

Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri

Bölüm 6

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

M. Somma, M. Querci

İçindekiler

Bölüm 6

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

<i>Giriş</i>	3
DNA'nın içeriği, yapısı ve replikasyonu	3
PCR prensipleri	9
PCR cihazları ve içeriği	12
PCR için primer tasarımı	16
Özelleştirilmiş PCR	20
Pratikte PCR	21
<i>Kaynaklar</i>	28

Giriş

1985 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından PCR (Polymerase Chain Reaction)'ın bulunmasıyla moleküler biyoloji ve moleküler tıp yenilenmiştir (Jaiki ve ark. 1985). PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir. Başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilebilirken, günümüzde PCR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya çoğaltılabilir.

PCR teknikleri diagnostik ve adli tıpta genlerin belirlenmesi ve özel DNA parçalarının klonlanması ve gen ifade modellerinin tespit edilmesinde önem kazanmıştır. Günümüzde PCR bakteri kontaminasyonu, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemeye olanak sağlamaktadır. PCR ve uygulamalarını anlayabilmek için öncelikle DNA molekülünün doğal yapısı anlaşılmalıdır. Bu nedenle izleyen bölümlerde DNA'nın yapısı ve replikasyonu açıklanmıştır.

DNA'nın içeriği, yapısı ve replikasyonu

DNA'nın içeriği:

DNA genetik bilgiyi taşıdığı nükleotidlerin sekansında şifrelenmiş olarak saklayan, fosforik asit ve deoksiriboz ünitelerinin oluşturduğu iki paralel zincirin, pürin ve pirimidin bazlarınca çapraz olarak bağlanması ile ortaya çıkan sağ yönlü sarmal yapıya sahip bir moleküldür. Ökaryot hücrelerde DNA'nın çoğu çekirdek içinde bulunur ve kromozomal DNA olarak adlandırılır. Çift katlı bir zar (çekirdek kılıfı) ile hücrenin geri kalanından (sitoplazma) ayrılır.

Buna ek olarak, mitokondri ve kloroplastlarda ekstra kromozomal DNA bulunabilir.

DNA'nın yapı taşı olan nükleotidler aşağıdaki gibidir

dATP (deoksiadenozin trifosfat)

dGTP (deoksiguanin trifosfat)

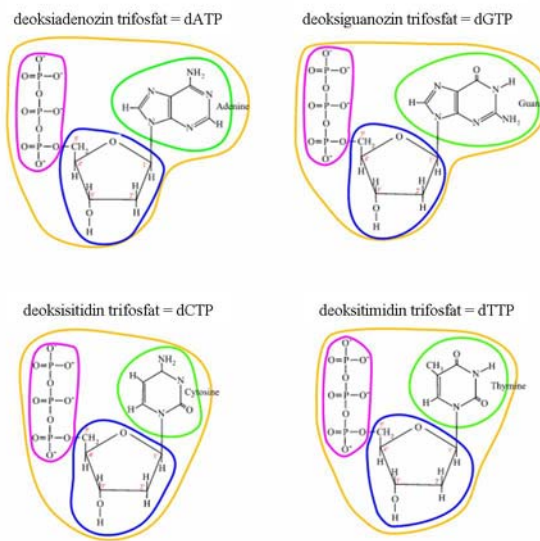
dCTP (deoksisitozin trifosfat)

dTTP (deoksitimin trifosfat)

İsimlendirme kolaylığı için bu dört nükleotid dNTP (deoksinükleosid trifosfat) olarak adlandırılır. Bir nükleotid üç ana bölümden oluşur, pürin (adenin A veya guanin G) veya pirimidin bazları (sitozin C veya timin T), pentoz şeker molekülü (deoksiriboz) ve trifosfat grup. Şekil 1’de görüldüğü gibi pürin veya pirimidin bazları pentoz zincirine N-glikosidik bağ ile ve fosfat grubu 5’ şekerin karbon atomuna diester bağ ile bağlanır. Ribonükleik asitte (RNA), timinin yerini urasil, deoksiribozun yerini de riboz alır.

Nükleotid = baz + şeker + fosfat

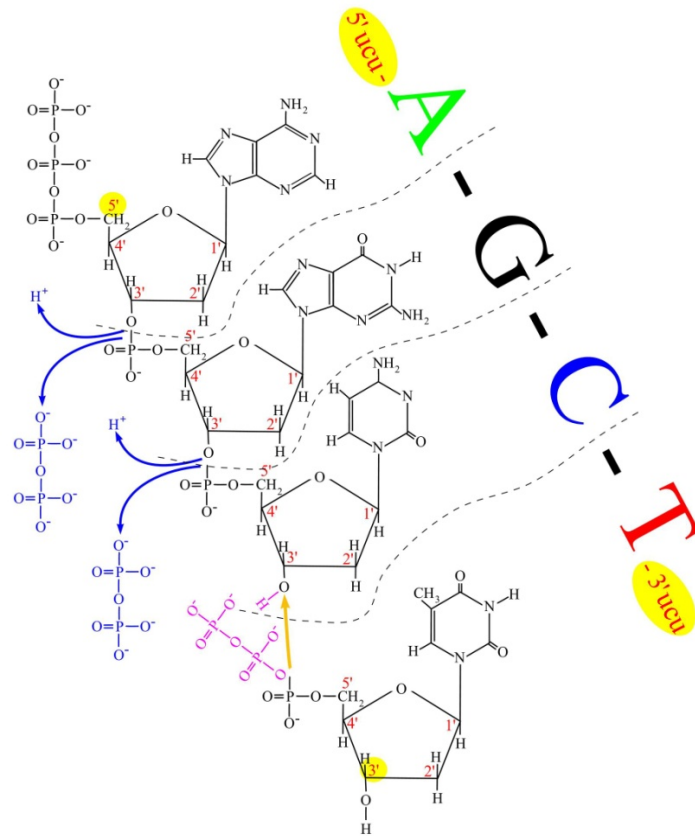
4 farklı dNTP (deoksinükleosid trifosfat)



Şekil 1. Nükleotidlerin içeriği (Şekil: Andy Vierstraete, 1999)

DNA’nın yapısı:

Şekil 2 nükleotidlerin bir DNA zincirini nasıl oluşturduğunu göstermektedir. DNA nükleotidleri, fosfat grubunun (şeker molekülünün beşinci karbon atomuna bağlanmış) önceki nükleotidin şeker molekülünün 3. karbon atomundaki hidroksil grup ile bağlanması ile oluşur. Bunu sağlamak için difosfat grubu ayrılır (ve enerji açığa çıkar). Bu zincirin daima 3’ ucuna yeni nükleotidlerin eklenebildiği anlamına gelir. Şekil 3’de görüldüğü gibi DNA çift ipliklidir (bazı virüsler dışında). İki iplik birbirisiyle tam bir şekilde eşleşir. İplikteki her baz diğer iplikte yalnız bir tip bazla eşleşerek baz çiftini (bp) oluşturur. A daima T ile iki hidrojen bağı, C daima G ile üç hidrojen bağı oluşturur. Bu yolla, iki zincir birbirine tamamlayıcı (komplement) olur. Bir zincir diğerinin üretimi için atasal olarak görev yapar.



Şekil 2. Tek nükleotidlerden DNA zincir oluşumu (Şekil: Andy Vierstraete, 1999)

Bazlar çift sarmal yapının içinde hidrofobik bir çekirdek oluşturur. Şekerler ve fosfat grupları (anyonik formlarında) molekülün dış hidrofilik katmanını oluşturur. Fizyolojik durumlarda çift iplikli DNA sarmalı tek iplikli DNA sarmalından daha dayanıklıdır.

