

## RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZLAR

- RE enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE varlığından söz edilmektedir. RE enzimlerinin çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir.
- 1965'te Arber; DNA metilasyonunun bakteriyi restriksiyon ajanlarına karşı koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Bakteri, kendi DNA'sını kendi endonükleazlarından korumak için metiller, demiştir.
- 1968'de Meselson ve Yuan; ilk RE'ı E.coli bakterisinden izole etmişlerdir. Fakat bu RE'ın spesifik tanıma bölgesi bulunmamaktaydı.
- 1970'de Smith ve Wilcox; H.influenza'dan spesifik DNA sekansını tanıyan ve kesim yapan bir endonükleaz ( Hind II ) izole ettiler.

RE'ların doğal biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında oynadıkları roldür. Bakteriye giren yabancı DNA'ları da kesebildiklerinden, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilmekte ve bakteriyi virüslerden ve yabancı DNA'lardan korumaktadırlar.

Aynı zamanda, bakterilerde bulunan spesifik metilaz enzimleri de, restriksiyon bölgelerine metil grupları ekleyerek, RE'ların bakterinin kendi DNA'sını kesmesini engellemektedir.

1970'li yıllardan sonra restriksiyon restriksiyon endonükleaz kullanımına bağlı olarak rekombinant DNA teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin çoğaltılmasını, genin kodladığı proteinin proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini vbmümkün hale getirmiştir. Bu teknolojiadaki merkezi konumu nedeniyle, RE enzimleri enzimleri özellikle zellikle klonlama klonlama çalışmaları araştırma laboratuarlar laboratuarlarında sıklıkla kullanılmıştır. RE kullanım alanlar m alanlarına örnekler:

- Rekombinant DNA elde edilmesi
- DNA haritası çıkarılması
- Polimorfizmlerin belirlenmesi
- Probların hazırlanmas
- DNA modifikasyon durumlarının analizi

## İSİMLENDİRME

İsimlendirmede önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra **bakteri türünün** ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilir.

- EcoR I

E = genus Escherichia

co = species coli

R = strain RY 13

I = first RE to be isolated from this species

- Hind III

H = genus Haemophilus

in = species influenzae

d = strain Rd

III = third RE to be isolated from this species

## RE'ların DNA'ya BAĞLANMA ve KESME MEKANİZMALARI

- RE'lar DNA tanıma bölgesi ve katalitik alan olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. DNA tanıma bölgesi spesifik bölgeyi tanır ve katalitik alanı buraya yerleştirir. Tanıma sekansına yerleşen katalitik alan heliksin fosfodiester bağlarını kırar.
- RE'lar, çift sarmal DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanabildikleri gibi, tanıma bölgeleri dışından da bağlanabilmektedirler. Tanıma bölgeleri dışından bağlandıktan sonra bu enzimler, çizgisel DNA boyunca kaymaktadırlar. Bu işlem esnasında DNA ile enzim arasında su molekülleri doldurmaktadır. Enzim tanıma bölgeleri bulunduğu zaman su moleküllerinin pek çoğu uzaklaştırılmaktadır. Enzim-DNA kompleks formunda, hem enzimde hem DNA dizilerinde konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir.

- RE'lar sadece bazlar arasında yatay konumda bulunan fosfodiester bağlarını kırarlar. Karşılıklı iki baz arasındaki hidrojen bağlarının kesilmesinden sorumlu değildirler. Hidrojen bağları, fosfodiester bağlarının kırılmasıyla ve çözeltideki termal hareketten doğan enerjinin etkisiyle kendiliğinden kırılırlar.

## RE'ların TANIMA SEKANS ÖZELLİKLERİ

- RE'lar için substrat olan spesifik veya nonspesifik çift zincir DNA sekanslarına tanıma sekansları denilmektedir.
- Restriksiyon tanıma bölgelerinin uzunluğu değişebilmektedir.

- Farklı RE'lar aynı tanıma sekansına sahip olabilirler. Aynı sekansı tanıyan ve farklı organizmalardan elde edilmiş RE'lara izoşizomer denir (Ör: Sac I ve Sst I ).

- İzoşizomerler sıklıkla farklı optimum reaksiyon koşullarına ve stabiliteye sahiptirler.

- İzoşizomerler aynı sekansı tanımalarına karşın, kesimi sekansın farklı bölgelerinden de yapabilirler. Bunlara ise neoşizomerler denir ( Ör: Sma I ve Xma I ).

Sma I ---- CCC ↓ GGG

Xma I ---- C ↓ CCGGG

Psp AI ---- C ↓ CCGGG

## ENZİM TANIMA SEKANSI

BamHI GGATCC  
CCTAGG

NotI GCGGCCGC  
CGCCGGCG

Sau3AI GATC  
CTAG

Sac I GAGCTC  
CTCGAG

**RE'ların TEPKİME ŞARTLARI** RE'lar gerek uzun süreli saklanırken, gerekse aktivite gösterirken uygun şartlara ihtiyaç duymaktadırlar. Bir enzimden en iyi şekilde yararlanabilmesi için gerekli şartlar üretici firmalar tarafından kullanıcıya bildirilmelidir. RE'larla çalışırken, bu şartlara uyulmadığı takdirde sıkça problemlerle karşılaşılır. Enzimlerin star aktiviteleri, DNA ve enzim konsantrasyonunun uygun olmaması, pH ve iyonik dengenin uygun olmaması, çalışılan enzimin diğer enzimlerle kontaminasyonu gibi problemler uygun olmayan kesimlere neden olabilmektedir.

- 1) Tampon kompozisyonu: Tampon çözeltisinin fonksiyonu yeterli iyonik gücü (tuz konsantrasyonu), major katyonları ( sodyum, potasyum ) ve uygun pH ortamını oluşturmaktır. Pek çok RE genellikle pH 8.0'de aktiftir. RE'ların çoğu 50-150 mM NaCl veya KC ortamında kesim yapmaktadır.
- 2) Enzim kofaktörleri: Ticari olarak mevcut RE'lar kofaktör olarak sadece magnezyuma (Mg) ihtiyaç duymaktadır. Diğer divalent katyonların varlığı problemlere neden olmaktadır.
- 3) Gliserol: RE'lar -20 oC'de saklanırken saklama tamponu içerisine gliserol (%50) katılmaktadır. Bu, enzimli dönemi engellemektedir. Böylece, enzimin dondurulup çözülmesi sırasında göreceği zarar



4) İnkübasyon sıcaklığı: Çoğu RE maksimum aktivitesini 37 oC'de göstermektedir. Fakat daha düşük veya daha yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini gösteren RE'lar da vardır. Ör: Apa I → 30 oC , Bcl I → 50 oC , Taq I → 65 oC

5) Enzim konsantrasyonu: 1 aktivite ünitesi, 1µg DNA'yı 50 µL total reaksiyon hacmi içinde 1 saatte hidrolize edebilen enzim miktarıdır. Kullanılan enzim konsantrasyonları substrata göre ayarlanmakla birlikte, çok yüksek enzim konsantrasyonları star aktiviteye neden olabilmektedir.

6) Substrat konsantrasyonu: Substrat olarak kullanılan DNA'nın miktarı RE kesimini etkilemektedir. Az bir hacim içerisinde çok miktarda DNA bulunması enzimin difüzyonunu engellemekte ve etkinliğini düşürmektedir. Çok düşük DNA konsantrasyonları da kesimin verimini etkilemektedir.

## STAR AKTİVİTE

- RE'ların özelliklerinden en dikkate değer olanı, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden kesebilme başarılarının optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Optimal olmayan şartlarda enzimin tanıma sekansına olan spesifitesi değişmektedir. Örneğin; Bam HI enzimi için tanıma sekansı (G↓GATCC) iken, optimal olmayan şartlarda (G↓GATCN) veya (G↓RATCC) şeklinde benzer bölgelerden de kesim yapabilmektedir.
- Bu duruma “ star aktivite ” veya “ relaxed specificity ” denilmektedir. Bu durum, çalışmalarda oldukça önemli olmakta ve çalışmanın başarısında belirleyici konuma gelebilmektedir. Bu nedenle, kullanılan RE'ların star aktiviteye sahip olup olmadıkları bilinmeli, üretici firmalar tarafından da bildirilmelidir.

## Star aktiviteye neden olan durumlar

- Yüksek gliserol konsantrasyonu (  $> \% 5$  v/v )
- Çok yüksek enzim konsantrasyonu ( genellikle  $> 100$  U/ $\mu$ g DNA )
- Düşük iyonik güç (  $< 25$  mM )
- Yüksek pH ( genellikle  $> 8.0$  )
- Organik maddelerin varlığı ( DMSO, etanol, dimetilasetamid vb.)
- Kofaktör Mg'un yerine diğer divalent katyonların varlığı (Mn<sup>+2</sup>,Cu<sup>+2</sup> vb.)

## RE'ların SINIFLANDIRILMASI

RE'lar; metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmışlardır.

- Tip I RE'lar: Endonükleaz aktiviteri için ATP, S-adenozilmetionin ve  $Mg^{+2}$ 'a ihtiyaç duyarlar. Bilinen tüm tip I RE'lar tanıma sekansındaki adenin rezidülerini metilasyona uğratmaktadır. Bu enzimler tanıma sekanslarına bağlanmalarına rağmen, kesimleri sekans dışında tesadüfi olarak gerçekleştirmektedirler. 3 altüniteden oluşurlar. Birincisi, tanıma sekansını tanır; ikincisi, adenin rezidülerini metiller; üçüncüsü ise kesimden sorumludur.
- Tip II RE'lar: RE'lar denildiğinde ilk akla gelen ve en çok çalışılan gruptur. İzole edilen RE'ların çok büyük kısmı bu gruptadır. Çünkü tip II RE'lar, tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle araştırmalar için ideal enzimlerdir.  $Mg^{+2}$  iyonlarının varlığında çift zincir DNA üzerindeki palindromik sekansları tanır ve bu sekans içindeki özel bölgeden kesim yaparlar. Kesimleri ATP'ye bağlı değildir. Restriksiyon fragmanları ve jelde band paternleri oluşturmaları bakımından diğer tip RE'lara göre çok üstündürler ve hemen hemen sadece bu grup RE'larla çalışılmaktadır.

