birlikte Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) bulunması ile modern moleküler biyoloji ve moleküler tıptaki gelişmeler yenilenmiştir. Moleküler fotokopiye benzeyen bu teknik, İnsan Genomu Projesinin tamamlanmasında yer almıştır. Yakın geçmişte moleküler tanı alanlarında ve Yeni Nesil Dizilimleme Teknolojisi platformlarında kullanılmasıyla PCR, genomik bilimin önemli basamağı olarak kendini geliştirmiştir.

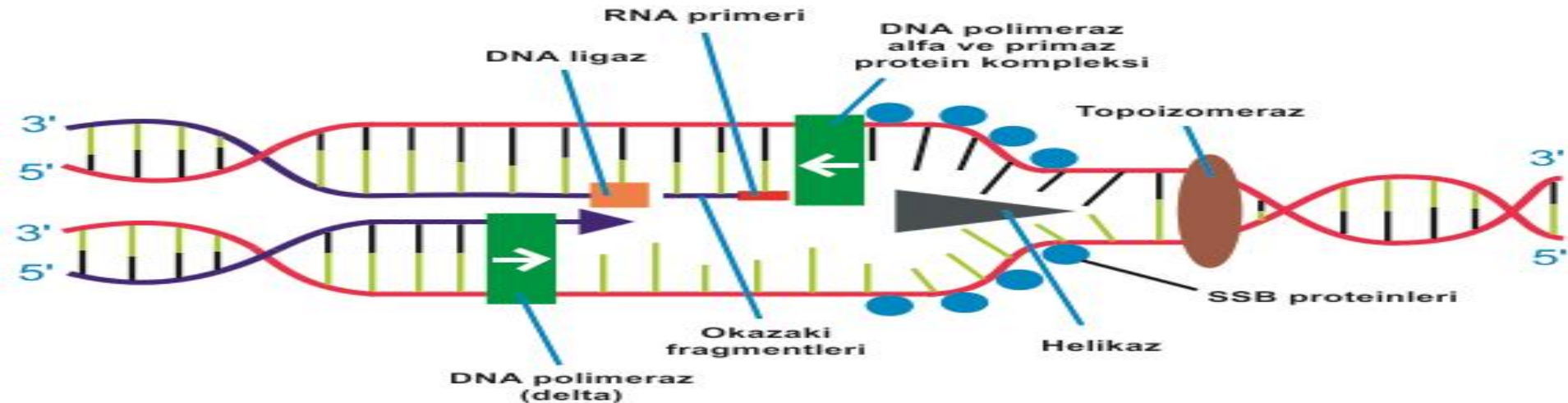
# PCR'ın Hikayesi

- 1970 yılında genleri yapay olarak sentezleyen ilk bilim insanı olan H. Gobind Khorana, çalışmaları ile genetik kodun deşifre edilmesinde büyük önem taşıdı. Böylelikle sentezlediği yapılar ile içerdikleri özgül kodun ışığında üretilen peptitleri karşılaştırarak kalıtsal kodun hangi sıra ile okunduğunu, kodun başlangıç ve bitiş noktalarının nasıl belirlendiğini buldu. H.Gobind Khorana, sentez yöntemleri ile kalıtım mekanizmasının aydınlığa kavuşturulmasında etkili olmuştur. Protein sentezinde genetik kod ve işlevlerinin yorumlanması hakkında yaptığı araştırmalardan ötürü Nobel ödülünü kazanmıştır.



# PCR'ın Hikayesi

- DNA polimeraz'ın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için önemli olduğunu ve daha öncesinde yapılan araştırmaların PCR'ın keşfi için gerekli olduğunu söylemek pek hata sayılmaz. 1956 yılında, Nobel ödüllü Arthur Kornberg ve arkadaşları tarafından *Escherichia coli*'de yer alan DNA polimeraz I (Pol I) enzimi keşfedilmiştir. Ve bu keşif DNA'nın kendini nasıl eşlediğinin anlaşılmasına yol açmıştır. Bununla birlikte laboratuvarlarda kullanılmak üzere yeteri kadar anlamlı sonuç verebilen stabil DNA polimerazın bir türünü keşfetmek biyologların bir 20 yılını daha alacaktı.



# PCR'ın Hikayesi

- 1976 yılında, Cincinnati Üniversitesinden bir grup araştırmacı kaplıca ya da hidrotermal bacalarda yaşayan termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* bakterisinden **Taq polimeraz** enzimini keşfetti. Taq polimeraz enzimi, PCR'da kullanılan, yüksek sıcaklıklara (94°C) ve denatürasyon sıcaklıklarına dayanabilen bir enzimdir.



# PCR'ın Hikayesi

- 1983 yıllarında, Nobel ödüllü Kary Mullis, California'da Cetus Corporation'da **oligonükleotit** (kısa DNA parçaları) sentezi üzerinde çalışırken hücredeki **DNA sentezinin laboratuvar şartlarında teknik olarak gerçekleşebileceğini gözlemler**. Mullis, reaksiyonunda her adım da (erime, bağlanma ve sentez) sıcaklıkların özenle kontrol edilmesini ve buna ek olarak reaksiyonlarda **DNA polimeraz kullanarak farklı sıcaklıklardaki üç olayın çevrimler halinde tekrarının yapılması gerektiğini bulur**. İki yıl sonra Cetus ekibi, Amerikan İnsan Genetiği Derneğinin yıllık toplantısında çalışmalarını sundular. Aynı yıl yöntem ilk olarak **Science dergisinde** yayınlandı. Ancak yeni geliştirilmiş olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi hakkındaki bu makale yaklaşık olarak 15 dergi tarafından reddedildi ve 1987 ye kadar da dergilerde yayınlanmadı.

# PCR'ın Hikayesi

- Bilim insanları tarafından yeni yöntemin yavaş bulunması üzerine Cetus araştırmacıları orjinal yöntemi geliştirdiler. 1986 yılında, bilim insanları yöntemde hataları azaltıp ısıya hassas olan DNA polimeraz yerine Taq polimeraz kullanıldı. Böylelikle bu enzimin uzun sıcaklık derecelerine oldukça dayanıklı olması ile tüm döngüler boyunca verimli şekilde DNA sentezi yapabiliyordu. Bir yıl sonra, ABD kökenli uluslararası bir şirket olan Perkin Elmer'de çalışan bilim insanları PCR'da ısıtma ve soğutma sağlayan makine parçaları düzenlemek için termal döngüyü icat ettiler.
- Sonuçta; 1988 yılında “*Thermus aquaticus*” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte PCR için otomatize termal siklüs cihazları geliştirilmeye başlanmıştır.

# PCR (termal döngü cihazı)





# PCR'ın Hikayesi

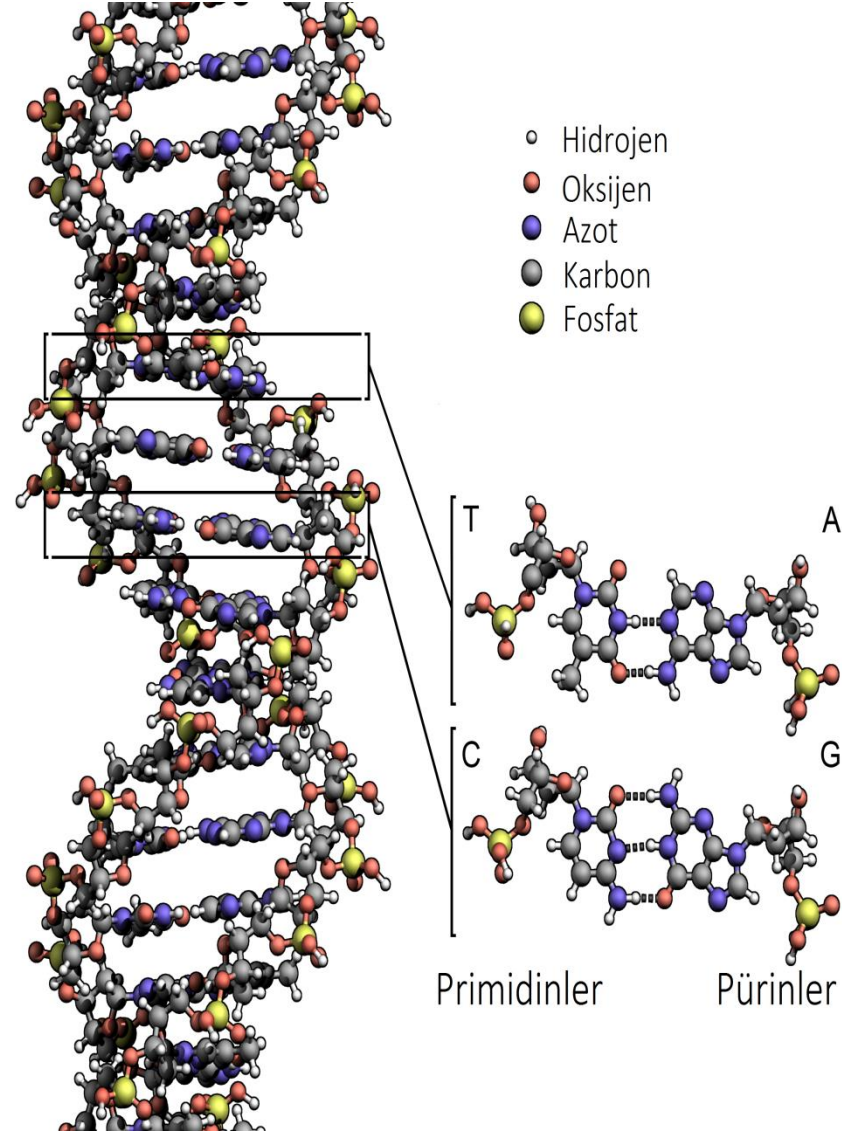
- PCR'ın sahneye ilk çıktığı yıllardan beri, yöntemde bir takım değişiklikler olmuştur. Örneğin, 1991 yılında, **Taq polimeraz** yerine hipertermofilik bakteri olan ***Pyrococcus furiosus* (Pfu)** tanıtıldı. Taq polimeraz aksine, Pfu eksonükleaz redaksiyon faaliyeti hatalarını düzeltmek için imkan verdiği görülür. 1995 yılında, PCR kullanıcıları için iki yeni gelişme tanıtıldı.
- İlk yenilik olarak polimerazın aktif hale getirilmesini sağlayan ilk 95°C kısmı eriyene kadar, polimeraz aktivitesini inhibe eden bir **immünglobulinin** kullanılmasıdır. Bu işlemin PCR'ın özgüllüğünü arttırmada etkili olmasına rağmen, işlem süresinde artış gözlenmiş ve çapraz kontaminasyon gerçekleştirdiğininide pek çok araştırmacı kanıtlamıştır.

# PCR'ın Hikayesi

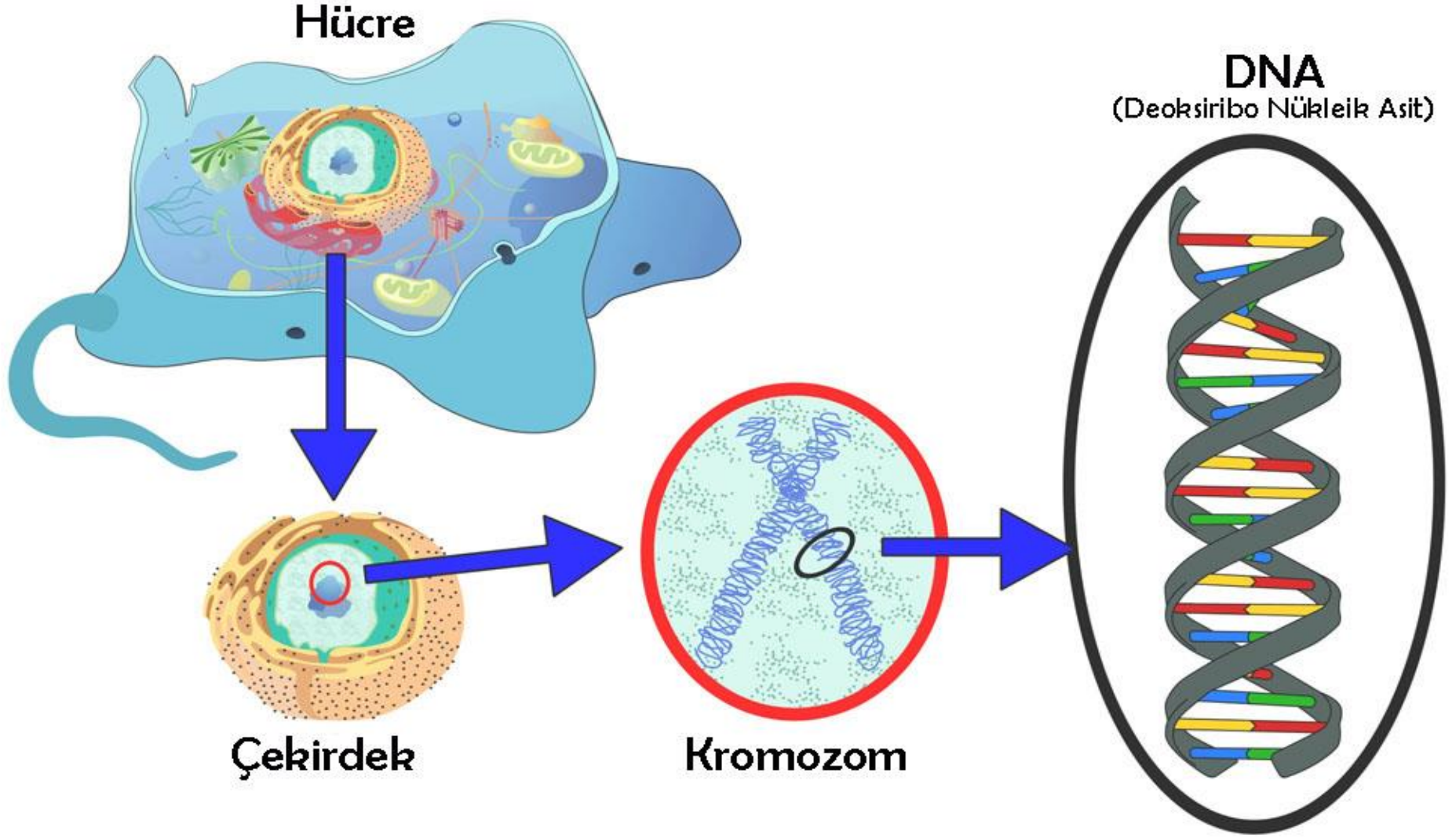
- İkinci yenilik ise, moleküler biyoloji alanı ve PCR kullanarak başka alanlarda devrim yapabilecek yöntemler tanıtılmasıdır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik **revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)**'da bir devrim yaşanmaktadır.
- Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek 'Real Time' (eş zamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Bir çok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, **Kantitatif-kinetik PCR (qPCR)** gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür.

# PCR Tarihçesi

- **1962**-Arber-RE hakkında ilk kanıtları buluyor, daha sonra Nathans ve Smith **bu enzimleri purifiye ediyor.**
- **1966**-Nirenberg Ochoa ve Khorana; **genetik kodu** aydınlatıyor.
- **1967**-Gellert; **DNA ligazı** buluyor.
- **1972-1973**- Boyer, Cohen, Berg; **ilk defa DNA klonlama teknikleri** geliştiriyorlar.
- **1975**-Southern: **Jel transfer hibridizasyon tekniğini** geliştiriyor.
- **1975-1977**-Sanger ve Barell ayrıca Maxam ve Gilbert **DNA dizi analizi yöntemi** geliştiriyor.
- **1981-1982**- Palmitter ve Brinster; transgenik fare Spradling ve Rubin; **transgenik sirke sineği** üretiyor.
- **1985**-Mullis ve çalışma arkadaşları: **polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)nu keşfediyor.**



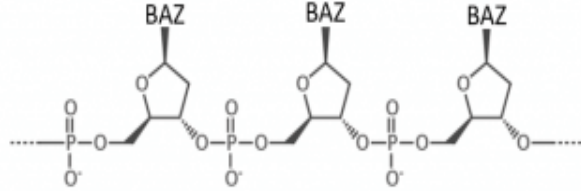
# DNA'nın Yapısı



# DNA'nın KİMYASAL YAPISI

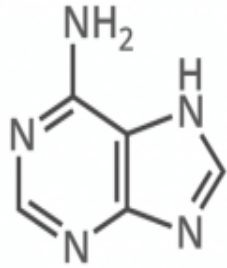
DNA (deoksiribonükleik asit) her çok-hücreli organizmanın genetik bilgisini taşır. Organizmaların yapıtaşı proteinlerin yapılması için gerekli talimatları barındırır.

## ŞEKER-FOSFAT İSKELETİ

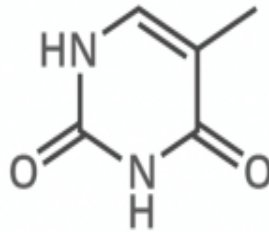


DNA, nükleotid adlı birimlerin oluşturduğu bir polimerdir. Nükleotidler 3 farklı komponentten oluşur: bir şeker grubu, bir fosfat grubu, ve bir baz. 4 farklı baz vardır: Adenin, Timin, Guanin & Sitozin

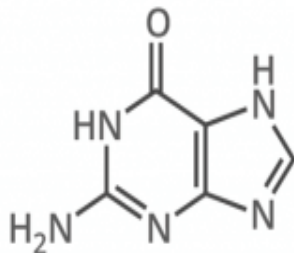
## A ADENİN



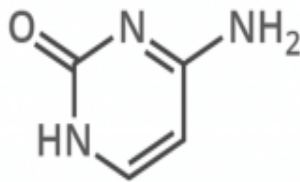
## T TİMİN



## G GUANİN

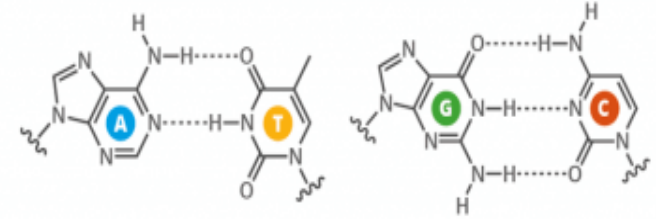


## C SİTOZİN



## DNA ZİNCİRLERİ NASIL BİR ARADA DURUR

DNA zincirleri hidrojen bağları ile bir arada tutulur ve merdiven şeklinde dizilir. Adenin (A) daima Timin (T) ile eşleşir; Guanin (G) ise Sitozin (C) ile eşleşir.



## DNA'dan PROTEİNLERE



DNA'nın tek bir zincirindeki bazlar bir «kod» gibi davranır. Üç harflik / nükleotidik dizilere «kodon» denir, ve kodonlar proteinleri oluşturan farklı amino asitleri kodlar.

Bir enzim olarak, RNA polimeraz, DNA'dan mRNA (mesajcı ribonükleik asit) oluşturur. Bunu, çift sarmal oluşturan iki ipliği ayırıp, sonra bir iplikçi okumak ve nükleotid dizisini (sekans) kopyalamak suretiyle yapar. RNA ve orijinal DNA arasındaki tek fark, Timin (T) yerine benzer yapıda bir baz olan Urasil (U) kullanılmasıdır.

