

PCR TEKNİKLERİ

Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

İmmunolojik Substansların Saptanması

- Ag;

ELISA, RIA, FA, IP, Immunblot, Protein Dot Blot, İn Situ İmmunperoksidaz

- Ab;

ELISA, RIA, FA, IP, Immunblot

Genetik Materyallerin Saptanması

- A)Nükleik Asit Hibridizasyon Tek.
 - Southern Blot Tekniği
 - Dot Blot Tekniği
 - İn Situ Hibridizasyon
- B)Nükleik Asit Amplifikasyon Tek
 - a)Transkripsiyonla Amplifikasyon Teknikleri
 - b)Prob Moleküllerinin Amplifikasyon Teknikleri
 - c)DNA Amplifikasyon Teknikleri

- a) Transkripsiyonla Amplifikasyon Teknikleri
 - Transkripsiyona Dayalı Amplifikasyon (TAS)
 - Self-Sustained Sequence Replication (SSSR)
 - Standart Displacement Amplification (SDA)
- b) Prob Moleküllerinin Amplifikasyon Teknikleri
 - Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR)
 - RNA Prob Moleküllerinin Q Beta Replikaz ile Amplifikasyonu
- c) DNA Amplifikasyon Teknikleri
 - Polimeraz Zincir Reaksiyonu

- PCR bakteri, virus, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak invitro olarak çoğaltılmasını sağlayan; oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir.
- Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA'lar arasında olsalar bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilip kolayca identifiye edilebilir

Genetik Materyaller

- Nükleik asitler nükleotid adı verilen alt birimlerden oluştuğu için polinükleotid olarakta adlandırılırlar
- Nükleotid=şeker+baz+fosfat
- DNA eşleşmiş iki polinükleotid zincirinden ibaret ikili sarmaldır.
- Hidrojen bağları ile bir arada tutulurlar
- Denatüre ve renatürasyon özelliği vardır
- Nükleik asitlerin kendi kendini çoğaltma yeteneği vardır

Mitochondria
Plasma membrane
Endoplasmatic reticulum
Golgi apparatus
Filamentous cytoskeleton
Nucleus
Lysosome

Genome = total of all chromosomes

chromosome fragment

chromosome

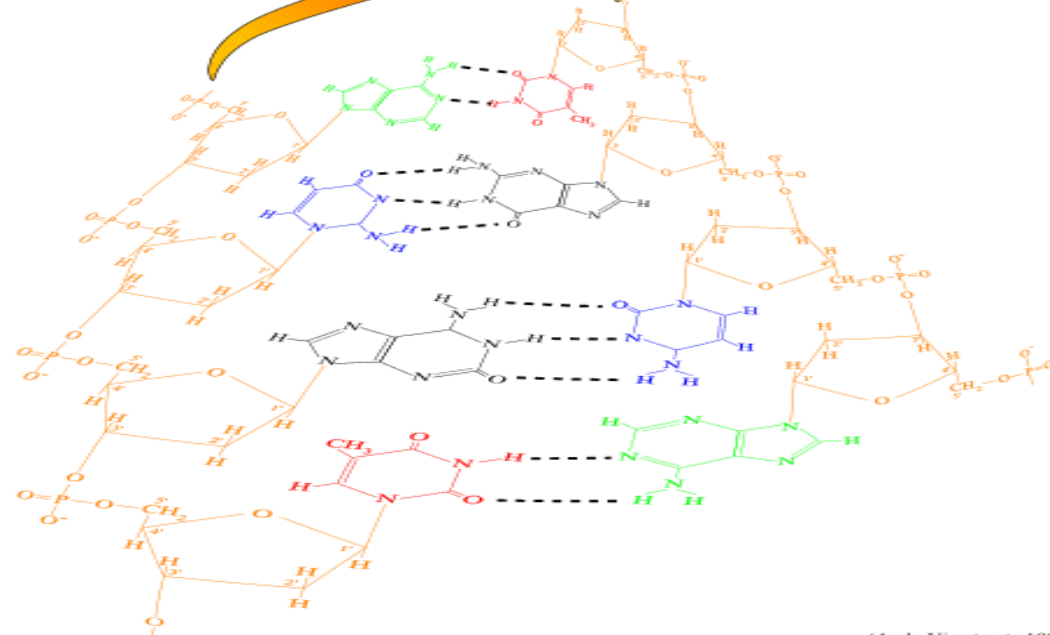
gene

nucleotide basepairs

sugar-phosphate backbone

hydrogen bond

base

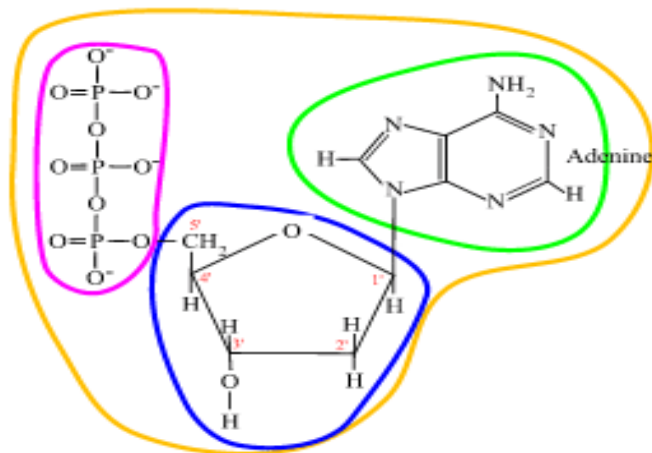


The components of nucleotides

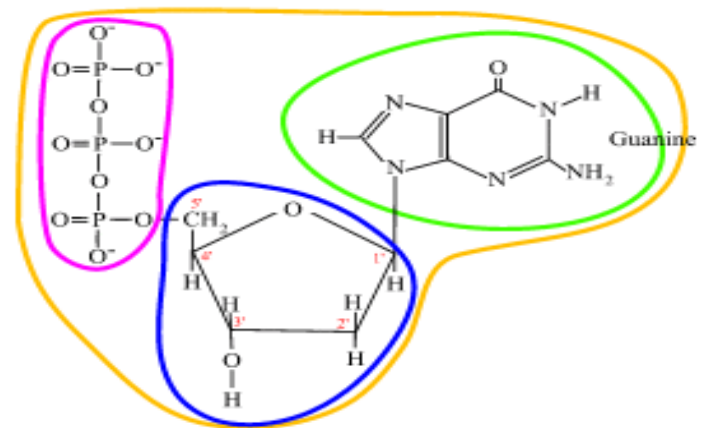
Nucleotide = base + sugar + phosphate

4 different dNTP's (deoxynucleoside triphosphate) :

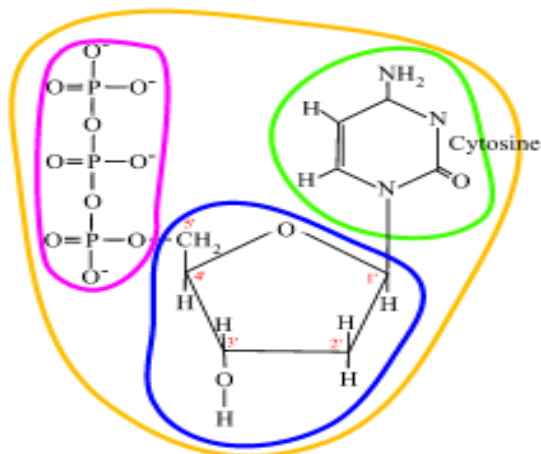
deoxyadenosine triphosphate = dATP



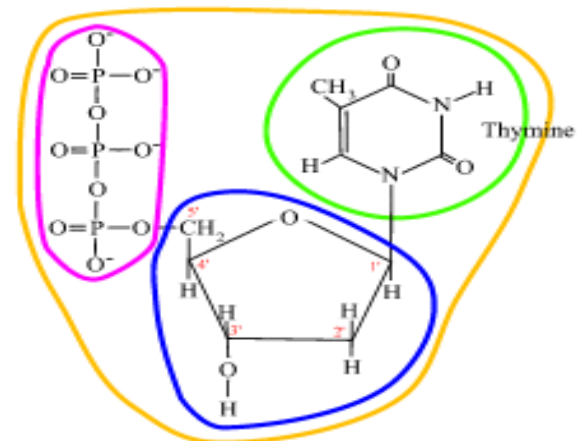
deoxyguanosine triphosphate = dGTP



deoxycytidine triphosphate = dCTP



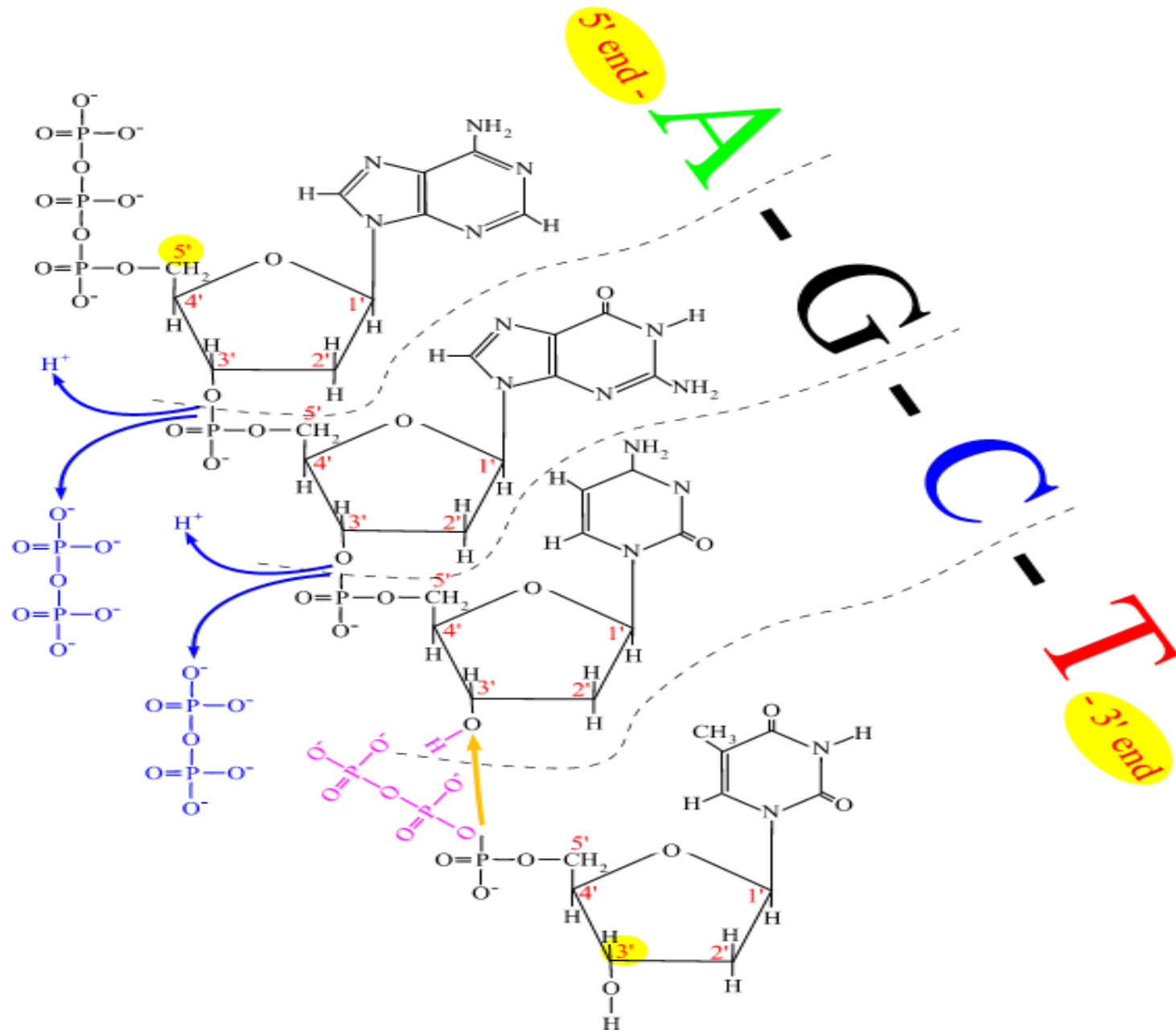
deoxythymidine triphosphate = dTTP



DNA'nın Yapısı

- DNA=baz+şeker+fosfat
 - Baz=Pürin bazlar(A, G),Pürümidin bazlar(C, T)
 - Şeker=2-deoksi D riboz
 - Fosfat
- Çift iplikçikli yapıdadır

From nucleotide to DNA



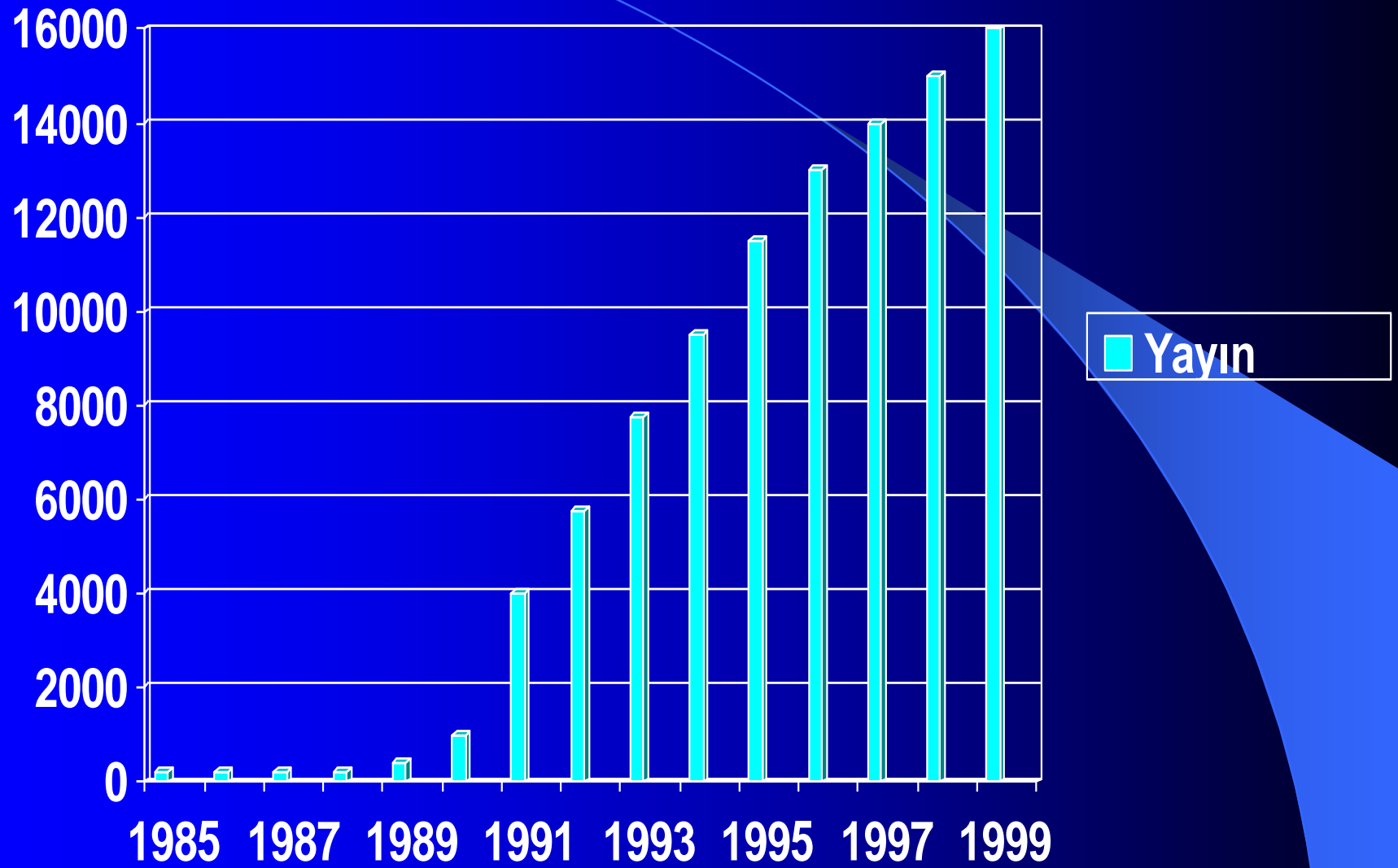
RNA'nın Yapısı

- RNA=baz+şeker+fosfat
 - Baz=Pürin bazlar(A, G),Pürümidin bazlar(C, U)
 - Şeker=D riboz
 - Fosfat
- Tek iplikçikli yapıdadır

PCR'ın Tarihçesi

- 1971 yılında Khorana ve ark.dizayn ettikleri primer ile DNA'yı çoğaltabileceklerini tanımladılar
- Fakat kullanılan yöntemle ampliconları çoğaltmadılar
- 1983'te Karry Mullis PCR'ı keşfetti
- 1985'te Saiki ve ark. DNA polimeraz I'in Klenow fragmentini PCR ile tanımladılar
- 1986'da Cetus Corp ve Perkin Elmer Corp, Perkin Elmer Cetus adı altında birleşerek alet ve kimyasal üretmeye başladı.