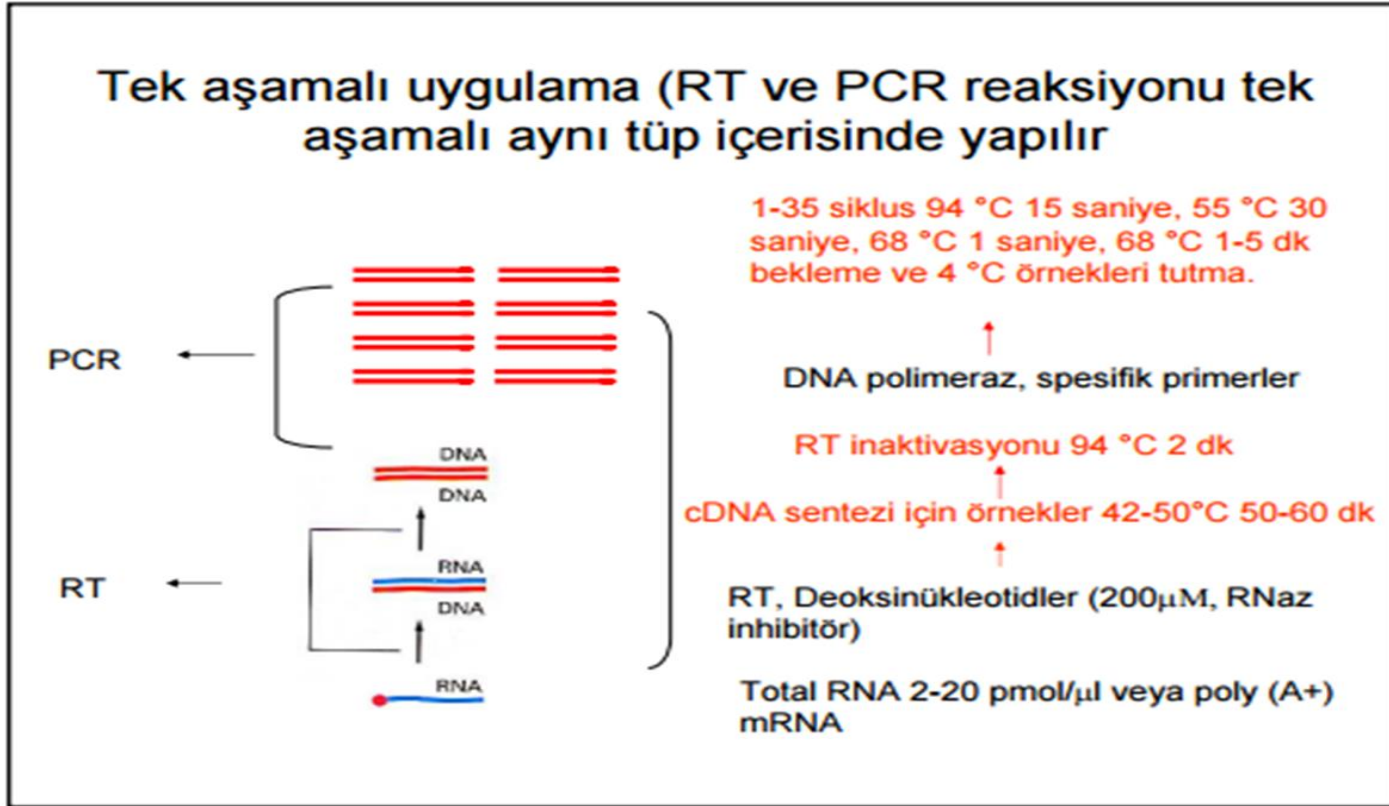
**Tip III RE'lar:** Tip I RE'lar gibi metilasyon modifikasyon fonksiyonuna sahip olup, Mg<sup>2+</sup> ve ATP'ye bağlı kesim gerçekleştirirler. Çok altüniteli enzimlerdir ve tam bir kesim yapma özellikleri zayıftır. DNA'ya tanıma sekanslarından bağlanmalarına rağmen, kesimi tanıma bölgesinden farklı bir yerden gerçekleştirirler.

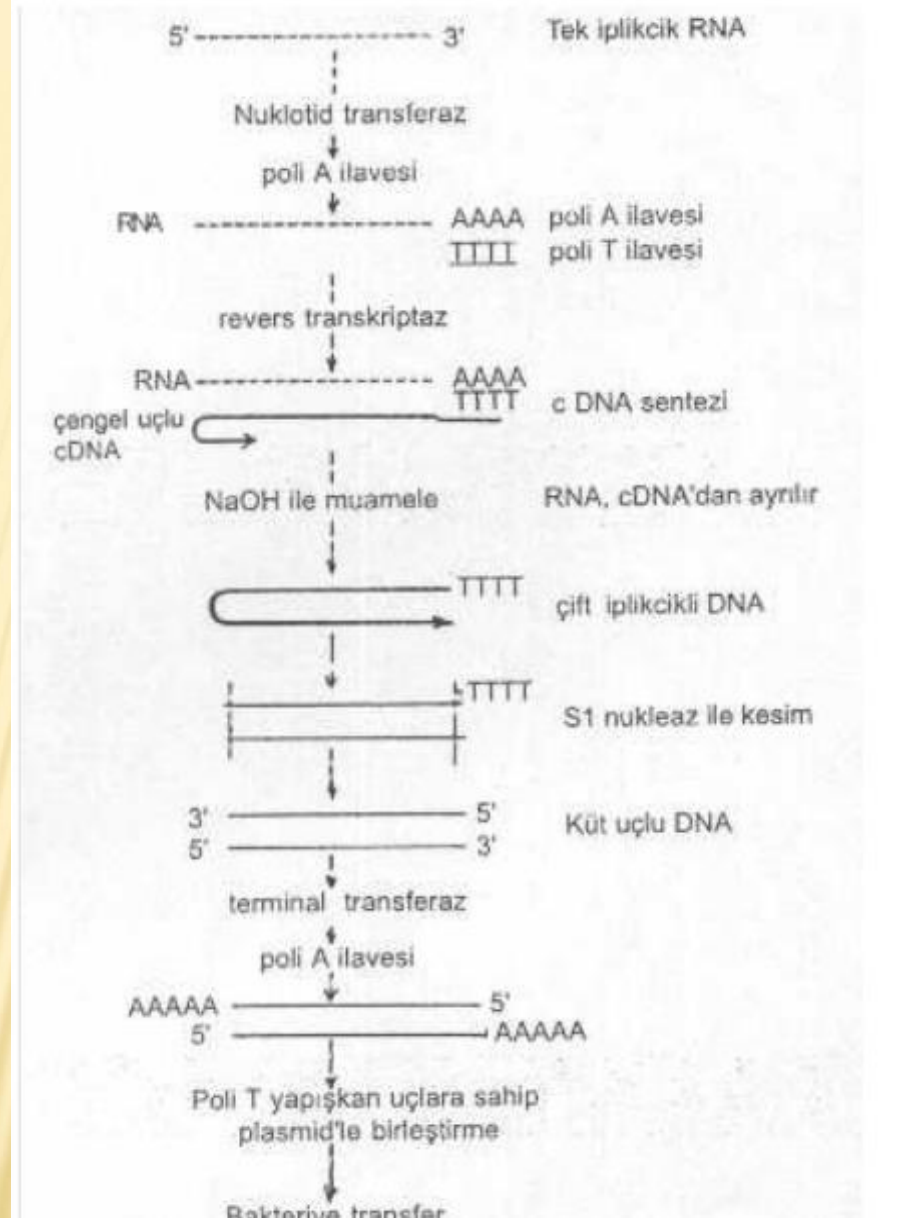
**Homing endonükleazlar:** Protein yapıları bakımından diğer RE'lardan farklılık gösteren, uzun ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA'ya ihtiyaç duyan enzim grubudur. Daha az tanıma özgüllüğü göstermekte ve tanıma bölgelerindeki tek baz değişimlerini tolere edebilmektedirler.

**Nicking endonükleazlar:** RE'lar çift zincir DNA'ya bağlanıp kesim yaparlar. Tek zincire bağlanıp endonükleaz aktivitesi gösteren enzim grubuna da “ nicking ” endonükleazlar denilmektedir.

## M-RNA ların Saflaştırılması ve cDNA hazırlanması

Önemli bir ürünü veya antijenik faktörü kodlayan genler her zaman DNA üzerinde bulunmayabilirler. RNA karakterinde genetik materyal taşıyan virüslerde antijenik olan kapsid proteinini kodlayan genler RNA üzerinde lokalize olmuşlardır (ayrıca, hücre içindeki mRNA'da bulunurlar).





- 1) Önce virus bolca üretilir. Özel yöntemlerle genetik materyali olan RNA'ları çıkarılır ve saflaştırılır.
- 2) RNA'nın 3'-ucuna enzimatik olarak poli A nukleotidleri ilave edilir (bu amaçla terminal nukleotid transferaz enziminden yararlanır).
- 3) Poli A'ların karşısına, bunun komplementeri olan Poli T'ler ilave edilir ve kısa bir primer taban nukleotidleri oluşturulur. Bu, işlem transferaz enzimi yardımıyla gerçekleştirilir.
- 4) Poli T primerleri basamak olarak kullanılarak, revers transkriptaz enzimi yardımıyla, RNA'ya komplementer bir DNA (cDNA) sentezlenir ve bunun 3'-ucu da çengel tarzında kıvrılır. Böylece RNA-DNA hibrid molekülü oluşur.
- 5) Sentezlenen tek iplikcikli cDNA'dan RNA, NaOH'le muamele edilerek giderilir ve sadece çengel uçlu tek iplikcikli cDNA kalır. Bu çengel uç, Pol.I'in sentezi için primer basamak oluşturur.
- 6) Pol. I enzimi çengel uçtan başlayarak ilk cDNA'ya buna komplementeri olan ikinci DNA'yı sentezler. Böylece DNA-DNA çift iplikcikli molekülü oluşur.
- 7) Sonra çengel uç kısım S1 nukleaz enzimi ile kesilerek çıkarılır.
- 8) cDNA'nın 5'-ucundaki poli T'ler de S1 nukleaz enzimi ile çıkarılır. Böylece küt uçlar meydana getirilir.
- 9) Terminal transferaz enzimi yardımıyla cDNA'ların 3'-uçlarına poli A'lar ilave edilir. Bu işlem sonunda iki ucunda poli A'dan oluşan yeni uçlar meydana gelmiş olur.

Böylece çift iplikcikli DNA oluşturulduktan sonraki aşamalar önceden bildirildiği tekniklerle yürütülür. Şöyle ki, bu amaçla, plasmid DNA'sı Pst I ile kesilerek iki yapışkan uç meydana getirilir. Yapışkan uçlar enzimatik olarak giderilerek (giderilmese de olur), yerlerine terminal transferaz yardımıyla poli T'ler ilave edilir. Böylece, plazmid ile gen DNA'sı birbirinin komplementeri haline getirilir. Bu uçlar birleştirildikten sonra bir bakteriye (E.coli 'ye) aktarılır. Yukarıda bahsedilen işlem aynen mRNA için de uygulanabilir.



## DNA SEKANS 'DİZİ' ANALİZİ

- DNA dizi analizleri yada sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır.
- İlk dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlanmıştır.
- 1970'lerin sonlarına kadar 5-10 nükleotid içeren bir nükleik asit dizisinin elde edilmesi bile zor ve çok zahmetli idi.

**Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam et al.,1977).**

*Manuel (Radyoaktif İşaretleme) Dizi Analizi*

**Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (Enzimatik). (Sanger et al.,1977).**

*Otomatik (Fluorasan İşaretleme) Dizi Analizi*

## **Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır**

### **1. DNA'nın hazırlanması**

Her iki analiz sırasında da tek iplikli DNA parçaları hazırlanır. DNA dizi analiz yöntemi sırasındaki temel fark DNA fragmentlerinin üretilme biçiminden kaynaklanır.

