



## Derleme Makalesi / Review Article

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Günümüz Polimer Zincir Reaksiyon Teknolojisi The Polymerase Chain Reaction and Today's Polymer Chain Reaction Technology

Aslıhan Çoban<sup>1</sup>, Aylin Sepici Dinçel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

#### Öz

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), rekombinant DNA teknolojisi ile birlikte gelişen, moleküler biyoloji ve genetik alanında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile, genetik materyal çok az sayıda veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa dahi çoğaltılabilir. Homojen bir DNA materyali haline getirebilir ve kolayca tanımlanabilir. Polimeraz zincir uygulamaları virüsler, bakteriler, bazı mantar türleri, insanda, hayvanda ve bitkilerde patojenite durumlarında başarılı sonuçlar vermektedir. Rutin olarak uygulanan polimeraz zincir reaksiyonları çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar; Gerçek zamanlı PZR, Ters transkriptaz PZR, Nested PZR, Multipleks PZR ve Kantitatif PZR'dir.


**Anahtar Kelimeler:** Polimeraz zincir reaksiyonu, Dijital droplet PZR, Uygulamalar


#### Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technique that has been developed with recombinant DNA technology and is frequently used in the field of molecular biology and genetics. This technique can be replicated even if the genetic material is between very few or unrelated DNAs. It can make it into a homogeneous DNA material and can be easily identified. Polymerase chain applications give successful results in cases of viruses, bacteria, some fungus species, pathogenicity in humans, animals and plants. There are routinely applied types of polymerase chain reaction. These; Real-Time PCR, Reverse transcription, Nested PCR, Multiplex PCR and Quantitative PCR.

**Keywords:** Polymerase chain reaction, Digital droplet PCR, Application

#### İletişim adresi/Address for Correspondence:

Aslıhan Çoban  <https://orcid.org/0000-0001-6229-6319>

Aylin Sepici Dinçel  <https://orcid.org/0000-0001-5847-0556>  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye  
Tel: +90312 2026949

**E-mail:** [asepicidincel@gmail.com](mailto:asepicidincel@gmail.com)

Geliş tarihi/Received:15 Eylül 2019. Kabul tarihi/Accepted: 15 Aralık 2019. Çevrimiçi yayın tarihi/Published online: 30 Aralık 2019

## GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyalin özgül kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımı ile, enzimatik olarak sayısal çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Bu, hedef genetik materyal çok az sayıda veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa dahi çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca tanımlanabilir<sup>1,2</sup>.

PZR işlemi canlı hücrelerde sürekli meydana gelmektedir. Canlı hücreler içindeki polimerizasyon işlemi, PZR tüpleri içinde, gerekli tüm kimyasal maddeler konularak ve sıcaklık parametreleri uygulanarak laboratuvar ortamında taklit edilmektedir. Canlı bir hücrede DNA replikasyonu gerçekleşirken substrat, kalıp DNA, primer ve enzimler kullanılmaktadır. Substrat olarak dört deoksitriphosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ortamda bulunmalıdır. Tek zincirli DNA kalıp olarak kullanılır. DNA çift sarmalı birbirinden ayrılınca, her bir zincir yeni sentezlenecek zincir için kalıp görevi görebilir. Yeni sentezlenen sarmallar kalıp sarmala uygun olarak sentezlenir. Böylece yeni oluşan çift sarmallarda bir yeni bir de eski zincir bulunur. Bu olaya semikonservatif replikasyon adı verilmektedir. DNA replikasyonu bir primer olmadan başlayamaz. Primer, kalıp zincirin yaklaşık ilk 10 nükleotidine uygun olarak sentezlenen RNA parçasıdır. DNA helikaz, DNA primaz, DNA polimerazlar, DNA topoizomeraz, DNA ligaz replikasyon aşamasında görev yapan enzimlerden bazılarıdır<sup>2,3</sup>.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, ilk olarak 1985'de Kary Mullis tarafından bulunmuştur. 1993'de Kary Mullis bu buluşu ile nobel ödülünü kazanmıştır. Kary Mullis *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq DNA polimeraz kullanarak ilk polimeraz zincir tepkimesini başlatmıştır<sup>3</sup>.