DNA'nın replikasyonu:

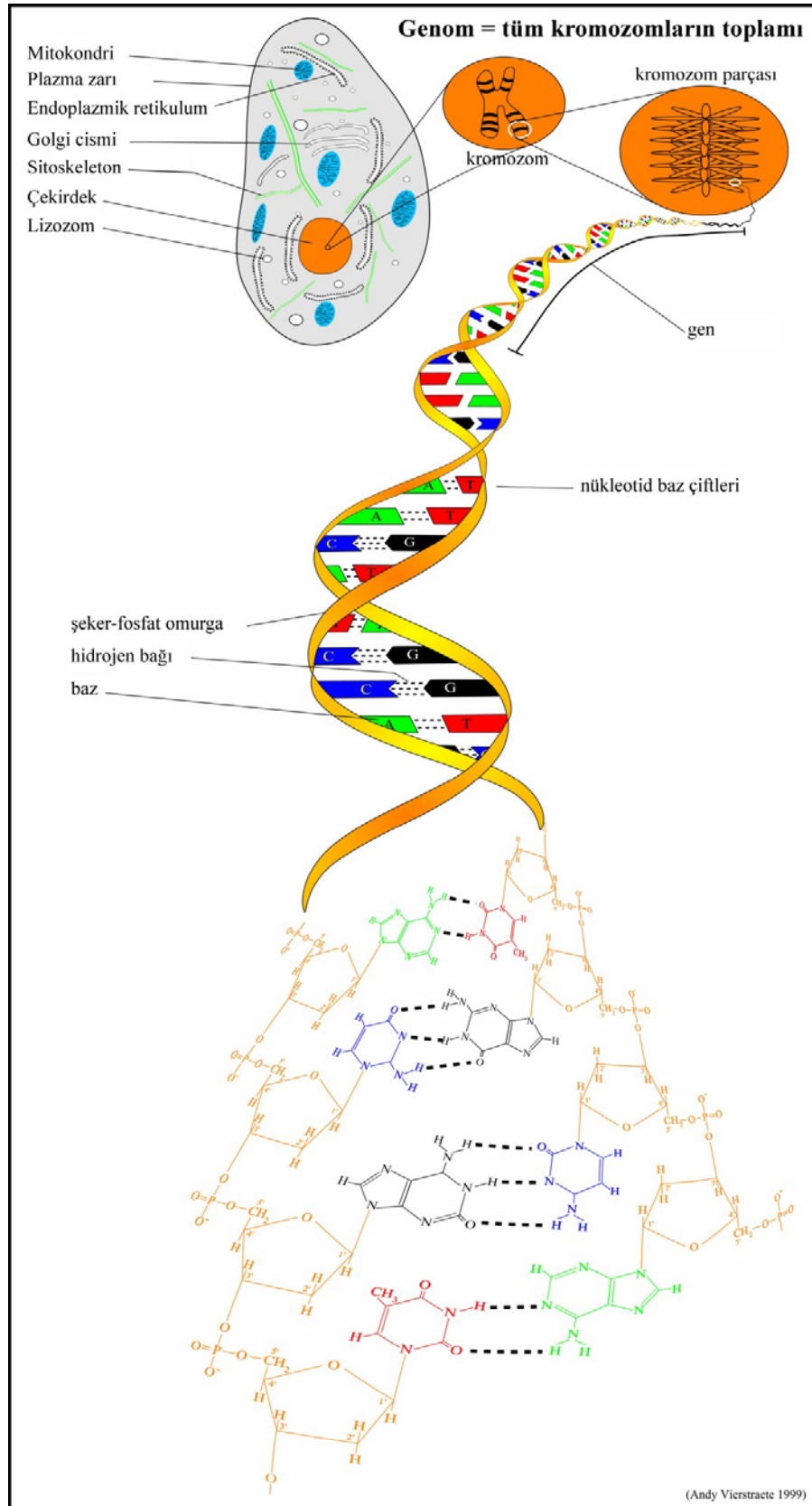
DNA bir organizmanın yapısını ve fonksiyonunu bütünüyle tanımlayan tüm genetik bilgiyi içerir. Genetik bilginin aktarımından üç farklı işlem sorumludur:

Replikasyon

Transkripsiyon

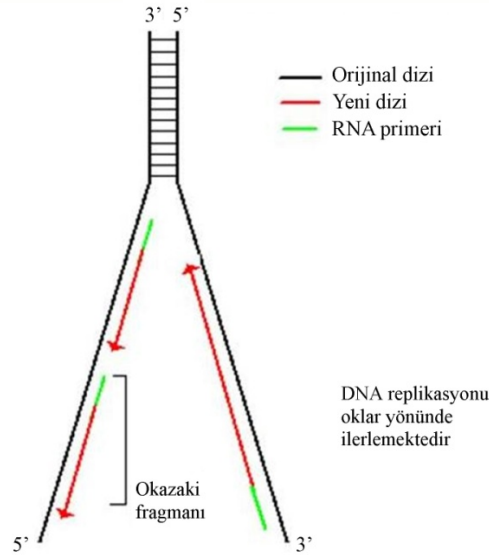
Translasyon

Replikasyon esnasında çift iplikli bir nükleik asit molekülü , eş kopyalar verebilmek için birebir çoğaltılır. Bu işlem genetik bilginin değişmeden korunarak sürekliliğini sağlar. Transkripsiyon sırasında, bir gene karşılık gelen DNA parçası okunarak tek iplikli bir RNA sekansı ile ifade edilir. Bu RNA molekülü çekirdekten sitoplazmaya hareket eder. Translasyon sırasında RNA sekansı sitoplazmada, protein oluşturan aminoasit zincirine çevrilir (Alberts ve ark. 1983).



Şekil 3. Hücrede DNA'nın yapısı (Şekil: Andy Vierstraete, 1999)

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.



Şekil 4. Replikasyon çatallı

Çift sarmalın açılması ve yeni DNA ipliğinin sentezlenmesi için bir çok enzim gereklidir. Topoizomeraz ve helikazlar DNA'nın sarmal yapısını kırarak çözmek ve DNA'nın tek ipliğinin çentiklenerek açılmasından sorumludur.

Böylece primaz (primezom olarak tanımlanan bir protein grubunun bir parçası) enzimi DNA polimerazın senteze başlayacağı 3' OH bölgesinde görev yapmak için küçük bir RNA primerini tek iplikli DNA'ya bağlar. Bu RNA primeri daha sonra RNAaz H tarafından uzaklaştırılır ve kalan boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulur. Bu safhada, DNA polimeraz DNA'nın tek ipliğinde ilerler. DNA polimerazın farklı tipleri vardır, fakat yeni DNA ipliklerinin ilerleyen sentezinden prokaryotlarda DNA polimeraz III sorumludur. DNA polimeraz ata iplikteki bazıları uygun komplementer serbest dNTP ile hidrojen bağları ile bağlar (A, T ile; G, C ile). Aynı zamanda oluşan ipliğin bir önceki nükleotidi ile bu yeni nükleotid arasında kovalent fosfodiester bağ oluşturur. Trifosfatta saklanan enerji her yeni nükleotidin büyüyen ikinci ipliğe kovalent bağla bağlanması için kullanılır. DNA polimeraz yalnızca 5' uçtan 3' uca doğru çalışır. Çift sarmalın bir ipliği 5' uçtan 3' uca doğru olduğu için, diğeri de 3'

uçtan 5' uca doğrudur. DNA polimeraz 5' uçtan 3' uca doğru olan ipliğin (lagging strand) ikinci kopyasını parçalar halinde (Okazaki fragmanları) oluşturur (Ogawa ve Okazaki 1980). 5' uçtan 3' uca olan ipliğin gen kopyasının sentezlenmesi şekil 4'de görülmektedir. Diğer iplik (leading strand) sarmal açıldıkça 5' uçtan 3' uca direkt olarak sentezlenir. DNA polimeraz boş bir tek iplikte, ex novo olarak sentezlemeye başlayamaz, mutlaka dNTP'yi bağlayacağı serbest bir OH grubuna sahip bir primere ihtiyaç duyar.

Ligaz enzimi serbest ama komşu olan 3' OH ve 5' fosfat grupları arasında fosfodiester bağın oluşumunu katalize eder. Bu aktivite, RNA primerinin ayrılmasını takiben arada kalan küçük bölümlerin, molekülün geri kalanına bağlanmasını sağlar. SSB (single strand binding, tek iplik bağlanıcısı) proteinleri replikasyon çatallının dayanıklılığını korumak için çok önemlidir. Tek iplikli DNA oldukça kırılgan ve dayanıksızdır bu nedenle bu proteinler tek iplikli kaldığında DNA'ya bağlanarak onu parçalanmaktan korur.