### **2. Reaksiyonlar**

Hem Sanger hem Maxam-Gilbert tekniğinde genel prensip, DNA'yı işaretlenmiş dört fragman grubuna ayırmaktır. • Her grubu oluşturan reaksiyon baza özeldir; belli bir bazın DNA dizisinde bulunduğu pozisyona uygun uzunlukta fragman oluşturur. • Örneğin 5' -pAATCGACT-3' biçiminde bir oligonükleotid için sadece C ile sonlanan fragmanlar oluşturan bir reaksiyon, dört ve yedi nükleotid uzunluğunda fragmanlar (pAATC ve pAATCGAC) meydana getirir. • Aynı oligonükleotid için G ile sonlanan fragmanlar oluşturan bir reaksiyon ise yalnızca beş nükleotidli bir fragman (pAATCG) meydana getirir.

*Restriksiyon enzimleri, bakteriyel enzimlerdir; izole edildikleri bakteriye göre isimlendirilirler. • Her enzim, 4-7 baz çifti uzunluğunda olan, palindrom diziler diye adlandırılan spesifik bir çift kollu DNA dizisini tanır ve ayrıştırır. • Bu DNA ayrışmaları, enzim tarafından uygulanan mekanizmaya bağlı olarak ya yapışkan veya zikzaklı uçlar ya da küt uçlar ile sonuçlanır*

### **3. Yüksek voltajlı jel elektroforezi**

DNA'da bulunan dört baza (A, G, C, T) uyan işaretlenmiş fragman grupları elektroforetik olarak yan yana ayrıldıklarında dizinin doğrudan okunabildiği bir bandlar merdiveni elde edilir ve böylece nükleotid dizisi tayin edilmiş olur

Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam et al.,1977).

***Ancak, zincir sonlandırma yönteminin zaman içinde iyileştirilmesiyle Maxam-Gilbert dizilemesi gözden düştü, zira teknik karmaşıklığı onun standart moleküler biyoloji kitlerinde kullanılmasına olanak vermiyordu, ayrıca zararlı kimyasallara gerek gösteriyordu ve ölçeklenmesi zordu.***

Bu yöntemin prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asitin, DNA' da bulunan bazıları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotidlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır.

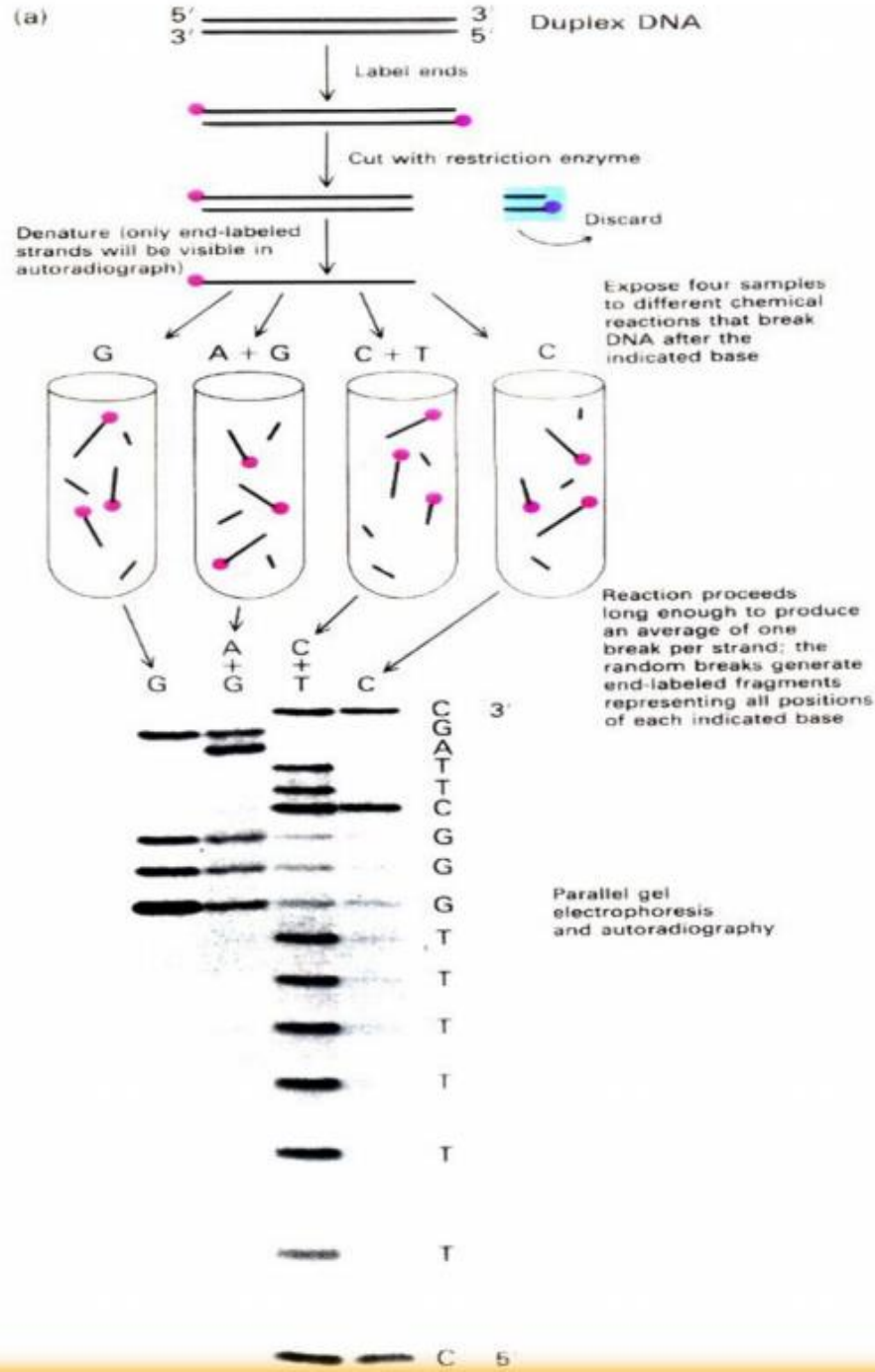
Nükleotid dizisi saptanacak olan DNA önce 5"- ucundan 32P ile ya da floresan bir boya ile işaretlenir.DNA" nın iki iplikçiği birbirinden ayrılarak ya da DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA" nın yalnızca bir ucundan işaretlenmesi sağlanır.

- İşaretleme sonrası DNA dört parçaya ayrılır.
- DNA molekülleri dört tüpe ayrılır.
- Her bir örneğe A, C, G ya da T nükleotidlerinden birini değiştirmek ve kırmak için gerekli kimyasallar eklenir.
- Genelde ilk pürin ve pürimidinlerin ayrımı, ardında bazların ayrımı şeklinde olur.
- Dimetilsülfat ile müdahale pürünlerin; hidrozin ile müdahale de pürimidinlerin arasındaki glikozit bağlarının kırılması sağlanır.
- Piperidin de fosfodiester bağlarının kırınımını katalizler