Polimeraz zincir reaksiyonu hedefli stratejiler ile İnsan Genom Projesi gibi kapsamlı araştırmalar yürütülmüş, tıp alanında da klinisyenler ve araştırmacılar tarafından gen dizileri, hastalıkların teşhisi gibi nitel-nicel ve genomik çalışmalarda kullanılmıştır.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, *in vitro* koşullarda belirli bir DNA parçasının enzimatik olarak

kopyalanması ve çoğaltılması yöntemidir. PZR, üç temel basamaktan oluşur;

- Hedef DNA'nın denatürasyonu
- Bağlanma
- Uzama

Hedef DNA denatürasyonu işleminin amacı çoğaltılmak istenen DNA bölgesi için kalıp olarak kullanılacak tek zincirli DNA elde etmektir. Bu işlemde ısı döngüleyici içerisine konulan DNA'nın 95°C sıcaklığa kadar ısıtılarak denatüre edilmesi sağlanır<sup>2,3</sup>.

Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotit primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanır. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında 30-60 sn'de, 50-52°C sıcaklıkta ise 3-5 dakikada gerçekleşir. Uzama aşamasında ısı 72°C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Uzama basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve çoğaltılacak DNA'nın uzunluğuna göre değişmekle birlikte, genellikle 70-74°C'de 2 dakika içerisinde gerçekleşir<sup>2,3</sup>.

Polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli reaktifler; kalıp DNA, dNTP karışımı, magnezyum klorür, tamponlar ve primerlerdir. Kalıp DNA olarak, arkeolojik, patolojik, histolojik materyaller, dokulardan izole edilmiş bütünlüğünü korumuş veya degrade olmuş DNA örnekleri ile RNA (cDNA elde edilir) kalıp olarak kullanılabilir. dNTP karışımı ise uzama aşamasında nükleotit kaynağı olarak kullanılır. Deoksiribonükleozit trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. *Taq* DNA polimeraz, düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla beraber, normal koşullarda PZR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. PZR'de kullanılan magnezyum primer/kalıp etkileşimini sağlamaktadır<sup>3</sup>.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri

Polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PZR metotları geliştirilmiştir.

Bunlar;

1. Gerçek Zamanlı PZR (real time (RT)-PCR)
2. Kantitatif PZR (qPCR)
3. Ters Transkriptaz PZR
4. Nested PZR
5. Multipleks PZR

**Gerçek Zamanlı PZR**'nin standart PZR'den farkı, başlangıç DNA miktarının hesaplanabilmesidir. Bu metot ile DNA çoğaltılması, artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirilip kantitatif sonuçlar elde edilir.

**Ters Transkriptaz PZR** ise RNA moleküllerinden komplementer DNA (cDNA) sentezini, retrovirüslerden izole edilen ters (revers) transkriptaz enzimi ile gerçekleştirilmesidir. Hassas ve hızlı bir yöntemdir. cDNA sentezlendikten sonra DNA-RNA sarmalı ayrılır, ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılır.

**Nested PZR metodu** birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu ile karakterizedir. İlk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılır ve uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilir. İkinci amplifikasyonda ise ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç kısmına bağlanan iki iç primer kullanılarak kısa bölgenin de çoğaltılması gerçekleştirilir.

**Multipleks PZR (mPZR)** metotunda ise kalıp DNA üzerinde birden fazla bölge için çoklu primer çifti tasarımı gerçekleştirilir. Sonuç itibarıyla aynı örnek üzerinde çoklu bölgenin çoğaltılmasına imkan sağlar. Net, hızlı ve güvenilir bir metottur<sup>3-4</sup>.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulama Alanları

PZR teknoloji bakteriyoloji, viroloji, mikoloji, genetik hastalıklar, parazitoloji gibi alanlarda çok sık olarak kullanılan bir analiz metotudur<sup>4</sup>.

**Bakteriyoloji:** Tanıda süreyi kısaltmak ve kültürü yapılamayan bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonları tanımlama, antibiyotik almış hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma, bakterilerin toksikojenik suşlarının ayırılması, invaziv olmayan metotlar kullanarak erken tanı koyma, antimikrobiyal direncin saptanması ve tiplendirilmesi amacıyla PZR teknolojisi sıklıkla kullanılmaktadır.

**Viroloji:** Özellikle HIV, Hepatiti B ve C, *Herpes simplex* virus (HSV), *Parvovirus* B19 enfeksiyonlarının tanısı, *Papillomavirus*'lerin ve *Influenza* virüs A,B,C'nin tiplendirilmesi ve tanısı, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Cytomegalovirus*, *Rubella*, *Parainfluenza*, *Norwalk* virüs gibi birçok virusun oluşturduğu enfeksiyonların tanısında PZR yaygın olarak kullanılmaktadır.

**Mikoloji:** *Cryptococcus neoformas*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis*, *Pneumocystis carini*, *Candida albicans*, *Coccoides immitis* tanısında PZR yaygın olarak kullanılmaktadır.

**Genetik Hastalıklar:** Hemofili, kistik fibrozis, muskuler distrofi, genetik hastalıkların doğum öncesi tespitinde; kısıtlayıcı enzim parça uzunluk çeşitliliği (RFLP) ve PZR uygulamaları ile birlikte genetik hastalıkların teşhisinde başarılı sonuçlar vermiştir.

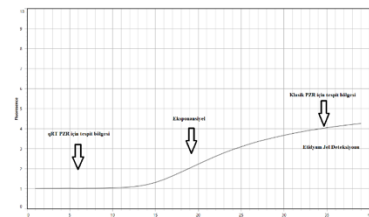
**Parazitoloji:** Parazitoloji ve alt dallarında; tanı tedavinin takibi ve epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak PZR kullanılmaktadır. Protozoonlardan *leishmania* 'lar, *trypanosoma* 'lar, *toxoplasma*, *entamoeba*, *giardia* cinsleri ile *trematodlar*, *sestodlar* ve *nematod*'ların teşhis ve tür ayırımının yapılmasında kullanılmaktadır.<sup>4</sup>

### Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Metodu

Gerçek zamanlı kantitatif PZR, nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. Bu teknoloji kinetik PZR veya homojen PZR isimleriyle de ifade edilmektedir.

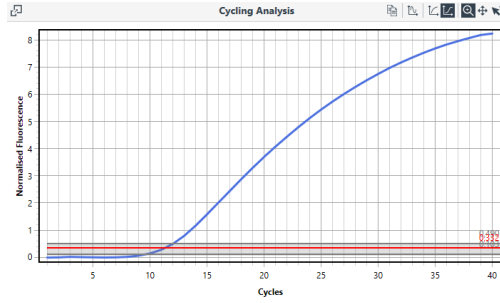
Gerçek zamanlı (real-time PZR de oluşan ürün miktarı tepkime boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir.

Gerçek zamanlı PZR ile geleneksel PZR arasında birçok belirgin fark vardır. Gerçek zamanlı PZR'de ürünün çoğalması erken evrelerde saptanabilir ve ürün artışındaki (eş zamanlı olarak) 2 kat gibi küçük ifade farklılıkları belirlenebilirken geleneksel PZR'de ancak (tepkime sonunda) agaroz jel elektroforezi ile 10 kat ve üzeri büyük ifade farklılıkları belirlenebilir (Şekil 1)<sup>5</sup>.

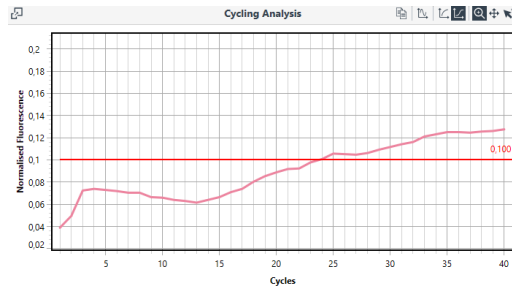


**Şekil 1.** Kantitatif ve Klasik PZR metotunda tespit bölgeleri

$C_t$  (eşik döngüsü, treshold cycle) ya da  $C_p$  (crossing point) değeri, floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü ( $C_t$ ,  $C_p$ ) denir.  $C_t$  değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı fark etmeye başladığı ve PZR ürününün log-linear fazda eksponensiyel olarak artmaya başladığı zamandır (Şekil 2). 40 döngünün üzerindeki bir  $C_t$  değeri çoğalma olarak adlandırılmaz ve hesaplara katılamaz (Şekil 3)<sup>5</sup>.



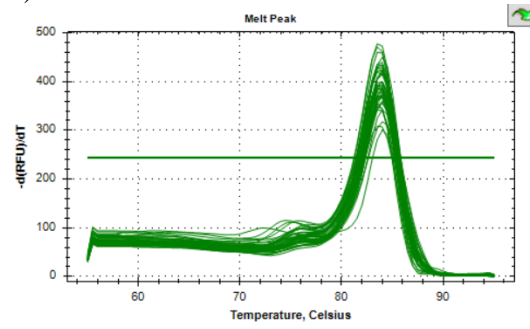
Şekil 2. Kantitatif PZR'de, PZR ürününün eksponensiyel olarak artması



Şekil 3. Kantitatif PZR ölçümünde floresan değerlerinin eşik değeri geçmemesi

### Erime Sıcaklığı Eğrileri

Bir primer seti ya da prob seti için bütün PZR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir. Kontaminasyon, özgül olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler. Eş zamanlı PZR ile ürünleri agaroz jelde yürütmeden, erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak özgül olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür (Şekil 4)<sup>5</sup>.



Şekil 4. Erime sıcaklığı grafiği

### Primer Tasarımı

Primerler özgül ve yüksek verimli olmalıdır. Primer dimeri olmamalıdır. DNA kontaminasyonunu bertaraf edebilecek primerler (ekson-ekson bağlantı bölgelerinden ya da araya büyük bir intron ekleyerek) tasarlanmalıdır<sup>5</sup>.

### Verimlilik Hesaplaması

Verimlilik hesaplaması;

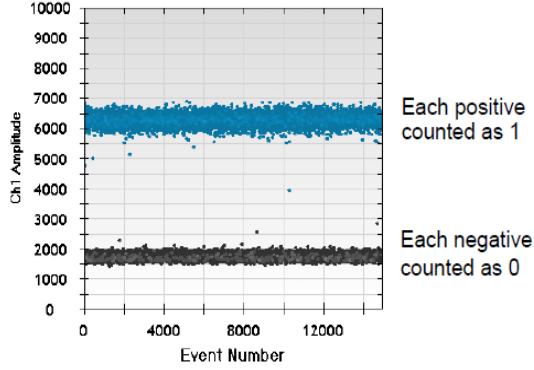
$Eff = 10^{(-1/E_{gim})} - 1$  şeklinde yapılmaktadır. Bir PZR çoğalmasının verimi; %90 - %100 ( $-3.1 < E_{gim} < 3.6$ ) arasında olmalıdır<sup>5</sup>.

### Dijital Droplet Polimeraz Zincir Reaksiyonu Metodu

Droplet dijital PZR (ddPZR) standart bir eğriye ihtiyaç duymadan nükleik asitlerin mutlak kantitatif ölçümüne olanak sağlamaktadır. Bu teknik 20.000 ve hatta çok daha küçük droplet adı verilen tepkime kapları içinde nükleik asitlerin porsiyonlanması temeline dayanır<sup>6</sup>. Dijital PZR bir numunedeki nükleik asitlerin, kesin olarak miktarının saptanmasını sağlamaktadır. ddPZR uygulaması için pratik ve ölçeklendirilebilen teknolojilerin eksikliği bu güçlü tekniğin yaygın olarak benimsenmesini engellemektedir. Burada yüksek verimli damlacık dijital PZR sistemi 96 kuyulu bir plaka ile geleneksel TaqMan problemleri kullanılarak ~2 milyon PZR tepkimesi işlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca, örneğin uygun bir şekilde seyreltilmesi genellikle tepkime bölümü başına sadece bir hedef molekülün incelenmesini garanti etmektedir. Dijital PZR üç aşamada gerçekleşmektedir. Analiz edilmek istenen DNA ürünü öncelikle otomatik droplet oluşturucu cihazına yüklenir. Bu cihazda yağ damlacıkları ve örnek bir araya gelerek dropletlerin oluşturulması sağlanmaktadır. Sonrasında oluşan dropletler klasik PZR cihazı kullanılarak çoğaltılması sağlanır. PZR sonrası örnekler son olarak Droplet okuyucuya yüklenir ve sonuçlar elde edilmiş olur<sup>6</sup>.