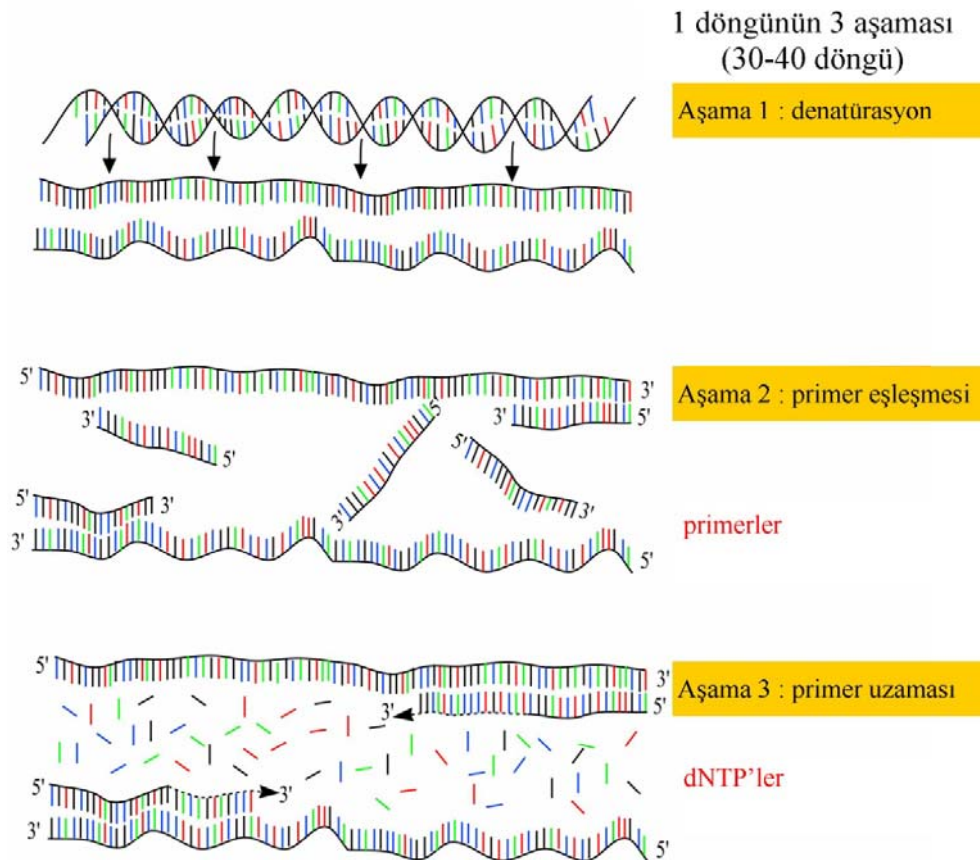
PCR prensipleri

PCR hücre içinde (in vivo) DNA'nın kendini eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçimine çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. Bu teknik;

- çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelmesi: denatürasyon
- primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması: primer eşleşmesi
- Mg^{+2} iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması: primer uzaması

İşlem döngülerinin bir çok tekrarından oluşur.

Genellikle kısa zincirlerden oluşan oligonükleotidler, birbirlerinden dizin olarak farklıdır. Primerlerin sekansı, çoğaltacak hedef DNA'ya komşu tanımlama bölgelerine eşittir. Denatürasyon, primer birleşmesi ve primer uzaması PCR metodunda bir döngüyü oluşturur. Şekil 5'de PCR işlemindeki üç ana basamak gösterilmektedir.

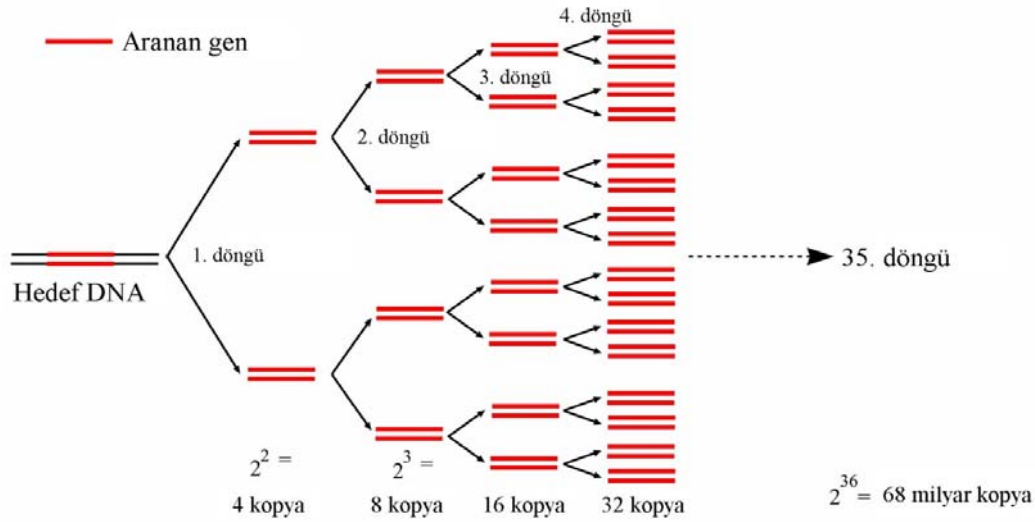


Şekil 5. PCR çoğalmasının basamakları (resim Andy Vierstraete,1999)

Her döngünün sonunda yeni sentezlenen DNA zincirleri, bir sonraki döngü için hedef (ata) zincir olabilir. Şekil 6'da görüldüğü gibi, bu reaksiyonun ana ürünü, sonu oligonükleotid primerlerin 5' ucu olan ve uzunluğu primerler arası uzaklıkla tanımlanan bir dsDNA parçasıdır. Başarılı bir amplifikasyonun ilk döngüsünün ürünleri, iki primerin bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip, farklı boyutlarda DNA molekülleridir. İkinci döngüde, istenen uzunluktaki DNA zincirleri oluşur. Bu ürünün miktarı diğer amplifikasyon döngülerinde lineer olarak çoğalır ve reaksiyonun temel çıktısını oluşturur. Amplifikasyon, başlangıçtaki ana zincirin reaksiyon sonundaki kopya sayısı biçiminde aşağıdaki formülle açıklanır:

$$(2^n - 2n) \times$$

Burada n döngü sayısı, 2n ilk ve ikinci döngüden sonra elde edilen uzunluğu bilinmeyen ürünler, x ana zincirin kopya sayısıdır. Potansiyel olarak 20 döngüden sonra her döngüde %100 başarı ile, 2^{20} kez amplifikasyon olacaktır. PCR'in başarısı, uygulanan optimizasyon düzeyine göre ve atadan ataya değişir. PCR amplifikasyonunun üç aşamsının detaylı tanımları (ata denatürasyonu, primer bağlanması ve uzaması) aşağıdaki paragraflarda verilmiştir (Sambrook ve ark 1989).



Şekil 6. DNA'nın PCR ile üstel çoğaltılması

Template Denatürasyonu:

Denatürasyon esnasında, çift sarmal çözülür, bütün enzimatik reaksiyonlar durur (örn. bir önceki döngüdeki uzama). İki eş zincir artan sıcaklık ile birbirinden ayrılır. Bu işlem denatürasyon (bozulma) olarak adlandırılır. DNA denatürasyonunu sağlamak

için sıcaklık yaklaşık 93-96°C 'ye çıkarılır. Bu sayede kuvvetli hidrojen bağları kırılır ve eşleşmemiş bazların sayısı artar. Ortamdaki tüm çift sarmal (ds) DNA, tek sarmal (ss) DNA formuna dönüştüğünde reaksiyon tamamlanır. Mevcut dsDNA'nın yarısının tek sarmal haline dönüştüğü sıcaklık T_m , erime sıcaklığı olarak bilinir. Kullanılan çözücü, tuz derişimleri ve ortam pH'sı denatürasyon işlemini etkiler. Örneğin, düşük tuz derişimlerinde, yüksek pH ve formaldehit gibi organik çözücülerin varlığında T_m düşer. DNA'nın içerdği nükleotid çiftlerinin oranı yani G/C ve T/A miktarları da T_m değerini etkiler. G/C miktarı yüksek olan DNA'nın T_m 'i, T/A miktarı yüksek olan DNA'ya göre daha yüksektir. Örneğin *Serratia marcescens* %60 G/C ile yaklaşık 94°C T_m 'e sahipken, *Pneumococcus* %40 G/C ile 85°C T_m 'e sahiptir.

Primer Eşleşmesi:

DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir (genellikle 55-65°C). Sıcaklık düşünce, birbirine eş iki ssDNA zinciri yeniden bağlanarak dsDNA oluşturur. Bu fazda, tek zincir primerler ile tek zincir hedef DNA arasında hidrojen bağlar oluşur ve kırılır. Hedef DNA'ya tam olarak eşleşen primer ile ana zincir arasındaki bağlar daha sağlam ve uzun süreli olur. Ortaya çıkan bu küçük dsDNA parçası (primer-template) üzerine DNA polimeraz bağlanarak ana zinciri kopyalamaya başlar. Birkaç baz eklendikten sonra primer ve template arasındaki iyonik bağ kuvvetlenir ve kırılmaz.

Primer Uzaması:

Sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (genellikle Taq DNA Polimeraz) ile dNTP'lerin varlığında primerler hedef zincir boyunca uzatılır. Bu reaksiyon başlangıçtaki hedef DNA materyalinin iki katına çıkması ile sonuçlanır (birebir kopyalama). Taq Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72°C'dir. Primerler bir kaç baz uzadıktan sonra, hedef DNA'ya karşı daha yüksek iyonik çekime sahip olurlar. Bu da yapılan işlemin geri dönüşünü engeller. Tam olarak eşleşmeyen (uyuşmayan) primerler yüksek sıcaklıktan dolayı gevşer ve böylelikle reaksiyon DNA parçasının uzaması ile sonuçlanmaz. Ana DNA'ya eş olan bazlar primere 3' kısmından bağlanır. Polimeraz ana zinciri 3'-5' yönünde okurken, 5'-3' yönünde dNTP ekler. Primer uzama basamağının süresi, çoğaltılacak DNA uzun ise arttırılabilir. Ancak genellikle PCR deneylerinde 1 dakikalık uzama zamanı tam sentez için yeterlidir.