Dimetilsülfat,  
piperidine  
guanini  
bağlar

Dimetil  
sülfat,  
piperidine  
formikasıit  
guainin ve  
adenini  
bağlar

Pürin

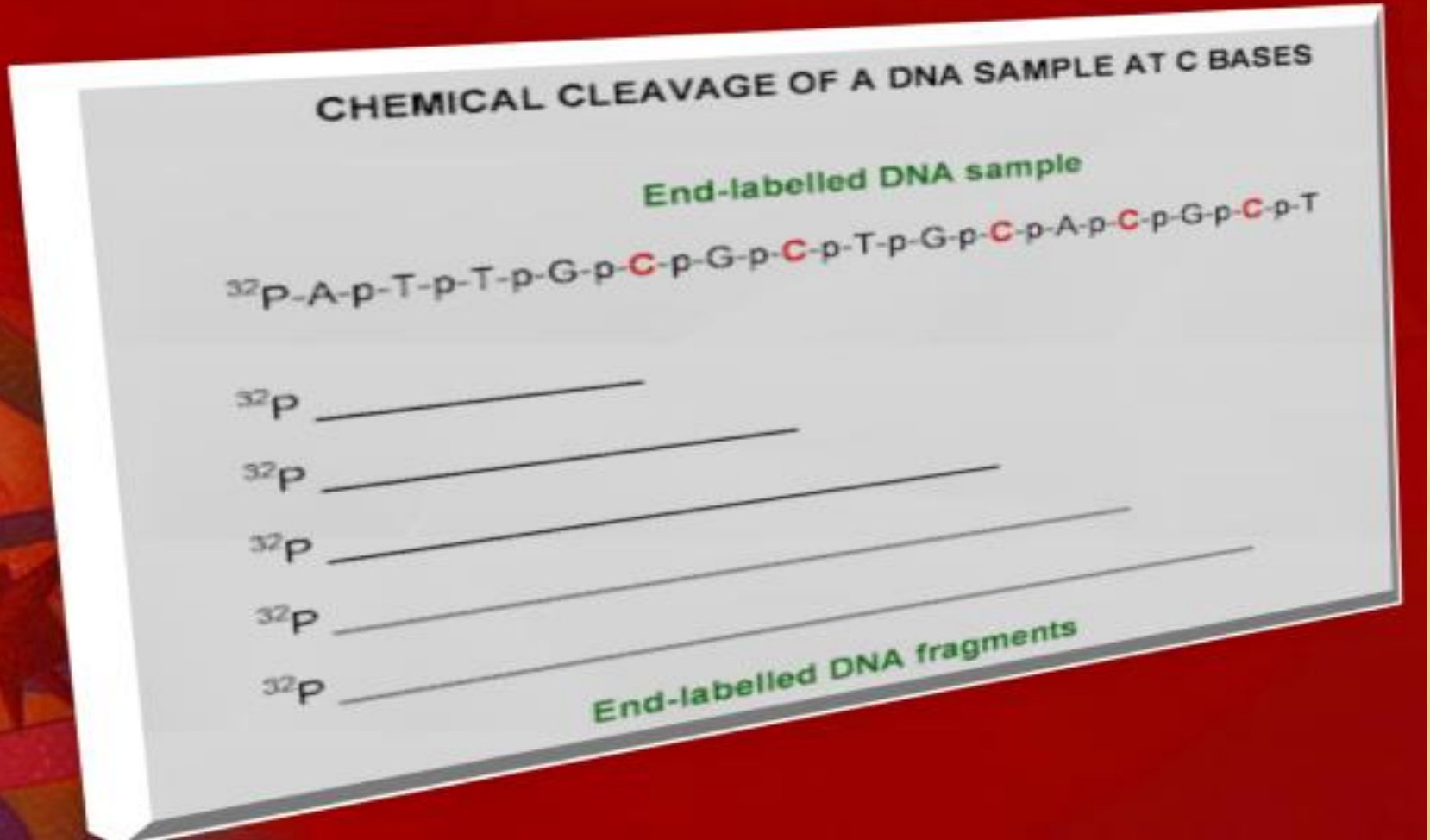


Pirimidin

Hidrozin ve  
piperidin  
birlikte  
timin ve  
sitozini  
bağlar

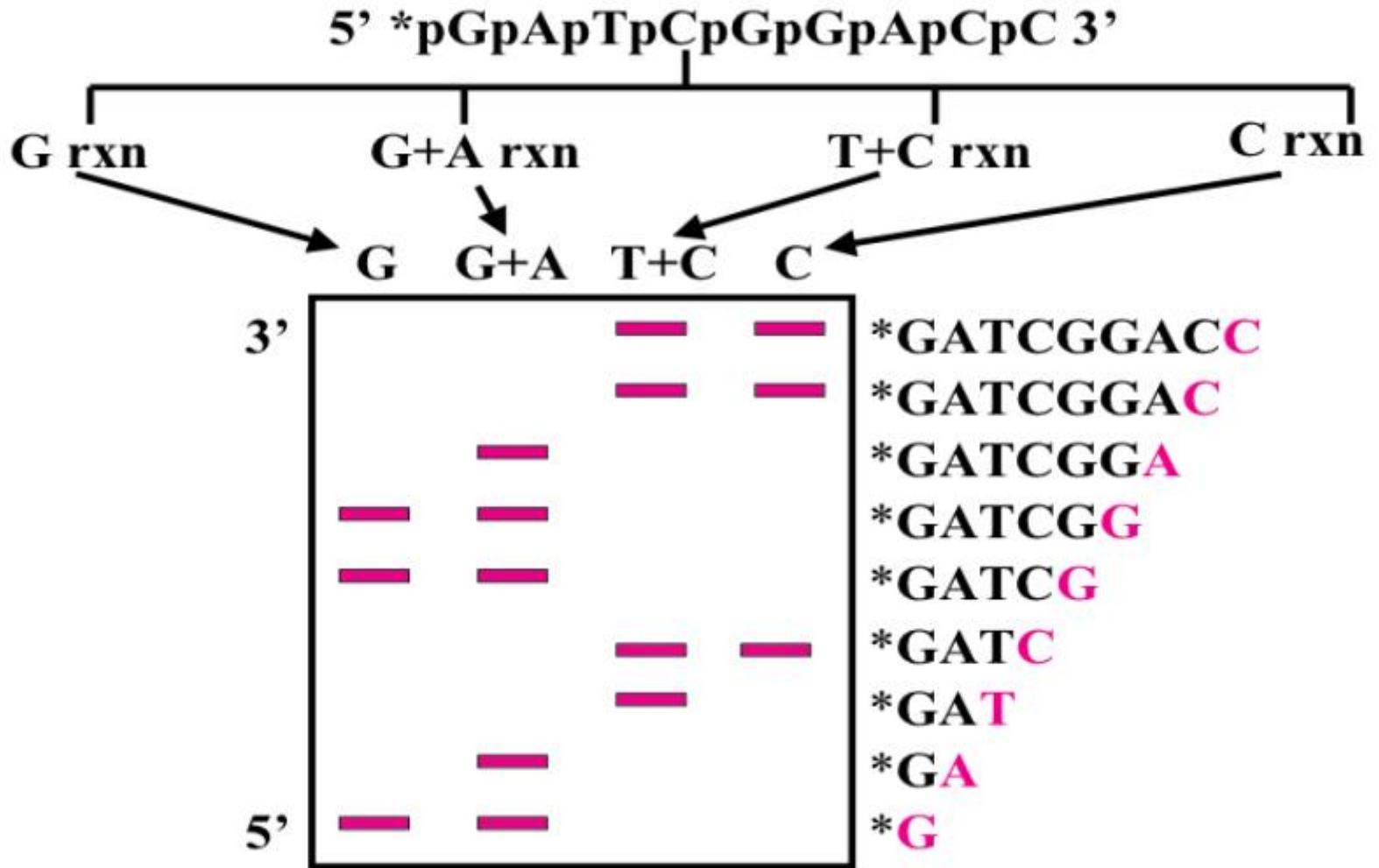
Hidrozin  
piperidin  
ve 1.5 M'lık  
NaCl  
yalnızca  
sitozini  
bağlar

Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış DNA parçaları elde edilir. • Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre hepsi 5"- pozisyonlarından işaretli ancak boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilmiş olur.





# Maxam-Gilbert sequencing



Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (Enzimatik). (Sanger et al.,1977).

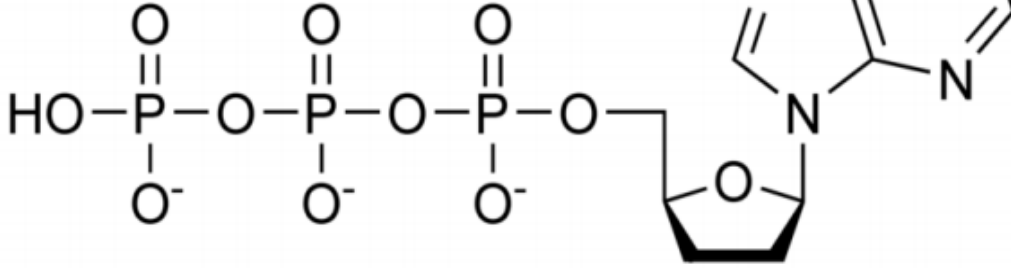
Tehlikeli kimyasallardan uzak, daha hızlı bir yöntem ve kitlere uygulanılabilirliği olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir.

Bu yöntem için:

- Tek iplikçi kalıp DNA'ya
- dNTP • ddNTP
- Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden biri
- Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır

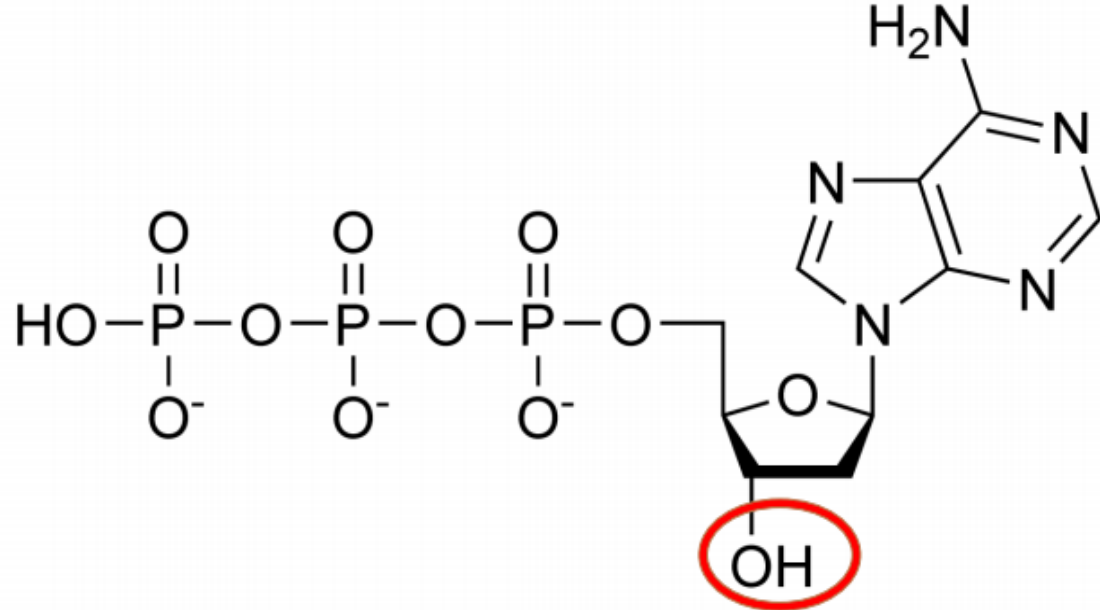
Yöntemin Temeli

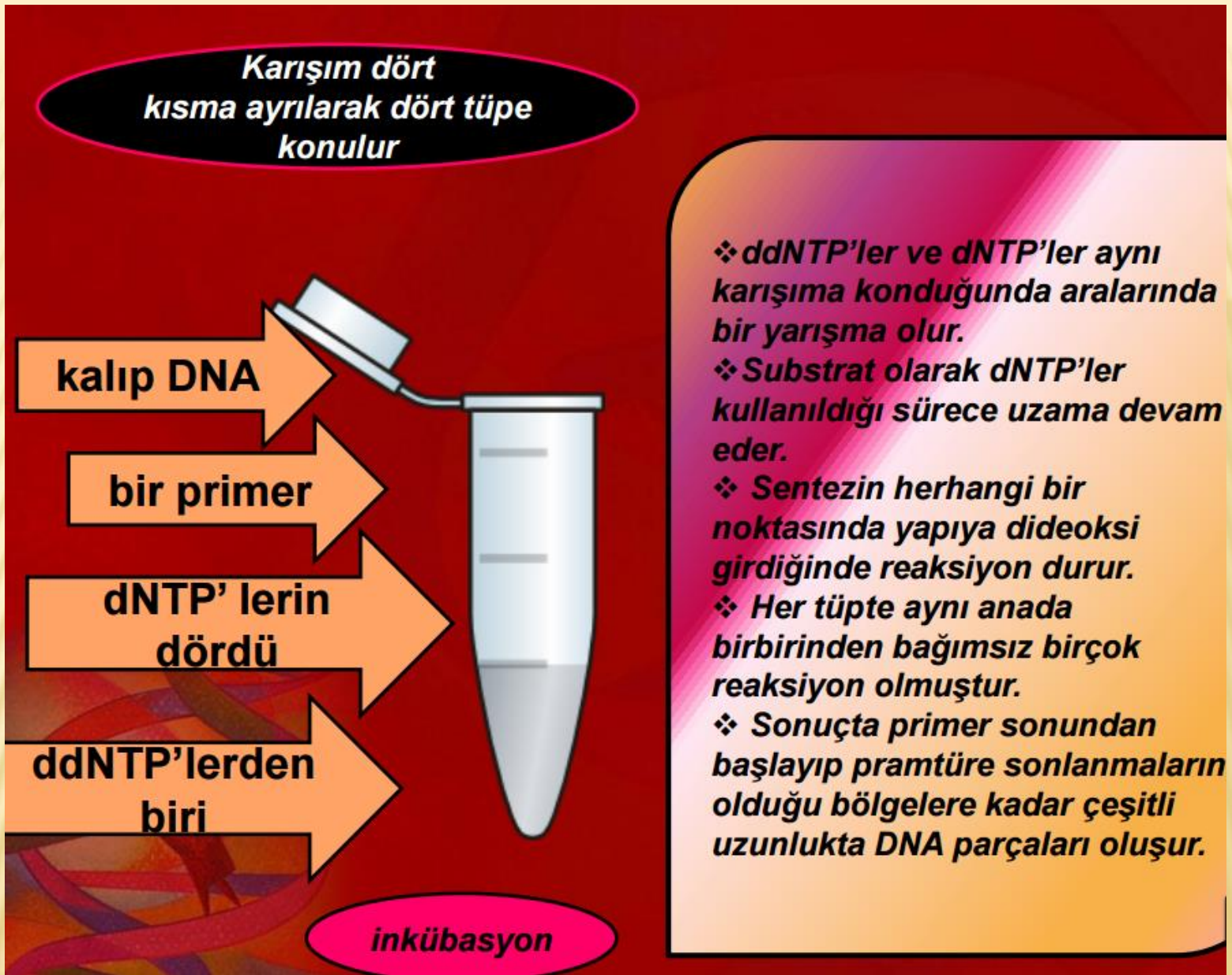
DNA polimerazın dNTP" lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3" OH grubu taşımayan ddNTP" leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır; bunlarda ribozun üçüncü C atomu deoksi halde bulunduğundan fosfodiester bağ oluşumu engellenir ve yapıya yeni nükleotit katılamadığından zincir uzaması sonlanır, bu durum Sanger yönteminin kilit noktasıdır.



