Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.
32 (2013), 1: 31-38

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu

Serpil KAHYA[1*] Esra BUYUKCANGAZ[1] K. Tayfun CARLI[1]

Geliş Tarihi: 14.06.2013
Kabul Tarihi: 26.06.2013

Özet: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir deoksiribo nükleik asit (DNA) zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir teknik olarak her geçen gün yaygınlaşmaktadır. PCR metodu, teşhis, epidemiyolojik ve DNA miktarı belirleme çalışmaları gibi birçok amaçla kullanılmakta ve geliştirilmeye devam edilmektedir. PCR'ın kullanıldığı tüm alanlarda meydana gelen gelişmelerden, mikrobiyoloji alanı da önemli oranda payını alarak gelişmeye devam etmektedir. İnsan ve hayvan kaynaklı patojenik mikroorganizmalar için pek çok amaçla kullanılan PCR aynı zamanda günümüzde kullanılan birçok moleküler metodun temelini oluşturmaktadır. Reaksiyon her ne amaçla çalışılırsa çalışılsın, her gen bölgesi için, kullanılacak reagent ve PCR parametrelerinin optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Hatta yapılan optimizasyonun, PCR'ın gerçekleştirileceği farklı aletler ve laboratuvarlar arasında bile tekrar yapılması gerekebilmektedir. Bu derlemede, kısaca PCR'ın mikrobiyolojide kullanımı, PCR dizayn edilirken ve PCR'ın tüm aşamalarında kullanılan reagentler ve malzemelerde uyulması gereken ana standartlardan bahsedilecektir.

Anahtar Kelimeler: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), mikrobiyoloji, optimizasyon.

Optimization of Polymerase Chain Reaction (PCR)

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR), a deoxyribonucleic acid (DNA) that lies between two known chain enzymatically amplify a specific DNA region as an in vitro technique becoming common everyday. PCR method, used for many purposes such as diagnosis, epidemiology and studies to determine the amount of DNA, are still under development. Microbiology is taking a significant proportion in PCR usage, like innovations of application in other fields. Furthermore, PCR is the fundamental molecular method that being used today for many purposes in detection of human and animal pathogenic microorganisms. It is needed to optimization of PCR parameters of each gene, regardless even what was targeted. PCR may be required to perform it again, even between different instruments and laboratories. In this review, PCR application in microbiology, the preperation of main standards must be followed at all stages of PCR reagents and materials when PCR a designed, will be mentioned.

Key Words: Polymerase Chain Reaction (PCR), microbiology, optimization.

[1] Uludag University Faculty of Veterinary Medicine Microbiology Department, Bursa, Türkiye.
serpilkahya@uludag.edu.tr

Giriş

PCR ve Mikrobiyolojide Kullanımı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) aranması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir teknik olarak tanımlanmış ve bu tekniğin bulucusu, tanı ve araştırma olanaklarında evrime yol açan bu başarısından ötürü Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır[29]. Bu evrimsel buluştan sonra diyagnostik mikrobiyoloji yeni bir sürece girmiş, nükleik asit amplifikasyon teknolojileri mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin tanımlanması temeline dayanan standart tanı tekniklerinin yerini almaya, hatta bazı mikroorganizmaların tespiti için altın-standart olmaya başlamıştır. PCR teknikleri infeksiyonların teşhisi, özel amaçlarla genlerin belirlenmesi, özel DNA parçalarının klonlanmasında önem kazanmış, bakteri kontaminasyonu, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır[5].

Mikrobiyoloji alanında kullanılan, mikroskobik ve kültürel teknikler, antijen arayan metotlar ve serolojik testler geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizleri oluşturmaktadırlar. Bu tekniklerin kullanımlarını düşük özgünlük oranı, yavaş üreyen, üremesinde çok hassas ortamlar gerektiren ya da apatojen ve saprofitik mikroorganizmalar gibi sebepler kısıtlamaktadır. İmmunosupresyon, antimikrobiyal tedaviler veya spesifik olmayan kros reaksiyonlar da geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerin önemli sorunlarındandır[1,3,24,10].