- 1987'de Cetus ortağı Kodak ile PCR temeline dayalı teşhis metodu geliştirdi.
- 1988'de Saiki ve ark. PCR'da Taq DNA polimerazı ilk defa kullandılar.
- 1993'te PCR muciti Karry Mullis Kimya alanında Nobel ödülü kazandı.
- Bugün için onlarca ticari firma PCR ürünleri üretmektedir



PCR'ın Temel Mekanizması

- Hedef DNA sekansının invitro olarak enzimatik amplifikasyonunu sağlayan oldukça güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir
- “Bakterisiz klonlama tekniği”
- PCR işlemi ile DNA amplifikasyonunun pensibi sıcaklık, zaman ve siklus sayıları istenildiği şekilde ayarlanabilen özel cihazlarda 3 aşamada gerçekleşir.

1.FAZ:Ayrışma(Denatürasyon)

- Çift iplikçikli DNA'nın denatürasyonu sağlanır.
- Ortamda buffer, dNTPs, primerler ve enzim vardır.
- Isı 91-94 °C olup, reaksiyon 1-2 dakika sürer.
- Denatürasyon süresinin uzun olması, Taq polimeraz enzim aktivitesinin kaybını hızlandırır

2.FAZ: Birleşme (Annealing)

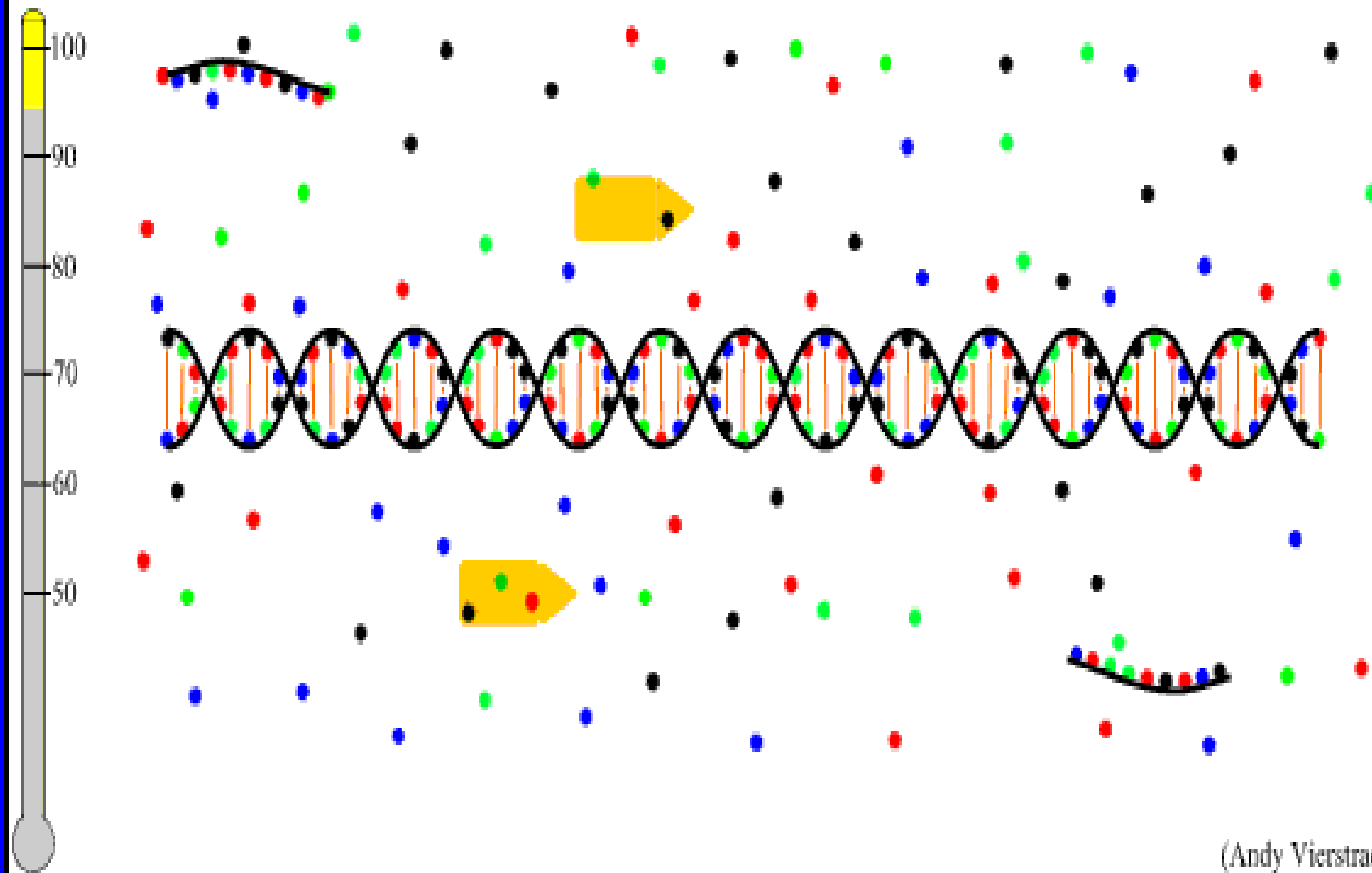
- DNA tek iplikçikli hale dönüşmüştür.
- Primerler bu aşamada hedef DNA'ya bağlanır.
- Reaksiyon ısısı 50 °C civarına düşürülür.
- Isının aniden düşmesiyle primerler DNA matrisi üzerinde yoğunlaşır.
- Isı yüksek olduğunda bağlanma şekillenmezken, ısı çok düşük olduğunda da primerler yanlış yere bağlanabilir ve primer dimerleri oluşur
- Isı 37-65 °C arasında değişmekte olup, reaksiyon 2-5 dakika sürer.

3.FAZ:Uzama (Polimerizasyon)

- Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primerler ve kalıp olarak tek iplikçikli DNA'nın kullanılarak invitro koşullarda çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesidir (Elongation, extension).
- Reaksiyon 70-72 °C'de 2-3 dakikada tamamlanmakta olup, enzim 5'—3' yönünde aktivite göstererek primerlerin 3' uçlarından başlayarak ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA diziliminin kopyasını yapar.
- Reaksiyon ısısı tekrar 94 °C'ye çıkarılarak bir siklus tamamlanmış olur.

PCR :

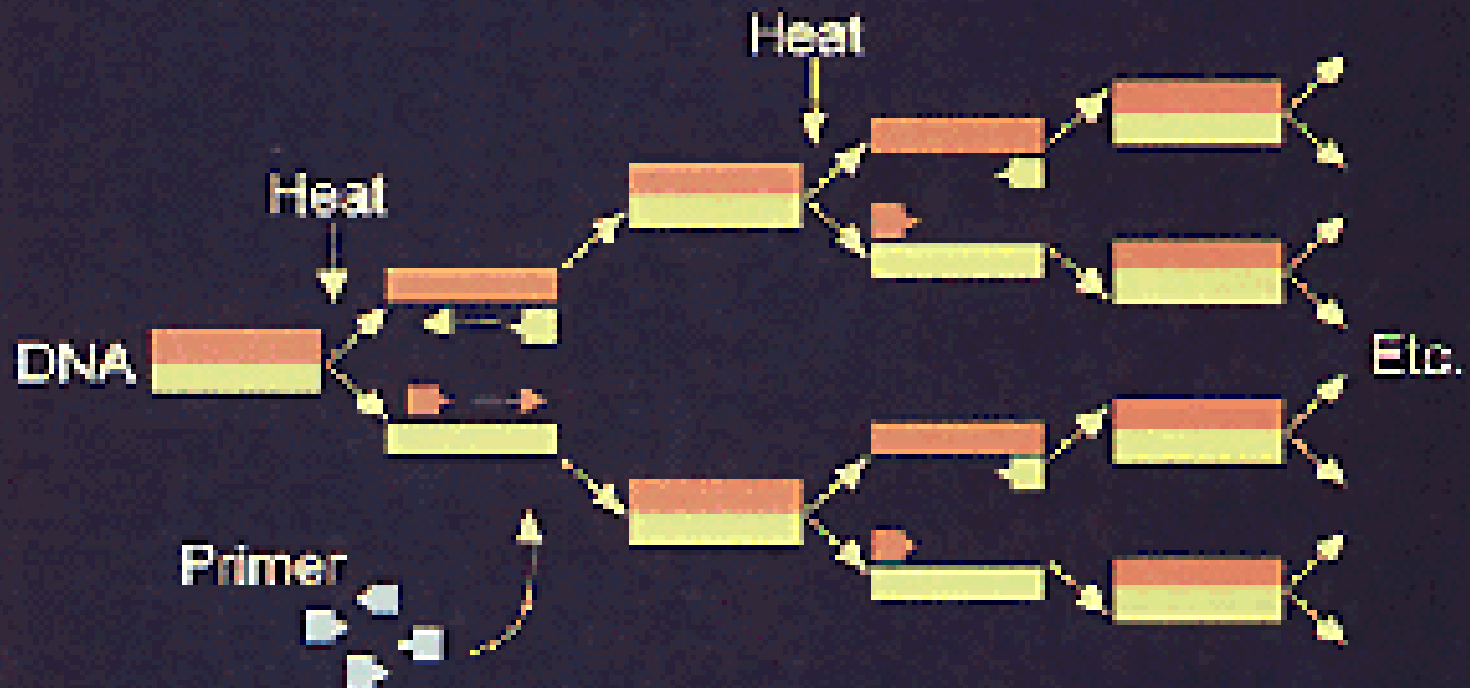
Denaturation 94°C



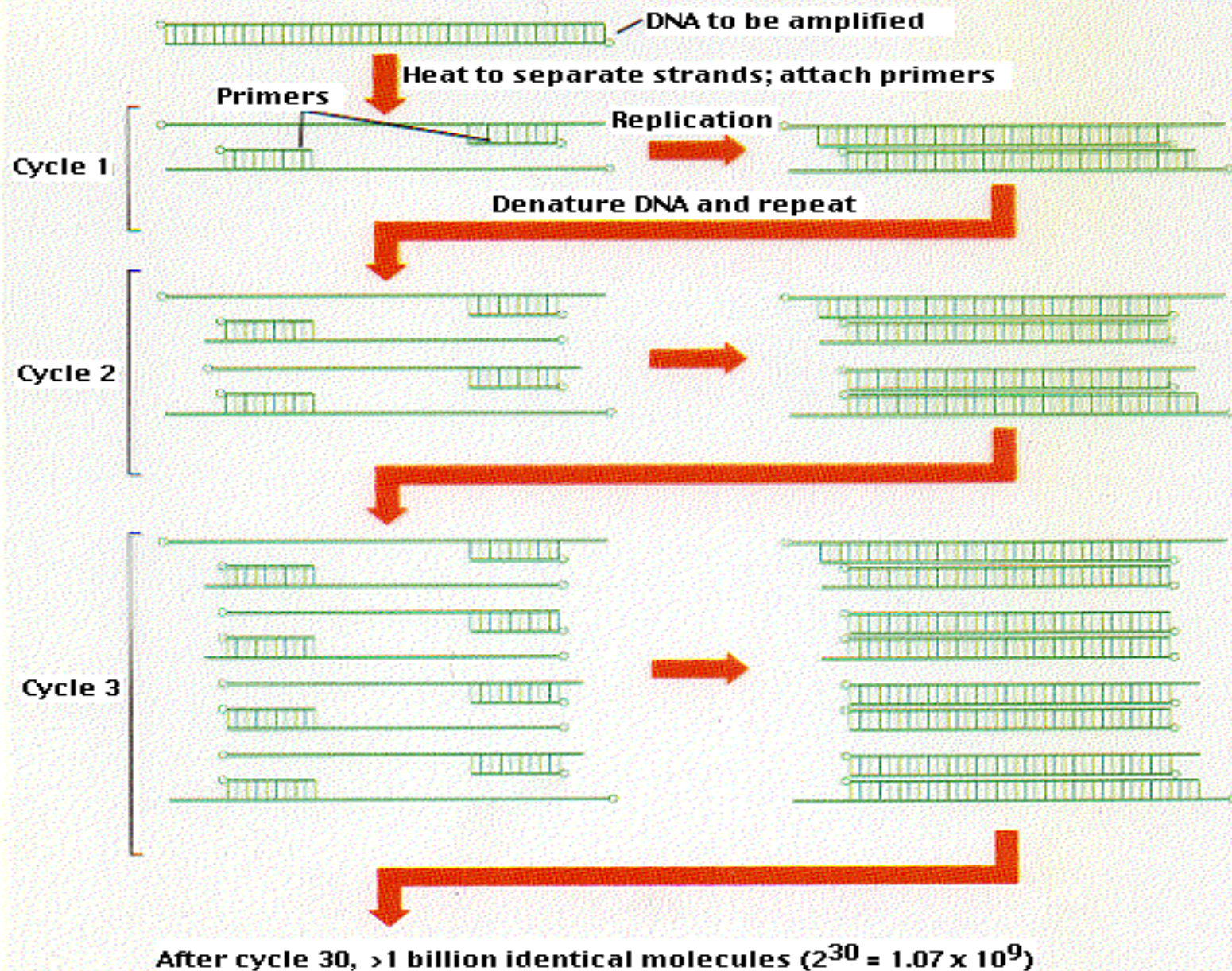
(Andy Vierstraete 1999)

