



BÖLÜM 6

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON TEMELLİ AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ:

MONOPEKS-, MULTİPEKS-, NESTED-, KONSENSUS-, IN SITU- VE TOUCHDOWN-PCR YÖNTEMLERİNİN PRENSİPLERİ

Zekiye BAKKALOĞLU¹

İştar DOLAPÇI²

Polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)], herhangi bir organizmaya ait belirli bir deoksiribo nükleik asit (DNA) bölgesinin hızlı ve doğru bir şekilde in vitro çoğaltılmasını sağlayan enzimatik bir yöntemdir. Bu yöntem, komplementer nükleik asit hibridizasyonunun ilkelerini, sayısız döngü boyunca tekrar tekrar uygulanan nükleik asit replikasyonu ilkeleriyle birleştirir. 1985 yılında Karry Mullis tarafından bilim dünyasına sunulmasından bu yana PCR, tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında birçok uygulama için yaygın ve vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir. Mullis, bu buluşundan dolayı, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. PCR adını, in vitro DNA sentezini gerçekleştiren polimeraz enziminden almıştır ve 'zincir reaksiyonu' da üssel artış anlamına gelmektedir¹.

Biyolojik bilimlerin farklı alanlarının değişmesine ve gelişmesine önemli katkılar sağlayan PCR yönteminin tıp, tarım, çevre ve biyo-endüstride temel ve uygulamalı araştırmalarda sayısız kullanım

alanı bulunmaktadır. Kültür yöntemine kıyasla klinik örnekteki mikroorganizmaları yüksek duyarlılık ve özgüllükte daha hızlı, daha ucuz ve daha doğru olarak saptaması nedeniyle PCR yönteminin en önemli tıbbi uygulamalarından biri mikroorganizmaların tanımlanmasıdır².

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Prensipleri

PCR, hedeflenen nükleik asit dizisinin sınırsız miktarlarda çoğaltılmasına (amplifikasyonuna) izin veren basit bir in vitro kimyasal reaksiyondur ve bu reaksiyon, doğru koşullar altında, bir DNA zincirini kopyalayabilen DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. PCR'de enzim katalizli DNA sentezini in vitro başlatmak ve sonlandırmak için sıcaklık döngüsü uygulanmaktadır ve her döngü üç aşamadan oluşmaktadır³ (Şekil 1):

- Kalıp çift zincirli DNA'nın ısı ile denatürasyonu (genellikle > 90°C) (denatürasyon, denaturasyon)

¹ Dr. Bio., Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, zekiye.yb@gmail.com

² Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., dolapci@medicine.ankara.edu.tr

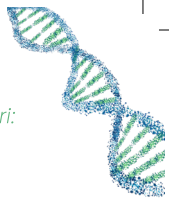
lanma derecelerinde farklı sayıda döngüler seçilmektedir. Teorik olarak özgül DNA eşleşmesinin olması için reaksiyonda kullanılan iki primerin Tm derecelerinin birbirlerine yakın olması ve PCR'de bağlanma derecesi olarak primer Tm derecelerinin birkaç derece altının seçilmesi gerekmektedir. Primerlerin Tm derecelerinin birbirlerine yakın olmadığı durumlar gibi bazı durumlarda reaksiyonun optimizasyonu için "touchdown" PCR tekniği uygulanabilmektedir^{51,52}.

Touchdown PCR'de ilk olarak uygulanan bağlanma derecesi, kullanılan primerlerin Tm değerinin üzerinde iken, daha sonra ardışık döngüler boyunca kademeli olarak düşürülerek primerlere uygun bir dereceye inilmektedir. Çift sarmal nükleik asidin hibridizasyonuna dayalı tüm reaksiyonlar aslında erime sıcaklığına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Tm, moleküllerin yarısının tek sarmallı, yarısının ise çift sarmallı olduğu sıcaklık derecesi olarak tanımlanmakta ve PCR'nin genel doğruluğu bu değişkenin doğru hesaplanmasına dayanmaktadır. Tm yanlış hesaplandığında, buna bağlı olarak ayarlanan bağlanma derecesi de hatalı olmakta ve bu da uygun olmayan hibridizasyona ve spesifik olmayan PCR ürünlerinin amplifikasyonuna yol açmaktadır. Özellikle düşük bağlanma dereceleri seçildiğinde özgül olmayan amplifikasyon ürünleri sıklıkla izlenmektedir^{13,52}.

