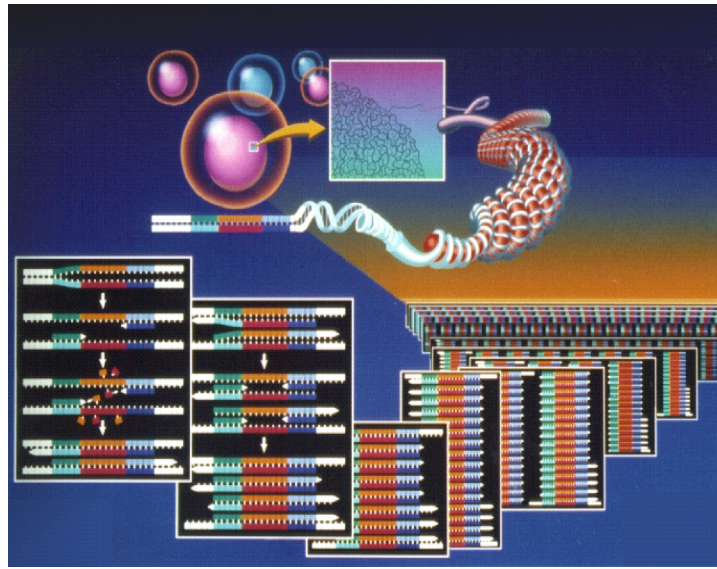
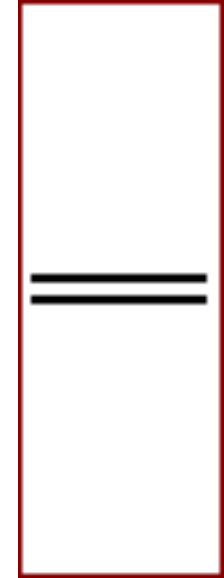
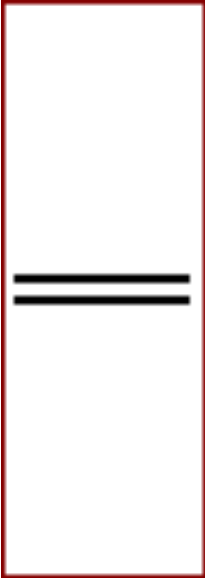


4. Hafta



Polimeraz Zincir Reaksiyonu

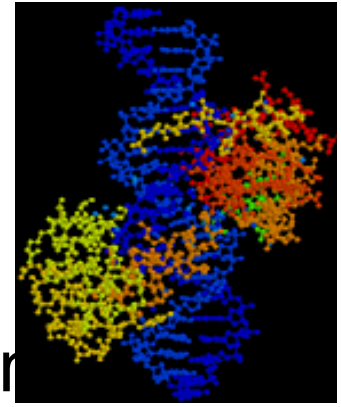
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Sunu içeriği

- *PCR'in tanımı*
- *PCR'in kısa tarihçesi*
- *Hücre içi DNA replikasyonu*
- *PCR bileşenleri*
- *PCR temel prensipler*
- *PCR'in kullanım alanları*
- *PCR'in avantajları ve dezavantajları*
- *PCR optimizasyonu*
- *PCR inhibitörleri ve enhanserleri*
- *Karşılaşılabilecek sorunlar ve çözüm önerileri*
- *Biz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi olarak neler yapabiliriz?*

PCR'in tanımı:



- spesifik bir DNA parçasının kopyalarını 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

PCR'in kısa tarihçesi:

- **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 (Cetus firması) PCR'ı geliştirdi



**Kary B.
Mullis**

- **1985** *PCR'in DNA polimeraz I'in Klenow fragmentiyle gerçekleştirilmesine yönelik ilk rapor (Saiki ve ark., 1988).*
- **1988** PCR'in 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

- **Reaksiyon bileşenleri**

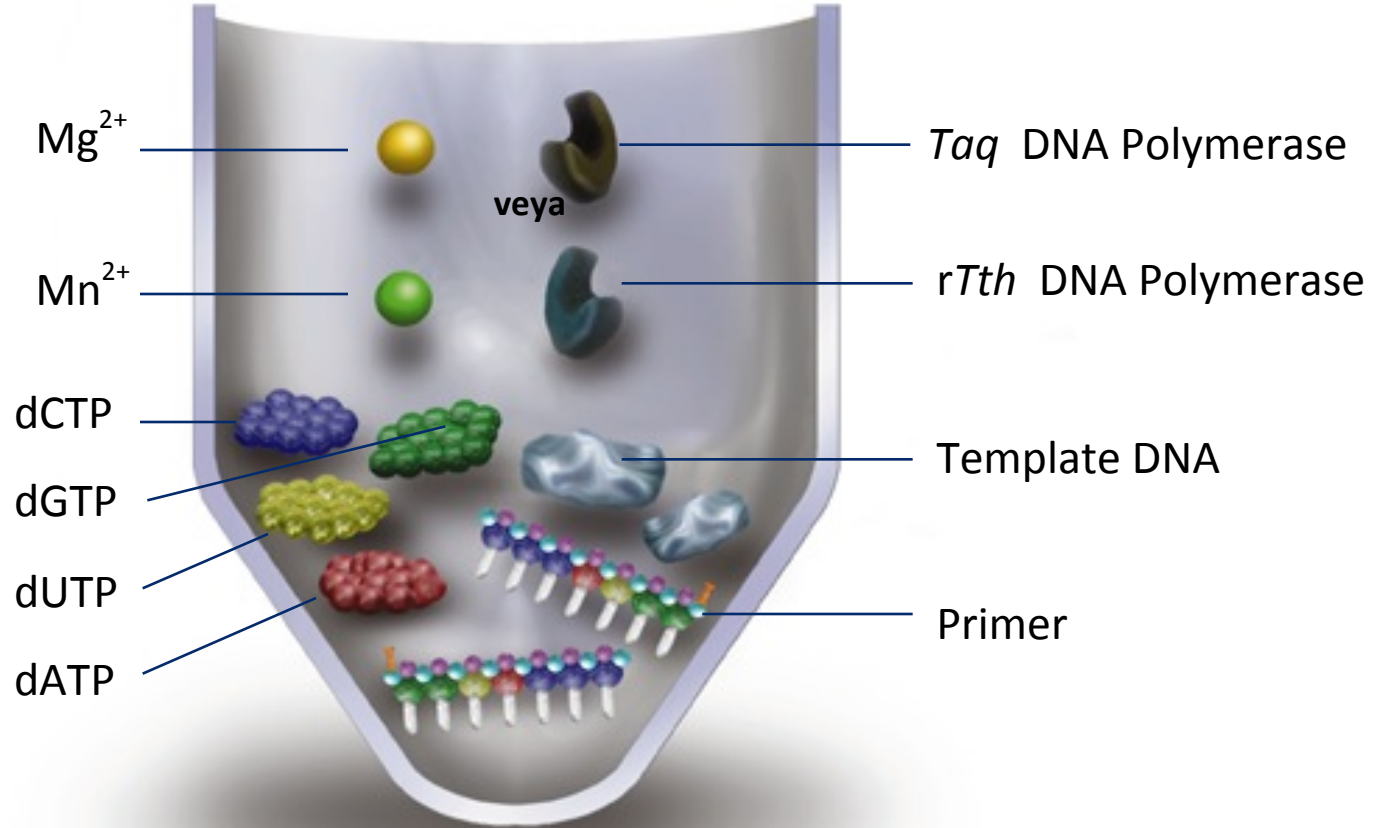
- Reaksiyon tamponu
- Template (kalıp) DNA
- Primerler
 - Forward ve reverse
- Nukleotidler
 - DNA'nın sentezinde
- Polimeraz
 - Taq DNA polymerase
- $MgCl_2$
 - Enzim aktivitesinde

- **Sıcaklık kontrolü**

- PCR cihazları (thermal cyclers)
- Sıcaklığın adımlar ve sikluslar halinde otomatik regülasyonu



PCR karışım bileşenleri

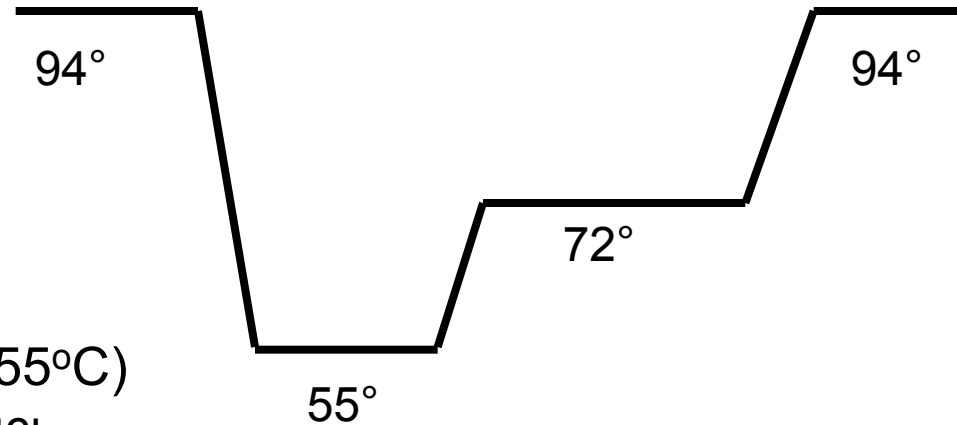


Primerlerin özellikleri

- 18-30 nukleotidden oluşurlar
- F ve R primerleri benzer T_m değerlerine sahip olmalı
- G+C içeriği $\sim 50\%$
- G veya C 3' sonda bulunmalı
- Primerler A ya da T ile sonlanmamalı
- hairpin oluşumuna yol açacak sekanslar engellenmeli
- Primerler birbirine komplementer olmamalı

PCR

- **PCR nasıl çalışır?:**
 - İki iplikçiğin birbirinden ayrılması (94°C)
 - Primerlerin bağlanması (55°C)
 - Replikasyonun başlangıcı
 - Ekstensiyon (uzama, polimerizasyon) (72°C)
 - = replikasyon
 - 20 – 30 kez tekrarla



SİKLUS PARAMETRELERİ

Denatürasyon; 93°C - 95°C

30 sn - 1dk

Bağlanma; 37°C - 65°C

30 sn - 1dk

Ekstansiyon; 72°C

1dk

(Her 500 bp'lik DNA için + 30sn)