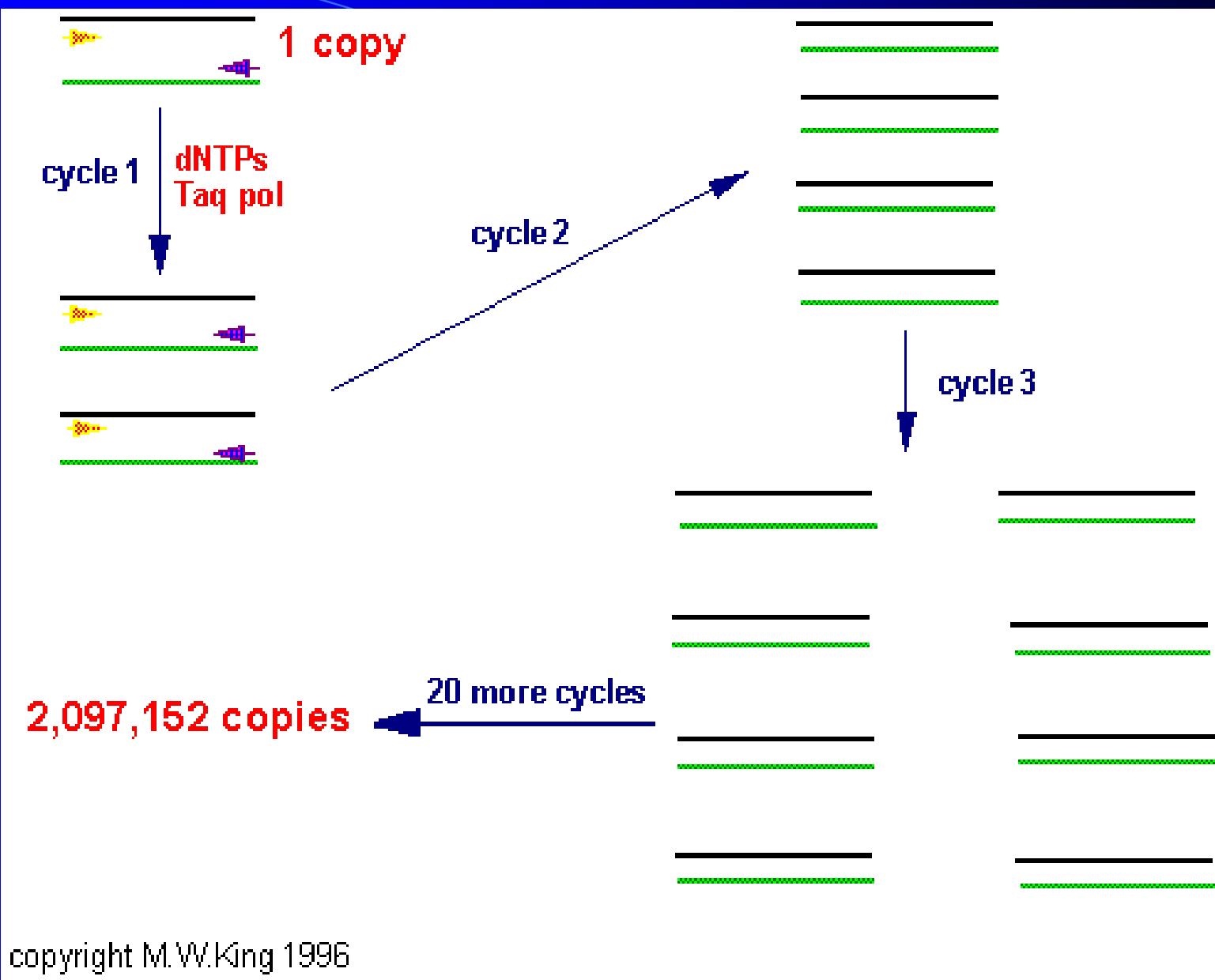
- Her siklusta DNA'nın miktarı bir kat artar.
- 3 aşamadan oluşan ve yaklaşık 10-15 dakika süren birinci amplifikasyon aşaması tamamlanmış olur.
- Etkin bir DNA amplifikasyon için gerekli siklus sayısı genellikle 25-40 arasındadır.
- 25 siklusta DNA bölgesi yaklaşık 1 milyon kat, 30 siklus sonra 270 milyon kat arttırılmış olur.
- Deneysel koşullarda verim oranı % 85 kadardır.

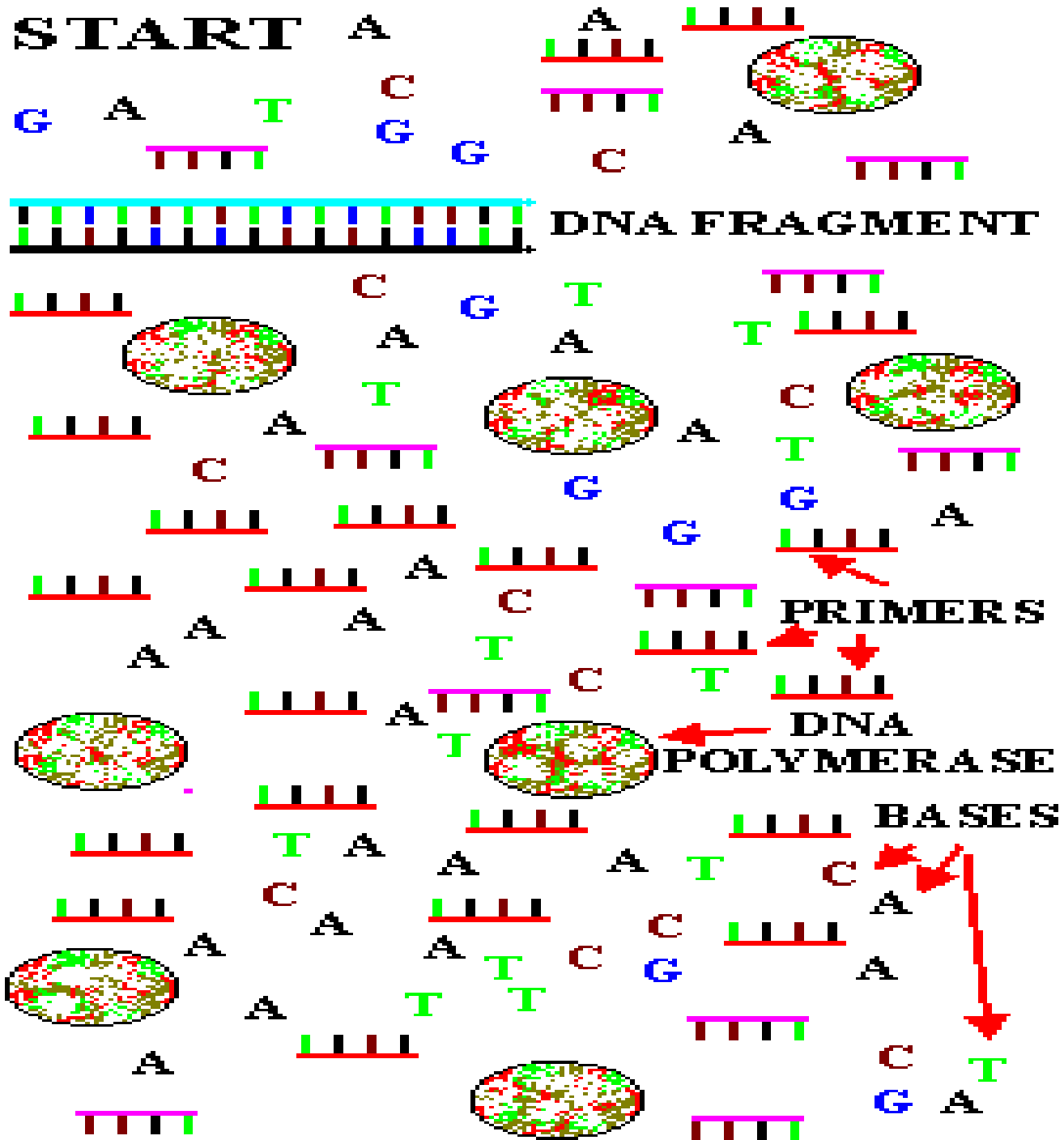
Polymerase Chain Reaction (PCR)



PCR Demo







PCR'ın Temel Bileşenleri

- Matris veya Kalıp DNA (Template)
- Primerler (oligonükleotidler)
- Polimeraz enzimleri
- Deoksinükleotid-trifosfat (dNTPs)
- Tampon solüsyonlar (Buffer)

Matris veya Kalıp DNA (Template)

- Çoğaltılacak olan genetik materyaldir.
- Bakteri, virus, genomik DNA, plazmid ve faj DNA'sı, çeşitli genler olabilir
- Kan, serum, vücut sıvıları, dokular, organlar, fikse edilmiş dokular çok kullanılır.
- Hedef zincir olarak RNA kullanılacaksa, reaksiyon başlamadan önce revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA cDNA'ya çevrilir ve bu kalıp olarak kullanılır.

Primerler (Oligonükleotidler)

- Hedef DNA'dan yeni DNA sentezini başlatan ufak DNA parçacıklarıdır.
- İşaretlenmiş nükleotidlerden oluşmuş sekanslar olup sentez için basamak oluşturan, DNA'yı PCR tekniği ile amplifiye edebilmek için kullanılan, başlatıcı yardımcı oligonükleotidlere primer denir.
- Primer DNA matrisinin belli bir bölümünün sonu ile komplementer bir yapıya sahiptir.
- Primerleri 5' ucu hedef DNA'nın 3' ucu ile birleşir ve polimerizasyon için 5' → 3' yönünde uygun bir ortam sağlar.

- Primerlerin uzunluğu en az 16, ortalama 20-24 baz uzunluğunda olmalıdır.
- Primer tasarlanırken 4 bazın eşit dağılımına
- Hedef DNA'nın 100-1000 bp uzunlukta olmasına
- 10-12 adet G veya C olmasına
- Tm değerinin 60 °C olmasına
- Sekonder yapılar içermemesine
- 3' ucunda dimer oluşumuna imkan vermemesine
- AAA-3' ve TTT-3' ile sonlanmamasına özen göstermelidir.
- 30 siklus için 1 μ M konsantrasyon yeterlidir.

- Düşük konsantrasyon az ürün oluşmasına, yüksek konsantrasyon ise düşük spesifiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı amplikonların tespiti ile mümkündür.
- Yine yüksek primer konsantrasyonu primer-dimer artifaklarının oluşmasına neden olur.
- Primerlerde polibaz(poly G) veya tekrarlayan diziler olmamasına dikkat edilmelidir.
- Primer tasarımı % 50-60 G+C bileşimine sahip ve 18-28 baz uzunluğunda nükleotidlerden oluşmalıdır
- Bilgisayar programları primer tasarımı yaygın olarak kullanılmaktadır

- Bir primer çiftinin T_m 'si hesaplamış olmalı ve pratik olarak A veya T için 2 °C, G veya C için 4 °C hesaplama kullanılabilir.
- Uygulamaya bağlı olarak 55-80 °C arasında T_m istenir.

Polimeraz Enzimleri

- İlk kullanılan enzim E.coli'den elde edilen DNA polimeraz enzimidir.
- Termolabil bir enzimdir
- 1987 yılında T.aquaticus'tan elde edilen Taq DNA polimeraz kullanıldı, termostabildir.
- 95 °C'de yarılanma ömrü 40 dakikadır
- 72 °C' de maksimum aktivasyon
- 70-80 °C'de saniyede 30-60 baz ekstensiyon hızı 55 °C altında ve 85 °C üzerinde düşer
- Enzim konsantrasyonu 1-2,5 U/ 100µl arındadır.

- Enzim konsantrasyonu yüksek olduğunda nonspesifik eşleşme, düşük olduğunda ise zayıf amplifikasyon gözlenir.
- Piyasada mevcut Taq DNA polimeraz enzimleri % 50 gliserol içinde 5 U/ ml konsantrasyonda, dilisyon tamponu ile birlikte – 20 °C’de satılmaktadır.
- 1 ünite enzim 74 °C’de 10 nmol dNTP’yi bağlayarak ekstensiyon yapar.
- 10 ml PCR hacminde 2,5 ml enzim 25-30 siklus için yeterli olur.

- Diğer polimeraz enzimleri;

T.aquaticus → Amplitaq

T.flavis → Hot Tub ve Pyrotase

T.thermophilus → Tth

Pyrococcus furiosus → Pfu

Thermococcus litoralis → Vent polimeraz

B.stearothermophilus → DNA polimeraz

Thermus brockianus → DNA polimeraz

Thermus litoralis → DNA polimeraz

Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTP)

- DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP gereklidir.
- Primerler ve dNTP'ler hedef DNA'nın amplifikasyonu için gerekli hammaddeyi sağlar.
- Genelde dNTP konsantrasyonu 20-200 mM arasındadır.
- dUTP konsantrasyonu 600 mM konsantrasyonda olmalıdır.
- Normal PCR 100 μ M dNTP konsantrasyonu yeterlidir.

- Kullanılırken pH kontrol edilerek pH'sı 1 N NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmalıdır.
- Optimal dNTP konsantrasyonu;
 - MgCl_2 konsantrasyonu,
 - Reaksiyon koşulları,
 - Primer konsantrasyonu,
 - Çoğaltılmış ürün boyuna,
 - PCR döngü sayısına bağlıdır

Tampon Solüsyonlar (Buffer)

- En çok kullanılan Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olanıdır.
- Standart tampon solüsyonunda;
 - 10 mM Tris Cl (pH 8,4)
 - 50 mM KCl
 - 1,5 mM $MgCl_2$
 - % 0,001(w/v) jelatin
 - % 0,01 NPO_4O
 - Tween 20 olmakla beraber çeşitli modifikasyonları mevcuttur.

- Mg önemli bir enzim kofaktörü olup, dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar ve çift iplikçikli DNA'nın Tm değerini arttırırlar.
- Teorik olarak nükleotidler testte Mg ile 1/1 oranında bağlandığından nükleotidin iki katı Mg konsantrasyonu olması gerekir.
- Mg iyon konsantrasyonu 0,05-5 mM arasında olmalıdır.
- Yüksek Mg konsantrasyonu zayıf reaksiyon spesifitesine, düşük Mg konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olmaktadır.
- Dondurma çözme neticesinde Mg presipite olduğu için buzdolabında saklanmalıdır.

Reaksiyon Koşulları ve Kullanılan Ekipmanlar

- PCR laboratuvarı, DNA'nın saflaştırma işlemlerinin yapıldığı amplifikasyon öncesi odası, PCR karışımının hazırlandığı temiz oda ve DNA'nın analizinin yapıldığı amplifikasyon sonrası odası adı verilen üç farklı odadan oluşmalıdır.
- Özellikle temiz odaya diğer odalardan malzeme taşınmaması, odalar arasında direk geçiş olmaması kontaminasyonu önlemede önemli hususlardır.
- PCR öncesinde kullanılacak materyalin yapısına göre ekstraksiyonu yapılarak inhibitör maddelerden ayıklanır ve PCR sonrası amplifiye nükleik asit analiz edilir.

● Gerekli aletler;

- Thermal cyclers
- Mikrosantrifüj
- Otomatik pipetler
- Derin dondurucu
- Analitik terazi
- UV laminar flow
- Agaroz jel elektroforez sistemi
- UV transimülatör
- Vorteks
- Mikrodalga fırın
- Fotoğraf makinesi
- Steril eldiven
- Saf steril su
- Pipet uçları
- Agaroz
- Ethidium bromit



Amplifiye Ürünün İncelenmesi

- Amplifiye ürün jel elektroforezi ile agaroz veya poliakrilamid olmak üzere iki farklı şekilde ayrıştırılabilir.
- Poliakrilamid jel genellikle düşey konumda kullanıldığı, hazırlanması daha zor ancak 5-500 bp arasında kullanışlı olduğu ve 1 bp'i dahi ayırabildiği bildirilirken, 200-50 000 bp arasında uygun olması , 4-30 °C gibi geniş bir ısı diliminde uygulama bulma özelliği vardır.