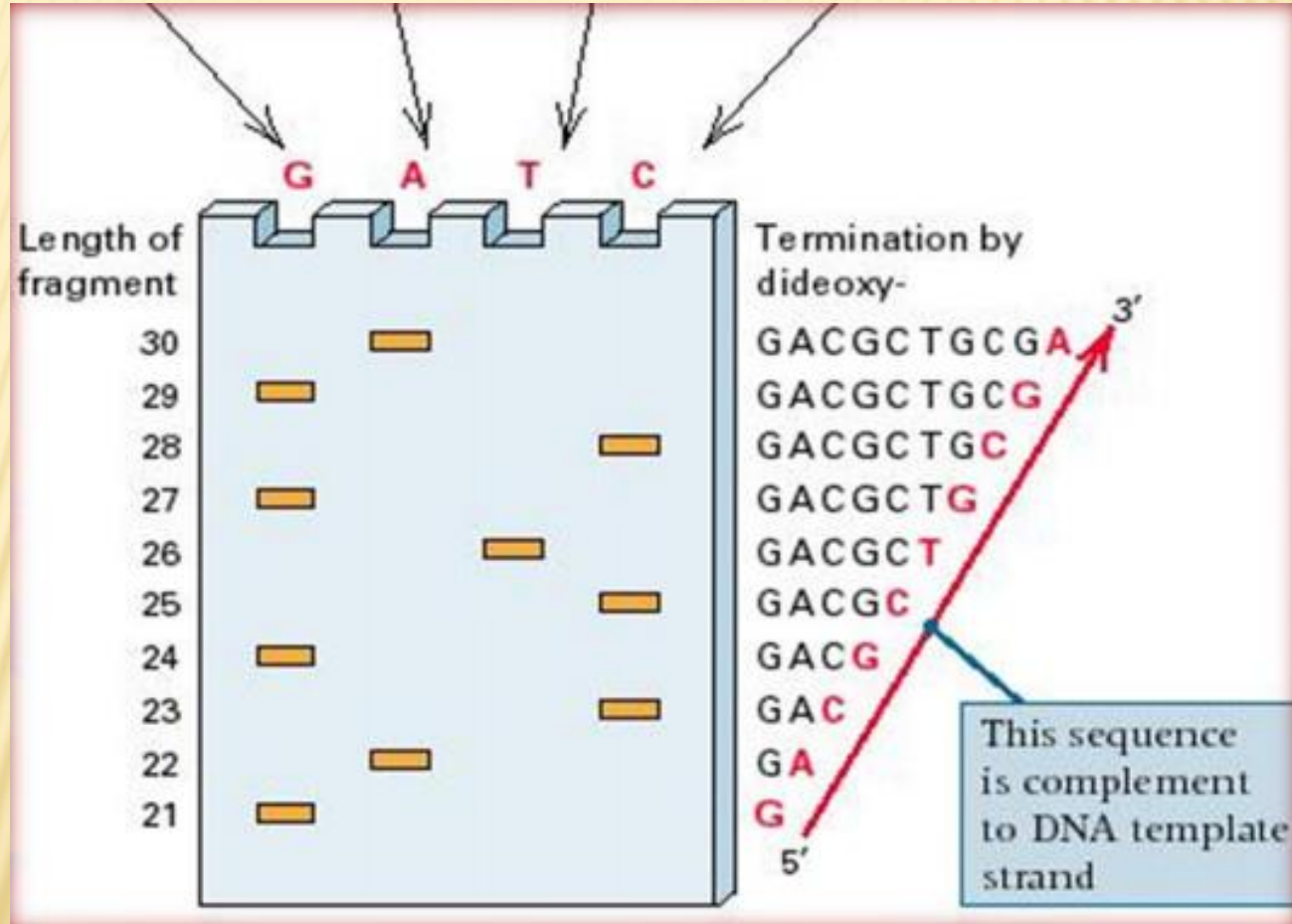
← ddATP

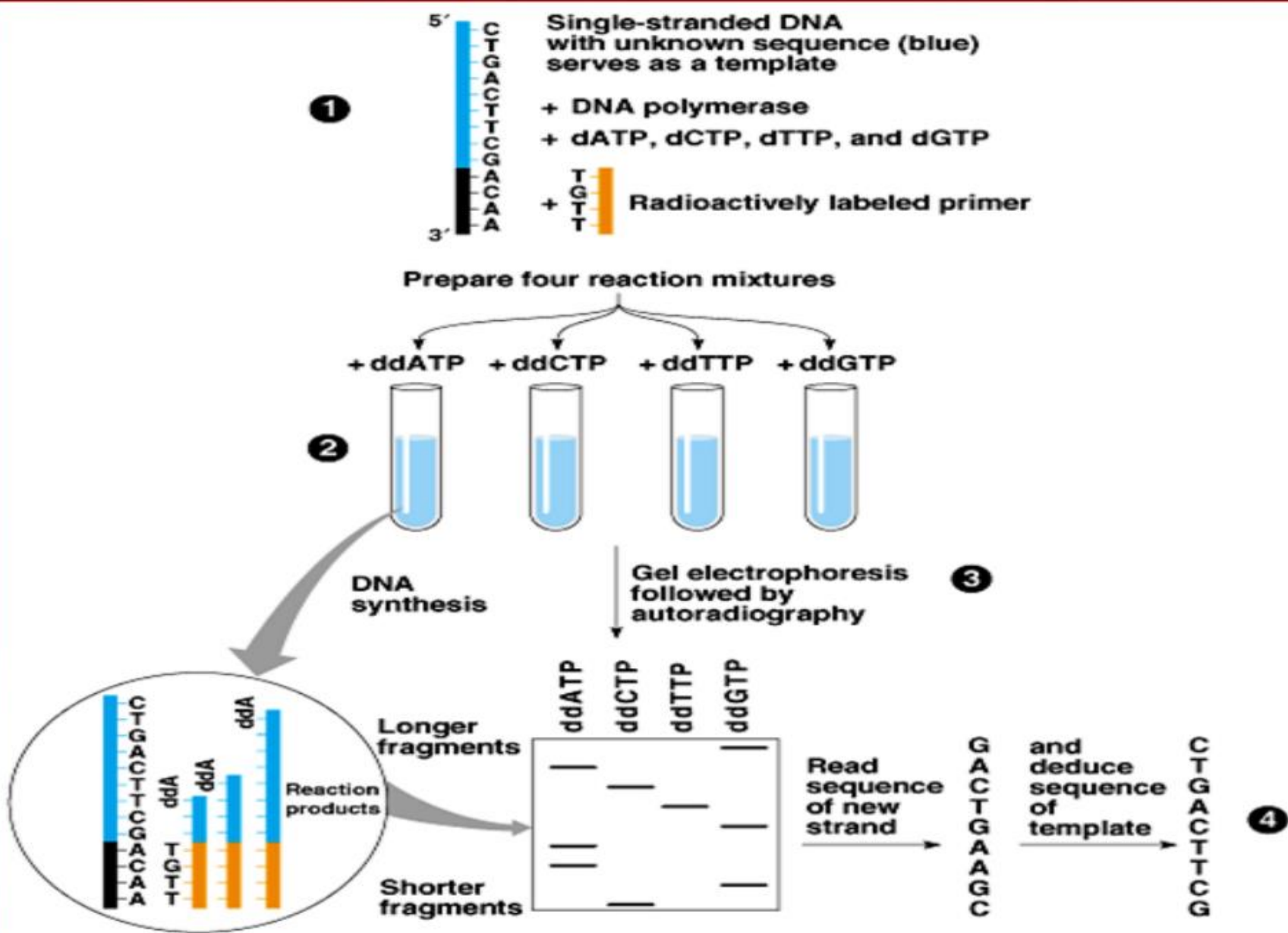
dATP →



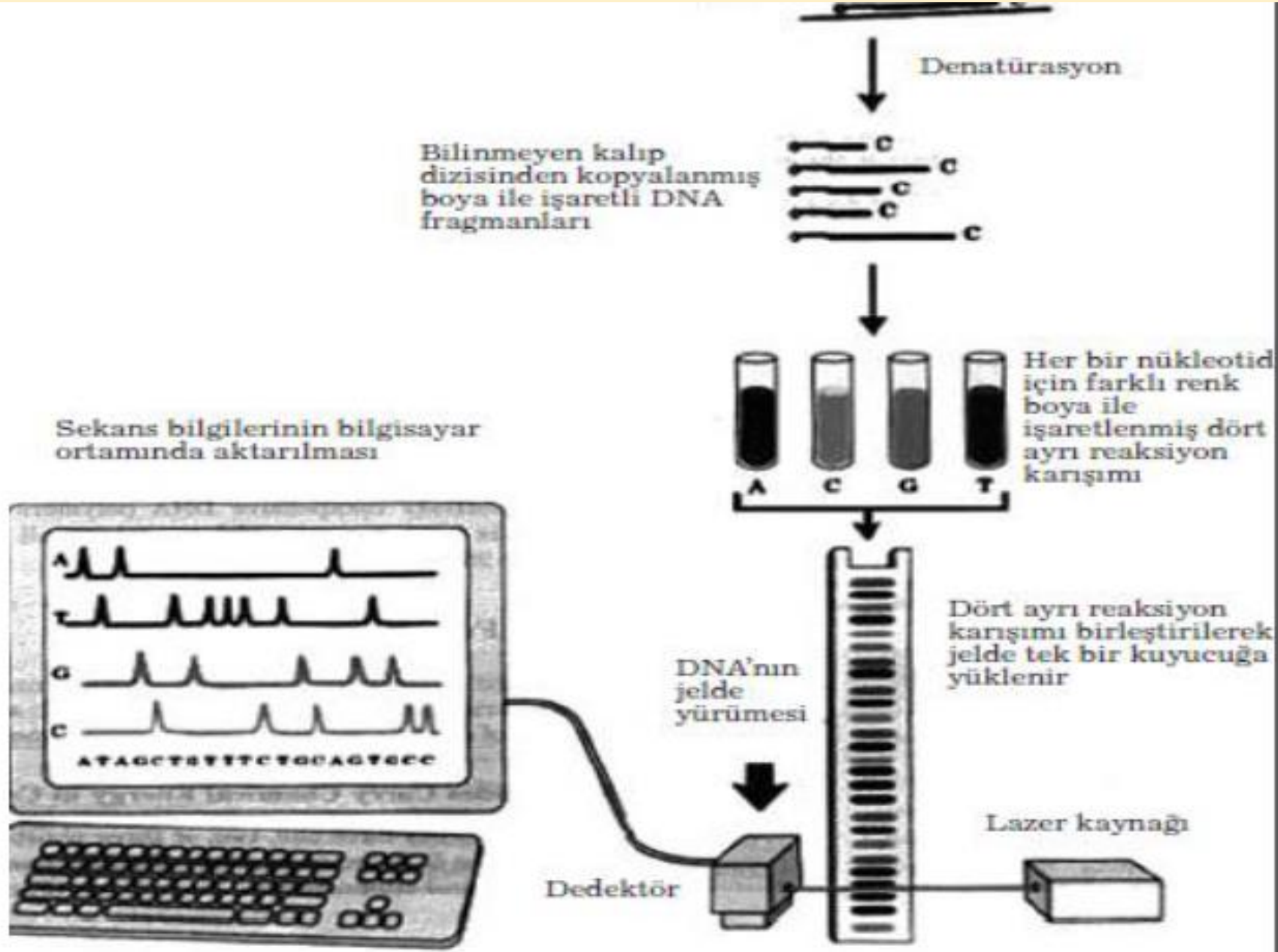


Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yürütülür. Uygulanan elektriksiz alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP" nin tipine göre okunur