25-35 siklus

Final ekstansiyon 2-10dk



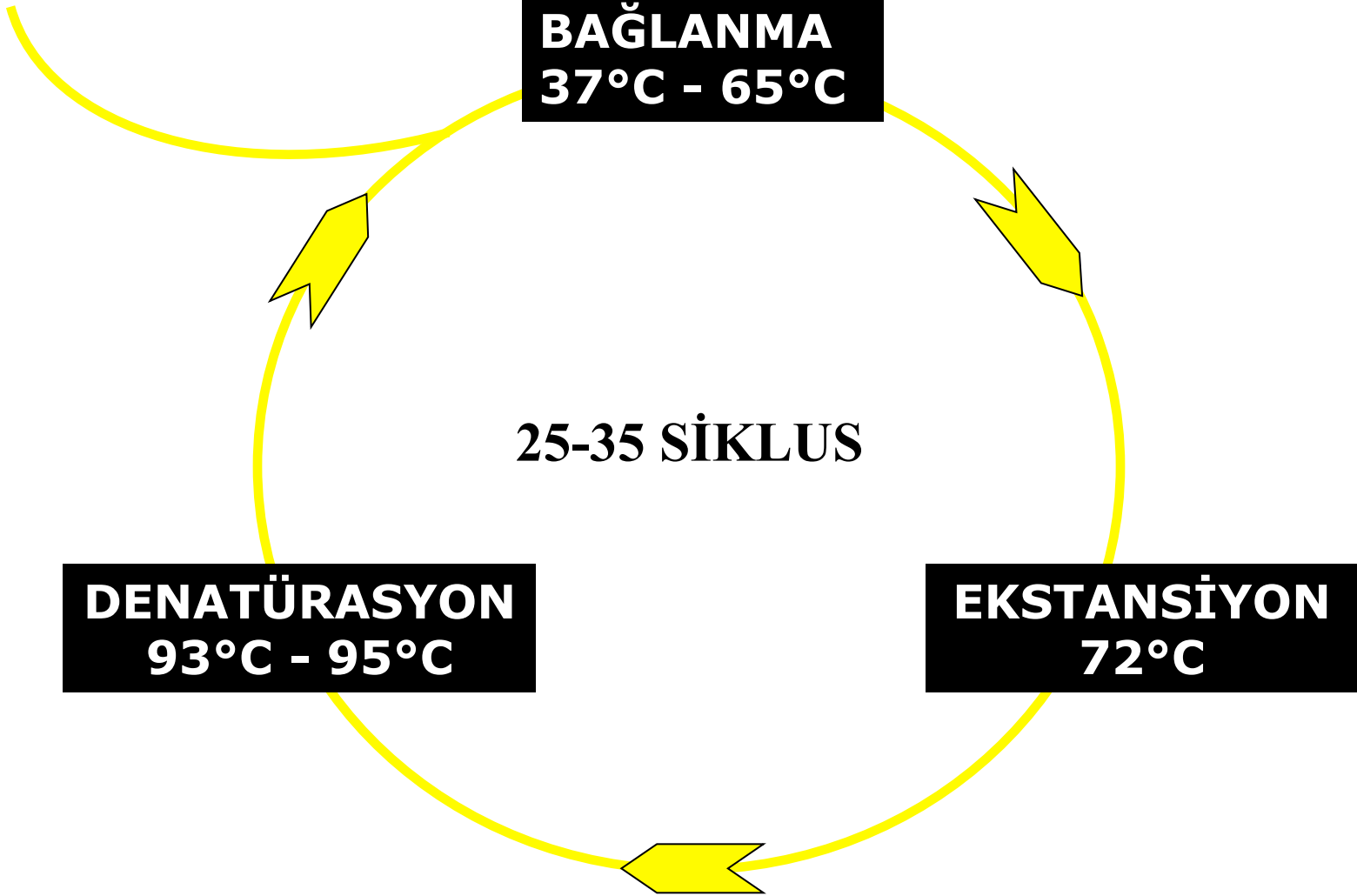
DENATÜRASYON
93°C - 95°C

BAĞLANMA
37°C - 65°C

25-35 SIKLUS

DENATÜRASYON
93°C - 95°C

EKSTANSİYON
72°C



Temel PCR koşulları

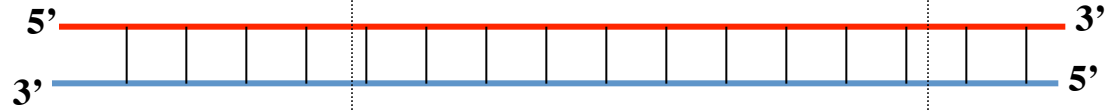
- 100 μ l reaksiyon hacmi
- Template 1-1000ng
- Primerler 10 -20 pmols
- 10mM Tris-CL pH 9.0, 50 mM KCl (10xPCR tamponu)
- $MgCl_2$ 0.5 -3.0 mM
- her birinin final konsantrasyonu 200 μ M olacak şekilde dNTP'ler: dATP, dGTP, dTTP, dCTP
- 1 ünite Taq polimeraz enzimi

REAKSİYON KARIŞIMI

25 or 50 μ l final hacim Eppendorf (0.2 ml) tüpü

Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonu
10 X PCR Buffer	5μl	1X
10 X dNTPs (2mM)	5μl	200μM
Forward primer (10pmols/μl)	5μl	1 μ M (50pmols/50 μ l)
Reverse primer (10pmols/μl)	5μl	1 μ M (50pmols/50 μ l)
Genomik DNA template	2μl	1μg
Taq polymerase (2U/μl)	0.5μl	1 unit
H₂O (to 50μl Final hacim)	27.5μl	

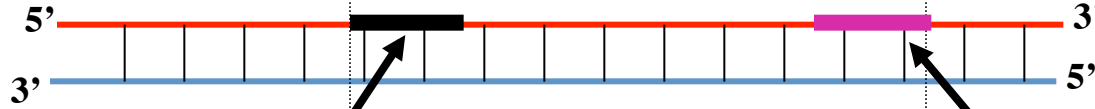
Çift iplikçikli template DNA



çoğaltılacak bölge

Çift iplikçikli template DNA

**Bu DNA sekansına
sahip primerleri sentezle**



Bu sekansla
benzer olan

Bu sekansın
komplementeri
olan

PCR SIKLUS 1

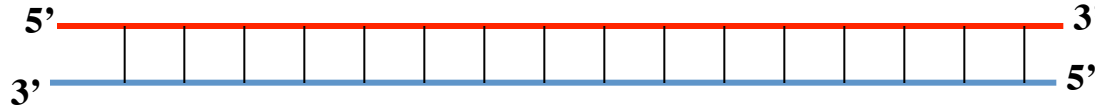
Primerler



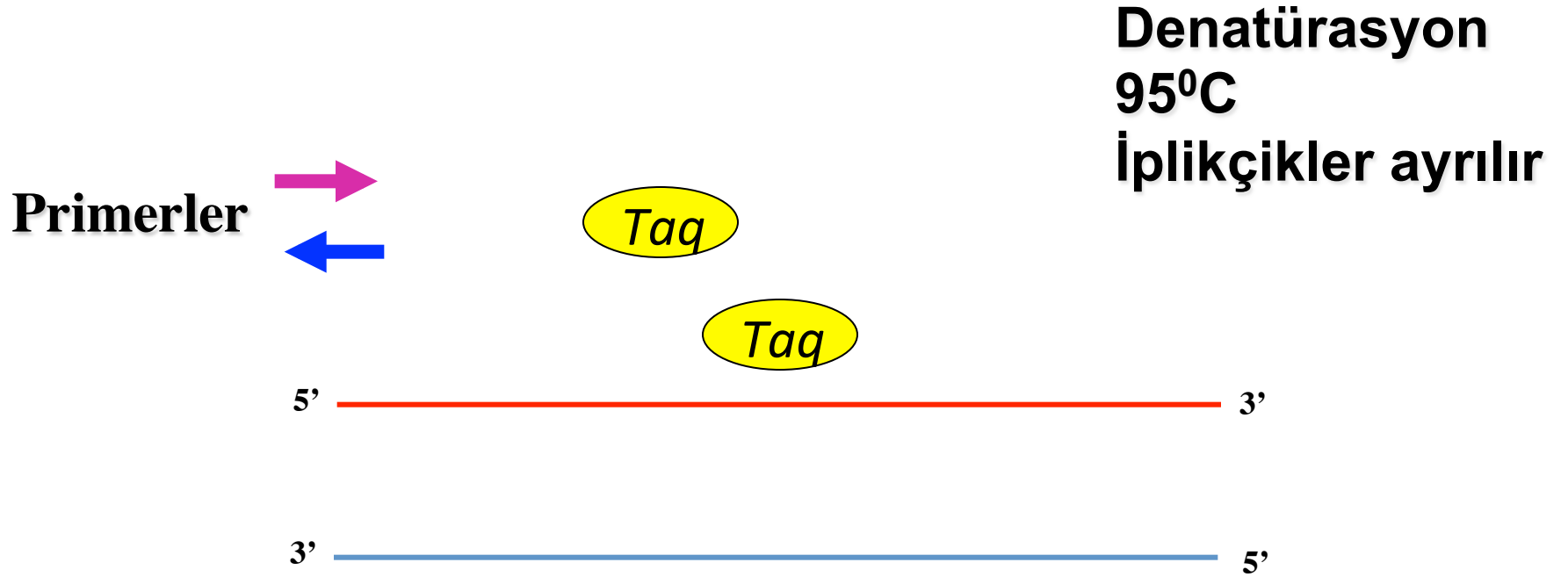
Çift iplikçikli
template DNA

Taq

Taq

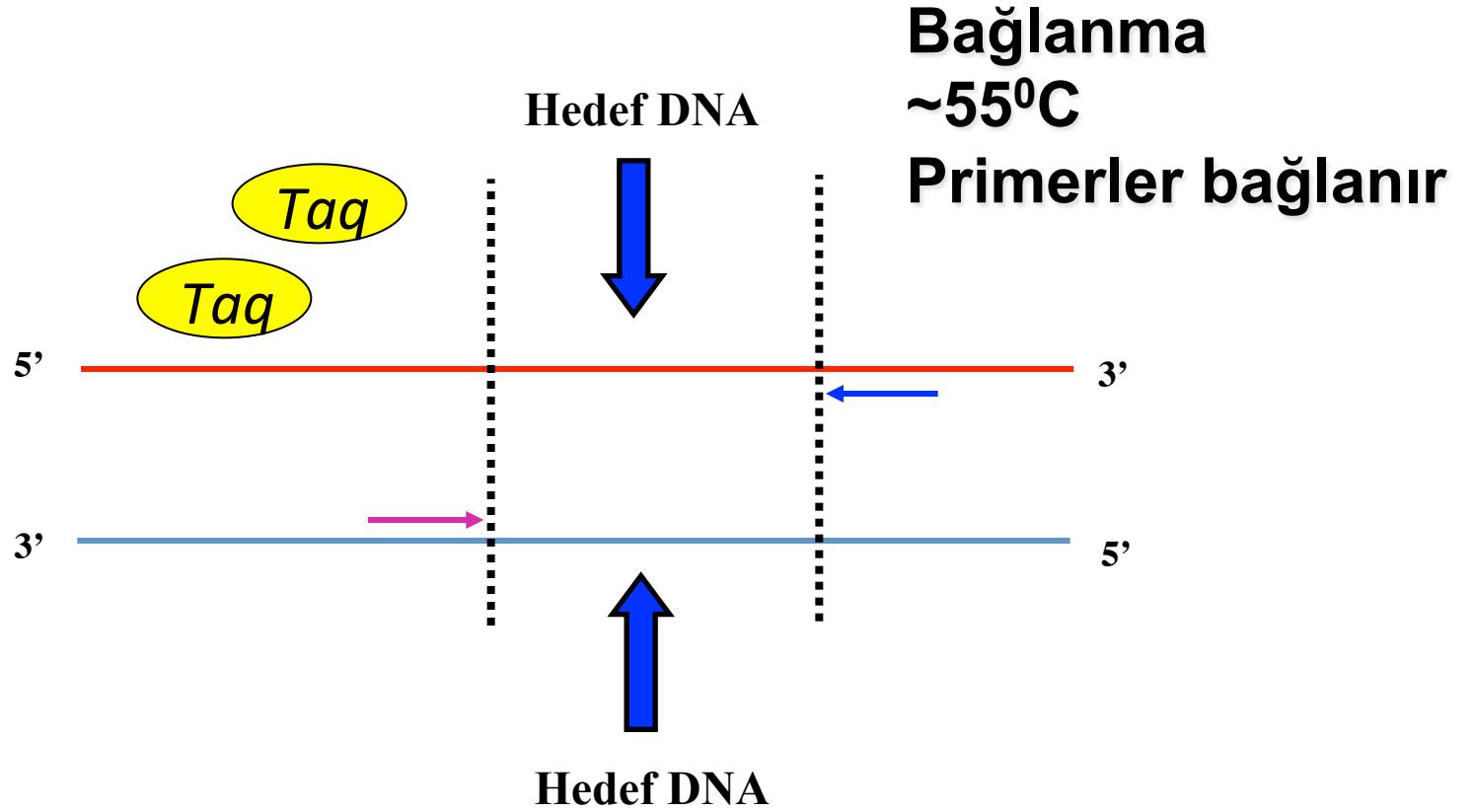


PCR SIKLUS 1



***Taq* polymerase termostabil (ısıya dayanıklı) karakterdedir**

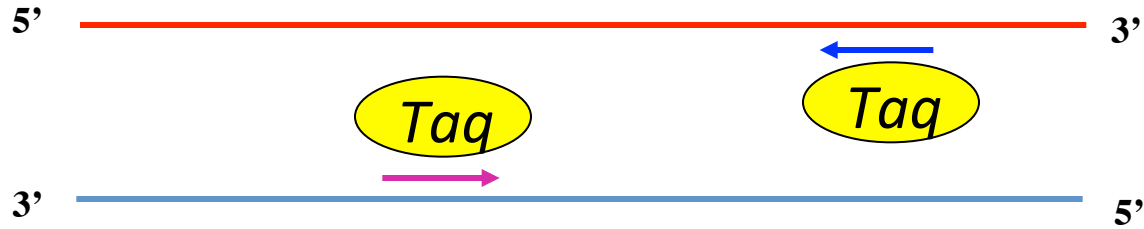
PCR SIKLUS 1



- Forward primer alttaki iplikçiğe bağlanırken
- ← Reverse primer üstteki iplikçiğe bağlanır