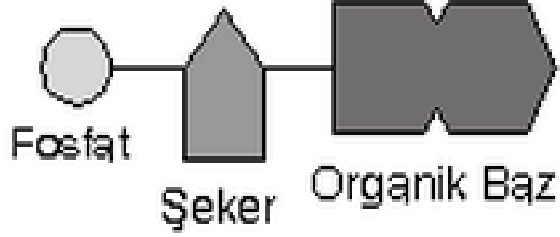
DNA Sekansı T T C C T G A A C C C G T T A

mRNA Sekansı U U C C U G A A C C C G U U A

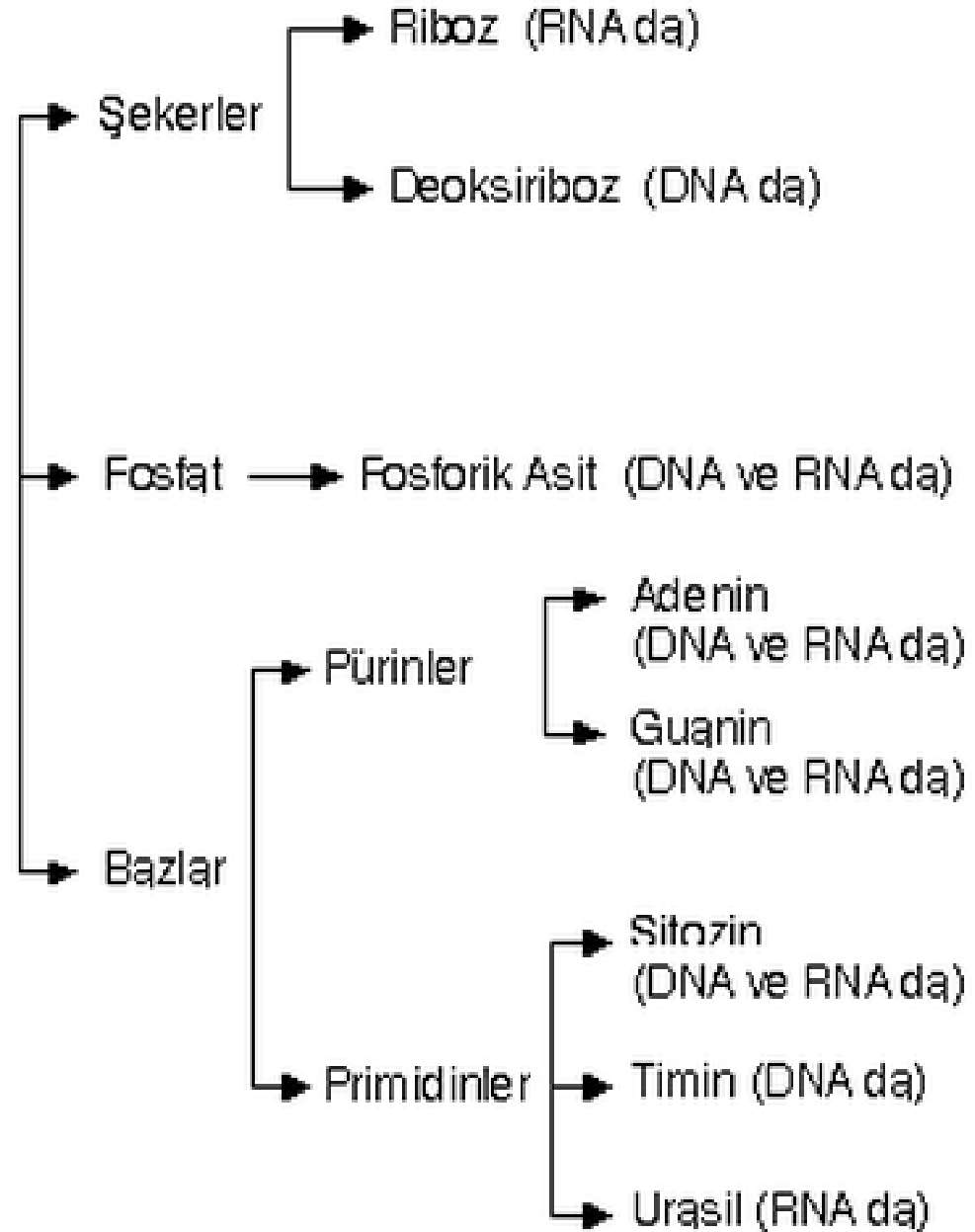
Aminoasit Fenilalanin Lösin Asparajin Prolin Lösin

Çok-hücreli organizmalarda, mRNA genetik kodu hücrenin çekirdeğinden dışarı çıkarır, sitoplazmaya doğru. Protein sentezi burada gerçekleşir. «Translasyon» mRNA'nın taşıdığı kodun proteinlere çevrilme sürecidir. Ribozom adlı moleküller aminoasitlerden proteinleri oluşturarak bu süreci yönetir.

Nükleik Asitler (DNA ve RNA) → Nükleotidler

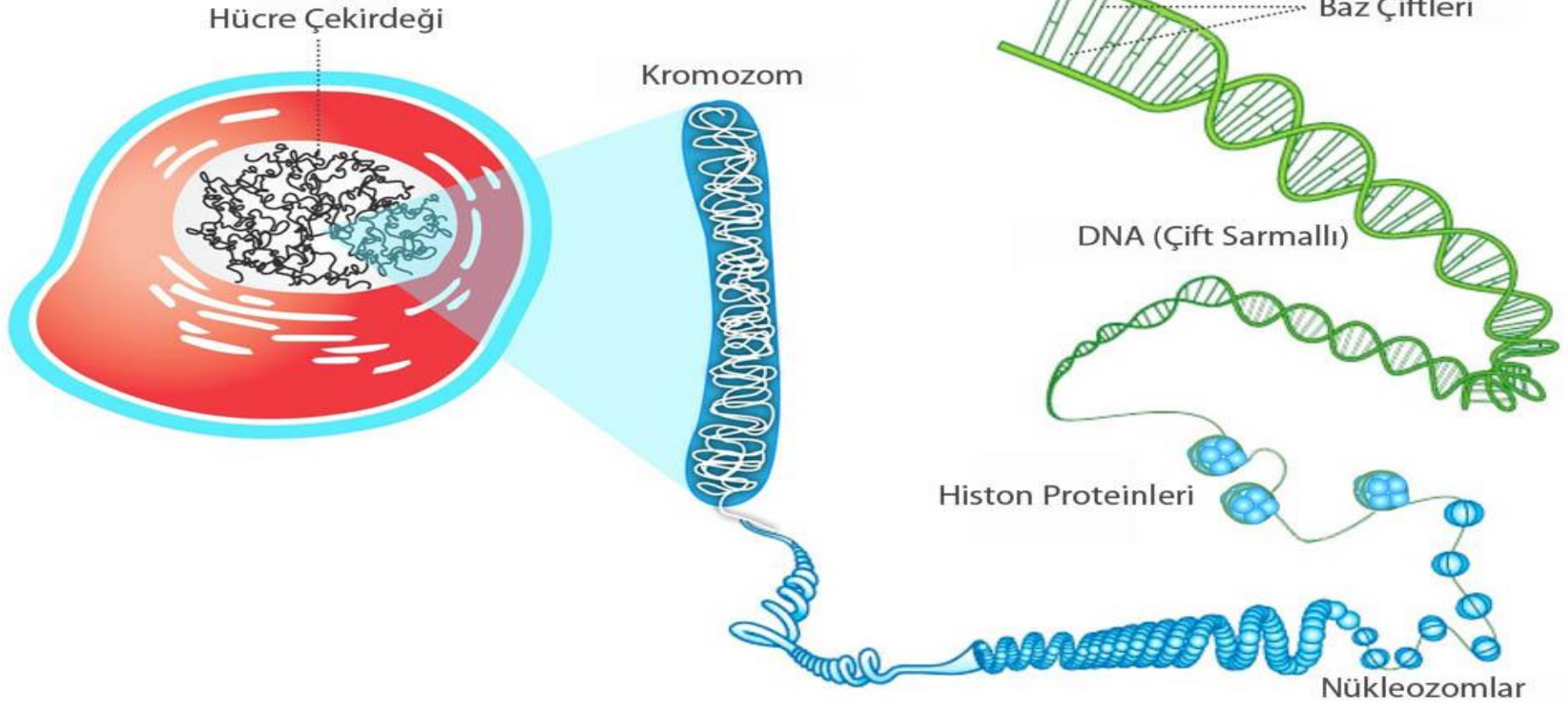
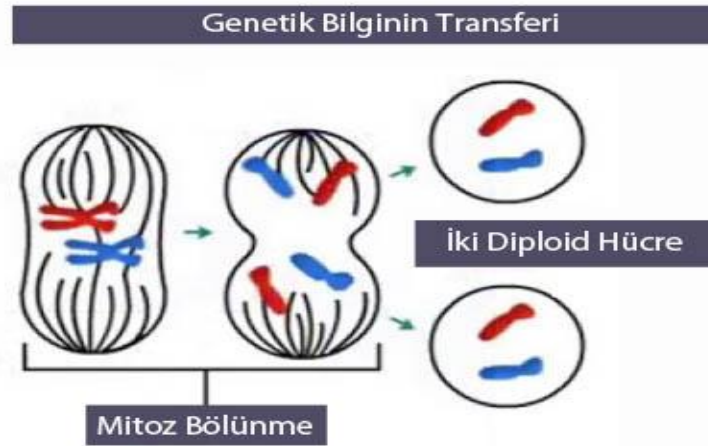
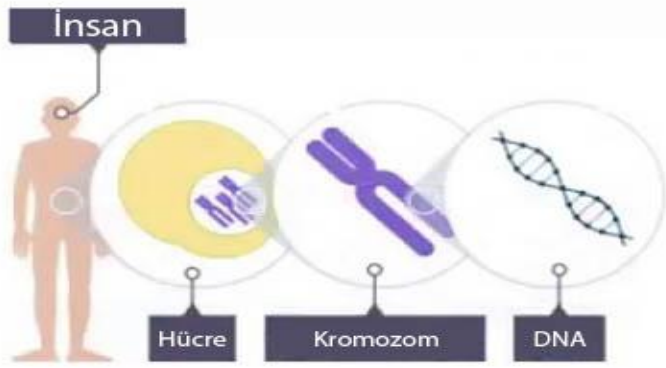


Bir Nükleotidin Yapısı



# DNA'nın Yapısı

- **Ökaryot Canlılar**” (yani hayvan, bitki, mantar ve protistalar) **DNA'larını hücre çekirdeği içinde** bulundururken, **“Prokaryot Canlılarda”** (yani bakteri ve arkelerde) **DNA, hücre sitoplazmasında** yer alır. Kromozomlarda bulunan **kromatin proteinleri** (histonlar gibi) DNA'yı sıkıştırıp organize ederler. Bu sıkışık yapılar DNA ile diğer proteinler arasındaki etkileşimleri düzenleyerek **DNA'nın hangi kısımlarının okunacağını** kontrol eder.





# DNA'nın Replikasyonu

- DNA molekülünün, sakladığı genetik bilgilerin sonraki nesillere aktarılması için kendi kopyasını oluşturmasıdır

Genetik bilginin aktarımından üç farklı işlem sorumludur.

- ❖ **Replikasyon**
- ❖ **Transkripsiyon**
- ❖ **Translasyon**

**Replikasyon** esnasında çift iplikli bir nükleik asit molekülü, eş kopyalar verebilmek için birebir çoğaltılır. Bu işlem genetik bilginin değişmeden korunarak sürekliliğini sağlar.

- **Transkripsiyon** DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) şeklinde kopyalanması veya yazılması olayıdır.
- **Translasyon** transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zinciri haline dönüştürülmesidir

# DNA'nın Replikasyonu

- **DNA replikasyonu PCR amplifikasyonunun dayandığı işlemdir.**
- Replikasyon sırasında, DNA molekülünün çift sarmal yapısı çözülerek açılır ve her iplik, yeni bir tamamlayıcı ipliğin sentezi için ata olur. Her yavru molekül bir eski bir de yeni DNA ipliğinden oluşur ve ana molekülün birebir kopyasıdır.

# DNA Replikasyonu Basamakları

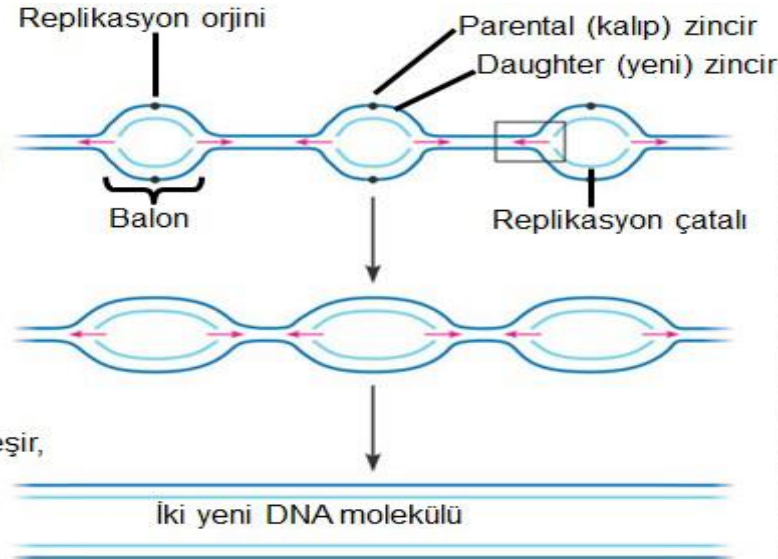
- 1) Ökaryotik hücrelerde replikasyon, uzun DNA'nın birkaç noktasında aynı anda başlar. Bu noktalardan eşlenen DNA parçaları daha sonra birbirleriyle birleşerek replikasyonu tamamlar.

www.biyolojidersim.com

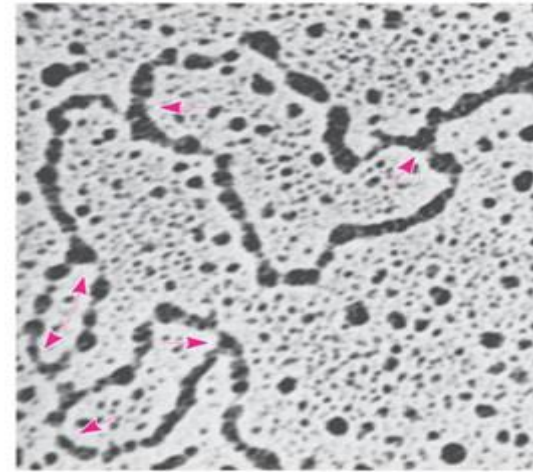
1 Replikasyon iki parental zincirin ayrıldığı ve replikasyon balonlarının oluşturduğu spesifik bölgelerde başlar

2 Balonlar lateral olarak genişlerler DNA replikasyonu her iki yönde ilerler

3 Sonunda, replikasyon balonları birleşir, ve yeni zincirlerin sentezi tamamlanır



0.25 µm



(a) Ökaryotlarda, her kromozomun kocaman DNA molekülü boyunca birçok yerde DNA replikasyonu başlar

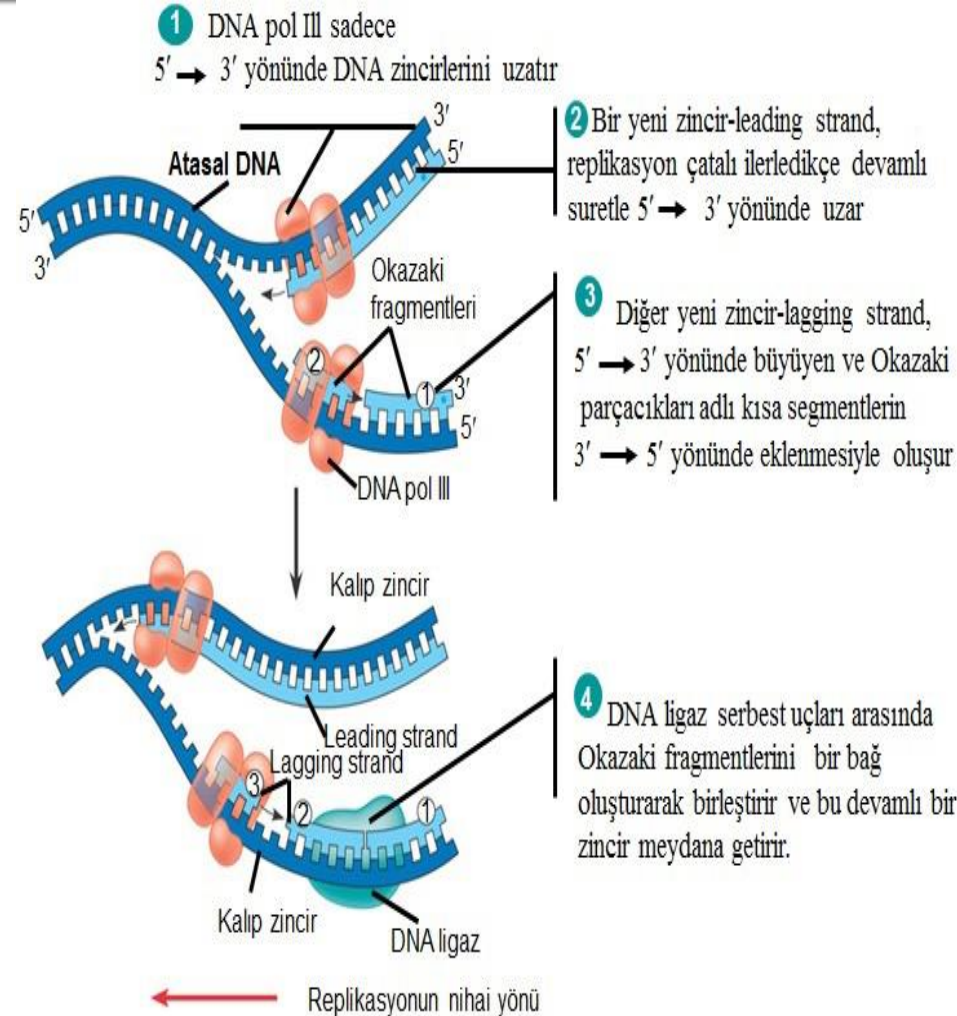
(b) Bu mikrografta, Chinese hamster cell kültürüne ait DNA boyunca üç replikasyon balonu Görülebilir.

**Bir ökaryotik kromozomu yüzlerce replikasyon orijini içerebilir**

# DNA Replikasyonu Basamakları

- 2) Replikasyon çatalında yeni zincirlerden biri **5'→3' yönünde kesintisiz bir biçimde replike** edilir. Diğer oluşan yeni zincir ise replikasyon çatalından uzaklaşacak biçimde kesintili olarak replike edilir. Bu kesintili küçük **parçalara okazaki parçaları** adı verilir. Ökaryotlarda 100-200 arası olan arası olan bu parçalar DNA ligaz enzimi yardımıyla şeker-fosfat bağlarıyla birleştirilir.

- 3) DNA molekülünün iki zincirini bir arada tutan bağlar **DNA helikaz enzimi** ile koparılır. Eşlenmenin olacağı bölgelerde DNA molekülü bir fermuar biçiminde açılır. Bu açılma sonucunda her iki zincirde bulunan pürin ve pürimidin bazlarının uçları açıkta kalır.

