

## **Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları**

*Araş.Gör.Burcu OKUTUCU\**  
*Yrd.Doç.Dr.Sacide PEHLİVAN\*\**

DNA replikasyonu yani DNA'nın kendini eşlemesi, DNA ipliğinin kalıp olarak kullanılıp çoğaltılmasıdır. Prokaryot hücrelerde replikasyon, halkasal bakteri kromozomunda belirli bir noktadan başlar. Replikasyon orjini adı verilen bu noktadan başlayarak, DNA kendini tümüyle eşleyene kadar, iki yönde ve aynı hızda sentezlenir. Ökaryotlarda ise DNA replikasyonu bir çok bölgede başlar ve her iki yöne doğru komşu bölgeler birleşene kadar devam eder. Replikasyon çatalında, iki DNA ipliğinin her biri yeni DNA sentezi için kalıp olarak işlev görür. Replikasyon sadece bir iplikte kesintisiz ilerler. Kesintili iplikte yeni DNA 1000-2000 bazlık kısa DNA parçaları şeklinde sentezlenir (Okazaki fragmenti). Bu işlemde replikasyonun başlaması için primer olarak kısa bir RNA gereklidir. RNA primeri sonradan uzaklaştırılır, yeri polimeraz I tarafından nükleotitler ile doldurulur ve doldurulan bölgeler DNA ligazca birleştirilir. Replikasyon sırasında oluşan hatalar karmaşık bir düzeltme mekanizmasıyla düzeltilir<sup>1</sup>.

### **A) POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA replikasyonunun taklit edilmesi olarak kısaca tanımlanır. Bu işlemin tüp içerisinde hızlı bir şekilde ard arda olarak tekrarlanmasıyla başlangıç DNA miktarının milyon kat artırılması söz konusudur.

---

\*Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Bornova-İZMİR

\*\*Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ABD, Bornova-İZMİR

PCR'da yer alan bileşenler; amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren *kalıp DNA*, amplifiye edilecek kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri oligonükleotid *primerler*, termostabil karakterli *Taq DNA polimeraz*, enzimidir. Taq DNA polimerazın görevi DNA moleküllerinin komplementleriyle eşlenmesine yardımcı olup onların çoğaltılmasını sağlamaktır. İşlemin başlaması için kısa DNA dizilerine ihtiyaç vardır. Bunun içinde primerler kullanılır. *dNTP*'ler (ATP,GTP,TTP,CTP) Taq DNA polimerazın substratlarıdır. Primerler ile başlatılan çift sarmal oluşumu hedef zincirin DNA polimeraz tarafından *dNTP*'leri kullanılarak uzatılmasıyla devam eder.  $Mg^{+2}$  iyonu da işlemde kofaktör olarak önemlidir. Konsantrasyonu belli oranlarda (her primer için farklı) olmalıdır. Konsantrasyonu aşırı olursa hatalı eşleşmeler olur. Az olursa da yeterli miktarda eşleşme olmaz

PCR işleminde hedef DNA'nın çoğaltılması 20-40 döngü arasında gerçekleşir. Her döngü farklı sıcaklıklardan oluşan 3 bölüm içerir. Bunlar *denatürasyon*, kalıp DNA çift zincirinin açılması olup DNA tek zincirli haline gelir. *Annealing (birleşme)* tek zincirli kalıp DNA'nın primerlerle birleşme adımıdır ve 50-60°C arasında gerçekleşir. *Extension (uzama)* DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu 72°C de gerçekleşir. Tek sarmal hedef DNA'nın komplementeri primerle zincir başlar ve Taq polimeraz ortamdaki *dNTP*'leri kullanarak zinciri uzatır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. İşlem 20-40 döngü olarak bu 3 adımın tekrarıyla devam eder.

#### **PCR' in Uygulama Alanları**

PCR; moleküler genetik çalışmalarda yer alan DNA klonlanmasından daha az zahmetli ve kısa sürmesi sebebiyle geliştirilen bir araçtır. Çoğaltılan DNA parçası, DNA dizi analizi, Southern yada Northern Blotting (DNA yada RNA hibridizasyonunda) prob olarak kullanılabilir. PCR yalnız farmasotik ve klinik alanda değil antropoloji, arkeoloji ve ziraat gibi birçok uygulama alanına sahiptir<sup>2</sup>. Bunlar özetlendiğinde;

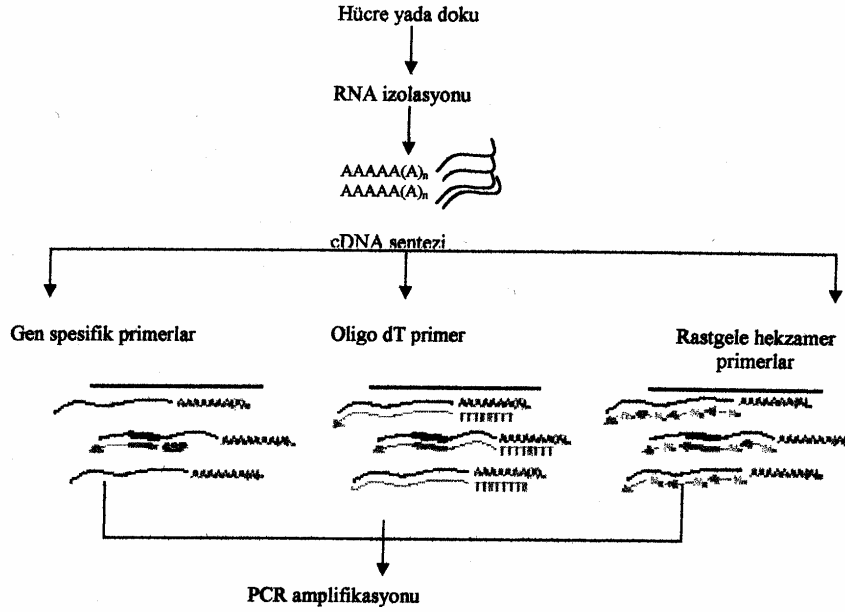
1. Kalıtsal hastalıkların teşhisi; (örn; hemofili) PCR ile gen dizileri çoğaltılır ve hasta genlerindeki bozukluk tespit edilir. Taşıyıcılarda da erken teşhis sağlanır.
2. Kanseri araştırmalarında; onkogen ve tümör supresör genlerdeki mutasyonlar PCR temelli stratejiler kullanılarak aydınlatılır.
3. Adli tıp çalışmalarında; DNA'daki tekrar dizilerinin PCR ile çoğaltılarak suçlu kişilere ait yada babalık testi için gerekli olan DNA analizleri yapılabilir.
4. Biyoteknolojik alanda PCR; rekombinant proteinlerin (insulin yada büyüme hormonu) ve rekombinant aşıların geliştirilmesinde kullanılır.
5. Bakteri ve virüslerin tespitinde; geliştirilmiş özel PCR yöntemleriyle karışımından dahi türe spesifik bir seçim yapılmasına olanak sağlar. Bu da hastalıkların teşhisinde hız ve duyarlılık kazandırır.

#### **B) REVERS-TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)**

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle ile çok az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir, ekspresyon miktarı da tesbit edilebilir. Oluşan RT-PCR ürünleri klonlama da vektör olarak kullanılabilir, bu ürünlerden cDNA kütüphaneleri oluşturulur ki bunlar daha sonra gen kütüphaneleri olarak değerlendirilir. RNA analiz tekniklerinden; RNA hibridizasyonu, RNaz koruma yöntemleri, *in situ* hibridizasyon ve S1 nükleaz yöntemleri ile kıyaslandığında daha hassas, hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir<sup>3</sup>.

RNA'nın bulunduğu ve en çok çalışıldığı örnekler kan, serum, hücre kültürleri, dokular (hayvan yada bitki) ve bakteri kültürleri olarak sıralanabilir. Lifli dokular ve proteince zengin dokulardan (kalp, beyin ve timustan) elde

edilen RNA izolasyonunda problemlerle karşılaşılır. Bunlar ortamdaki protein, lipid, DNA ve nükleazların uzaklaştırılmamasıdır. Bu nedenle DNaz parçalaması, fenol:kloroform ekstraksiyonunun tekrarlamalı yapılması ve LiCl çöktürmesi ile bu sorunların üstesinden gelinmesi gereklidir (Şekil 1)<sup>4</sup>.



Şekil 1. RT-PCR işlem adımları.

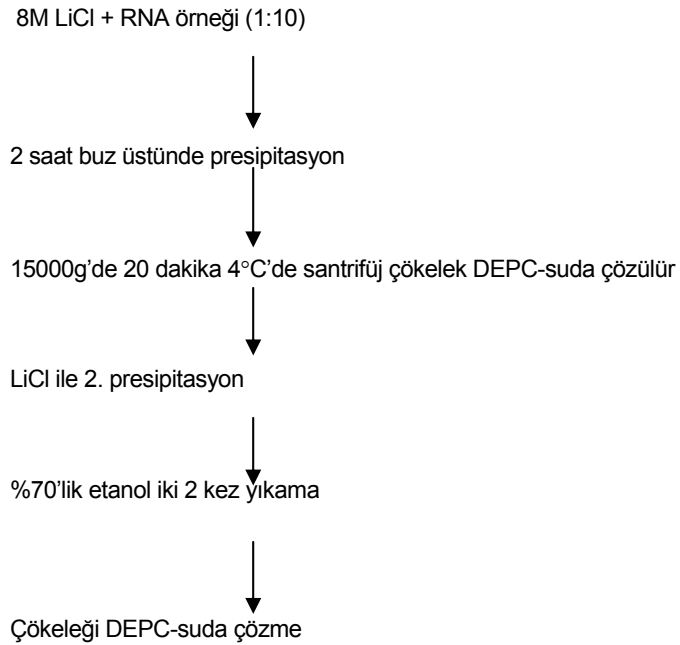
İzolasyonda dikkat edilecek noktalar; çalışma steril kabinde yapılmalı, +4°C'de çalışılmalı (yada buz üzerinde), steril ve filtreli pipet uçları kullanılmalı, mutlaka eldiven kullanılması gerekir çünkü derideki RNazlar RNA'ların parçalanmasına neden olur.

İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılmalıdır. RNA spektrofotometrik olarak ölçülerek saflık miktarı kontrol edilir. Ayrıca RNA çalışmaya uygun uzunlukta olmalı ve EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) yada SDS(Sodyumdodesilsülfat) gibi revers transkriptaz enzimini inhibe eden inhibitörleri içermemelidir.

Genelde oligo (dT) poli A<sup>+</sup> RNA primer olarak tercih edilmez. Sebebi RNA izolasyonu sırasında örnekler arasında mRNA içeriği farklanır ve oluşan son ürünlerin kantitasyonunda hatalara yol açar (histon mRNA'ları ve bazı interferonlar poli A içermez). Ama poli A<sup>+</sup> RNA ender oluşan son ürünlerin analizinde hassasiyeti artırır<sup>5</sup>.

RNA'nın, RNazlarca zengin kaynaklardan (pankreas) elde edilmesi durumunda parçalanmasını önlemek amacıyla örneğin formamidde saklanması gerekir dört kilobazdan büyük transkripler yıkılmaya daha dayanıklıdır<sup>6</sup>.

Genel RNA izolasyon yöntemi guanidyum izotiyosiyanat/fenol yöntemidir. Tüm doku ve diğer RNA kaynaklarına da uygulanır<sup>7</sup>. Kısaca özetlendiğinde;



Maya ve gram + ve gram - bakterilerden RNA izolasyonuna yönelik yöntem özetlendiğinde<sup>8</sup>

Farklı bakteri türlerinden(gram + veya gram -), *S.cerevisiae* ve *R.muciliginasodo* mayalarından birer koloni seçilir.

Seçilen her koloni sıvı YED ortamında (%0,5 Glukoz, %0,5 maya ekstraktı) sadece *E.coli* %0,4 laktöz içeren N.Broth' da 28°C'de 24 saat inoküle edilir.

- Her kültür ortamından alınan 1ml hücre örneği
- 10000g'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjleme
- RNA-SDS muamelesi
- 10000g'de 5 dak. santrifüj
- Asetat/SDS solüsyonuyla (pH 5,1) 100°C'de 5 dakika ısıtma
- Süspansiyon sulandırılır, 7000g'de 5 dakika santrifüj
- RNA örneği -80°C'de RNAz ların degradasyonuna karşı saklanır.

Son zamanlarda yöntemlerde kullanılan kimyasalların bazılarının zararlı olması ve hassas çalışmalar yapılabilmesi için genelde diagnostik çalışmalarda kitler kullanılmaya başlamıştır. Kitlere örnek verdiğimizde;

- EZ-RNA (Biological Industries Co.) kitiyle tam kandan RNA izolasyonu
- mRNA monolayer hücreleri + EZ-RNA denatürasyon solüsyonu ile hücreleri parçalama
- Farklı rpm'lerde 4°C'de santrifüjleme ve üst fazların atılması RNA çözültisi üzerine (alt faz) izopropanol ekleme 12000g'de 4°C santrifüj, -20°C 'de bir gece bekletme Örnek santrifüjlenir çökeleği 2 kez %75 etanol ile yıkama
- Çökelek kurutulur. Eğer hemen kullanılacaksa nükleaz içermeyen su eklenir, etanol eklenirse 4 °C'de bir hafta -20 °C'de bir yıl saklanabilir.

#### **RT-PCR iki aşamadan oluşur;**

**a)** cDNA sentez reaksiyonları; random-hegzamer primerler, oligo (dT) primerler veya gen spesifik primerler (GSP) kullanılabilir ve sentez için Retrovirüslerden elde edilen AMV (Avian Myeloblastosis Virus) ve MMLV (moloney murine leukemia virus) virüse ait revers transkriptas enzimleri

kullanılır (Şekil 1).

**b)** RT-PCR tek yada iki adımlı olarak gerçekleştirilebilir. İki adımlı RT-PCR'da; RT tamponunda cDNA sentezi gerçekleştirilir. Sentez edilen cDNA'nın 1/10'u PCR için kullanılır. Kullanılmayan cDNA ise  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır (9). İki yada tek adımlı olarak PCR işlemi gerçekleşir. İki adımlı RT-PCR tek RNA örneğinden çoklu mesajların saptanması için kullanılan yaygın ve kullanışlı bir yöntemdir. Yöntemde tek zincirli cDNA oligo (dT), random heksamer veya GSP primerlerle eşleşir (Şekil 1). Faydaları ise amplifikasyon enziminin ve primerlerin seçilebilmesi, tek örnekten oluşan farklı mesajların saptanması ve kantitasyonuna uygundur.

Tek adımlı PCR'da ise revers transkripsiyon ve PCR aynı tüpte optimize edilen koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem fazla miktarda RNA örneği varken daha kullanışlıdır. cDNA sentezi ve amplifikasyon arasında tüplerin kapatılmasına gerek yoktur çünkü adımın azaltılması kontaminasyon riskini en aza indirir. Tek zincirli RNA GSP primerleriyle eşleşir. Daha az pipetleme, daha az kontaminasyon riski vardır. Kantitatif PCR'a uygundur. Revers transkriptaz ile amplifikasyon enzimleri birlikte çalışır ve yüksek hassasiyetlidir.

Uygun RT-PCR sonuçlarına ulaşabilmek için; deneysel işlem adımlarının dikkatli yapılması, uygun enzimlerle çalışılması, uygun primer seçilmesi, farklı tampon ve ilave ajanların kullanılması, döngü parametrelerinin iyi ayarlanması ve en önemlisi yüksek kalite ve saflıkta kalıpların (örneklerin) hazırlanması gerekmektedir.

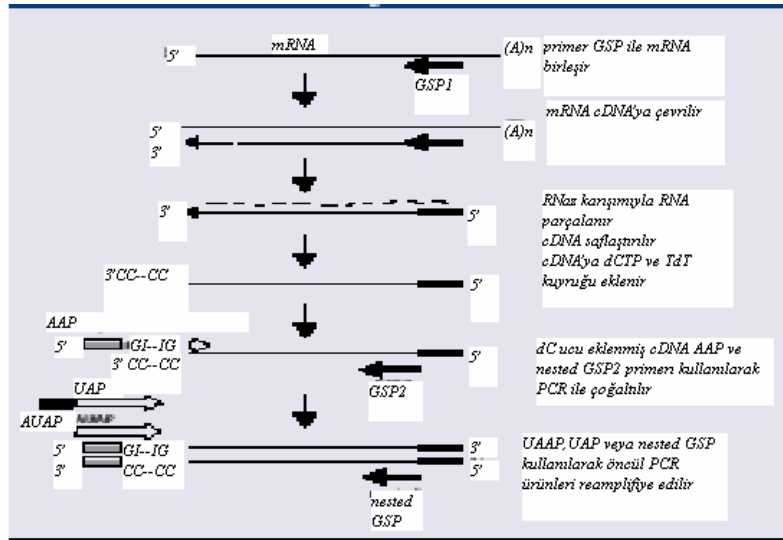
### **C) RT-PCR'ın YENİ UYGULAMALARI**

#### **Yeni bir RT-PCR yöntemi: 5' ve 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

RACE ender bulunan mRNA'ların çoğaltılıp, klonlanmasında kullanılır. RACE ürünleri tek bir ürün yada çoklu ürünler olabilir. 5'RACE işleminin duyarlılığını tek sarmal sentez işleminde kullanılan GSP'lerin spesifikliğı,

hedef molekülde bulunma miktarı ve oluşan ürünün uzunluğu etkiler. Nested primerlerle amplifikasyon hedef olarak seçimli boyutlu amplifiye ürünlerin kullanılması da duyarlılığı artırır. 5' RACE hassasiyeti kullanılan revers transkriptaz ve cDNA uzantısının oluşumunu da inhibe eden cDNA'nın 3' ucundaki sekonder yapıdan da etkilenir<sup>4</sup>. Transkriptlerin 3' yada 5' ucunda bilinmeyen dizilerin yakalanması için cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonudur. Bilinen RT-PCR protokollerinde iki dizi spesifik primer kullanılırken, RACE'de tek dizi spesifik primer ve poli(A) uçlu mRNA'lar (3'RACE) veya homopolimerik uç eklenmiş cDNA'lar kullanılır (Şekil 2).

İşlem sonrasında klasik yöntemlerle (Poliakrilamid yada agaroz jeller) görüntüleme yapılmazsa, ürünlerin belirlenmesi için Northern hibridizasyonu kullanılır bu durumda ürünlerin prob olarak kullanılabilmesi içinde dizi bilgisine ihtiyaç duyulur<sup>4</sup>.



Şekil 2.5'RACE işlem adımları



### **RT-PCR yardımıyla mRNA Ekspresyonunun Kantitasyonu**

RT-PCR, Northern hibridizasyon yada ribonükleaz koruma analizlerinden daha hassas, daha az RNA ve dizi bilgisine ihtiyaç duyar. mRNA kantitasyonunda iki popüler PCR metodu kullanılır

1- Kompetitif PCR

2-Real-time PCR

1) **Kompetitif PCR**'da ekzojen RNA transkripti (internal standard RNA) örnekler arasında farklanmayı kontrol etmek için RT adımından önce eklenir. Internal standard RNA, cDNA çevrimi ve amplifikasyonundaki farklanmanın etkinliğini kontrol için hedefle birlikte revers transkripte ve amplifiye edilir. Kantitasyon, internal standard RNA'nın bilinen konsantrasyonlarının spesifik hedef dizisiyle birlikte amplifikasyonu olur. Internal standard RNA hedefle aynı primer tanıma bölgesini paylaşır fakat uzunluğu farklıdır. En basit yöntemlerden biri spesifik olmayan spacer DNA'da PCR ile primer tanıma bölgeleri oluşturmaktır. Oluşan ürün T7 yada SP6 RNA polimeraz promotörü içeren bir vektöre klonlanır. RNA standartları *in vitro* transkripte edilerek oluşturulmuş olur. Kompetitif PCR, GSP kullanarak tek adımlı RT-PCR yada GSP yada oligo dT kullanarak iki adımlı RT-PCR olarak gerçekleştirilir. Oligo dT dizisi revers primere poli dT dizilerinin eklenmesiyle oluşur.