PCR geleneksel metotların yerini her zaman tamamen alamaz. Fakat yavaş üreyen ve teşhisi günler/haftalar alan mikroorganizmalar ile, doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu nedenle tespit edilemeyen mikroorganizmaların teşhisinde PCR'ın kullanımı çok önem kazanmıştır. PCR ile yakın türler arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve klinik örnekler ön zenginleştirmeye gereksinim duymadan hızlı şekilde test edilebilirler[34]. PCR'ın en büyük avantajlarından biri de transport nedeniyle ölmüş olduğundan kültürle üretilemeyecek durumlarda ve kronik persistent etkenlerde kullanılabilmesidir[4].

Günümüzde insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik çalışmaları, PCR tabanlı tekniklerin uygulamaya sokulmasıyla olağanüstü bir hız kazanmıştır. Bakteri, virüs, mantar veya parazitin izolasyonu ve identifikasyonu için, oldukça uzun ve zahmetli bir dizi laboratuvar işleminin yapılmasını gerektiren uygulamalara PCR'ın devreye girmesiyle gerek kalmamıştır[8].

PCR Optimizasyonu

Örneklerde inhibe edici maddelerin bulunması, çevresel kontaminasyon riski, kullanılan bileşenlerin miktarının yanlış kullanılması, sıcaklık parametrelerinin ayarlanamaması gibi problemler PCR yapılırken her zaman karşılaşılabilecek sorunlardır. Ayrıca oligonükleotit primerlerinin dizaynı ancak mikroorganizmaların bilinen suşları ve bu suşların bilinen dizileri ile mümkün olabilmektedir. PCR'ın işlevlerinde sorun yaratabilecek bir diğer etmen de mikrobiyal genomlarda oluşan beklenmedik mutasyonlardır. Teşhis laboratuvarlarındaki rutin PCR uygulamalarında, karşılaşabilecek en önemli problemlerden biri de, kontaminasyonlardan dolayı olabilecek yanlış pozitifliklerdir. Bu problem, PCR yapılacak laboratuvarların çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğini göstermiştir[9,34,50].

Yukarıda bahsettiğimiz rutin olarak PCR'ın kontrolü ve değerlendirilmesi sırasında karşılaşabileceğimiz problemlerdir. Bunlar dışında, bahsedilen kullanılacak reagent ve malzemelerin optimizasyonu için bilinmesi gereken standartlar ve kurallar vardır. Kısaca yapılacak işlemler sırasıyla, kullanılan reagentlerin miktarlarının ve malzemelerin kalitesinin optimize edilmesinde kullanılan standartlar ve parametrelerden aşağıda bahsedilmektedir.

1- DNA Ekstraksiyonu

Genetik materyalle yapılacak çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için, PCR öncesinde kullanılacak marazi maddelerin yüksek molekül ağırlıklı DNA ve Ribo Nükleik Asit (RNA) moleküllerinin, inhibitörleri de içereceği göz önünde bulundurularak, saf bir şekilde elde edilebilmesi gerekir[36]. PCR, örneklerden DNA ve RNA ekstraksiyonu yapılarak ya da günümüzde yeni geliştirilen ve geliştirilmeye devam eden kitler ve sistemlerle, ekstraksiyon yapılmaksızın direkt olarak klinik örneğin kullanımıyla yapılabilen bir metodtur[21,23]. DNA ve RNA ekstraksiyonu yapılmazsa, sonuçlar örnekteki taq polimeraz enzimi inhibitörleri tarafından maskelenebilir[13]. Bu problem DNA ve RNA ekstraksiyonu ile ya da

örneklerin sulandırmaları yapılarak ortadan kaldırılabilir. Sulandırma, örnekteki mikroorganizma sayısı az olduğunda problem yaratabilir. DNA ve RNA ekstraksiyonu ise çok örnekle çalışıldığında oldukça fazla iş gücü gerektirir ve kit kullanıldığında test maliyetini artırabilir. Fakat ekstraksiyon yapıldığında PCR'ın analitik ve diyagnostik duyarlılığı artacaktır. Hatta örnekte inhibe edici maddeler çoksa, kitle DNA ve RNA ekstraksiyonunu yapıldıktan sonra bile bu inhibitörler azaltamayabilmekte ve kitle ekstraksiyondan sonra bile sulandırma yapılması gerekebilmektedir[41].