Agaroz Jel Elektroforezi

- Elektrik akımı uygulandığında negatif yüklü DNA'nın nötral pH'da anoda doğru hareketi esasına dayanan elektroforezde kullanılan saf agar elektroforez kalitesini artırır.
- En sık kullanılan tampon solüsyonlar; Tris asetat(TAE), tris-fosfat(TPE), tris-borat(TBE), alkalın gibi EDTA içeren tampon solüsyonlardır.
- Tamponda iyon yetersizliğinde iletkenlik azalarak hız düşmekte, fazlalığında iletkenlik artarak ısı oluşmaktadır.
- TAE tercih edilen solüsyon olmasına rağmen uzun süreli elektroforezde tükenerek anodun bazık, katodun asidik hale gelir

- TAE'den biraz pahalı olan TPE ve TBE uzun süreli elektroforeze dayanıklı olduğu ve hızı % 10 arttırdığı bildirilmiştir.

- DNA uzunluğu(bp) % (w/v) Agaroz Konst.

5 000-60 000	0,3
--------------	-----

1 000-20 000	0,6
--------------	-----

800-10 000	0,7
------------	-----

500- 7 000	0,9
------------	-----

400- 6 000	1,2
------------	-----

200- 3 000	1,5
------------	-----

100- 2 000	2,0
------------	-----

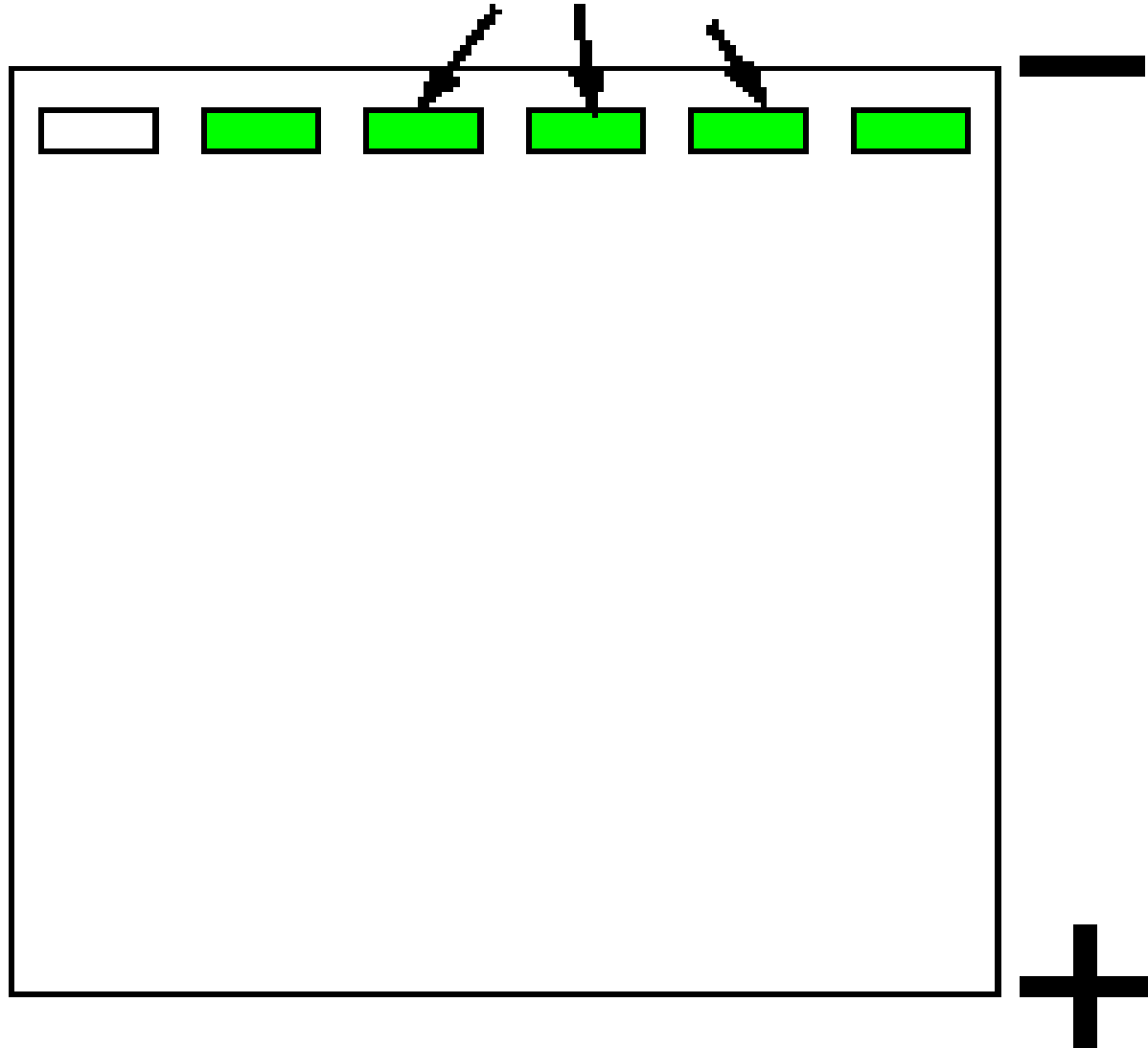
- Eritilen agaroz 60 °C'ye soğutularak jel tabakasına dökülür.
- 3-5 mm kalınlıkta dökülür ve 0,5-1 mm tabla ile boşluk kalacak biçimde tarakla delikler açılır.
- Elektroforez işleminde, jelin delikli kısmı katoda gelecek biçimde yerleştirilir ve jelin 1 mm üzerine kadar tampon solüsyonlar eklenir.
- Amplifikasyon ürünlerinin jeldeki çukurlara yerleştirilmeden önce yoğunluklarının artırılması, boyanması ve jelde ilerleme hızının görülmesi amacı ile karıştırıldıkları solüsyon yükleme tamponu olarak adlandırılır.
- 5 farklı tip yükleme tamponu vardır.

Boyama ve Görüntüleme İşlemleri

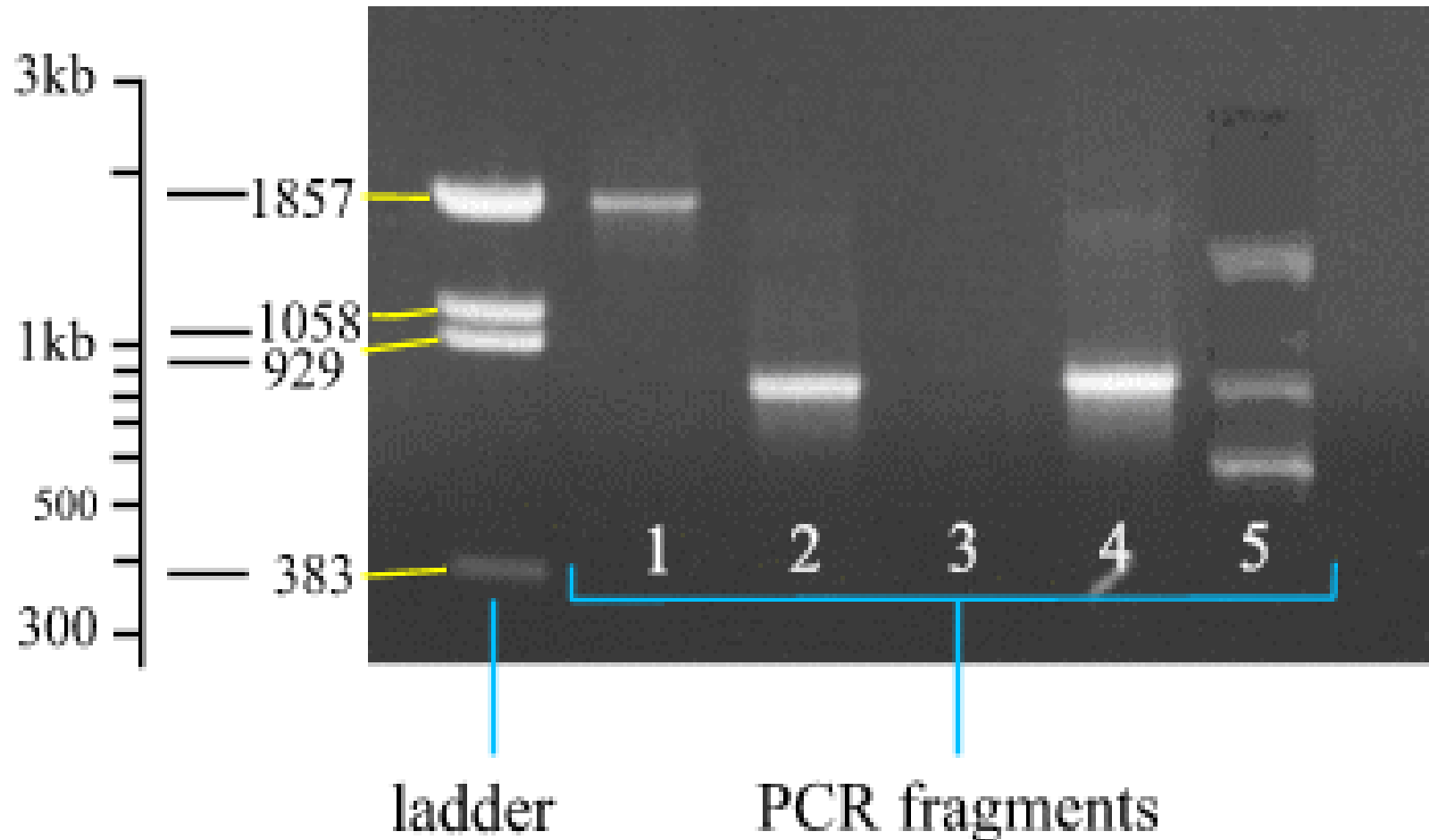
- Boyamada floresan boya olan Ethidium bromit kullanılır.
- Boya DNA zincirindeki bazların arasına girerek etkili olduğu, 254 nm dalga boyunda morötesi ışınların DNA tarafından absorbe edilerek ethidium bromide aktarıldığı, 302 ve 366 nm dalga boyundaki ışınların ise doğrudan boyayı etkilediği, sonuçta boyanın 590 nm boyunda kırmızı turuncu ışın yaydığı belirtilmiştir.
- Son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak miktarda ethidium bromitin 60 °C'ye soğutulmuş jelde kullanılması yaygındır.

- Bazların arasına giren Ethidium bromit, DNA'nın uzunluğunu ve kırılgenliğini arttırdığı, hareket hızını %15 azalmasına yolaçtığı, elektroforez sırasında DNA'nın ters yönde hareket ettiğı bildirilmiştir.
- Karsinojen olduğı için kullanılırken dikkatli olunmalıdır.
- Boyama sonrası jel mor ötesi bir ışık kaynağı (transsimilatör) üzerine konularak boyanmış DNA'ların görölerek fotoğraf makinasıyla fotoğrafi çekilir.

START WELLS FILLED
 WITH SAMPLE



Verification of PCR product on agarose or separide gel



PCR'ın Modifikasyonları

- Inverse (Tersine Dönmüş) PCR;
 - Bilinen bir diziye komşu olarak bulunan fakat bilinmeyen bazlara sahip olan DNA segmentlerini amplifikasyonunda kullanılır.
 - Bilinen sekansın iki ucunda bulunan ve baz sıraları bilinmeyen segmentler belli bir uzaklıktan restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilir ve iki tarafta yapışkan uçlar meydana getirilir.
 - Kesim sonunda moleküler lineer forma dönüşür.
 - İki yapışkan uç birleştirilerek molekül sirküler hale getirilir.
 - Ortada bulunan ve bilinmeyen sekanslara sahip DNA segmenti tekrar kesilerek linear forma dönüştürülür ki bu molekülün iki ucunda bilinen sekanslar bulunmaktadır.

- Bu iki uçta bulunan bilinen sekanslara komplementer iki ayrı primer hazırlanarak reaksiyon ortamına atılır.
- PCR için gerekli bileşenlerde ortama konarak konvansiyonel PCR basamakları takip edilir

Asimetrik PCR

- Sekans analizi protokollerinde önemli bir gelişme DNA'nın tek sarmalının çoğalmasına yol açan ve farklı miktarlarda primer DNA kullanılarak gerçekleştirilen Asimetrik PCR'dır.
- Örneğin 50 pmol bir primer, 0,5 pmol diğer primerdir. İki basamakta yapılır.
- Önce çift iplikçikli DNA çoğaltılır. Az olan primer tamamen kullanıldıktan sonra fazla olan primer tek DNA zinciri çoğaltılır.
- Bu DNA Taq polimeraz veya modifiye olmuş T7 polimeraz kullanılarak sekans analizine tabi tutulur

Homopolimerli PCR

- Primer bağlanma bölgesi olarak yalnız bir sekansın bilindiği durumlar için geliştirilmiştir.
- Bu teknik amplifikasyonu yapılacak gen molekülünün 5- terminus kodunun değişken olduğu veya bilinmediği durumlarda başarıyla kullanılmıştır
- Bu yöntemde mRNA revers transkriptaz kullanılarak cDNA'ya transkripte edilmekte ve poly (dG) kuyruğu deoksinükleotidil transferaz ile cDNA'nın 3'- ucuna eklenmektedir.
- Homopolimerli poly (dC) kuyruğu taşıyan bir primer poly (dG) bölgesine bağlanmakta ve ikinci iplikçinin sentezi başlamaktadır. Daha sonra spesifik 3'-ucu primeri ve homopolimerli primer kullanılarak reaksiyon standart PCR'a göre devam ettirilir

İn Situ PCR

- Morfolojik olarak sağlam doku ve hücrelerden DNA'nın amplifikasyonudur.
- İn situ parafinlenmiş veya arşivlenmiş dokular için geliştirilmiştir.
- Mikroskop lamı üzerine yapıştırılmış sağlam hücre ve dokular hedef DNA olarak kullanılır.
- Üzerine proteaz ilave edilerek proteinler giderilir ve %0,5 Nonidet P40'la permeabilitesi arttırılır.
- Gerekli komponentler ilave edilerek lamel kapatılır ve thermal cyclere yerleştirilerek konvansiyonel PCR'daki gibi devam edilir.

- Elde edilen ürünün spesifitesini anlamak için nonradyoaktif maddelerle (digoxigenin, biotin, vs.) işaretli probatla in situ hibridizasyon yapılır.
- İn situ hibridizasyon sadece tek hücre düzeyinde nükleik amplifiye etmekle kalmaz, aynı zamanda tek tek hücrelerden hangisinin hedef DNA sırası içerdiğini veya özel bir geni eksprese ettiğini tam olarak identifiye edebilir.
- Konvansiyonel PCR'da dokudaki spesifik bir hücre ile PCR sonuçları arasında korrelasyon kurmak tam mümkün değildir.
- İn situ PCR'da kontaminasyonlar en aza indirgenmiştir.



