

Niçin PCR?

Dr. Abdullah Tuli

1980'lerin Başı...



- Bir yöntem düşünün...
- Tepkimeyi gerçekleştirmek kolay mıdır?
- Bu yöntem çok mu karmaşıktır, yoksa basit mi?
- Yöntemde kullanılan örnek, saf mı ya da son derece karmaşık mı?
- Kullanılacak örnek çeşitlilik gösterir mi?

Guys!
It's PCR time



What if we want to
have a moment of solitude?



- "Genetik materyal DNA'nın tek bir molekülü ile başlayan PCR, bir öğleden sonra 100 milyar benzer molekül oluşturabilir. Tepkimeyi gerçekleştirmek kolaydır. Bir test tüpü, birkaç basit ayıraç ve bir ısı kaynağından başka bir şeye gereksinim yoktur. DNA örneği, saf ya da biyolojik materyalin son derece karmaşık karışımının küçük bir parçası olabilir. DNA, hastane doku örneğinden, tek bir insan saçından, suç mahallindeki kurumuş bir damla kan örneğinden, mumyalanmış beyin dokusundan ya da buzda donmuş 40.000 yaşındaki kıllı bir mamuttan gelebilir. "

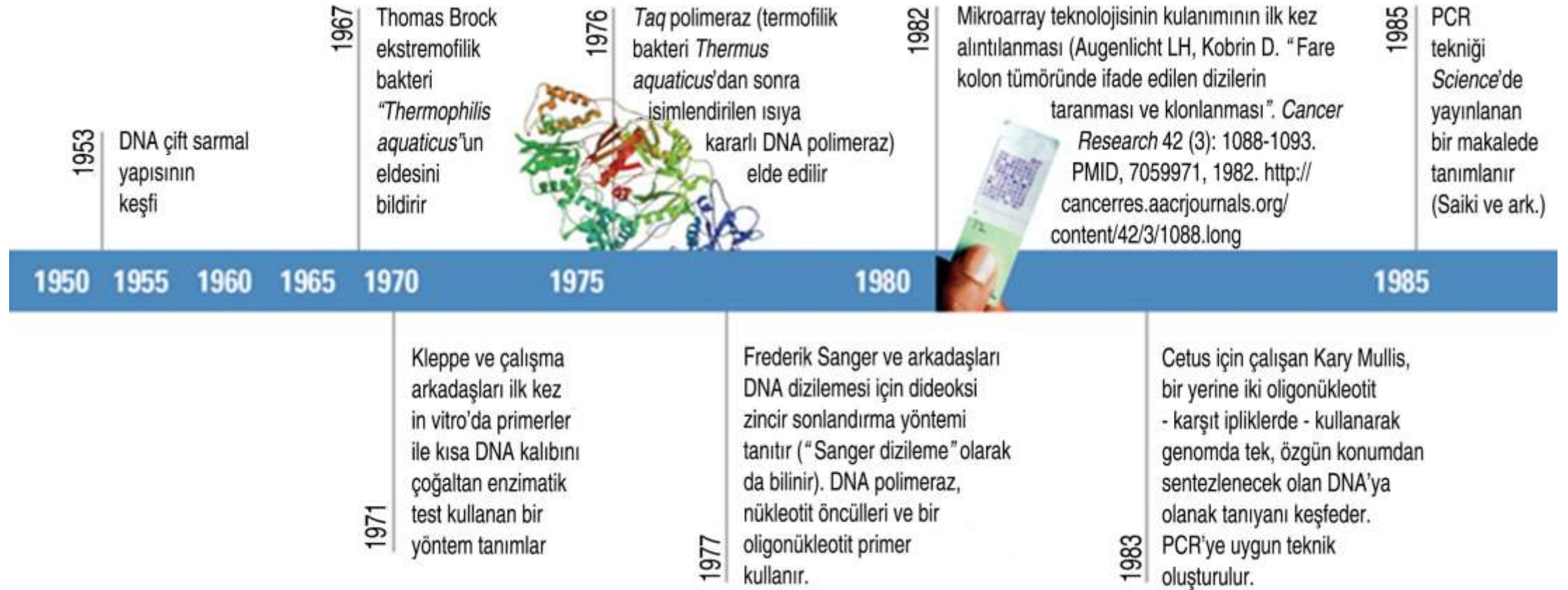
Kary Mullis, "Scientific American"

Niçin PCR?



Değişken	PCR	Klonlama
Son Ürün	Özgün dizinin seçici amplifikasyonu	Özgün dizinin seçici amplifikasyonu
Çalıştırma	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> ve <i>In vivo</i>
Karmaşık DNA'dan özgün parçanın seçiciliği	Birinci basamak	Son Basamak
Başlangıç materyalin miktarı	Nanogram (ng)	Mikrogram (μ g)
Gerekli biyolojik ayıraçlar	DNA polimeraz (Taq polimeraz)	Restriksiyon enzimleri, Ligaz, vektör, bakteri
Otomasyon	Evet	Hayır
Emek yoğunluğu	Hayır	Evet
Hata olasılığı	Daha az	Daha fazla
Uygulamalar	Daha fazla	Daha az
Maliyet	Daha az	Daha fazla
Kullanıcının becerisi	Gerekmez	Gerekli
Tipik bir deney için süre	4 saat	2 ile 4 gün

PCR'nin Tarihsel Öyküsü



PCR'nin Tarihsel Öyküsü

1989	Science Dergisi ona ilk kez "Yılın Molekülü" Taq polimeraz ismini verdi	1993	Kary Mullis Nobel Ödülünü aldı İlk kez "real-time" PCR aleti tanımlandı	1995	İlk kez bağımsız yaşayan bir organizmanın (<i>Haemophilus influenzae</i>) tüm genomu Venter ve arkadaşları tarafından dizilendi	2000	"Lynx Therapeutics", "next generation" dizeleme MPSS'yi - Massively parallel signature sequencing, a parallelized, adapter/ligation-mediated, bead-based sequencing teknolojisi - yayınladı ve satışa çıkardı	2007	İlk tam insan genomu Levy ve ark. tarafından dizilendi	2010	Gibson ve ark. kimyasal olarak sentezlenmiş bir genomla denetlenen ilk bakteri hücrelerini oluşturur (Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanarak)
19901995200020052010											
1988	Taq DNA polimeraz patenti, Mullis ve ark tarafından kayda alındı İlk otomatikleşmiş PCR döngüleyici Perkin Elmer ve Cetus tarafından markete sunuldu	1991	İlk yüksek verimlilikte DNA polimeraz Matilla ve ark. tarafından tanımlandı Mumlu Hot Start PCR	1994	Antibodi tabanlı hot start teknoloji tanımlandı	1996	İlk kez ökaryotik organizmanın genomu, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , dizilendi İki ticari real-time PCR cihazı piyasaya sürüldü	2003	Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz, füzyon protein teknolojisine dayalı ilk PCR enzimi, Finnzymes Oy tarafından piyasaya sürüldü	2009	MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) kılavuzu Bustın ve ark. tarafından yayınlandı

Niçin PCR?