PCR aletleri ve içeriği

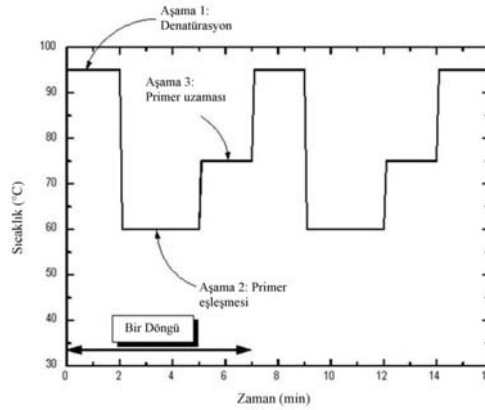
Aletler

PCR işleminin otomatik hale gelmesini iki temel gelişme izin sağlamıştır

- Sıcağa dayanıklı, yüksek sıcaklıkta aktivitesini koruyan DNA polimerazların kullanımı. Böylece reaksiyonun başlangıcında eklenen polimeraz sayısız işlem döngüsü boyunca aynı aktiviteyi gösterir.
- Sıcaklığın programlı olarak hızlı bir şekilde düşürüp yükseltilebildiği ısı banyolarının gelişmesi. Bunlar PCR cihazları ya da termal cykler olarak bilinir.

Kullanılan PCR cihazlarının farklı tasarımları mevcuttur. Örneğin: sıvılarla ısıtma ve soğutma, elektriksel rezistansla ısıtma ve sıvılarla soğutma ve elektrik rezistansla ısıtma yarı iletkenlerle soğutma. Üç aşamalı işlemin tipik sıcaklık döngü profili Şekil 7’de görülmektedir.

Aşağıda bahsedilecek olan reaksiyon girdileri ve döngü sayısının yanısıra, denatürasyon, primer bağlanması, primer uzaması gibi daha önce bahsedilen termal döngü parametreleri de başarılı bir PCR için kritiktir.



Şekil 7. PCR sıcaklığı değişim profili

Hedef DNA

PCR amplifikasyonu prensip olarak, hedef genin en azından bir tam kopyası bulunduğu yapılabılır. Çok sayıda hedef gen kopya sayısı başarılı DNA amplifikasyon olasılığını artırır. Hedef DNA yapısında herhangi bir hasar (örneğin kırılma) PCR amplifikasyonunu durdurur. Hedef zincirin uzunluğu <0,1'den birkaç kilobaza kadar olabilir. PCR'de kullanılan toplam DNA miktarı hedef DNA'nın tek

kopyasının belirlenmesine olanak sağladığı için 0,05 ile 1 µg arasında olur. Kullanılan numunenin çok saf olması gerekmemekle beraber heparin, heme, formalin, Mg⁺² şelatlayıcı ve deterjan gibi maddeler amplifikasyon işlemini engelleyebilir.

Primerler (Öncüler)

Genellikle yüksek bağlanma sıcaklıklarında kullanılabilmesi açısından 16-30 nükleotid uzunlukta primerler kullanılır. Primerlerde hedef ile uygun olmayan bağlanmalar yapabilecek polibaz zincir uzamalarından (örneğin poli dG), veya tekrar eden motiflerden kaçınılmalıdır. Hedef DNA'ya hibridizasyonu engelleyeceği için primerde ikincil yapı oluşmasına yol açan tekrar eden ters zincirlerden kaçınılmalıdır. PCR'da kullanılan primerlerin birbirlerine tamamlayıcı olmaması primerler arasında hibridizasyon veya primer-dimer oluşumlarını engellemek için önemlidir (özellikler primerin 3' ucu için). Eğer mümkünse uzayacak olan kısmın bağlanmasını arttırmak için primerin 3' ucunda çok sayıda G ve C bazları bulunmalıdır. Primerler arasındaki mesafe 10kb'den az olmalıdır. Genellikle primerler arasındaki uzaklık 3kb'den fazla olunca PCR ürünüde önemli ölçüde azalma görülür. Genelde PCR'da oligonükleotidler 1 µM derişimde kullanılırlar. Bu miktar 30 döngülük bir PCR için yeterlidir. Yüksek miktarlarda oligonükleotid istenmeyen bölgelerin amplifikasyonuna sebep olabilir. Buna karşılık düşük primer konsantrasyonları PCR verimini azaltır.

DNA Polimeraz

Orijinal PCR metodunda *E. coli* DNA polimeraz l'in Klenow parçası kullanılmıştır (Saiki ve ark. 1985). Ancak bu enzim hedef dsDNA'yı denatüre etmek için gerekli olan sıcaklıktan daha düşük sıcaklıklarda bozulmaktadır. Bu nedenle ilk çalışmalarda her döngüden sonra reaksiyonayeni enzim eklenmesi gerekiyordu. Buna ek olarak farklı sıcaklıklarda gerçekleşen denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları için örneklerin bir sıcaklık banyosundan diğerine aktarılması gerekiyordu. Sıcağa dayanıklı DNA polimerazın kullanımı, her denatürasyon basamağından sonra enzim eklenmesi gereğini ortadan kaldırdığı için PCR işlemini kolaylaştırmıştır. DNA polimerazlar polinükleotidin sadece 3' ucuna yeni nükleotid ekleyebilmektedir. Kullanılan ilk sıcağa dayanıklı DNA polimeraz *Thermus aquaticus*'dan izole edilen Taq DNA polimerazdır (Saiki ve ark. 1988). Bu enzim PCR uygulamalarında en yaygın kullanılan enzim olmasına karşın başka DNA polimerazlar da bulunmaktadır. Tablo 1 PCR için kullanılan ısıya dayanıklı DNA polimerazların özelliklerini göstermektedir.

Tablo 1. PCR’da kullanılan bazı DNA polimerazların özellikleri

	Taq/ AmpliTaq®	Vent™	Deep- Vent™	Pfu	Tth	UITma™
Kaynak	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>	<i>Pyrococcus GB-D</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Uygulama	Taq: doğal AmpliTaq: genetik müh. için	Genetik müh. için	Genetik müh. için	Doğal	Genetik müh. için	Genetik müh. için
95°C’de T _{1/2} aktivitesi (dk)	40	1380	400	>120	20	>50 ^a
5’ - 3’ Ekzonükleaz aktivitesi	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
3’ - 5’ Ekzonükleaz aktivitesi	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
İşlevsellik	50-60	?	7	?	30-40	?
Uzama hızı (nt/sn)	75	?	>80	60	>33	?
Son DNA ucu	3’A	>%95 kör	>%95 kör	?	3’A	Kör
Moleküler Ağırlık (kDa)	94	?	?	92	94	70

Taq/AmpliTaq® DNA Polimeraz

Daha önce bahsedildiği gibi bu enzim Amerika Yellowstone Doğal Parkında yaklaşık 85°C sıcaklıktaki kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmiştir. Bu enzimin optimal çalışma sıcaklığı 70-80°C arasındadır. Bu sıcaklıkta bakteri saniyede 35-100 nükleotid sentezleyebilme hızına sahiptir. Enzimin hedef DNA’dan ayrılmadan önce DNA’ya bağlayabildiği nükleotidlerin ortalama sayısı “işlem kapasitesi” olarak tanımlanır. AmpliTaq® DNA polimeraz *E.coli* tarafından ifade edilen ve genetiği değiştirilmiş bir enzimdir. AmpliTaq® rekombinant olduğu için bu enzimin saflığı ve verimliliği doğal enzimden daha fazladır. Ancak DNA amplifikasyonu sırasında bazı homolog *E.coli* sekansları ile potansiyel bir kontaminasyon meydana gelebilir, bu durumda konak organizma olarak *E.coli*’de ifade edilmeyen bir DNA polimeraz tavsiye edilir. Hem Taq hemde AmpliTaq® DNA polimerazlar büyüyen zincirin başından nükleotidleri ayıran 5’ uçtan 3’ uca ekzonükleaz aktivitesine sahiptirler.

Vent™- ; Deep Vent™- ; Pfu- ve UITma™- DNA Polimerazlar

Bu enzimler doğru eşleşmiş bir baz çiftine gelinceye dek yanlış eşleşmiş tüm parçaları kesebilen 3’ uçtan 5’ uca ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Ancak 3’-5’ ekzonükleaz aktivite, aynı zamanda primerlerin parçalanmasında da neden olabilir. Bu

nedenle enzim yalnızca reaksiyon başladıktan sonra eklenmeli ya da alternatif olarak kimyasal olarak değiştirilmiş primerler kullanılmalıdır.