PCR SIKLUS 1

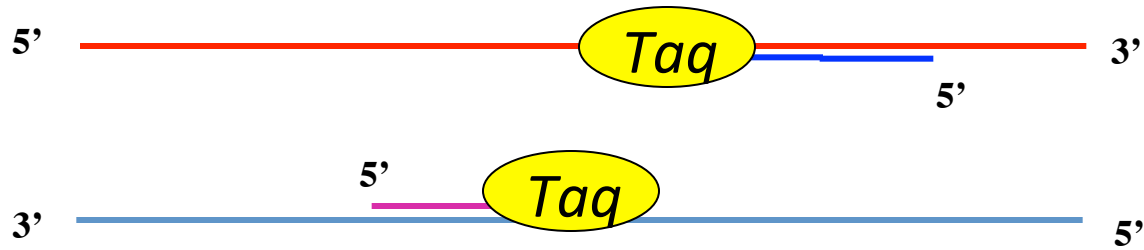
Bağlanma
~55°C
***Taq* iplikçiklere**
bağlanır



Ekstansiyon

72°C

**Taq dNTP'ler yardımıyla
DNA'yı kopyalar**



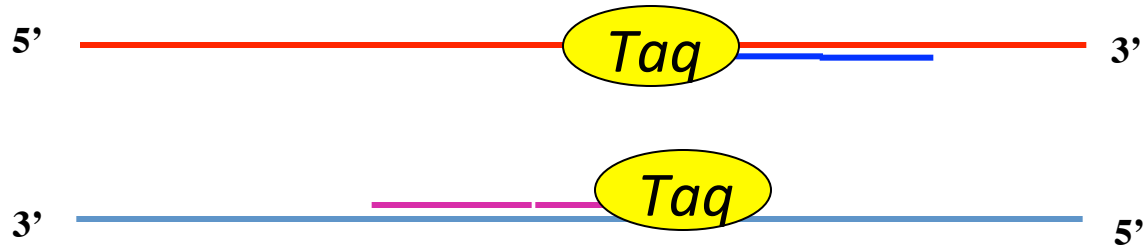
***Taq* 5' den 3'ne doğru DNA'yı sentezler**

PCR SIKLUS 1

Ekstansiyon

72°C

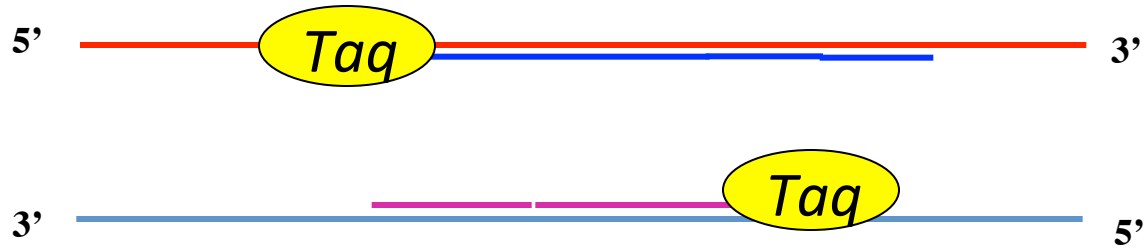
Taq DNA iplikçigini
kopyalar



Taq 5' den 3'ne doğru DNA'yı sentezler

PCR SIKLUS 1

Ekstansiyon
72°C
Taq DNA iplikçigini
kopyalar



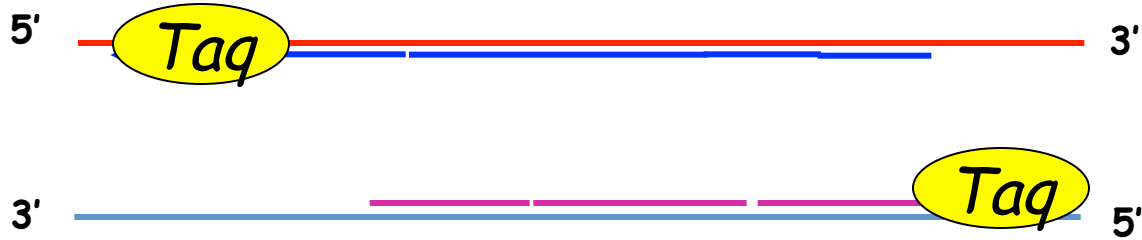
***Taq* 5' den 3'ne doğru DNA'yı sentezler**

PCR SIKLUS 1

Ekstansiyon

72°C

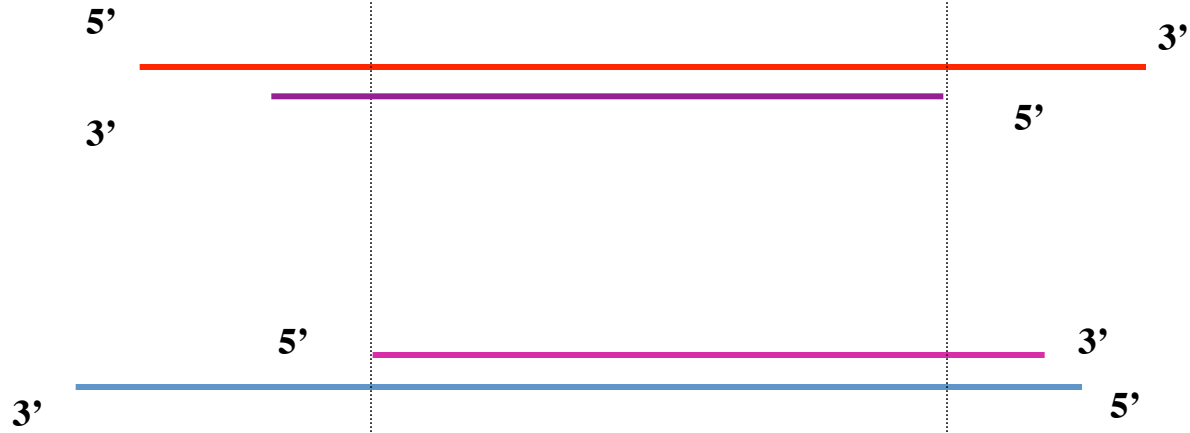
Taq DNA iplikçigini
kopyalar

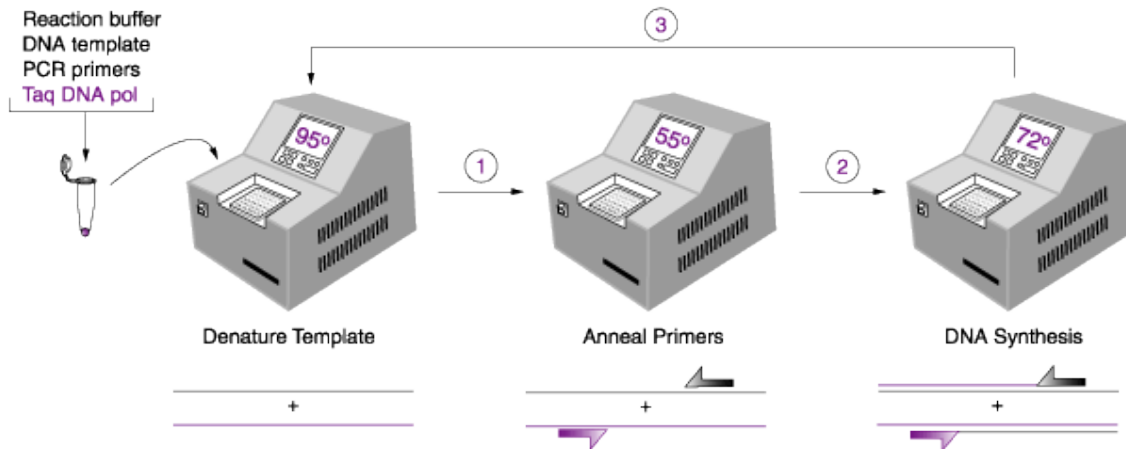
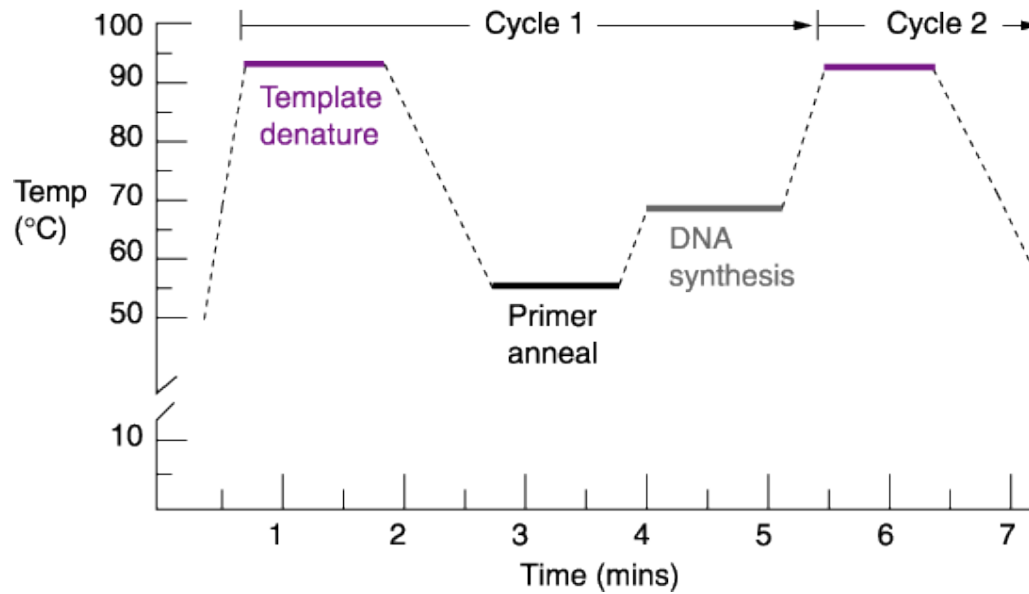


Taq 5' den 3'ne doğru DNA'yı sentezler

PCR SIKLUS 1

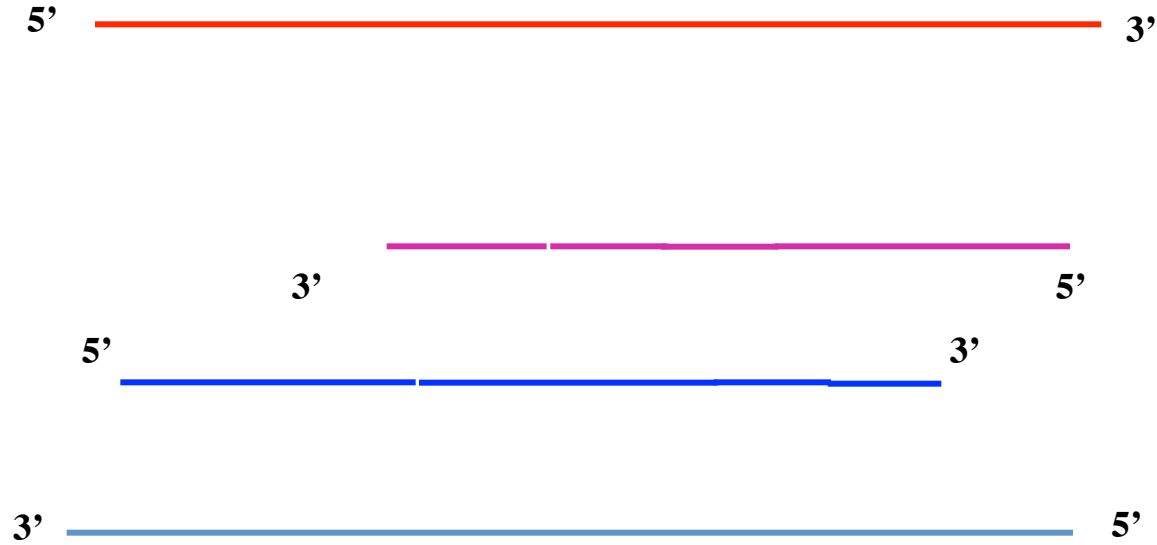
Siklus 1'in sonu





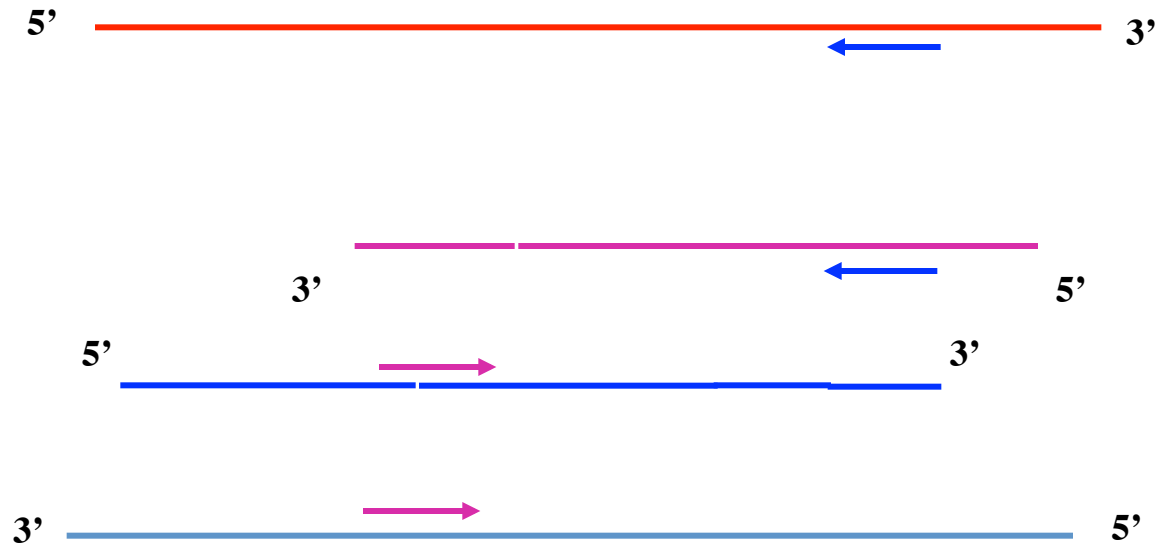
PCR SIKLUS 2

Denatürasyon
95°C
İplikçikler ayrılır



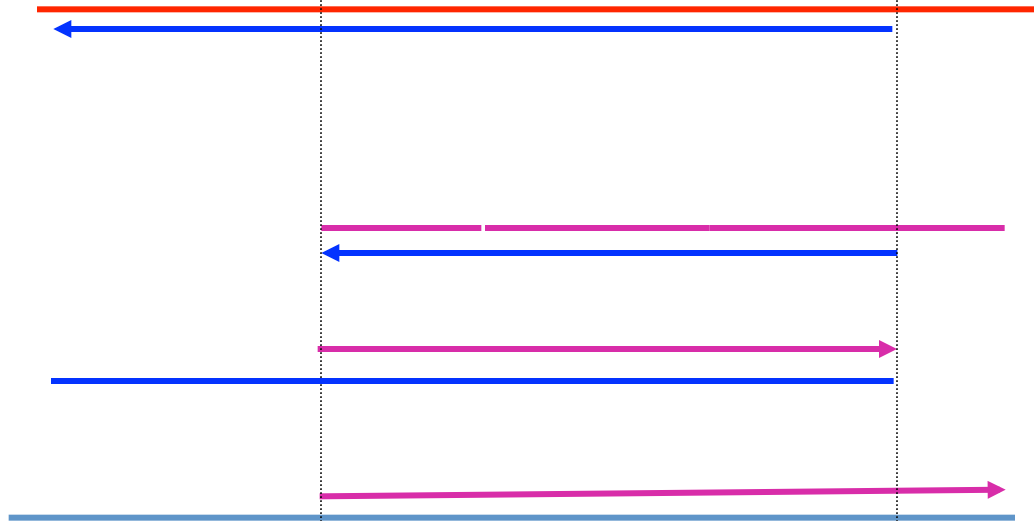
PCR SIKLUS 2

Bağlanma
~55°C
Primerler bağlanır



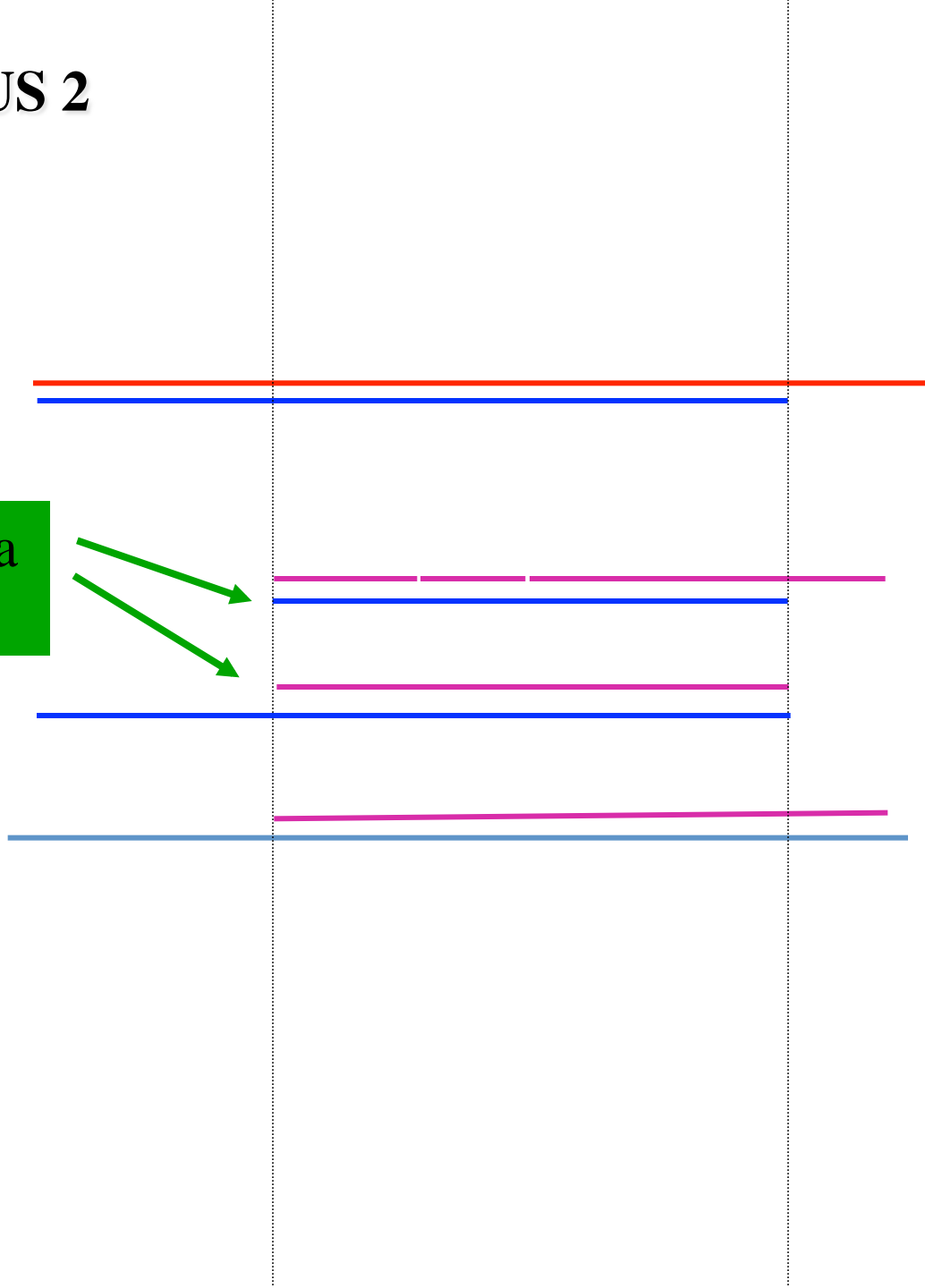
PCR SIKLUS 2

Ekstensiyon
~72°C



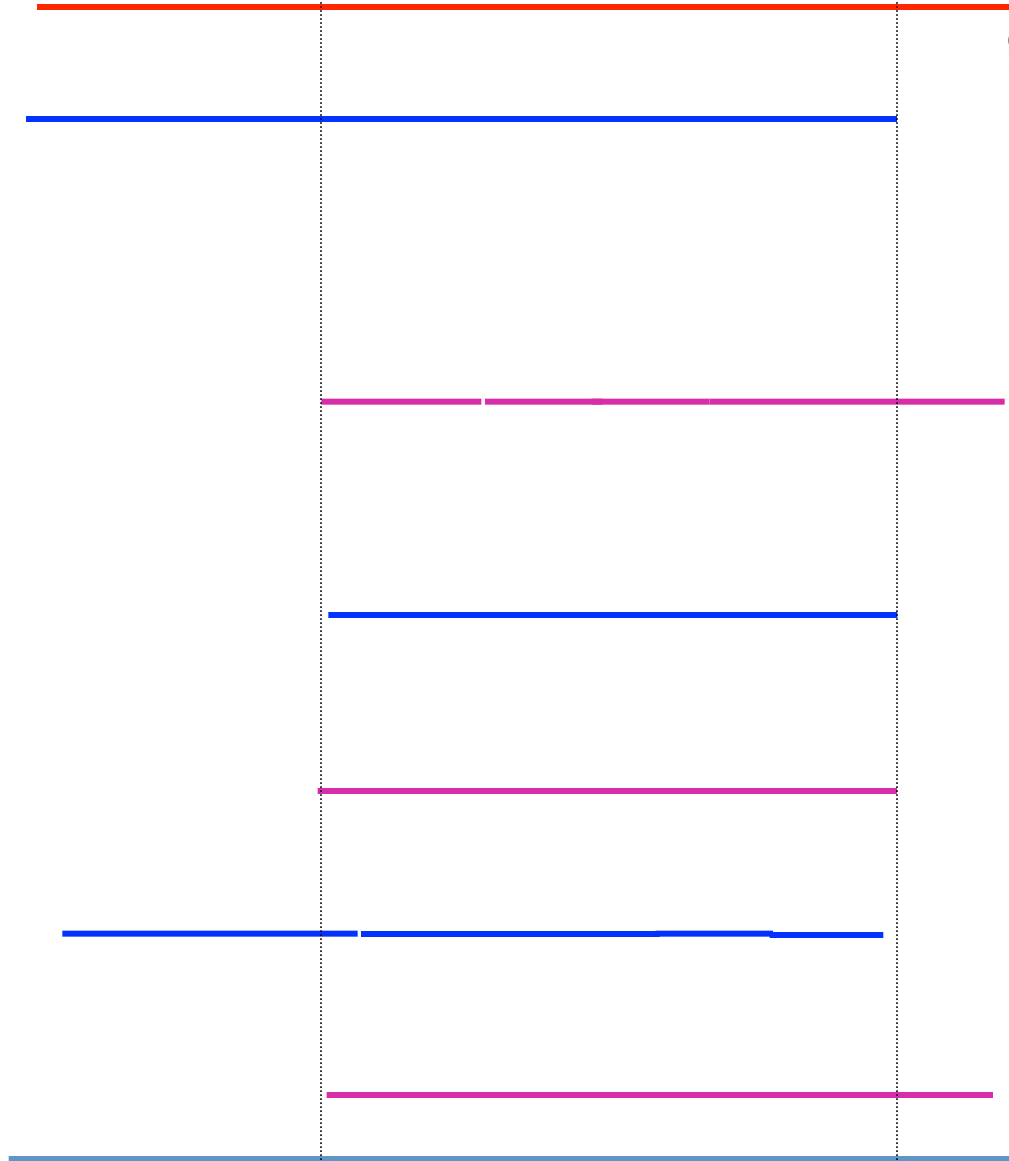
PCR SIKLUS 2

Doğru uzunlukta
iki tek iplikçik

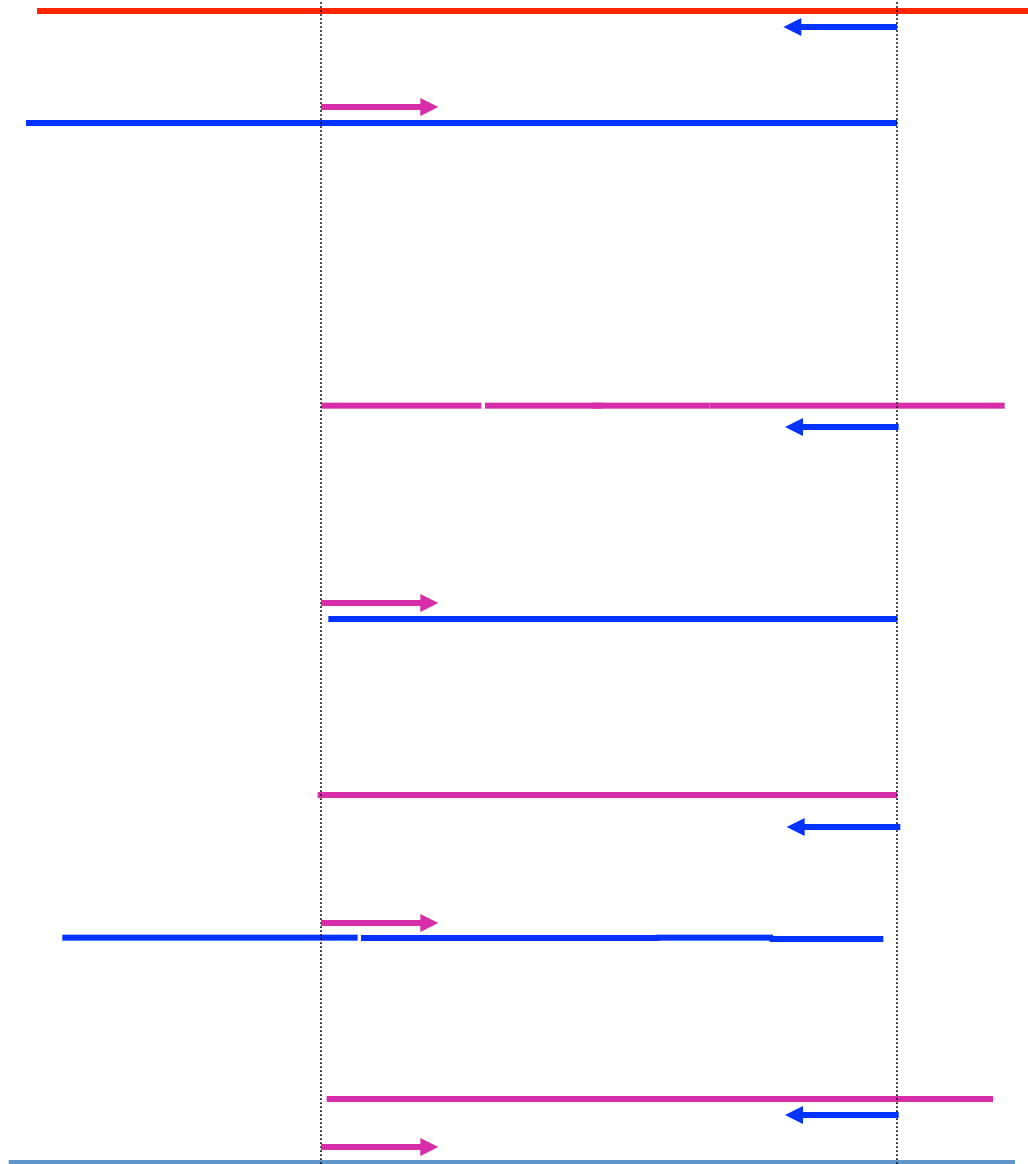


PCR SIKLUS 3

Denatürasyon
95°C

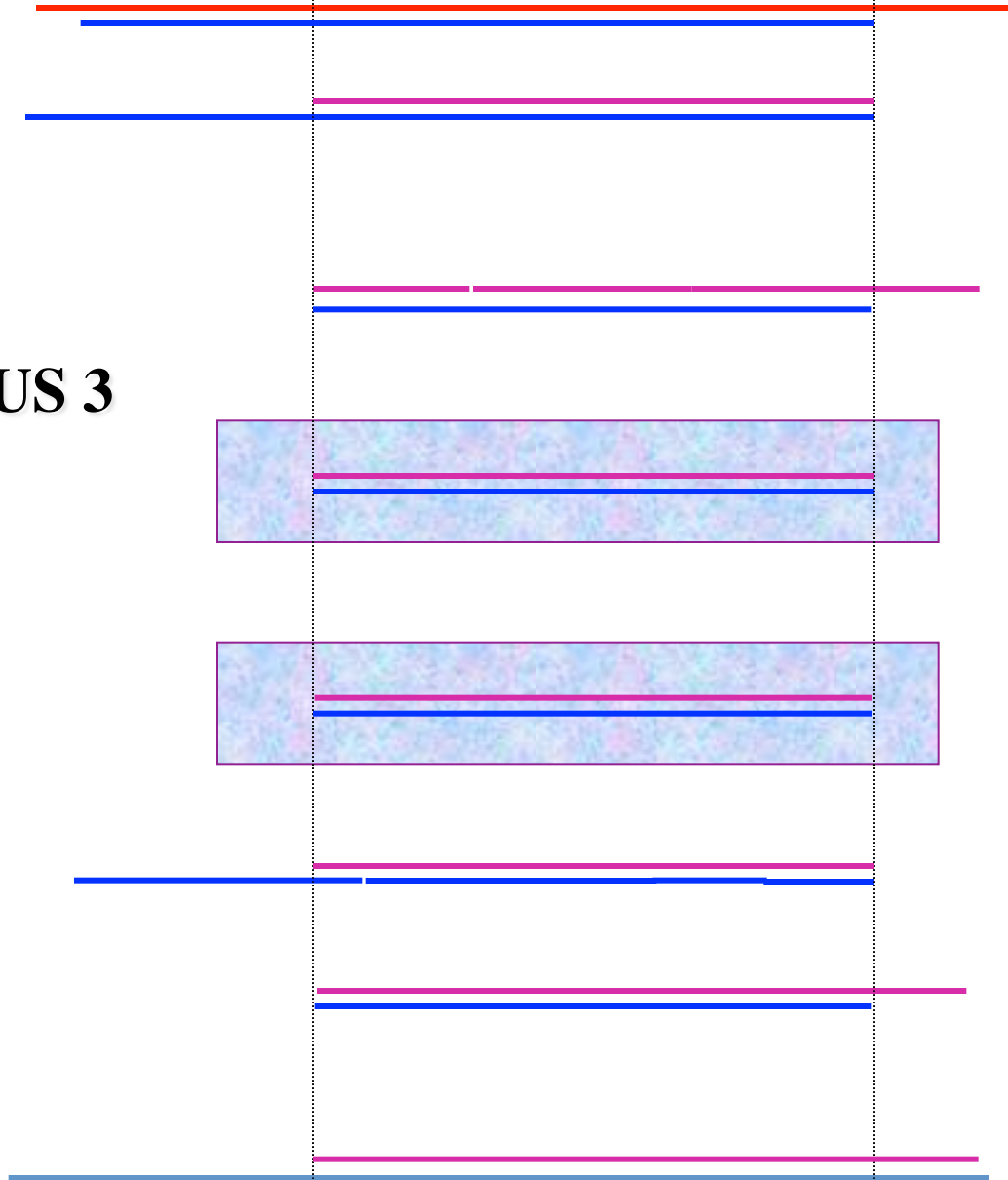


PCR SIKLUS 3



Bağlanma
55°C

PCR SIKLUS 3



**Uzama
72°C**

Ürün 1

Ürün 2

3. Siklus istenen ürünlerin oluştuğu ilk siklus

Bu aşamadan sonra amplifikasyon üssel olarak gerçekleşir

Bu amplimerler aşağıdaki denkleme göre şekillenir

n sayıdaki üssel artışın görüldüğü PCR siklusunun ardından **$No(1+Y)^{n-1}$** kadar ürün kopyası olacaktır