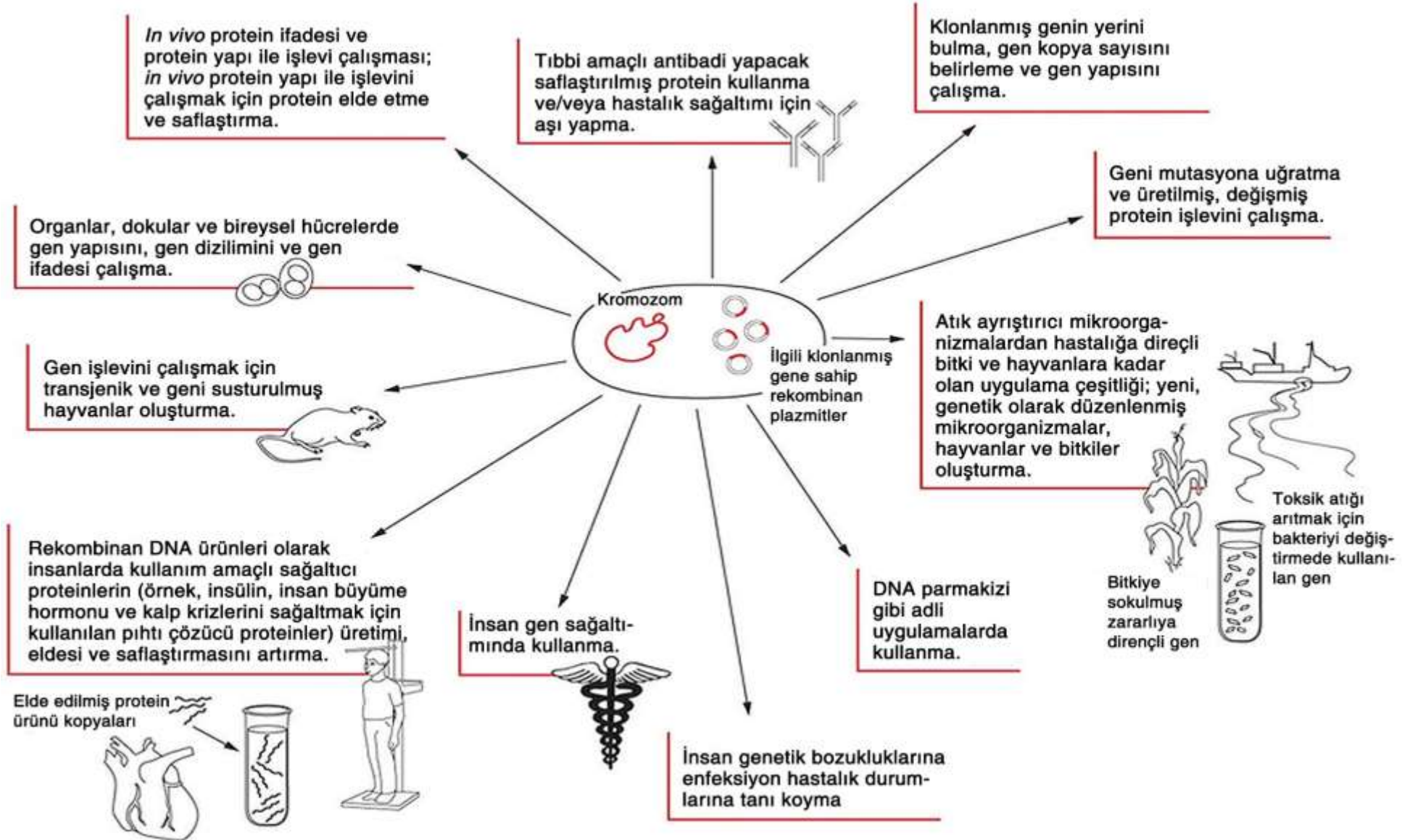
● Bir son

- PCR, bir soruyu analiz etmede ya da yanıtlamada son basamak olabilir. Buna bir örnek, gıda numuneleridir. PCR, genetik değişimi ya da bakteri ile bulaşığı gösteren bir DNA parçasını tanımlayabilir.

● Bir yol/araç

- PCR, daha ileri çalışmalar ya da klonlama için bir geni ampliyeye edebilir.

Niçin PCR'a Genel Bakış



PCR Uygulamaları?



- Organizmaları sınıflandırma
- Genotipleme
- Moleküler arkeoloji
- Mutagenez
- Mutasyon belirleme
- Dizileme
- Kanser araştırması
- Patojenlerin belirlenmesi
- DNA parmakizi
- İlaç keşfi
- Genetik eşleşme
- Genetik mühendislik
- Prenatal tanı

PCR Uygulamaları?



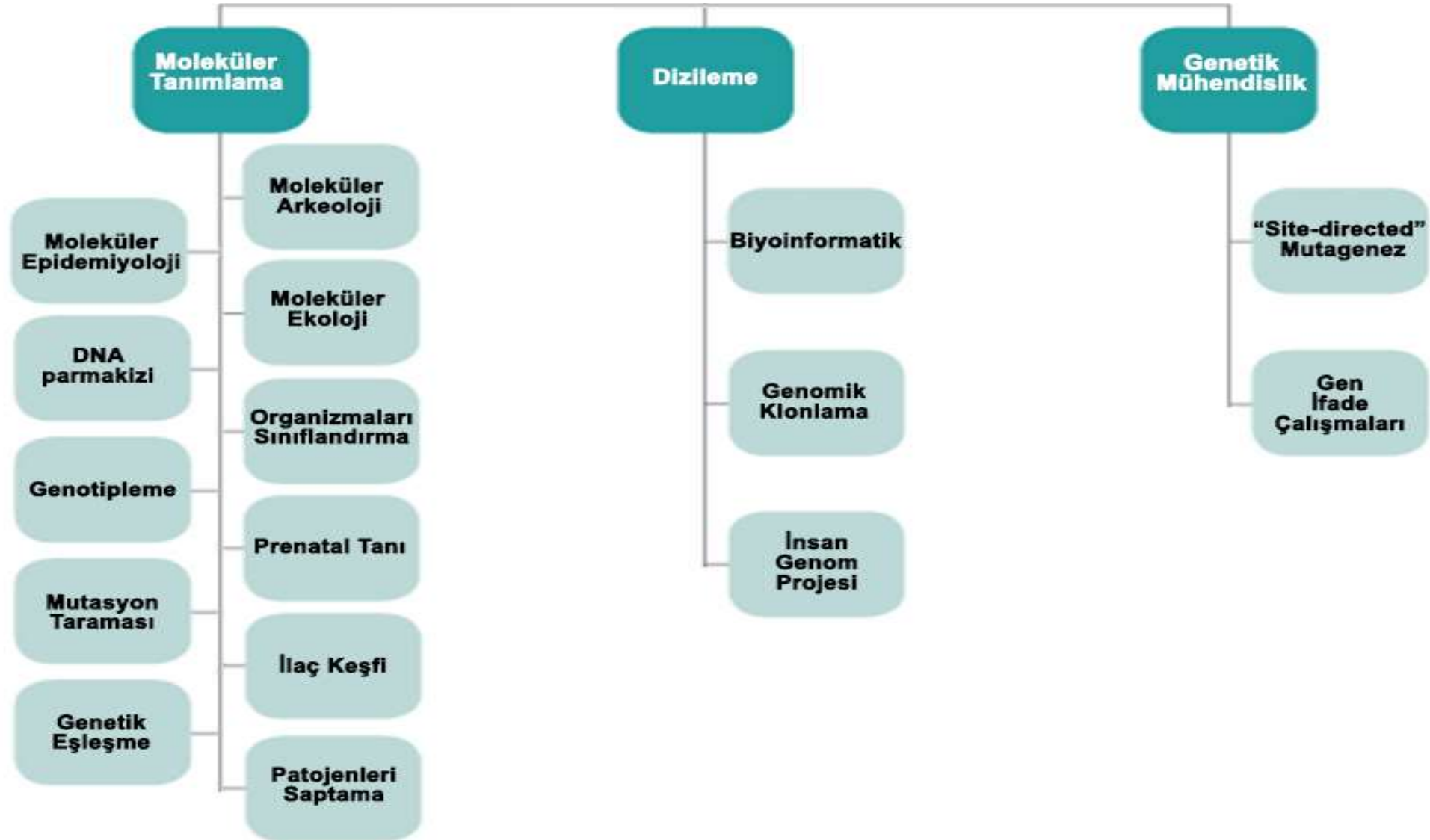
Temel Araştırma

- Mutasyon taraması
- İlaç keşfi
- Organizmaları sınıflandırma
- Genotipleme
- Moleküler Arkeoloji
- Moleküler Epidemiyoloji
- Moleküler Ekoloji
- Biyoinformatik
- Genomik klonlama
- "Site-directed" mutagenез
- Gen ifade çalışmaları

Uygulamalı Araştırma

- Mutasyon taraması
- Patojenleri saptama
- Prenatal tanı
- DNA parmakizi
- Gen sağaltımı

PCR Uygulamaları?



Moleküler Tanımlama



- DNA, organizmanın her bir türü için benzersizdir.



- DNA, bir organizmanın tanımlaması için kullanılabilir.



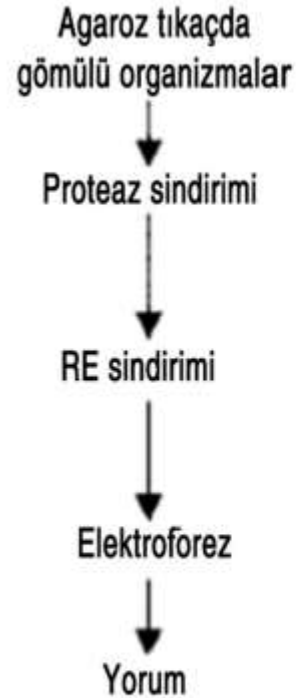
- **Organizmalar, PCR kullanılarak tanımlanabilir.**



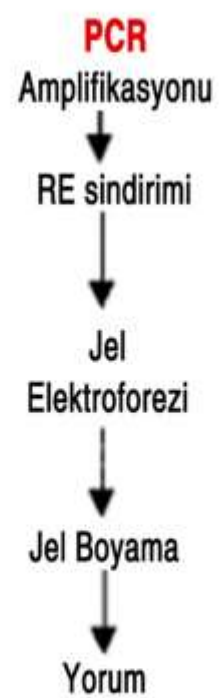
- PCR, DNA'nın kolayca kullanımına olanak sağlar.

Moleküler Tanımlama

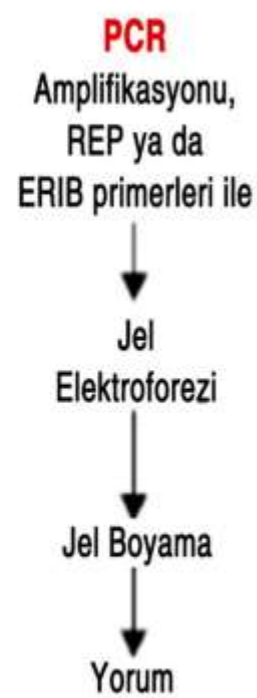
PFGE



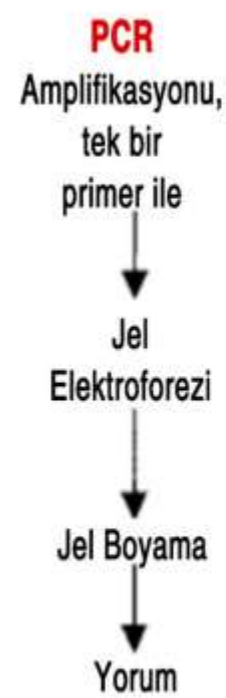
RFLP



REP-PCR



RAPD



AFLP



“SEQUENCING”