AmpliTaqGold™ - DNA Polimeraz

AmpliTaqGold DNA polimeraz oda sıcaklığında inaktif olan ve yalnızca 94°C'lik inkübasyon aralığında aktive olabilen bir enzimdir. Bu durumda kullanılacak termal cycler programı 92-95°C'de bir ön inkübasyon safhası içermelidir. Time-released PCR için ön inkübasyon elimine edilebilir, ancak klasik PCR'den farklı olarak reaksiyonlar en az 10 döngü fazla sürdürülmelidir.

PCR Reaksiyonlarında Reaksiyon Tampon Çözeltileri ve MgCl₂

PCR için reaksiyonda direk olarak yer alan maddelerin yanısıra uygun bir tampon çözeltisine ihtiyaç duyulur. Tampon içeriği kullanılan enzimin özellik ve tipine bağlıdır ve bir çok üretici enzimle beraber 10X tamponunu da sağlar. Taq/AmpliTaq®DNA polimeraz ile en yaygın olarak kullanılan tampon;

10mM Tris, pH 8.3

50mM KCl

1,5-2,5 mM MgCl₂ içermektedir.

PCR'da divalent katyonların bulunması çok önemlidir. Reaksiyon karışımında MgCl₂ konsantrasyonu 0,5 ile 5 mM arasındadır ve optimum konsantrasyon ampirik olarak belirlenir (Innis ve Gelfland 1990). Mg⁺² iyonları;

- dNTP bağlanması için gerekli olan dNTP'ler ile çözünebilen bir karışım oluşturur.
- polimeraz aktivitesini artırır.
- primer/hedef DNA etkileşiminin T_m'ni artırır (böylece ikili etkileşimi daha dengeli hale getirir).

Genellikle düşük Mg⁺² konsantrasyonu düşük miktarda ürün (ya da hiç) oluşmasına sebep olurken yüksek miktarlardaki Mg⁺², özel olmayan ürünlerin (yanlış eşleşme) artmasına sebep olur. Hedef DNA solüsyonunda yüksek miktarlarda fosfat gibi negatif olarak yüklenmiş iyonik gruplardan ya da EDTA gibi şelatlayıcı maddelerden kaçınılması gerekir. Güncel literatürde çeşitli PCR tamponları ve DMSO, PEG 6000, formamid, gliserol, spermidin ve iyonik olmayan deterjanlar gibi reaksiyon hassasiyeti ve etkisini arttırmak için kullanılan ek maddelerin kullanılması üzerine tartışmalar bulunmaktadır (Roux, 1995).Belli DNA polimeraz türleri sadece bu tür ek maddelerin varlığında optimum aktivite göstermektedir (Ralfs ve ark. , 1992)

Deoksiribonükleosit Trifosfatlar

Serbest deoksiribonükleosit trifosfatlar (dNTP'ler) DNA sentezi için gereklidir. PCR için kullanılan her dNTP için konsantrasyon 20 ile 200 µM arasında olmalıdır ve yanlış bağlanma hatalarını önlemek için 4 dNTP de eşit miktarlarda kullanılmalıdır (Innis ve ark 1988). Yüksek saflıkta dNTP'ler üretici firmalar tarafından dört ayrı stok ya da dört dNTP karışımı olarak sağlanmaktadır. dNTP stok solüsyonları (genellikle 100 mM) için pH, son reaksiyon pH'sı 7,1'in altına düşmeyecek biçimde, 1M NaOH ile pH 7,0-7,5 arasında ayarlanmalıdır (Sambrook ve ark 1989). Şu anda üretilen dNTP stok solüsyonlarının çoğu pH ayarlı olarak sağlanmaktadır.

Döngü Sayısı ve Plato Etkisi

Jelde görülebilecek bir DNA bantı elde edebilmek için gerekli olan amplifikasyon döngülerinin sayısı hedef DNA'nın başlangıç derişimine bağlıdır. 50 hedef molekülü çoğaltmak için 40-45 döngü önerilir, ancak aynı derişimde 3×10^5 molekülü çoğaltmak için 25-30 döngü de yeterlidir (Innis ve Gelfald 1990). Bu oransızlık "Plato etkisi" olarak adlandırılır. Sebebi ürün konsantrasyonu 0,3-1 nM'e ulaştığı PCR'ın son safhalarında reaksiyonun lineer hızındaki azalmadır. Reaksiyon girdilerinin (dNTP, enzim) parçalanması kısa hedefler için, azalması ise (primerler, dNTP) uzun hedefler için bir problem olabilir. Son ürün inhibisyonu (pirofosfat oluşumu), özel olmayan ürünlerin reaksiyon girdileri için yarışması, konsantre ürünün (10 nM) yeniden bağlanma ile primer bağlanması için yarışması bu duruma yol açabilir (Innis ve Gelfald 1990). Eğer istenilen ürün 30 döngüde elde edilmiyorsa, döngü sayısını arttırmak yerine çoğaltılan üründen çok az bir örnek (1 µl) alınarak yeni bir reaksiyon karışımı ile 20-30 döngü çoğaltılmalıdır. Ana molekül derişiminin sınırlı olduğu durumlarda bu yeni amplifikasyon iyi sonuç verirken döngü sayısının 40 ya da daha fazla yapılması iyi sonuç vermez.

PCR için primer tasarımı (dizaynı)

Başarılı bir PCR için en kritik parametre primerlerin tasarımıdır. Tüm koşulların uygun olduğu bir durumda, sadece zayıf tasarlanmış bir primer PCR reaksiyonun çalışmamasına neden olabilir. Primer sekansı ürünün gen üzerindeki pozisyonu ve uzunluğu, erime sıcaklığı, ve nihayetinde PCR verimi dahil pek çok parametreyi etkiler (Innis ve Gelfald 1994). Zayıf tasarlanmış bir primer, ürün oluşumunu bastıracak biçimde rakip olabilen primer-dimer oluşumu ve/veya özel olmayan

amplifikasyon sonucu çok az veya hiç ürün üretilmemesine neden olabilir. Bu uygulama notu PCR için primer tasarlanırken dikkat edilmesi gereken kuralları içermektedir. Bu konuda daha detaylı bilgi başka kaynaklardan bulunabilir (Dieffenbach ve ark. 1995).

Primer Seçimi

PCR primerleri tasarlanırken çeşitli parametrelere dikkat edilmelidir. En kritikleri;

- Primer uzunluğu
- Erime sıcaklığı T_m
- Hassasiyet (specificity)
- Tamamlayıcı primer sekansları
- G/C miktarı ve polipirimidin (T, C) ve polipurin (A, G) uzamaları
- 3' uc sekansıdır.

İzleyen bölümlerde bu kritik maddeler tartışılacaktır.

Primer uzunluğu

PCR hassasiyeti, bağlanma sıcaklığı ve bağlanma süresi primer uzunluğuna bağlı olduğundan bu parametre başarılı bir PCR için çok önemlidir. Genel olarak, bağlanma sıcaklığı uygun olduğunda 18 ile 24 bazlık oligonükleotidler belli bir sekansa özel olarak bağlanırlar. Primer uzunluğu aynı zamanda bağlanma verimi ile de doğru orantılıdır. Genel olarak primer uzadıkça , bağlanma verimi azalır. Her basamakta daha az ana molekül primerle bağlandığından çoğaltılan üründe önemli derecede azalmaya neden olur.

Uygulama özellikle gerektirmedikçe, primerler çok kısa olmamalıdır. Aşağıda bahsedildiği gibi hedef en az 50°C'lik bağlanma sıcaklığına sahip bir primer tasarlamaktır. Bağlanma sıcaklığı ile erime sıcaklığı arasındaki bağlantı PCR'ın kara kutularından biridir. Genel kural bağlanma sıcaklığını erime sıcaklığından 5°C daha düşük olarak kullanmaktır. Genellikle sadece bu şekilde hesaplanan bağlanma sıcaklığı, eni uygun sıcaklık olmayıp belirlemek için ampirik deneyler yapılmak zorunda kalınabilir. Bu optimizasyon kademeli termal döngü kullanılarak kolaylıkla yapılabilir.