No hedeflerin başlangıç sayısı

Y PCR reaksiyonunun etkinliği

n siklus sayısı

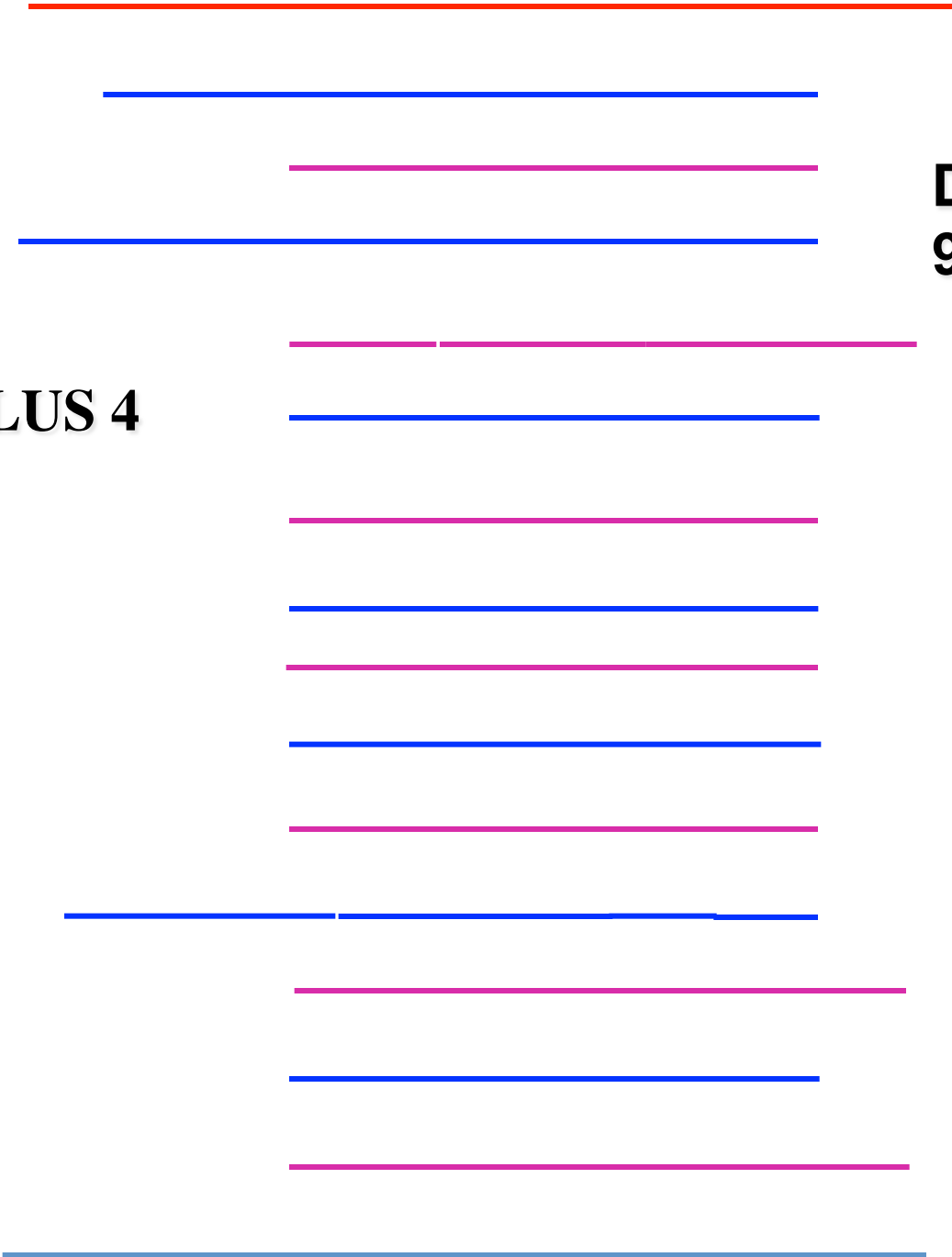
3. SIKLUS'un sonu



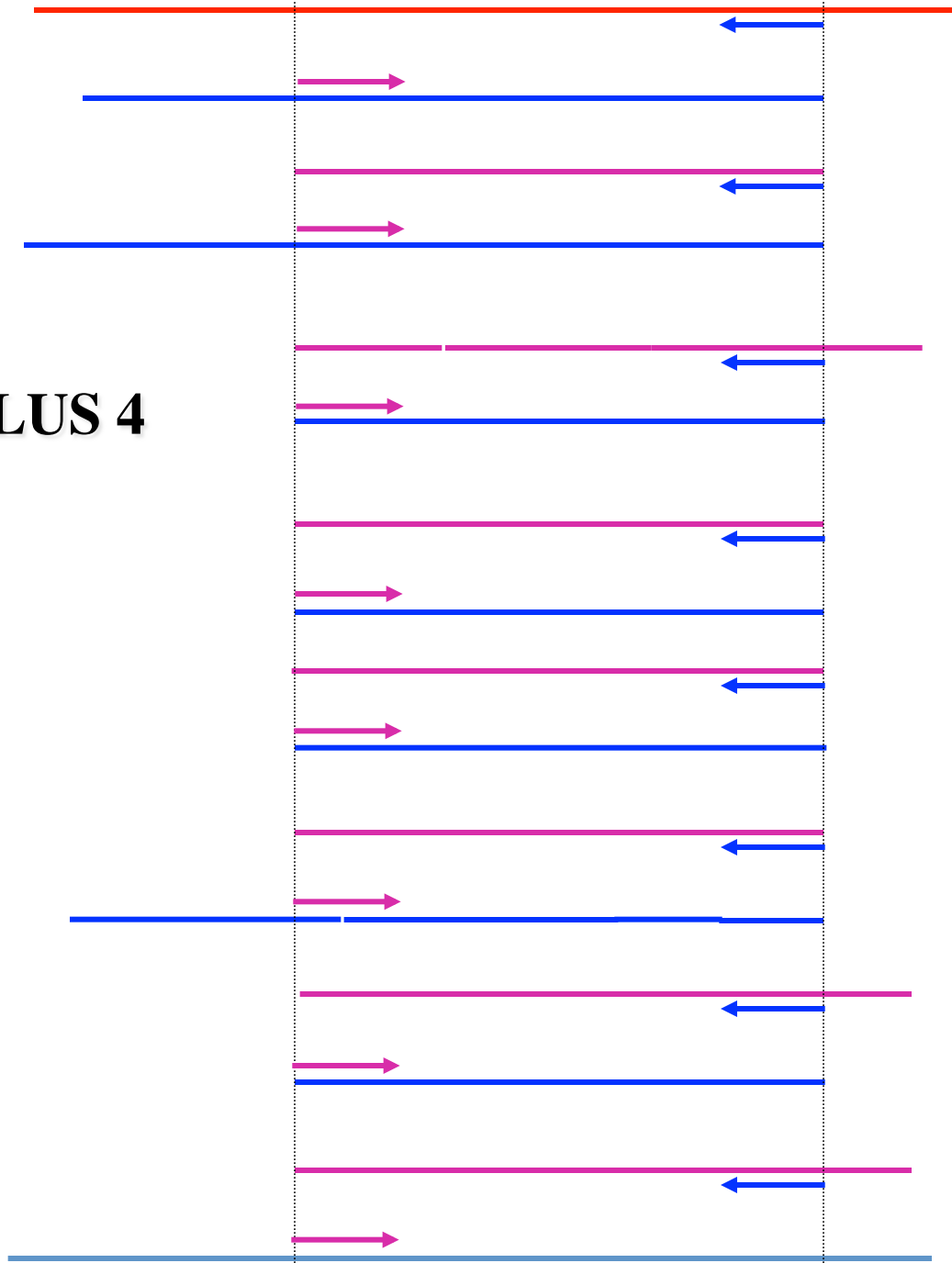
Handwriting practice lines consisting of multiple sets of horizontal lines. Each set includes a top blue line, a middle red line, and a bottom blue line. The lines are arranged in a staggered pattern across the page.

**Denatürasyon
95°C**

PCR SIKLUS 4

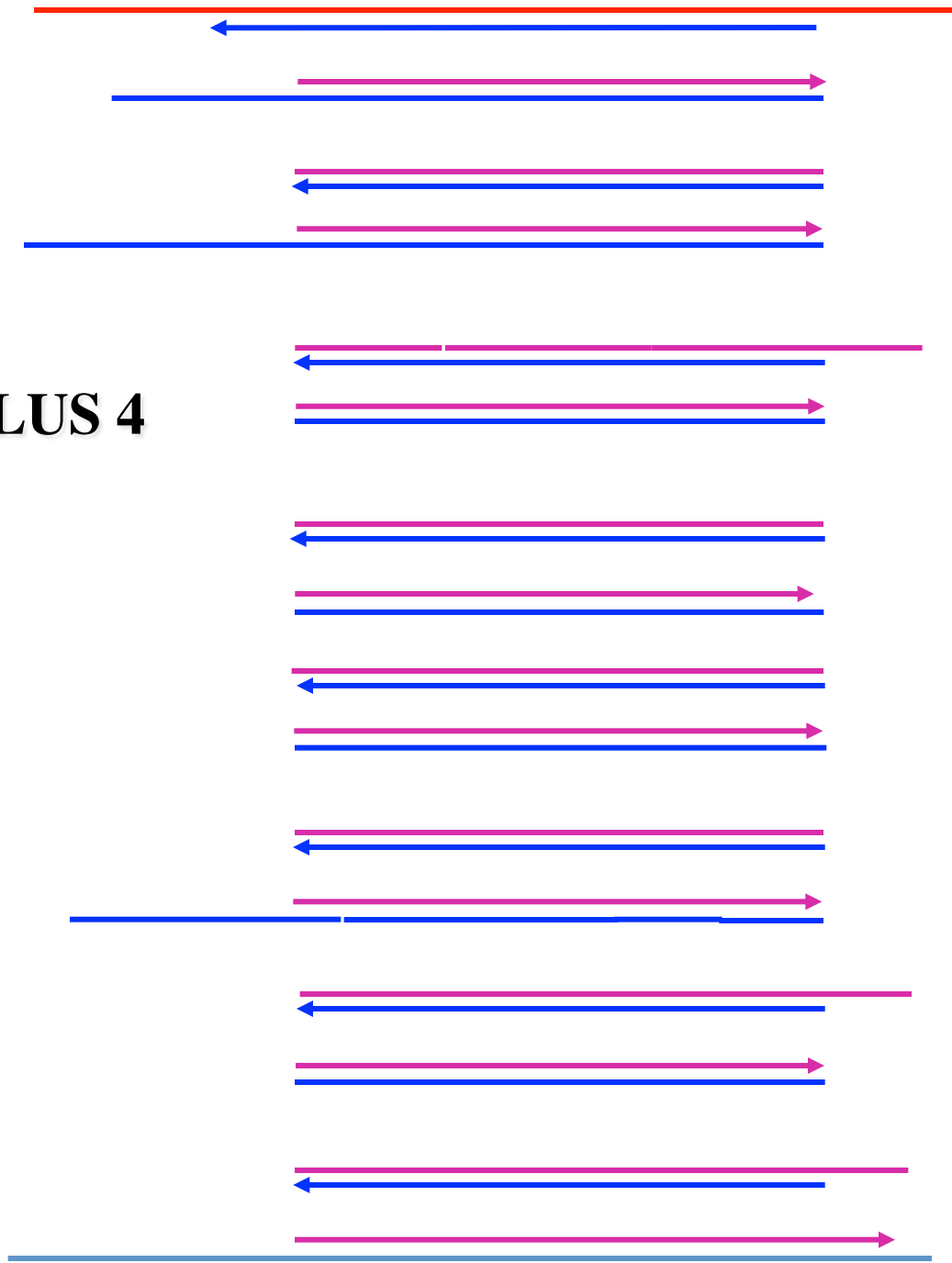


PCR SIKLUS 4



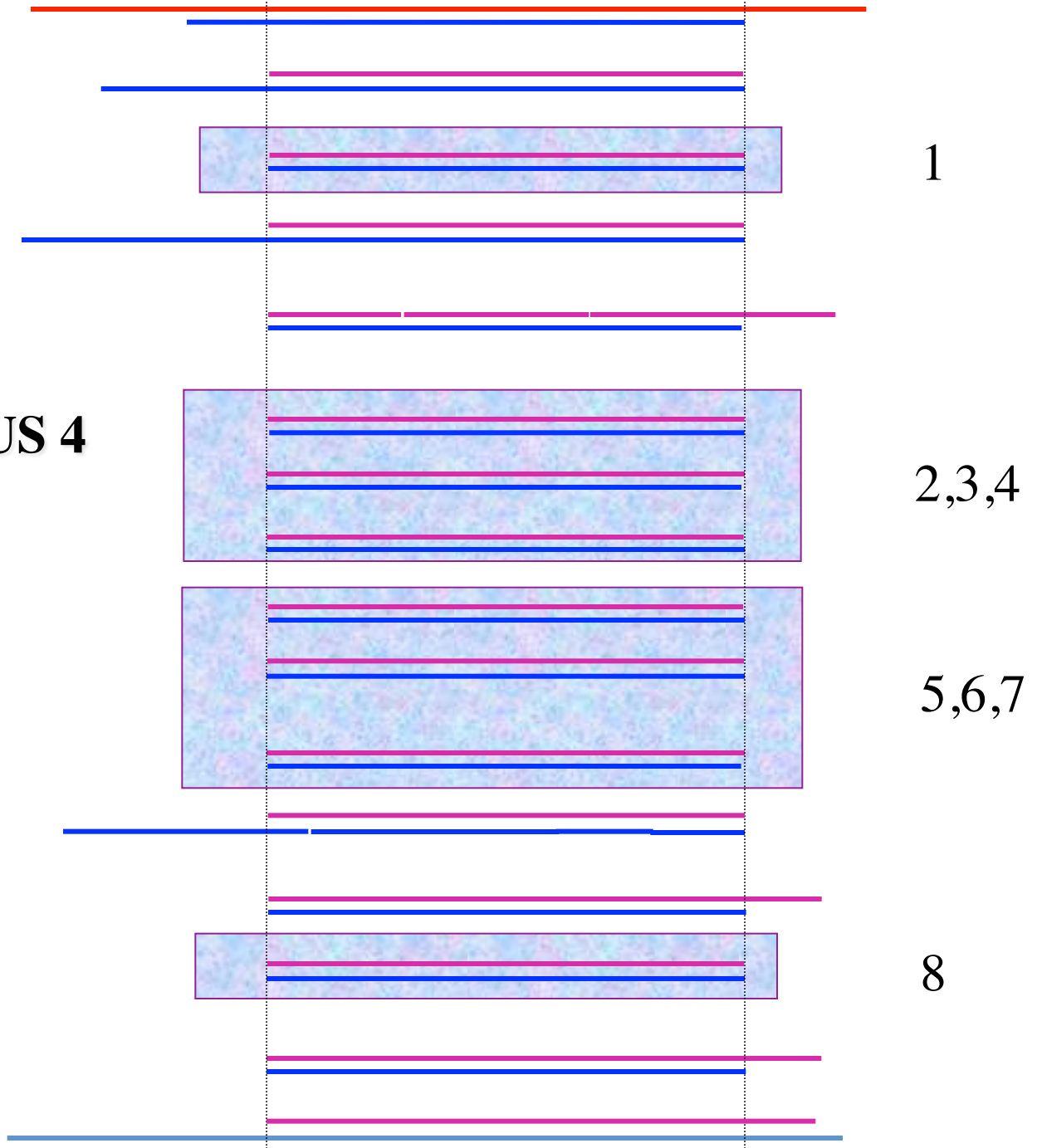
**Bağlanma
55°C**

PCR SIKLUS 4



**Ekstansiyon
72°C**

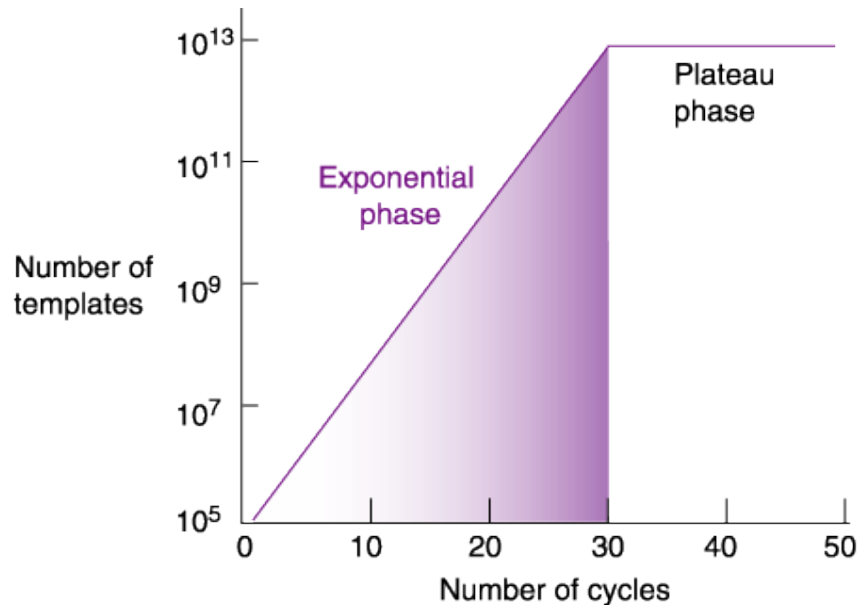
PCR SIKLUS 4

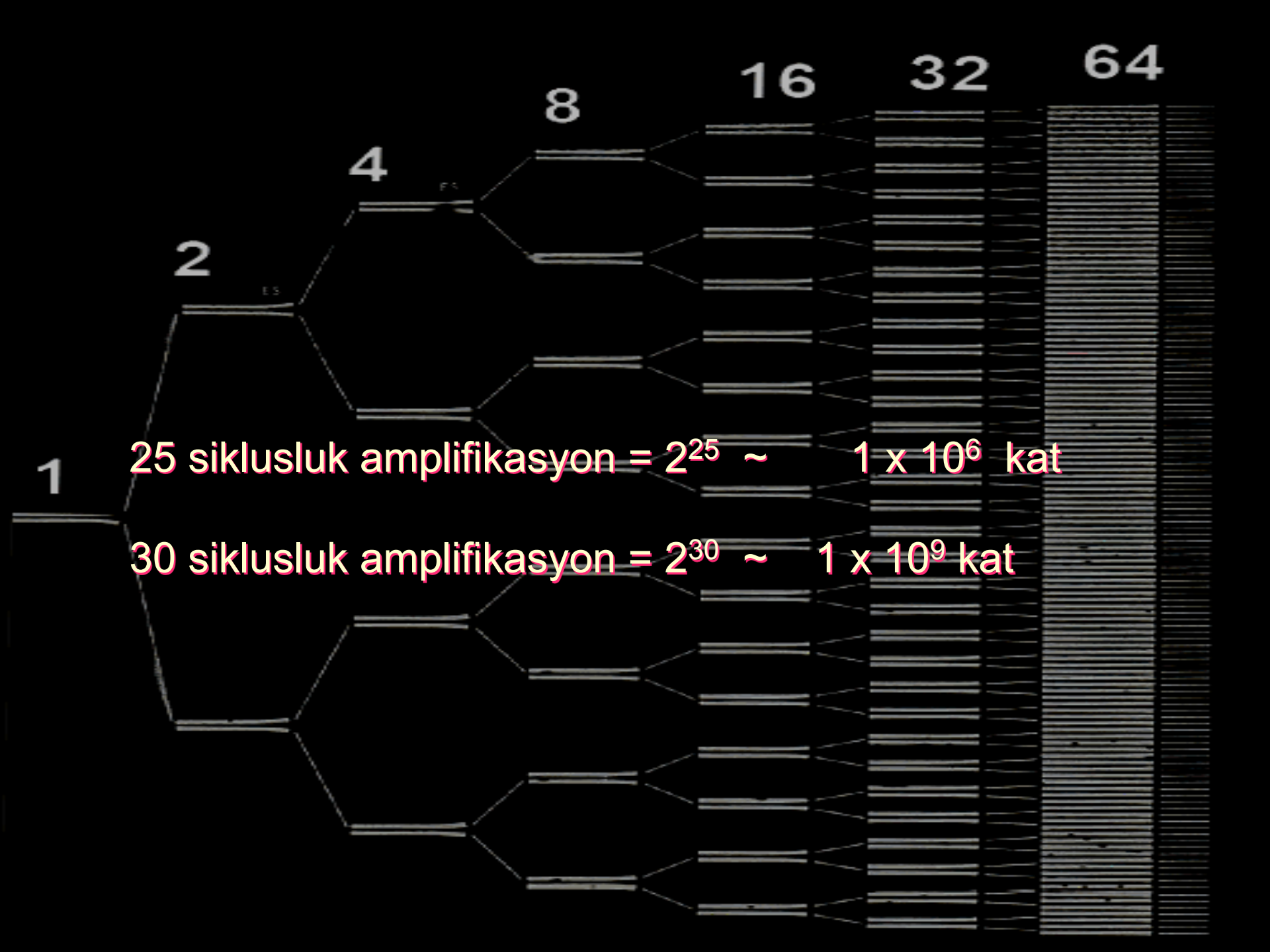


Varsayalım ki sadece tek bir DNA molekülü mevcut

- 4. siklus $1(1+1)^3=8$
- 5. siklus $1(1+1)^4=16$
- 6. siklus $1(1+1)^5=32$
- Belirli sayıdaki siklusun ardından etkinlik düşer

$$No(1+Y)^{n-1}$$





PCR



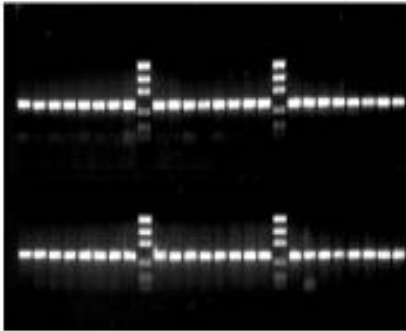
Agaroz jel elektroforezi



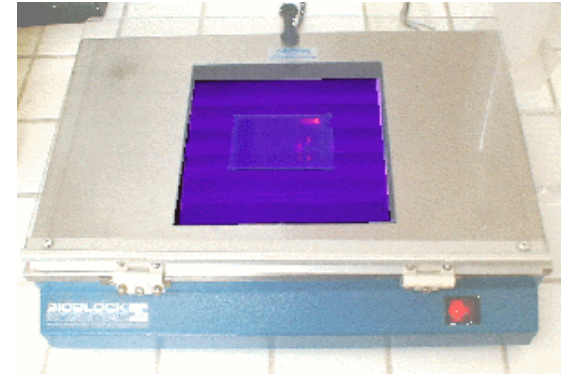
3-4 saat



Reliable PCR from Every Sample



Son ürün

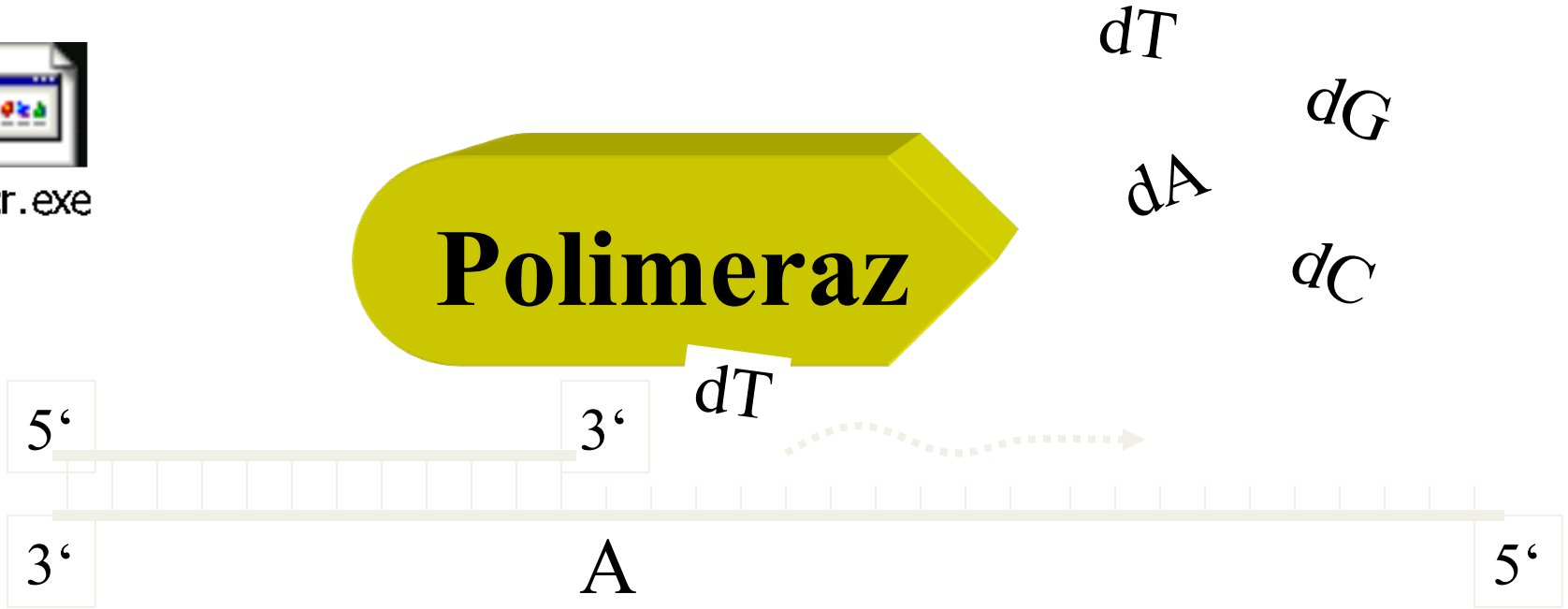


UV görüntüleme

Polimerizasyon



Pcr.exe



- Nükleofilik etki
- Fosfodiester bağlarının katalizi

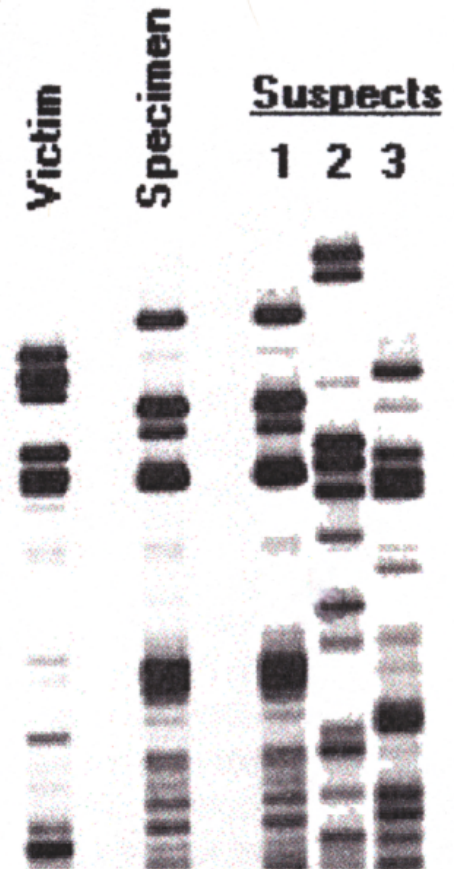
PCR'ın Kullanım Alanları

- 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

Forensik teşhiste PCR:

Example 3: Multilocus Fingerprinting

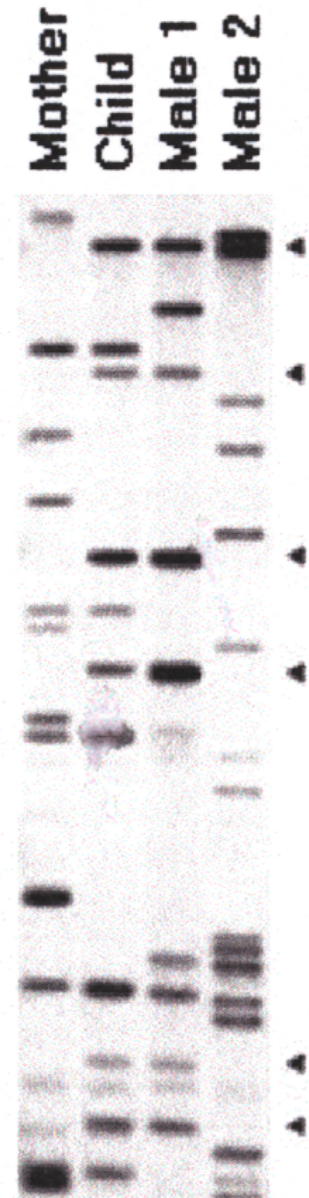
Multilocus fingerprinting to match trace evidence from a crime with suspects. Which suspect matches the specimen?



Analık-babalık tayini:

Example 2: Multilocus Fingerprinting

Microsatellite fingerprinting to establish parentage. The probe, $(CAG)_5$, recognizes a large number of loci. Examine the bands detected in DNA from the child that are not detected with DNA from the mother. Which male is the biologic father of the child?



