

# Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Doç. Dr. İnci Başak Müştak  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji ABD

# PCR nedir?

- Spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek in vitro ortamda enzimatik olarak sentezlenmesi
- Nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılması
- DNA fotokopisi
- Samanlıkta iğne aramak yerine samanlıktaki iğnelerin sayısını çoğaltmak

# Tarihçe

- **1971** Khorana ve ark. 3' uçları birbirine yönlendirilmiş iki DNA sentez primeri kullanarak çift iplikçikli DNA'nın spesifik bir bölgesini replike eden bir metot geliştirdiler
- **1983** Kary Mullis PCR'ı geliştirdi
- **1985** PCR'ın DNA polimeraz I'in Klenow fragmentiyle gerçekleştirilmesine yönelik ilk rapor (Saiki ve ark.1988)
- **1988** PCR'ın Taq polimeraz enzimi kullanılarak ilk kez gerçekleştirilmesi
- **1993** Kary Mullis buluşuyla Kimya dalında Nobel Ödülü aldı
- **1993** PCR teknolojisi ve Taq polimeraz enzimi lisanslarının önde gelen şirketler tarafından alınması



# Hücre içi DNA replikasyonu

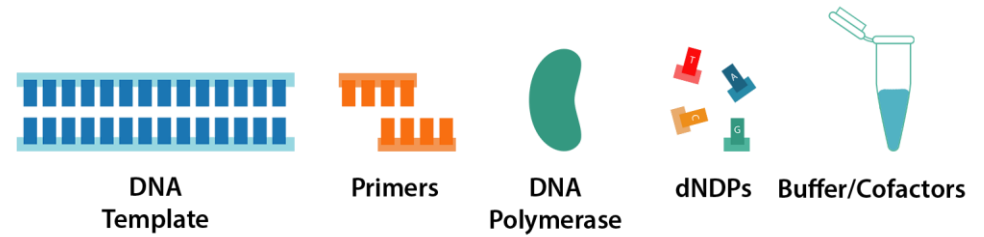
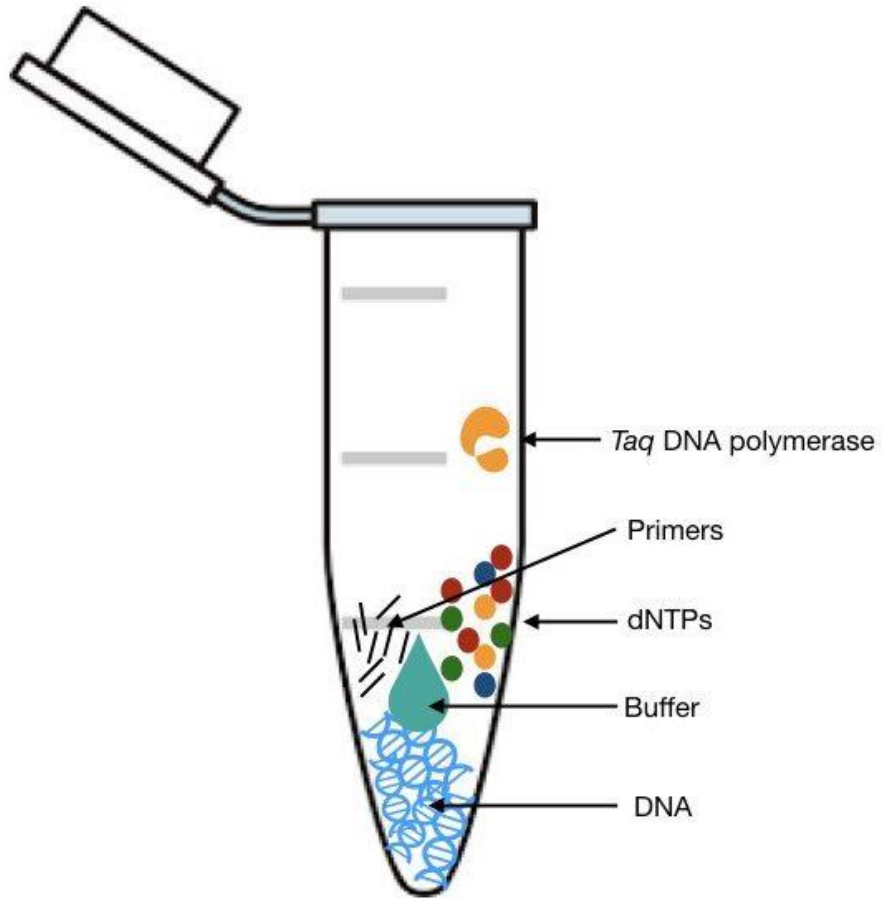
- DNA replikasyonu 37°C'de gerçekleşir
- Replikasyonda; “tek zincir bağlayan proteinler” gibi yardımcı proteinler bu amaçla kullanılır
- Replikasyonun başlatılacağı bölgede 12 nükleotid uzunluğunda bir RNA primeri, “primaz” adı verilen enzim tarafından yapılır
- DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek DNA sentezini yapar

# PCR

**Sıcaklık;** PCR cihazları  
(thermal cyclers)

Sıcaklığın adımlar ve  
sikluslar halinde  
otomatik regülasyonu

# PCR Bileşenleri



# Primerlerin Özellikleri

- 18-30 nukleotidden oluşurlar
- Forward (F) ve Reverse (R) primerleri benzer  $T_m$  değerlerine sahip olmalı
- G+C içeriği ~ 50%
- G veya C 3' sonda bulunmalı
- Primerler A ya da T ile sonlanmamalı
- Hairpin oluşumuna yol açacak sekanslar engellenmeli
  - bir mRNA sarmalının katlanıp aynı sarmalın başka bir bölümüyle baz çiftleri oluşturmasıyla oluşan, eşlenmemiş bir mRNA döngüsüdür. Ortaya çıkan yapı bir döngü veya U şekli gibi görünür.
- Primerler birbirine komplementer olmamalı

# PCR nasıl çalışır?

- İki iplikçiğin birbirinden ayrılması ( $94^{\circ}\text{C}$ )
- Primerlerin bağlanması ( $55^{\circ}\text{C}$ )
  - Replikasyonun başlangıcı
- –Ekstensiyon (uzama, polimerizasyon) ( $72^{\circ}\text{C}$ )
  - =replikasyon
- 20 – 30 kez tekrarlar



PCR nasıl çalışır?

# Siklus Parametreleri

- Denatürasyon;  $93^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$  30 sn – 1dk
- Bağlanma;  $37^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$  30 sn – 1dk
- Ekstansiyon;  $72^{\circ}\text{C}$  1dk

*(Her 500 bp'lik DNA için + 30sn)*

- 25-35 siklus
- Final ekstansiyon 2-10dk

# PCR Bileşenlerinin Özellikleri

- 10-25  $\mu$ l reaksiyon hacmi
- Template DNA 1-1000ng
- Primerler 10 -20 pmols
- 10mM Tris-CL pH 9.0, 50 mM KCl (10xPCR tamponu)
- MgCl<sub>2</sub> 0.5 -3.0 mM
- Her birinin final konsantrasyonu 200  $\mu$ M olacak şekilde dNTP'ler: dATP, dGTP, dTTP, dCTP
- 1 ünite Taq polimeraz enzimi

# PCR Analizi

- <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>
- [https://www.youtube.com/watch?v=c07\\_5BfIDTw](https://www.youtube.com/watch?v=c07_5BfIDTw)

# PCR Analizi

- 3. Siklus istenen ürünlerin oluştuğu ilk siklus
- 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
- Matematiksel olarak amplifikasyon ;  $(2^n - 2^n) \times X$  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
- Reaksiyon için ısıya dayanıklı bir enzim Taq DNA polimeraz “Thermus aquaticus” adlı termofilik bakterisinden izole edilen ve ısıya dayanıklı enzim olan Taq polimeraz kullanılmaktadır. Çünkü bu enzim  $94^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra bile aktivitesini kaybetmez

- PCR çok duyarlı bir teknik – istenmeyen bir DNA ile meydana gelen kontaminasyon önemli olabilmektedir
- **Her zaman** negatif kontroller teste eklenmeli
- Pozitif kontrol da unutulmamalı
- Uygun filtreli uçlar ve sadece PCR'a özgü otomatik pipetler kullanılmalı
- Bölümler ayrı olmalı
- UV lamba içeren kabinler kullanılmalı

# PCR'ın Kullanım Alanları

- Gen ya da gen fragmentlerinin klonlanması
- Genetik teşhis - Mutasyonların teşhisi
- Analık-babalık tayini
- DNA sekans analizi
- Forensik teşhis
- Endüstriyel kalite kontrolü ortaya konması
- Doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi
- Türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi
- Moleküler tiplendirme
- Patojenlerin saptanması

# PCR'in avantaj ve dezavantajları

- Yüksek özgüllük ve duyarlılık
- Saptama ve tanı hızı
- Cansız etkenleri saptayabilme yeteneđi
- Nazlı üreme özelliğinde ve çevre şartlarına karşı hassas etkenler
- Geç üreyen etkenler
- İleri çalışmalara (tiplendirme, sekans analizi, klonlama) olarak sağlaması
- Kesin teşhiste izolasyonun yerini tutmamakta;
- kros-kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflik
- Laboratuvar altyapısı gereksinimi
- Yetişmiş eleman
- Yüksek sarf maliyetleri



# PCR Optimizasyonu

- Örneklerde;
  - inhibe edici maddelerin bulunması,
  - çevresel kontaminasyon riski,
  - kullanılan bileşenlerin miktarının yanlış kullanılması,
  - sıcaklık parametrelerinin ayarlanamaması gibi problemler PCR yapılırken her zaman karşılaşılabilecek sorunlardır
- Bunlar dışında, bahsedilen kullanılacak reagent ve malzemelerin optimizasyonu için bilinmesi gereken standartlar ve kurallar vardır.

# PCR Reaksiyonun Temel Bileşenleri ve Optimizasyonları

- PCR'da kullanılan temel bileşenler;
  - hedef DNA veya RNA (template),
  - taq DNA polimeraz enzimi,
  - primerler,
  - deoksinükleotitler,
  - tampon sıvı,
  - pH,
  - Mg<sup>+2</sup> iyonları

# Mg<sup>+2</sup> Konsantrasyonu

- Mg<sup>+2</sup> iyonları enzim aktivitesine, primer bağlanmasına ve DNA erime ısısına etki edebilir.
- dNTP'ler Mg<sup>+2</sup> iyonunu bağladıkları için dNTP konsantrasyonundaki artış serbest Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonunda azalmaya yol açabileceğinden optimizasyon bu durum göz önüne alınarak yapılmalıdır.
- Mg<sup>+2</sup> iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz enzimi aktivitesini uyarır, çift iplikli DNA'nın erime derecesini (T<sub>m</sub>) arttıırırlar ve primer-template DNA hibridizasyonunu sağlarlar
- **PCR reaksiyon karışımında ortalama 0.5-2.5 mM Mg<sup>+2</sup> olması gereklidir**

# Primerler

- Primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır
- Dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli
- Tekrarlı bölgeler içermemeli
- Primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır
- **Primer konsantrasyonunun genel olarak 0.1-0.5  $\mu$ M arasında olması tavsiye edilmiştir.**
- Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır

# dNTP'ler

- Geleneksel PCR'da ayrı reagent olarak kullanılan dNTP'lerin final konsantrasyonları **20-200  $\mu\text{M}$  arasında olmalı** ve 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalıdır

# PCR Etkinliğini Artıran Kimyasallar

- *DMSO (dimetil sülfoksit)*
- %5'lik formamid
- 10-100 $\mu$ M trimetilamonyum klorür
- %0.1-2.5'lik Tween 20 gibi deterjanlar
- %5-15'lik polietilen glikol (PEG) 6000
- Tek iplikçikli DNA bağlayan proteinler
- 7 deaza-dGTP G-C baz çiftlerinin gücünü azaltmak için
- Taq extender (Stratagene)
- *Perfect Match PCR Enhanser (Stratagene)*
- Q-Solution (Qiagen)

# PCR inhibitörleri

- Biyolojik materyaller (kan, idrar, balgam, BOS,...vs.)
- DNA ekstraksiyon metodu
- DNA izolasyonunda kullanılan reaktifler
- Kan heparin, porfirin bileşikleri
- *SDS*
- Proteinaz-K

## Çözüm

- Materyalin sulandırılması
- İzolasyon aşamasında ya da PCR'a internal kontrollerin eklenmesi
- Uygun DNA ekstraksiyon yöntem ve kitleri
- Ekstraksiyonu takiben fenol-kloroform + etanol uygulaması