Erime sıcaklığı (T_m)

Hedef/bölge yönlü PCR reaksiyonu için iki primer kullanıldığı unutulmamalıdır. Her iki oligonükleotid primer de benzer erime sıcaklıklarına sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Eğer primerler T_m nedeni ile yanlış bağlanırsa, amplifikasyon daha az verimli olacaktır. Düşük sıcaklıkta T_m'ye sahip primer yüksek sıcaklıkta, yüksek sıcaklıkta T_m'ye sahip primer düşük sıcaklıkta çalışmayacaktır. Oligoların erime sıcaklığı en yakın komşu termodinamik hesaplamaları kullanılarak kesin olarak hesaplanabilir.

$$T_m^{\text{primer}} = \Delta H [\Delta S + R \ln(c/4)] - 273,15^\circ\text{C} + 16,6 \log_{10} [K^+]$$

Burada sarmal oluşum için H; entalpi, S; entropi, R molar gaz sabiti ve c de primerlerin derişimidir. Primer tasarımı yazılım paketleri kullanılarak yapılabilir (Sharrocks 94). Bu değerin iyi çalışan yaklaşık hesabı (genellikle 18-24 baz aralığında oligolar için) aşağıdaki formül kullanılarak yapılabilir;

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

A,T,C,G purin ve pirimidin bazlarıdır. Tablo 2, bu eşitlik (Wallace formülü) kullanılarak ve %50 G/C içeriği tahmini ile çeşitli uzunluklardaki primerlerin hesaplanmış değerlerini göstermektedir.

Tablo 2. Wallace eşitliği ile primerlerin T_m değerlerinin hesaplanması (G/C içeriği %50 kabul edilmiştir)

Primer uzunluğu	T _m =2(A+T)+4(G+C)	Primer uzunluğu	T _m =2(A+T)+4(G+C)
4	12°C	22	66°C
6	18°C	24	72°C
8	24°C	26	78°C
10	30°C	28	84°C
12	36°C	30	90°C
14	42°C	32	96°C
16	48°C	34	102°C
18	54°C	36	108°C
20	66°C	38	114°C

Wallace kuralı kullanılarak hesaplanan erime sıcaklıkları bu tablonun uç değerlerinde kesin değildir. Primerlerin erime sıcaklığı hesaplanırken ürünün erime sıcaklığının 92°C’de %100 erime elde edilebilecek kadar düşük olmasına dikkat edilmelidir. Bu parametre, daha etkili PCR elde edebilmek için önemli fakat her zaman gerekli değildir.

Genel olarak, 100-600 bp arasındaki ürünler PCR reaksiyonlarında etkili olarak çoğaltılabilir. Eğer kuşku varsa ürünün Tm’i aşağıdaki formül ile hesaplanmalıdır.

$$Tm=81,5+16,6(\log_{10} [K^+]+0,41(\%G/C)-675/uzunluk$$

Primer hassasiyeti

Yukarıda bahsedildiği gibi, primerin hassasiyeti (specificity), primer uzunluğuna bağlıdır. 24 bazlık özgün oligo sekansları 15 bazlık oligo sekanslarından daha hassastır. Primerler kısmi olarak çoğaltılacak hedef DNA içinde özgün bir sekans taşıyacak biçimde tasarlanmalıdır. Tekrarlanan sekanslar içeren primer ile genomik DNA çoğaltılması bulanıklık ile sonuçlanacaktır (birden fazla ürün türü). Ancak aynı primer, genomik kütüphaneden tek bir klon çoğaltıldığında net, tek bir bant verebilir. Taq polimeraz geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğu için primer uzaması düşük bağlanma sıcaklıklarında meydana gelebilir. Sıcaklık çok düşük olduğunda primer ile özgün olmayan bağlanma gerçekleşebilir. Eğer 3’ ucunda kısa da olsa homoloji varsa polimeraz bu noktadan çalışmaya devam eder. Genel olarak 55-72°C arasındaki erime sıcaklığı en iyi sonucu verir (bu sıcaklık aralığı Wallace kuralına göre 18-24 bazlık primer uzunluğu düşünülerek verilmiştir)

Tamamlayıcı primer sekansları

Primerler 3 bazdan daha fazla iç primer homolojisine sahip olmayacak şekilde dizayn edilmelidir. Primerler kendi içinde homolojiye sahip olursa, “snap back” veya “hairpin” (saç tokası) tabir edilen, primerin homolog sekansları sebebiyle kendi üzerine katlanarak çift zincir oluşması görülebilir. Bu da primerin hedef DNA’ya bağlanmasını etkileyecektir. Diğer bir tehlike primerler arası homolojidir. İki primerin orta bölümündeki kısmi homoloji hibridizasyonu engelleyebilir. Eğer homoloji primerlerden birinin 3’ ucuna karşılık geliyorsa primer-dimerleri (birbirine bağlanmış

iki primer molekülü) oluşur. Bu da elde etmek istenen ürünle yarışacağı için istenilen ürünün oluşmasını engelleyecektir.

G/C miktarı ve poliprimidin (T,C) ve polipurin (A,G) uzamaları

Primerlerin baz kompozisyonu %45 ile %55 arası GC taşıyacak şekilde olmalıdır. Primer sekansı özel olmayan bağlantıları arttıracak poli G ve poli C uzamaları olmayacak şekilde seçilmelidir. Primer-hedef kompleksinde gevşemeye yol açacak Poli A ve poli T uzantılarından da kaçınılmalıdır. Bu amplifikasyonun verimini düşürebilir. Polipirimidin (T,C) ve polipurin (A,G) uzantılarından da kaçınılmalıdır. İdeal olarak bir primer %50 GC içerik taşıyan ve yaklaşık 20 bp uzunluğunda nükleotidlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı erime sıcaklığı T_m'yi 56-62°C'lik aralıkta tutar (Dieffenbach ve ark. 1995).

3'- uc sekansı (zinciri)

3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı kontrol için çok önemlidir. Bu bölgede yer alan primer homologilerinin yaratacağı sorunlardan bahsedilmişti. Diğer bir değişken primerlerin 3' ucuna G ve C bazlarının eklenmesidir. Bu GC kıskacı G/C nükleotidlerinin daha kuvvetli hidrojen bağlarla bağlanması nedeni ile 3' ucun sonuna doğru bağlanmayı garanti eder. Bu aynı zamanda primer-hedef kompleksinde gevşemelere bağlı olarak reaksiyon hızının yavaşlamsının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon verimini artırır.

Özelleştirilmiş PCR

Yukarıda bahsedilen tipik PCR prosedürleri yoluyla hedef DNA'nın amplifikasyonun yanı sıra özel uygulamalar için geliştirilmiş özel PCR'lar vardır.

Nested PCR

Hedef DNA'nın PCR verimini arttırmak için nested yani birbirini içine gömülmüş primer setleri kullanılabilir (Newton ve Graham 1994). Nested PCR'da birinci primer seti ile 15-30 döngü arası amplifikasyonun ardından bu ilk PCR'ın ürünü kullanılarak bu bölgede bir sekansa karşılık gelen ikinci bir primer seti ile 15 ile 30 döngü arasında ikinci bir PCR yapılır. Böyle ilk PCR'dan elde edilen uzun parça ikinci PCR'ın hedef

DNA'sı olur. Nested PCR metodu kullanılarak, DNA amplifikasyon hassasiyeti ve özgünlüğü önemli ölçüde artırılabilir. Özgünlüğün artmasının nedeni bu tekniğin benzer lakin özgün olmayan olmayan çoğalma ürünlerini ortadan kaldırmasıdır. İlk PCR döngüsünden sonra ortaya çıkan özel olmayan ürünler, ikinci PCR primerleri için de tamamlayıcı olma ihtimalleri çok düşük olduğundan çoğaltılmayacak ve dolayısıyla sadece istenilen hedef sekans çoğaltılacaktır. Lakin bu yüksek hassasiyetin dezavantajı yüksek kontaminasyon riskidir. Bu nedenle bu tip PCR'lar yapılırken özellikle diagnostik laboratuvarlarda çok dikkatli olunmalıdır.

Multiplex PCR

Standart bir PCR reaksiyonunda özel bir sekansı çoğaltmak için tek primer çifti kullanılırken, multiplex (çoğul) PCR'da bir çok sekansı eş zamanlı çoğaltmak amacıyla birden fazla primer çifti kullanılır. Bir tüp içinde bir çok primerin bulunması yanlış eşleşmiş PCR ürünleri, "primer-dimer" oluşumu ya da daha kısa DNA parçalarının çoğaltılmasının yeğlenmesi gibi problemler yaratabilir (Atlas ve Bey 1994). Bu tip PCR çoğaltımı için benzer bağlanma sıcaklığına sahip primerler seçilir. Çoğaltılan ürünlerin uzunluğu da benzer olmalıdır; hedef DNA'ların uzunluğundaki büyük farklılıklar, kısa parçaların uzun parçaların üzerinde çoğalmasına sebep olur. Bu da ürün verimlerinde farklılık yaratır. Multiplex PCR tampon çözeltileri ampiklonlar arasındaki yarış ve kısa DNA parçalarının multiplex PCR esnasında yeğlenmesini azaltan Taq polimeraz katkısı içerir. Multiplex PCR ürünleri, kontrol amaçlı olarak, söz konusu gene özel prob ile hibridize edilebilir.

Pratikte PCR

Daha önceki bölümlerde gösterildiği gibi, PCR yaygın olarak kullanılan hızlı bir analitik ve hazırlık tekniğidir. Yalnız bu işlemin doğası gereği, eser miktarlarda DNA kontaminasyonu dahi hedef DNA olarak davranabilir ve bu da yanlış nükleik asidin çoğaltılmasına neden olur (false pozitif). Bu nedenle PCR amplifikasyonunu DNA'dan arındırılmış ortamda yapmak çok önemlidir. Fiziksel olarak ayrılmış alanlarda çalışmak kontaminasyon riskini azaltır. Dekontaminasyon kurallarına tamamen uymak (nükleik asitlerin dekontaminasyonu, aerosollerin önlenmesi gibi) yanlış pozitif sonuçları minimuma indirmek için en önemli zorunluluktur. PCR kontaminasyonu çeşitli sebeplerle oluşabilir;

- Laboratuvar masaları, pipetleme aletleri ve diğer cihazlar (daha önceki DNA deneyleri sırasında kontamine olmuş olabilir.)
- Örnekler arası çapraz kontaminasyon
- Daha önceki amplifikasyonlardan bulaşmış PCR ürünleri

Bu bölüm, çalışılacak örnek sayısına bakılmaksızın PCR için gerekli olan temiz bir ortamın kurulması ve korunması için gerekli olan rutin ihtiyaçları belirtmektedir (Roth ve ark. 1997).

Fiziksel önleme metodları

Laboratuvar Ortamı: Kontaminasyonu önlemek için fiziksel olarak ayrılmış çalışma alanları aşağıdaki gibi düzenlenmelidir.

1. Numune hazırlama bölgesi: Bu oda hedef DNA amplifikasyonu öncesi bütün diğer işlemlerinin yapıldığı alandan oluşur (DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması gibi).
2. PCR odası: Bu "temiz oda" PCR reaksiyonu için gerekli olan işlemlerin yapıldığı yerdir (mastermiks, primer seyreltilmesi gibi).
3. PCR sonrası alan: Bu alan hedef DNA zincirinin çoğaltılması ve PCR ürünlerinin tayini ve analizi için ayrılmıştır.

Ek olarak aşağıdaki genel kurallar uygulanmalıdır.

- Bütün odalarda PCR için ayrılan ve yeri değiştirilmeyen aletler ve malzemeler bulunmalıdır (eldiven, kimyasal, önlük gibi).
- Sıvılar ve diğer malzemeler içerik ve hazırlama tarihi ile etiketlenmelidir.
- Tek yönlü akış sistemi kullanılmalıdır. Örneğin hiçbir zaman PCR sonrası alandan, PCR öncesi alana, numune ya da örnek getirilmemelidir.
- DNAaz ve RNAaz ari, tek kullanımlık PCR reaksiyon tüpleri kullanılmalıdır.
- Aerosol dayanıklı pipet uçları ve PCR için özel olarak ayrılmış pipetler kullanılır (tercihen pozitif yer değiştirmeli pipet).
- Eğer mümkünse PCR reaksiyonları UV lambalı laminarda yapılmalıdır. Laminar içinde mikrosantrifüj ve yalnızca PCR için kullanılan eldivenler bulundurulmalıdır.
- Periyodik olarak çalışma alanları ve raflar %10 çamaşır suyu ve ardından %70 etanol ile yıkanmalıdır.

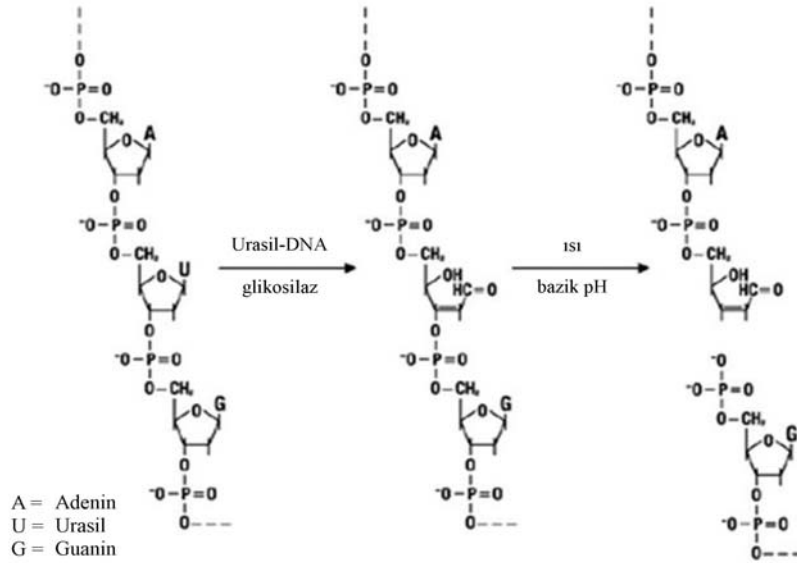
Örneğin çalışılması

- Daha önce bahsedilen alanlarda steril teknikleri kullanın ve daima eldiven giyin. Eldivenleri sık sık değiştirin. Özellikle hedef DNA içeren sıvılarla kontamine olduğunu düşündüğünüzde hemen yeni eldivenler kullanılmalıdır.
- PCR solusyonları ve hedef DNA hazırlarken daima yeni ve steril cam ve plastik malzeme, pipet, vs. kullanılmalıdır.
- Otoklavda bozulmayacak bütün solüsyon ve sıvıları otoklavlayın. Primerler, dNTPler ve Taq polimeraz otoklavlanmaz.
- Küçük miktarlarda saklanan, sadece sizin tarafınızdan kullanılan PCR kimyasal seti ve solüsyonlarını kullanın.
- DNA'yı pipetlerken kontaminasyon taşıyacak aerosoller oluşturmaktan kaçının
- Daima kontrol reaksiyonları yapın. Örneğin DNA içermeyen negatif kontrol ve daha önceki PCR'lerde başarı ile kullanılan pozitif kontrol.

Biyokimyasal önleme metodları

Urasil DNA Glikosilaz

PCR tek kopya molekülü milyarlarca kopya olarak çoğaltabilir. Bu yüzden çok küçük miktarlardaki kontamine DNA dahi çoğaltılarak yanlış pozitif sonuç verebilir. Bu tip kontaminasyonun kaynağı genellikle daha önceki PCR ürünleridir (taşıma kontaminasyon). Bu nedenle bu tip kontaminasyonları engelleyecek yöntemler geliştirilmiştir. Yaygın yöntemlerden biri PCR sırasında dTTP yerine dUTP kullanarak urasil içeren DNA (U-DNA)'lar üretmektir (Longo ve ark. 1990). Bu reaksiyonu izleyen PCR öncesi tüm PCR reaksiyon karışımlarını urasil-DNA glikosilaz (UNG) ile muamele edip, alkalik koşullarda ilk denatürasyon basamağında yüksek sıcaklığa (95°C'de) maruz bırakmak primidin polinükleotidlerin kırılması ve kontamine eden U-DNA'nın örnekten ayrılmasını sağlayacaktır (şekil 8).



Şekil 8. Urasil-DNA glikosilaz reaksiyonu

Bu yöntem laboratuvardaki bütün PCR reaksiyonlarını dTTP yerine dUTP ile yapılmasını gerektirmektedir. dU içeren PCR ürünlerini kullanırken aşağıdakilere dikkat edilmesi gerekmektedir.

- dU içeren PCR ürünleri dideoksi sekansı için ana molekül olarak ya da hibridizasyon hedefleri olarak kullanıldığında dT içerenler kadar iyi sonuç verir.
- dU içeren PCR ürünleri UNG bakteri hostlarına transfer edilirse direkt olarak klonlanabilir
- dU içeren substrat bazı reaksiyon enzimleri ile (EcoRI, BamHI gibi) kolayca kesilirken diğerleri bu substratlar üzerinde daha düşük aktiviteler gösterebilirler (HpaI, Hind II ve Hind III gibi).
- dU içeren DNA'ların kullanımı protein bağlanması veya DNA-protein etkileşim çalışmalarında tavsiye edilmemektedir.

DNaz I, Ekzonükleaz III

Diğer biyokimyasal yöntemler kontamine olmuş DNA'nın DNaz, ekzonükleaz III veya uzaklaştırılmak istenen DNA yapısı içinde hedef bölgesi bulunan bir restriksiyon enzimine tabi tutulmasına dayanır. Çok kuvvetli reaksiyon koşulları gerektiği için bu enzimler PCR amplifikasyonunun hassasiyetini düşürebilirler.

