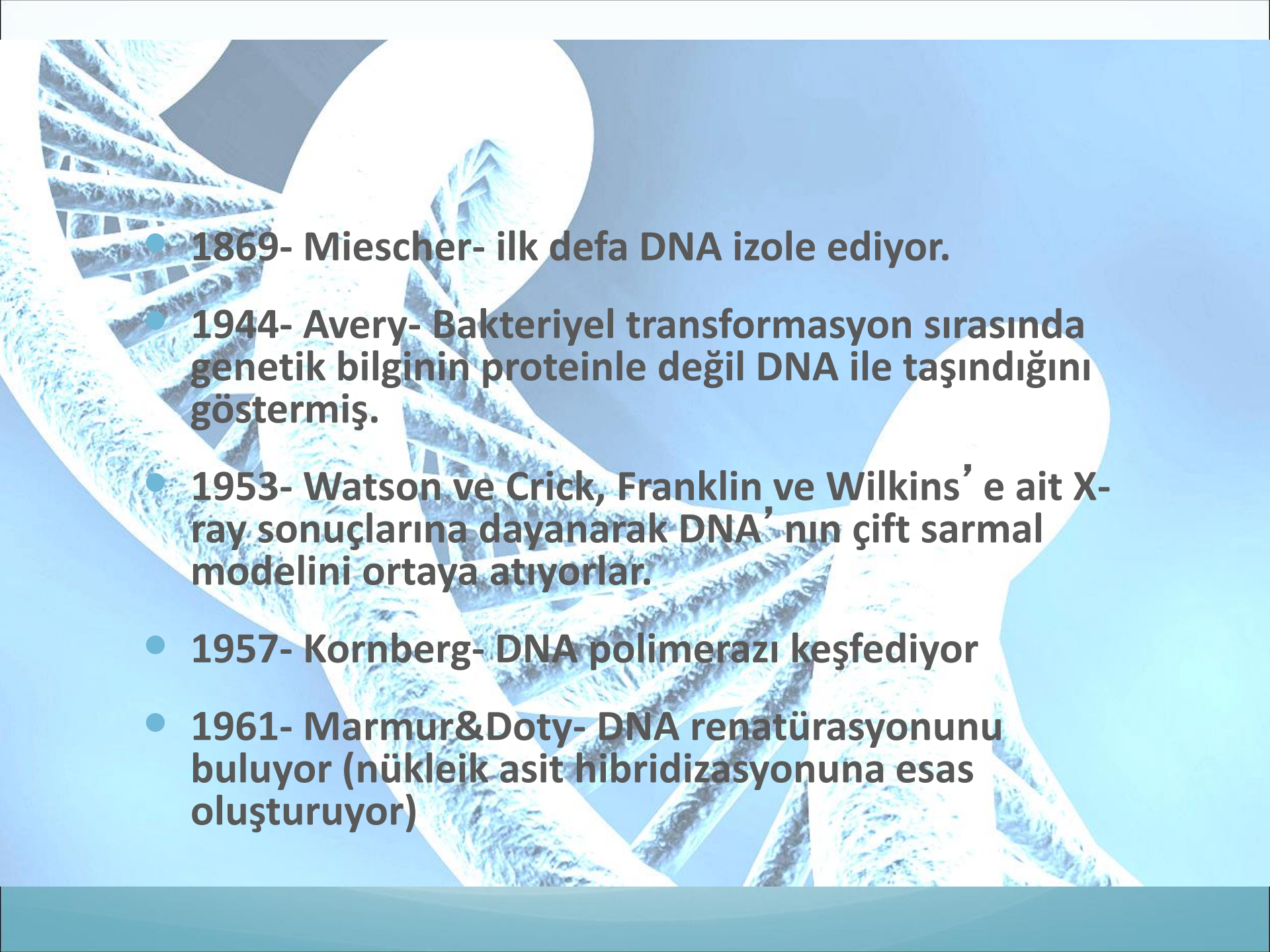
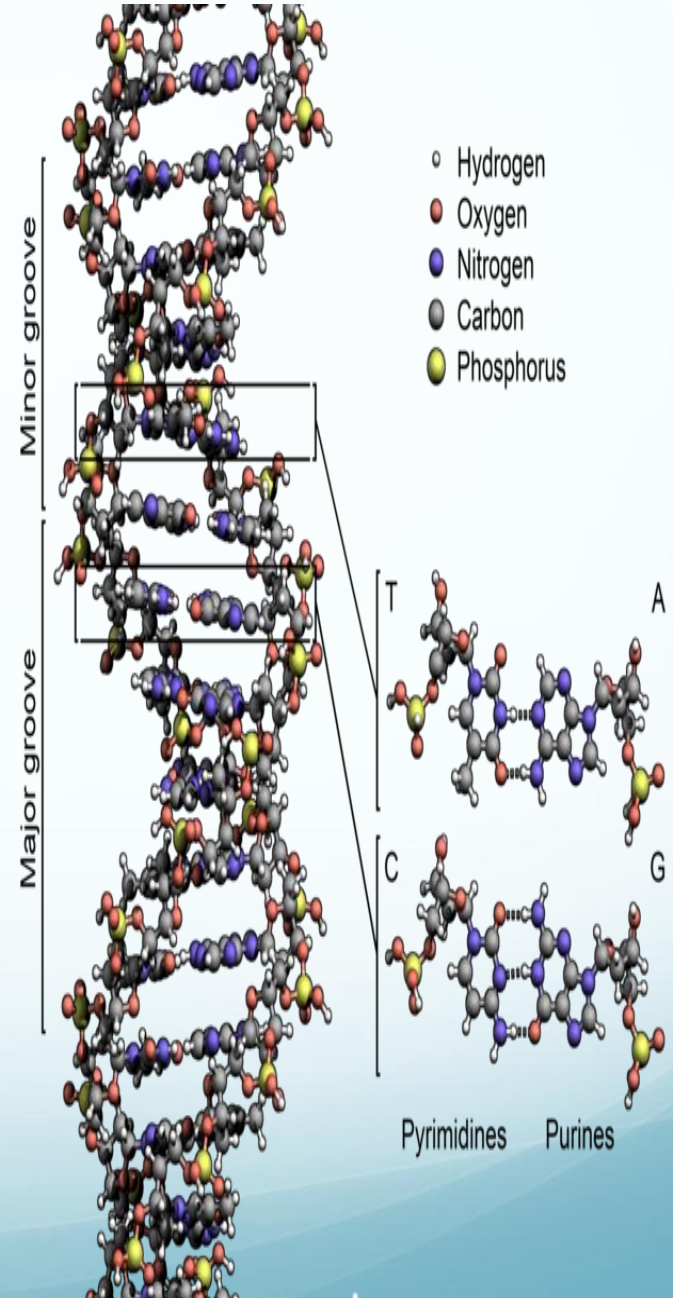


Polimeraz Zincir Reaksiyonu

- 
- 1869- Miescher- ilk defa DNA izole ediyor.
 - 1944- Avery- Bakteriyel transformasyon sırasında genetik bilginin proteinle değil DNA ile taşındığını göstermiş.
 - 1953- Watson ve Crick, Franklin ve Wilkins' e ait X-ray sonuçlarına dayanarak DNA' nın çift sarmal modelini ortaya atıyorlar.
 - 1957- Kornberg- DNA polimerazı keşfediyor
 - 1961- Marmur&Doty- DNA renatürasyonunu buluyor (nükleik asit hibridizasyonuna esas oluşturuyor)

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



- **Genom:** Genlerin toplamını veya tüm DNA'yı ifade eden terimdir.
- **Genomik:** Rekombinant DNA teknikleri, DNA dizi analizi metotları ve genomun (bir hücredeki tüm DNA) dizilenmesi, yapısal ve fonksiyonel analizi konularını inceleyen, genetik bilimi içerisinde yer alan bir disiplindir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- Genetik materyal ile çalışmada DNA'nın saflaştırılması (izolasyonu) yeterli değildir.
- DNA'nın saflaştırılmasının yanı sıra DNA'nın bol şekilde elde edilmesi başka bir deyişle analiz edilebilir konsantrasyona gelene kadar çoğaltılması (amplifikasyonu) gerekir.
- Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonudur (**Polymerase Chain Reaction, PCR**).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- **Polimeraz zincir tepkimesi** DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen isimdir.
- Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro" klonlama.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- PCR, hücrede doğal olarak meydana gelen replikasyona benzer şekilde, istenilen bir DNA parçasının kopyalarının enzimatik olarak sentezlenmesini sağlayan hızlı *in vitro* bir yöntemdir.
- Kopyalama, kalıp DNA üzerindeki hedef dizilerde kendilerine komplementer bölgelere bağlanan primer denilen oligonükleotitler tarafından yönlendirilir.

Polimeraz zincirleme tepkimesi (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

Kary Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında **Kimya** alanında **Nobel ödülü** almıştır.



PCR için kullanılan bir termal cykler cihazı

- Bu yöntemin tepkime karışımı içerisinde temel olarak
 1. DNA örneği (kalıp DNA),
 2. 4 tane serbest dNTP(deoksiribonükleozit trifosfatlar, dATP, GTP, CTP, TTP),
 3. DNA polimeraz enzimi (taq polimeraz),
 4. Primerler (hedef DNA'ya spesifik oligonükleotitler)
 5. $MgCl_2$ ve tampon bulunmaktadır.
- PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkısı Taq Polimeraz enziminin bulunması yapmıştır, çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklara dahi dayanabilen bir enzimdir.
- Bu enzim termofilik bir bakteriden (Thermus aquaticus) izole edilmiştir.