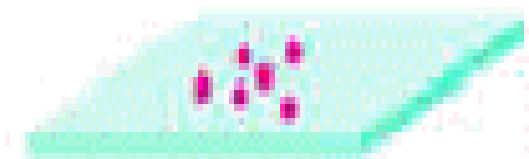
in situ PCR



agarose gel
electrophoresis



Southern blot

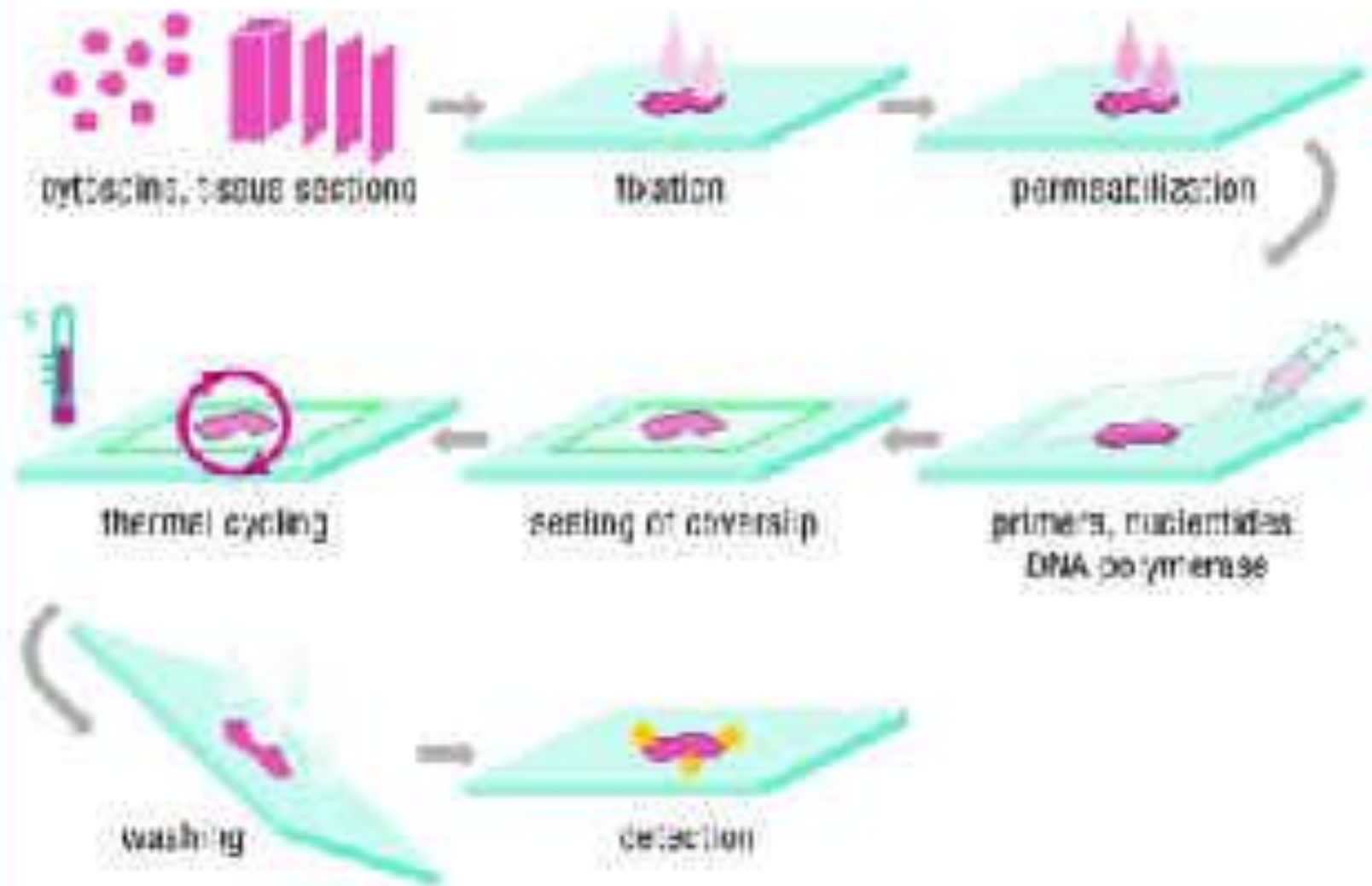


cytocentrifuge
preparations



in situ hybridization

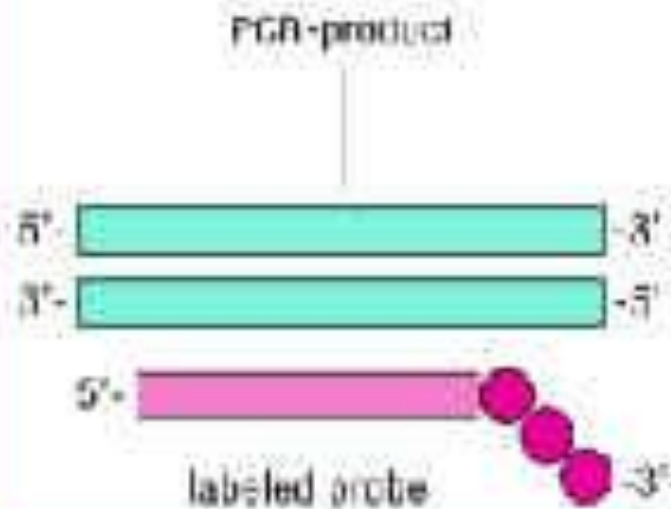
In Situ PCR on Glass Slides



Indirect *In Situ* PCR

in situ amplification

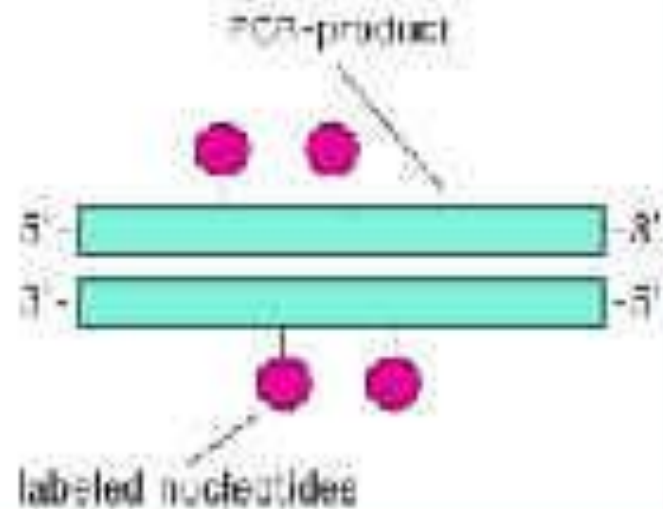
in situ hybridization
for detection



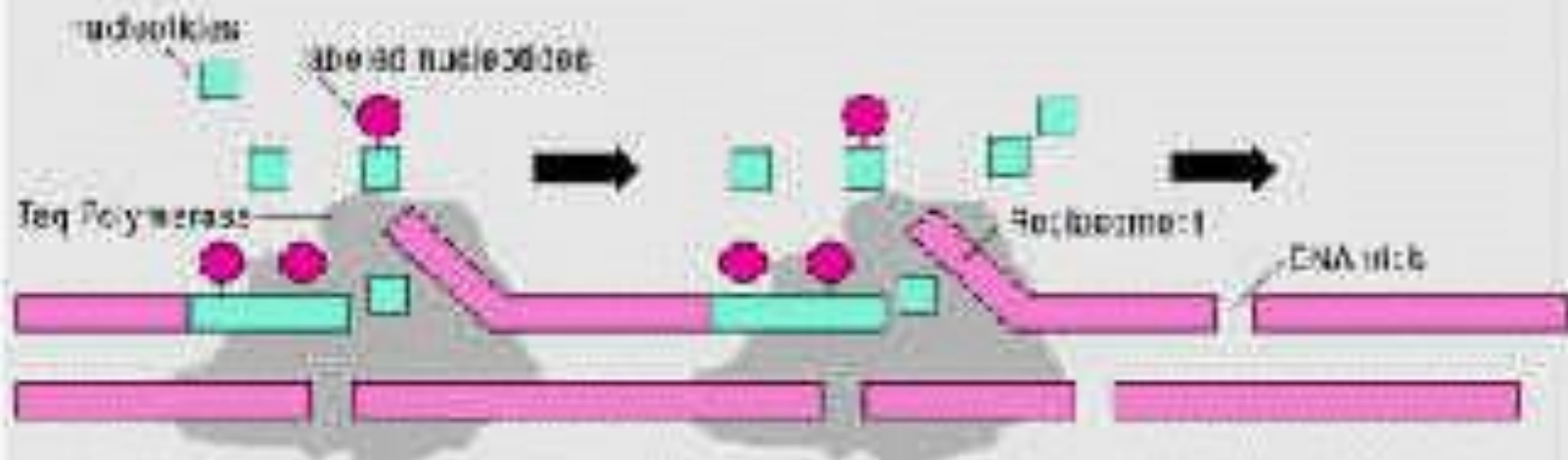
Direct *In Situ* PCR

in situ amplification with
incorporation of labeled
nucleotides

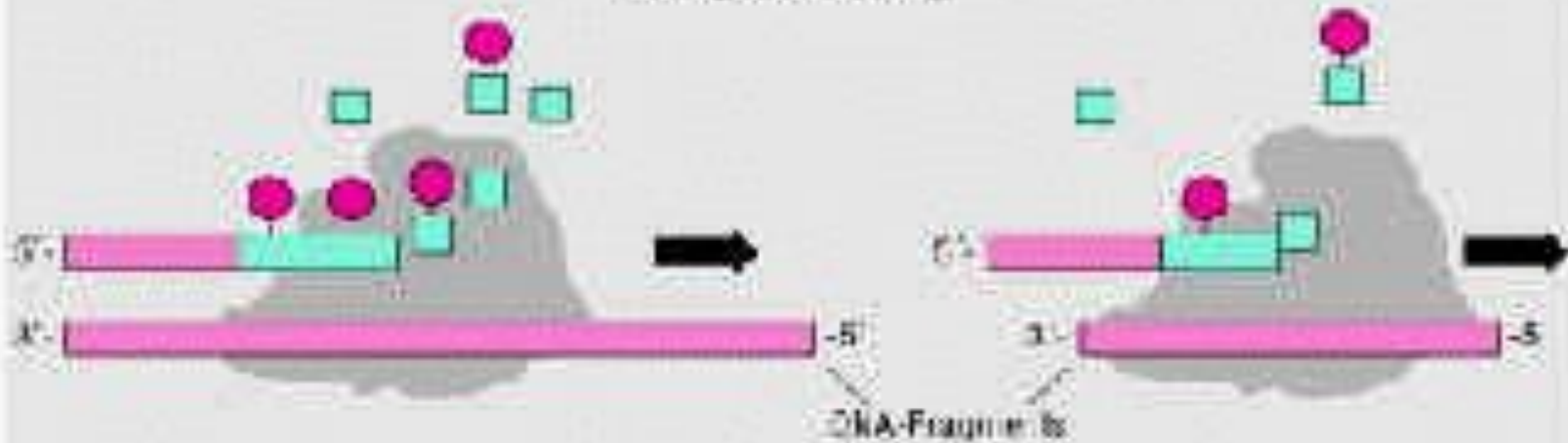
direct detection



DNA-Repair



Endogenous Priming



Hot Start PCR

- Konvansiyonel PCR'da reaksiyona girecek maddeler oda sıcaklığında ve aynı zamanda reaksiyona sokulur.
- Ancak primerler daha reaksiyon başlamadan oda ısısında Taq polimerazın etkisiyle hedef DNA dışında nonspesifik hedeflere bağlandığı ve yanlış sonuç (primer oligomerizasyonu, primer kaybı, nonspesifik amplifikasyon vs.) elde edilir.
- Hot start PCR'da reagentlerin bir kısmı oda ısısında (primerler, dNTP, $MgCl_2$, buffer), bir kısmı ise reaksiyonun optimal ısısında (Taq polimeraz, hedef DNA, buffer) reaksiyona sokulur.

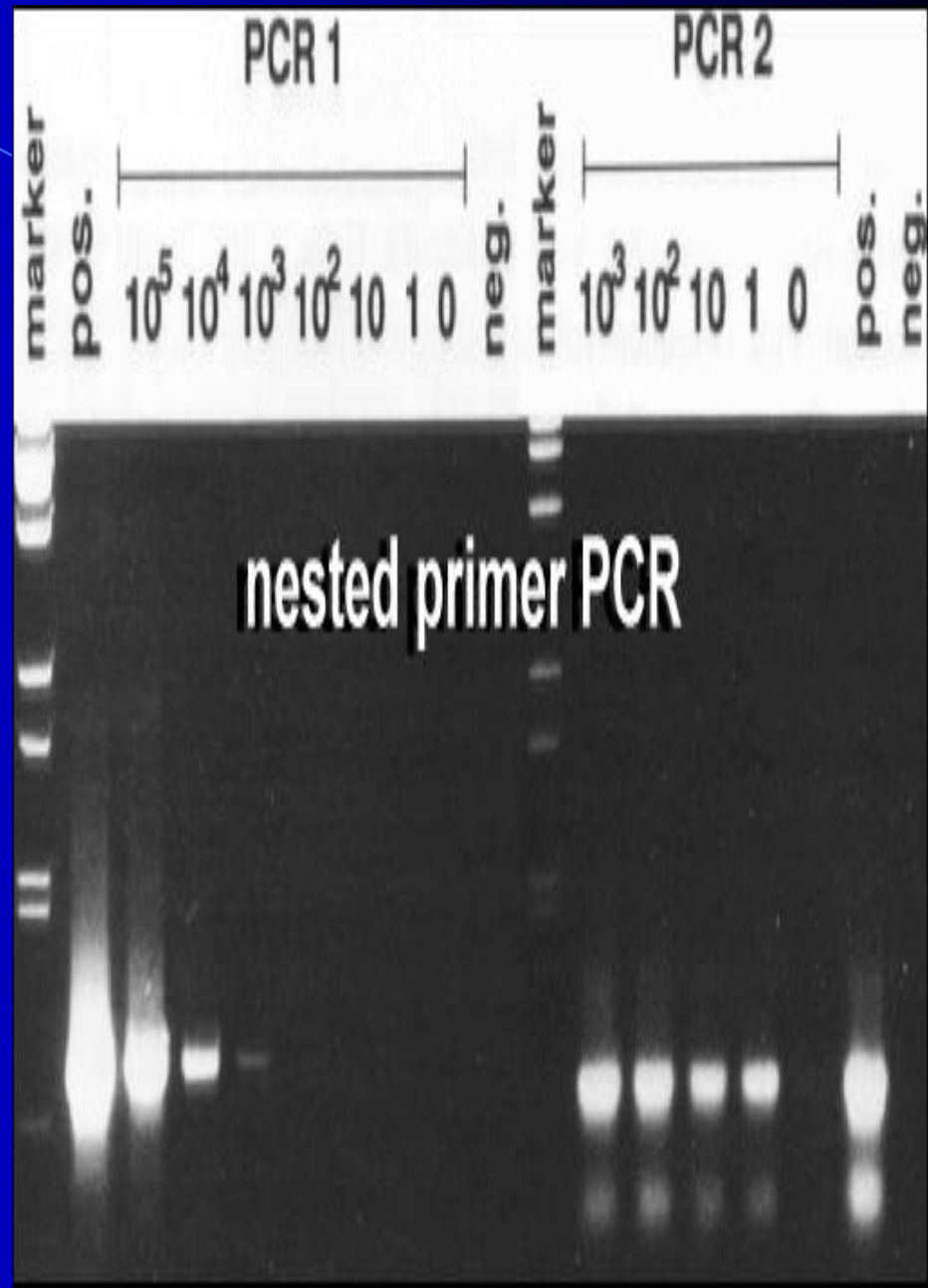
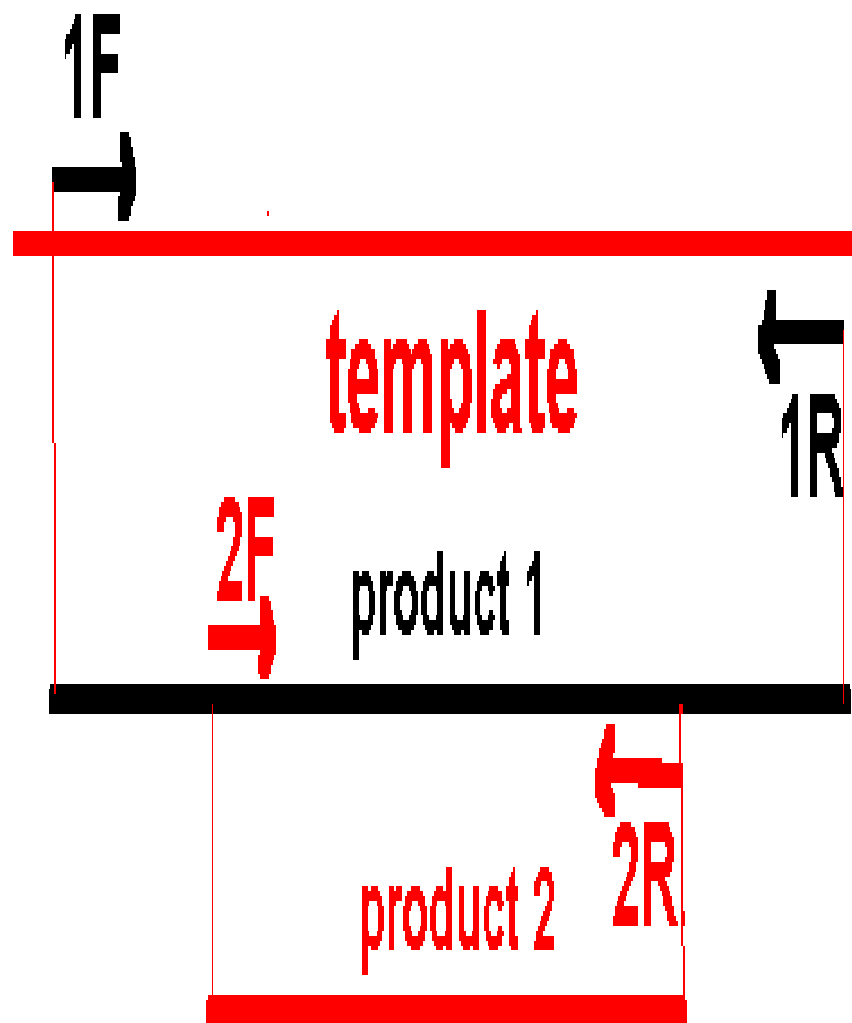
- Bu yöntemde birbiri ile reaksiyona girerek sakınca doğuracak maddeler ayrı fazlarda, ayrı zamanlarda ve optimal ısıda reaksiyona sokulduğundan nonspesifik reaksiyonlar ve kontaminasyonlar önlenmiş olur.

