

## BUĞDAYDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE OLASI SORUNLARIN OPTİMİZASYONU

Ahmet YILDIRIM\*<sup>1</sup> Nejdet KANDEMİR<sup>2</sup> Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU<sup>2</sup> Tuğba GÜLEÇ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KARAMAN  
<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Biyoteknoloji  
Laboratuvarı, TOKAT

\*e-mail: ahmety55@gmail.com.tr

Geliş Tarihi: 29.06.2009

Kabul Tarihi: 06.01.2011

**ÖZET:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) DNA polimeraz enzimi aracılığıyla suni şartlarda DNA'nın çoğaltılması işlemidir. Yaygın ve geniş bir kullanım alanı olan PCR, moleküler çalışmalara büyük bir hız ve kesinlik kazandırmıştır. Oldukça kompleks olan bu teknik optimize edilerek başarılı bir şekilde kullanıldığında araştırmacıların işini kolaylaştırmaktadır. Ancak zayıf, istenmeyen ve spesifik olmayan ürün oluşumundan kaçınmak için kullanıcı gereken optimum konsantrasyon ve şartları kendisi ayarlamalıdır.

Bu çalışma, PCR'de kullanılan temel bileşenlerden DNA, MgCl<sub>2</sub>, dNTP ve primer konsantrasyonlarının optimize edilmesi ve karşılaşılan sorunların ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Bu bileşenler PCR sonucunu etkileyen kritik faktörlerdir. Diğer bileşenler sabit tutularak her bir bileşen için farklı konsantrasyonlar denenmiş ve doğru amplifikasyon için gerekli optimum konsantrasyonların DNA (100 ng), MgCl<sub>2</sub>, dNTP ve primer için sırasıyla 1 µl, 2-2.25 mM, 200-400 µM ve 0.25 µM olduğu saptanmıştır. Ayrıca reaksiyon karışımına mineral yağ koymanın PCR ürününe etkisinin bulunmadığı da tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR, DNA, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Primer, Optimizasyon

### POLYMERASE CHAIN REACTION IN WHEAT AND OPTIMIZATION OF THE POSSIBLE PROBLEMS

**ABSTRACT:** Polymerase Chain Reaction (PCR) is a process of DNA amplification via DNA polymerase enzyme under artificial conditions in a thermal cyclers. PCR, which has very common use in a wide range of different disciplines, has provided high speed and certainty for molecular studies. If this complex technique is used effectively after optimization, it makes studies easy for researchers. However, researcher should optimize the PCR conditions before any specific study to avoid from poor and nonspecific PCR products.

The aim of this work was to put forward the problems encountered in a PCR and show how to optimize concentrations of DNA, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs and primers. These are the critical components for a successful PCR process. By keeping other factors stable, it was determined that optimum DNA (100 ng), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs and primer amounts were 1 µl, 2-2.25 mM, 200-400 µM and 0.25 µM, respectively. In addition, mineral oil addition to the mix had no effects on PCR product.

**Key Words:** Polymerase Chain Reaction, PCR, DNA, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Primer, Optimization

## 1. GİRİŞ

Moleküler çalışmaların temeli DNA'nın yapısının tanımlanmasına dayanmaktadır. Kesim enzimlerinin keşfi (Roberts, 1987), DNA dizi analizinin başarılması (Maxam ve Gilbert, 1977), rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi (Watson ve ark., 1992) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Anonim, 2004) gibi önemli birçok tekniğin bulunmasının birbiri ardına hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, moleküler biyoteknolojide hayal bile edilemeyen başarıların elde edilmesini sağlamıştır (Southern, 1975; Sanger ve ark., 1977; Sambrook ve ark., 1989).

Yüzyılın en önemli buluşlarından olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ilk kez 1985 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Anonim, 2004). Moleküler biyoloji alanında oldukça fazla kullanılan bu teknik, kısaca, nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Temel olarak DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra primerlerin (sentetik oligonükleotidler) hedef DNA'ya bağlanması (yapışma) ve zincirin uzamasından oluşan döngünün belirli bir sayıda tekrarlanmasına dayanır.