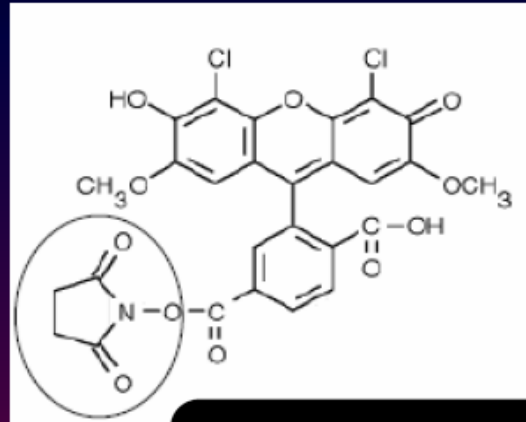




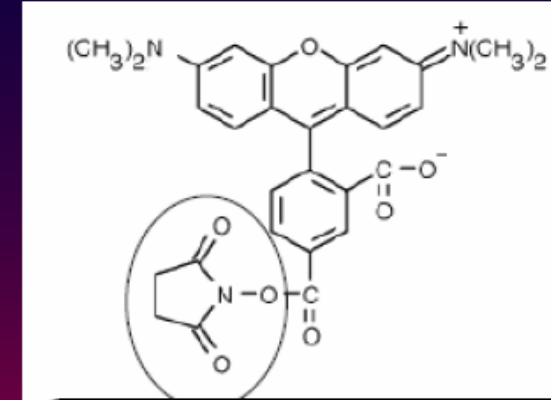
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



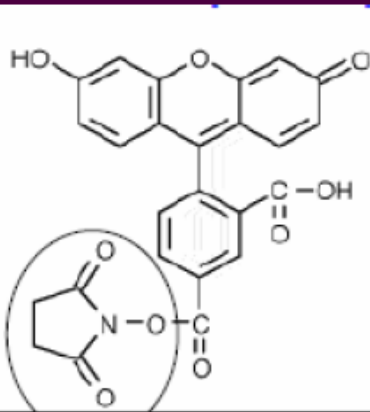
# Fluorescent Dyes Used in 4-Color Detection



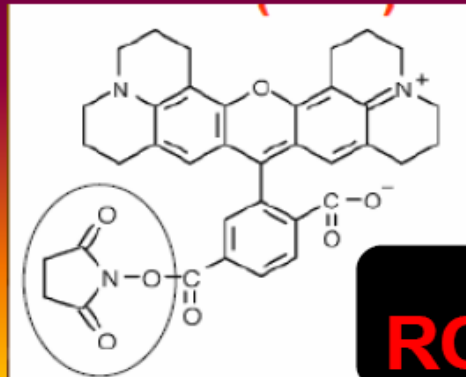
**JOE (Green)**



**TAMRA (Yellow)**

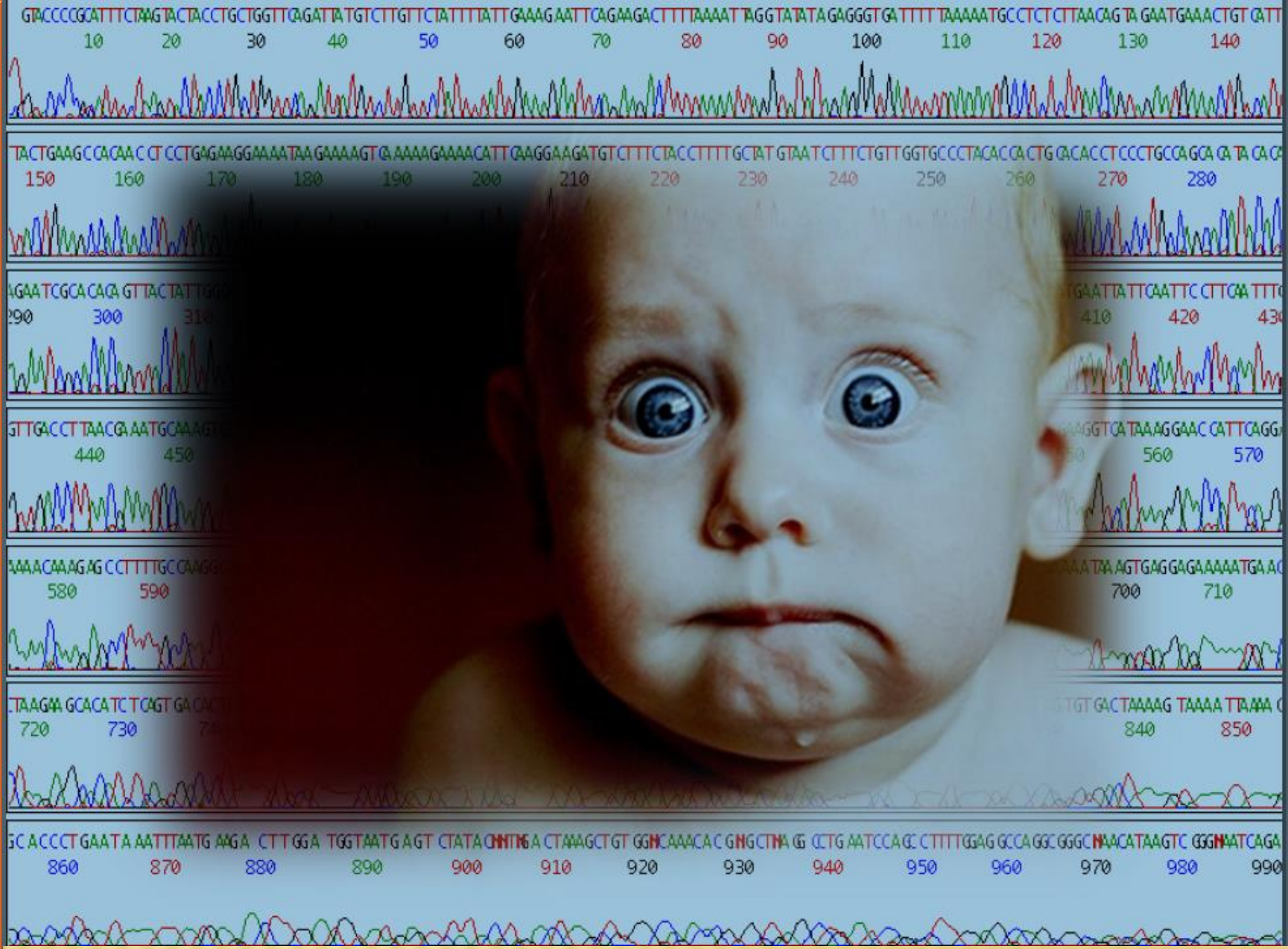


**FAM (Blue)**



**ROX (Red)**





PCR

# *In vitro* DNA Amplifikasyonu

DNA'nın çoğaltılabileceği bir teknik, 1983 de **Kary Mullis** adlı bir biyokimyacının geliştirdiği **Polimeraz Zincir Reaksiyonu**'dur. İlk kez başarılı in vitro DNA amplifikasyonu **Saiki ve ark.** Tarafından 1985 yılında gerçekleştirildi.

## PCR'nun Kullanıldığı Alanlar

PCR'nin geliştirilmesi, moleküler biyoteknolojinin ve kullanım alanının da genişlemesine yol açmıştır

- Moleküler biyoloji ve biomedikal araştırmalar
- Bakteriyel, viral, fungal ve protozoal hastalık etkenlerinin teşhisi
- Gıda, su ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısı
- Genetik bozukluklar ve kanser taramaları

- Prenetal tanı ve cinsiyet belirlenmesi
- Gen tedavisi ve DNA aşılıarı
- Adli tıp'da suçlu teşhisi
- Antropoloji

• **PCR için gerekli malzemeler:**

**1-** Hedef diziyi taşıyan kalıp DNA

(az miktarda ve ilgisiz DNA'larla kontaminasyon sorun değildir)

**2-** Kalıp DNA çift iplikleri ile eşleşebilen 2 tür

oligonükleotid primeri (15-30 bazlık ve tek iplikli)

**3-** Dört tür dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)

**4-** Termostabil DNA polimeraz enzimi (Taq, Vent)

- Bu materyaller bir tampon çözeltisi içinde karıştırılır.  
MgCl<sub>2</sub> gereklidir.
- **Thermal Cycler** adı verilen özel bir cihaz kullanılarak DNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilir.



- Her bir PCR döngüsü üç aşamada gerçekleştirilir.

## 1- Hedef DNA'nın denatürasyonu (95 °C de 5 dak.)

ds DNA' nın birkaç saniyede ısı ile ss DNA' ya ayrılmasıdır. (döngüye başlamadan 3-5 dk ön ısıtma yapılabilir)

## 2- Primerlerin bağlanması (42-52 °C de 5 dak.)

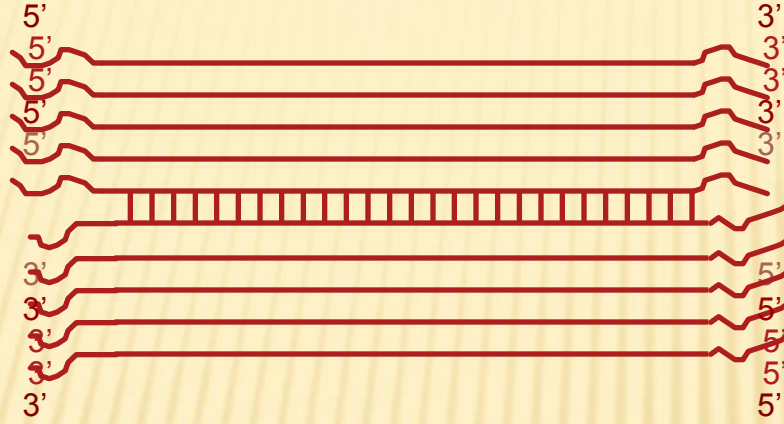
örnek 1-2dk bu ısıda tutularak primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) ss DNA' daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır.

## 3- Polimerizasyon (65-72 °C de 5 dak.)

polimeraz enzimi yardımı ile ss DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5' 3' yönde uzatılmasıdır.

- Her döngüde elde edilen yeni DNA'lar bir sonraki için kalıp görevi gördüklerinden, 25-30 döngü sonunda, DNA'nın milyonlarca kopyası elde edilir.