Nested PCR

- Bu yöntemde üst üste iki PCR reaksiyonu gerçekleştirilir.
- Bu nedenle iki çift primer seti kullanılır.
- İlk PCR'da “outer” denilen dış primer kullanılarak istenilen gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra elde edilen PCR ürününden “inner” denilen ikinci primer seti ile tekrar PCR yapılır.
- Böylelikle PCR'da elde edilen ürünün, tekrar mutasyona özgü daha spesifik bir bölgesi çoğaltılmış olur.

- 2001 yılında FAT ile kuduz müspet değerlendirilen 80 materyalden 49 (%61,25) adedinde RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilirken heminested PCR ile tamamında (% 100) viral nükleik asit tespit edildi.
- Çalışmada kullanılan 113 materyalden 53 adedinde RT-PCR ile 86 adedinde de heminested PCR ile viral nükleik asit tespit edildi.

NESTED PRIMER PCR:



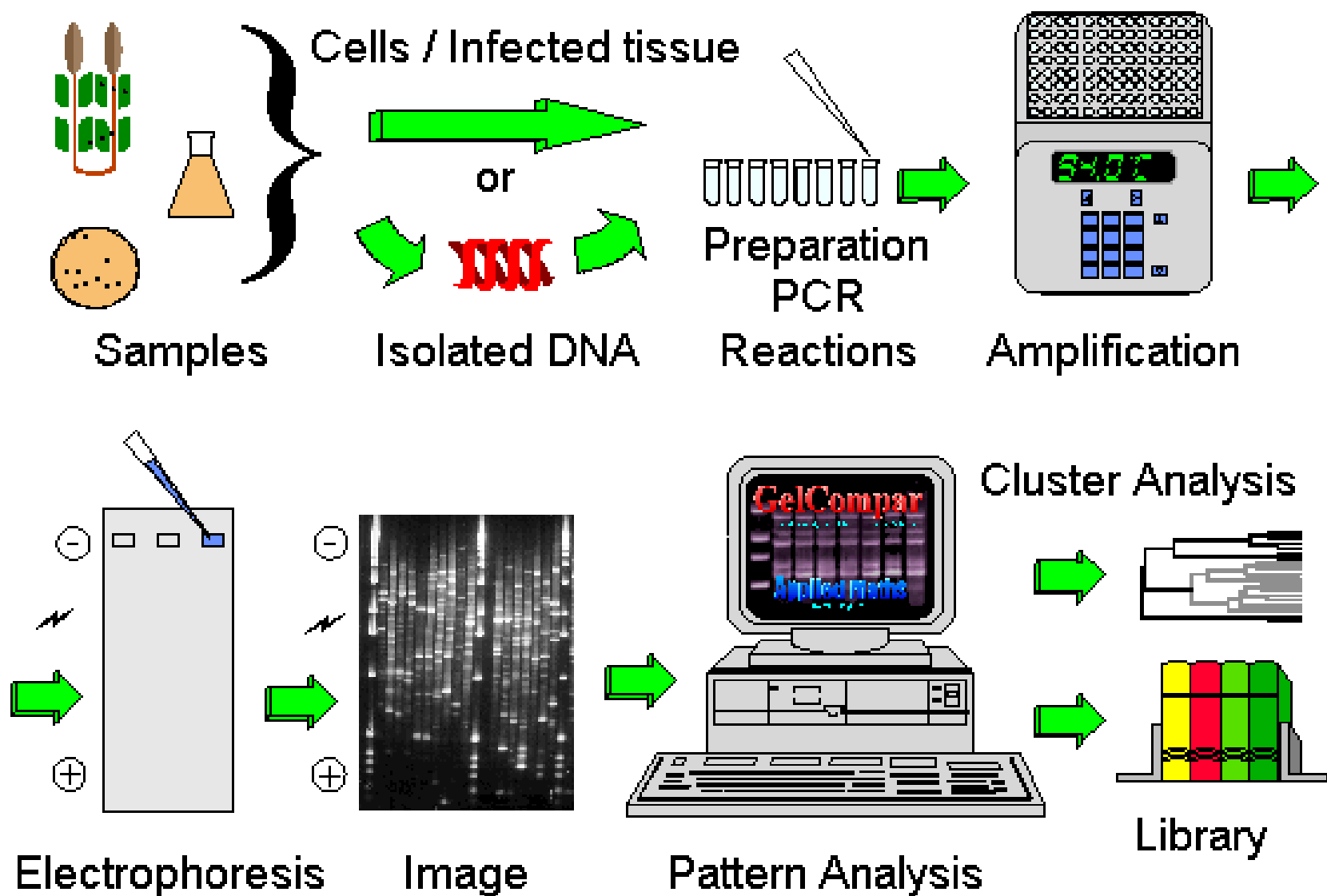
Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)

- Rasgele seçilen primerler kullanılarak genomların fingerprintingleri oluşturulur.
- Primerlerin eşleşmesi tam değildir.
- Bunların bazıları karşı tarafta eşleşir.
- Bu primer eşleşmesinin en büyük etkisi, bilinen 100'den fazla PCR ürününden birkaçının fingerprintinginin oluşmasıdır.
- Fingerprintten RFLP, genetik haritalama, taksonomi, filogenetik, klinik epidemiyoloji, kanserlerde mutasyon belirlenmesinde kullanılır.

rep PCR

- Repetitive DNA dizilerinin amplifikasyonu ile mikroorganizma soylarının belirlenmesine (fingerprinting) dayalı bir yöntemdir.
- PCR primerleri, DNA'da dağılmış olan tekrarlayan dizilere spesifik düzenlenir ve 18-22 bp uzunlukta olur.
- Amplifikasyon sonrası elde edilen farklı boylardaki multibil ampliconlar elektroforezde gözlenir.
- Bu şekilde mikroorganizma soylarına ait spesifik DNA fingerprint bantları ayırt edilir.

rep-PCR genomic fingerprinting protocol



RT-PCR

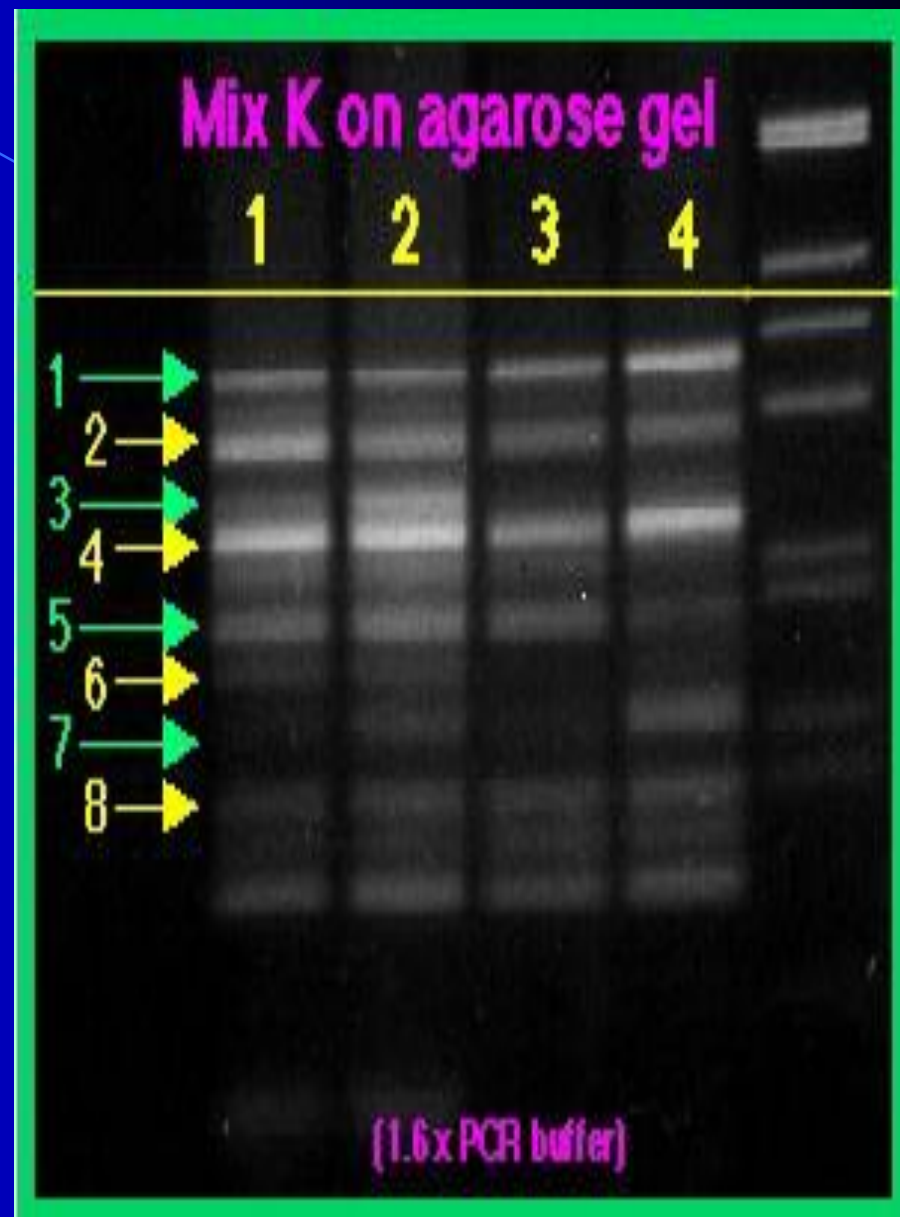
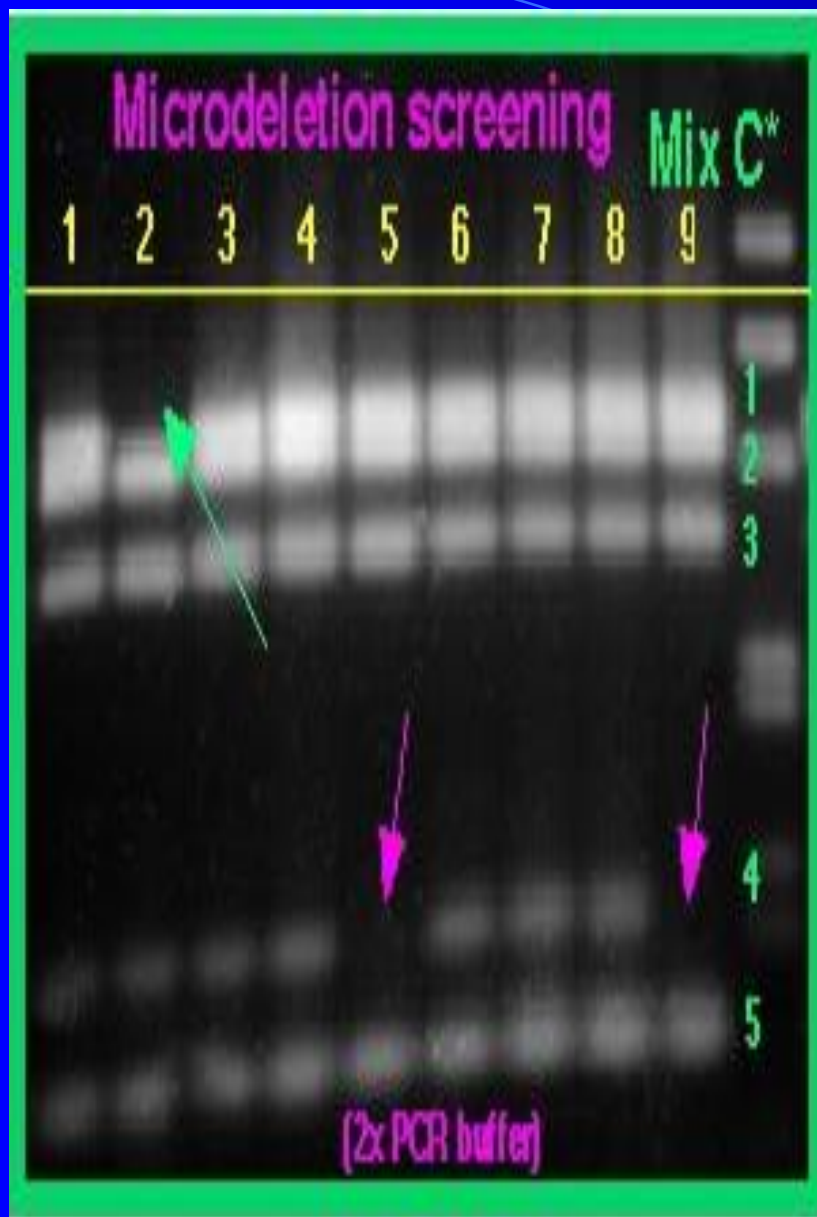
- mRNA'dan DNA polimeraz enzimiyle cDNA sentezlenir. Elde edilen cDNA PCR için kullanılır
- Bu yöntem doku veya hücrelerde spesifik dizinin ekspresyonunun tayini için çok duyarlıdır.
- En az bir yıl dondurulan kan örneklerinde BVDV virusunun tespitinde 3 İmmunperoksidaz test modifikasyonu ile RT-PCR karşılaştırıldı. 45 adet pozitif örnekte RT-PCR 42 adedinde (% 93,3), İmmun peroksidaz modifikasyonları ise sırayla 41(% 91,1), 40 (% 88,8) ve 37 (% 82,2) adedinde pozitif bulundu

Differential Display (DD PCR)

- Farklı dokularda eksprese olan genlerin belirlenmesinde kullanılır.
- İlk basamak RT-PCR'dır.
- Amplifikasyon için kısa nonspesifik primerler kullanılarak PCR yapılır.
- Yüksek resolüsyonlu bir jel ile bant serileri elde edilir.
- Bant hangi dokuya ait ise o dokuda ekspresyonun varlığını gösterir.