Standart bir PZR daha sonra her bir droplet hedefini çoğaltmak için kullanılabilir, böylelikle ayrı ayrı pozitif ve negatif şekilde hedef bağımlı floresan sinyali ölçülebilecektir. "1" olan sinyal pozitif, "0" olan sinyal negatif olmak üzere ikili kod tekniği dijital kısmını

temsil eder ve veriler Poisson dağılımına uygun olarak hesaplanabilmektedir. Bu da standart eğriye gerek kalmadan herhangi bir örnekten DNA kopya sayılarının doğrudan ve basit bir şekilde hesaplanmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 5)<sup>6</sup>.



Şekil 5. Örnek Dijital PZR Sonucu<sup>8</sup>

Dijital PZR, qPCR'a kıyasla daha yüksek hassasiyet gösteren PZR bazlı mutlak ölçüm tekniğidir. Bugüne kadar yapılan kanser ve viral enfeksiyonlar üzerindeki çeşitli çalışmalar dPCR'nin qPCR'a göre duyarlılığının ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu avantajın asıl nedeni, tepkimelerin tek tek bölümlendirilebilmesidir. Geleneksel qPCR ile karşılaştırsak ddPCR daha düşük saptama limitlerine ve daha büyük dinamik aralığa sahiptir<sup>6,7</sup>. Dijital PZR teknik olarak Gerçek Zamanlı PZR'den çok daha basittir ve eşik (threshold) verilerini yorumlayabilmek için standart dilüsyon eğrilerine gerek duyulmamaktadır. Böylelikle qPCR ile tespit edilemeyen biyolojik ve translasyonel potansiyele sahip çok düşük düzeyde açıklanan genlerin varlığı ddPCR ile tespit edilebilmektedir<sup>7</sup>.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüz teknolojisi PZR uygulamalarında oldukça hızlı gelişmektedir. Bu da kullanılan metoda bağlı olarak analiz sonuçlarının doğruluğunu arttırmakta ve en hassas örnek için bile ifade edilebilir forma dönüşmektedir. Sağlık uygulamaları, adli vakalar, biyolojik tür teşhisleri, antik DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılan PZR teknolojisinin gelişmesi bu alanlarda büyük ilerlemeler kaydedilmesini sağlamaktadır. Örneğin; birçok genetik ve mikrobiyolojik hastalıkların erken tanısı gerçekleştirilebilmekte ve erken tedavi şansı yakalanabilmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında kullanımda olan moleküler teknikler tek başına bütün sorularımıza cevap verememektedir. Metotlar birbirinin tamamlayıcıları durumundadır. Dolayısı ile dPCR, kullanım alanlarında hassasiyeti yakalamak isteyenlere daha doğrulayıcı bir yaklaşım sağlayabilecektir. Ülkemizde özellikle temel bilimlerde kullanımı artmaya başlayan yeni nesil PZR cihazlarının, sağlık alanlarında da kullanımının artırılması gerekmektedir.

**Etik Onay:** Etik onay gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

**Finansal Destek:-**

**Ethical Approval:** Not applicable

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Support:** None

## KAYNAKLAR

1. Eleonora Z., Philippe N., Valérie T. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. *Adv Clin Chem*, 2015, 70:197-246. doi: 10.1016/bs.acc.2015.03.002.
2. Bartlett J., *PCR Protocols*, Humana Press, 2003, <https://doi.org/10.1385/1592593844>
3. Mullis K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Scientific American*. 1990, Apr;262(4):56-61, 64-5. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.
4. Mifflin T., Setting Up a PCR Laboratory, Department of Pathology, University of Virginia, 22908. 2007, Jul 1;2007:pdb.top14. doi: 10.1101/pdb.top14.
5. Günel T.,(2007). Quantitative Analysis of Gene Expression "Real-Time PCR", *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:763-767.
6. Bio-Rad Laboratories, Inc. QX 200 Droplet Digital PCR System (Bulletin\_6311).
7. Çarhan A. Digital PZR ve Kullanım Alanları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2016, (73:2). DOI : 10.5505/TurkHijyen.2016.48902
8. Rosaria Arvia, Mauro Sollai, Federica Pierrucci, Carmelo Urso, Daniela Massi, Krystyna Zakrzewkska. Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J Virol Methods* 2017, Aug;246:15-20. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.04.003.