Nükleik asit ekstraksiyonu amacıyla kullanılan pek çok metod ve hazır kitler bulunmaktadır. Bu amaçla kendi ekstraksiyon yöntemimizi kullanabileceğimiz gibi, maliyeti biraz artırsa da hazır ekstraksiyon kitleri de kullanabilinmektedir. DNA ve RNA ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan maddeler, yöntem ya da kit ne olursa olsun genel olarak 3 aşamayı amaçlamaktadır. Bunlardan ilki hücrenin parçalanması ile DNA'nın açığa çıkması, denaturasyon veya proteoliz ile DNA/RNA-protein kompleksinin ayrılması, ikincisi DNA-RNA'nın çözünür duruma getirilmesi ve son olarak da DNA-RNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makro moleküllerden ayrılması işlemleridir[39].

2- PCR Reaksiyonun Temel Bileşenleri ve Optimizasyonları

PCR'da kullanılan temel bileşenler hedef DNA veya RNA (templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon sıvı, pH, Mg^{+2} iyonlarıdır[5,45]. PCR reaksiyonundaki optimal olmayan koşullar sadece kullanılan bileşenlerden değil birçok sebepten kaynaklanabilir. Uygun olmayan primerlerin, zaman ve sıcaklık parametrelerinin kullanımı (özellikle annealing sıcaklığı), polimeraz enzimi kalitesi ve Mg^{+2} konsantrasyonu en önemli parametrelerdendir. Reaksiyon koşullarının optimize edilmesi ve reaksiyon karışımına koyulan tüm maddelerin uygun miktarları için denemeler yapılarak en uygun miktarlar ve reaksiyon koşulları bulunmasıyla, aynı zamanda inhibe edici etkiler de azaltılabilir. Bu faktörlerin optimizasyonu pozitif kontrolle erime noktasına göre farklı sıcaklıklarda ve konsantrasyonlarda reaksiyon çalışılarak ya da bu maddelerin veya templeytin (şüpheli örnekten elde edilen DNA veya RNA) çeşitli oranda sulandırmalarıyla ayrı ayrı denemeler yapılarak karşılaştırmalarla sağlanabilmektedir[2,32].

2-1- Mg^{+2} Konsantrasyonu

Kit üreticileri standart reaksiyon reagentleri yanında Mg^{+2}'u ayrı olarak sağladıkları için Mg^{+2} konsantrasyonu aslında optimize edilecek koşullar arasında en kolayıdır. Tek bir reaksiyonda her örneğe farklı miktarlarda Mg^{+2} koyularak yapılan denemeler kısa süre içinde sonuçlandırılabilinir[32]. PCR reaksiyon karışımında ortalama 0.5-2.5 mM Mg^{+2} olması gereklidir. Mg^{+2} iyonları enzim aktivitesine, primer bağlanmasına ve DNA erime ısısına etki edebilir[31,42]. dNTP'ler Mg^{+2} iyonunu bağladıkları için dNTP konsantrasyonundaki artış serbest Mg^{+2} konsantrasyonunda azalmaya yol açabileceğinden optimizasyon bu durum göz önüne alınarak yapılmalıdır[32]. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz enzimi aktivitesini uyarır, çift iplikli DNA'nın erime derecesini (Tm) arttırırlar ve primer-templeyt DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle Mg^{+2}'un PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna neden olmaktadır[5,31].

2-2- Primerler

Tekrarlanan dizilerden oluşmayan, sentetik olarak kolayca hazırlanabilen ve 15-40 oligonükleotitden oluşan primerler, kullanım amaçlarına göre değişiklik göstermektedirler. Primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır[38,32,37]. Primer tasarımı yapılırken dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır[5]. Primerlerin yapısında %50-60 kadar G+C bazları bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek sıcaklıkta oluşturulan reaksiyon sırasında görülebilecek non-spesifik bağlanmaları da azaltmaktadır[32, 36, 37]. Primer konsantrasyonunun genel olarak 0.1-0.5 μM arasında olması tavsiye edilmiştir. Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. Primer-dimerler, küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirleriyle bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotitleri, kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlaması neticesinde oluşan bantlardır[31,37].

Son yıllarda oldukça yaygın olarak kullanılan PCR sistemi ise, birden fazla primerin aynı anda çalışılmasıyla oluşan multiplex-PCR sistemleridir. Aynı reaksiyonda, birden fazla bölgenin çalışılarak, birden fazla bölge için sonuçların kısa sürede alınabildiği bu PCR sistemi oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Çok pratik sonuçlar veren multiplex-PCR sistemlerinin optimizasyonu tek bir primer ile çalışılan PCR'a göre, kullanılacak primerler arasındaki uyumun sağlanması ve diğer parametrelerin düzenlenmesi gerektiğinden daha zor olsa da, elde edilen sonuçların kalitesi nedeniyle PCR sisteminin günümüzdeki devrim niteliğindeki bu şekli multiplex-PCR yaygın biçimde kullanılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir.

2-3-dNTP'ler

Geleneksel PCR'da ayrı reagent olarak kullanılan dNTP'lerin final konsantrasyonları 20-200 μM arasında olmalı ve 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalıdır. Hedef olmayan alanlarda yanlış bağlanmaları azaltmak için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır. Ancak bazı mikroorganizmalar vardır ki, çoğaltılacak gen bölgesinden dolayı bazı bazların diğerlerinden az yada çok olması gerekebilir[26] (çok Adenin-Timin, az Guanin-Sitozin gibi). Nükleotitlerin optimal konsantrasyonunu tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonları, çoğaltılmış ürünün büyüklüğü ve PCR döngü sayısı dikkate alınmalıdır. Nükleotitlerin düşük konsantrasyonda kullanılması PCR'ın özgünlüğünü arttırmaktadır[5,6].

3- PCR Reaksiyonunda Kullanılan Sıcaklık Parametreleri

PCR, ön denaturasyon ve tekrarlanan sikluslardan oluşan, denaturasyon-annealing-ekstansiyon aşamaları ve final ekstansiyon aşamalarından oluşur. RNA tespiti yapılacaksa, önce RNA, ön aşamalarla DNA'ya dönüştürülür ve reaksiyona yukarıda sayılan DNA çoğaltma aşamalarıyla reaksiyona devam edilir. Ön denaturasyon 5-10 dakika boyunca 94-95°C'de gerçekleştirilir. Denaturasyon zamanı ve sıcaklığı, G+C oranına dolayısıyla da çoğaltılmak istenen bölgenin büyüklüğüne bağlıdır. G+C'ce zengin dizilerde denaturasyon sıcaklığı artırılabilir[40]. Ayrıca yeni kullanılan hot-start enzimlerde de, enzimin aktif hale gelebilmesi için ön denaturasyonun mutlaka kullanılması gerekmektedir. Denaturasyonun tam olmaması halinde verim düşer. DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise DNA polimeraz enziminin aktivitesini düşürmektedir[15,16,27]. Primerlerin yapışma sıcaklığı (annealing) 55-72 °C arasında değişmektedir ve optimize edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak sıcaklık, amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, büyüklüğüne bağlıdır. Primer yapışması için gerekli olan sıcaklık hesaplanırken her bir Adenine (A) ve Thymine (T) nükleotiti için 2 °C hesaplanır[11,15,16,27,31]. Yapışma sıcaklığının, teorik olarak spesifik DNA eşleşmesinin sağlanması amacıyla, 2 primerin erime sıcaklığının birkaç derece altında olması gerekir[20,40]. Bu yüzden yapışma sıcaklığının optimizasyonu, primer-templeyt kompleksinin erime sıcaklığının [basit formülle T_m = (G+C)4 + (A+T)2)] hesaplanmasıyla başlamaktadır. Daha kompleks formüller kullanılabilir[25,33,40]. Fakat pratikte erime sıcaklığı, tampon içeriği hatta primer ve templeyt konsantrasyonundan etkilenebildiği için formüllerle sadece ortalama bir değer hesaplanabilir. Bazı primerler nedeni bulunamayan sebeplerden[14] optimizasyona açıkça direnç gösterirler[32]. Yüksek sıcaklığın kullanılması yanlış nükleotitlerin primerlerin 3' uçlarına bağlanmasını önler. Hibridizasyon sıcaklığının düşük tutulduğu durumlarda ise spesifik olmayan küçük DNA fragmentlerinin oluşumu söz konusudur[11]. Uzama (ekstensiyon) sıcaklığı ve zamanı, yine seçilen bölge ve bu bölgenin G+C oranına bağlı olarak taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72-78°C'lerde gerçekleştirilir[40]. Uzama hızı 35-100 nükleotit/saniyedir. Uzama süresi de yine hedef dizinin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve sıcaklığa bağlıdır. En uygun uzama süresi ortalama 1 dakikadır. Siklus sayısı ise, templeytin DNA konsantrasyonuna, primer ekstensiyonu ve amplifikasyonunun etkinliğine (kullanılan enzimin kalitesine) bağlıdır. Az miktarda DNA ile başladığında en fazla 40 siklus, daha fazla DNA ile başladığında ise ideal siklus sayısı 30 olmalıdır. Siklus sayısının fazla olması hatalara yol açarak spesifik olmayan ikincil ürünlerin (primer-dimer) oluşumuna neden olur[40,43].

PCR reaksiyonunda kullanılan parametreler ve reagentler genel olarak ele alınırsa, PCR amplifikasyonunun etkinliğine etki etmeleri bakımından 4 gruba ayırmak mümkündür. Birinci grup PCR reaksiyonundaki siklus sayısıdır. Her ne kadar hedef DNA'nın amplifiye edilecek miktarını siklus sayısı belirlese de DNA kon-

santrasyonu arttıkça, primer bağlanmasından ziyade PCR reaksiyonu neticesinde meydana gelen sarmalların birbirine bağlanması söz konusu olur. Bunun sonucu olarak geç PCR siklusların erken sikluslara oranla daha az etkili olduğu bildirilmiştir[38]. İkinci önemli faktör amplifiye edilecek hedef DNA miktarıdır. PCR reaksiyonu, yüksek konsantrasyonda hedef DNA ($>10^7$) ihtiva eden numunelerle çalışıldığında düşük konsantrasyondakilere ($<10^4$) nazaran daha düşük bir düzeyde amplifikasyonla neticelenir[30,35]. Üçüncü faktör hedef DNA sekansının uzunluğudur. PCR'ın etkinliği ile sekans uzunluğu arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur. Dördüncü önemli faktör ise primer bağlanması ve hibridizasyon için kullanılan sıcaklık ile ilgilidir[38]. Hibridizasyon sıcaklığı ile PCR'ın özgünlüğü arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur. Yüksek ısıda PCR'da önemli bir problem olarak kendini gösteren yanlış hibridizasyon oluşma ihtimali düşmektedir[11].

4- PCR Makinaları

Temelde hava ısıtmalı ve blok ısıtmalı olmak üzere iki çeşit PCR makinası vardır. Bu iki sistem arasında önemli farklar bulunmaktadır. Öncelikle hava bloğa göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğu için PCR zamanı minimuma inmektedir. Geleneksel blok ısıtmalı PCR makinelerinde aksesuarların sıcaklık geçirgenliğinin az olması, arzu edilen sıcaklığa uzun zamanlarda erişilebilmesi, dolayısıyla zamanın çoğunun denaturasyon, annealing ve ekstensiyon basamaklarına geçişte harcanması, bu aletlerin kullanımlarıyla ilgili büyük dezavantajlar getirmektedir. Günümüzde artık pek kullanılmayan blok ısıtmalı thermalcycler makinelerinde PCR süresi 2-4 saat almaktadır[45,47].

Yeni kullanılan PCR makinalarının hemen hepsi hava ısıtmalı sistemlerdir. Bu sistemler sayesinde testlerin performansı artmakta ve süresi azalmaktadır. Son zamanlarda PCR amplifikasyonunu ve amplifiye olmuş ürünün (amplikon) kontrolünü aynı kapalı sistemlerde gerçekleştiren ve amplikonun görüntülenmesine izin veren yeni sistemler geliştirilerek gıdalardan, memeli genomundan, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanlarındaki çok değişik örneklerden nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaya başlanmıştır[1,17,28]. Bu aletler sıcaklık değişimini geleneksel hava ısıtmalı termocyclerlara göre bile çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirirler ve her PCR siklusu sonunda, hedef DNA'ya nükleik problar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı tespit eden sistemlerle çalışmaktadırlar. Bu test sistemleri, Real-Time (RT) PCR olarak adlandırılır[10]. Ayrıca RT PCR sistemleri sayesinde azalan ve kısalan işlemler, kontaminasyon ve manipülasyonlarda yapılan yanlışlık ihtimallerini de engellemiş olmaktadır. RT PCR'ın en önemli yararlarından birisi de araştırıcının DNA'nın başlangıç seviyesi çok az miktarda olsa dahi bu seviyenin belirlenmesine imkan vermesidir. Amplifikasyon sürecinde örnekteki DNA ne kadar yüksekse, floresan sinyal o kadar çabuk eşik seviyesine çıkmakta bu da miktar tayinini mümkün kılmaktadır[50]. DNA'nın başlangıç seviyesinden bağımsız olarak, sadece negatif ve pozitif olarak sonuç veren geleneksel PCR'da ise miktar tayini oldukça zor olmaktaydı. Bu sistemler miktar tayinini de olanak sağlayarak çalışmaları çok daha ileri boyutlara ulaştırmaktadırlar.

RT PCR, PCR'ın ortaya çıkarılması kadar olmasa da ona yakın bir teknolojik gelişme olarak tüm dünyadaki araştırmacılara yeni bir güç ve çalışma alanı sağlamıştır. PCR'la sağlanan kolaylık ve gücün, RT teknolojisi ile birleşmesi çalışmalara aşırı derecede kolaylık ve sensitivite sağlamıştır[50].

5- PCR Reaksiyonun Gerçekleştirildiği Tüpler

PCR makinası kadar PCR reaksiyon hacimleri ve kullanılan PCR tüplerinin özellikleri de PCR performansını etkileyen diğer önemli öğelerdir. İyi bir PCR tüpünün sahip olması gereken özellikler tüpün kapağı kapandıktan sonra buharlaşma olmaması, düşük ısıl kütleye sahip olması, sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması ve çapraz reaksiyonlara izin vermeksizin reaksiyon reagentlerinin tüplere konulabilmesidir. Kalın çeperli PCR tüplerinin, içerdikleri örneklere sıcaklık transferini randımanlı bir şekilde yapamaması, tüpün yüzeyine temas eden örnek hacminin sınırlı olması, PCR protokollerinde belirlenen sıcaklıkların örneklerde sağlanamaması veya örneğin belirlenen zamandan daha kısa bir süre final sıcaklığına maruz kalması gibi özellikler PCR'ın verimli bir şekilde uygulanmasını engelleyen etmenlerdir. Bunlardan dolayı ince çeperli 200 µl'lik tüpler PCR'da tercih edilmelidir[47].

PCR amplifikasyonu için kullanılan farklı bir taşıyıcı ortam ise borosilikat cam borucuklardır. Bunlar içerisinde PCR yapmanın avantajları şu şekilde özetlenebilir: borosilikat kapiller cam PCR borucukların yüzeylerinin geniş olma-

sı nedeniyle reaksiyon hızının ve veriminin yüksek olması, kapiller borucukların plastik kapaklarla uçlarının kapatılması sonucu buharlaşma ve çapraz kontaminasyon oranının en aza indirgenmesi ve borucukların sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması sonucu PCR lehine çevirmektedir. Cam kapiller PCR'da zamanın kısa olmasının nedeni, kapiller borucukların çevresinde havanın dönerek hızla ısıtılmasıdır[46-48]. Tüm bunların yanında borosilikat cam borucukların silindirik yapısı dolayısıyla yüzey arttırılmış ve sıcaklık reaksiyona daha çok etkimiş olur[7,12,22,44,47,48]. Bu durum annealing, ekstensiyon ve denaturasyon sürelerinin de kısalmasına neden olmaktadır. Bu sistemlerde PCR süresi 10 kat kadar kısaltılmış olmaktadır. Kapiller PCR'da, PCR basamaklarında oluşan süre kısalmasıyla primerlerin yanlış bağlanma olasılığı en aza indirgendiği için spesifik PCR ürünü oluşma olasılığı ve miktarında da artış sağlaması bir başka avantajdır[46-48]. Cam tüplerin diğer avantajı, PCR reaksiyon hacminin konvansiyonel PCR'a göre yarı yarıya azalması ve dolayısıyla test maliyetinin düşmesidir. Bunlar dışında cam kapiller cam fiber optiklere benzer biçimde ışığı çekerek ve sinyali kapillerin ucunda yoğunlaştırarak sinyal toplamaya hizmet eder. Bu etki kapiller içindeki mikro hacimdeki sıvıda floresan izlemeye ve görüntülemeye yaramaktadır. Bu özellik RT-PCR sistemlerinde, boya ve ışıma teknoloji ile çalışılan sistemler için oldukça önemlidir[49].

Sonuç

Sürekli geliştirilen alet, malzeme ve hazır olarak sunulan kitlerle geliştirilen PCR tabanlı yöntemler başlangıçta tanı amaçlı geliştirilse de, şu anda birçok bilim dalı ve alanında kullanılmaktadır. Optimize edilmeleri için uzmanlaşmış moleküler çalışanların gerektiği PCR tabanlı yöntemler, optimize edilme aşamalarına kadar laboratuvarlarda oldukça zorluklar çıkartmakta, zaman ve malzeme kaybına neden olabilmektedirler. Optimize edilmiş literatürlerden alınan bilgiler kullanılarak, taklit çalışmalar yapılsa bile, malzemelerin ve aletlerin markası, kullanım şartları, yanlış kullanımları ve deneyimli olmayan personelle taklit edilen reaksiyonlar aynı sonuçları vermeyebilir. Deneyimli personelle, aynı alet ve markalarla bile farklı laboratuvarlar arasında farklı sonuçlar alınmaktadır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda bile, PCR tekniği dezavantajları ve zorluklarına rağmen günümüzde diagnostik mikrobiyoloji diğer alanlarda gittikçe artan önemde ve pratik bir teknik olmaya devam etmektedir. Teknik, her geçen gün eklenen yeni PCR metodlarıyla da önümüzdeki yıllarda gittikçe yükselen bir ivmeyle gelişimini devam ettirecektir.

Kaynaklar

1. Ahmed F.E., 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology, 20, 215-223.
2. Aldemir O.S., Uçan U.S., 2001. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Temel prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 1, 53-59.
3. Anonim, 2008. Avian *Mycoplasmosis* (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.5, Ofis International Epizootic terrestrial manual, Paris.
4. Anonim, 2009. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine developments. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 1.1.7. Office International Epizootics Terrestrial Manual, Paris.
5. Arı Ş., 2004. DNA' nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. Editörler: Temizkan G., Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, No:1, Bölüm 5, İstanbul, pp. 101-120.
6. Bilgehan H., 1992. Klinik mikrobiyoloji Tanı. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, Ankara, pp. 56-68.
7. Caplin B.E., Rasmussen R., Bernard P.S., Wittwer C.T., 1999. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. Biochemica, 1, 5-8.
8. Carlı K.T., 2008. Hayvan İnfeksiyonlarında LightCycler PCR Kullanımı. Uludağ Üni Vet Med., 27, 1-10.
9. Cockerill F.R., Smith T.F., 2002. Rapid-cycle real-time PCR: A revolution for clinical microbiology. American Society for Microbiology News, 68, 77-83.
10. Cockerill F.R., 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Archieves of Pathology and Laboratory Medicine, 127, 1112-1120.
11. Çetinkaya B., 1998. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temel prensipler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 12, 149-156.
12. Elenitoba-Johnson O., David D., Crews N., Wittwer C.T., 2008. Plastic versus glass capillaries for rapid-cycle PCR. Biotechniques, 44, 487-492.
13. Greenfield L., White T.J., 1993. Sample preparation methods. Editörler: Persing D.H., Smith T.F.S., Tenover F.C., White T.J. Diagnostic mo-

lecular microbiology, 1 baskı. American society for microbiology, Washington, pp. 122-137.

14. He Q., Marjamaki M., Soini H., Mertsola J., Viljanen M.K., 1994. Primers are decisive for sensitivity of PCR. BioTechniques, 17, 82-87.
15. Howe C.J., Ward E.S., 1989. Nucleic acids sequencing. IRL Pres at Oxford University Pres, Oxford, page 53-114.
16. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., 1995. Optimization of PCR's. Editörler: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. PCR Applications protocols for fanctional genomics. Academic pres, San Diego, pp. 39-67.
17. Klein D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8, 257-260.
18. Kleven S.H., Yoder H.W., 1984. *Mycoplasmosis.* Editörler: Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H., Pearson J.E. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition, American Association of Avian Pathologists, Kenet Square, Pennsylvania, pp. 57-62.
19. Kleven S., Jordan H.F.T.W., Bradbury J.M., 1996. Avian *Mycoplasmosis* (*Mycoplasma gallisepticum*). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International Des Epizootics, Paris, pp. 512-521.
20. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects in Medicine, 27, 95-125.
21. Lauerman L., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., Santen V.L.V., 1993. Development and application of polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae.* Avian Diseases, 37, 829-834.
22. Lee D.S., Tsai C.Y., Yuan W.H., Chen P.H., 2004. A new thermal cycling mechanism for effective polymerase chain reaction in microliter volumes. Microsystem Technologies, 10, 579-584.
23. Ley D.H., Avakian A.P., Berkhoff J.E., 1993. Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and meat turkeys caused by F strain: identification by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis and the polymerase chain reaction. Avian Diseases, 37, 854- 862.
24. Ley D.H., 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection. Editörler: Saif Y.M., Barnes H.J., Fadly A.M., Glisson J.R., Mcdougald L.R., Swayne D.E. Diseases of poultry, Iowa State University Press, 11. edition, pp. 722-743.
25. Lowe T., Sharefkin J., Yang S.Q., Diefenbach C.W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. Nucleic Acids Research, 18, 1757-1761.
26. Marenda M.S., Sagne E., Poumarat F., Citti C., 2005. Suppression substractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactia* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. Microbiology, 151, 475-489.
27. Mcpherson M.J, Hames B.D., Taylor G.R., 1995. A practical approach. Oxford Univresity Pres, Amerika, pp. 7-118.
28. Mhlanga M.M., Malmberg L., 2001. Using Molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. Methods, 25, 463-471.
29. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986. Spesific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51, 263-273.
30. Mullis K.B., Faloona F.A., 1987. Spesific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods of Enzimology, 155, 335-351.
31. Persing D.H., 1993. Diagnostic molecular microbiology, principles and applications. Editörler: Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J. American Society for Microbiology, Washington, pp. 88-104.
32. Roux K.H., 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Research, 4, 185-194.
33. Rychlik W., Rhoads R.D., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 17, 8543-8549.
34. Sachse K., 2004. Specifity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. Molecular Biotechnology, 26, 61-79.
35. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., 1985. Enzymatic amplification of B-Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1350-1354.
36. Saiki K.R., Gelfand H.D., Stoffi S., Scharf J.S., Higuchi R., Horn T.G., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.
37. Saiki K.R., Walsh P.S., Leverson C.H., Erlich H.A., 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-spesific oligonucleotide probes. Proceedings of National Academic Sciences, USA, 86, 6230-6234.
38. Saiki K.R., Gelfand H.D., Stoffi S., Scharf J.S., Higuchi R., Horn T.G., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.
39. Sarikaya A.T., 2004. DNA'nın izolasyonu ve analizi. Editörler: Temizkan G., Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem ya-

yınları, Nobel Tıp Kitabevleri, No:1, Bölüm 2, İstanbul, pp. 55-80.

40. Sambrook J., Russell D.W., 2001. Molecular cloning, A laboratory manual. Third edition, Volume 2, chapter 8, New York.
41. Silveira R.M., Fiorentin L., Marques E.K., 1996. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis. Avian Diseases, 40, 218-222.
42. Steffan R.J., Atlas R.M., 1991. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. Annual Review of Microbiology, 45, 137-161.
43. Şahin F., Çiftçi M., Pirim İ., 2000. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri kurs notları. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi,
44. Teo I.A., Choi J.W., Morlese J., Taylor G., Shaunak S., 2002. LightCycler QPCR optimization for low copy number target DNA. Journal of Immunological Methods, 270, 119-133.
45. Wilson I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63, 3741-3751.
46. Wittwer C.T, Fillmore G.C, Hillyard D.R., 1989. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. Nucleic Acids Research, 17, 4353-4357.
47. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Garling D.J., 1990. Minimazing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Analytical Biochemistry, 186, 328-331.
48. Wittwer C.T., Garling D.J., 1990. Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization. Biotechniques, 10, 76-83.
49. Wittwer C.T., Rine K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. 1997. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques, 22, 176-181.
50. Valasek M.A., Repa J.J., 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29, 151-159.