Multipleks PCR

- Aynı örnekte iki veya daha fazla hedef DNA dizisinin amplifiye edilmesidir.
- Farklı hedef DNA sekanslarına spesifik multiple primer çiftlerinin kullanılması ile gerçekleştirilir.
- Değişik hedef sekansların koamplifikasyonu birçok amaç için kullanılma olanağı bulunmaktadır.
 - DNA sekanslarının büyük bir bölümü, bunlarda bulunması muhtemel alterasyonlar yönünden incelenir
 - Hedef DNA'nın farklı segmentleri araştırılabilir.
 - Sekansların amplifiye olabilirliğinin internal kontrolleri yapılabilir.
 - Bir numunede bulunan değişik ajanlara ait DNA'lar aynı tüpte aynı anda amplifiye edilebilir.



Amplifikasyon Refractory Mutation Systems (ARMS)

- 1989 yılında Newton ve ark. Herhangi bir nokta mutasyonunun veya küçük delesyonların tanımlanmasına olanak sağlayan ARMS'yi geliştirdi
- ARMS'de iki komplementer reaksiyon söz konusudur.
 - Birinci reaksiyon normal DNA dizisine spesifik olan ve belirli bir lokalizasyondaki mutant DNA bölgesini amplifiye edemeyen ARMS primerini içerir.
 - İkinci reaksiyon ise benzer olarak, mutant bölgeye spesifik primerleri içerir ve bu primerler normal DNA'yı amplifiye edemez.

- Bir kişinin mutasyona sahip olup olmadığı, heterozigot veya homozigot olduğu gibi durumlar, diğer bir deyişle kişinin genotipi, bu amplifikasyon ürünlerinin analizi ile tanımlanabilir.
- ARMS diğer PCR bağımlı yöntemlere karşı bazı avantajları vardır.
 - İzotipik madde kullanılmamaktadır.
 - Hızlı ve güvenilirdir.
 - Her iki reaksiyon içinde internal kontrollerin kullanılması yanlış negatif sonuç olasılığını ortadan kaldırır.
 - ARMS testi aslında herhangi bir mutasyonun tanımlanabilmesi için geliştirilmiş ve çeşitli genetik polimorfizmlerin saptanmasında kullanılmıştır.

Touchdown PCR

- PCR sırasında giderek annealing ısısının düşürülmesi yöntemin esasıdır.
- Yaklaşık 10 döngüden sonra her döngüde annealing ısısı 2-4 derece düşürülür.
- Bu tekniğin avantajları primerler ile kalıp DNA arasında doğru eşleşme ile ürün miktarını artırmaktır.
- Ayrıca bu teknik bilinen peptid dizisinin DNA dizisini tayin etmede kullanılır.
- Özellikle de serin, leucine ve arginin (her biri 6 kodonlu) peptid dizileri için kullanılmaktadır.

Real Time PCR

- Syber green boyası çift iplikli DNA'nın minor çukuruna bağlanır. Floresan sinyali bu bağlanma ile çok artar. PCR'ın değişik aşamalarında oluşan çift iplikçikli DNA miktarına farklı ölçülerde floresan sinyalleri oluşur.
- Denatürasyon sonrası bütün DNA tek zincirli hale gelir, bu durumda syber green boyası DNA'ya bağlanmaz ve floresan miktarı düşer.
- Annealing basamağında primerler hedef DNA dizilerine bağlanır ve böylece küçük parçalar halinde çift iplikçikli DNA'lar oluşur.

- Bunlara syber green boyasının bağlanması ile floresan miktarı artar.
- PCR'ın elongation basamağında primerler uzamaya başlar ve daha fazla miktarda syber green boyası DNA'ya bağlanır.
- Uzama basamağının sonunda bütün DNA çift iplikli olur ve maksimum miktarda boya bağlamış olur.

- Real Time PCR oldukça kesin, hassas, başlangıç miktarını belirleyen ve son çoğaltılmış ürün miktarını ortaya çıkaran kantitatif RT-PCR'ın diğer formlarına tercih edilebilir bir alternatiftir.
- Konvansiyonel PCR metotlarıyla endpoint belirlenmesine karşı olarak, real time PCR her bir PCR döngüsünde amplifikasyon üretiminin bir indikatörü olarak reaksiyon süresince dışarı çıkarılan floresanı takip eder.
- Real time PCR amplikon büyüklüğünü ortaya koymaz ve bu yüzden DNA ve cDNA amplifikasyonu arasındaki farka izin vermez.

Complexity of Gene Quantification:

Steps and variables of a successful
mRNA quantification using real-time RT-PCR (1)

tissue sample → RNA → cDNA → PCR

**sample
preparation**

**nucleic acid
isolation**

**RT = reverse
transcription**

**real-time PCR
amplification**

- **Sampling
method:**

- Biopsy
- Stability of RNA
- Tissue storage
- Liquid Nitrogen
- RNA Later
- 1st extraction buffer

- **Isolation
method:**

- total RNA
- mRNA
- liquid-liquid
- columns
- RNA storage

- **Efficiency of RT:**

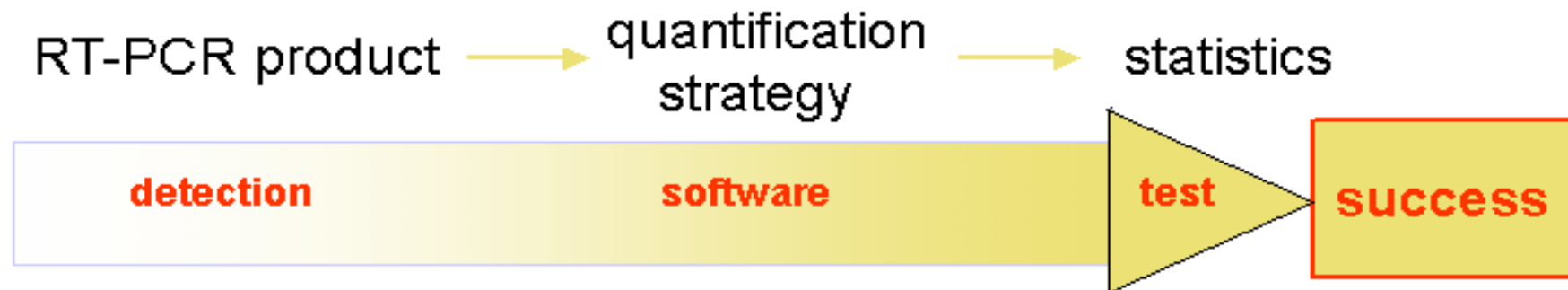
- RT enzyme type
- RT temperature
- poly-T Primer
- Random Hexamers
- Specific primer
- **One step RT-PCR**
- **Two step RT-PCR**

- **Efficiency & Specificity
of real-time PCR:**

- Primer design (multi-species)
- Primer specificity
- mRNA abundance
- cDNA input
- Polymerase types & Mixtures

Complexity of Gene Quantification:

Steps and variables of a successful mRNA quantification using real-time RT-PCR (2)



- **Detection method:**

- SYBR Green I
- Probes, Beacons, Scorpions etc.
- Fit point method
- TaqMan fitting (10x SD)
- 2nd derivative maximum
- other models (Log. or Sig.)
- background correction
- 3-step or 4-step PCR

- **Quantification strategy:**

- **absolute quantification**
- normalization with HKG
- **relative quantification**
- normalization with HKG
- Normalization via index of more (> 3) HKGs
- **"BestKeeper" & "geNorm"**

- **Test method:**

- SAS, SPSS, Excel, Sigma Stat
- Normality of data (???)
- t-Test (???)
- ANOVA (on the ranks ???)
- Permutation test
- Randomization test

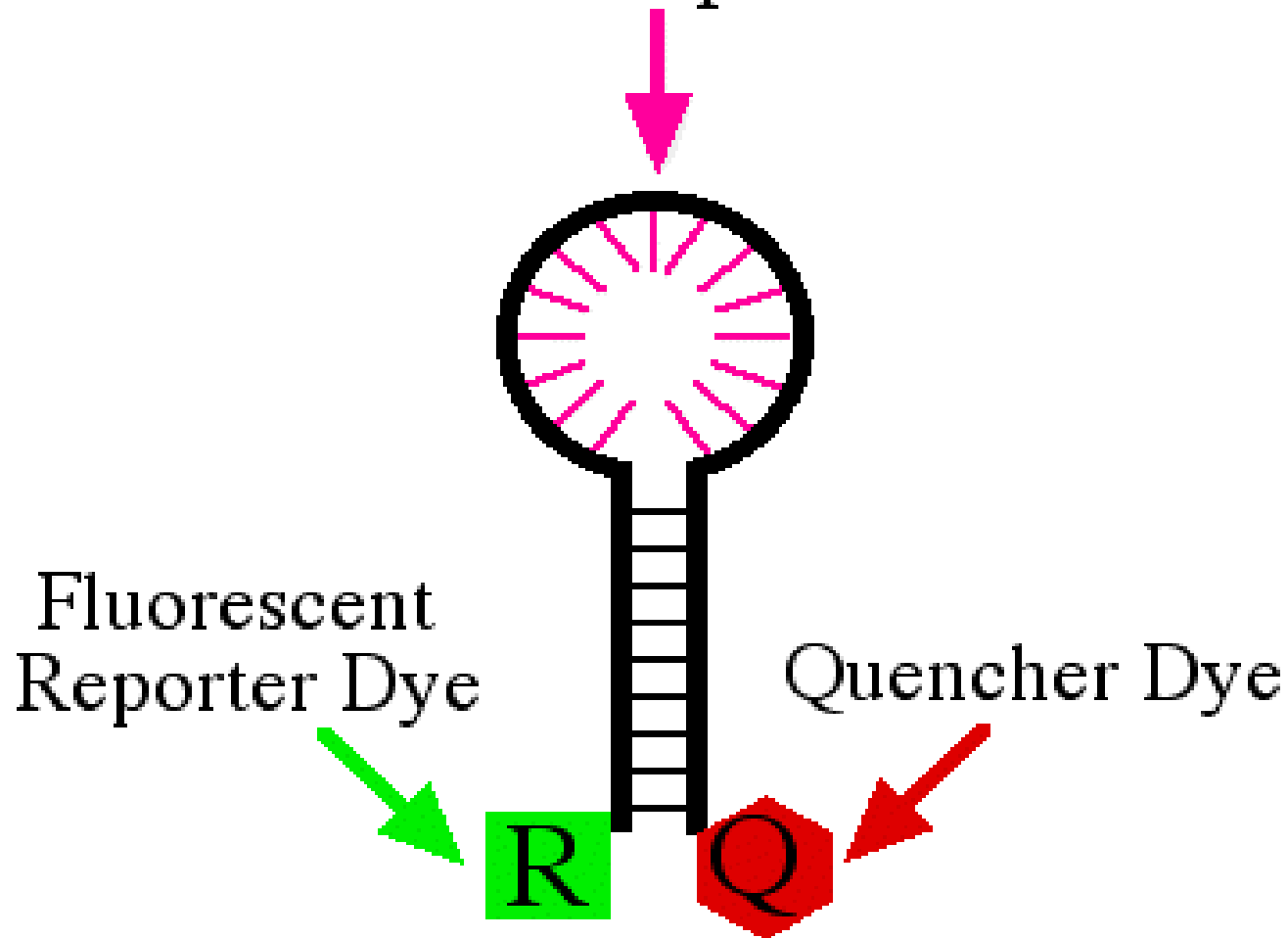
- Konvansiyonel PCR'a oranla real time PCR 10^7 kata kadar varan genişlikte bir dinamik sunar (konvansiyonel RT-PCR daki 1000 katla kıyaslandığında).
- Real time PCR sistemi floresant reporterların tespiti ve miktarının ortaya konmasına dayanır.
- Amplifikasyonun kantitatif tespiti için 2 genel metot vardır;
 - 1) Floresan yayan problrar
 - 2) DNA bağlayan ajanlar

- Problar cDNA örneklerindeki hedef sekansların miktarını ölçmek için Taq polimeraz'ın flourogenic 5'ekzonukleaz aktivitesini kullanırlar.
- Taq Man probları genellikle 5'bas'de floresan boya ve tipik olarak 3' base'de quenching boya (genellikle TAMRA) ihtiva eden primerlerden daha uzun oligonükleotidlerdir.
- Röntgen ışınlarına tutulunca harekete geçen floresan boya, floresan vermekten ziyade enerjisini yakınındaki quenching boya molekülüne transfer eder (Bu FRET olarak adlandırılır=Fröster veya floresanrezonans enerji transferi).

- Taq Man problemleri bir PCR ürününün bir dahili bölgesini çoğaltmak üzere dizayn edilmiştir.
- Moleküler bakonlar her iki uçlarında flouresans (FAM, TAMRA, TET, ROX) ve quenching boyalar (tipik olarak DABCYL) ihtiva ederler.
- Moleküler bakonlar PCR süresince bozulmadan kalırlar ve mutlaka flouresan yayımı için her siklуста hedefe bağlanırlar.
- Hem Taq Man problemleri hem moleküler bakonlar farklı reporter boyalar kullanılarak çeşitli DNA türlerinin tespitine olanak sağlar.
- dsDNA bağlayıcı boya kimyası daha ucuz bir alternatiftir ve non sekans spesifik flouresant araya giren ajan (syber green veya ethidium bromit) kullanılarak ampikon ürünleri tespit edilir.

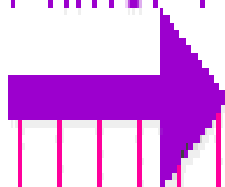
- Syber green IssDNA'yı bağlamaz. Syber green'e dayalı tespitte en önemli problem, nonspesifik amplifikasyonlar spesifik amplifikasyonlardan ayırt edilemez.
- İkinci derecede önemli ve kontrol edilebilir bir problemde daha uzun ampikonların daha kuvvetli sinyal oluşturmasıdır.
- Syber green sadece singleplex reaksiyonlarda kullanılabilir.
- Tek basamak real time RT-PCR'da tek bir tampon sistem ve bir tüp de ters kopyalama ve PCR oluşturur.
- İki aşamalı RT-PCR'da bu iki aşama farklı tüplerde ayrı bir şekilde gerçekleştirilir.
- Multipleks Real time RT-PCR için tek aşamalı PCR kullanılamaz.