Tekrarlanan döngüler sonunda DNA'nın milyarlarca kopyası üretilebilir. Bu teknik ile kısa zamanda laboratuvar çalışmalarında büyük bir hız ve kesinlik kazanılmıştır. Hemen hemen her moleküler laboratuvarında kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu moleküler biyoloji ve biyomedikal araştırmalardan, adli tıp, bitki ve hayvan ıslahı, genetik teşhis gibi çok farklı alanlara yayılan oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Weining ve Langridge, 1991; Akar, 1999).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü primerler kullanılarak, bu bölge DNA'sının suni olarak sentezlenmesi işlemidir. Reaksiyon karışımında kullanılan temel bileşenler kalıp DNA (template), primerler, nükleotidler (dNTP), DNA Polimeraz Enzimi, Tampon çözelti (Buffer) ve Magnezyumdan (MgCl<sub>2</sub> veya MgSO<sub>4</sub>) oluşmaktadır. Kullanılan bu temel bileşenlerin miktarı ve kalitesi reaksiyon sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Temel bileşenlerin yanı sıra kullanılan Thermal Cyclers, primer hatta mikrofuj tüpün bile sonucu etkilediği bilinmektedir (Anonim, 2005; Karcicio, 2007). Bu nedenle kullanılan bileşenlerin miktarı deneylerle optimize edilmeli ve kullanıcı optimum

koşulları kendisi ayarlamalıdır. Optimizasyon yapılmadığı takdirde spesifik olmayan amplifikasyon (non spesifik), PCR ürününün zayıf olması, daha önce çalışan reaksiyonun çalışmaması ve beklenmedik ürünlerin ortaya çıkması gibi sorunlar ortaya çıkabilir. Herhangi bir bileşenin fazla ya da eksik konulması istenmedik ya da yanıltıcı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Reaksiyon sonucunu etkileyen en önemli bileşenler kalıp DNA, primer, dNTP ve Magnezyumdur. Bu çalışmada diğer faktörler sabit tutularak bu bileşenlerin farklı konsantrasyonları denenmiş ve istenen ürünün elde edildiği optimum miktarlar tespit edilerek karşılaşılan sorunlar ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan çalışmada PCR tüplerine yağ konulmasının reaksiyon üzerine etkili olup olmadığı da test edilmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

DNA izolasyonu, genç buğday yapraklarından DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak (Fermentas Life Sciences Genomic DNA Purification Kit) gerçekleştirilmiştir. Her bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımı; toplam hacim 40 µl olacak şekilde 250 nM primer, deoksiniükleotidlerin her birinden 0.2 mM, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ünite *Taq* Polimeraz enzimi ve 1 µl kalıp DNA'dan (100 ng) oluşmaktadır. Diğer bileşenler sabit tutularak farklı DNA (0.2-12 µl), MgCl<sub>2</sub> (1-20 mM), dNTP (20-1200 µM) ve primer (0.05-2 µM) konsantrasyonları denenmiştir. Bir PCR işlemi; 94 °C'de bir dakika denatürasyon, 94 °C'de bir dakika denatürasyon, Xgwm798 primerinin yapışma sıcaklığı olan 60 °C'de bir dakika yapışma, 72 °C'de bir dakika uzatma ve 72 °C'de beş dakika son uzatma sirkülasyonundan oluşmaktadır. Elde edilen PCR ürünleri yüksek çözünürlüğe sahip % 3'lük metaphore agaroz jelde, 100 V'lık elektrik akımında koşulmuştur. Reaksiyonda net ürünler verdiği daha önceden belirlenmiş olan buğdaya özgü Xgwm798 primeri (Somers ve ark., 2004) kullanılmıştır.

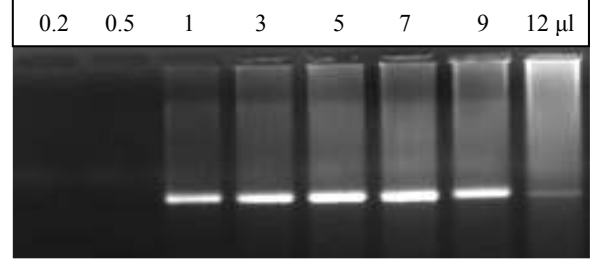
## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1. DNA Miktarı Optimizasyonu

Başarılı bir amplifikasyon (çoğaltım) DNA miktarı ve kalitesi ile yakından ilgilidir (Promega, 2004). DNA miktarı ile ilgili yapılan en temel yanlış reaksiyona konulan DNA miktarı arttıkça PCR ürününün de artacağı kanısındır. Genel olarak çok küçük miktarlarda kalıp DNA kullanımı istenen ürünün yeterince sentezlenememesine dolayısıyla zayıf amplifikasyona neden olurken, çok fazla miktarda DNA kullanımı ise non spesifik üretime neden olmaktadır.

Bu çalışmada 100 ng kalıp DNA'dan her bir tüpte 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 ve 12 µl DNA olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları amplifiye edilmiştir. Düşük miktarlarda (0.2 ve 0.5 µl) DNA kullanıldığında amplifikasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir (Şekil 1). İstenen ürünün en net olarak 1

µl'de elde edildiği ve kullanılan DNA miktarı arttırıldıkça PCR ürününden elde edilen bandın yoğunlaştığı ancak özellikle 12 µl'lik miktara doğru çıktıkça non spesifik ürünlerin ortaya çıktığı ve istenen ürün miktarının azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. Farklı DNA miktarlarının PCR ürünlerine etkisi

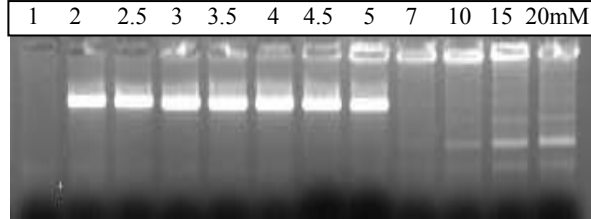
Az miktarda DNA kullanılan PCR'lerde karışımın toplam hacminin düşük tutulması yararlı olabilir. Genelde böyle düşük DNA miktarlarında hacmin fazla olduğu reaksiyonlarda bantlar görünmezken, toplam hacim azaltıldığında PCR ürünleri görüntülenebilir (Anonim, 2005). Bu durumun temel nedeni toplam hacmin düşük olduğu durumlarda, reaksiyonun her mikrolitresindeki PCR ürün miktarının daha yüksek olmasıdır.

### 3.2. Magnezyum Konsantrasyonu Optimizasyonu

*Taq* DNA polimerazın ideal koşullarda çalışması için gerekli olan magnezyum (Mg) amplifikasyon başarısını etkileyen kritik bir faktördür. Bununla birlikte magnezyum konsantrasyonu; primer bağlanması, denatürasyon, ürün spesifikliği, primer dimer oluşumu ve enzim aktivitesini de etkilemektedir. Kalıp DNA ve dNTP konsantrasyonu ile DNA'da proteinlerin ve EDTA gibi kimyasalların varlığı reaksiyonda kullanılması gereken magnezyum miktarını etkilemektedir. Gereğinden fazla miktarda magnezyumun ortamda bulunması non spesifik ürünlerin oluşumuna yol açarken (Promega, 2004); gerektiğinden az miktarlar ise istenen ürünün yeterince sentezlenememesine neden olmaktadır (Şekil 2). Reaksiyon karışımında magnezyumun yeterli miktarda bulunmaması *Taq* DNA polimeraz enziminin inaktif olmasına neden olurken; yüksek magnezyum konsantrasyonu enzimin verimliliğini azaltmakta (Eckert ve Kunkel, 1990) ve non spesifik amplifikasyonu giderek artırmaktadır (Williams, 1989; Ellsworth ve ark., 1993). Bu nedenlerden ötürü yapılan deneylerle her bir reaksiyon için optimum magnezyum konsantrasyonu belirlenmelidir.