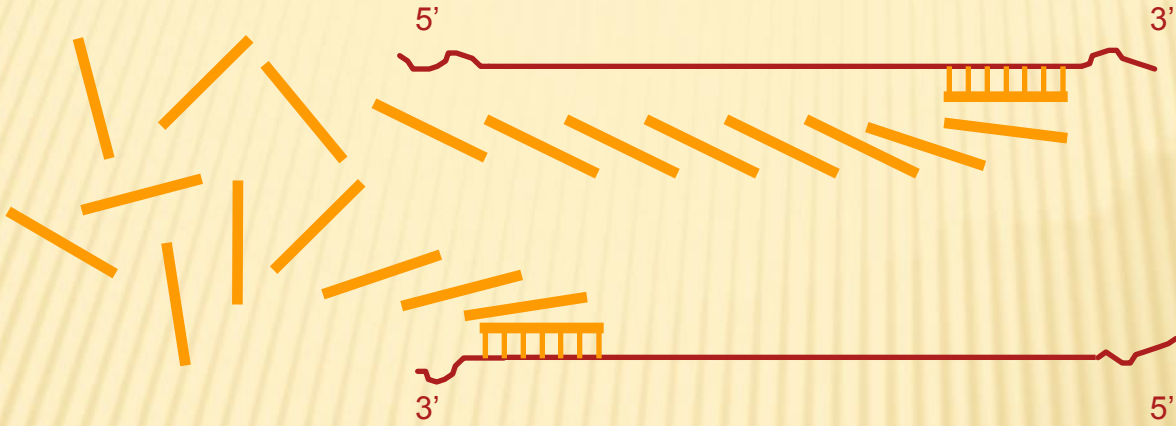
Taq DNA polimeraz optimal uzama sırasında yani 72-78 °C arasında 2000 nükleotid/dakika hızında çalışır.

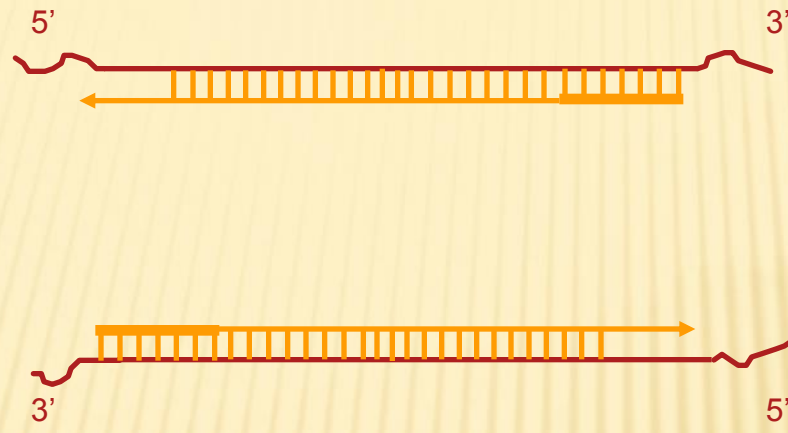


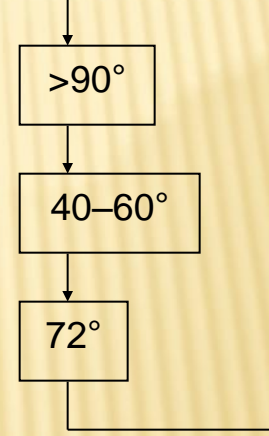
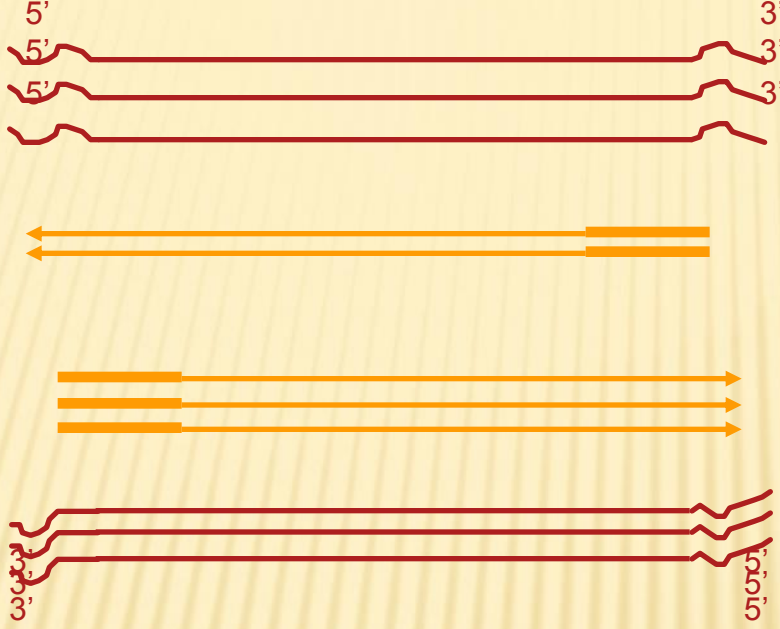
DNA

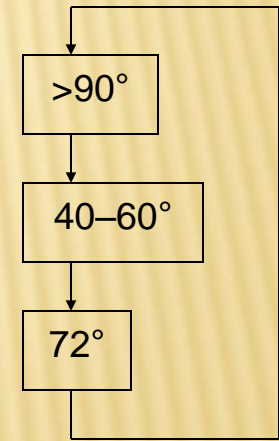
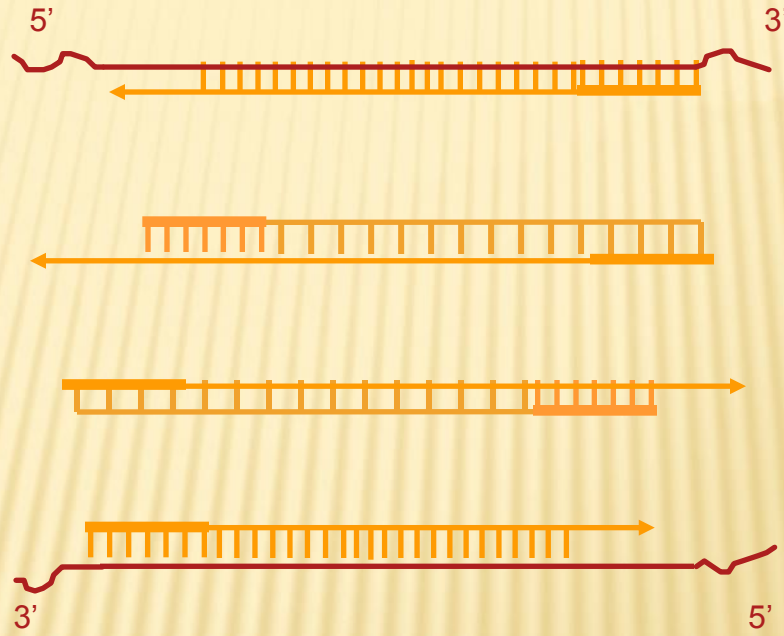
>90°