PCR

- 1- KALIP DNA MOLEKÜLÜ
- 2- HEDEF BÖLGEYE ÖZGÜL DNA OLIGONÜKLEOTİDLERİ (F ve R PRİMERLER)
(*forward ve reverse primer*)
- 3- DNA POLİMERAZ ENZİMİ
- 4- SERBEST NÜKLEOTİDLER
- 5- MAGNEZYUM (Kofaktör) ve TAMPON SOLÜSYONU

PCR Aşamaları

Bir PCR döngüsü

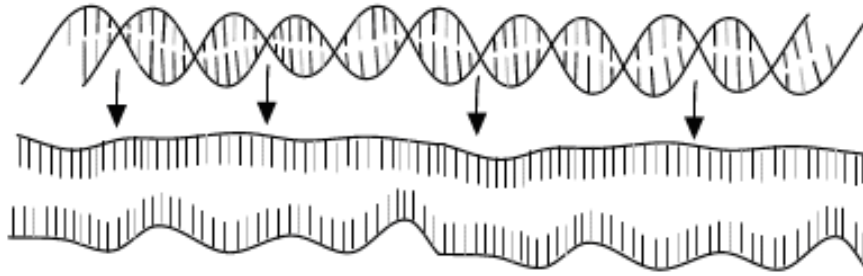
1. Denatürasyon,
2. Bağlanma (annealing),
3. Uzama (ekstensiyon, elongasyon)

diye adlandırılan üç aşamadan oluşur.

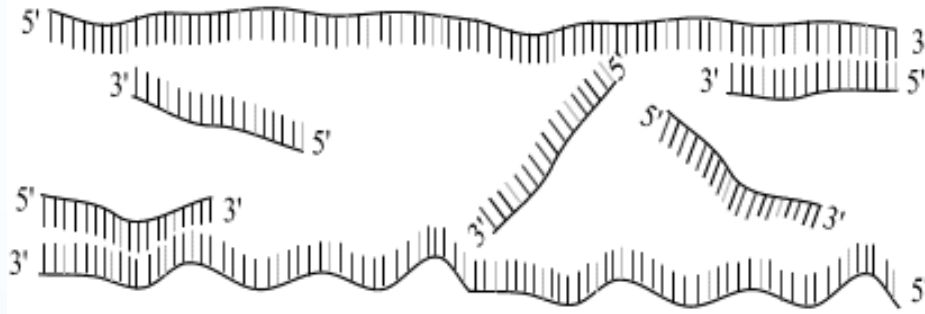
- Bir döngü 25-35 kez tekrar edilerek DNA amplifiye edilir

1. **Denatürasyon**, yüksek sıcaklık uygulanarak çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale getirildiği aşamadır (94-98° C'da yaklaşık 5 dakika süreyle).
 - (Çift iplikli DNA molekülü ısı ile denatüre edilir. Süre ve ısı DNA'nın büyüklüğü ve Hedef bölgenin "G+C" oranına bağlı olarak artar).
2. **Bağlanma**, aşamasında sıcaklık 50-70 ° C arasında bir değere düşürülür ve böylece primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır.
3. **Uzama aşaması**, (72 °C) yüksek sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz (genelde taq polimeraz enzimi kullanılır) tarafından hedef bölgenin sentezlenmesini kapsar.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

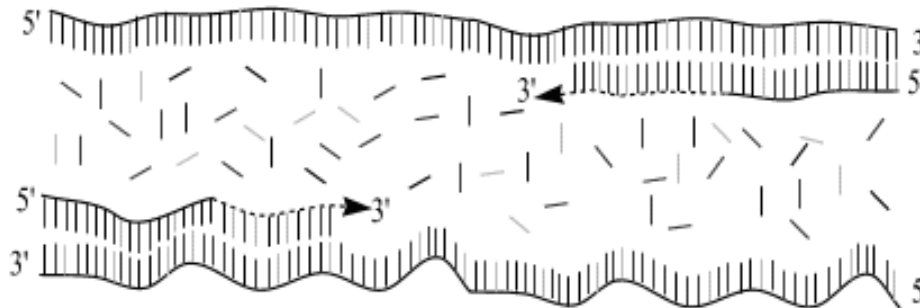


1. Aşama: Denatürasyon



2. Aşama: Bağlanma

F ve R primerler



3. Aşama: Uzama

dNTP'ler

PCR'nin şematik gösterimi

- PCR' de yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür.
- 25-35 döngü ile birkaç saat gibi kısa bir sürede istenilen DNA kısmının milyarlarca kopyası elde edilebilir.
- DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi, hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgilerin bilinmesini gerekli kılar.

ŞEMATİK OLARAK PCR



A. Çift iplik DNA



B. Denatürasyon



C. Primer bağlanması



D. *Taq* Polymeraz takılması



E. Kopya iplikler



F. Denatürasyon

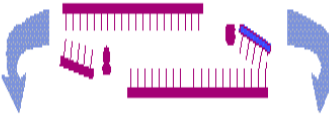
cDNA sentezinin ilk döngüsü (4 iplik)

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction

Reaction mixture contains target DNA sequence to be amplified, two primers (P1, P2) and heat-stable *Taq* polymerase



Reaction mixture is heated to 98°C to denature target DNA. Subsequent cooling to 37°C allows primers to hybridize to complementary sequences in target DNA



When heated to 72°C, *Taq* polymerase extends complementary strands from primers



First synthesis cycle results in two copies of target DNA sequence



DENATURE DNA

HYBRIDIZE PRIMERS

EXTEND NEW DNA STRANDS

Second synthesis cycle results in four copies of target DNA sequence



PCR Optimizasyonu

- **Standart bir PCR Amplifikasyon Protokolü**
- 0.5 (veya 0,2) ml eppendorf tüpünde 20-50 μ l/100 μ l
- reaksiyon + 50-75 μ l mineral yağı (opsiyonel).
- Kalıp DNA (10^5 - 10^6 hedef molekül) (0.5-1 μ M)
- İnsan: 1 μ g tek kopya genomik DNA= 3×10^5 hedef
- Maya: 1ng maya DNA= 3×10^5 hedef
- *E. coli*: 1 ng *E.coli*= 3×10^5 hedef

- DNA miktarı önemlidir. Öncelikle DNA' nın iyi izole edilmiş olduğundan emin olunmalıdır.

PCR çalışmıyorsa ilk akla gelen soru DNA' nın yeterli olup olmadığıdır.

- Negatif kontrol yapılmalıdır: mix içerisine DNA konmadan PCR çalıştırılır ve primerlerin jelde nasıl görüldüğüne bakılır. Böylece daha sonra DNA ile çalıştırdığımız PCR sonucunun jeldeki görüntüsü primerlerin mi yoksa gerçekten DNA mı net bir şekilde anlaşılır.
- Annealing sıcaklığı kontrol edilmelidir. Gradiyent uygulaması yapılabilir.(Tm değerinin altında ve üzerindeki değerlerle denemeler yapılır)
- PCR optimizasyonunda diğer önemli bileşen ise kullanılan tampondur. Amonyumsülfatlı ya da potasyum karbonatlı tamponlar kullanılabilir.

Nonspesifik bantlar varsa jelde, amonyum sülfatlı tampon kullanılır.

Potasyum klorürlü tampon (KCl₂); Normal şartlarda bu tampon kullanılır. Jelde zayıf bantlar varsa potasyum klorürlü tampon kullanılır.

- MgCl₂ miktarı ise PCR' ın işleyişini düzenleyen diğer bir faktördür.

MgCl₂ miktarının az ya da çok olması PCR' ı etkiler. Düşük MgCl₂ ürün oluşumunu azaltır. Yüksek MgCl₂ ise spesifik olmayan ürün birikimine sebep olur.

- **Enzim Konsantrasyonu:**
- Ünite enzim: Standart koşullarda 25⁰C de 1μM substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarı.
- Tavsiye edilen Taq polimeraz konsantrasyonu
- 1-3 ünite/100 μl reaksiyon arasındadır. Tabii diğer parametrelerin optimize edilmiş olmaları gerekir. Bununla beraber enzim miktarı sizin kalıp DNA'nıza ve primerlere göre farklılık gösterir. Bunu test ederken enzim konsantrasyonunu 0.5-5 unite/100μl olarak denemiz faydalı olur.
- Eğer enzim konsantrasyonu çok yüksek ise istemediğiniz bantlar oluşabilir (non spesific background), eğer çok düşük ise yeterli ürün elde edemeyebilirsiniz.
- Enzimler firmalara göre farklılık gösterir: aktivite, formülasyon, çalışma koşulları, ünite ifadeleri farklı olabilir.

- PCR'da kullanılan ilk enzim *E.coli* DNA Polimeraz I den elde edilmiş olan *Klenow* parçasıdır. Bu enzim yüksek sıcaklıklarda kararlı olmaması nedeniyle her döngüde yeniden eklenmesi gerekiyordu ve tabii bu nedenle kullanışlı değildi.
- Bakteriyofaj *T4* DNA polimeraz da PCR'da ilk kullanılan enzimlerdir. Replikasyon esnasında *Klenow* parçasına göre daha yüksek doğruluğa sahiptir ama bu da ısıyla parçalanmaktadır. *Thermus aquaticus* (Taq)'dan izole edilen DNA polimeraz PCR'da kullanılan ilk termostabil enzimdir ve hala daha da en yaygın kullanılan enzimdir. Enzim orijinal kaynağından izole edilebileceği gibi *E.coli*'ye klonlanıp ekspresyonu yapılan kaynaktan da izole edilebilir.
- *Stoffel* parçası *E.coli*'de ekspresyonu yapılan Taq polimeraz kesilmiş genininden elde edilir. 5'-3' eksonükleaz aktivitesi yoktur ve yaban tip enzime göre daha uzun hedeflerin amplifikasyonunu (çoğalmasını) sağlayabilir.
- *Faststart* polimeraz Taq polimerazın değişik bir formudur ve kuvvetli ısı aktivasyonuna ihtiyaç duyar ve böylece düşük sıcaklıklardaki polimeraz aktivitesine bağlı non-spesifik ürünlerin oluşması engellenir.

- *Pfu DNA polimeraz*, bir arke olan *Pyrococcus furiosus* dan izole edilmiştir. Hata okuma (proofreading) aktivitesi olduğu için Taq polimeraza göre yanlışlık yapma oranı beş misli daha düşüktür. PCR ilerledikçe hatalar arttığı için dizi analizi veya ekspresyon için klonlanacak ürünlerin çoğaltılmasında *Pfu* tercih edilir.
- *Vent polimeraz*, *Thermococcus litoralis*'den izole edilen aşırı derecede termostabilite gösteren bir DNA polimerazdır.
- *Tth polimeraz*, *Thermus thermophilus*'dan izole edilen termostabil bir polimerazdır. Mn^{+2} iyonları varlığında ters transkriptaz aktivitesi gösterir ve böylece direk hedef RNA'dan PCR amplifikasyonu yapılabilir.

Deoksinükleotid Trifosfatlar

- pH: 7.0
- primer stok: 100 mM (-20°C)
- 20-200 μ M/reaksiyon
- Dört değişik dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)nin de eşit oranlarda karşılaştırılması gerekir, bu yanlış bağlanma ihtimalini minimuma indirir. Kullanabileceğiniz en düşük dNTP konsantrasyonunu kullanmalısınız.
- Ör: 20 μ M her bir dNTP/100 μ l total hacim
- 2-6 μ g DNA yı sentezlemek için yeterli olmaktadır.
- Fazla dNTP Mg^{+} u da çöktürür (şelasyon) ve Mg^{+} konsantrasyonunu düşürür.

- dNTP konsantrasyonu da doğru ayarlanmış olmalıdır. dNTP miktarı ;

Çoğaltılacak DNA 'nın boyutuna

PCR'in döngü sayısına

MgCl₂ konsantrasyonuna

Primer konsantrasyonuna

Reaksiyon koşullarına bağlı olarak değiştirilmelidir.

Magnezyum konsantrasyonu

- Mg konsantrasyonunu neleri etkiler?

Primer bağlanmasını

Zincir açılmasını

Ürünün özgüllüğünü

Enzim aktivitesini

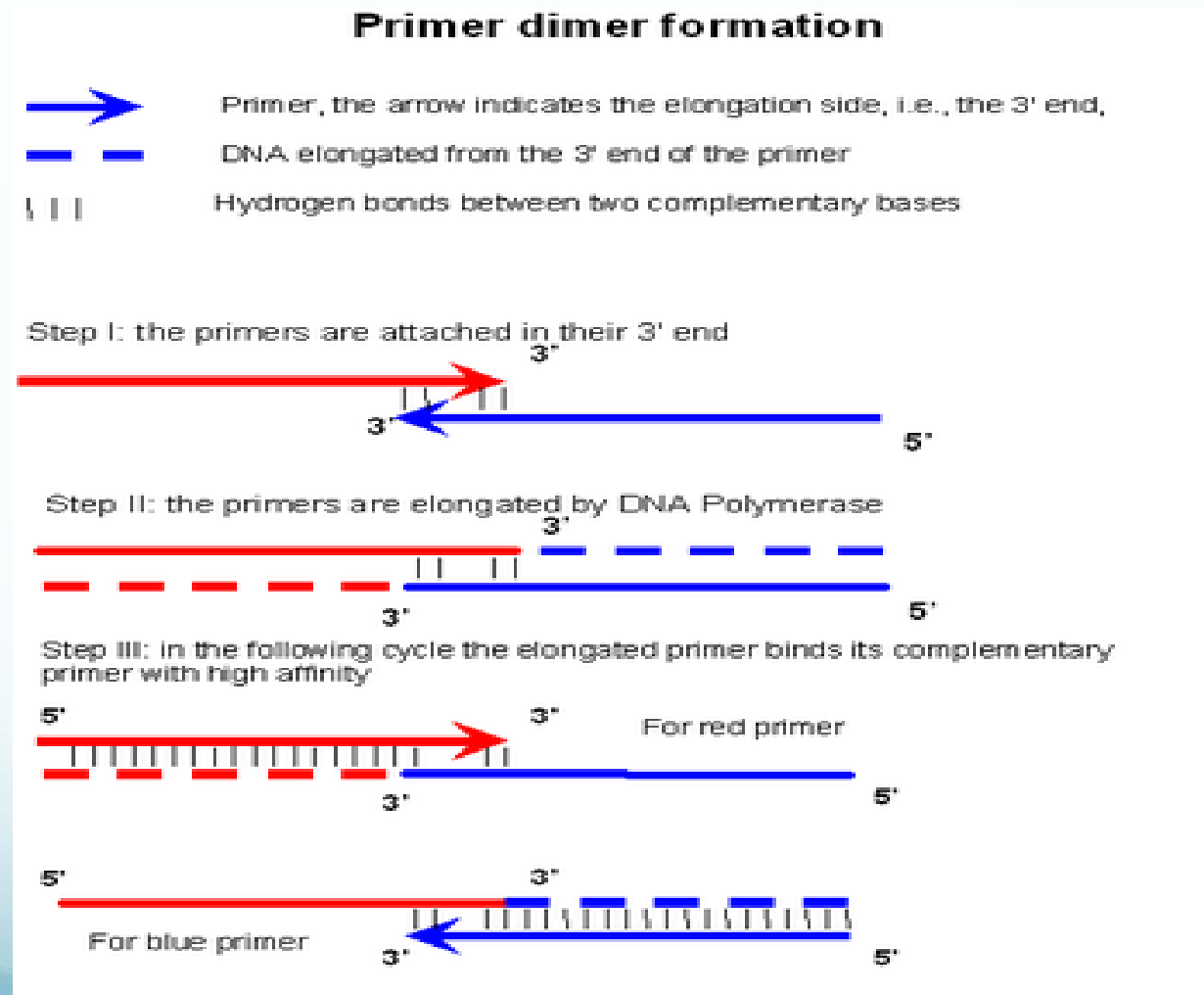
Kullanılması gereken konsantrasyon aralığı: 0.5-2.5
mM/reaksiyon

PRİMERLER

- 0.1-0.5 μM arasında primer konsantrasyonu genelde optimaldir. Fazla primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasını ve non-spesifik ürünlerin oluşmalarına neden olabilir buna ilaveten primer-dimerlerin oluşmasına da yol açabilir.
- Özgül olmayan ürünler ve primer-dimer artefakları PCR reaksiyonu için kendileri substrat oluştururlar ve istenilen ürünle enzim, dNTP, primer için yarışa girerler ve sonuçta istenilen üründen düşük miktarda elde edilir. Primerler yüksek konsantrasyonda olursa, primerler aralarında bağ yaparak dimerler oluşturabilirler.
- Primerler (F,R) ikisi de aynı miktarda mı? Kontrol edilmelidir.

- **Primer dizaynı**
- Tipik bir primer 18-28 baz uzunluğunda olur.
- %50-60 oranında G+C içerir.
- Tm'si 55-70⁰C arasında tercih edilir.
- 2⁰C A + T
- 4⁰C G + C

- 3' ucunda komplementer bazlar tercih edilmez bu primer dimer oluşumuna neden olur.



- Arka arkaya 3 veya daha fazla G,C istenmez, bu G + C'ce zengin dizilerde yanlış bağlanmaya neden olabilir.
- Palindromik diziler olmamasına özen gösterilir çünkü bunlar da saç tokası yapısı oluşturarak bağlanmayı engeller.

- Tüm bunlara dikkat edilerek tasarlanmış bir primer hala istenilen sonucu vermiyorsa, kalıp DNA'daki ikincil yapılara bağlı olabilir ve primeri yeniden dizayn etmek faydalıdır.

Denatürasyon Zamanı ve Sıcaklık

- PCR da sonuç alamamanın en önemli nedenlerinden biri hedef kalıp DNA'nın tamamen denatüre olamamasıdır.
- Tipik denatürasyon şartları:
- 95⁰C- 30 saniye
- 97⁰C -15 saniye dir.
- Hedef DNA da G+C oranı çok yüksek ise bu yükseltilebilir.

- DNA'yı denatüre etmeye zincirlerin ayrılmasına yeterli olmaktadır (strand-separation) temperature-Tss).
- Yetersiz denatürasyon DNA zincirlerinin tam açılmamasına, hatta tekrar birleşmesine neden olur ve yeterince ürün elde edilmez.
- Bunun tersine, çok yüksek sıcaklıkta veya çok uzun denatürasyon gereksiz enzim aktivite kaybına neden olur. Taq DNA polimerazın yarı ömrü hakkında bir fikir sahibi olmak için aşağıdaki değerler bakabilirsiniz. Değerler yaklaşık değerlerdir.
- 92.5°C >2 saat
- 95°C 40 dakika
- 97.5°C 5 dakika

DÖNGÜ SAYISI

- Karry Mullis çok fazla döngü sayısı kullanmanın yanlışlığını şöyle ifade ediyor 'tek kopya bir geni 40 siklusedan fazla amplifiye ediyorsanız PCR reaksiyonunuzda bir şeyler ciddi anlamda yanlış gidiyor demektir.'
- Çok fazla döngü özgül olmayan arka plan ürünleri artırır. Çok az döngü de az sayıda ürün elde etmenize neden olur. Yaklaşık şu değerleri verebiliriz;

3x10 ⁵ hedef molekül sayısı (1µg insan DNAsı) (10 ng maya DNAsı) (1 ng <i>E.coli</i> DNAsı)	25-30 siklus
1,5 x 10 ⁴ hedef molekül	30-35 siklus
1 x 10 ³ hedef molekül	35-40 siklus
50 hedef molekül	40-45 siklus

Plato Etkisi

• Bu terim ürünün belli bir süre sonra, yani geç PCR döngülerinde, $\sim 0.3-1$ pmol ürün biriktirdikten sonra, ürün birikiminde bir yavaşlamanın veya durmanın olduğu durumları ifade eder.

• Bunun nedeni:

• Substratların (primer ve dNTP) tükenmesi

• dNTP ve enzim stabilitesi

• Özgül olmayan ürün veya primer-dimer oluşması ve bunların reaksiyon girdileri için yarışa girmesi.

• Yüksek ürün konsantrasyonunda, yeterli denatürasyon/zincir ayrılmasının gerçekleşememesi olabilir.

• Burada, başta çok az amplifiye olan özgül olmayan ürünler, tercihen amplifiye olabilir. PCR döngü sayısının iyi optimize edilmesi gerekir.

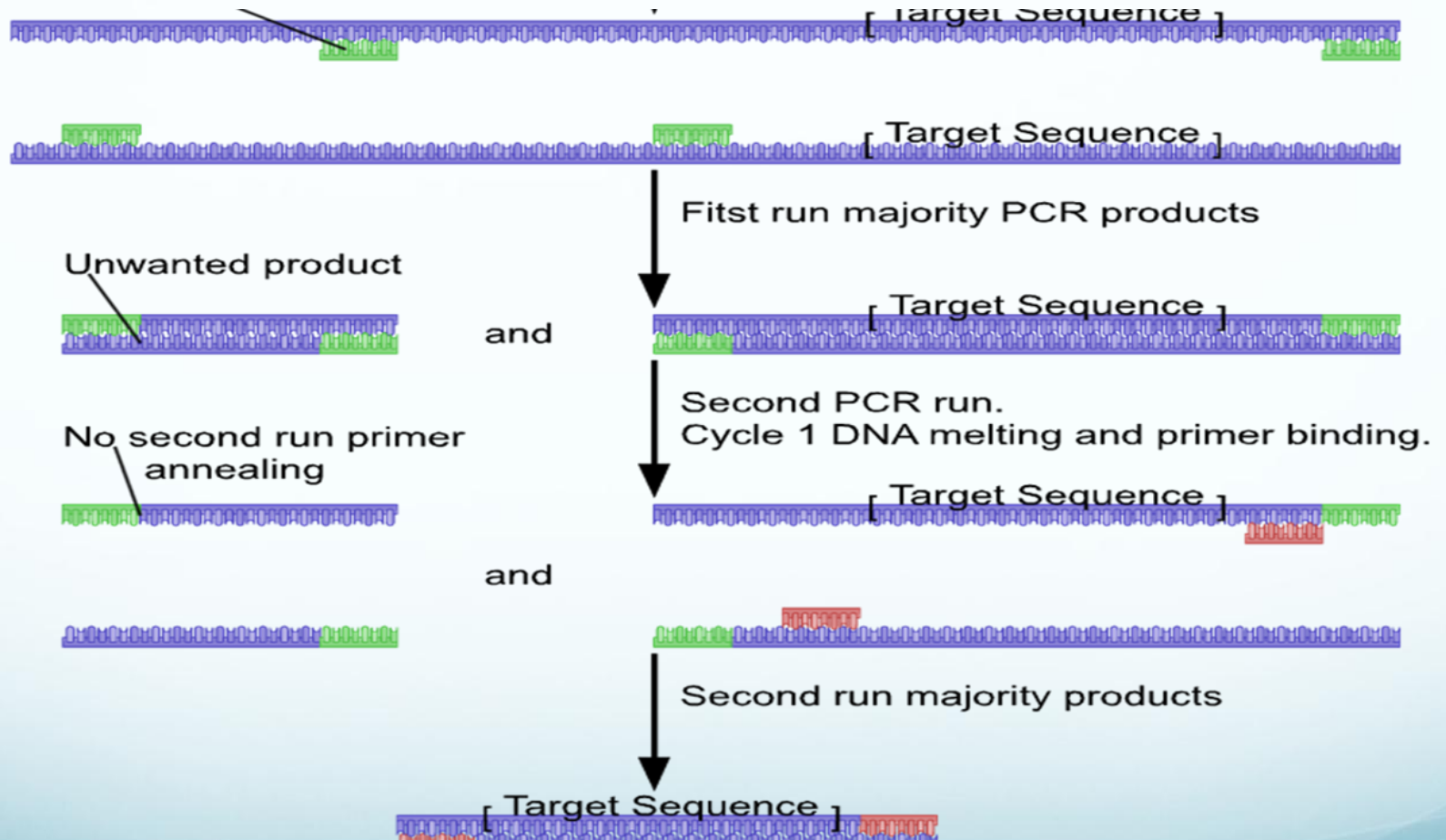
PCR ÇEŞİTLERİ

Multipleks PCR

- İki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır.
- Bir örnekte bulunan değişik ajanlara ait DNA'lar aynı tüpte aynı anda çoğaltılabilir.
- Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat çoklu primer setleri kullanılır.
- Primer bağlanma sıcaklıklarının birbirine uygun olması gereklidir.
- Primerlerin birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gerekir.
- Önemli derecede optimizasyon gerektirir.

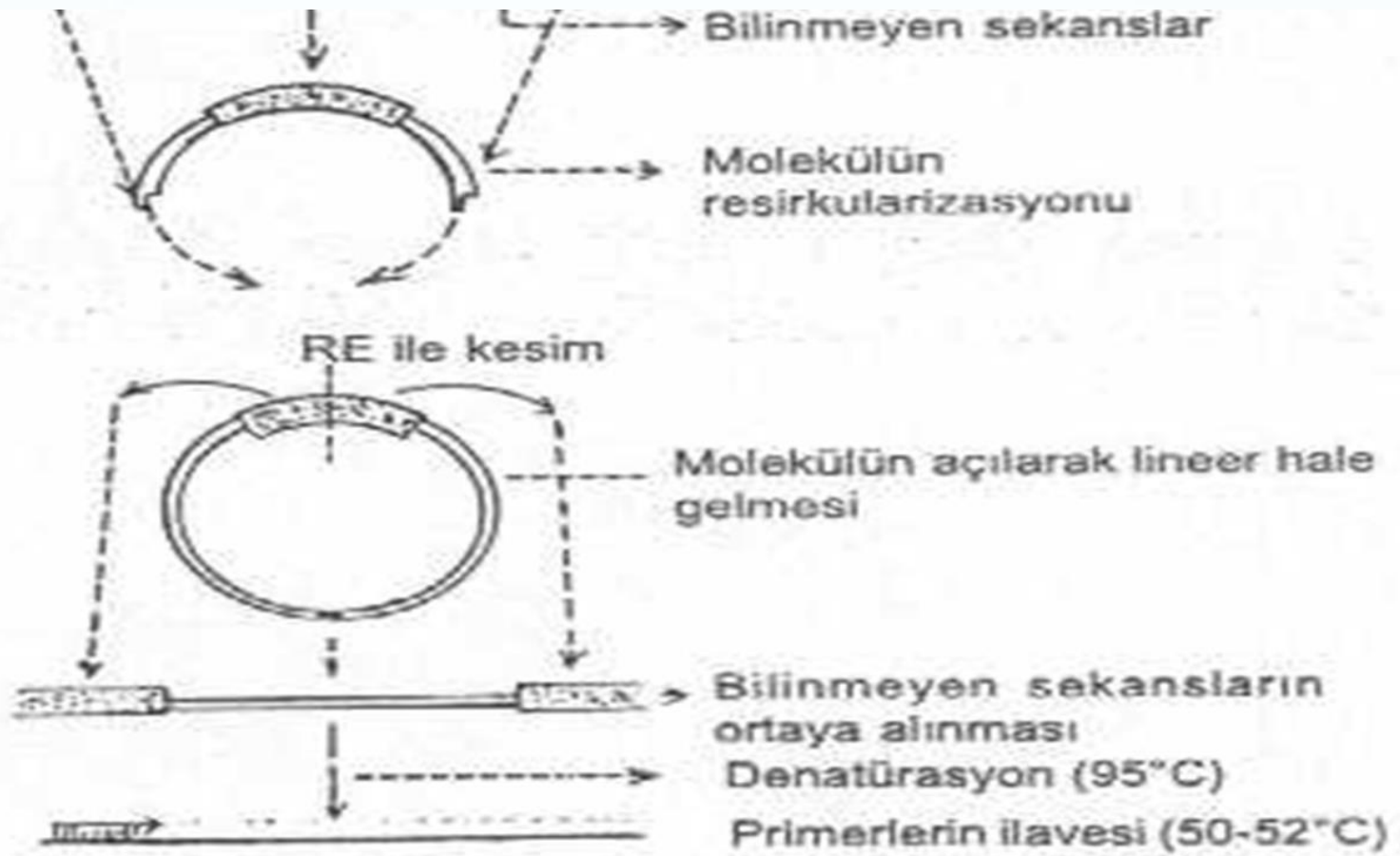
Yuvalanmış (Nested) PCR

- Bu metot; klasik PCR'a farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan oluşur.
- Birinci amplifikasyondan elde edilen ürün ikinci için kalıp olarak kullanılır.
- Kullanılan ikinci primer takımı diziye özgüdür. Oluşan ürünler jel elektroforezi ile incelenir.



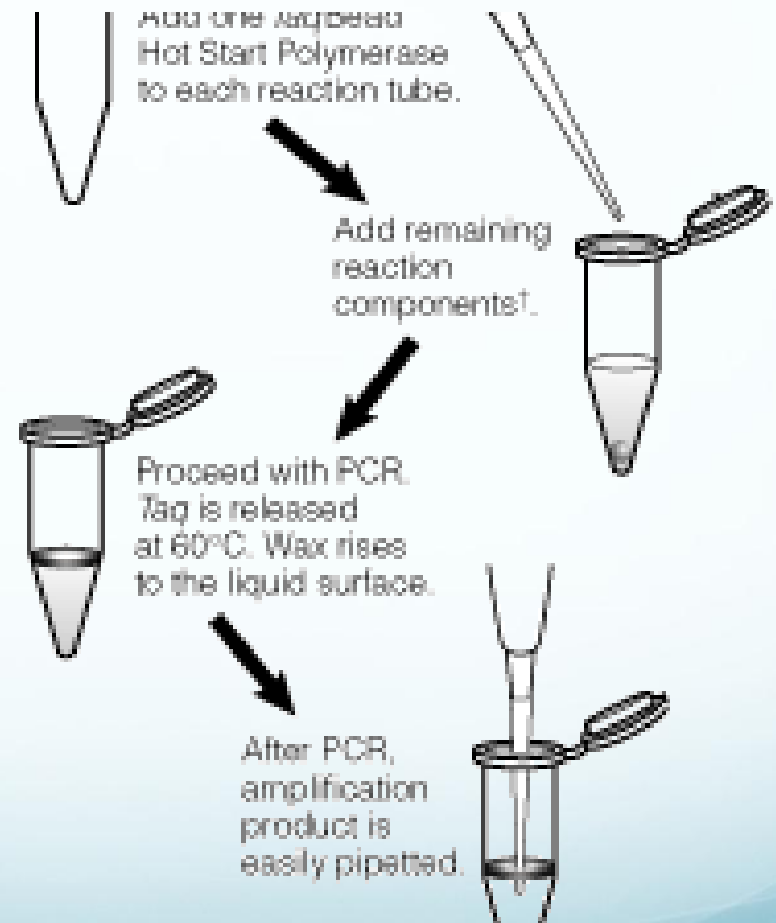
Ters (Inverse) PCR

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



Hot Start PCR

PCR'in ilk aşamasında non-spesifik amplifikasyonları azaltmayı amaçlayan bir yöntemdir.



- Hot Start PCR düşük sıcaklıklarda Taq polimerazı inaktive ederek özgül olmayan bağlanmaların engellenebildiği bir PCR yöntemidir.
- Bu metotda; Örnekler (çift zincirli DNA) kendi denatürasyon sıcaklığında denatüre edilir ve sıcaklık aniden 55°C'ye düşürülüp primer ve Taq polimeraz eklenir.
- Değişik yaklaşımlar kullanılabilir ör; bağlanma sıcaklığında Taq polimerazı durduran özgül antikorlar kullanılabilir. Sıcaklık 72°C'ye yani uzama sıcaklığına ulaştığı zaman bu antikorlar Taq polimerazdan ayrılır ve daha yüksek oranda özgüllük ile amplifikasyon başlar.

Touchdown PCR

- Birçok tüp kullanılması yerine bir tüpe ve ya da birkaç tüpte değişik döngü şartları denenir.
- Optimal amplikasyona ulaşmak hedeflenir.
- Primer ve kalıp arasındaki kimliği tam olarak bilmiyorsanız kullanırsınız.
- Burada değiştirilen annealing sıcaklığı ilk siklularda primer tmsinin üzerinde başlatılan annealing siklus sayısı arttıkça düşürölür ve sonuçta tm değerinin altında bir değere iner.

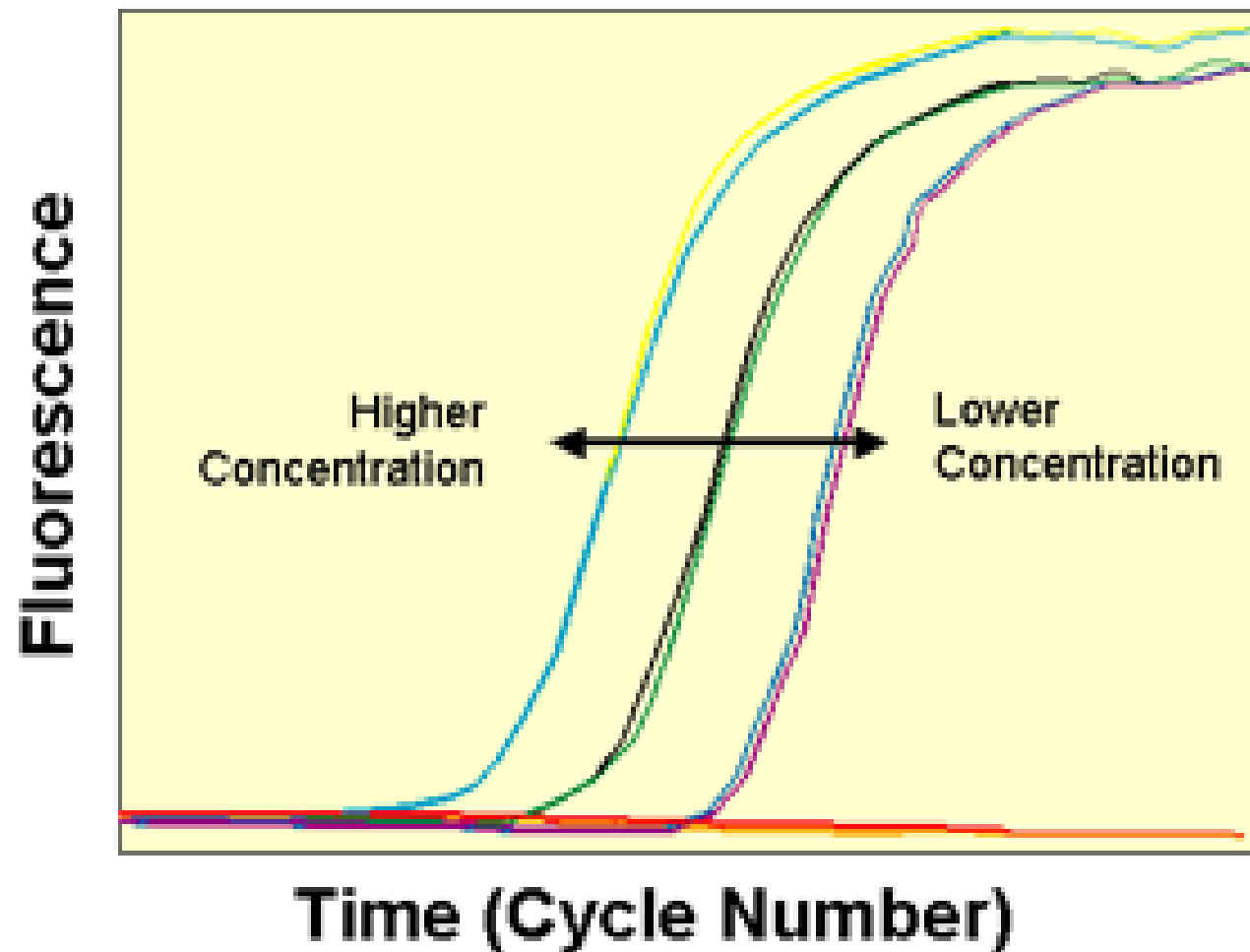
Asimetrik PCR

- Orijinal DNA'nın tek zincirini diğer zincirden daha çok çoğaltmaya dayanır.
- Farklı oranda(1:50) primer kullanılır ve iki aşamada gerçekleşir.
- Yavaş (aritmetik) amplifikasyondan sonra sayısı az olan primerler (sınırlayıcı primerler) tükenmektedir.
- Sınırlayıcı primerler daha yüksek Tm sıcaklığında kullanılır. Fazla primerlerle reaksiyonun devamı sağlanır.
- Reaksiyonun ortalarında sınırlayıcı primerlerin konsantrasyonu düşer.
- Dna dizi analizi , hibridizasyon problama , tek zincir konformasyon analiz tekniklerine hazırlık olarak yapılmaktadır.

Real-Time PCR

- Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.
- Real-time PCR ürünlerinin **kalitatif** ve **kantitatif** analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır.
- Real-time PCR Reaksiyon esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.

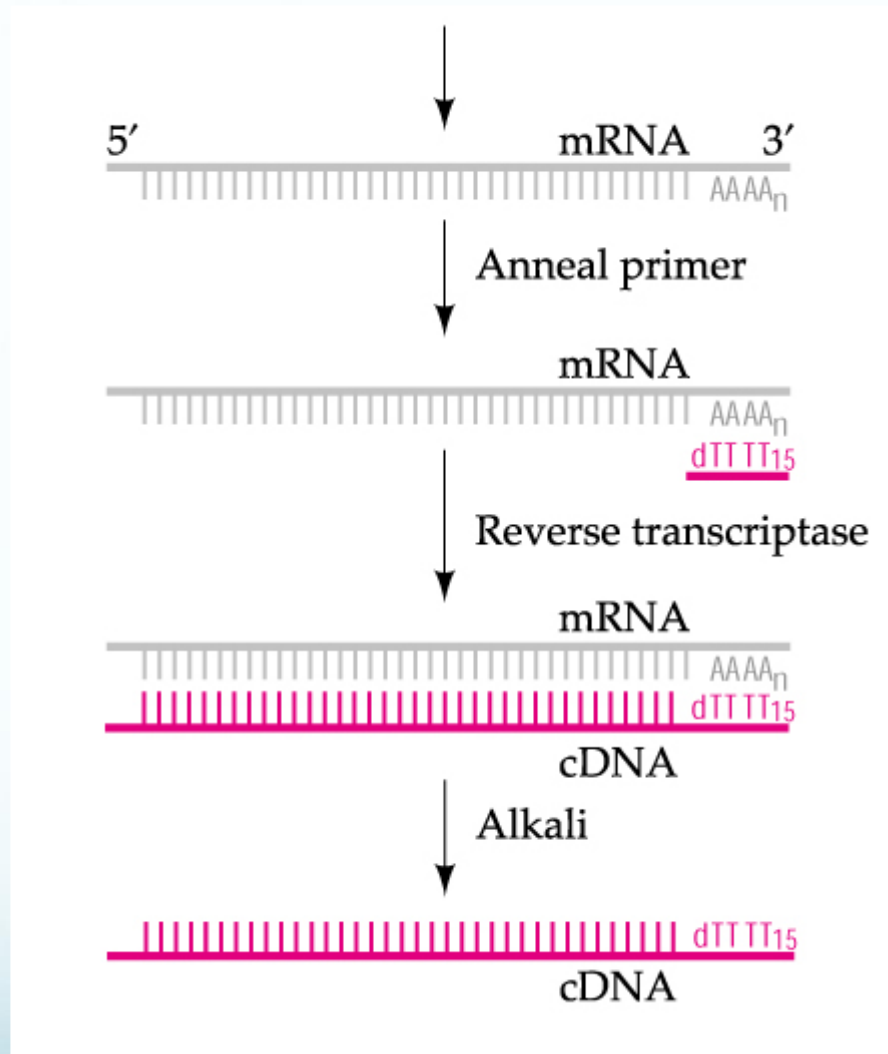
Real-Time Monitoring of PCR



RT-PCR (REVERS TRANSKRIPTASE, TERS TRANSKRİPTAZ)

- RNA PCR olarak da adlandırılan RT-PCR iki aşamalı olup, RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar.
- RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. T. thermophilus DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilir.
- RT-PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Aynı zamanda “Message amplification phenotyping-MAPPING” olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizini de mümkün kılar.
- Ayrıca RNA PCR, hücresel bir RNA örneğindeki tüm RNA'lardan PCR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması içinde yararlı bir yöntemdir .

- Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu



- Değişik ters transkripsiyon enzimleri bulunmaktadır.
- MMLV enzimi RNA da bulunan ikincil yapıları aşamaz.
- SS III (Superscript) RNA da bulunan ikincil yapıları açarak senteze devam edebilir.

- Örnek Ters Transkripsiyon Reaksiyonu
- I. Denatürasyon
- Primer (50ng/ul rastgele heksamer).....1 ul
- RNA (100pg- 5ug).....x ul
- 10mM dNTP.....12 ul
- DEPC ile muamele edilmiş H₂O.....12 ul'ye kadar
- RNA'nın denatürasyonu için 5 dakika 65°C'de inkübe edilir

- RT karışımının hazırlanması
- 5X cDNA sentez tamponu.....4ul
- 0.1 M DTT.....1ul
- RnaseOUT (40 U/ul).....1ul
- DEPC ile muamele edilmiş su...1ul
- Ters transcriptaz (15units/ul)..1ul
- Denature RNA ve primerler.....12ul

- Örnek ısı döngü cihazına yerleştirilir.
- 25°C'de 10 dakika
- Takiben 50°C'de 60 dakika
- 85°C'de 5 min bekletilerek reaksiyon sonlandırılır.
- Sentezlenen cDNA -20° C'de saklanabilir veya PCR reaksiyonları için hemen kullanılabilir.

- 10X PCR tamponu.....5ul
- 50mM MgCl₂.....1.5ul
- 10mM dNTP.....1ul
- 10uM sense primer.....1ul
- 10uM antisense primer.....1ul
- Taq polimeraz (5U/ul).....0.4ul
- cDNA.....2ul
- DEPC muameleli edilmiş su....38.1ul
- TOTAL.....50 ul

- PCR reaksiyonu gerçekleştirilir.
- Agaroz jel elektroforezi ile sonuçlar değerlendirilir.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism PCR)

- Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
- Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, Restriksiyon endonükleazlar, restriksiyon bölgeleri olarak bilinen çift zincirli DNA'nın sadece spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir.
- RFLP uygulamalarında kullanılabilecek 3000 civarı restriksiyon enzimi bulunmaktadır.
- Çalışılan gen bölgesine ait farklı organizmalardan alınan baz dizilimlerine ait bilgiler (Gen Bankalarından) kullanılmalıdır.
- RFLP analizi; SNP analizlerinde, Mutasyon analizlerinde, viral suşlardaki mutasyonları saptamada, viral epidemileri belirlemede kullanılmaktadır.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

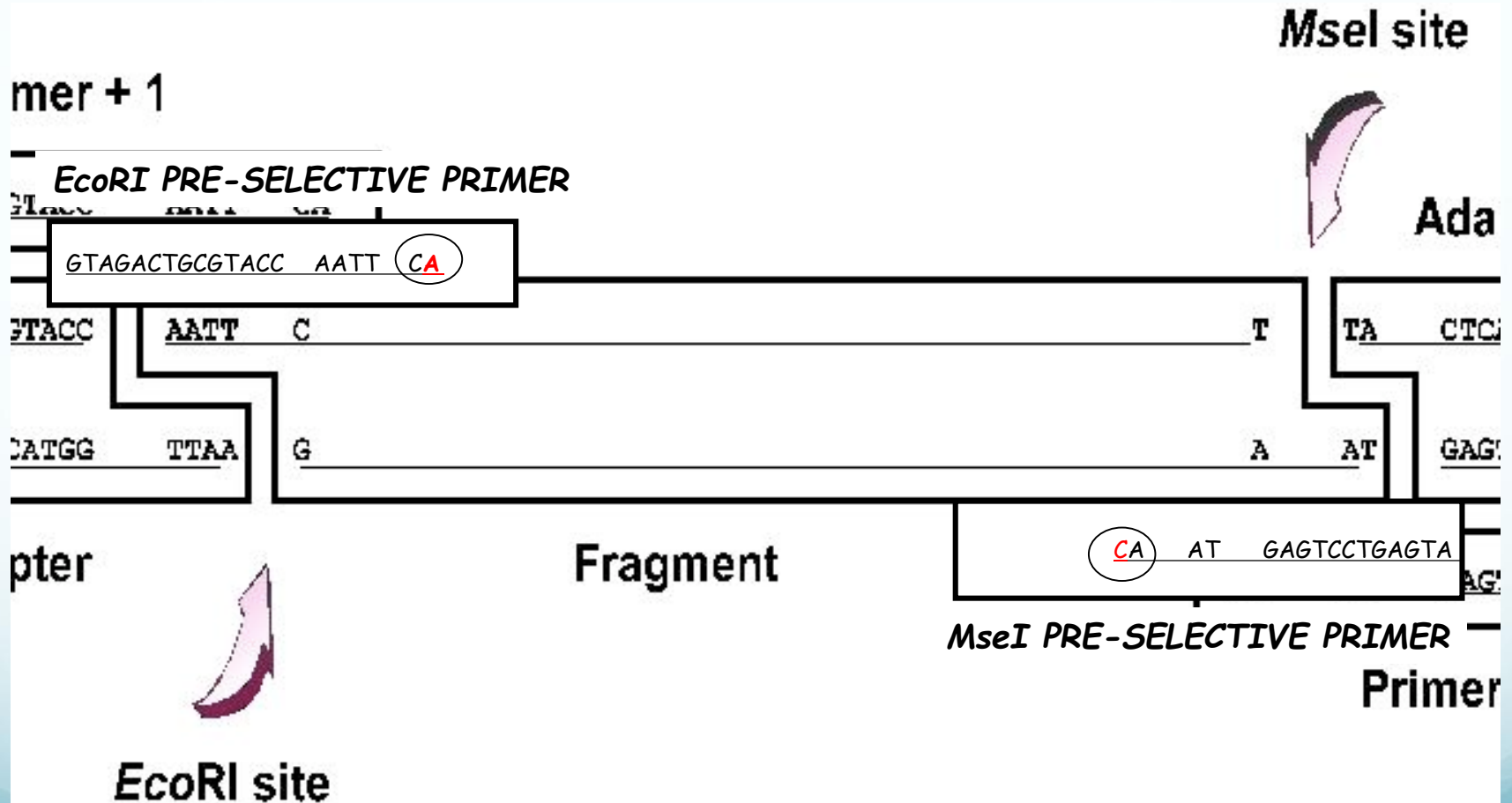
- Bu yöntem restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA parçalarını PCR çoğaltımıyla belirleyen DNA parmak izi tekniğidir.
- AFLP analizi yapabilmek için DNA dizi bilgisine gerek yoktur.
- AFLP, kesilmiş genomik DNA parçalarını tespit eden ve RFLP ye benzeyen bir DNA parmakizi tekniğidir. RFLP (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi) ye benzerliği nedeniyle AFLP adını almıştır.
- Çünkü bu teknik uzunluk farklılıklarından ziyade kesilmiş DNA parçalarının varlığını ya da yokluğunu gösterir.

AFLP analizi aşağıdaki basamaklardan oluşur

- Genomik DNA bir nadir kesim yapan birde sık kesim yapan restriksiyon enzimle kesilir.
 - Genellikle bu iş için *EcoRI*, *Pst* I ve *Mse* I restriksiyon enzimleri tercih edilir.
- Çift zincirli adaptörlerin restriksiyon fragmentlerinin uçlarına bağlanması (ligasyon).

- Adaptör ve kesilmiş DNA parçalarına komplementer iki primer kullanılarak bu parçaların çoğaltılması. İlk gerçekleştirilen işlem ön-amplifikasyondur. Böylelikle bir sonraki yani seçici PCR için kalıp DNA'lar üretilmiş olur.
- γ^{33} P-ATP ile primer işaretleme. İşaretleme için genellikle *EcoRI* ve *Pst* I primerleri (seçici nükleotid uzantısı olan primerler) tercih edilir. İşaretleme reaksiyonu T4 polinükleotid kinaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilir.

Ön Seçici PCR



- Bu basamak seçici amplifikasyondur.
- Adaptör ve restriksiyon sekanslarına komplementer ve 3' uçlarında 3 selektif nükleotit ile uzatılmış iki primer kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin çoğaltılması.

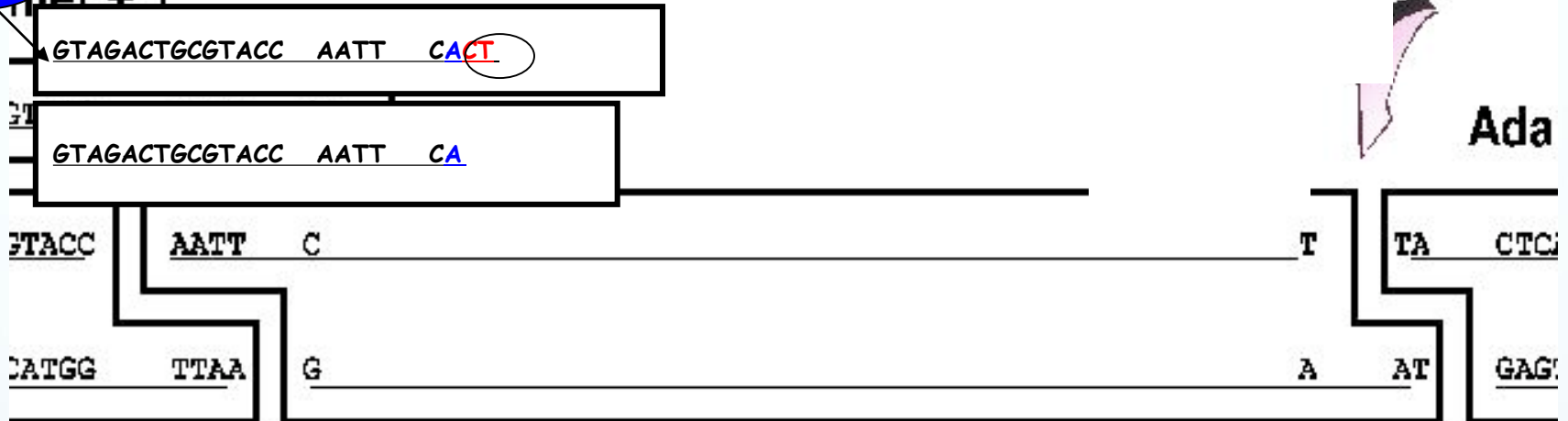
Seçici PCR

FAM

EcoRI SELECTIVE PRIMER (labeled)

el site

Ada



pter

Fragment

CA AT GAGTCCTGAGTA

GACA AT GAGTCCTGAGTA

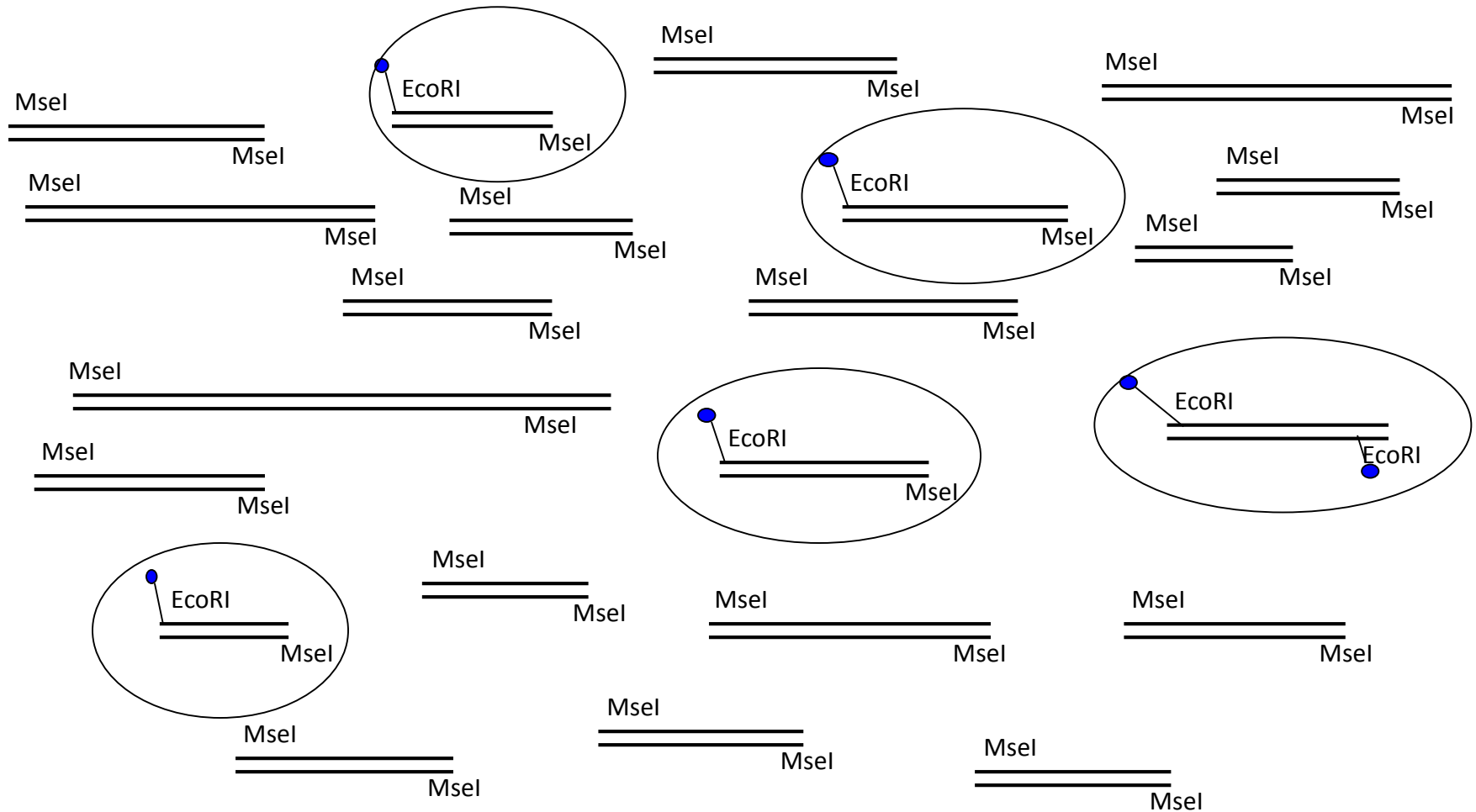
EcoRI s...

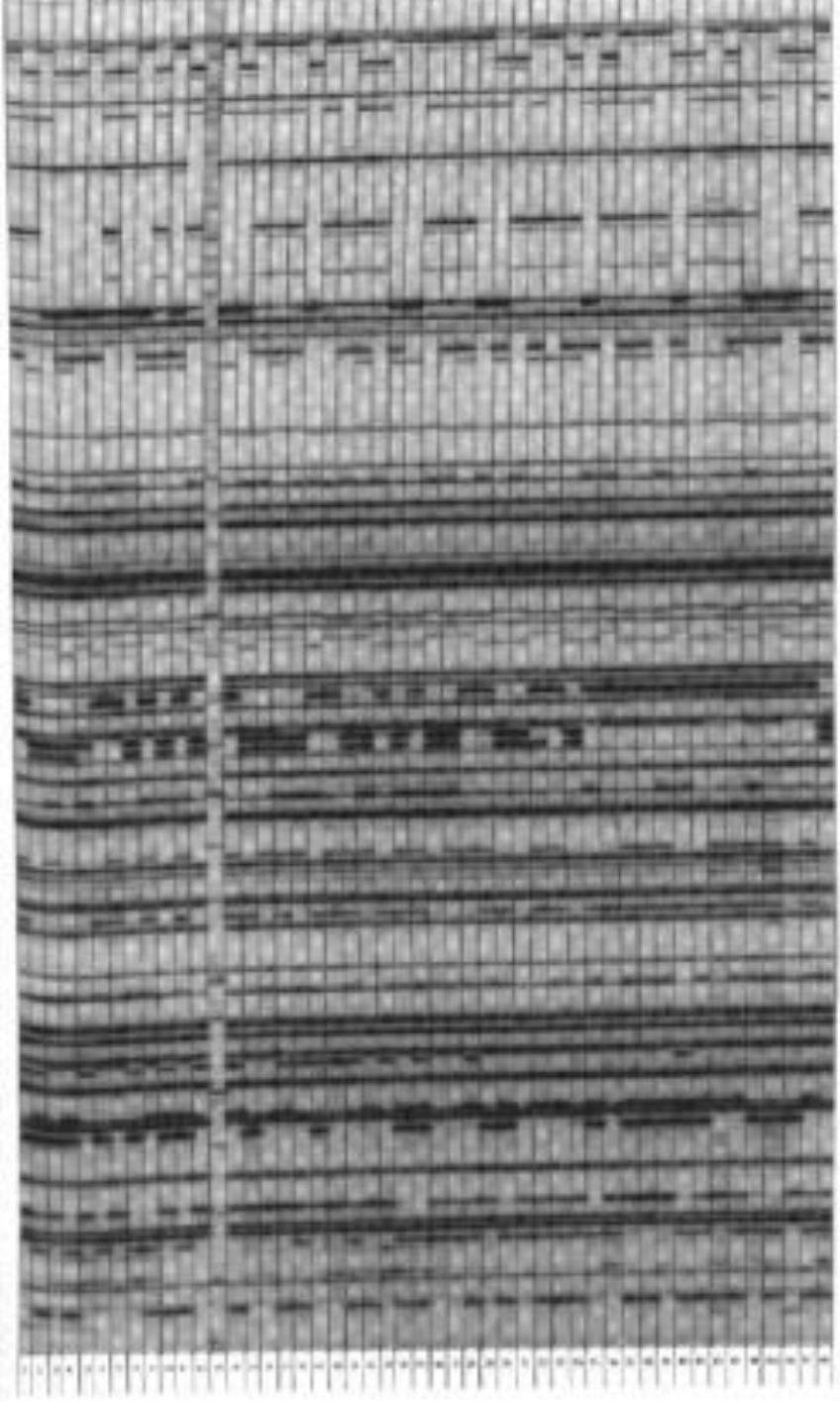
MseI SELECTIVE PRIMER

EcoRI: 6bç kesici- > 4096 bç'inde bir kesim

MseI: 4bç kesici 256 bç'inde bir kesici

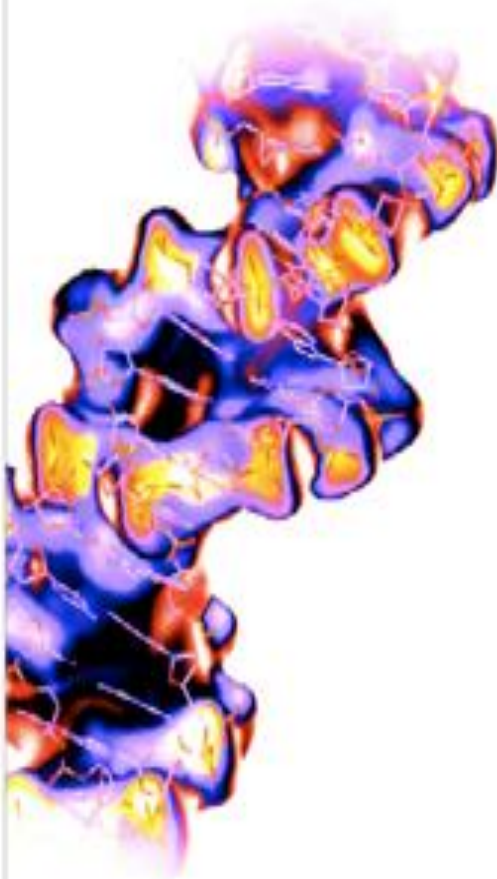
İşaretsiz oluğu için görünemeyen Seçici PCR ürünleri





- Çoğaltılmış DNA parçaları denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezinde ayrılır.
- DNA parmakizlerinin otoradyogramının alınır.
- Sonuçların uygun istatistik programları ile değerlendirilmesi.

AFLP® System Analysis Getting Started Guide

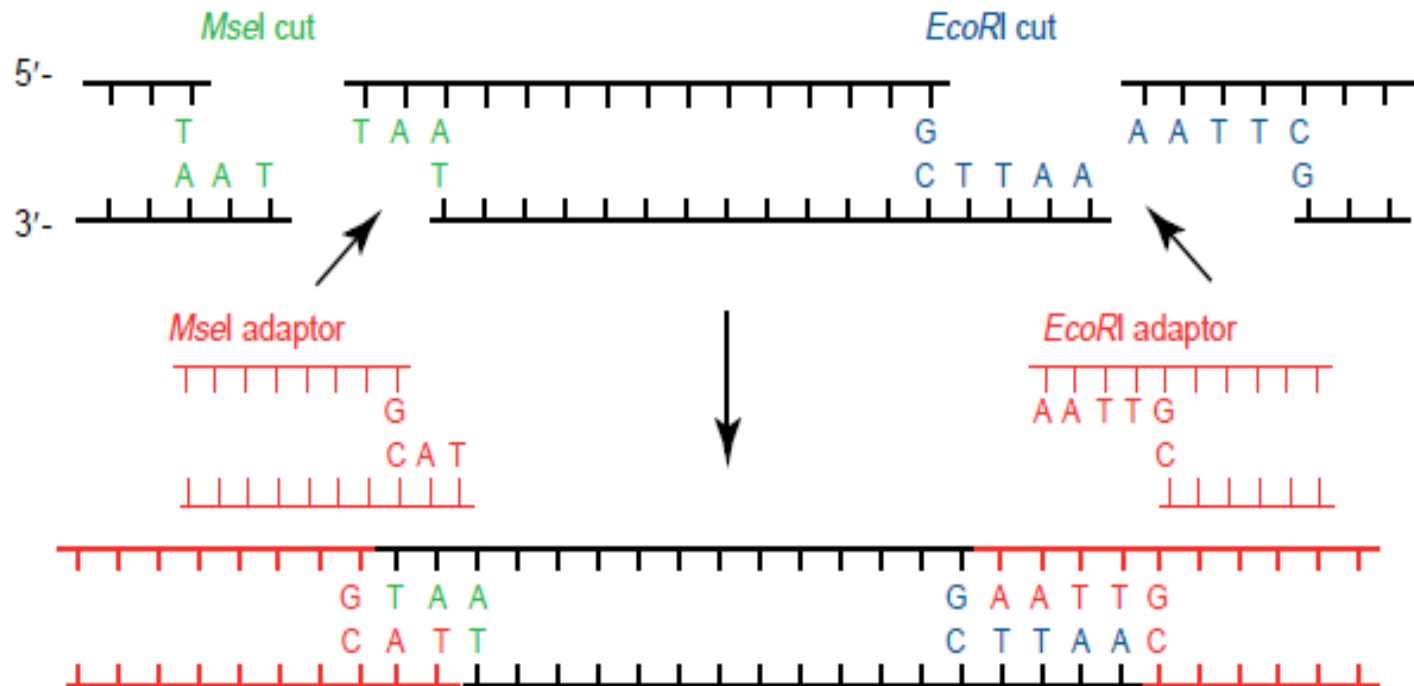


•AFLP reaksiyonları sonucunda elde edilen bantlar uygun istatistiki programlarla incelenir. Bantlar 1-0 olarak değerlendirilerek benzerlik indeksleri elde edilir. Bunu takiben genetik benzerlik veya farklılıklara göre filogenetik ağaçlar elde edilir.

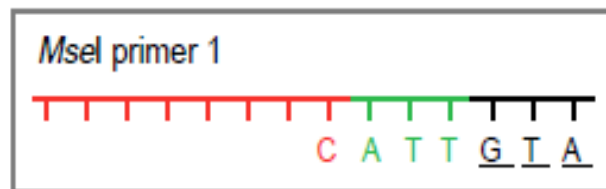
•Bantlar incelenirken monomorfik ve polimorfik olarak ayrılır. Böylece bu belirteçlerden yola çıkılarak tüm genomun ya da genomun özel bir kısmının genetik haritası çizilebilir.

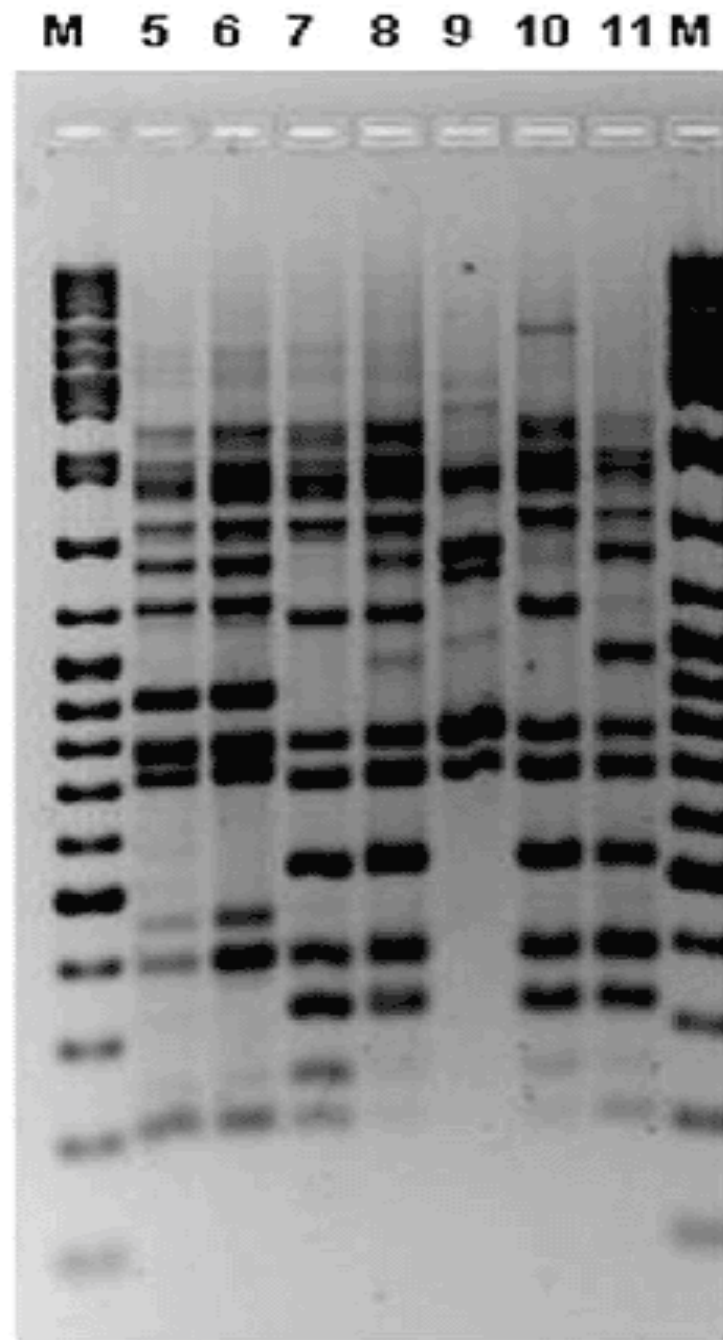
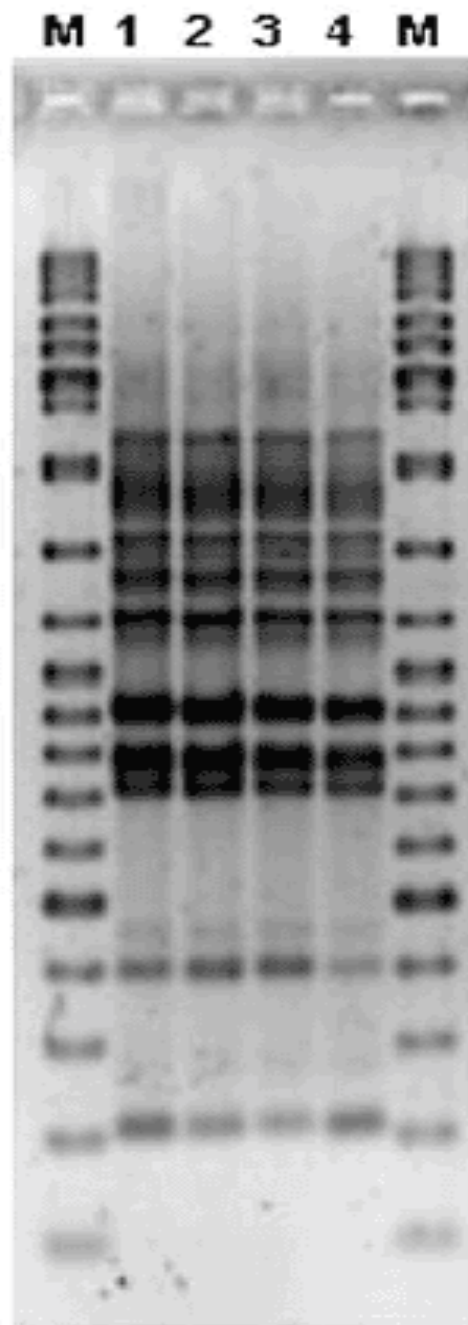
- AFLP tekniği çok sayıda DNA parçacığının birlikte çoğaltılabilmesi için etkili bir yoldur. Çoğaltılan DNA parçaları sadece seçilen enzimlerce oluşturulmuş kesim parçalarıdır.
- Elde edilen parçaların sayısı genom büyüklüğü ile ilişkilidir yani genom boyutu arttıkça elde edilen parça sayısı da artar.

(b) Restriction and ligation



(c) Selective amplification (one of many primer combinations shown)





Nükleik asit analizleri için kullanılan temel yöntemler

1. Örneğin hazırlanması (DNA, RNA izolasyonu vs.),
2. Elektroforetik ayırım,
3. Amplifikasyon yöntemleri (PCR, RT-PCR),
4. RFLP analizi,
5. AFLP (DNA parmak izi)
6. Hibridizasyon yöntemleri
7. Dizi (sekans) analizi
8. Klonlama
9. Rekombinant DNA teknolojisi