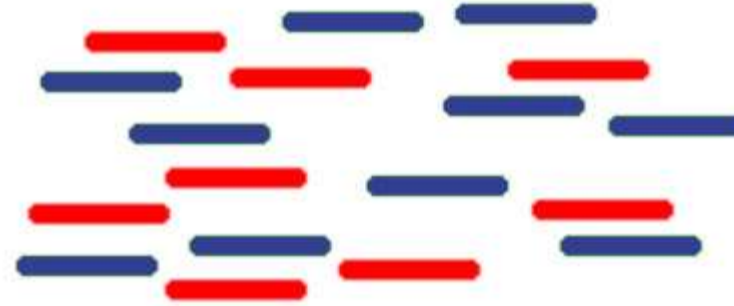


Bilinmeyen Mutasyonların Belirlenmesi



Tüm
Genomik
DNA

PCR

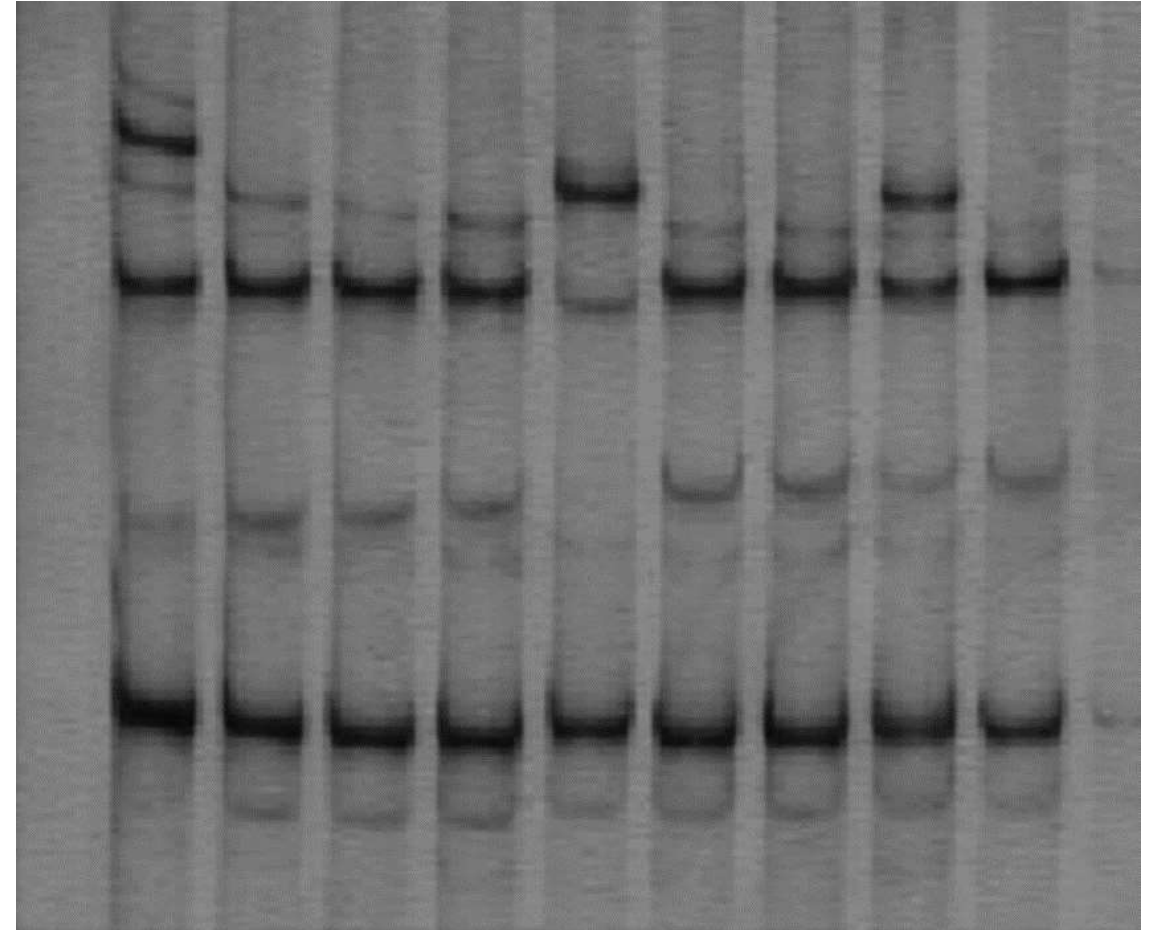


Bir mutasyon
içerebilen çok büyük
sayıda istenen DNA
parçaları

SSCP

Bilinmeyen Mutasyonların Belirlenmesi

- SSCP jel, amplifiye edilmiş DNA parçasındaki bir mutasyonu gösteren değişimleri sunar.



Organizmaların Sınıflandırılması

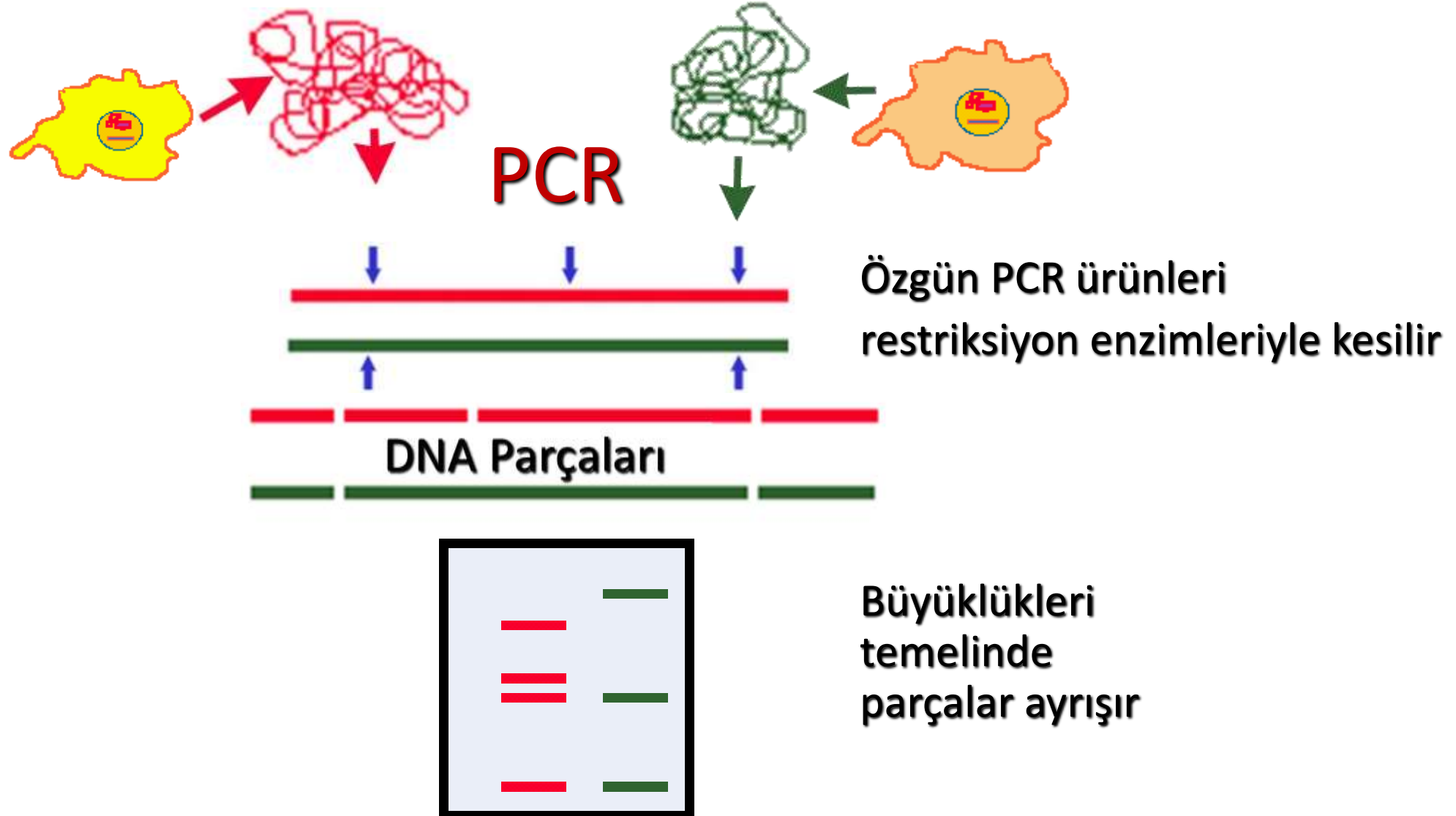
- Birbiriyle ilişkisi
- Benzerlikler
- Farklılıklar

- Fosiller
- Eser miktarlar
- Küçük organizmalar

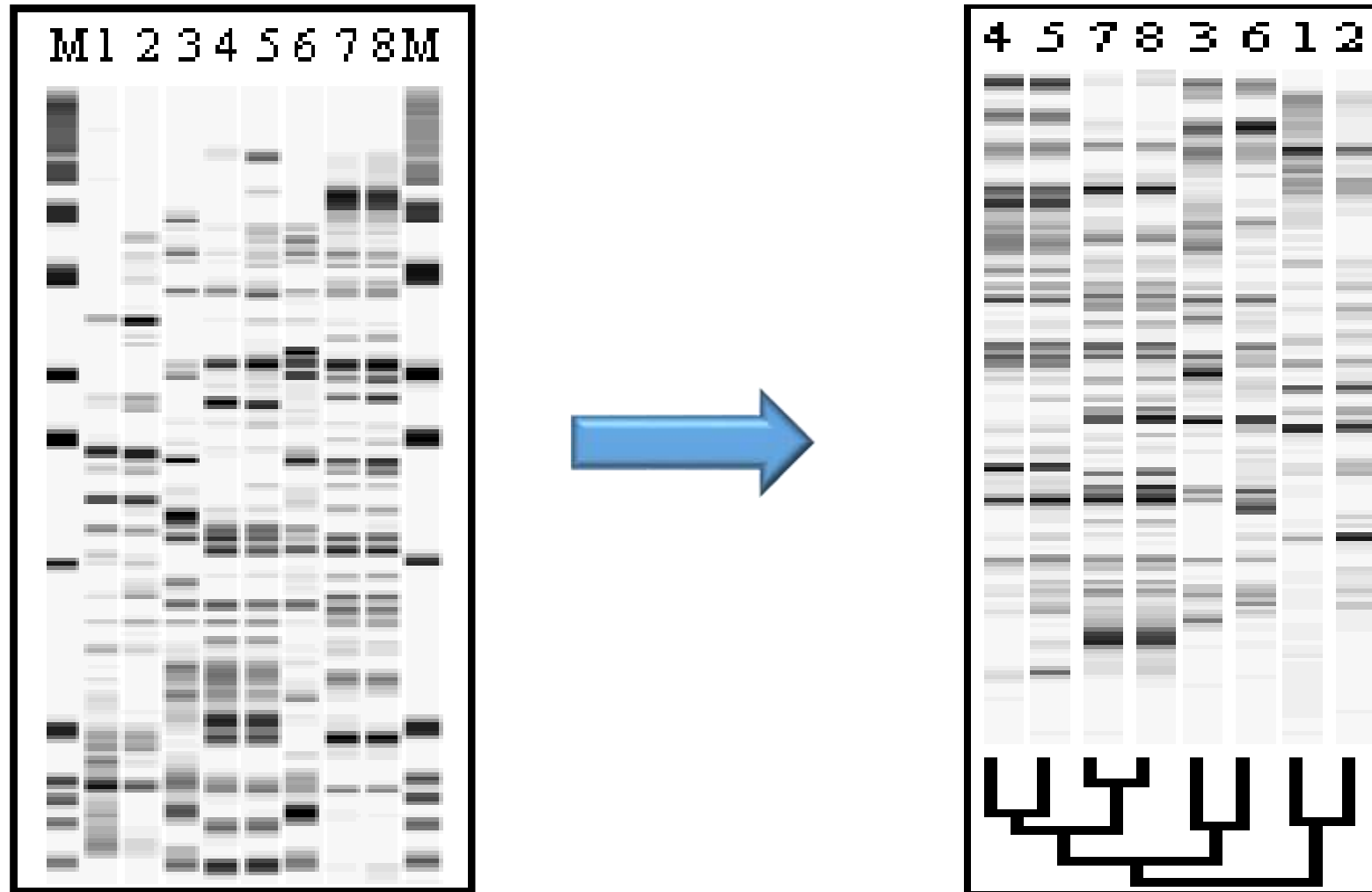
} Yetersiz Bilgi

DNA

Organizmaların Sınıflandırılması



Organizmaların Sınıflandırılması



Patojenlerin Saptanması



Patojenik
DNA
içerebilen
bir örnek

PCR

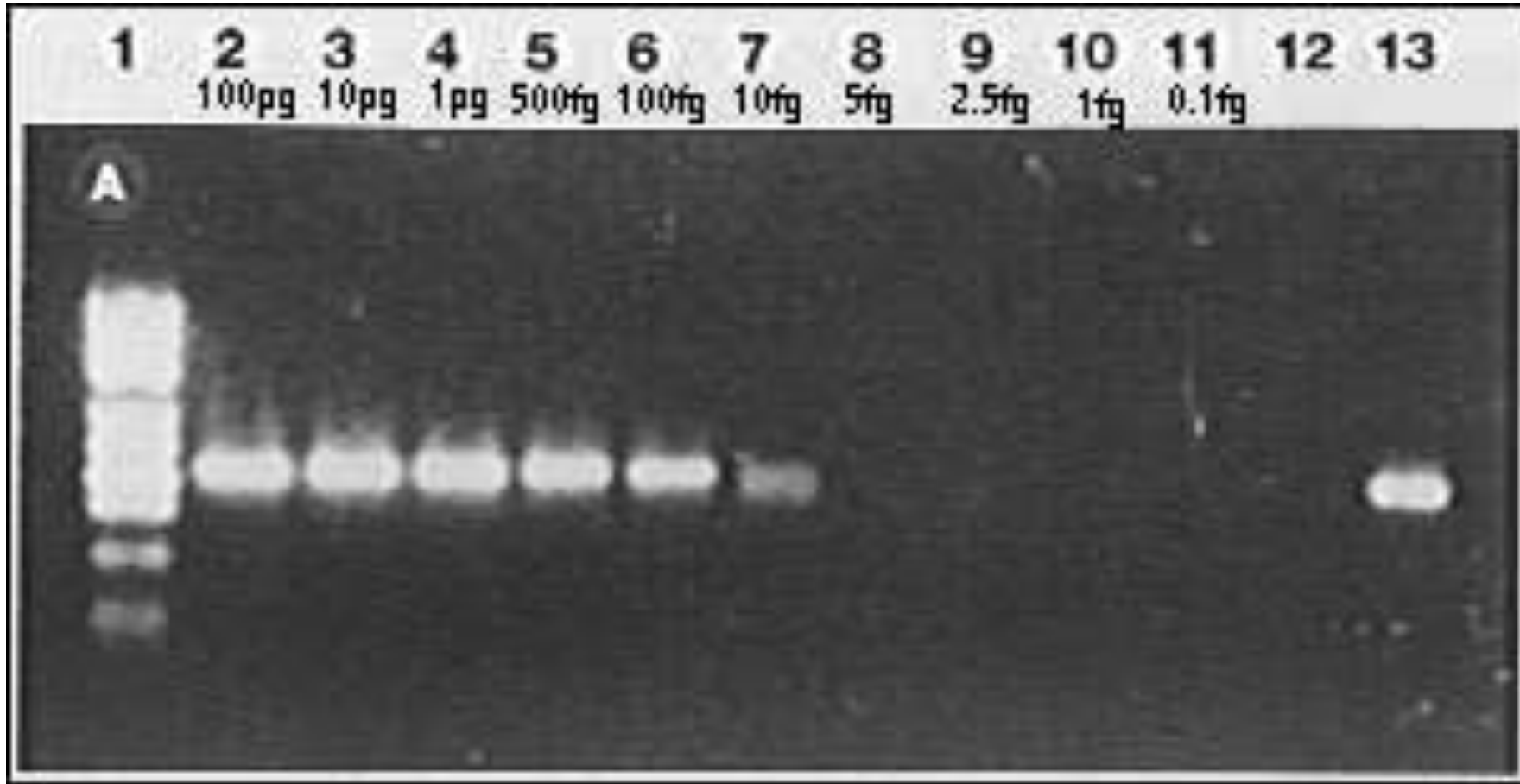
PCR Var

Patojen Var

PCR Yok

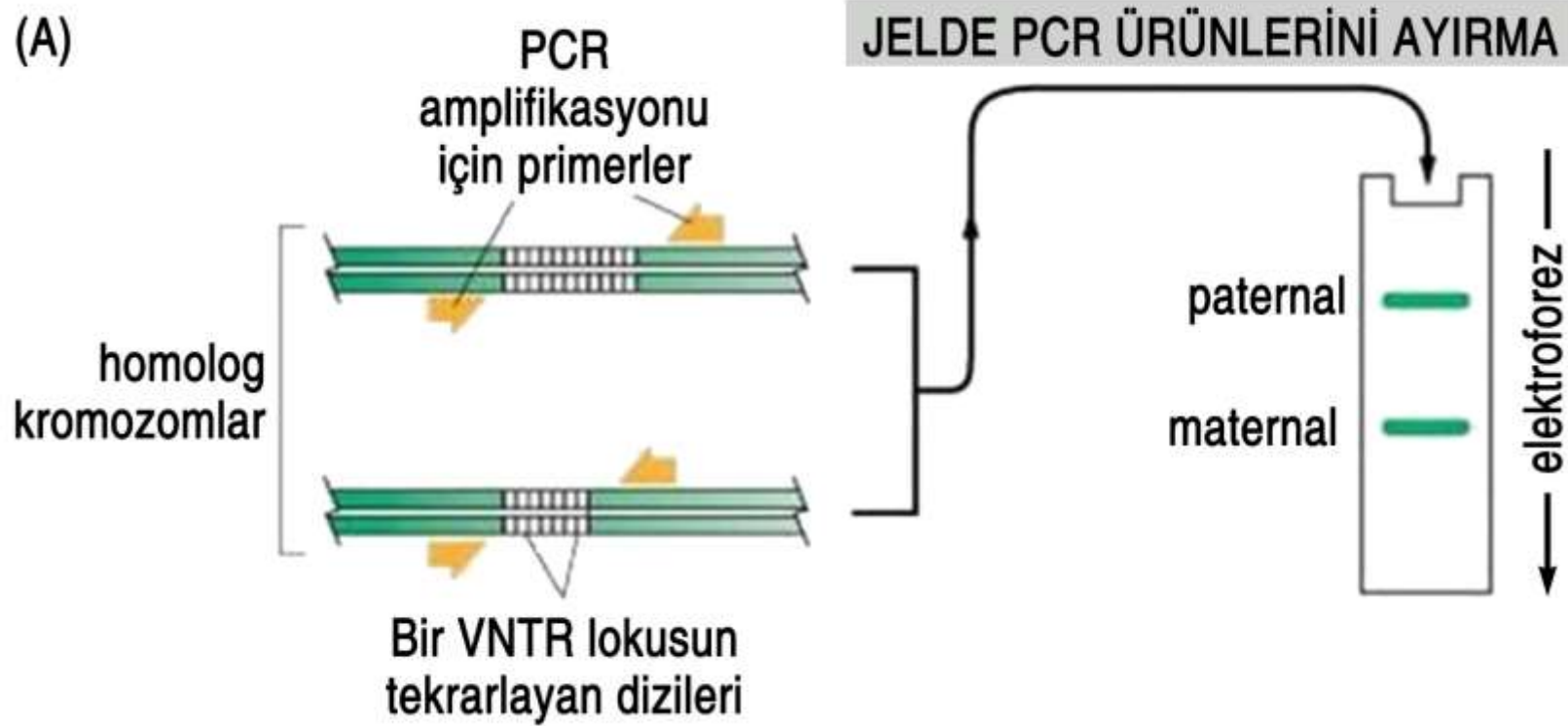
Patojen Yok

Patojenlerin Saptanması

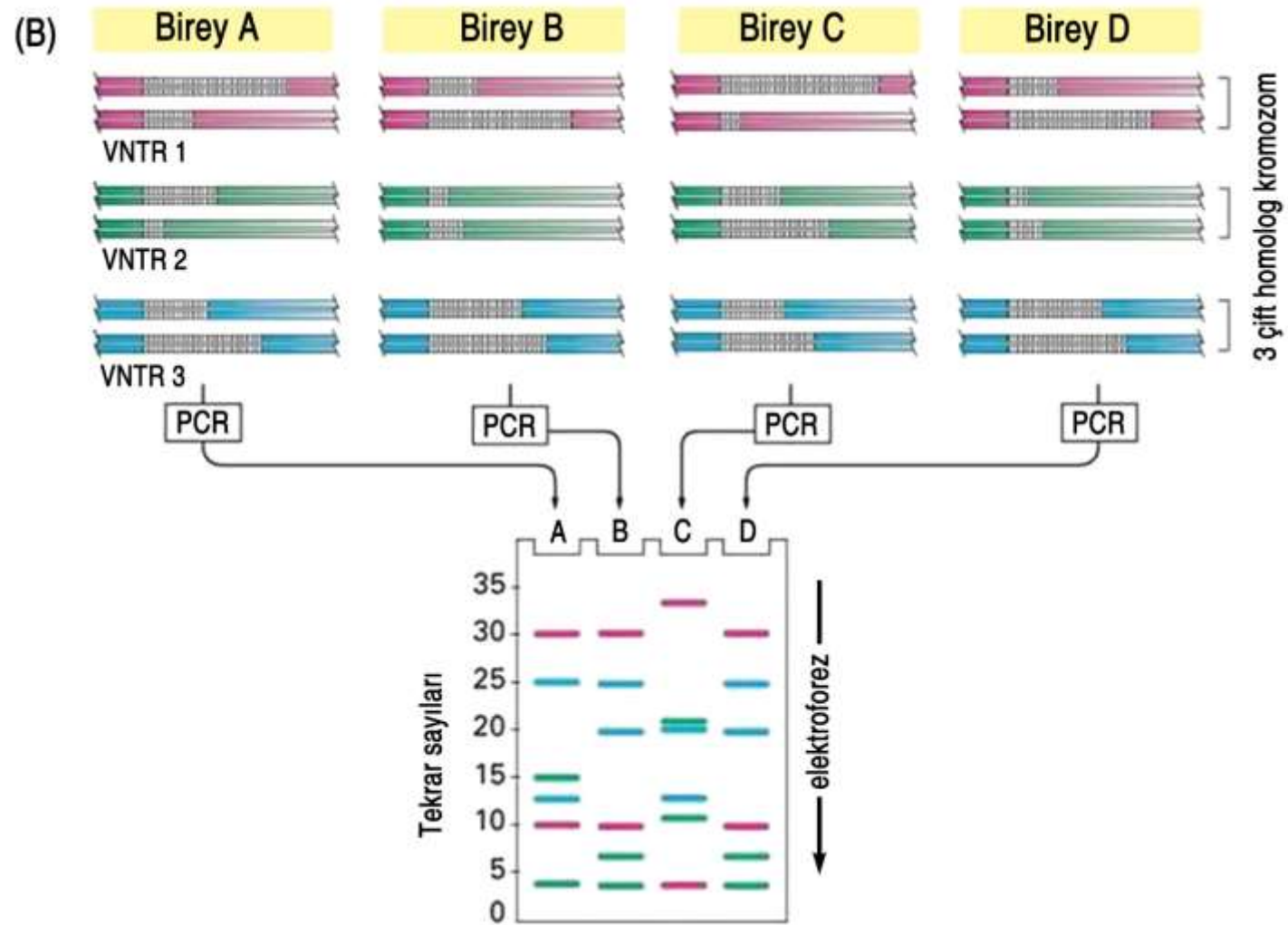


PCR ile amplifiye *M. tuberculosis* DNA'sının saptama **duyarlılığı**. (Kaul et al.1994)

Genotipleme (VNTR Belirteçleri ile)



Genotipleme (VNTR Belirteçleri ile)

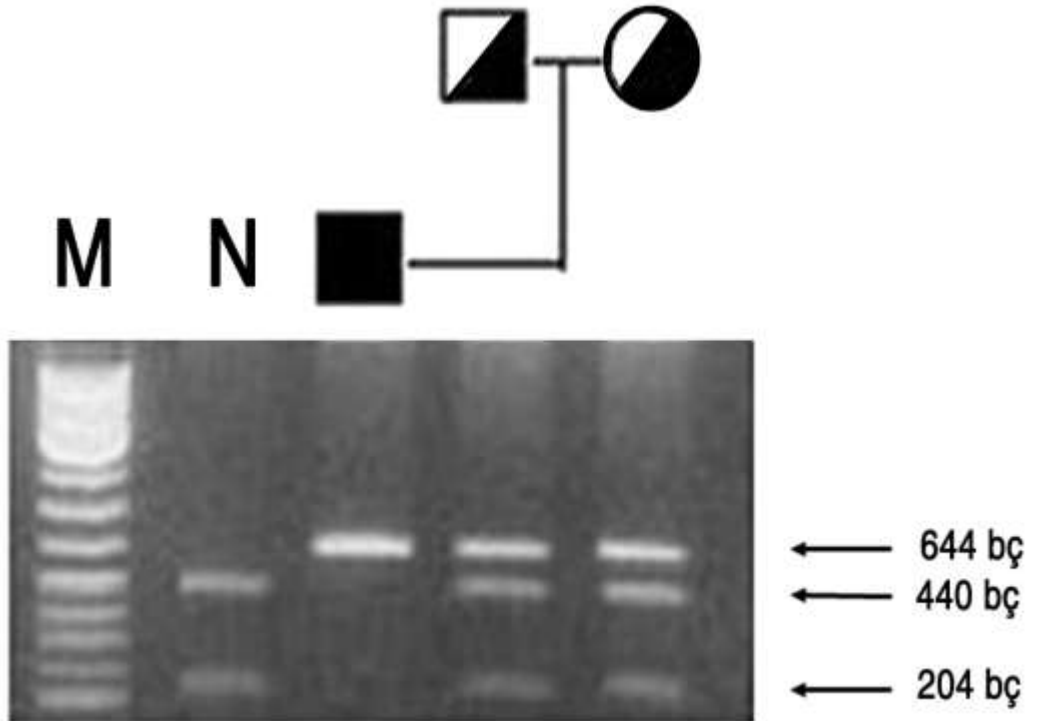


Prenatal Tanı

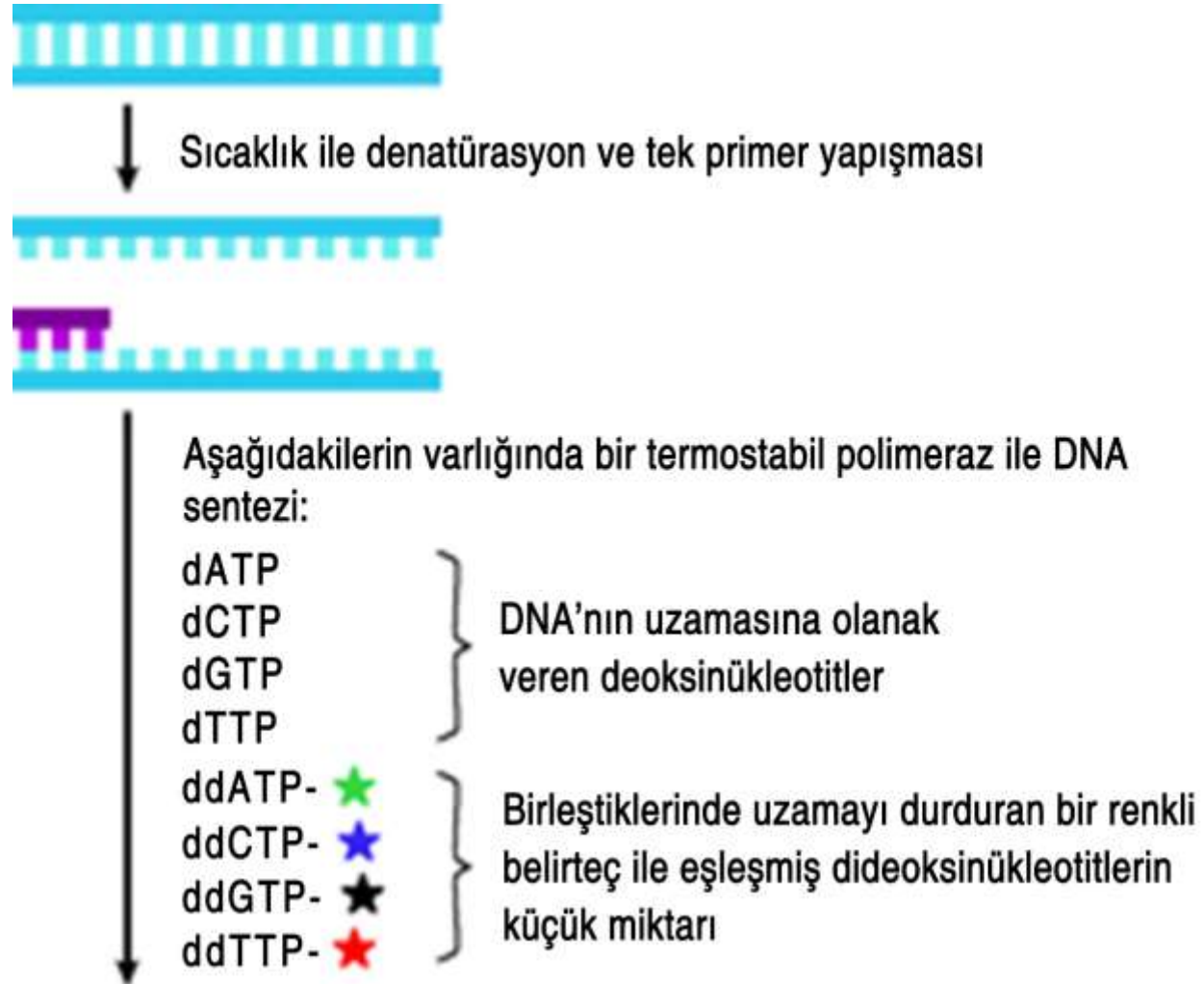
- Koriyonik Villus

- Amniyon Sıvısı

Otozomal resesif bir hastalığa sahip ailenin moleküler analizi



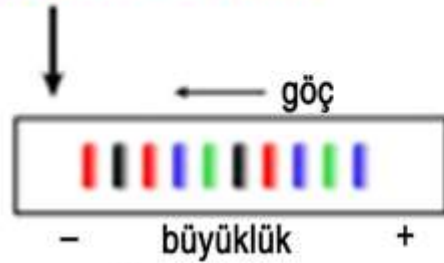
"Sequencing"



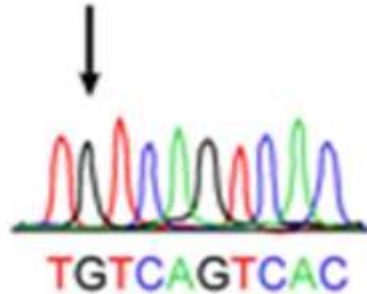
"Sequencing"



Polimerazla dideoksinükleotitlerin rasgele birleşmesi, tamamen farklı olası büyüklükte DNA parçaları üretir.



DNA parçalarının jel elektroforezi, büyüklüklerine bağlı olarak ayıklanmasına olanak tanır.

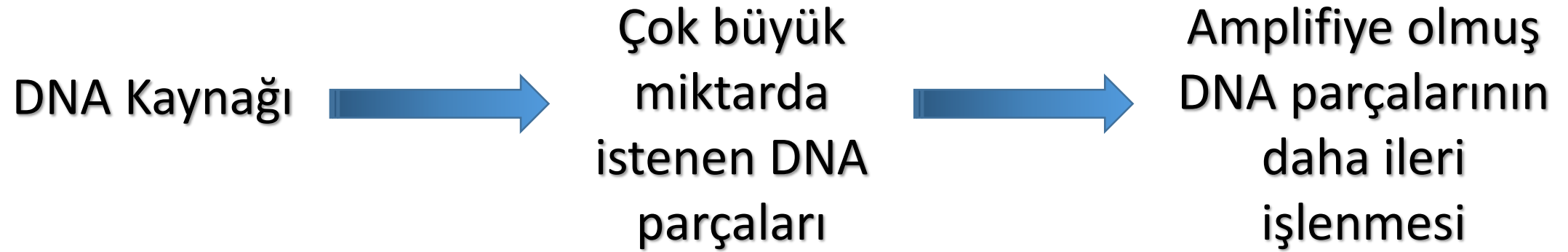


Jeldeki renkli belirteçlerin analizi, DNA'nın başlangıç parçası dizisini anlamamıza olanak verir.

Özet

- Bilimsel alanların sonsuz çeşitliliğinde birçok kullanımı vardır.
 - DNA dizileme
 - DNA profillemeye ("fingerprinting")
 - GDO'lar için rekombinan DNA yapma
 - Gıdalarda yabancı organizmaları (*Salmonella*, *E. Coli*) saptama
 - Enfeksiyon ya da hastalık nedenini belirleme (Lyme Hastalığı, Streptokoksik boğaz, CYH'lar, vd.)
- Tıp
- Moleküler biyoloji
- Hücre biyolojisi
- Ziraat
- Botanik
- Arkeoloji
- Tarihsel tıbbi genetik...

Özet



Sonuç

- Hızlı ve kolay kullanımı, duyarlılığı, özgünlüğü ve sağlamlığıyla PCR moleküler çalışmalarda devrim yapmıştır. Ayrıca araştırma ve tanısal uygulamalardaki geniş yelpazesıyla çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir tekniktir.



Soru, Katkı?!