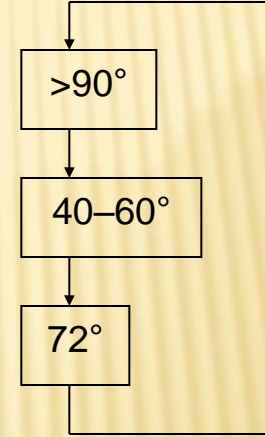




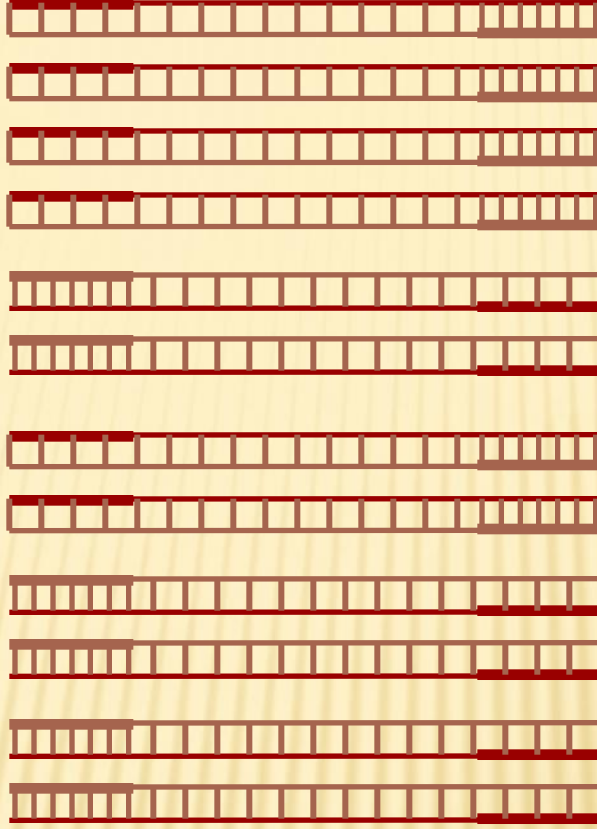


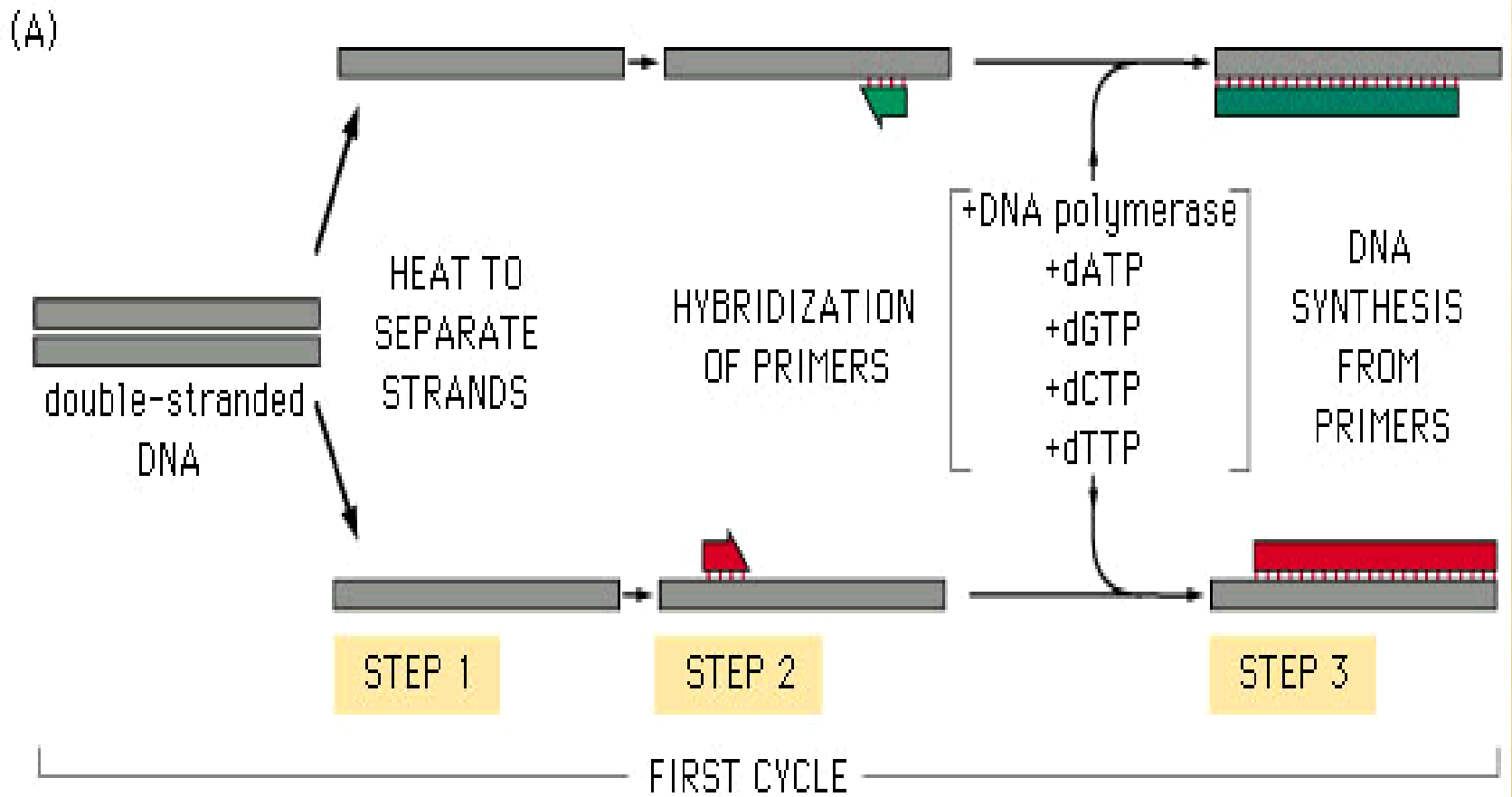




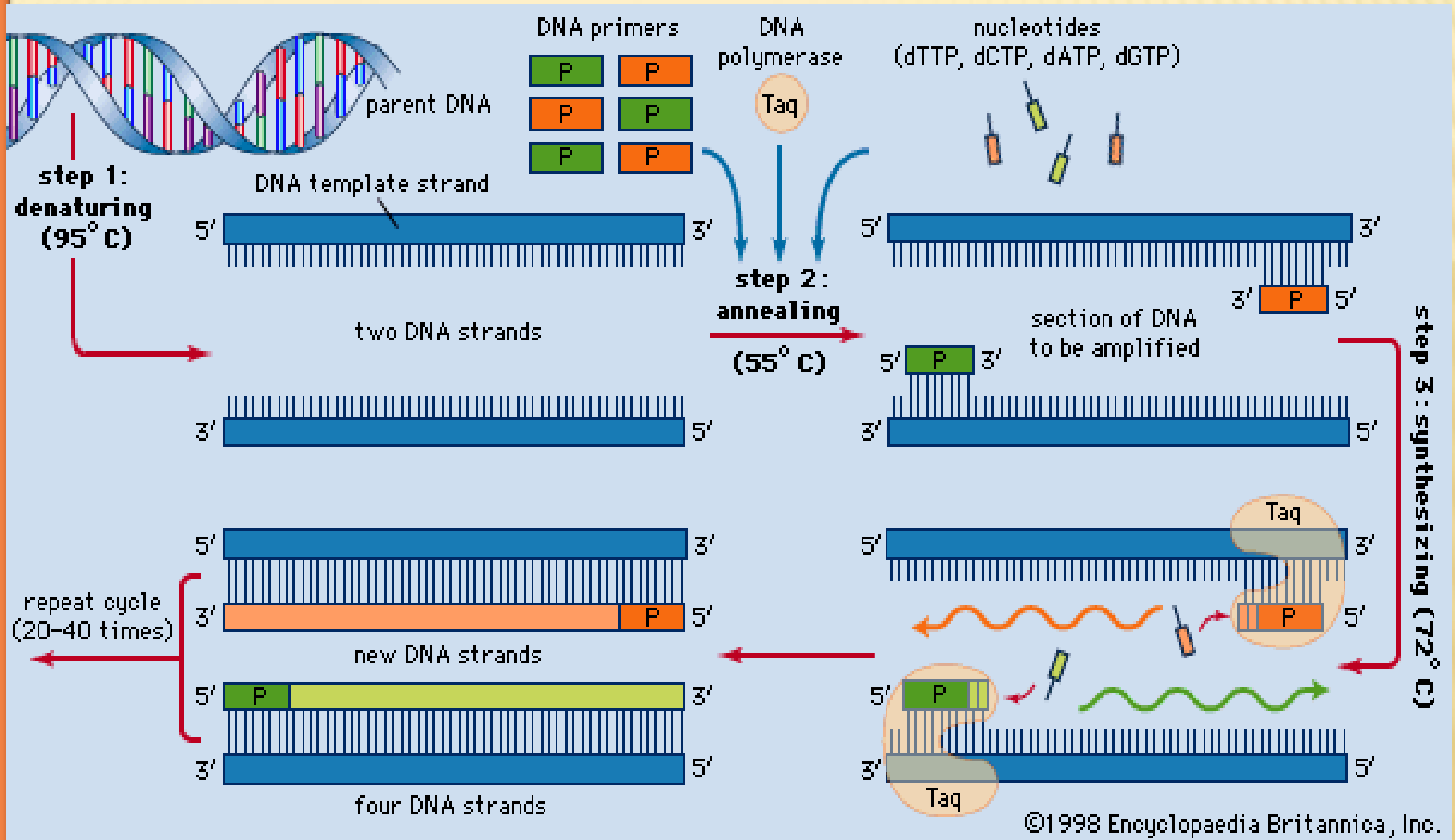


$2^n \times$





©1998 GARLAND PUBLISHING





## PCR'nun Avantajları

- Çabuk
- Duyarlı
- Yüksek özgüllüğe sahip

## PCR'nun Dezavantajları

- Pahalı
- Kros reaksiyonlar/non-spesifik DNA amplifikasyonu ⇒ Sterilite
- Yalancı pozitif/negatif değerlendirme ⇒ Deneyimli personel

# PCR ile Saptanan **Bakteriyel** Patojenler

- Bacillus anthracis
- Corynebacterium diphtheriae
- Shigella sp
- Vibrio cholerae
- Mycobacterium avium
- Mycobacterium tuberculosis

# PCR ile Saptanan **Viral** Patojenler

- Hepititis A,B,C,E,G
- İnsan papillomavirus
- HIV-I,II
- Influenza virus
- Rubella virus
- Herpes simplex virus

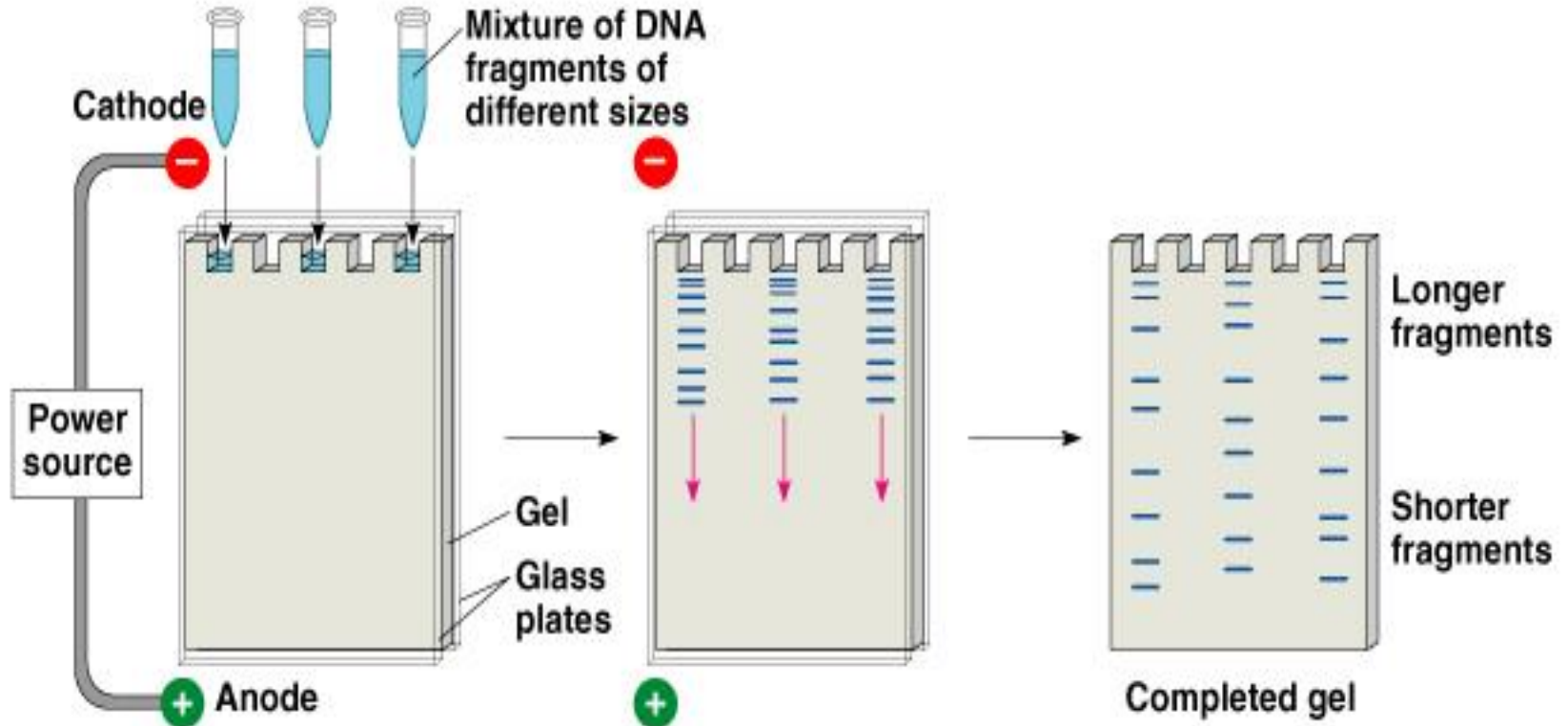
# PCR ile Saptanan **Fungal** Patojenler

- Blastomyces dermatitis
- Histoplasma capsulatum
- Candida albicans
- Pneumocystis carinii

# PCR ile Saptanan **Protozoal** Patojenler

- Plasmodium falciparum
- Leishmania sp
- Toxoplasma gondii
- Trypanosoma sp.

# PCR – ANALIZİ JEL-ELEKTROFOREZ



Gel electrophoresis of DNA

©Addison Wesley Longman, Inc.

File: Fast Exposure Time: 2.240 Seconds  
Brightness: 0 DR: Dual  
06/2012 Time: 09:22:02  
e: C:\Documents and Settings\Sadık Dinçer\Belgelerim\tetb-tet-e-1.tif





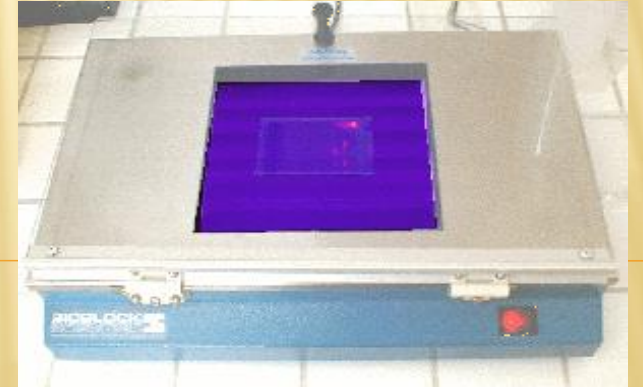
Thermal Cycler



Elektroforez



3-4  
SAAT



Ürünlerin değerlendirilmesi  
(Agaroz jel)

UV translüminatör

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü





Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Çukurova Üniversitesi



Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü