



Derleme

Polimeraz Zincir reaksiyonu (PZR) İnhibitörleri

¹Dilek Kula ²Sami Gökpinar

¹Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı, 71450, Kırıkkale

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 71450, Kırıkkale

Öz bilgi/Amaç: Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) son yıllarda bilimsel çalışmalarda oldukça yoğun kullanılmaya başlanan özgül ve duyarlı bir moleküler biyolojik bir tekniktir. PZR, enzimatik bir reaksiyon olduğundan inhibitörlere karşı oldukça duyarlıdır. Bu inhibitörlerin oluşması PZR'in önemli bir dezavantajıdır. Çünkü inhibitörlerin oluşması sonuçların duyarlılığını etkileyeceği gibi, yanlış negatif sonuçlara da neden olabilmektedir. Bu derleme'nin amacı PZR çalışmalarında karşımıza çıkabilecek inhibitörler ve bunların ortadan kaldırılmaları için alınması gereken önlemler hakkında bilgi verilmesidir.

Anahtar Kelimeler: İnhibitör, Moleküler yöntemler, PZR

Polymerase chain reaction (PCR) inhibitors

Background/Aim: Polymerase chain reaction (PCR) is a specific and sensitive molecular biological technique that has been used intensively in recent years in scientific studies. PCR is highly sensitive to inhibitors since it is an enzymatic reaction. The formation of these inhibitors is a significant disadvantage of PCR. Because the formation of inhibitors can affect the sensitivity of the results, as well as cause false negative results. The purpose of this review is to give information about the inhibitors that can be anticipated in the intended PCR studies and the precautions that should be taken to remove them.

Key Words: Inhibitor, Molecular methods, PCR

Correspondence to: Sami Gökpinar, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Yahşihan, Kırıkkale e-posta: samigokpinar@hotmail.com

1. Giriş

Hedef nükleik asit zincirlerinin spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak *in vitro* olarak çoğalmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), oldukça güvenilir bir tekniktir (Erlich ve ark, 1991). Teknik ilk defa Saiki ve ark. (1985) tarafından hemoglobinopatilerin tanısında kullanılmıştır. Teknik şüpheli hastalık materyallerindeki mevcut nükleik asit parçacıklarının sayısının artırılması ya da amplifikasyonu temeline dayanmaktadır. PZR'nin genetik ve enfeksiyöz hastalıklar ile kanser vakalarının teşhisinde de kullanılabileceği bildirilmiştir (Yetilmez, 2010).

2. PZR inhibitörleri

Polimeraz zincir reaksiyonu enzimatik bir reaksiyon olduğundan inhibitör maddelere karşı duyarlıdır. PZR inhibitörlerinin oluşumu tekniğin büyük bir dezavantajıdır. PZR inhibitörleri, numuneden kaynaklanabileceği gibi, örneklerin işlenmesi veya nükleik asit ekstraksiyonu sırasında da reaksiyona eklenebilir. PZR'nin kısmen veya tamamen inhibe olması, sırasıyla yöntemin hassasiyetinin azalması veya yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. PZR, mikroorganizmaların ve genetik belirteçlerinin saptanması ve tanımlanması için standart yöntem olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yöntem, analiz edilen numunede bulunabilen ve tahlilin duyarlılığını etkileyebilecek veya yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek maddeler tarafından inhibe edilebilir (Schrader ve ark, 2012).

PZR inhibitörleri farklı özelliklere ve etki mekanizmalarına sahip çeşitli maddeler grubudur. Bunlardan bazıları çoğunlukla belirli spesifik örneklerde bulunur. Bu nedenle PZR öncesi nükleik asitlerin hazırlanması için matris-spesifik protokoller gerektirir. PZR inhibitörleri çok heterojen kimyasal maddeler grubudur. Belirli bir matris, birçok farklı inhibitör madde içerebilir ve aynı inhibitörler birçok farklı matriste bulunabilir. PZR inhibitörleri, çözünen veya katı olabilen organik ve inorganik maddelerdir. Bilinen inhibitörlerin çoğu organik maddelerdir. Bu maddeler proteinazlar ve miyoglobin, hemoglobin, laktoferrin, hafifletilmiş immunoglobulin (IgG) ve kollajen gibi proteinlerin yanı sıra, safra tuzları, üre, fenol, etanol, polisakaritler, sodyum dodesil sülfat (SDS), humik asitler, tannik asit ve melanindir. Kalsiyum ise PZR üzerinde inhibitör etkisi olan inorganik bir maddedir (Rossen ve ark, 1992, Radström ve ark, 2004). Organik veya inorganik madde olmasının yanı sıra bileşiğin konsantrasyonu da inhibitör etki açısından önemlidir.

PZR inhibitörleri çeşitli biyolojik materyallerde, çevresel numunelerde ve gıdada bulunabilir. Buna ek olarak, inhibitör maddeler, taşıma, örnek işleme veya nükleik asit ekstraksiyonu sırasında istem dışı bir şekilde ilave edilebilir (Schrader ve ark, 2012). Dışardan ilave edilen maddelere örnek olarak fazla miktardaki KCl, NaCl ve diğer tuzları, sodyum deoksikolat, sarkosil ve SDS (Weyant ve ark, 1990), etanol ve izopropanol (Bessetti 2007) ve fenol (Katcher ve Schwartz, 1994) verilebilir.

PZR inhibitörleri etkilerini genellikle DNA ile doğrudan etkileşim göstererek veya termostabil DNA polimerazlara müdahale ederek gösterirler. Etkinlerin DNA'ya doğrudan bağlanması amplifikasyonu önleyebilmekte ve inhibitör madde ile DNA'nın birlikte saflaştırılmasını kolaylaştırabilmektedir. İnhibitörler maddeler, doğrudan DNA polimeraz ile etkileşime girerek enzim aktivitesini bloke edebilirler. DNA polimerazlar magnezyum gibi inhibisyon hedefi olabilecek kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Mg²⁺'yi indirgeyebilen veya DNA polimerazın Mg²⁺'yi bağlamasına müdahale eden ajanlar PZR'yi engelleyebilir (Bessetti, 2007).

2.1. İşlenen Numunelerdeki İnhibitörler

2.1.1. Kan, serum ve plazmadaki inhibitör maddeler

Kan, serum veya plazma örneklerindeki inhibitör maddeler IgG, hemoglobin ve laktoferrindir (Al-Soud ve ark, 2000, Al-Soud ve Radström, 2001). Heparin gibi antikoagülanlar da PZR'yi inhibe edebilir (Costafreda ve ark, 2006). Bu inhibitörlerin birçoğunun, reaksiyonun enzimlerini değil doğrudan RNA'yı etkilediği düşünülmektedir. RNA serumdan ekstrakte edildiğinde solüsyondaki inhibitörlerin varlığının RT-PZR ile viral RNA'nın amplifikasyonuna ciddi bir engel oluşturabileceği bildirilmektedir (Konet ve ark, 2000). Hormonlar ya da asiklovir gibi antiviral maddeler de amplifikasyonu etkileyebilmektedir (Burkardt, 2000). Kanda bulunan ve yukarıda ifade edilen inhibitörlerin yanısıra proteaz aktivitesi de PZR etkinliğinin azalmasına yol açabilir (Kermekchiev ve ark, 2009).

Heparin'in inhibitör etkisi DNA ile arasındaki etkileşime dayanmakta ve buna Mg'nin aracılık ettiği düşünülmektedir. Heparin geleneksel fenol-kloroform ekstraksiyonunda DNA ile birlikte işlem görür. İnhibisyonun, tekrar eden etanol presipitasyonu, kaynatma ve pH değişikliklerini takiben jel filtrasyon ile tersine çevrilmemesi, heparin ile DNA arasında bir benzerlik olduğunu göstermektedir. Bu nedenle heparin inhibisyonunun hedef nükleik asitlerle rekabet etme yeteneğine bağlı olabileceği düşünülmektedir (Al-Soud ve Radström, 2000).

Kanın PZR üzerindeki inhibe edici etkisi henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak bu durumun öncelikli olarak DNA polimerazın inaktivasyonu ve/veya hedef DNA ve primerlerin tutulması veya parçalanması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Kermekchiev ve ark, 2009). Kandaki PZR inhibitörlerinin başlıca etkileri Taq DNA polimerazın inaktivasyonu ve inhibisyonu ile ilişkilidir. Taq DNA polimeraz ve Ampli Taq Gold gibi yaygın olarak kullanılan DNA polimerazları insan tam kanının %0.2'sinden daha az olduğunda tamamen inhibe edilebilir. Bununla birlikte Tth, Tf1, Hot Tub ve Pwo gibi bazı Taq dışı DNA polimerazları daha yüksek kan konsantrasyonlarına direnç gösterebilir (Kermekchiev ve ark, 2009).

Immunoglobulin G'nin tek sarmallı DNA ile etkileşime girerek PZR'yi inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, ısıtma işleminin bu etkileşimi arttırdığı tespit edilmiştir. Ig G'nin farklı spesifik klonları test edilmiş ve bunun sonucunda, tek sarmallı hedef DNA'nın etkileşimi yoluyla amplifikasyonun bloke edilmesinde Ig G'lerin genel bir etkisi olduğu bulunmuştur. Bu nedenle kan numuneleri hazırlanırken kaynatma ve hot-start PZR protokolleri kullanılmamalıdır (Radström ve ark, 2004).

2.1.2. Doku örneklerindeki inhibitör maddeler

Kas dokusundan PZR ile küçük seviyedeki nükleik asitlerin saptanması çeşitli nedenlerle zordur. Nükleik asitler zayıf üretim veya bozulma ya da değişkenlik düzeyinin yüksek olması nedeniyle çok az miktarda saptanabilir. Örneğin; bazı sitokin mRNA'ları için zayıf üretim ve belirgin değişkenlik bildirilmiştir. Doku inhibitörleri Taq polimerazın kısmen ya da tamamen inhibisyonunu sağlayarak yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır. İskelet kas dokuları geleneksel nükleik asit ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilen PZR inhibitörlerini içerir. İskelet kasları yapısında heme molekülünü içeren yüksek konsantrasyonda miyoglobin kapsar. Bu maddenin *Thermus aquaticus* DNA polimeraz inhibitörü olarak görev aldığı ve bunun da kas dokusuna bağlı PZR inhibisyonuna karıştığı belirlenmiştir. Bu nedenle kas dokusundan PZR işlemi yapılacağı zaman Taq polimeraz yerine *Thermus thermophilus* DNA polimerazın kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Bu enzim, kas dokusuna bağlı PZR inhibisyonunu önlemektedir (Belec ve ark, 1998).

2.1.3. Dışkı örneklerindeki inhibitör maddeler

Dışkı PZR inhibitörleri açısından oldukça zengin bir materyaldir. Dışkı ve fekal numuneler, beslenme, bağırsak florası, yaşam biçimi ve hastanın çevre koşullarına bağlı olarak oldukça değişken bileşenleri içerir (Oikarinen ve ark, 2009). Otlar ve sebzelerden kaynaklanan polisakkaritler veya klorofil, yağlar, selüloz, glikojen, safra tuzları, üre glikolipidleri, hemoglobin ve heparin, bakteri hücresi bileşenleri, hedef olmayan nükleik asitler ve ağır metaller dışkıda bulunabilen inhibitör maddelerdir (Lantz ve ark, 1997, Monteiro ve ark, 1997, Oikarinen ve ark, 2009, Pontiroli ve ark, 2011).

Dışkıda PZR uygulamasında, kullanılacak DNA ekstraksiyonu yöntemi ve PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması oldukça önemlidir (Yılmaz, 2004). Dışkıdan DNA ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler önerilmekte olup, bu yöntemlerin hemen hepsi zor ve zaman alıcıdır. Bu yöntemlerin hemen hepsinde fenol gibi yüksek toksisite gösteren kimyasallar kullanılmaktadır (Oikarinen ve ark, 2009). Dışkı filtrasyon yöntemi, polipropilen membran ile dışkının süzülmesi, immunmanyetik ayırma gibi yöntemler inhibitörlerin uzaklaştırılması için kullanılan yöntemlerdir. Biyokimyasal saflaştırma, dışkıdan DNA ekstraksiyonu için kullanılan başka bir yöntemdir (Yılmaz, 2004).

2.1.4. Toprak örneklerindeki inhibitör maddeler

Tarımsal amaçlar, enfeksiyöz hastalıkların kontrolü ve biyoterörizm ile ilişkili patojen testleri, topraktaki mikroorganizmaların hassas PZR ile tespitini gerektirmektedir. Humik asit, toprak örneklerinde bulunduğu bilinen en güçlü PZR inhibitörüdür. Toprakta yapılan direkt total DNA ekstraksiyonu sırasında bu madde de ekstrakte edilebilir. Taq DNA polimeraz tipik olarak bir PZR reaksiyonunda 1 ng'dan daha düşük humik asit varlığında inhibe edilir (Kermekchiev ve ark, 2009).

Toprak örneklerindeki diğer inhibe edici bileşenler fulvik asit, polisakkaritler ve metal iyonlarıdır. Bu maddeler yanında yüksek moleküler ağırlıklı PZR inhibitörü de tespit edilmiştir. Bu inhibitör, proteinler ile kompleks oluşturur ve Taq DNA polimeraz ile etkileşime girerek PZR'yi inhibe edebilir. Bazı durumlarda PZR'ye sığır serum albumininin eklenmesi inhibe edici etkiyi hafifçe azaltabilir (Kermekchiev ve ark, 2009).

Toprak numuneleri ile ilgili genel problem toprak kaynağına bağlı olarak inhibitör konsantrasyonlarında yüksek varyasyona bağlı tutarsız verilerdir. Bu gerçek, PZR öncesi örneklerin işlenmesi için standart DNA saflaştırma protokollerinin gelişimini önemli ölçüde zorlaştırmaktadır (Kermekchiev ve ark, 2009).

2.1.5. İdrar örneklerindeki inhibitör maddeler

İdrar numunelerindeki en kritik bileşen üre olup, polimerazın bozulmasına yol açabilir (Wilson, 1997). Bununla birlikte etki, numunedeki üre konsantrasyonuna bağlıdır ve yaklaşık 50 mmol konsantrasyonda başlar (Khan ve ark, 1991). PZR reaksiyonunun iyon içeriğini değiştiren tuz kristalleri idrarda bulunan muhtemel inhibitör maddelerdendir (Hedman ve Radström, 2013). Mutlu ve ark, (2013) idrar örneklerinde %1.1 oranında inhibitör madde tespit ettiklerini ve inhibitör madde tespit edilen idrar örneklerinin çalışmalarda göz önüne alınmaması gerektiğini ifade etmişlerdir.

2.1.6. Safra örneklerindeki inhibitör maddeler

Safra örneklerinde bulunan en önemli inhibitör faktörler safra asitleri ve bunların karşılık gelen tuzlarıdır. Bununla birlikte, etkili çoğaltma, bu maddelere duyarlı olmayan bir polimeraz kullanılarak başarılabilir (Al-Soud ve ark, 2005).

3. PZR aşamaları sırasında devreye giren inhibitör maddeler

PZR inhibitörleri örnek işleme sırasında veya nükleik asit ekstraksiyonu sırasında numuneye eklenebilir. Bunlar eldiven tozları (Demeke ve Jenkins, 2010), sodyum klorid ya da potasyum klorid gibi değişik tuzlar, deterjan ya da EDTA, etanol, fenol gibi organik moleküllerdir (Katcher ve Schwartz, 1994, Burkardt, 2000, Peist ve ark, 2001, Demeke ve Jenkins, 2010). Bu maddelerden bazıları etkili hücre lizisi veya saf nükleik asit elde edilmesi için gerekli olmakla birlikte, bazı konsantrasyonlarda PZR inhibisyonuna da neden olabilmektedir. İyonik deterjanlar PZR üzerinde önemli derecede inhibitör etki gösterirken, non-iyonik deterjanlar sadece nispeten yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında PZR inhibisyonuna neden olmaktadır. DNA'nın korunması için ekstraksiyon kitlerinin yıkama solüsyonlarının bazılarında bulunan EDTA, belirli konsantrasyonlarda Mg iyonlarını tüketerek, DNA polimeraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Ditiotreitol, dimetil sülfoksit veya merkaptetanol gibi PZR karışımının katkı maddeleri belirli konsantrasyonlarda inhibitör etki gösterebilir (Schrader ve ark, 2012).

UV ile ışınlanmış plastik tüpler ve polimer yüzeylerin, PZR kimyasallarıyla temas ettiklerinde PZR'nin duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (Butot ve ark, 2007b, Fox ve ark, 2007, Gassilloud ve ark, 2007, Gonzalez ve ark, 2007). Tamariz ve ark, (2006) ise UV radyasyonunun herhangi bir etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir. Bu durumun kullanılan UV ışık dozajı ile ilgili olabileceği belirlenmiştir (Burgess ve Hall, 1999). Genellikle, swap malzemesinin bileşimi veya taşıma ortamı da PZR duyarlılığını etkileyebilir (Wadowsky ve ark, 1994).

4. PZR İnhibitörlerinin Etki Mekanizmaları

PZR inhibitörleri, hücre lizis basamağını engellemeleri, nükleik asitleri degrade ederek veya tutarak, ısıya dirençli DNA polimerazı inaktive ederek PZR üzerinde etkili olmaktadır (Wilson, 1997). İnhibitör maddeler, PZR reaksiyonunun farklı aşamalarını etkileyebilmektedir. Genellikle, birkaç PZR bileşeni, özellikle de DNA, numunenin işlenmesi, ekstraksiyon veya PZR sırasında polimer yüzeylere, örneğin kapların ve reaksiyon tüplerinin duvarına adsorbe edilebilir (Butot ve ark, 2007b, Fox ve ark, 2007, Gassilloud ve ark, 2007, Gonzalez ve ark, 2007). Numunenin işlenmesi ve nükleik asit ekstraksiyonu etkilenir. Nükleazlar RNA veya DNA kalıbını bozabilir. Fenoller oksitleyici koşullar altında RNA'yı çapraz bağlayabilir ve böylece RNA izolasyonunu engeller (Su ve Gibor, 1988). Buna ek olarak, polisakkaritlerin varlığı, çöktürülmüş RNA'yı yeniden süspanse etme kapasitesini düşürebilir (Sipahioğlu ve ark, 2006). Ters transkripsiyon, örneğin enzimin melanin ile doğrudan etkileşimi engellenebilir (Eckhart ve ark, 2000). PZR şablonu olarak kullanılan DNA, nükleazlar ve diğer maddeler tarafından modifiye edilebilir veya parçalanabilir.

DNA polimerazını doğrudan veya dolaylı olarak hedefleyen birçok PZR inhibitörü bulunmaktadır. Reaksiyonda bulunan proteazlar veya deterjanlar, bu enzimi parçalayabilir (Powell ve ark, 1994). Örneğin üre (Wilson, 1997) ve fenol'ün (Katcher ve Schwartz, 1994) DNA polimerazını bozduğu bilinmektedir. Kalsiyum, kollajen, hematin ve tannik asit polimeraz aktivitesini inhibe edebilir (Opel ve ark, 2010). Melanin DNA polimeraz ile tersine çevrilebilir bir kompleks oluşturur (Eckhart ve ark, 2000) ve polisakkaritler, nükleik asit yapısını taklit ederek enzimatik işlemi bozar (Peist ve ark, 2001). Humik asitler şablon DNA ve polimeraz ile etkileşime girer, böylece düşük konsantrasyonlarda bile enzimatik reaksiyonu engeller (Sutlovic ve ark, 2005). Diğer maddeler polimerazın kofaktörleri ile reaksiyona girer. Yüksek konsantrasyonda kalsiyum, magnezyum ile tannik asit ve tükenmiş magnezyum gibi kompleks yapıcı ajanlar yerine

DNA polimeraz ile rekabetçi bir bağlanmaya yol açabilir. Her iki olayda da, magnezyum artık polimeraz için bir kofaktör değildir ve aktivitesi azalmıştır (Opel ve ark, 2010).

5. PZR İnhibitörlerinin Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

İnhibitör maddelerin etkileri numune işleme ve nükleik asit ekstraksiyonu sırasında uygun bir yöntem kullanmak, daha sağlam bir DNA polimerazının seçilmesi veya özel PZR katkılarının kullanılmasıyla azaltılabilir (Al-Soud ve Radström, 2001). Örneğin, guanidinyum tiyosülfat ekstraksiyonu, farklı numunelerdeki matrislerden gelen inhibitörleri diğer metotlardan daha etkili şekilde kaldırabilir (Shieh ve ark, 1995, Hale ve ark, 1996). İnhibitör lipidlerin çıkarılması için bir fenol-kloroform ekstraksiyonunun kullanılması veya üratlar gibi inhibe edici tuzları ortadan kaldırmak için aktive karbon eklenmesi etkili olabilecek diğer metotlardır (Wiedbrauk ve ark, 1995, Abolmaaty ve ark, 2007, Chaturvedi ve ark, 2008). Bu yöntemlerin bazı çalışmalarında jel filtreleme, proteinaz K ile muamele veya ısı işleminden daha başarılı olduğu rapor edilmesine rağmen (Huppertz ve ark, 1993, Bergallo ve ark, 2006), bazı çalışmalar fenol-kloroform ekstraksiyon yönteminin PZR inhibitörlerinin tamamen uzaklaştırılmasında yeterli olmadığını göstermektedir (Pachner ve Delaney, 1993).

Tuzlar, küçük proteinler, seminal sıvı veya dışkı numunelerinden polisakkaritlerin çıkarılması için sefakril S-400, sefadex G-200, chelex veya santrimonyum bromür kullanılarak kolon kromatografisi yapılabilir (Da Silva ve ark, 1995, Schmidt ve ark, 1995, Hale ve ark, 1996, Croci ve ark, 2008). PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması için katyon değişim reçineleri de başarıyla kullanılmıştır (Jacobsen ve Rasmussen, 1992, Henson ve French, 1993). Nükleik asit izolasyonu sırasında manyetik silika boncukların kullanılmasının, geniş bir PZR inhibitör aralığını etkin bir şekilde ortadan kaldırılmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Sur ve ark, 2010).

Immuncapture metotlar, patojenin numunelerden ve uyumlu inhibitörlerden spesifik olarak ayrılmasında çok etkilidir (Widjoatmodjo ve ark, 1992, Croci ve ark, 2008). Örneğin, anti-jen yakalama PZR, deniz ürünlerinde hepatit A virüsünün hassas olarak saptanması için başarıyla kullanılmıştır (Arnal ve ark, 1999). Bununla birlikte, spesifik antikorların kullanılması nedeniyle, bu yöntem, nöroviruslar gibi oldukça değişken patojenler için geçerli değildir (Atmar ve ark, 1995). Bu durumda, nöroviruslar için hücre reseptörleri olarak önerilen insan doku-kan grubu antijenleri veya domuz gastrik müsin, virus yakalama ve daha sonra algılama için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Cannon ve Vinje, 2008, Tian ve ark, 2008).

Numunenin veya özümlenen nükleik asidin seyreltilmesi otomatik olarak PZR inhibitörlerinin seyreltilmesine neden olacaktır (Widjoatmodjo ve ark, 1992, Monteiro ve ark, 1997, Eckhart ve ark, 2000, Scipioni ve ark, 2008a,b). Ancak seyreltme neticesinde testin duyarlılığıda azalır.

Bir diğer strateji, betain, sıgır serum albümini (BSA), dimetil sülfoksit, formamid, gliserol, iyonik olmayan deterjanlar, polietilen glikol, toz süt, T4 bakteriyofaj geni 32 ürünü (gp32) ve proteinaz önleyicilerin PZR karışımına eklenmesidir (Frackman ve ark, 1998, Al-Soud ve Radström, 2000, Eckhart ve ark, 2000). Özellikle BSA ve gp32'nin demir klorür, hem, fulminik asit, humik asit, tannik asit, dışkı özleri ve melanine karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Al-Soud ve Radström, 2000, Scipioni ve ark, 2008b, Opel ve ark, 2010). Bununla birlikte, BSA safra tuzları, bilirubin, EDTA, sodyum klorid, SDS, triton X-100, kalsiyum ve kollajene karşı etkili değildir (Kreder, 1996, Opel ve ark, 2010).

DNA polimerazın ve eğer varsa, uygun revers transkripsiyon sisteminin seçimi, PZR inhibitörlerinin etkilerini ortadan kaldırmak için büyük önem taşımaktadır (Al-Soud ve Radström, 1998, Löfström ve ark, 2004). Kermekchiev ve ark, (2009), Taq DNA polimerazındaki belirgin mutasyonların, kan, plazma, hemogloblin, laktoferrin, serum, IgG, toprak özleri ve humik asitler tarafından inhibisyonun üstesinden gelebileceğini göstermiştir. Baar ve ark, (2011) kemik tozu, fosilleşmiş dışkı, kömür katranı veya kil zengini topraklar gibi çeşitli organik ve inorganik öne-yicilere karşı geniş bir direnç gösteren *Thermus* cinsinin farklı polimerazlarından oluşan bir kimerik polimeraz geliştirmiştir.

Nükleik asit arıtımı ve PZR için ticari olarak temin edilebilen kitlerin üreticileri, PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması ve PZR enzimlerinin dayanıklılığının artırılması için yukarıda belirtilen stratejilerin farklı çeşitlerini kullanmaktadır. Birçok çalışma, bu tür kitlerin performansını araştırmış (Ribao ve ark, 2004, Levesque-Sergerie ve ark, 2007, Demeke ve Jenkins, 2010), ancak etkinlik, kullanılan matrise büyük ölçüde bağlı olduğu için, genel kullanıma uygun olmadığı ifade edilmiştir.

Spesifik inhibitör sınıflarını ortadan kaldırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Çoğunlukla deniz ürünleri veya çileklerde bulunan polisakkaritler, çökelti nükleik asitlerin yeniden süspansiyonlanmasını engelleyebilir (Atmar ve ark, 1993, 1995, Butot ve ark, 2007a). Polisakkaritlerin RNA izolasyonu öncesinde çöktülmesi veya herhangi bir polisakkarit kontaminasyonu olmaksızın bir RNA izolasyon yönteminin uygulanması bu olumsuz etkileri önlemek için kullanılır (Fang ve ark, 1992). Buna Tween 20, DMSO, polietilen glikol veya aktif karbon ile tedavi dahildir (Demeke ve Adams, 1992, Abolmaaty ve ark, 2007).

Fenoller doğrudan RNA ile etkileşime girebilir. Fenollerin çıkarılması, polivinilpirolidon kullanılarak çökeltme ile gerçekleştirilebilir (John, 1992). Yüksek konsantrasyonlarda boratlar RNA'yı polifenollerle etkileşime karşı korurlar (Wan ve Wilkins, 1994). Sipahioglu ve ark, (2006) bu inhibitörleri yapraklardan 65°C'de 2 gün boyunca kurutarak ve hermetik koşullar altında 4°C'de muhafaza ederek çıkarmıştır.

Ölü biyokütle, toprak ve su numunelerinde genellikle bulunan humik ve fulminik asitler, diyaliz, sıvı ekstraksiyonu, polivalan katyonlar kullanılarak folikülasyon, jel özütleme, kolon esaslı yöntemler ve ultrafiltrasyon ile çıkarılabilir; bu sonuncusu en başarılı olanıdır (Tsai ve Olson, 1992, Abbaszadegan ve ark, 1993, Tsai ve ark, 1993, Braid ve ark, 2003). Queiroz ve ark, (2001) kanalizasyon ve su örneklerinin analizinde, tercihen mikroorganizmaları bağlayan ve inhibitör maddelerin ko-pürifikasyonunu önleyen elektropozitif filtreler kullanmışlardır.

Diğer maddelerin spesifik olarak uzaklaştırılması için yalnızca birkaç yöntem yayınlanmıştır (Khan ve ark, 1991). İdrar numunelerinde mevcut olan üre, diyaliz veya ultrafiltrasyon ile etkin bir şekilde alınabilir (Khan ve ark, 1991). Sütte ortaya çıkabilecek proteazlar, proteaz inhibitörleri veya BSA'nın eklenmesiyle ortadan kaldırılabilir (Powell ve ark, 1994). Kalsiyum iyonlarının neden olduğu inhibisyonun etkileri magnezyum iyonlarının eklenmesiyle telafi edilebilir. Bir başka olasılık, artan amplifikasyon oranlarına neden olan, kalsiyum iyonlarını yakalayan farklı şelatlayıcı maddelerinin kullanılmasıdır (Bickley ve ark, 1996).

Sonuç olarak klinik örneklerde bulunabilen PZR inhibitörleri, testlerde maliyet artışına, sonuçların gecikmesine neden olmaktadır. Bu nedenle birçok çalışmada bu PZR inhibitörlerin ortadan kaldırılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

Kaynaklar

- Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59, 1318–24.
- Abolmaaty A, Gu W, Witkowsky R, Levin RE. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. *J Microbiol Methods* 2007, 68, 349–52.
- Al-Soud WA, Radström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64, 3748–53.
- Al-Soud WA, Radström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 2000, 38, 4463–70.
- Al-Soud WA, Radström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001, 39, 485–93.
- Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000, 38, 345–50.
- Al-Soud WA, Ouis IS, Li DQ, Ljungh S, Wadstrom T. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, 44, 177–82.
- Arnal C, Ferre-Aubineau V, Besse B, Mignotte B, Schwartzbrod L, Billaudel S. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *J Virol Methods* 1999, 77, 17–26.
- Atmar RL, Metcalf TG, Neill FH, Estes MK. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59, 631–5.
- Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61, 3014–8.
- Baar C, D'abbadie M, Vaisman A, Arana ME, Hofreiter M, Woodgate R, Kunkel TA, Holliger P. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2011, 39, e51.
- Belec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piedouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* 1998, 21, 1064–7.
- Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Negro PA, Cavallo R. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol* 2006, 29, 111–9.
- Bessetti J.. An introduction to PCR inhibitors. <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.2007.pdf?la=es-es>. Erişim Tarihi:15.05.2017.
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996, 22, 153–8.
- Braid MD, Daniels LM, Kitts CL. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J Microbiol Methods* 2003, 52, 389–93.
- Burgess LC, Hall JO. UV light irradiation of plastic reaction tubes inhibits PCR. *Biotechniques* 1999, 27, 252–3.
- Burkhardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38, 87–91.
- Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl Environ Microbiol* 2007a, 73, 186–92.
- Butot S, Putallaz T, Croquet C, Lamothe G, Meyer R, Joosten H, Sanchez G. Attachment of enteric viruses to bottles. *Appl Environ Microbiol* 2007b, 73, 5104–10.
- Cannon JL, Vinje J. Histo-blood group antigen assay for detecting noroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74, 6818–9.
- Chaturvedi U, Tiwari AK, Ratta B, Ravindra PV, Rajawat YS, Palia SK, Rai A. Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2008, 149, 260–3.
- Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. Development, evaluation, and standardization of a realtime TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2006, 6, 3846–55.
- Croci L, Dubois E, Cook N, De Medici D, Schultz A, China B, Rutjes S, Hoorfar J, Van Der Poel WHM. Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: towards international standards. *Food Anal Methods* 2008, 1, 73–84.
- Da Silva N, Zardoya R, Santurde G, Solana A, Castro JM. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. *J Virol Methods* 1995, 55, 209–18.
- Demeke T, Adams RP. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 1992, 12, 332–4.
- Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396, 1977–90.
- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 271, 726–30.
- Erllich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science* 1991, 252, 1643–50.
- Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 1992, 13, 52–5.
- Fox DH, Huang CK, Du J, Chang TY, Pan Q.. Profound inhibition of the PCR step of CF V3 multiplex PCR/OLA assay by the use of UV-irradiated plastic reaction tubes. *Diagn Mol Pathol* 2007, 16, 121–3.
- Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. Beatine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega Notes* 1998, 65, 27–30.
- Gassilloud B, Huguet L, Maul A, Gantzer C. Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support. *J Virol Methods* 2007, 142, 98–104.
- Gonzalez A, Grimes R, Walsh EJ, Dalton T, Davies M. Interaction of quantitative PCR components with polymeric surfaces. *Biomed Microdevices* 2007, 9, 261–6.
- Hale AD, Green J, Brown DW. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J Virol Methods* 1996, 57, 195–201.
- Hedman J, Raström P. Overcoming inhibition in Real-time diagnostic PCR. In: *PCR Detection of Microbial Pathogens*. Ed: WILKS M, 2013 943, 17–48.
- Henson JM, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu Rev Phytopathol* 1993, 31, 81–109.
- Huppertz HI, Schmidt H, Karch H. Detection of *Borrelia burgdorferi* by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. *Eur J Pediatr* 1993, 152, 414–7.
- Jacobsen CS, Rasmussen OF. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58, 2458–62.
- John ME. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res* 1992, 20, 23–81.
- Katcher HL, Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques* 1994, 16, 84–92.
- Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res* 2009, 37, e40.
- Khan G, Kangro Ho, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* 1991, 44, 360–5.
- Konet DS, Mezencio JM, Babcock G, Brown F. Inhibitors of RT-PCR in serum. *J Virol Methods* 2000, 84, 95–8.
- Kreider CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62, 1102–6.

- Lantz PG, Matsson M, Wadstrom T, Radström P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J Microbiol Methods* 1997, 28, 159-67.
- Levesque-Sergerie JP, Duquette M, Thibault C, Delbecchi L, Bissonnette N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 2007, 8, 93.
- Löfström C, Knutsson R, Axelsson CE, Radström P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 69-75.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997, 35, 995-8.
- Mutlu D, Sağlık İ, Koyun M, Çomak E, Mutlu E, Uslu Gökçeoğlu A, Çağla Doğan S, Dinçkan A, Akbaş SH, Akkaya B, Akman S, Süleymanlar G, Çolak D. Pediatrik Renal transplant alıcılarında BK virus enfeksiyonları. *Mikrobiyol Bul* 2013, 47, 1-10.
- Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, Simell O, Knip M, Virtanen S, Hyoty H. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol* 2009, 44, 211-4.
- Opel KL, Chung D, Mccord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 2010, 55, 25-33.
- Peist R, Honsel D, Twieling G, Loffert D. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *QIAGEN News* 2001, 3, 7-9.
- Pachner AR, Delaney E. The polymerase chain reaction in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 1993, 34, 544-50.
- Pontiroli A, Travis ER, Sweeney FP, Porter D, Gaze WH, Mason S, Hibberd V, Holden J, Courtenay O, Wellington EMH. Pathogen quantitation in complex matrices: a multioperator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. *PLoS ONE* 2011, 6, e17916.
- Powell HA, Gooding CM, Garrett SD, Lund BM, Mckee RA. Protease inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1994, 18, 59-61.
- Queiroz AP, Santos FM, Sassaroli A, Harsi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67, 4614-18.
- Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004, 26, 133-46.
- Ribao C, Torrado I, Vilarino ML, Romalde JL. Assessment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. *J Virol Methods* 2004, 115, 177-82.
- Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 1992, 17, 37-45.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230, 1350-54.
- Schmidt BL, Aberer E, Stockenhuber C, Klade H, Breier F, Luger A. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in the urine and breast milk of patients with Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995, 21, 121-8.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012, 113, 1014-26.
- Scipioni A, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Thiry E. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virol J* 2008a, 5, 94.
- Scipioni A, Bourgot I, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Daube G, Thiry E. Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. *Mol Cell Probes* 2008b, 22, 215-22.
- Shieh YS, Wait D, Tai L, Sobsey MD. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1995, 54, 51-66.
- Sipahioglu HM, Usta M, Ocak M. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *J Virol Methods* 2006, 137, 120-4.
- Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Anal Biochem* 1988, 174, 650-7.
- Sur K, Mcfall SM, Yeh ET, Jangam SR, Hayden MA, Stroupe SD, Kelso DM. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid. *J Mol Diagn* 2010, 12, 620-8.
- Sutlovic D, Definis GM, Andelinovic S, Gugic D, Primorac D. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J* 2005, 46, 556-62.
- Tamariz J, Voynarowska K, Prinz M, Caragine T. The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci* 2006, 51, 790-4.
- Tian P, Engelbrektson A, Mandrell R. Two-log increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine gastric mucin conjugated to magnetic beads. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74, 4271-6.
- Tsai YL, Olson BH. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58, 2292-95.
- Tsai YL, Sobsey MD, Sangermano LR, Palmer CJ. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59, 3488-91.
- Wadowsky RM, Laus S, Libert T, States SJ, Ehrlich GD. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol* 1994, 32, 1054-7.
- Wan CY, Wilkins TA. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem* 1994, 223, 7-12.
- Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B. Effect of ionic and nonionic detergents on the taq polymerase. *Biotechniques* 1990, 9, 308-9.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GP, Verhoef J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J Clin Microbiol* 1992, 30, 3195-9.
- Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol* 1995, 33, 2643-6.
- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63, 3741-51.
- Yetilmezer E. Sığır sütünde *Brucella* ve *Listeria* tanısı için PZR optimizasyonu. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, 2010.
- Yılmaz YA. *Helicobacter pylori*: mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Derg* 2004, 35, 182-6.