PCR reaksiyonu için karışım hazırlama

PCR için gerekli kimyasallar nükleaz ari su, reaksiyon tamponu, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, oligonükleotid primerler, deoksinükleotidler (dNTP), hedef DNA ve Mg iyonlarıdır. Genel olarak bütün maddeler (hedef DNA dışında) reaksiyon sayısına göre yeterli olacak miktarda tek bir tüpte karıştırılır (master karışım). Bu karışım tek tek tüplere dağıtılır ve hedef DNA eklenir. Master karışım solüsyonunun kullanımı kontaminasyon riskini azaltır ve aşağıdaki sebeplerden ötürü PCR reaksiyon performansını artırır :

- Bir seri analiz için aynı kalitede karışım garantisi vardır.
- Orijinal ve yeni hazırlanan karışımların kontaminasyon riski düşer.
- Daha yüksek hacimler pipetlenebilir.
- Pipetleme safhaları azalır, böylece zamandan kazanılır.

İlgilenilen bölgenin başarı ile çoğaltılması hedef DNA'nın miktarı ve kalitesine bağlıdır. Gereken hedef DNA'nın miktarı DNA örneğinin ne kadar karmaşık olduğuna bağlıdır. Organizmalar arasında nüklear genomun uzunluğunun farklı olduğu göz önünde bulundurularak reaksiyondaki DNA derişimi sabit tutulmalıdır (genellikle 10 ng/μl). Transformasyonda sıkça kullanılan bitki türlerinin genom boyutu ile belirli miktardaki DNA'nın içerdiği genom kopya sayılarının karşılaştırılması Tablo 3'de verilmektedir.

Tablo 3: Bazı bitki türlerinin genom boyutunun, belirlenmiş miktardaki DNA'nın içerdiği genom kopyaları ile karşılaştırılması

Örnek	Genom boyutu	1 μg DNA'daki genom kopya sayısı	1 ng DNA'daki genom kopya sayısı
Mısır	5x10 ⁹ bp	1,85x10 ⁵	185
Soya	1,55x10 ⁹ bp	5,98x10 ⁵	598
Tütün	3,8x10 ⁹ bp	2,43x10 ⁵	245
Pirinç	4x10 ⁸ bp	2,31x10 ⁶	2310

Örneğin 1 kb'lik bir DNA parçası eklenmiş 4kb'lik bir plazmid için reaksiyona dahil edilen DNA'nın %25'i istenilen bölgedir. Halbuki mısır genomunda (5x10⁹ bp) yer alan 1 kb'lik bir gen, reaksiyona dahil DNA'nın yaklaşık olarak %0,00002'sini oluşturmaktadır. Yani her reaksiyonda hedef kopya sayısını sabit tutabilmek için yaklaşık olarak bir milyon kez daha fazla mısır genomik DNA'sı gerekmektedir.

Optimize edilmiş sonuç için hedef sekansın en az 10^4 , tercihen daha fazla kopyası 25-30 döngüde sinyal alabilmek için başlangıç atası olarak kullanılmalıdır. Pratikte hedef sekansın 10'dan az kopyasını dahi çoğaltmak mümkün olsa bile bu durumda da elektroforezde sinyal alabilmek için daha fazla PCR döngüsü gerekecektir. Genel protokollerde 30 ile 40 döngü arası rutin olarak uygulanır. Özel olmayan çoğaltmayı da arttırabileceği için döngü sayısını arttırırken dikkatli olunmalıdır.

Kontroller

Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi laboratuvarında birçok kontaminasyon kaynağı bulunabilir. Örnekler, lab personeli, havalandırma, aletler ve kimyasallar kontaminasyon kaynağı olabilir. Kontamine ajanları arasında aşağıdakiler sayılabilir:

1. Daha önceki PCR'larda çoğaltılan DNA'ların taşınması yoluyla kontaminasyon
2. Örnekler arası kontaminasyon; hedef DNA'nın bir örnekten diğerine aktarılmaınsa neden olur
3. Daha önceki DNA'ların hazırlanmasından kalan genomik DNA
4. Dekontaminasyon reaksiyonlarından parçalanmış ürünler.

İlk üç kontaminasyon biçimi yanlış pozitif sonuçlar verirken, sonuncusu yanlış negatif sonuç verir. PCR reaksiyonlarının engellenmesine neden olan bu tip kontaminasyon ilk olarak Neiderhauser ve ark. tarafından 1994 yılında gösterilmiştir. UNG yöntemi kullanılarak yapılmış dekontaminasyon, primerlerle kompleks oluşumu ihtimalini arttırır. Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için PCR reaksiyonu sırasında hem pozitif hem de negatif kontroller kullanılmalıdır. Tablo 4 nükleik asit amplifikasyonu prosedürlerinden emin olmak için yaygın olarak kullanılan bazı kontrolleri göstermektedir.

Tablo 4. PCR dayalı testlerde kullanılabilecek kontroller

Kontrol	Yöntem
Ayraçların hedef DNA ile kontaminasyonu	DNA template olmadan yapılan PCR (yalnızca master karışım) – kontrol
Reaksiyonun özgünlüğü	İkincil ve özel olmayan ürünleri bulmak için yapılan kontroller
Reaksiyonun geliştirilmesi ve hassasiyeti	+/- kontroller (istenilen koşulları ve ürünleri sağlayabilmesi için)
PCR karışımının bütünlüğü	DNA ile + kontrol PCR'ı

Pozitif (+) kontroller

DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyon verimliliği pozitif (+) kontrollerle sınanmalıdır. İdeal olarak elde etme limitleri genomik karşılık olarak verilmelidir. Bu düşük kopya sayısında bile tanımlanan hassas bir şekilde üretilmesine izin verecek şekilde olmalıdır. Kural olarak incelenen hedef DNA'nın bilinen miktarlarını içeren referans hazırlanabilmelidir.

Negatif (-) kontroller

Hedef DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması veya amplifikasyon reaksiyon karışımlarının hazırlanması esnasında kontaminasyon olabileceğinden (çoğaltılan ürün veya nükleik asitleri taşıyan) her PCR reaksiyonu için DNA içermeyen bir örnekle negatif (-) kontrol yapmak gereklidir.

Kaynaklar

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1983). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., NewYork.
- Atlas, R.M., and Bej, A.K. (1994). Polymerase Chain Reaction. In: Gerhardt, P., Murrey, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., (Eds) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, pp. 418-435.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. (1995). General Concepts for PCR Primer Design. In: Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. (Eds.) *PCR Primer: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 33-155.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press, pp. 3-12.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1994). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London, CRC Press, pp. 5-11.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **85**, 9436-9440.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* **93**, 125-128.
- Newton, C.R. and Graham, A. (1994). *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Limited, Oxford.

- Niederhauser, C., Höfelein, C., Wegmüller, B., Lüthy, J., and Candrian, U. (1994). Reliability PCR Decontamination Systems. *PCR Methods and Applications* **4**, 117-123.
- Ogawa, T., and Okazaki, T. (1980). Discontinuous DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 421-457.
- Roux, K.H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR methods and Applications* **4**, 185-194.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., and Weber-Rolfs, I. (1992). Substances affecting PCR: Inhibition and enhancement, 51-58. In: *PCR: Clinical diagnostics and research*, Springer.
- Roth, A., Mauch, H., and Göbel, U. (1997). *Nucleic acid Amplification Techniques-Recommendations for Employing Molecular Methods in Diagnostic Routine Microbiology Laboratories and Measures for Internal Quality Assurance*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350.
- Saiki, R.K. et al. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487.
- Sambrook, J. and Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 14.
- Sharrocks, A.D. (1994). The design of primers for PCR. In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M. (Eds.) *PCR Tehnology:Current Innovations*. London, CRC Press pp.5-11.
- Suggs, S.V. Hirose, T., Miyake, E.H., Kawashima, M.J., Johnson K.I., and Wallace, R. B. (1981) Using Purified Genes. IN *ICN-UCLA Symp. Developmental Biology*, Vol.23, Brown, D.D. Ed., Academic Press, New York, 1981, 683.

Ek Kaynaklar

Gayer-Herkert, G., (1992). Molekularbiologische Methoden für den Nachweis von Mikroorganismen in Mischpopulationen-eine Literaturstudie. *Bioengineering* **5+6**, 55-64.

Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. and Scrimgeour, K., (1994). *Principes de Biochimie*. De Boeck-Wesmael, S.A. Bruxelles.

Knippers, R. (1995). *Molekulare Genetik*. Geaorg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kwok, S., Kellog, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C. and Sninsky, J.J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human Immunodeficiency Virus 1 model studies. *Nucleic Acids Research* **18**, 999-1005.

Larzul, D. (1993). *Le PCR: un procede de replication in vitro*. Tec&Doc Lavoisier, Paris.

Stryer, L. (1991). *Biochemie*. Spectrum Akademischer Verlag, GmbH, Heidelberg.

Watson, D.J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J., and Weiner, A. (1988) *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York.