PCR'in avantaj ve dezavantajları

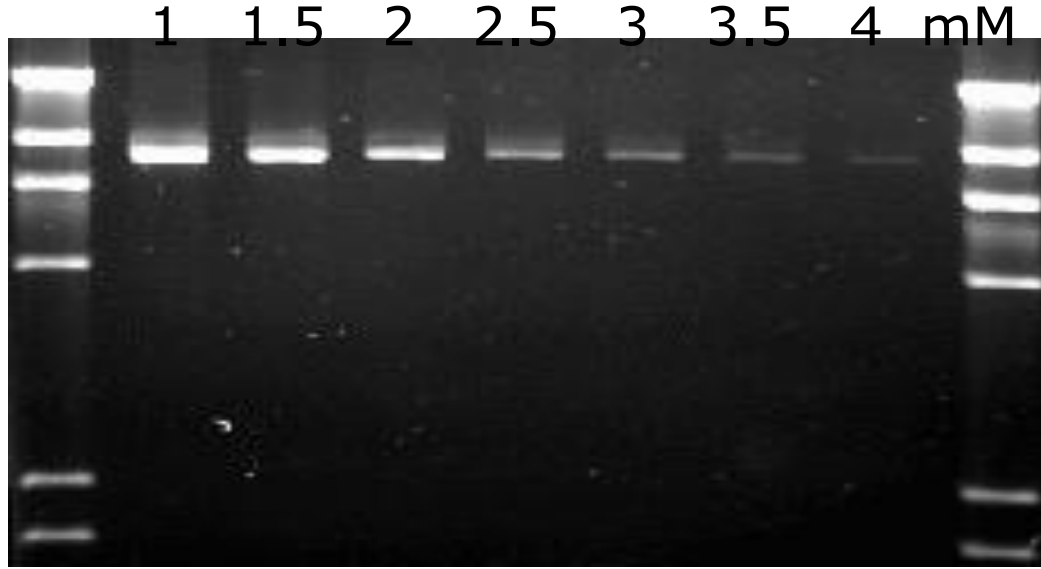
- yüksek özgüllük ve duyarlılık
- Saptama ve tanı hızı
- cansız etkenleri saptayabilme yeteneđi
- Nazlı üreme özelliğinde ve çevre şartlarına karşı hassas etkenler
- geç üreyen etkenler
- İleri çalışmalarına (tiplendirme, sekans analizi, klonlama) olanak sağlaması
- Kesin teşhiste izolasyonun yerini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

PCR OPTİMİZASYONU

Magnezyum iyonları

- *dNTP-Mg²⁺ kompleksleri*
- Nukleik asitlerin şeker-fosfat omurgası ile etkileşime girer
- *Taq polimeraz aktivitesini etkiler*
- 0.5 veya 1mM'lık oynamalarla MgCl₂ konsantrasyonu 0.5-5 mM arasında değiştir
- *dNTP kons. Değişirse MgCl₂ da değiştir*
- MgCl ise bant yoğ. İse non-spesifik ürün
 ↓ ↓ ↑

Optimal Mg²⁺ Konsantrasyonu!



Normal olarak , 1.5mM MgCl₂ optimal

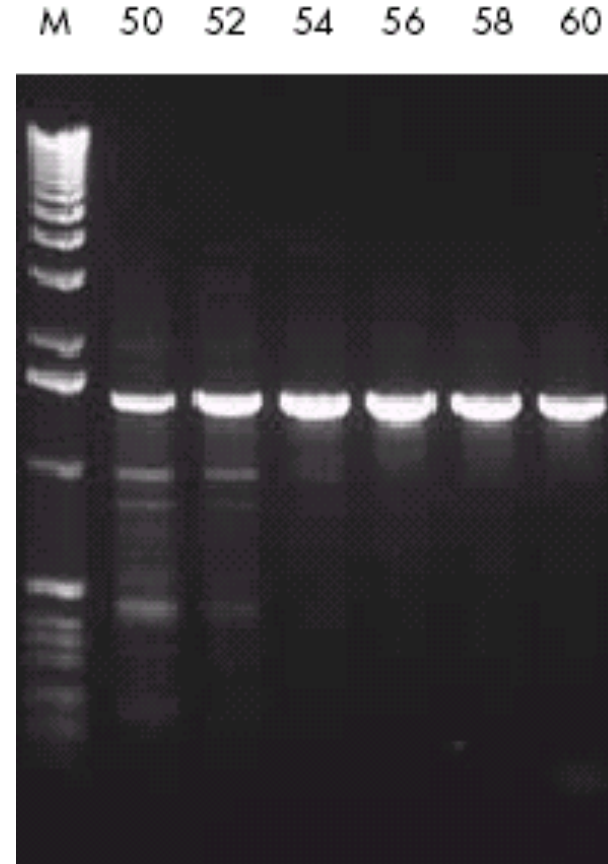
Ayrı olarak temin edilmeli

MgCl₂ kullanılmadan önce çözdürölüp vortekslenmeli

Mg²⁺ konsantrasyonu DNA, primer ve nukleotid miktarına bağılı olarak belirlenmelidir

Primer bağlanma (annealing) sıcaklığının optimizasyonu

- Primerlerin T_m değerleri hesaplanabilir (örn. 54°C).
- Touchdown-PCR
- Gradient thermal cycler kullanımı.



PCR etkinliğini artıran kimyasallar

- *DMSO (dimetil sülfoksit)*
- %5'lik formamid
- *10-100 μ 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

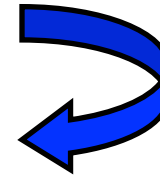
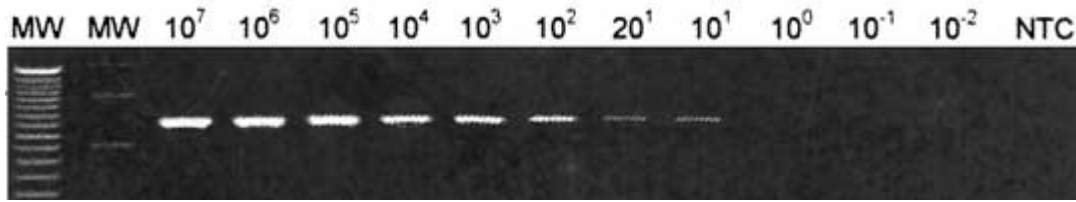
- *biyolojik materyaller (kan, idrar, balgam, BOS,...vs.)*
- DNA ekstraksiyon metodu
- *DNA izolasyonunda kullanılan reaktifler*
- Kan---- heparin, porfirin bileşikleri
- SDS
- Proteinaz-K

Çözüm:

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

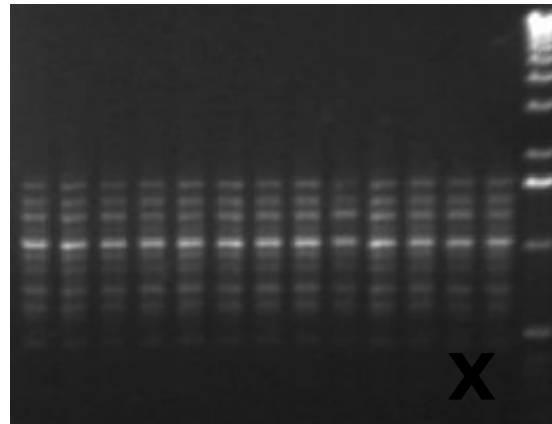
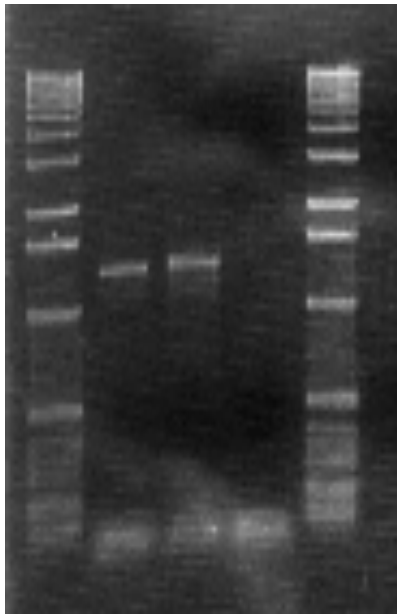
Zayıf bantlar ya da bantın görülmemesi

- Eklenmemiş bileşen
 - PCR karışımı tekrar hazırlanır
- Yanlış yoğunlukta bileşen
 - Template DNA
 - Primer kon.
 - *Taq polimeraz*
 - $MgCl_2$
- Primer hatası
 - Sekansları kontrol et (Blast)
 - Alternatifi kullan
 - Pozitif kontrol ile test et
- Template'e bağlı sorun
 - Template'i jelde kontrol et
 - Fragmentasyon
 - PCR inhibitörleri
 - Daha önce çalışmış PCR'a ekle
 - Çok fazla DNA
- Hatalı PCR koşulları
 - Bağlanma sıcaklığını düşür
 - $MgCl_2$



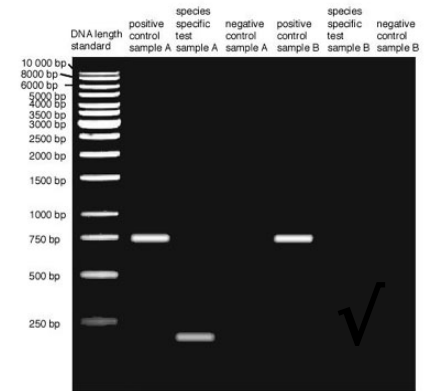
**template DNA
konsantrasyonu**

M 1 2 T M



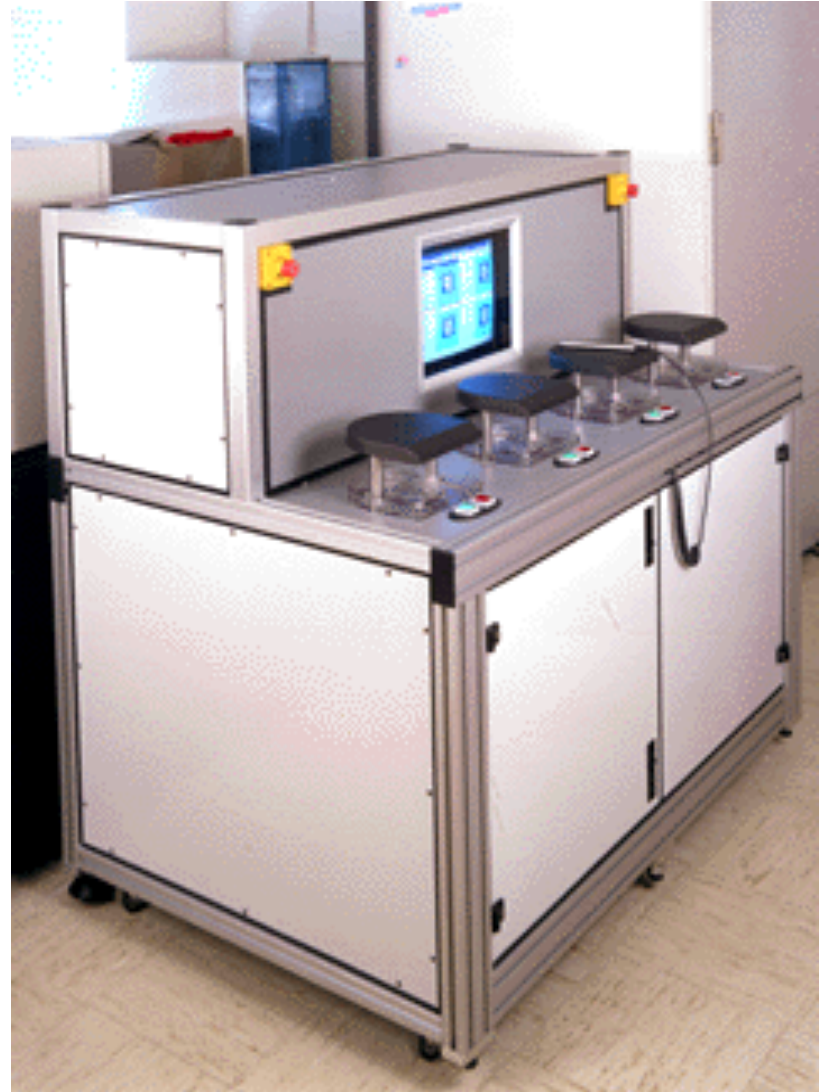
← PCR ürünleri

← Artefaktüel ürünler



Thermal Cycler Modelleri







Portatif Moleküler Biyoloji Laboratuvarları!!!