Touchdown PCR'deki temel ilke, bağlanma aşamasının özgüllüğünü artırmak amacıyla, kullanılan primerlerin Tm derecelerinin üzerinde bir bağlanma derecesi ile reaksiyona başlanıp sonra kademeli olarak sıcaklığın düşürülmesi ve en son 10-15 döngünün primerlerin Tm dereceleri ile uyumlu bir bağlanma derecesinde yürütülmesidir. Tm değeri, basit olarak $4(G+C) + 2(A+T)$ formülüyle hesaplanabileceği gibi, uzun primerler için farklı formüller de uygulanabilmektedir¹³. Touchdown PCR, primerlerin Tm değerlerinin hesaplanması sırasında yapılan yaklaşımları ampirik olarak ele alarak, yanlış hesaplamalardan kaynaklanan sorunları ortadan kaldırmaktadır⁵¹.

Kaynaklar

1. Shahzad BS, Afzal M, Sikandar S, Afzal I. Polymerase Chain Reaction. In: Jamal F (ed), Genetic Engineering- A Glimpse of Techniques and Applications [Internet]. London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70299> 10.5772/intechopen.81924
2. Ulu E ve Cacina C. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. ÜCD Güncelleme Serileri, Moleküler Tıp Özel Sayısı 2020;9(2): 37-41.
3. Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc 2019(6); 436-56.
4. Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: Nagpal ML, Boldura O, Baltă C, Enany S (eds), Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science [Internet]. London: IntechOpen; 2019 [cited 2022 May 20]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/67558>.
5. Hirschhorn JW, Schandl CA, Nolte FS. Polymerase Chain Reaction and Other Nucleic Acid Amplification Technology, pp: 1387-99. In: Henry's Clinical Diagnosis Management by Laboratory Methods. 2022, 24th ed. Elsevier Inc., Philadelphia.
6. Mostafa HH, Zimmerman S, and Miller MB. Molecular Microbiology, pp: 932.e8-932.e9; 932.e1-932.e51. In: Nader R (Ed), Tietz Textbook of Laboratory Medicine, 2023, 7th ed. Elsevier Inc., Missouri.
7. Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
8. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. Anwer Khan Mod Med Coll J 2013;4(1): 30-6.
9. Hazel M. The Polymerase Chain Reaction. Chapter 5, pp: 71-88. In: Welch Miriam Dwek et al. (eds), Metastasis Research Protocols, Methods in Molecular Biology. vol. 878, 2016, 2nd ed. Humana Press, Springer Science+Business Media, New York.
10. Waters DLE, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): General methods, pp: 65-75. In: Henry RJ, Furtado A (eds), Cereal genomics: Methods and protocols. 2014. Humana Press Inc., New York.
11. Nazir I, Mahmood HZ, Mustafa SE. Polymerase chain reaction: a creative review. J Appl Biotechnol Bioeng 2020;7(4): 157-159.
12. Dey P. Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. Chapter 20, pp: 201-211. In: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. 2018. Springer Nature, Singapore.
13. Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. Journal of Research in Veterinary Medicine 2013;32(1): 31-38.
14. Goshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application. Int Jour of Biomed Res 2011;2(1): 81-97.
15. Shahi S, Zununi Vahed S, Fathi N, Sharifi S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. International Journal of Biological Macromolecules 2018;117: 983-992.
16. Garibyan, L, and Avashia, N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol 2013;133(3): 1-4.
17. Liu HY, Hopping GC, Vaidyanathan U, Ronquillo YC, Hoopes PC, Moshirfar M. Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis. Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol 2019;8(3): 152-155.



18. Yılmaz S, Devran Z. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. *Derim* 2016;20(1): 31-42.
19. Tille PM. (Ed) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, pp: 113-143. 2017, 14th ed. Elsevier Inc., Missouri.
20. Wittwer CT, Makrigiorgos GM. Nucleic Acid Techniques, pp: 959-94.e5 In: Rifai N (Ed), Tietz Textbook of Laboratory Medicine. 2023, 7th ed. Elsevier Inc, Missouri.
21. Marmiroli N, Maestri E. Polymrase Chain Reaction (PCR), pp: 147-187. In: Picó Y (Ed), Food Toxicants Analysis. 2007, 1st ed. Elsevier, Amsterdam.
22. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger HC, Woods GL (eds), Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, pp: 137-172. 2017, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia.
23. Harnett GB, Chidlow GR. Multiplex PCR in Diagnostic Microbiology, pp: 31-34. In: Schuller M, Sloots TP, James GS, Halliday CL, Carter IWJ (eds), PCR for Clinical Microbiology (An Australian and International Perspective). 2010. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
24. Lindström J, Elfving K, Lindh M, Westin J, Studahl M. Assessment of the FilmArray ME panel in 4199 consecutively tested cerebrospinal fluid samples. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(1): 79-84.
25. Miller MB. Opinion on Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. *Clin Chem* 2020;66(1): 42-4.
26. Nolte FS, Wittwer CT. Nucleic Acid Amplification Methods Overview, pp: 3-18. In: Persing DH, Tenover FC (eds), Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice. 2016, 3rd ed. ASM Press, Washington DC.
27. Serigstad S, Markussen D, Grewal HMS, Ebbesen M, Kommedal Ø, Heggelund L, et al. Rapid syndromic PCR testing in patients with respiratory tract infections reduces time to results and improves microbial yield. *Sci Rep* 2022;12(1): 326.
28. Buonomini AR, Riva E, Di Bonaventura G, Gherardi G. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Blood for the Diagnosis of Bloodstream Infections: A Mini-Review. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(10): 830.
29. Sanchini A. Recent Developments in Phenotypic and Molecular Diagnostic Methods for Antimicrobial Resistance Detection in *Staphylococcus aureus*: A Narrative Review. *Diagnostics (Basel)* 2022;12(1): 208.
30. White PL, Price JS, Cordey A, Backx M. Molecular Diagnosis of Yeast Infections. *Curr Fungal Infect Rep* 2021;15(3): 67-80.
31. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2017; 31(1): e00024-17.
32. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4): 559-70.
33. Nolte FS. Molecular Microbiology, pp: 54-90. In: Jorgensen JH, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2015, 11th ed. ASM Press, Washington DC.
34. Sevidik E, Abacı ZT. Nested PCR ve kullanım alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2013;6(2): 22-6.
35. Andrews V, Pinholt M, Schneider UV, Schønning K, Søes LM, Lisby G. Performance of PCR based syndromic testing compared to bacterial culture in patients with suspected pneumonia applying microscopy for quality assessment. *APMIS*, 2022 doi: 10.1111/apm.13232.
36. Guillotin F, Poulain C, Gaborit B, Bouras M, Cinotti R, Lakhal K, et al. Potential Impact of Rapid Multiplex PCR on Antimicrobial Therapy Guidance for Ventilated Hospital-Acquired Pneumonia in Critically Ill Patients, A Prospective Observational Clinical and Economic Study. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12: 804611.
37. Patel A, Harris KA, Fitzgerald F. What is broad-range 16S rDNA PCR? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2017;102: 261-264.
38. Mishra D, Satpathy G, Chawla R, Venkatesh P, Ahmed NH, Panda SK. Utility of broad-range 16S rRNA PCR assay versus conventional methods for laboratory diagnosis of bacterial endophthalmitis in a tertiary care hospital. *British Journal of Ophthalmology* 2019;103(1): 152-156.
39. Hassan RM, El Enany MG, Rizk HH. Evaluation of broad-range 16S rRNA PCR for the diagnosis of bloodstream infections: two years of experience. *J Infect Dev Ctries* 2014;8: 1252-58.
40. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH* 2016;38(3): 223-32.
41. Turan MK, Günay ÖC, Kayış SA, Çörtük M. Mikrobiyotada 16S rRNA ve Basit Biyoinformatik Analizler. *J Biotechnol and Strategic Health Res* 2018;2(1): 23-34.
42. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 2020;33(4): e00053-19.
43. Park C, Kim SB, Choi SH, Kim S. Comparison of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers. *Front Microbiol* 2021;12: 715500.
44. Aggarwal D, Kanitkar T, Narouz M, Azadian BS, Moore LSP, Mughal N. Clinical utility and cost-effectiveness of bacterial 16S rRNA and targeted PCR based diagnostic testing in a UK microbiology laboratory network. *Sci Rep* 2020;10: 7965.
45. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. *Int J Infect Dis* 2017;57: 144-149.
46. Mishra D, Satpathy G, Wig N, Fazal F, Ahmed NH, Panda SK. Evaluation of 16S rRNA broad range PCR assay for microbial detection in serum specimens in sepsis patients. *Journal of Infection and Public Health* 2020;13(7): 998-1002.
47. Tkadlec M, Peckova L, Sramkova V, Rohn D, Jahoda D, Raszka J, et al. The use of broad-range bacterial PCR in the diagnosis of infectious diseases: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* 2019;25(6): 747-752.
48. Boujelben I, Gdoura R, and Hammami AA. "A broad-range PCR technique for the diagnosis of infective endocarditis. *Braz J Microbiol* 2018;49(3): 534-543.
49. Iwan E, Szczotka M, Kuźmak J. Application of in situ PCR for the Detection of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Infection in Dendritic Cell cultures. *Journal of Veterinary Research* 2014;58(3): 347-352.
50. Lossi L, Gambino G, Salio C, Merighi A. Direct In Situ RT-PCR. *Neuropeptides* 2011;111-126.
51. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3(9): 1452-6.
52. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991;19(14): 4008.