Bu çalışmada, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 7, 10, 15 ve 20 mM arasında değişen farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre (Şekil 2) çok düşük magnezyum konsantrasyonunda (1 mM) amplifikasyonun gerçekleşmediği, ancak artan konsantrasyonlarda özellikle 2-2.25 mM arasında istenen ürünün yeterince sentezlendiği görülmüştür. Beş mM'nin üstündeki konsantrasyonlarda spesifik olmayan ürünlerin ortaya çıktığı ve istenen ürünün zayıf bir şekilde elde edildiği

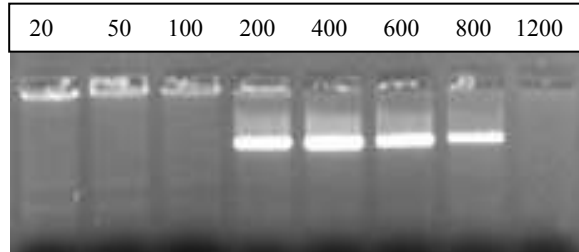
tespit edilmiştir. Yüksek  $MgCl_2$  konsantrasyonları polimeraz aktivitesini engellemekte dolayısıyla ürün miktarını azaltmaktadır. Ürün miktarları göz önüne alındığında en ideal magnezyum konsantrasyonunun 2-3 mM arasında olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda düşük yapışma sıcaklığında çalışan primerlerde magnezyum konsantrasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan non spesifik ürünlerin çok daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Promega, 2004).



Şekil 2. Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarının PCR ürünlerine etkisi

### 3.3. dNTP Konsantrasyonu Optimizasyonu

Deoksi nükleotit trifosfat (dNTP) konsantrasyonunun optimize edilememesi beklenen ve istenen ürünün yeterince sentezlenememesine neden olmaktadır. 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1200  $\mu M$  aralığında denenen dNTP miktarında (Şekil 3) 200-400  $\mu M$  konsantrasyonda istenen ürünün sentezi yeterince gerçekleşmişken; konsantrasyon artırıldıkça (800  $\mu M$ 'da) ürün yeterince sentezlenememiş 1200  $\mu M$ 'da (1.2 mM) ise amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bununla birlikte 200  $\mu M$ 'dan daha düşük konsantrasyonlarda istenmeyen ürünler ortaya çıkmış ve ürün yeterince sentezlenememiştir.



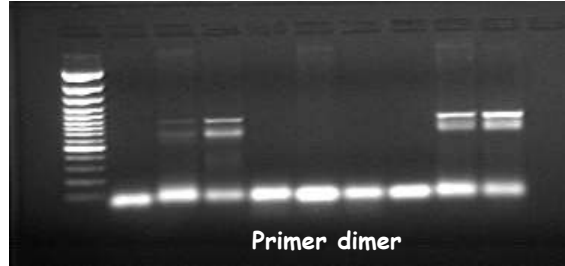
Şekil 3. Farklı dNTP konsantrasyonlarının PCR ürünlerine etkisi

Yapılan çalışmada dNTP miktarındaki küçük farklılıkların bile PCR reaksiyonunu engellerken, magnezyum konsantrasyonundaki küçük artışların sonucu olumlu etkilediği saptanmıştır (Şekil 2). Bunun temel nedeni *Taq* polimeraz için gerekli serbest magnezyumun dNTP ve DNA tarafından bağlanmasıdır (Henegariu ve ark., 1997; Anonim, 2005).

### 3.4. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu

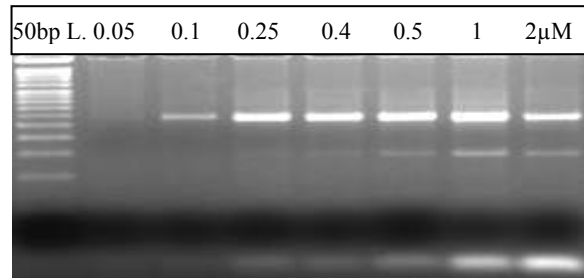
Başarılı bir PCR için primer konsantrasyonu kritik bir parametredir. Primerlerin yüksek konsantrasyonda kullanılması özellikle primer dimer adı verilen spesifik olmayan bantların oluşmasına neden olmaktadır (Bock, 1997). Primer dimerler (Şekil 4)

küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirine bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotidleri, kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır.



Şekil 4. Primer dimer bantlarının görünümü

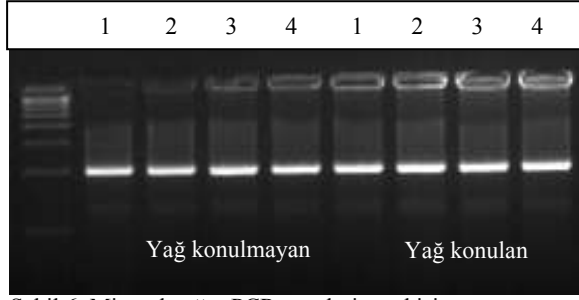
Primer konsantrasyonunun çok yüksek tutulması yanlış bağlanma olasılığını da artırmaktadır. Şekil 5'de 0.05, 0.1, 0.25, 0.4, 0.5, 1 ve 2 $\mu M$  arasında değişen primer konsantrasyonlarının kullanıldığı PCR ürünlerine ait bant profilleri verilmiştir. Optimum primer konsantrasyonu 0.25  $\mu M$  olarak belirlenmiş ve belirli bir konsantrasyona kadar primer miktarının artırılmasının PCR reaksiyonu sonucunu geliştirdiği bu nedenle de primer miktarındaki ayarlamaların PCR reaksiyonlarını optimize etmenin önemli bir yolu olduğu tespit edilmiştir. Ancak yüksek primer konsantrasyonlarında istenmeyen bantlar ortaya çıkmış ve primer dimer oluşumu giderek artmıştır. Bu durumun temel nedeni yüksek primer miktarında primerlerin tamamlayıcı olmayan sekanslara da yapışması sonucunda spesifik olmayan hibridizasyonun gerçekleşmesi ve oluşan non spesifik ürünlerin asıl ürünle rekabete girerek verimliliği düşürmesidir (Qiagen, 2005).



Şekil 5. Farklı primer konsantrasyonlarının PCR ürünlerine etkisi

### 3.5. Mineral Yağın PCR Ürününe Etkisi

Yapılan deneylerde hot start yöntemi dışında PCR reaksiyon karışımlarını mikrofüj tüplere dağıttıktan sonra mineral yağ eklenmesinin reaksiyon sonucuna herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 6). Çalışmalarda eski model Thermal cycler kullanılıyorsa (ısıtma kapağı olmayan) reaksiyon karışımlarını örtmek için mineral yağın gerekli olduğu ve yağın kullanılmasının tüpteki sıvının hacmini artırarak az da olsa sonucu etkilediği bildirilmiştir (Karcicio, 2007). Ancak yapılan çalışmada Termal döndürücülerin ısıtma kapağı varsa mineral yağ gereksinimi olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 6. Mineral yağın PCR ürünlerine etkisi

### 3.6. PCR Spesifikliğinin Artırılması

PCR'yi optimize etmenin bir yolu da touch down veya gradient PCR yöntemlerini kullanmaktır. Optimizasyon primerlerin yapışma (bağlanma) ısısı üzerine odaklanmaktadır. Touch down PCR programı yapışma ısısı, her döngüde (yaklaşık 0.5 °C) ardışık olarak azalacak şekilde düzenlenmektedir. Gradient PCR'de ise Thermal döndürücünün her bir bloğundaki kolonlara farklı yapışma sıcaklıkları (yaklaşık 0.2-0.5 °C'lik farklılıklarla) gelecek şekilde program hazırlanır. Özellikle ilk defa kullanılacak primerlerin optimum yapışma sıcaklığının tespit edilerek ürün verimliliğinin ve spesifikliğinin artırılması için gradient PCR yöntemi kullanılmalıdır. Çalışmada SCAR C+D primeri için 52-56.3 arasında değişen farklı sıcaklıklarda gradient PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve optimum yapışma sıcaklığının 53 °C olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Gradient PCR yöntemi kullanılarak optimum yapışma sıcaklığının belirlenmesi.

## 4. SONUÇ

PCR ile ilgili birçok araştırma yapılmış kullanım amacına ve başlangıç materyaline göre yeni uygulamalar geliştirilmiştir. Bu teknik optimize edilerek kullanıldığında moleküler araştırmaları oldukça kolaylaştırmakta ve hızlandırmaktadır.

Bu çalışmada denenen temel bileşenlerin miktarındaki artışların istenmeyen ürünlere neden olduğu, optimum şartlardan daha düşük konsantrasyonlarda ise ürünün yeterince sentezlenemediği belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen verilerden yola çıkılarak zayıf, istenmeyen ve spesifik olmayan ürün oluşumu gibi olumsuz sonuçlardan kaçınmak için kullanıcıların reaksiyon karışımında kullanılan kimyasalların optimum konsantrasyon ve şartlarını mutlaka ayarlamaları gerektiği kanısına varılmıştır. Çalışma sonuçlarına bakılarak elde edilen

ürünlerde oluşabilecek olumsuz durumların nedeni ve çözüm yolu kolaylıkla anlaşılabilir. Ayrıca araştırmada saptanan optimum verilerden yola çıkılarak istenen ürünün eldesi çok daha kısa sürede ve detaylı deneylere gerek kalmaksızın sağlanabilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Akar, N., 1999. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik. <http://www.medicine.ankara.edu.tr/internalmedical/pediatrics/molgen/index>.
- Anonim, 2004. Polymerase Chain Reaction(PCR). <http://www.karymullis.com/pcr>.
- Anonim, 2005. PCR Generalities. Standard PCR Reaction Mix. <http://www.info.med.yale.edu/genetics>.
- Bock, R., 1997. Biolistic Transformation of plants with anion-exchange-purified plasmid DNA. Qiagen News. Issue No:5. Institut für Biologie III, Universität Freiburg, Germany.
- Eckert, K.A. and Kunkel, T.A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acids Res. 18: 3739-3744.
- Ellsworth, D.L., 1993. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques, 14: 214-217.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques, 23: 504-511.
- Karcicio, M., 2007. Uygulamalı Gen Amplifikasyonu: PCR Teknolojisi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). Bio 954. <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~coner>.
- Maxam, A., and Gilbert, W., 1977. A new method Sequencing DNA. Proceeding of the National Academy of Sciences, 74: 560-564.
- Promega, 2004. General Considerations for PCR Optimization. Protocols and Applications. Chapter 1: Nucleic Acid Amplification.
- Qiagen, 2005. Critical Factors for Successful PCR. Primer Annealing and PCR buffers. <http://www.qiagen.com>.
- Roberts, R.J., 1987. Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition Sequences. Gene Amplif Anal, 5: 1-49.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceeding of the National Academy of Sciences, 7: 5463-5467.
- Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K., 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet., 109: 1105-1114.
- Southern, E.M., 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. Journal Molecular Biology, 98: 503-517.
- Watson, D.J., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M., 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books, s:63-75, New York.
- Weining, S. and Langridge, P., 1991. Identification and Mapping of Polymorphism in Cereals Based on the Polymerase Chain Reaction. Theor. Appl. Genet., 82: 209-216.
- Williams, J.F., 1989. Optimization Strategies for the Polymerase Chain Reaction. Biotechniques, 7: 762-769