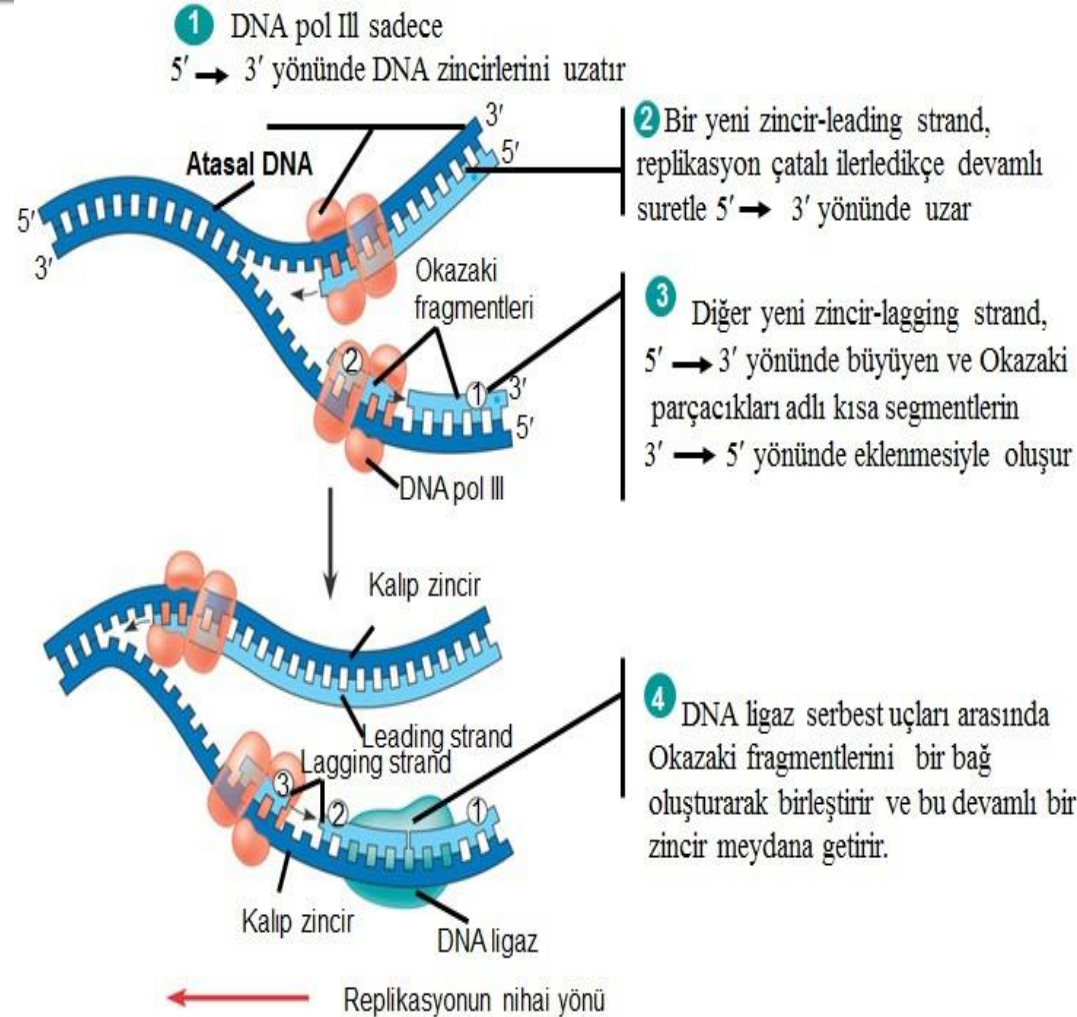


DNA zincirlerinin kesintili ve kesintisiz replikasyonu

# DNA Replikasyonu Basamakları

4) DNA'nın açılan iki zinciri üzerine **RNA polimeraz enzimi** gelir. RNA primaz tarafından primeri oluşturulur.

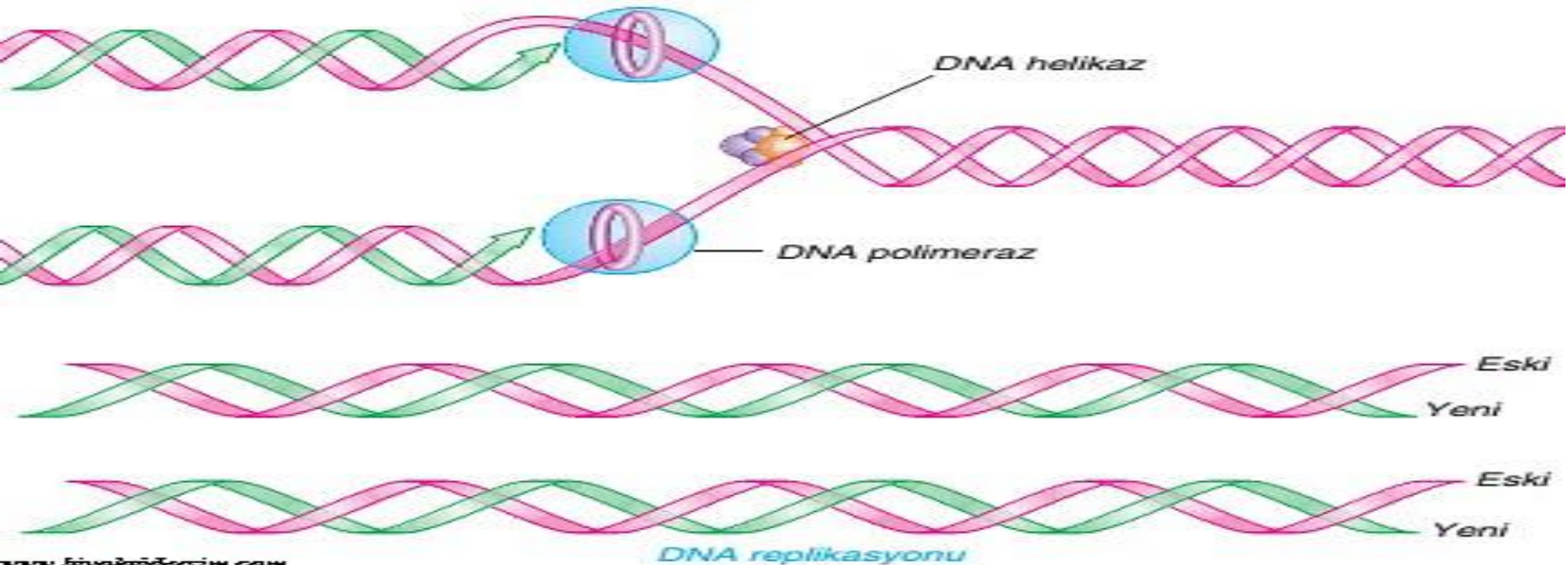
5) Açılan her iki zincirin üzerine **DNA polimeraz enzimi** gelir. Bu enzim hücrede daha önceden sentezlenmiş olan serbest nükleotitleri açık olan uçlara uygun biçimde ekleyerek (adenin karşısına timin, sitozinin karşısına guanin nükleotidi) yeni DNA zincirlerini oluşturur. Böylece açılan zincirin her biri yeni oluşacak **DNA molekülü için kalıp görevi** görür.



DNA zincirlerinin kesintili ve kesintisiz replikasyonu

# DNA Replikasyonu Basamakları

6) Eşlenmenin tamamlandığı DNA bölümleri zincirler arasında **kurulan H bağları ile tekrar sarmal yapıya** döner. Bütün nükleotitler eşlendiğinde nitelik ve nicelik bakımından birbirinin aynısı iki DNA molekülü oluşur. Yeni DNA moleküllerinde biri eski diğeri yeni olmak üzere iki zincir bulunur.



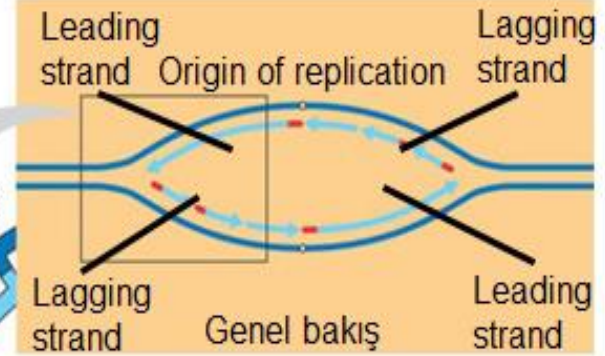
# DNA replikasyonunun özeti

← Replikasyonun esas yönü →

1 Helikaz parental ikili sarmalı açar

2 Tek-zincir bağlama proteini açılan kalıp zincirlere bağlanarak sabitler

3 leading zincir DNA pol III tarafından 5'→3' yönünde kesintisiz olarak sentezlenir



5'  
3'

Parental DNA

4 Primaz 5. Okazaki fragmenti için RNA primerinin sentezini başlatır

Primaz

Primer

DNA pol III

Lagging strand

6 DNA pol I ikinci fragmentin 5' ucundan primeri Ayırır, ve üçüncü fragmentin 3' ucuna tek tek DNA nükleotitlerini yerine yerleştirir. Son RNA Nükleotidinin DNA ile yer değiştirmesi şeker-fosfat iskeletinde serbest 3' ucu bırakır

7 DNA ligaz ikinci fragmentin 3' ucunu ilk fragmentin 5' ucuna bağlar





# PCR;

- DNA' nın dizi analizi ve DNA haritalamasında,
- Genetik hastalık teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi v.b.),
- DNA parmak analizinde,
- İnsan evrimi araştırmalarında,
- İnsan Genom Projesi' ndeki araştırmalarda,
- Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde,
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde, (analık babalık tayini ),
- Tarımda ( tohum saflığının belirlenmesi ) gibi alanlarda kullanılır.

# PCR;

## **PCR'nun Avantajları**

- Çabuk
- Duyarlı
- Yüksek özgüllüğe sahip

## **PCR'nun Dezavantajları**

- Pahalı
- Kros reaksiyonlar/non-spesifik DNA amplifikasyonu : Sterilite
- Yalancı pozitif/negatif değerlendirme
- Deneyimli personel

# PCR'nin işleyişi

- Verimli bir PCR için;
- 1. Denatürasyon
- 2. Primerlerin bağlanması
- 3. Primerlerin uzaması
- 4. Döngü sayısı
- 5. PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir.

# PCR için gerekli olanlar;

1. Distile su
2. Buffer (tampon çözeltisi-1XTBE) ve  $MgCl_2$
3. Dinükleotittrifosfatlar (dNTP)
4. Primerler (forward ve revers)
5. Taq DNA polimeraz
6. Çoğaltılmak istenen DNA (kalıp-template DNA)

# PCR'da Önemli Bileşenler

## ■ 1. Kalıp DNA

Çoğaltılacak bölgeye üzerinde taşıyan DNA'dır. Bu bölge için kalıp olma görevi vardır. PCR'de; genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'de kalıp olarak DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Bu kalıp DNA'lar amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları şeklinde ya araştırma laboratuvarları yada kliniklerden ticari olarak temin edilebilir.

# PCR'da Önemli Bileşenler

## ■ 2.DNA POLİMERAZLAR

Bu enzimler kalıp DNA'ya bağlanmayı kolaylaştırıp, yeni bir iplik oluşturmak üzere uzun polipeptidten zincirin sentezini kataliz eder. Sentezi başlatmak için primerlere ihtiyaç duyarlar. 5' uçtan 3' uca doğru, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanmış olur.

# PCR'da Önemli Bileşenler

## ■ 3.PRİMERLER

- Reaksiyonun özgülüğü **primer oligonükleotidlerin** seçilmesiyle sağlanır. Bunlar amplifiye edilecek DNA'ya bağlanacak olan bağlanma bölgesine komplementer yapıda kısa tek sarmal DNA molekülleridir.
- Primerler çiftler halinde biri çift zincir DNA'yı oluşturan zincirlerinden birine, diğeri de o zincirin komplementerine eşleşecek şekilde farklı dizilimlerde tasarlanırlar. Amplifikasyon için DNA dizisinin bilinmesi gerekli değildir. Birleşme bölgelerinin dizisinin bilinmesi yeterlidir.
- Reaksiyon için ısıya dayanıklı bir enzim Taq DNA polimeraz Klenow fragmenti kullanılırken günümüzde "***Thermus aquaticus***" adlı termofilik bakterisinden izole edilen ve ısıya dayanıklı enzim olan **Taq polimeraz** kullanılmaktadır.

- Çünkü bu enzim 94C'de inkübe edildikten sonra bile aktivitesini kaybetmez. Fakat E.coli'den elde edilen DNA polimeraz I yüksek sıcaklıkta inaktive olur ve her döngüde enzimi yenilemek gerekir. Bu yol hem yavaş hem pahalıdır. O yüzden Taq polimeraz kullanılır.
- DNA polimeraz enzimleri bir DNA sentezleyebilmek için komplementerini sentezleyeceği bir kalıp DNA molekülüne, substrat olarak dNTP' lere ve kalıp zincirine eşleşmiş primerin 3'OH grubuna ihtiyaç duyarlar. Enzim bu bileşenlerin bir araya geldiği uygun tampon sisteminde ve uygun sıcaklıkta primerin 3'OH grubuna serbest dNTP' lerin 5'a -fosfat gruplarını 3'-5 fosfodiester bağı ile kovalent olarak bağlar

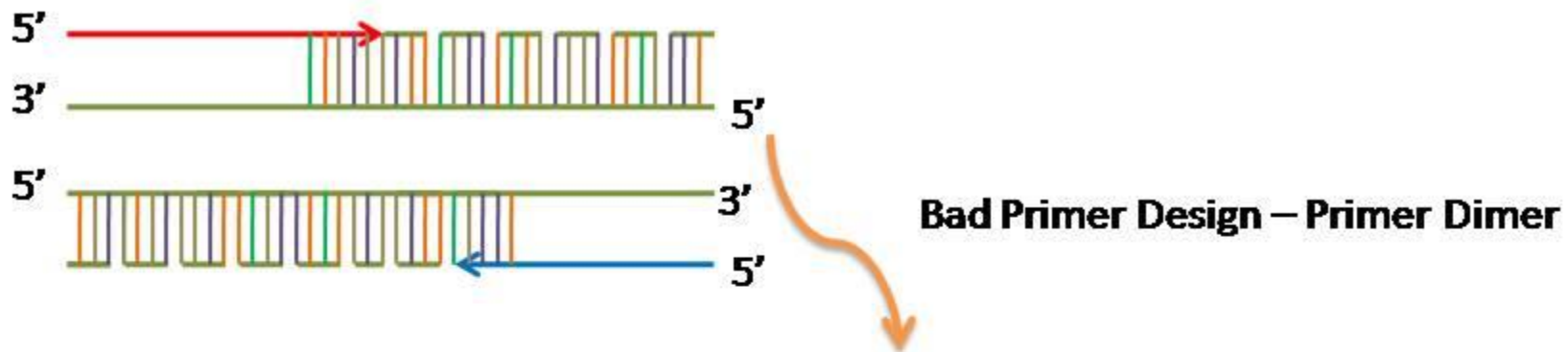


# PCR PRİMERLERİNİN SEÇİMİ VE DİZAYNI

- PCR için primerlerin dizaynında aşğıdaki basamaklar/yollar test edilmiştir ve yararlı oldukları kanıtlanmıştır.
- Primerlerin boyutları 18-24 bp arasındadır. Büyük primerler (30-35 bp) kısa primerler ile karşılaştırıldığında bunların daha benzer döngü şartlarında çalıştıkları görülür ve bu durum PCR'ı daha da kolaylaştırır.
- Tm derecesi ya da erime sıcaklığı yakın olan iki primerin kullanılması faydalıdır. İki primer arasındaki Tm farklılığı yüksek ise; düşük Tm derecesi 5' ya da 3' uçta yer alan primerin uzunluğunun artırılması yoluyla yükseltilebilir. Pürin : pirimidin içeriği 1 : 1 civarında olmalıdır (%40-60 olabilir). Primer sekansı 1-2 pürin bazıyla başlamalı ve bitirilmelidir.

# PCR PRİMERLERİNİN SEÇİMİ VE DİZAYNI

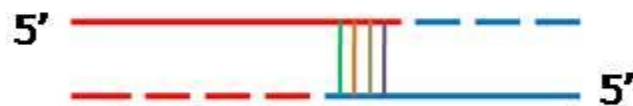
- Her primer çifti primer-primer etkileşimi bakımından test edilmelidir. Bu amaçla kullanılacak yararlı Macintosh programı “CPrimer” dir. Bu program sekansa giriş için erime sıcaklığını da verir. Bu şekilde PCR programlarının dizaynına yardımcı olur. Bazı web sitelerinin direkt olarak kullanılabilen programları aynı fonksiyonu yapabilir (erime sıcaklığının, uygun primerlerin seçilmesi gibi).
- Primer sekansları; istenilen DNA sekanslarıyla ve genomda başka yerdeki gen bölgeleri ile ya da sıralı sekanslar ile benzerlikleri bakımından kontrol edilmelidir. Eğer iki gen bölgesi çok benziyor ise (örneğin across türler); amplifiye olan gen bölgesinin 3' ucuna spesifik olan primer en az 1-2 baz fazla olacak şekilde dizayn edilir.
- Döngü şartları ve tampon konsantrasyonları her primer çifti için ayarlanabilir. Sekonder ürün oluşturulmadan istenilen gen bölgesinin amplifikasyonu spesifikleştirilmiş olur. Bu durum mümkün değil ise, primerlerin sekansları (her ikiside) 4-5 baz uzatılır ya da primer çifti tamamen değiştirilir.



**Step I: Two primers are attached at complementary bases at the 3' end**



**Step II: Primers are elongated by DNA polymerase**



**Step III: The elongated primer dimer binds its complementary primer with high affinity**



# PCR'da Önemli Bileşenler

## ■ 4.dNTP KARIŞIMI

Deoksirübonükleozid trifosfatlar (dATP,dGTP,dTTP,dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak bulunur. DNA sentezi için gereklidir.

# PCR'da Önemli Bileşenler

## 5. TAMPONLAR VE MAGNEZYUM

Tamponlar, enzim için gerekli olan elektrolitleri ve koenzimleri sağlar. Yine polimeraz enzimleri aktiviteler için serbest magnezyum iyonlarına gereksinim duyarlar. Bu yüzden magnezyum içeren tamponlar kullanılır. Tampon çözeltisinin içeriği kullanılan enzimin tipi ve özelliğine göre seçilir. PCR'de en çok kullanılan tampon Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur.

### **Mg+2 iyonları;**

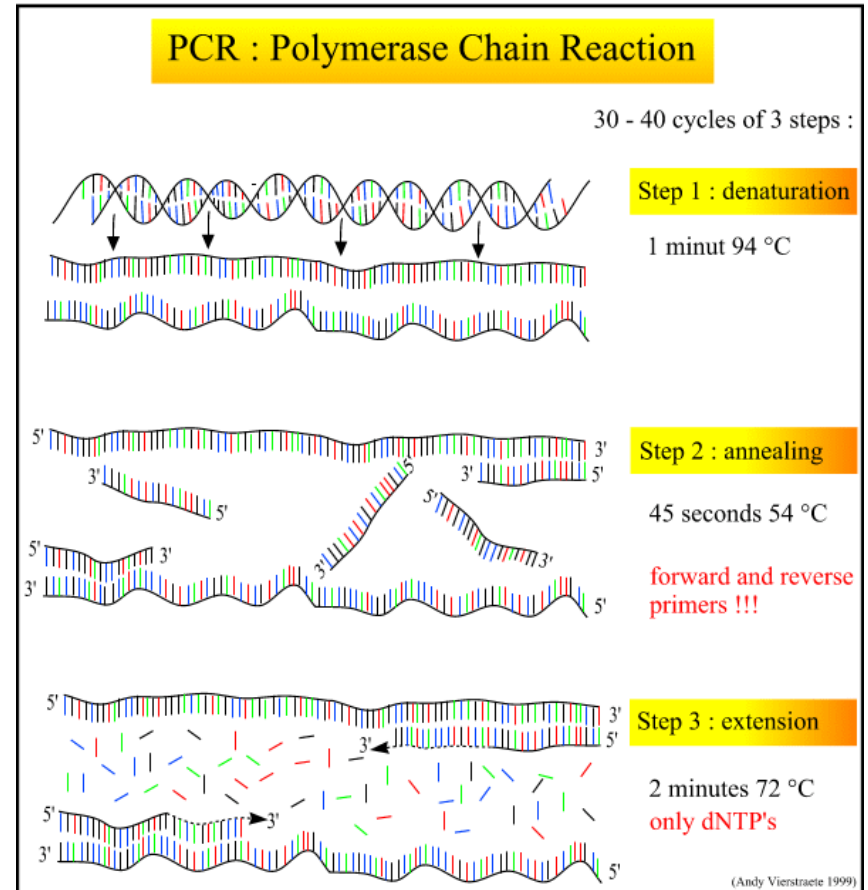
1. dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar.
2. Polimeraz aktivitesini artırır.
3. Çift iplikli DNA'nın Tm (erime noktasını) değerini arttırmaları.
4. Primer/kalıp etkileşimini sağlarlar.

Bu yüzden MgCl<sub>2</sub>'ün PCR'nin özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu olarak 1,0-1,5 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük Mg+2 konsantrasyonu; ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg+2 konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar. MgCl<sub>2</sub> içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca MgCl<sub>2</sub> kullanımına gerek yoktur.

# PCR'IN TEMEL PRENSİPLERİ

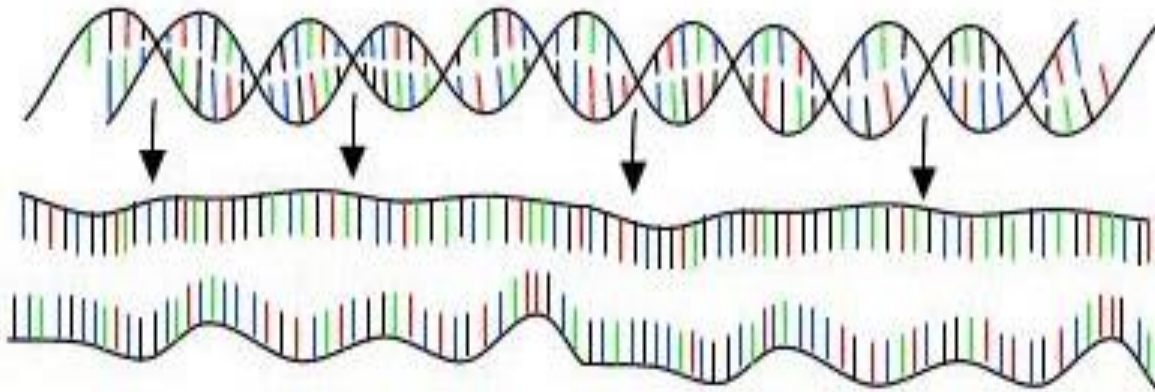
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), in vitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir. PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar;

- ❖ DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)
- ❖ Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)
- ❖ Primer Uzaması (Primer Extension)



# DNA Zincirinin Açılması (Denaturation):

- Kalıp DNA (template DNA), 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir.

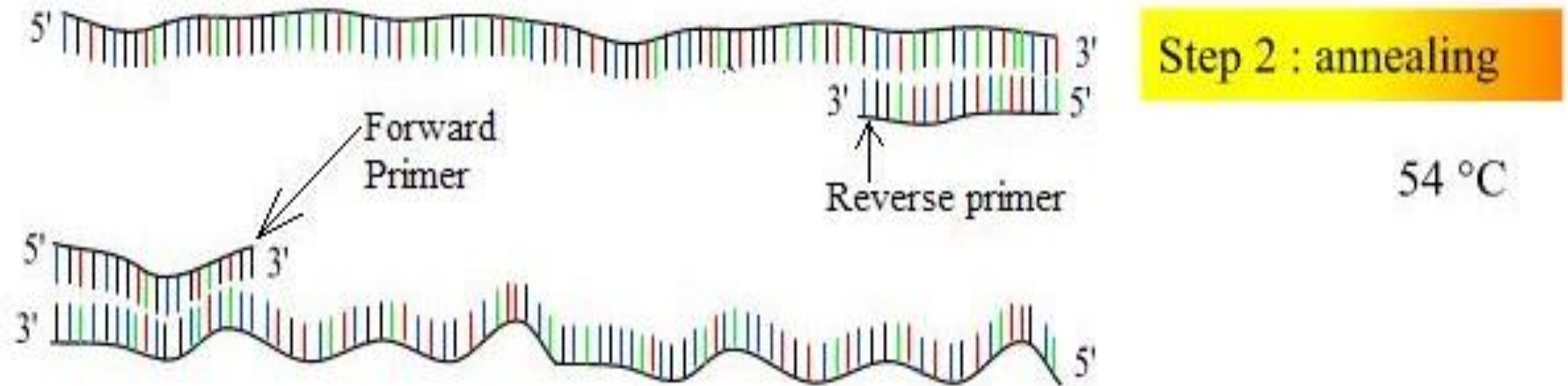


Step 1 : denaturation

94 °C

# Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing):

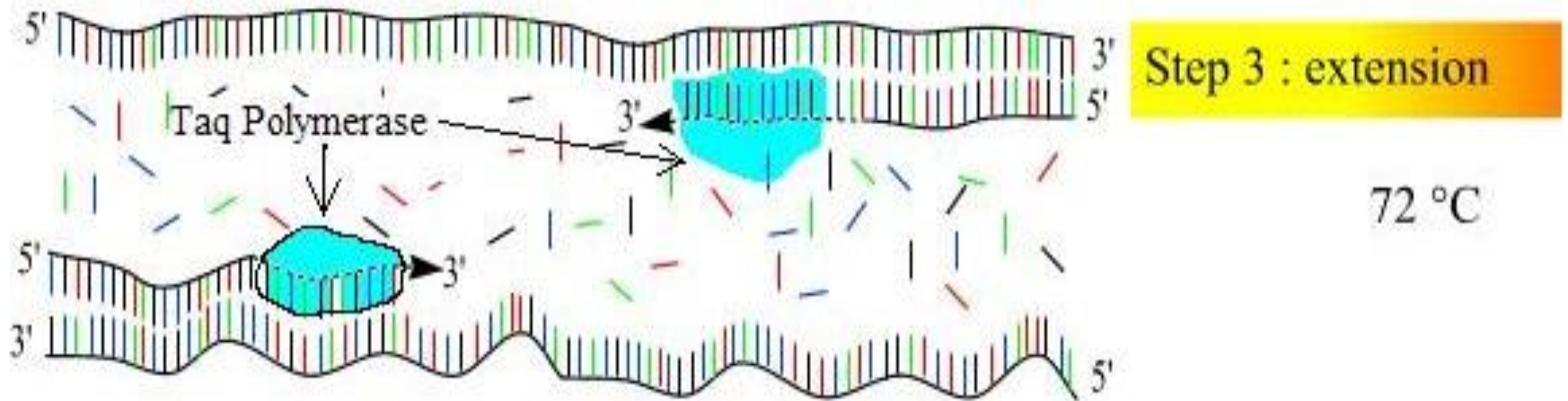
- Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir.





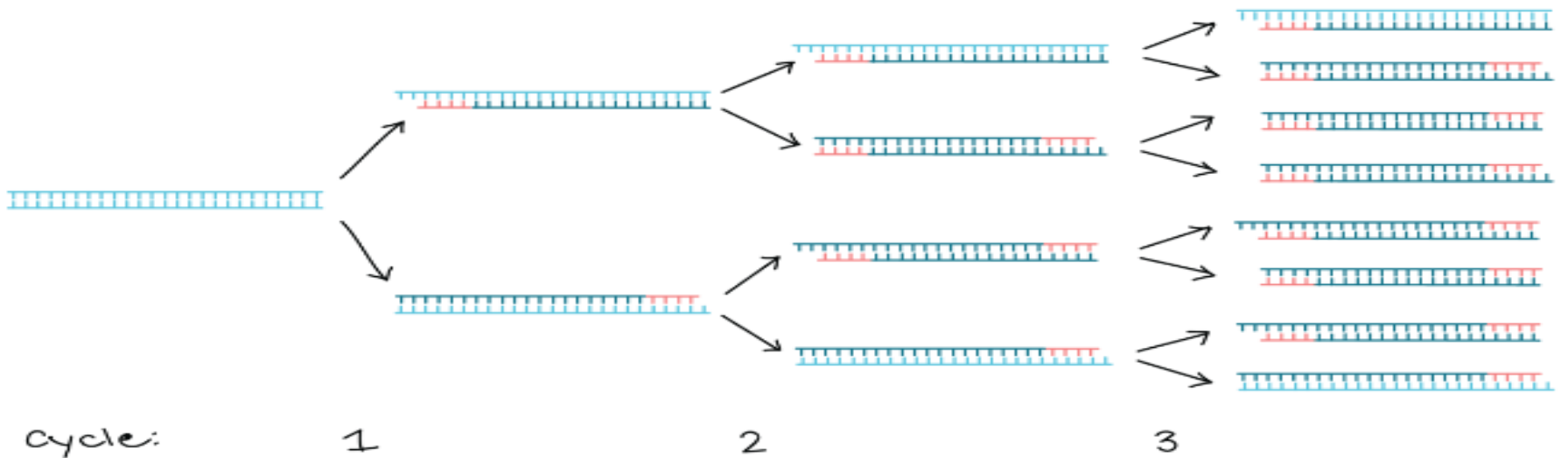
# Primer Uzaması (Primer Extension):

- DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır.



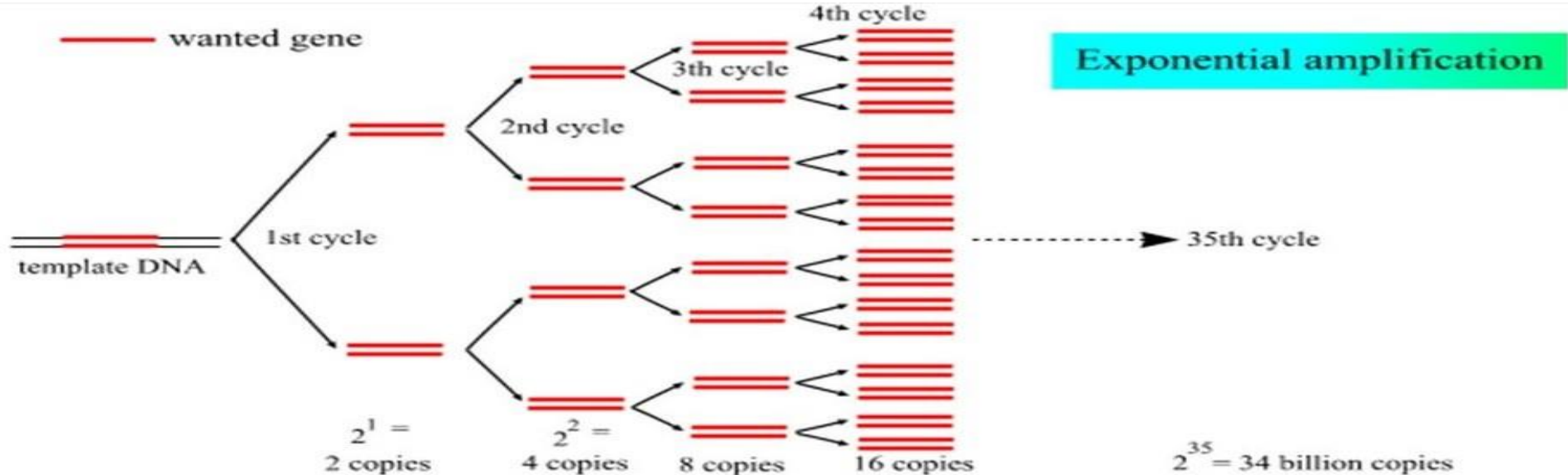
# PCR DÖNGÜSÜ

Çoğaltılmış ürün miktarı bu üç adımın tekrarlanma sayısını bağlıdır. DNA sarmalının yüksek sıcaklıklarda birbirinden ayrılmasıyla denatürasyona uğrar. Daha sonra sıcaklık düşürülür. Bu sayede primerler çoğaltılacak DNA parçası üzerindeki dizilere bağlanırlar. DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda çalışabilir ve PCR döngüsü sırasında zincirin açılması için kullanılan sıcaklığa dayanabilir. Primerlerin bağlanmasıyla sıcaklık düşürülür ve polimerizasyon tepkimesi gerçekleşmesi sağlanır. Bu polimerizasyon tepkimesi uzama evresidir. Primerler uzatılır ve primerlerin arasında kalan bölge sentezlenir. DNA zinciri tekrar denatüre edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar tekrar gerçekleşir. Bu işlemler 20 ile 50 döngü arasında yapılır. Böylece her PCR döngüsü DNA parçası üzerinde bulunan istenilen bölgenin iki katına çıkmasıyla sonuçlanır.



# PCR DÖNGÜSÜ

- PCR boyunca biriken ürünlerin boyu, iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.
- Matematiksel olarak amplifikasyon;  $(2^n - 2n)X$  ile ifade edilir.
- $n$  = döngü sayısı
- $2n$  = birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler.
- $X$  = orijinal kalıbın kopya sayısı
- Her döngü %100 verimle çalışsa 20 döngü sonunda 220 kat ürün oluşur



# PCR DÖNGÜSÜ

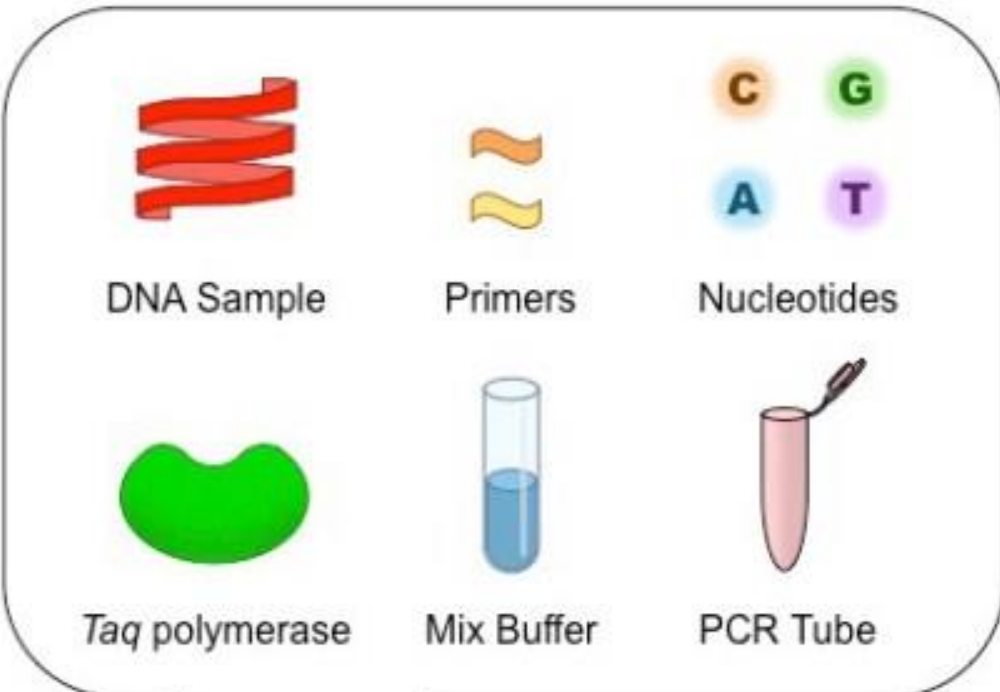
- Başlangıçtaki DNA molekülü sayısı PCR' ın kaç döngü uygulanacağını belirler. **1 – 100** kopya DNA molekülü ile başlanıyorsa **30 – 45 döngü**, **1.000 – 100.000** ile başlanıyorsa **20 – 30 döngü** yeterlidir. Bir döngü sonucunda başlangıçta  $n$  olan DNA zincir sayısı  $2n$ ' e yükselir. Döngüler arka arkaya çok kez tekrarlanırken her bir döngünün ürünü, bir sonrakinde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde istenen DNA fragmenti miktarı 2 katına çıkar.

# PCR DÖNGÜSÜ

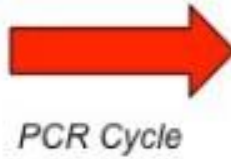
- PCR'a başlamadan önce primer dizaynı yapılmalıdır. İstlenen bölgenin çoğaltılması için o bölgeye özgü primerler yapılır. Primer boyutu 18-22 baz çifti arasındadır. Daha düşük sayıda primer üretilirse primerin özgüllüğü azalır, yükseltirse de primerin bağlanması kalıp DNA'ya bağlanması güçleşir.
- **Primerlerin annealing derecelerinin hesaplanması:**
  - **•2(A+T)+4(G+C)**
  -
- Örnek dizi: 5'-ccttaagctggtgtccaaat-3'  
2(11AT)+4(9GC)=58°C 5'-gctagcaatatttgtaagcat-3'  
2(14AT)+4(7GC)=56 °C

## PCR Components

## PCR Process (ONE Cycle)



Thermal Cycler



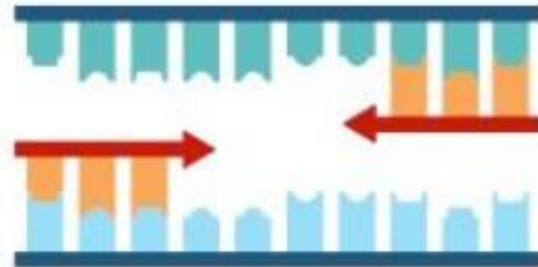
↓ 95°C - Strands separate

1. Denaturing



↓ 55°C - Primers bind template

2. Annealing



↓ 72°C - Synthesise new strand

3. Extension



# PCR DÖNGÜSÜ

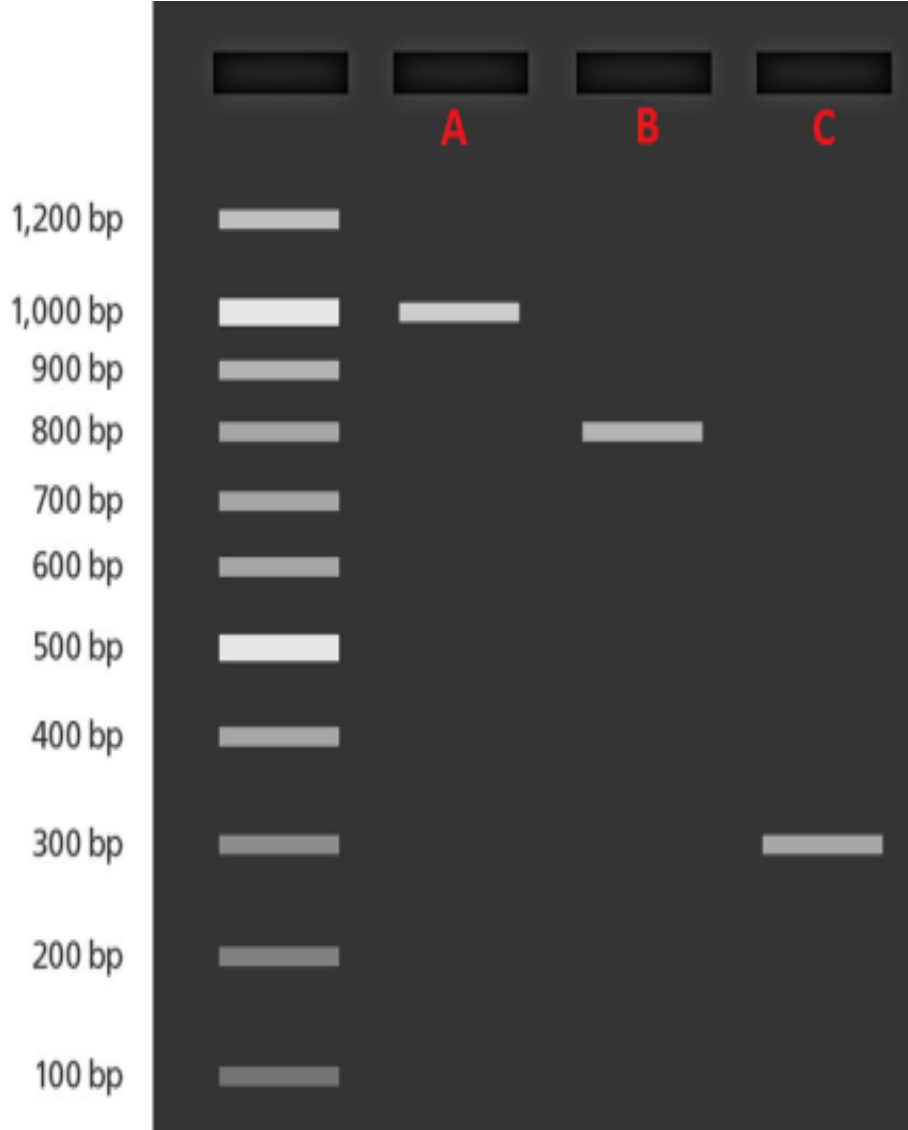
- PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır .Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir.

# PCR Kontrolü

- PCR yapıldıktan ve Jel Elektroforez ile yürütüldükten sonra ilgili bölgenin çoğalıp çoğalmadığı UV ışın ile ortaya çıkan bant boyları ile anlaşılır. Bu bant boyları çoğaltılan bölgenin boyu (bp) ile belirlenir.
- Her Jel yüklemesinde örneklerle beraber uzunluğu bilinen DNA Ladder da yürütülür. Ve elektrik akımı ile açılan DNA Ladder bantlarına göre örneklerin çoğaldığı bölge boyu tespit edilir ve buna göre PCR'ın olup olmadığı anlaşılır.



# PCR'da Karşılaşılan Sorunlar



Örnek verecek olursak ilk sırada yürüyen 1200bp DNA Ladder. Bu Ladder'a göre A örneğinin boyu 1000bp , B örneğinin boyu 800bp ve C örneğinin boyu 300 bp diye yorumlayabiliriz. Fakat Jel Elektroforez sonucu her zaman bu kadar net ve doğru bölgede olmayabilir.

# 1.Sorun: Teknik Sorunlar:

- Teknik sorunlar ile karşılaşıldığında ilk akla gelecek olan o jelde yürütülen tüm örneklerde bant görüntüsünün olup olmamasına bakılır.
- Eğer hiçbir kuyuda yani örnekte bağlanma olmadıysa 3 durum akla gelir.
- 1- Jel tamponu hazırlanırken floresan boya konulmamış yada uzun süre gün ışığına maruz kalmış etkisini yitirmiştir.
- 2- Aynı PCR cihazında çalışılmış ise örnekler; PCR cihazında çalışma esnasında cihaz yada PCR programı kaynaklı sorunlar yaşanmış olabilir.
- 3- Pcr mixi hazırlanırken DNA, primerler vb. gibi PCR ürünlerinden bir veya bir kaç reaksiyona konulmayı unutulmuş ya da bozulmuş, degrede olmuş vb. olabilir.

# 2.Sorun: Exon Delesyonları:

- Jel elektroforez ile yürütülme sonrasında gene ait exonlarda bant olmaması ya da bazı exon veya exonlarda bant olmaması durumunda;
- İlk akla gelmesi gereken exonlara ait primerlerin bozulmuş olması ya da tüp içerisine konulmayı unutulmuş olmasıdır. Bu durumun en basit teyidi için o çalışmalardan sonraki çalışılmış aynı genin aynı exonlarına ait bant olup olmamasına bakılır. Eğer ki sonraki çalışmalarda da o exonlarda bant yok ise muhtemelen primer kaynaklı bir bozulma söz konusu olabilir. Fakat sonraki çalışmalarda aynı genin aynı exonlarında bant var ise o zaman ilk çalışmadaki exon yada exonlarda delesyon şüphesi akla gelmelidir. Bunun teyidi için ise o exonlarda çalıştığı bilinen bir pozitif kontrol ile pcr + jel elektroforez yüklemesi yapılır.

# Exon Delesyonları

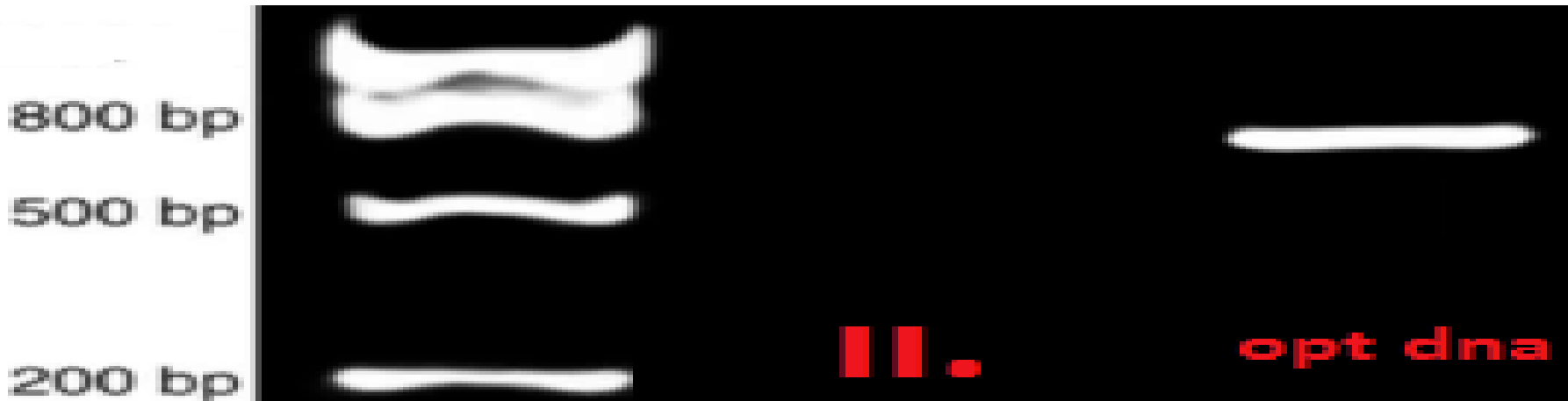
Yukarıdaki jel elektroforez görüntüsünde 6 exonluk bir gene ait görüntü verilmektedir. II. Exonda bant olmaması durumuna bir örnektir. Bu durumda aynı gene ait II. Exon çalıştığı bilinen bir dna (optimizasyon dnası) ile pcr + jel elektroforez yapılır.



# Exon Delesyonları

Çalıştığı bilinen DNA ile yapılan PCR da bant var fakat tekrar edilen çalışmanın genine ait aynı exonda bant yok ise o exon yada exonlar için delesyon var denilebilir.

PCR küçük bir kontaminasyondan bile etkilenip yanlış sonuçlar doğurabileceği için delesyon şüphesi pcr ve analiz yapanların aklından çıkmaması gereken bir durumdur. Delesyon olan bir bölge ile farklı pcr yöntemleri denenerek çoğaltıp delesyon yokmuş gibi sonuç vermek sık rastlanabilecek bir hatadır.



# 3.sorun: Zayıf Bantlar:

Zayıf bant genelde pcr protokolündeki bir yanlışlığın göstergesidir. Böyle durumlarda şunlar uygulanabilir;

1- Genelde bu gibi durumlarda ilk önce yapılması gereken PCR anaeling (bağlanma) ısısı ve süresini değiştirmektir. Genelde 60°C olan anaeling sıcaklığı 50°C ya da 70°C kadar kademeli olarak düşürülüp arttırılabilir. Süresi ise yaklaşık 2.5 dk kadar yükseltilebilir.

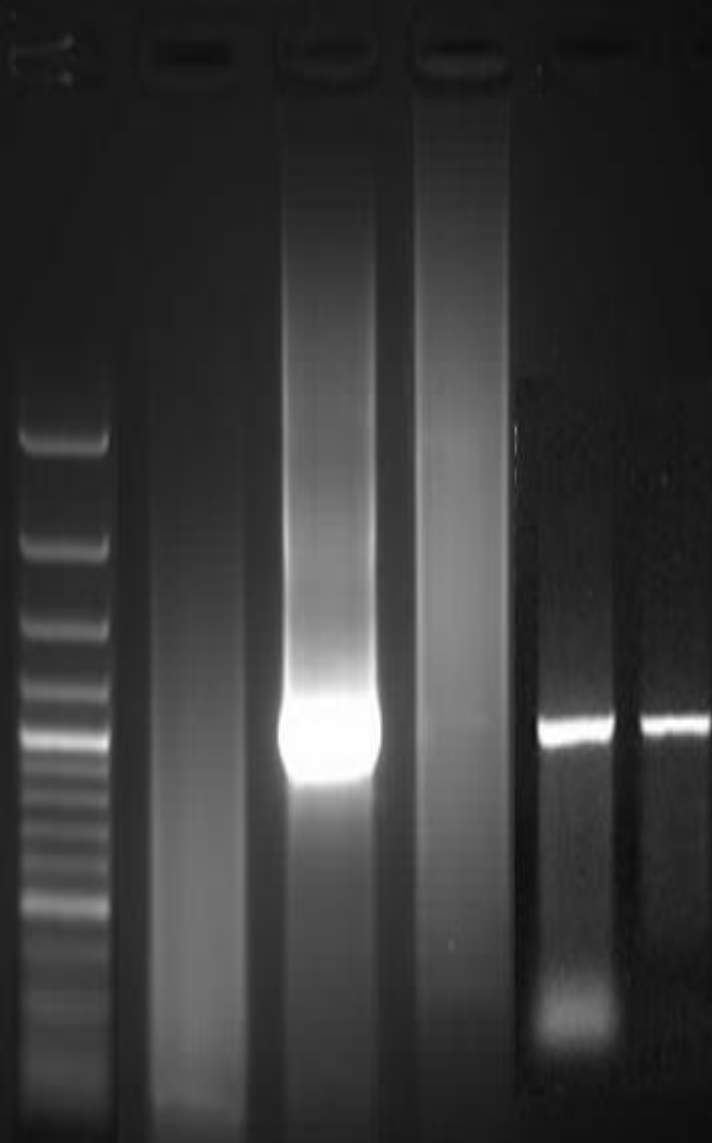
Kademeli olarak düşürülüp veya artırılan sıcaklıktaki yapılan PCR işlemine gradient PCR denir. Örnek verecek olursak sıcaklığı 50 °C ile 60 °C arasında ayarlanan PCR cihazının sıcaklığı bilinen kuyularına, 4 tane aynı örnek (aynı exon, aynı enzim, aynı mix) yerleştirilir ve her sıcaklıktaki çalışma kalitesi jel elektroforez ile gözlenir.



# 3.sorun: Zayıf Bantlar:

- **2-** PCR cycle (döngü) miktarını da artırmak çözüm olabilir. Fazla miktarda cycle fazla ürün bağlanmasını sağlar. Fakat yanlış bölgeleri de çoğaltabilir.
- **3-** PCR mixi içerisindeki DNA, enzim ya da primer miktarları artırılarak daha sağlıklı bir PCR ürünü beklenir.
- **4-** Kullanılan mix içerisine  $MgCl_2$  ilave edilerek daha sağlıklı bir PCR ürünü elde edilebilir. Düşük  $MgCl_2$  ürün oluşumunu azaltırken, yüksek  $MgCl_2$  spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olur. (Tavsiye edilen konsantrasyon aralığı 0.5-2.5 mM/reaksiyon  $MgCl_2$ ) Yine fazla dNTP  $MgCl_2$  konsantrasyonunu düşüreceğini de unutmamalıyız.

## 4.sorun: Artefaktüel ürünler/Primer dimer/Smear



Jel elektroforezindeki bu görüntü bize bağlanması gereken bölge ile birlikte başka bölgelerinde bağlandığını gösterir.



- Her ne kadar istediğimiz boyda bant elde etmiş olsak bile bir smear'li PCR sanger sekanslamada asla çalışmazken yeni nesil sekanslamada da çalışması çok zor bir ihtimaldir.
- **Bu durumlarda yapılması gerekenler şunlardır;**
- **1-** PCR cihazındaki anaeling sıcaklığı ve süresini değiştirmek.
- **2-** Cycle (döngü) miktarını azaltmak gerekir. Fazla miktarda döngü istenmeyen ürün elde ettirir.
- Birden fazla farklı enzimler ile de PCR yapmak istenmeyen bantların oluşumunu engelleyecektir. Ayrıca primer tasarımları, dna kaliteleri, primer saklama koşulları da pcr daki sorunların kaynağını oluşturabilmektedir.

# PCR OPTİMİZASYONU

PCR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PCR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PCR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuarda yeniden ayarlanması gerekmektedir. Eğer PCR şartları yeni PCR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir.

## **Bu problemler;**

- ❖ PCR'dan beklenen ürün ya az alınır yada hiç alınmaz.
- ❖ Primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
- ❖ Primerler yanlış şekilde uzayabilir.
- ❖ Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatır.
- ❖ Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.

# PCR Çalışma Şartlarını Etkileyen Faktörler:

- 1. Enzim Konsantrasyonu
- 2. Magnezyum Konsantrasyonu
- 3. Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotide Triphosphates=dNTPs)
- 4. Diğer Reaksiyon Unsurları
- 5. DNA Zincirinin Açılması İçin Gerekli Zaman ve Sıcaklık
- 6. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması
- 7. Primer Uzunluğu, Konsantrasyonu ve Yapısı
- 8. Primer uzaması
- 9. Devir sayısı

# 1. Enzim Konsantrasyonu

- Diğer PCR şartları optimum seviyede olduğu zaman 100 µl reaksiyon için önerilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2.5 ünedir. Fakat enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilir. **Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur.** Enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilir.

# 2. Magnezyum Konsantrasyonu

- PCR uygulamalarında magnezyum (Mg) iyon konsantrasyonunu ayarlamak çok önemlidir. Çünkü **Mg konsantrasyonu**;
  - ❖ primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını,
  - ❖ kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını,
  - ❖ PCR sonucunda elde edilen DNA kalitesini,
  - ❖ primer-dimer bağ oluşumlarını,
  - ❖ enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir.

Ayrıca, Taq DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir.

# 3. Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotide Triphosphates=dNTPs)

- Her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) konsantrasyonu 20- 200  $\mu$ M arasında olduğunda genellikle PCR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmektedir. Bu dört bazın konsantrasyon içerisindeki oranı eşit olmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak – 20°C de saklanmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin (misincorporation) hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden mümkün olduğu kadar düşük konsantrasyonda dNTP'leri kullanmak PCR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır.

# 4. Diğer Reaksiyon Unsurları

- PCR uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8) kullanılır. Bu tampon çözeltinin 20°C'de pH'sı 6.8 ile 7.8 arasında değişir. PCR karışımı içerisine 50 mM KCl ilave edilirse primer bağlanmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM'ın üzerindeki KCl veya 50 mM NaCl Taq DNA polimeraz aktivitesini engeller. Ayrıca, PCR solüsyonuna Jelatin (gelatin), bovine serum albumin veya Tween 20 deterjanı eklenirse enzimin daha iyi çalışmasına yardımcı olurlar. Fakat bu maddeler eklenmeden de PCR protokolleri çok iyi bir şekilde çalışabilmektedir.

# 5. DNA Zincirinin Açılması İçin Gerekli Zaman ve Sıcaklık

- PCR uygulamalarında sistemin çalışmamasının en önemli sebeplerinden birisi kalıp DNA zincirinin veya üretilen DNA parçacığının yeterince açılmamasıdır.
- Genel olarak DNA moleküllerinin 95°Cde 2 dakika tutulması zincirin açılması için yeterli olmaktadır. Fakat GC bazlarınca zengin kalıp DNA zincirlerinde bu süre ve sıcaklığın fazla olması istenmektedir.



# 6. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması

- Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması için gerekli sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonu, elde edilecek DNA'nın uzunluğu ve kullanılan bazların kompozisyonuna göre değişir. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması 37- 65°C sıcaklıklarda gerçekleşir. Primerler açılan DNA'ya bağlanması sırasında sıcaklığın artırılması DNA seçiciliğini artırmaktadır. Dolayısıyla primerlerin yanlış yerlere bağlanması ve hatalı DNA dizilerinin elde edilmesi önlenmiş olmaktadır. Özellikle PCR işleminin ilk birkaç devrinde sıcaklığın artırılması PCR uygulamasının hassasiyetini çok yükseltmekte ve spesifik olarak beklenen DNA parçacıkları sentezlenmektedir. Sıcaklığın düşürülmesi primerlerin hatalı şekilde uzamasına ve yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmalarına sebep olmaktadır.

# 7.Primer Uzunluğu, Konsantrasyonu ve Yapısı

- Primer konsantrasyonunun 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  arasında olması sistemin iyi çalışmasını sağlamaktadır. Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ve spesifik olmayan DNA bantlarının üretilmesine sebep olur. Ayrıca primer-dimer oluşumunu teşvik ederek elde edilecek ürünün (DNA) az olmasına sebep olmaktadır. Tipik primer uzunluğu 16-30 baz arasında değişmekte fakat genel olarak 18-24 baza (nükleotid) sahip primerler eğer primer yapışma sıcaklığı ( $T_m$ ) da iyi ayarlanmış olursa çok spesifik ürün elde edilebilmektedir. Ancak daha kısa (14 bazdan aşağı) primerlerde bazı özel amaçlar için kullanılmaktadır .Primerlerin baz dizilişinde Guanin, Citosin (GC) miktarı ve primerlerin yapışması için gerekli sıcaklık miktarı ( $T_m$ ) arasında çok iyi bir ilişki kurmak gerekir. Bu denge sağlanamadığı taktirde PCR uygulamalarından iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Bu bakımdan primer dizilerinde GC bazlarının toplam oranı % 50 veya daha yukarı olması istenmektedir. Örneğin bir primerin baz dizisinde GC oranı % 50 ve  $T_m$  değerı 56-62°C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenir. Primerlerin açılan DNA kalıplarına hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için yapışma sıcaklığının iyi hesaplanması gerekmektedir. Primerlerin yapışma sıcaklığını hesaplamak için bir formül geliştirilmiştir. Bu formül  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  şeklinde ifade edilmiştir. Burada  $T_m$  yapışma sıcaklığını, G,C,A ve T ise nükleotid bazlarını ifade etmektedir. Primerlerin 3' uçlarındaki baz dizilişi, primerin yanlış veya doğru yere bağlanmasını belirlemektedir. Eğer aşağı ve yukarı yönlü (upstream ve downstream) primerlerin karşılıklı olarak 3' uçlarında birbirlerine bağlanabilecek baz dizilişi (complementarity) mevcut olur ise bu durum istenmeyen primerdimer oluşumlarına sebep olmaktadır .

# 8. Primer uzaması

- Primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılması için gerekli zaman, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA parçasının uzunluğu, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. **Genel olarak primer uzatılma işlemi 72°Cde yapılmaktadır. Çünkü bu sıcaklık Taq DNA polimeraz enziminin iyi çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır.** Primerlerin uzatılması için gerekli süre ise baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir.

# 9. Devir sayısı:

- PCR'in çalışma şartları iyi ayarlandığı takdirde 25-40 devir sayısı yeterli olmaktadır. Devir sayısı çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkilidir. Devir sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına, devir sayısının az olması üretilen DNA miktarının az olmasına sebep olmaktadır.

# PCR METOTLARI

- PCR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojide çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

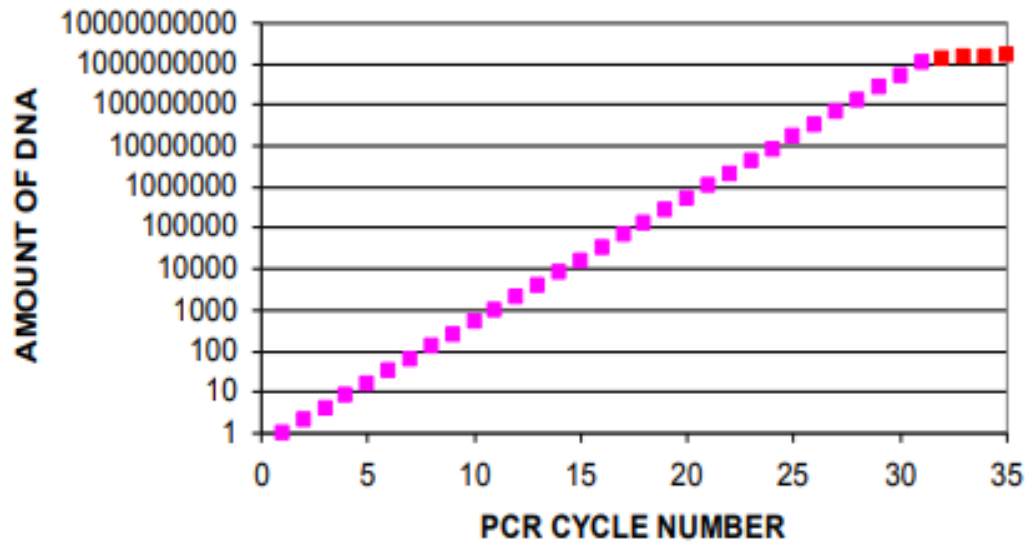
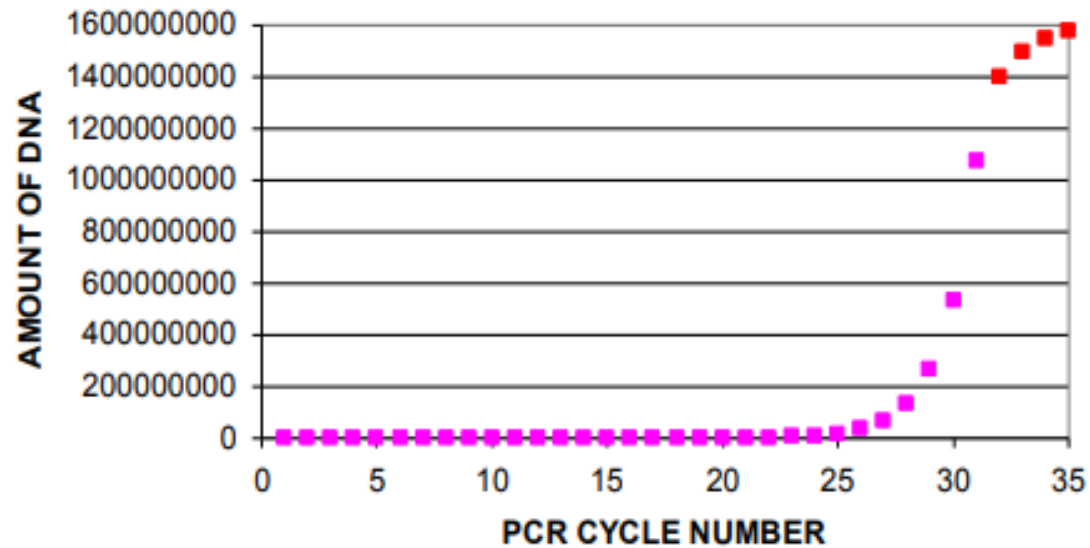
## **Çoğaltılması İstenen DNA Dizisinin Bilindiği Durumlarda Kullanılan PCR Metotları:**

- Bu tip PCR metotlarında çoğaltılması hedeflenen DNA dizisinin sekans yapısı bilimektedir. Oligonucleotide primer çifti kullanılarak çift sarmal DNA dizileri Taq DNA polimeraz enzimi tarafından 5'→3' yönünde okunmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

# PCR Metotları

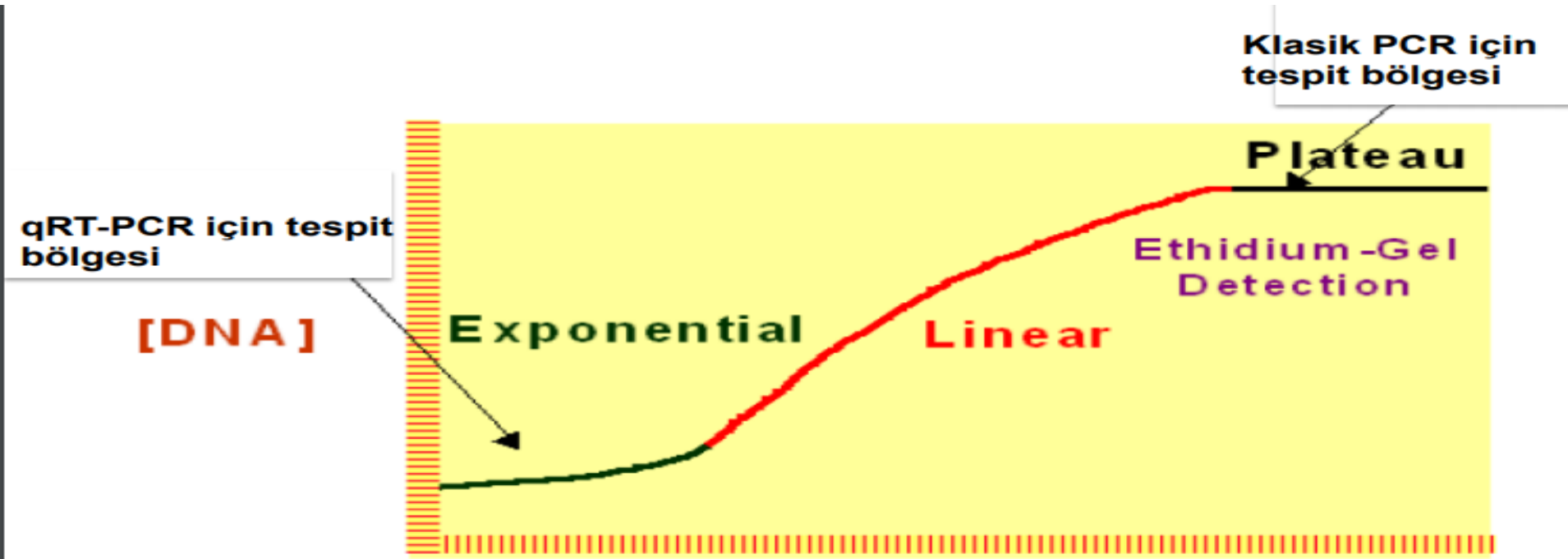
- 1. Standart PCR
- 2. Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)
- 3. Katlı PCR (Multiplex PCR)
- 4. Antiserumla Sabitleme PCR (Immunocapture PCR)
- 5. İç içe PCR (Nested PCR)
- 6. Renkli PCR (Colorimetric PCR)
- 7. Damlatma PCR (Spot PCR)
- 8. Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR)
- 9. Canlı Hücre Belirleyen PCR (Bio PCR)

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



# Neden RT-PCR?

- ❖ mRNA ifadeleri arasındaki farkların tayini
- ❖ Çok az miktarda örnek sağlanabilmesi -Lazer yakalama yöntemi (laser capture microdissection) -Az miktarda doku -Primer hücreler -Değerli materyal (kanser dokusu, hasta doku)

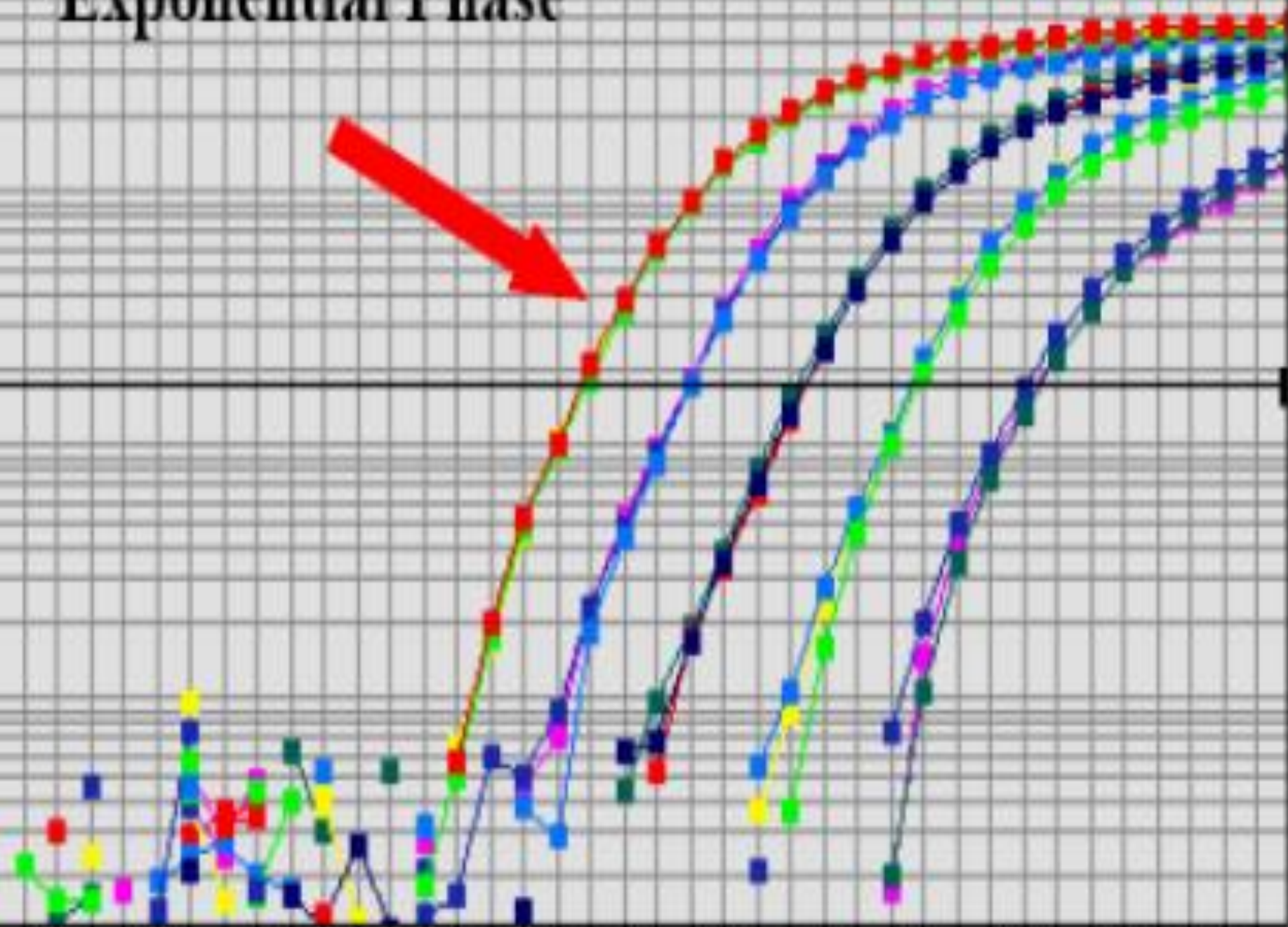




# RT-PCR

- Eş zamanlı RT-PCR, kalıp DNA'nın başlangıç miktarını spesifik, hassas ve tekrarlanabilir şekilde tespit eder, tüm bunlardan dolayı son-noktada DNA miktarı saptanabilen klasik PCR'ye göre daha fazla tercih edilmektedir.
- Her bir döngüde açığa çıkan floresan miktarını kaydedilir ve PCR ürünündeki ilk anlamlı artışın gözleendiği ekspanensiyal faz görüntülenir. PCR ürününün ekspanensiyal artış gösterdiği ilk döngü başlangıç materyalinin miktarı ile doğru orantılıdır.
- Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri ekspanensiyal faza o kadar erken girecektir.
- Eş zamanlı PCR'nin dinamik dağılımı  $10^7$ -kat kadar olabilirken klasik PCR'de bu dağılım 1000-kat civarında seyretmektedir.

# Exponential Phase



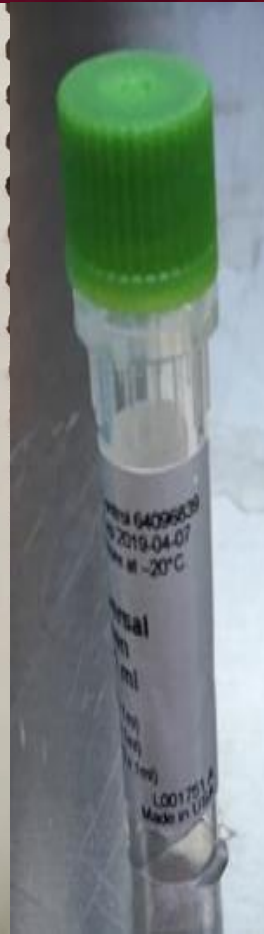
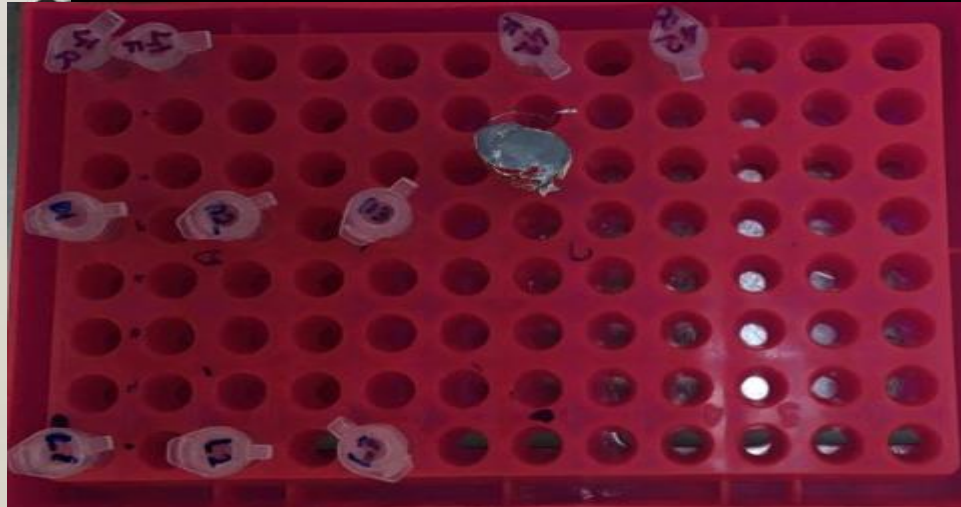
1230 + 2 = 14x

41 pl A	L1	L1	L2	L2	L3	L3	D1	D1
41 pl B	D2	D2	D3	D3	/	/	/	/
42 pl C	L1	L1	L2	L2	L3	L3	D1	D1
42 pl D	D2	D2	D3	D3	/	/	/	/

Mix 41 (14x)

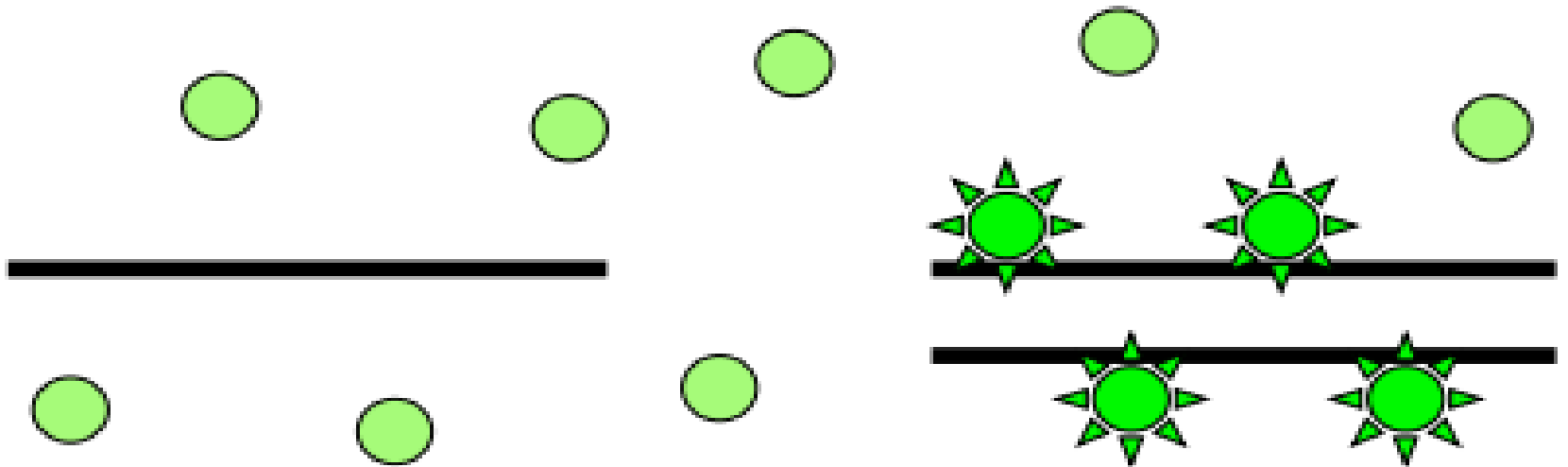
Mix 42 (14x)

iTag	70 μl	70 μl	<u>1x</u>
Fp	14 μl	14 μl	7' μl
Rp	14 μl	14 μl	depit
+cdna	3 μl	3 μl	



# SYBR GREEN

- SYBR green çift sarmal DNA'ya bağlanabilen ancak tek zincirli DNA'ya bağlanamayan bir boyadır. Eş zamanlı PCR reaksiyonlarında ucuzluğu ve hassasiyeti sebebiyle çok tercih edilen bir boyadır. Çift sarmal DNA'ya bağlandığı zaman floresan ışımaya başlar ve bu ışımaya etidyum bromürden çok daha güçlüdür



# • Spesifik değil

- SYBR green herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlanabilir (PCR ürünü, primer dimerleri, spesifik olmayan PCR ürünü)
- DNA zincirlerinin arasına girmesi sadece yapısaldır, sekansa bağımlı değildir.
- • **Kantifikasyon ve karakterizasyon erime eğrileri ile saptanabilir.**
- • **Primer dimerlerinin engellenebilmesi için dikkatli primer tasarımı yapılmalıdır.**

# Taqman ® probes

- Spesifik
- Sadece spesifik hedeflere bağlanır.
- Öncelikle Taqman probalar bağlanır, sonra PCR evrelerinden biri olan bağlanma (annealing) evresinde primerler bağlanır ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Taq polimerazın 5'Exonucleaz aktivitesi sayesinde proba bağlı florofor kesilir ve floresan açığa çıkar.
- En yüksek sinyali veren prob sistemidir.
- Kantifikasyon ve SNP tespiti yapılabilir.
- Tasarlaması PrimerExpress™ ve BeaconDesigner gibi hazır bilgisayar programları ile çok kolaydır.

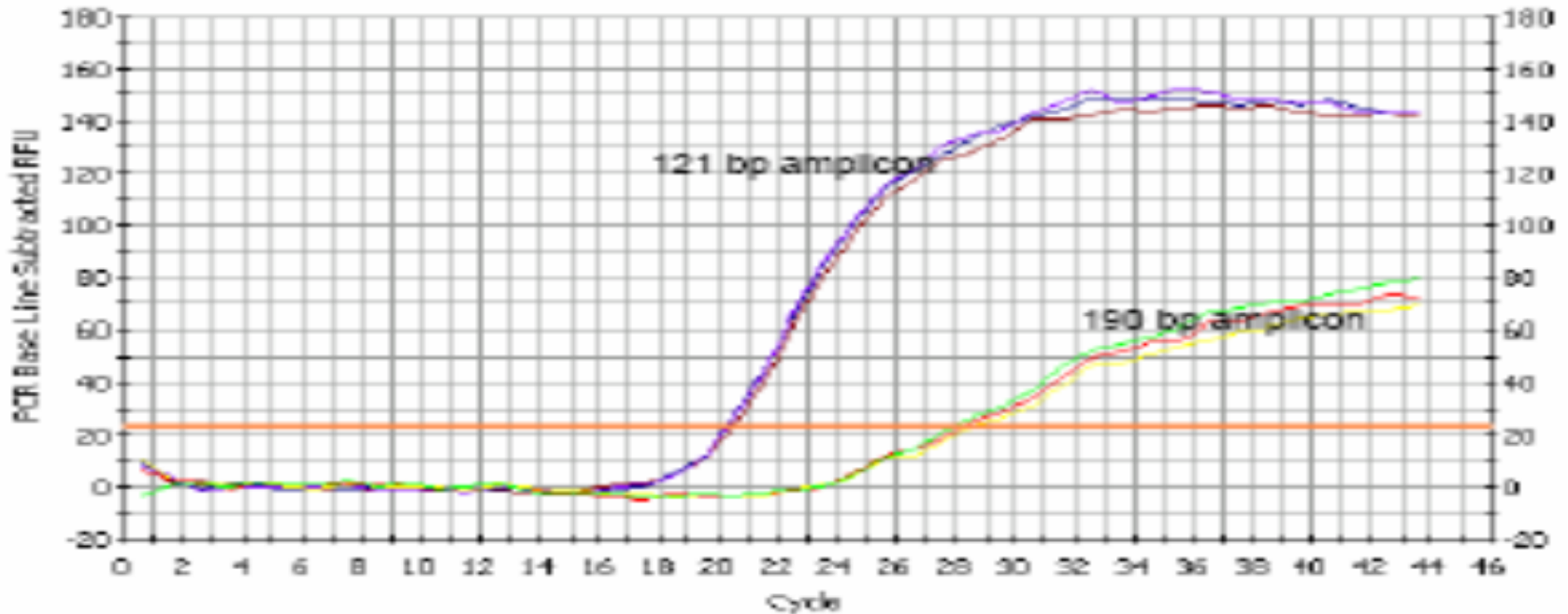
# Eş Zamanlı PCR'de Önemli Noktalar

- **1- Primer Tasarımı**
- • **Spesifik**
- • **Yüksek verimli**
- • **Primer dimer olmamalı**
- • **DNA kontaminasyonunu bertaraf edebilecek primerler tasarlanmalı.**
  - exon/exon sınırlarından
  - Araya uzun bir intron koyarak
- **Primer Tasarımı Verimlilik Farkını Yaratır !**

# 2- Çoğalma verimi

- SYBR Green kullanılarak yapılan eş zamanlı PCR'de en yüksek verimin elde edilmesi için hedef ürün uzunluğu 100–200 bç civarında olmalıdır.

- Comparison two primer-probe sets 18S rRNA





CYCLE	AMOUNT OF DNA 100% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 90% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 80% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1.073.741.824	230.466.618	45.517.160	8.193.466

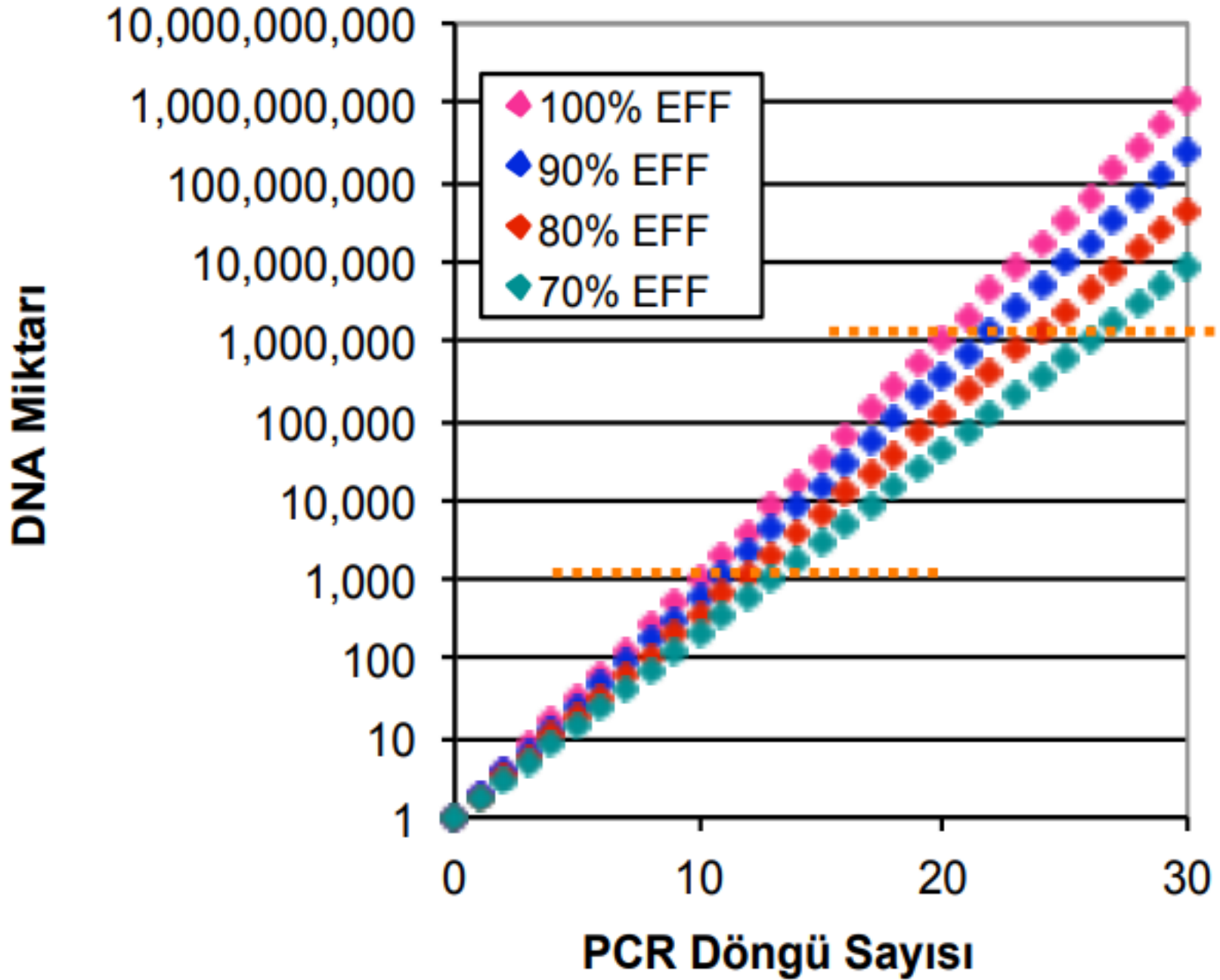
1 döngü sonunda

100% = 2.00x

90% = 1.90x

80% = 1.80x

70% = 1.70x

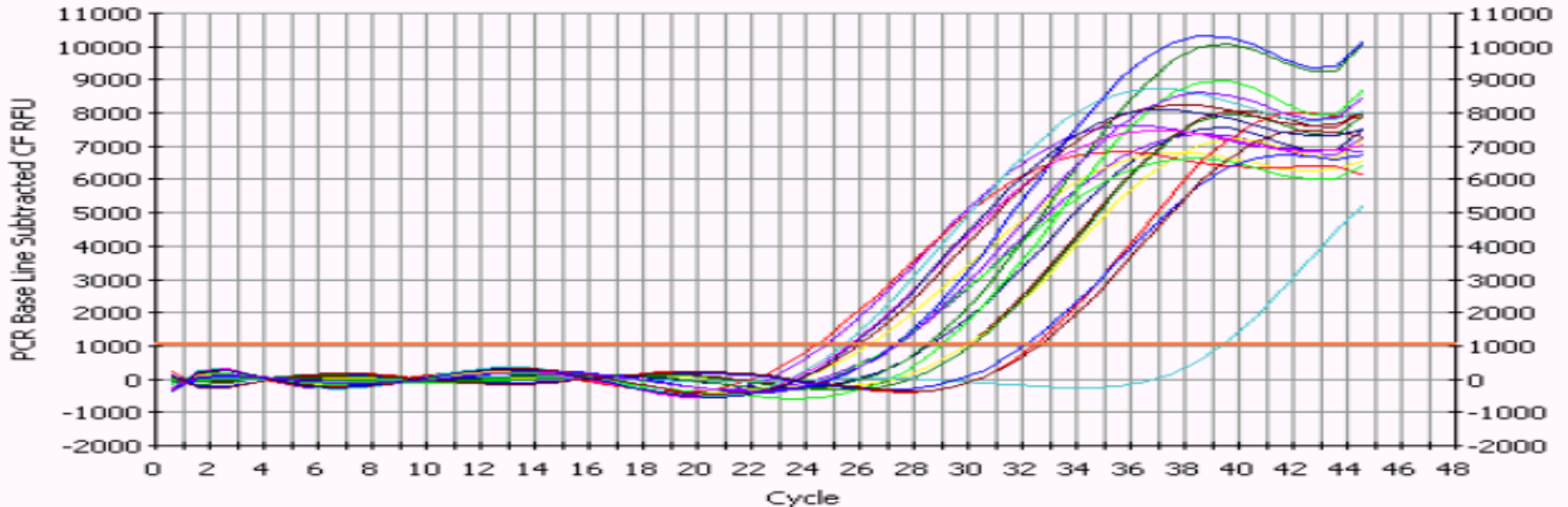


# 3- Referans Gen Seçimi (GAPDH, ACTB)

- **Normalizasyon İçin Doğru Referans Gen Seçilmeli!**
- •Referans gen araştırılan dokularda ya da hücrelerde değişiklik göstermemeli (kararlılık).
- •En stabil olan minimum sayıda gen kullanılmalı.
- •Kullanılan referans gen sayısı birden fazla ise ortalama değer almak yerine geometrik ortalama değer kullanılmalıdır.

# Ct (Treshold Cycle) ya da Cp (Crossing Point) Nedir ?

- Floresan değerlerinin eşik değerini geğtiği noktaya eşik döngüsü (Ct, Cp) denir.
- Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-linear fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır.
- 40 döngünün üzerindeki bir Ct değeri çoğalma olarak adlandırılmaz ve hesaplara katılamaz.

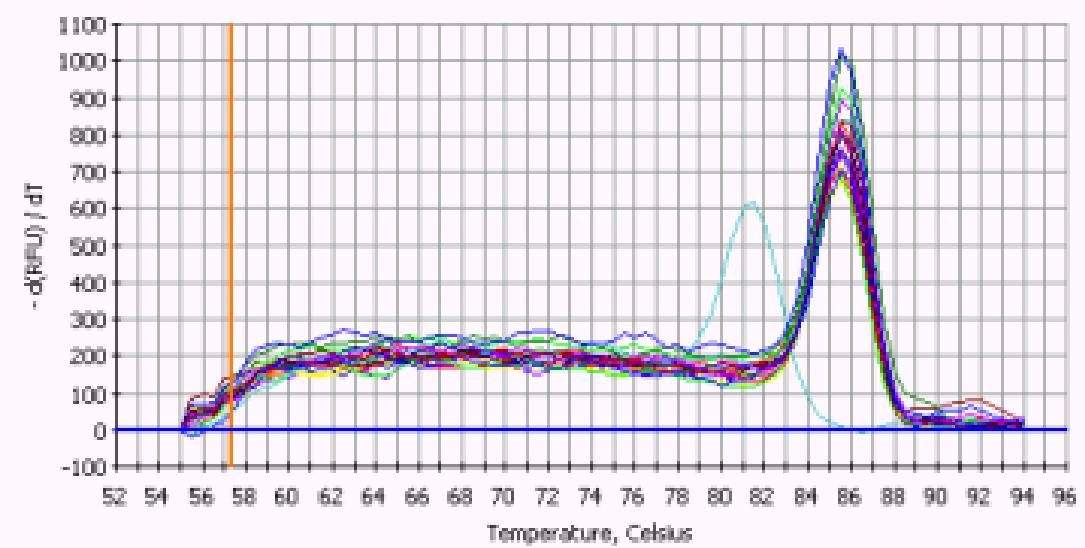
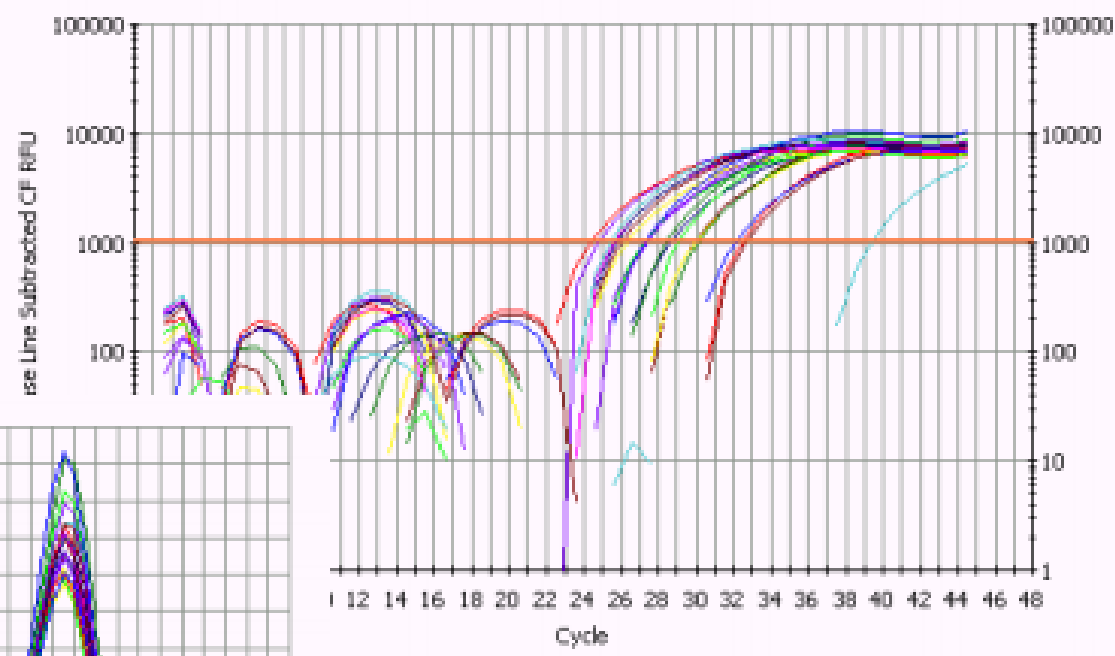
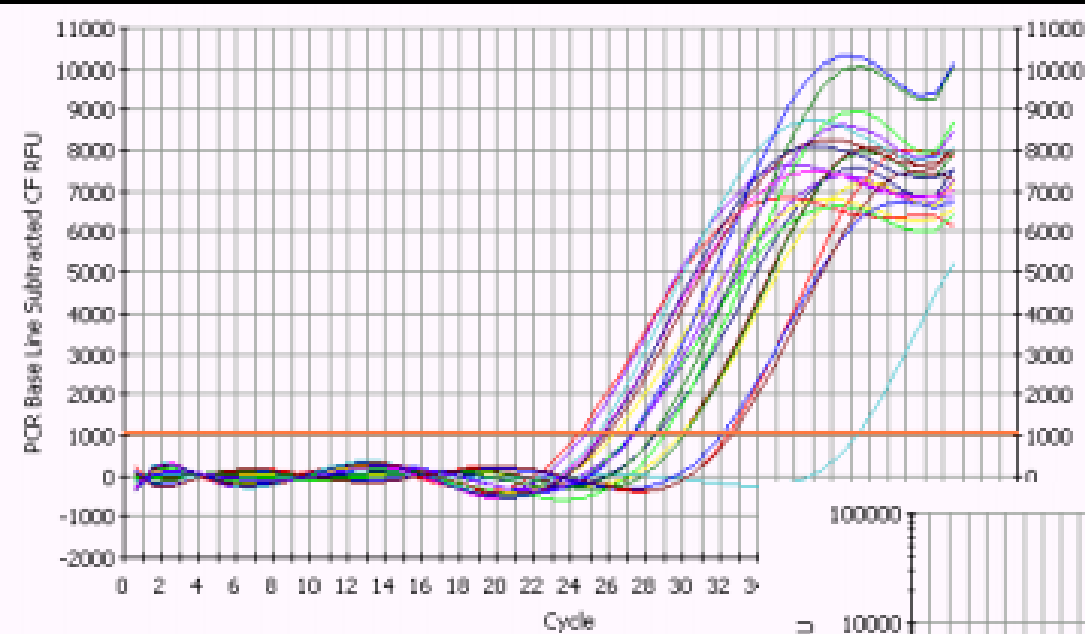


# Ct (Treshold Cycle) ya da Cp (Crossing Point) Nedir ?

Bir primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir.

Kontaminasyon, spesifik olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler.

Eş zamanlı PCR ile ürünleri agaroz jelde koşturmadan, erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür.