PCR Product-Specific Nucleotides

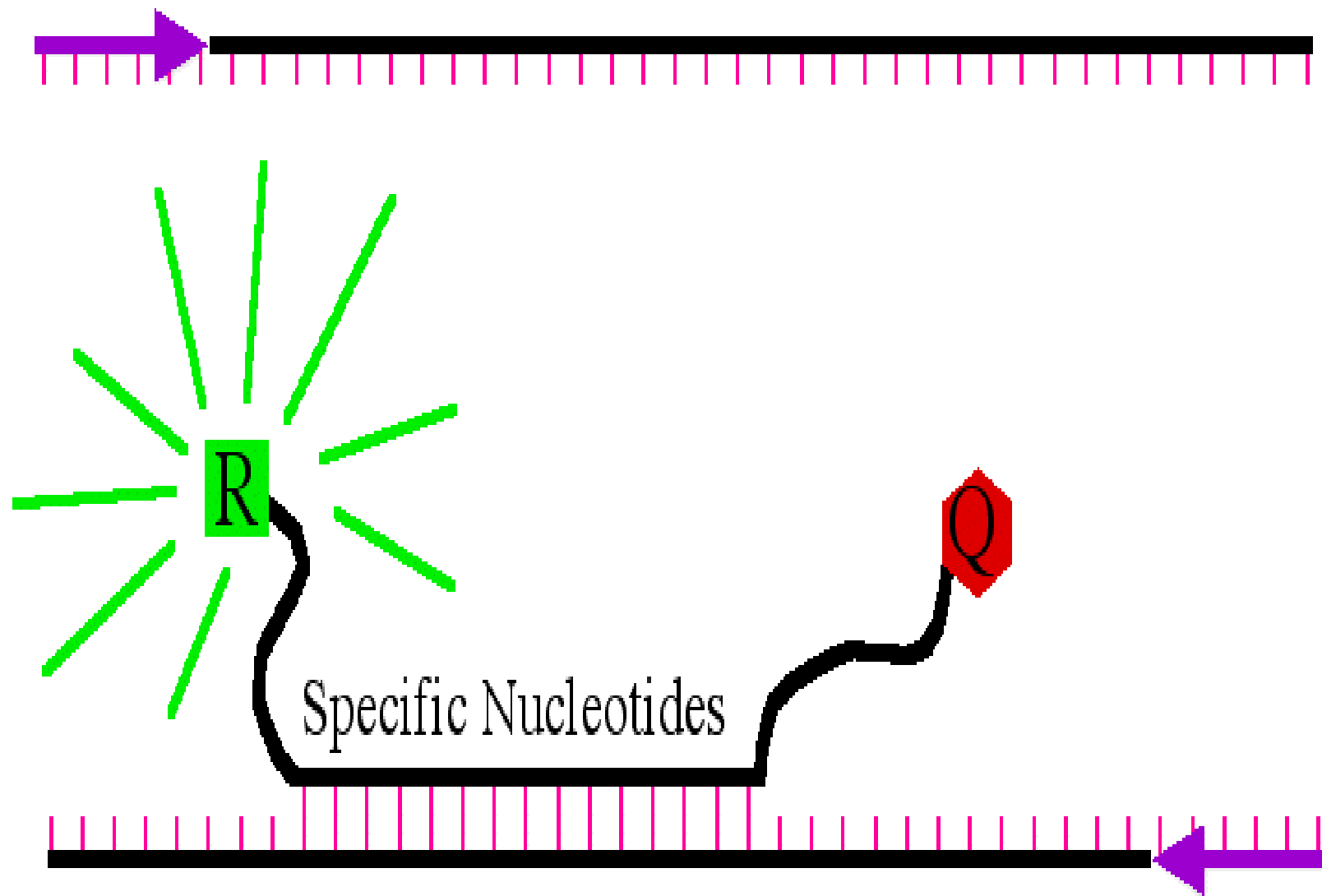


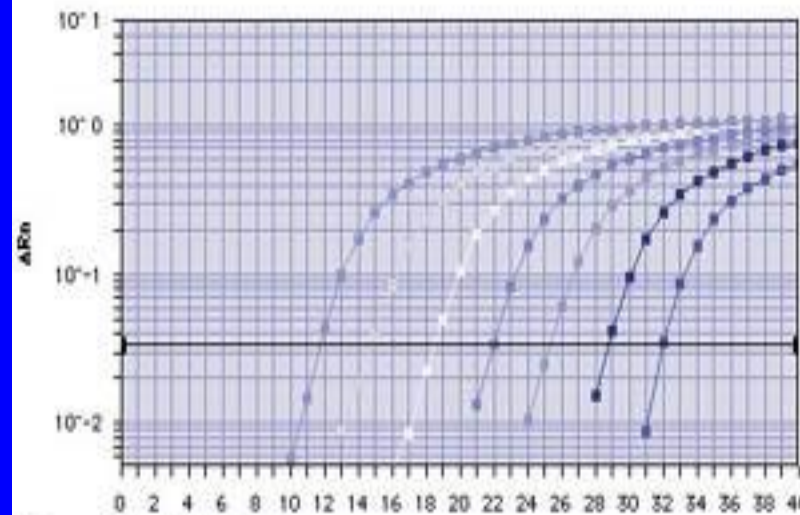
PCR Product

Primer 1

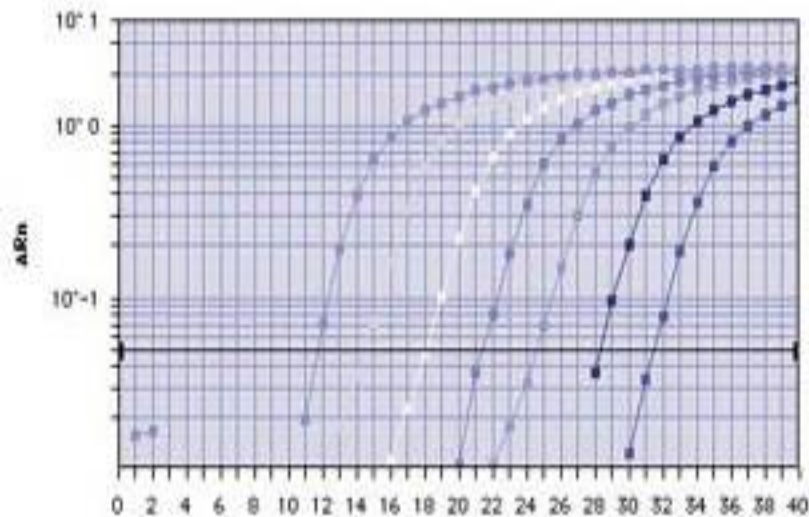
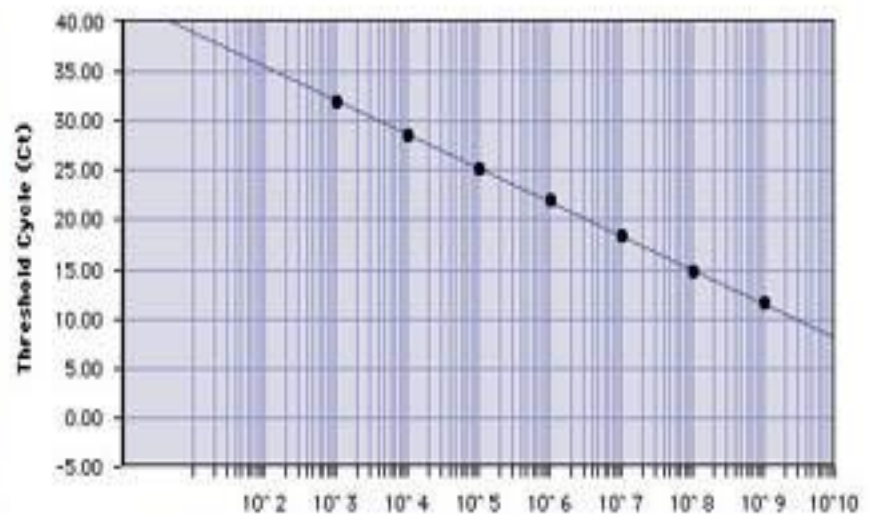


Primer 2

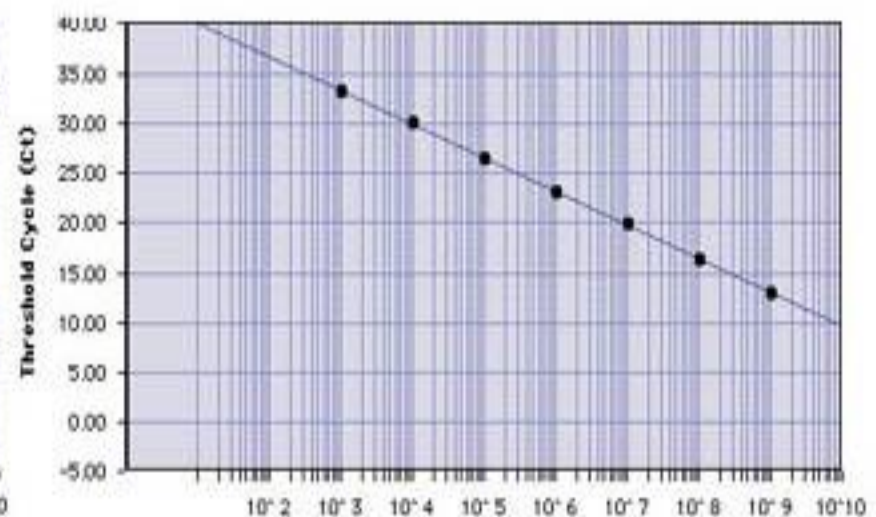




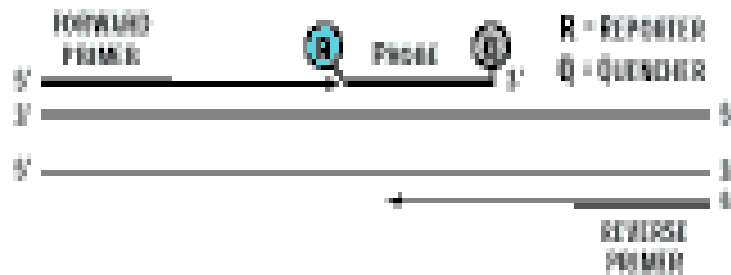
Panel A. SYBR Green



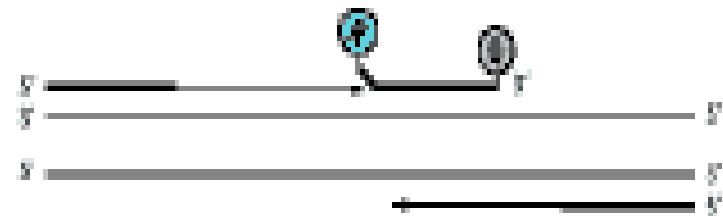
Panel B. TaqMan



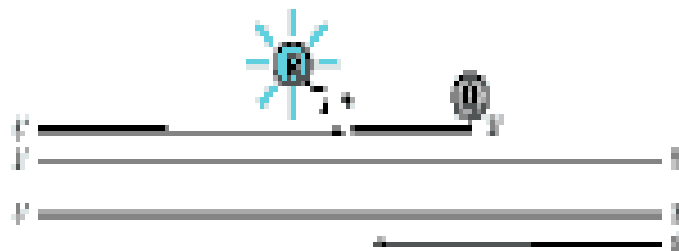
Polymerization



Strand Displacement



Clearance



Polymerization Completed

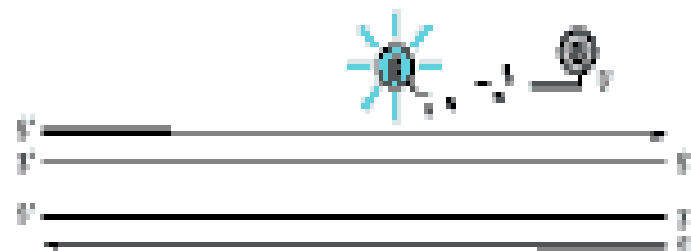


Figure 1. Stepwise representation of the forklike-structure-dependent, polymerization-associated, 5' to 3' nuclease activity of Taq DNA polymerase acting on a fluorogenic probe during one extension phase of PCR [Figure from Applied Biosystems' DNA/RNA Real-Time Quantitative PCR bulletin].

PCR'in Başlıca Kullanım Alanları ve Avantajları

- Kültürünün yapılması, izolasyon, identifikasyonu çok zor olan veya yapılamayan m.org. Teşhisinde
- Toksin oluşturan ajanlar ve toksinlerinin saptanmasında
- Antimikrobiyal dirençliliğin tespitinde
- M.org alt tiplerinin belirlenmesinde
- Moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji vs.
- Adli tıpta
- Genetik bozuklukların belirlenmesinde

PCR'ın Dezavantajları

- Tekniğin en büyük avantajı aynı zamanda dezavantajını oluşturur. Şöyle ki; tek bir kontaminant DNA eğer reaksiyonlarda kullanılan primer ile ortak baz sırasına sahip ise aynı oranda çoğalarak reaksiyon sonrası elde edilecek sonuçları olumsuz yönde etkileyecektir.
- Deneyimli personel gerektirir, tekniğin yeterince duyarlı ve özgün olması, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanmasına bağlıdır.
- Yöntemin pahalı olması kullanılan alet ve malzemedен kaynaklanmaktadır.
- PCR'da eğer primer bölgeyi içeren DNA parçası zarar görmemiş ise canlı veya cansız m.org.lar arasında bir ayırım yapamamaktadır.

PCR'da Oluşan Hata, Kontaminasyon ve Alınması Gereken Önlemler

- Laboratuvarlarda kullanılan bir çok bileşik PCR'da amplifikasyonu önlemekte veya olumsuz yönde gelişimini sağlamaktadır.
- Deterjanlar, chelating ajanlar(EDTA), proteinazlar, kanser kmoterapötik ajanları, RNA düzeyinin yüksek olması, EDTA düzeyinin yüksek olması, heparin, urasil, fenol kalıntısının yüksek olmaması PCR duyarlılığını olumsuz etkiler.

- Kontaminasyonu önlemek amacıyla;
 - Tüm solüsyonlar ufak hacimlere bölünerek steril edilmiş olarak saklanmalı
 - Pipet uçları ve diğer kapakların otoklavlanması
 - Her odada bir önlük bulunması
 - Pipetleme işleminde sıçratma yapılmaması
 - Tüpleri kullanmadan önce santrifüj yapılmalı
 - Her 3-5 örnek arasına negatif örnek konularak saflaştırma işlemine başlanmalı
 - Amplifikasyon aşamasında DNA içermeyen negatif kontrol ilave edilmeli
 - Seçilecek pozitif kontrolün zayıf olması

- Yalancı pozitifliği önlemek için;

- Her çalışmada kullanılan malzemeler germisid etkili Uv ışınları ile sterilize edilmelidir. Primerler UV ışınına kalıp DNA'dan daha dayanıklıdır
- Yüksek ısıdan etkilenmeyen, reaktiflerin hazırlanmasında kullanılan deiyonize sular ve tampon çözeltiler sterilizasyon amacıyla otoklavlanabilir, primerler ve nükleotidler otoklavlanamaz.
- PCR için özel hazırlanmış pipetler kullanılmalı, reaksiyon sırasında pozitif ve negatif kontroller kullanılmalıdır.
- PCR ürünlerinin incelenmesinde kullanılan aletler 1 M HCl ile yıkanmalıdır. Kontaminasyona karşı diğer bir uygulamada; UNG (Urasil N Glikolaz) sterilizasyonudur.

- Yanlış negatifliğe yol açan nedenler;
 - Uygun olmayan bir ekstraksiyon işlemi ya da bunun sonucu genetik materyalin kaybedilmesi
 - Amplifikasyon işleminin uygun bir şekilde gerçekleştirilmemesi
 - Reaksiyonda çeşitli nedenlerden kaynaklanabilecek PCR inhibitörlerinin bulunması
 - Primer seçiminin doğru yapılmaması
 - Etken özellikle RNA olduğunda uygun saklanamaması nedeniyle genetik materyalin tahrip olması



Teşekkür

Ederim.