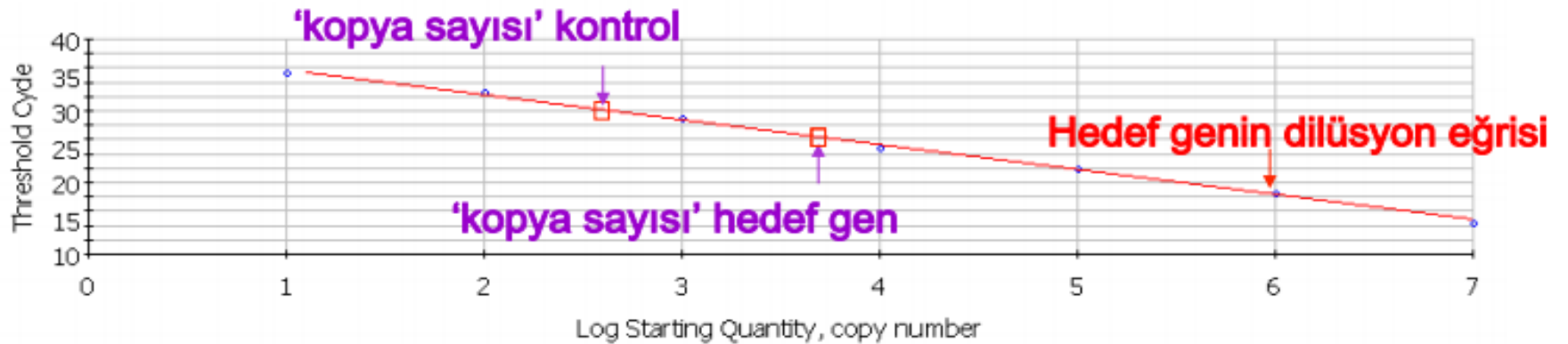
# mRNA seviyesinin qRT-PCR ile ölçümü

- • STANDART EĞRİ METODU
- • Delta-Delta CT METODU (yaklaşım metodu)
- • PFAFFL METOD

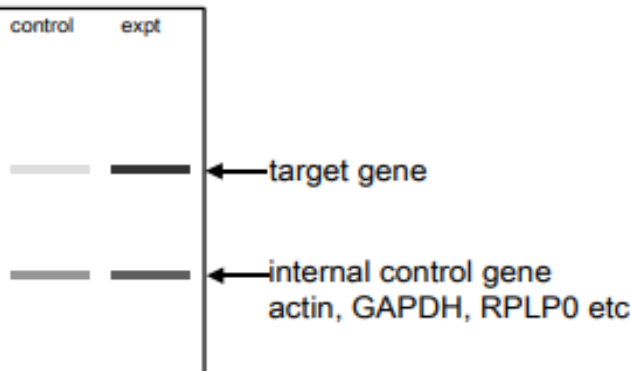
# Standart Eğri Metodu

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns  
● Standards



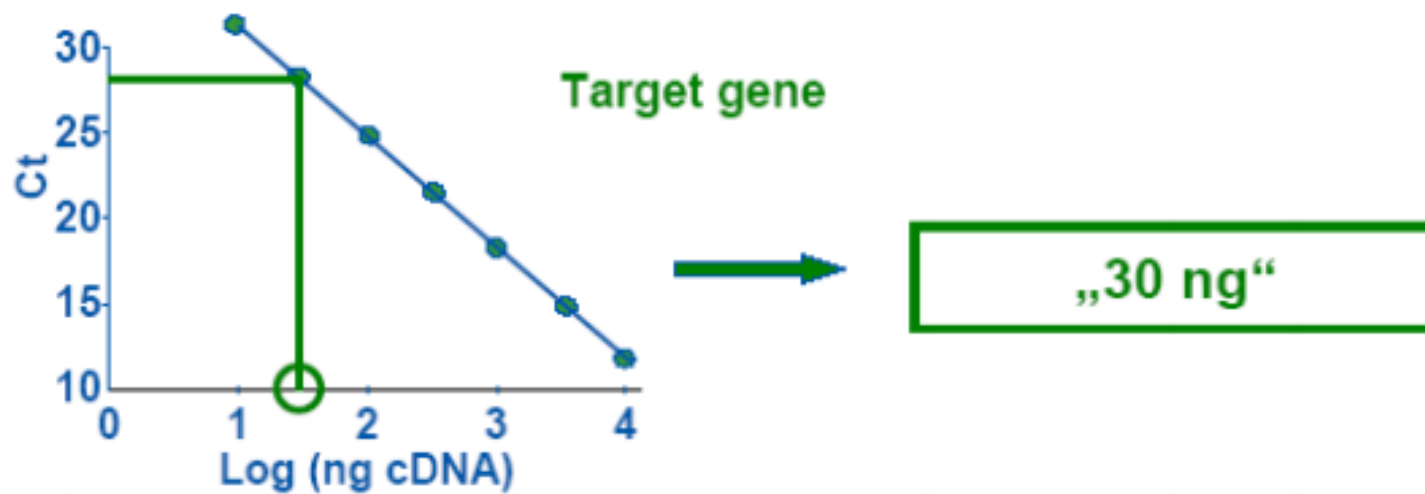
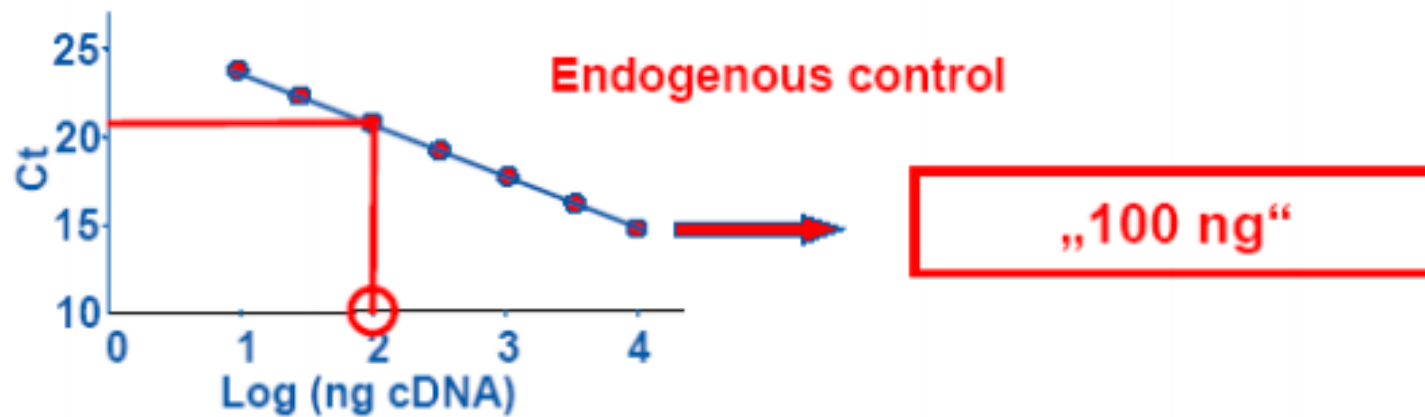
## NORTHERN



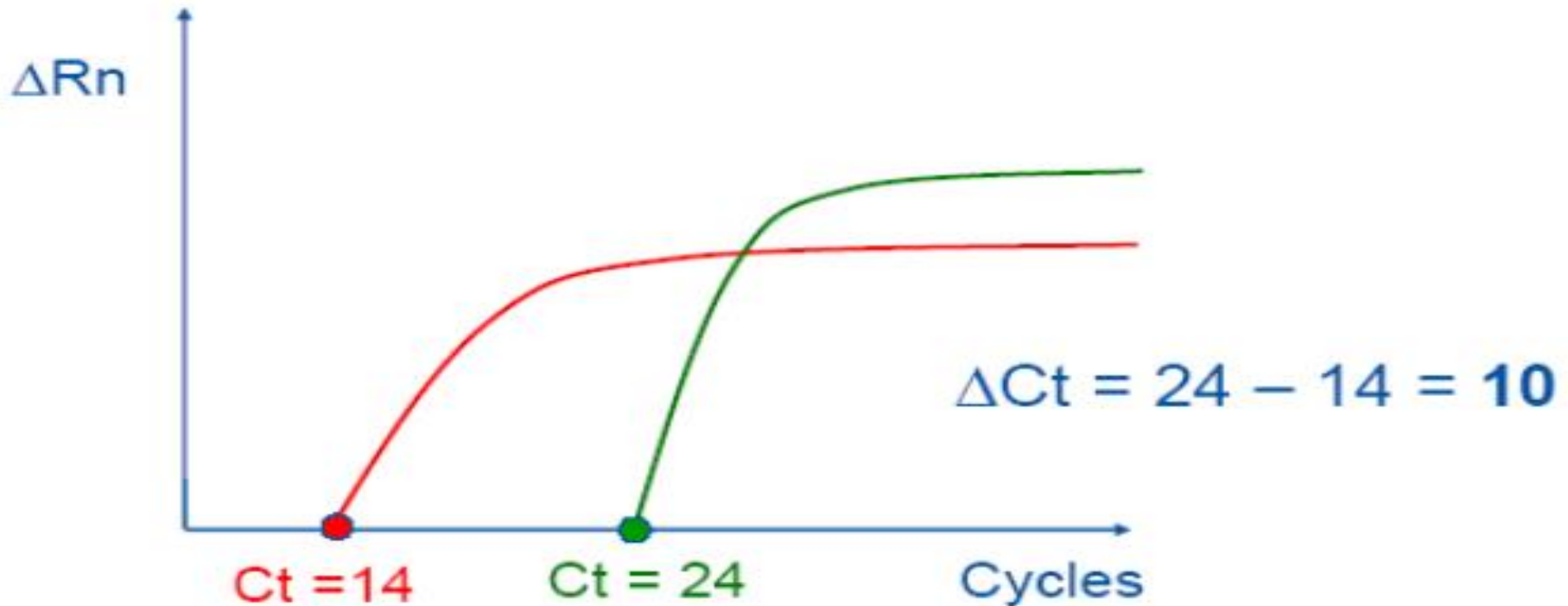
Hedef gendeki kat-değişim=  
Deney örneğinin kopya sayısı  
Kontrol kopya sayısı

Ratio experimental/control = fold change in target gene  
fold change in reference gene

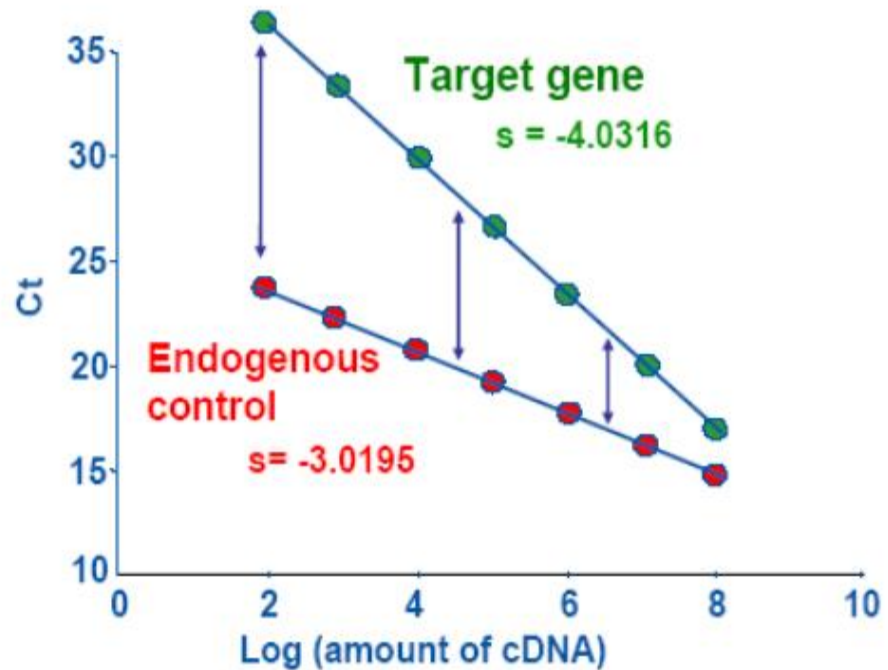
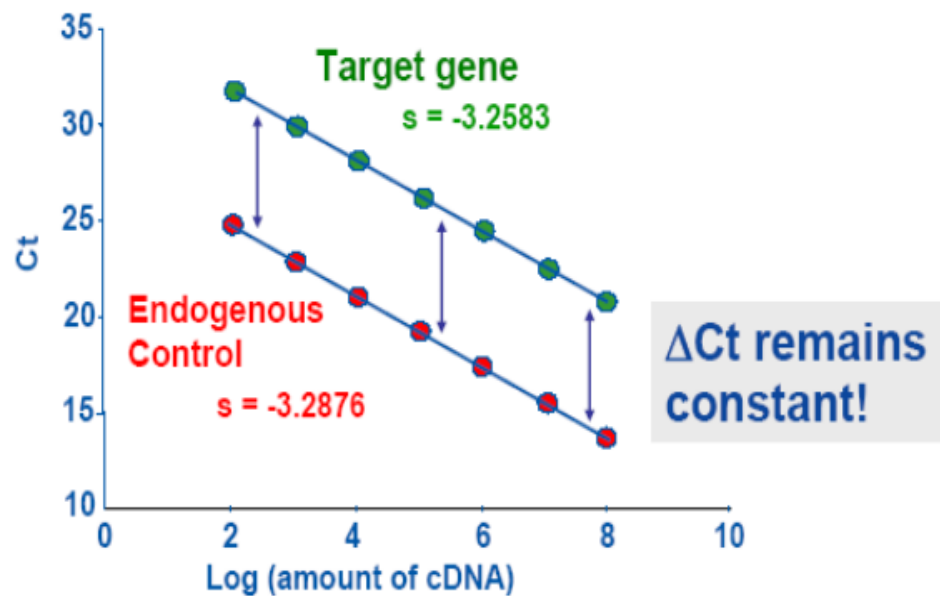




# 2- Kıyaslamalı Ct Metodu



- Endogenous control
- Target gene



## Verimlilik (Efficiency) Metodu

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}$$

# 3. Katlı PCR (Multiplex PCR):

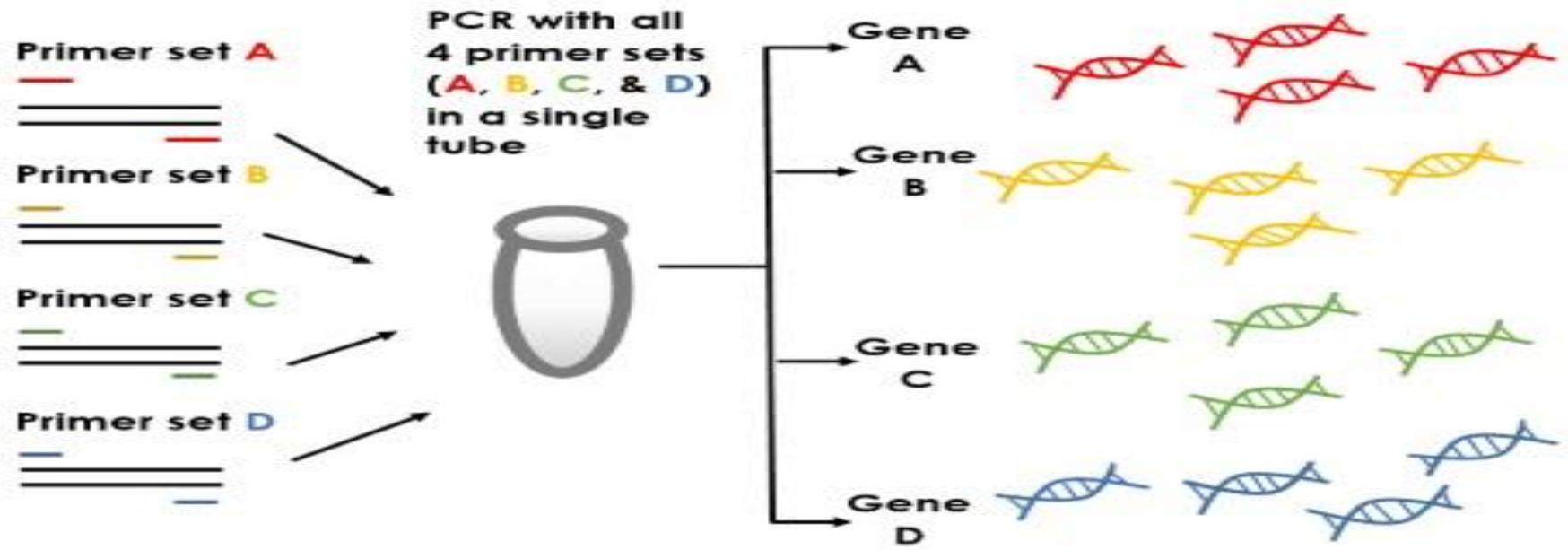
- Moleküler bir yöntemdir. Birden fazla bakteri, virüs, fungal veya paraziter etken tek bir çalışmada ortaya konulmaktadır.

1) Hızlıdır

2) Duyarlıdır

3) Antibiyotiklerden Etkilenmez

4) Çok Sayıda Patojen Tek Çalışmada Saptanır



# PCR ÇEŞİTLERİ

- **Antiserumla Sabitleme PCR (Immunocapture PCR):**
- PCR veya RT-PCR yapılmadan önce, geni çoğaltılacak virüs steril katı bir yüzey üzerinde o virüse spesifik antiserum kullanılarak sabitlenir. Bu işlemden sonra PCR veya RT-PCR metotlarına devam edilir ve hedef virüsün geni çoğaltılır. Bu metot özellikle bitki virüslerinin hastalıklı dokulardan veya vektör böceklerden izolasyonu ve tanılanması işlemlerinde kullanılmaktadır.
- **İç içe PCR (Nested PCR):**
- Nested PCR metodunda iki farklı set primer çifti kullanılır.
- İkinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçası birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasından daha kısa ve birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasının içerisinde yer alır.

# PCR ÇEŞİTLERİ

## RENKLİ PCR (COLORİMETRİC PCR):

- Son zamanlarda RT-PCR metodunun spesifikliğini ve ELISA serolojik yönteminin kullanma kolaylığını birleştiren bir metottur. Eğer sistem hatasız çalışıp hedef gen parçasını çoğalttı ise tüp içerisinde renk değişimi ortaya çıkmaktadır.

## DAMLATMA PCR (SPOT PCR):

- Virüs veya viroid içeren hastalıklı bitki öz suyu ya naylon membran üzerine bir damla damlatılır yada yeni kesilmiş dal veya yaprak parçası membran üzerine bastırılarak öz suyunun membrana geçmesi sağlanır. Bu işlemden sonra RTPCR işlemi yapılır. Bu teknik özellikle arazi uygulamalarında çok yararlı olmaktadır.

# Çoğaltılması İstenen DNA Dizilerinin Bilinmediği Durumlarda Kullanılan PCR Metotları

- Bu tip PCR metodlarında çoğaltılması amaçlanan DNA dizisinin baz dizilimi ya çok az bilinir veya hiç bilinmez. Bu tip baz dizilerini çoğaltmak için farklı PCR metotları geliştirilmiştir.
- 1. Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPDPCR)
- 2. Ters PCR (Inverse-PCR)
- 3. Kanca PCR (Anchored PCR)
- 4. Asymmetric PCR

# 1. Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPDPCR):

- Bu teknik, DNA dizilişi bilinmeyen veya az bilinen DNA fragmentlerinin analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır. Rastgele hazırlanmış 6-10 baz uzunluğundaki oligonükleotid primerleri ile PCR yapılır ve PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyanır. Karşılaştırılan örnekler arasında görünen aynı (monomorphic) ve farklı (polymorphic) DNA bantları sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. RAPD-PCR, genetik çeşitliliğin araştırılmasında, genom haritalamalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır.



# 2. Ters PCR (Inverse-PCR)

- **Bilinen DNA dizileri kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır** .Tekniğin temeli, bilinen sekanslara bitişik olarak bulunan fakat bilinmeyen bazlara sahip olan DNA bazlarının çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Bilinen diziler ters çevrilerek içe alındığı için bu şekilde adlandırılmaktadır.

# 3. Kanca PCR (Anchored PCR)

- Bu metot, **DNA fragmentinin sadece bir ucunun baz dizilişini bilip diğer ucunun bilinmediği durumlarda** kullanılmaktadır. Baz dizilişini bilinmeyen tarafa universal primerler kullanılırken baz dizilişini bilinen tarafa bir primer sentezlenerek PCR işlemi yapılır. Bu teknik daha çok **virüs ve viroidlerin** gen dizilişlerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır.

# 4. Asymmetric PCR

- Bu PCR metodu, tek iplikçikli DNA dizilerinin üretilmesinde kullanılır. Bu amaçla PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin konsantrasyonları farklı oranlarda (50:1, 100:1 gibi) tutulmaktadır. PCR reaksiyonunda başlangıçtaki primerlerin oranlarının farklı olması elde edilecek üründe farklı oranda çoğaltılmasına sebep olur ve üretilen DNA fragmentlerinden birinin miktarı (başlangıçta fazla olan) çok artar. Aynı zamanda çok miktarda tek iplikçikli DNA dizileri üretilmiş olur. Bu tip tek iplikçikli DNA dizileri klonlama işlemleri ve farklı uygulamalarda kullanılabilir.



