Kompetitif RT-PCR, hedef ve internal standardın eşit olarak amplifiye etkinliğine sahip olması sayesinde bir son-nokta analizidir. Bu yüzden hedefin miktarı ile ilgili bilgi sahibi olunmalıdır ki internal standard konsantrasyon aralığının ona göre ayarlanması için gerekmektedir<sup>4</sup>.

### **2) Real-time PCR**

Ürün olduğu formatıyla dedekte edilir. Ürünlerin kantitasyonunda çeşitli yöntemler kullanılır. Florogenik 5' nükleaz problemleri moleküler markerlardır. İlk method Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi sayesinde hibridizasyon probunu uzamanın dallanma noktasında kesilmesine dayanır. Burada diğer yöntemlerden farklı olarak floresan şiddetinin baskılanması (sönümü) izlenir.

Moleküler markerlarda 5' ucu florofor 3'ucu da bastırıcıdır. Bu problemler saç tokası şeklindedir. Baş kısmı 5-7 nükleotitli ve G-C içeriği fazladır. Dış kısımda 25-30 nükleotit yer alır ve hedef dizinin komplementeri baz dizisine sahiptir. Ortamda hedef dizi bulunduğunda, moleküler işaretçiler hedefle hibridize olur, saç tokası şekli açılır ve floresan etki açığa çıkar. Bunun zamanla incelenmesiyle sonuçların kantitasyonu olur.

Real-time RT-PCR'in, kompetitif PCR'a bazı üstünlükleri vardır. Floresan görüntüleme hassas bir belirleme yöntemidir. Örneklerin post-amplifikasyona ihtiyacı yoktur. Hedef hakkında fazla bilgi sahibi olmak yeterlidir<sup>4</sup>.

#### **D) RT- PCR yönteminin gelecekteki yeri;**

RT-PCR, son yılların İnsan Genom Projesiyle kullanım amaçları giderek artan bir tekniktir. Mikroarraylerin kullanım alanlarından olan gen ekspresyon çalışmalarında çıkış noktası mRNA'dır çünkü ekspresyon düzeyindeki tüm farklılıklar bu şekilde saptanabilir<sup>10</sup>. Gen ekspresyon çalışmaları genel olarak kanser ve SNP (Tek Nokta Polimorfizmler) gibi insan sağlığını olumsuz etkileyen durumları en iyi açıklayan çalışmalardır<sup>11-12</sup>. Mikroarraylerde prob olarak kullanılan mRNA RT-PCR'la cDNA'ya çevrilir ki cDNA'lar daha sonraki aşamalara daha dayanıklıdır (işaretleme, hibridizasyon). Aynı anda kantitasyonda yapılabildiği için RT-PCR'a verilen önem giderek artmaktadır. Ayrıca sistemin hassasiyeti ve güvenilirliği de kullanım oranını artmaktadır. Gelecekte de yoğun biçimde kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler arasında yerini koruyacağı muhakkaktır.

#### **Kaynaklar**

1. Wright J., Color Atlas of Genetics, Nobel Tıp Kitapevi, Türkiye, 2000; 38.
2. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. Instant Notes in Genetics, Bios Scientific Publishers Limited England, 1998; 274.
3. Santagati S, Garnier M, Carlo P, et al. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods, Br Res Prot 1997; 217.
4. Clontech Technical Notes. The Basics of PCR and RT-PCR, 2001.

5. Klebe RJ, Grant GM, Grant AM, et al. RT-PCR without RNA isolation, *Biotechniques* 1996; 1094.
6. Nakajima D, Nakayama M, Ohoa O. Modified TRIZOL reagent protocol for large mRNA, *Focus*, 1998; 20:80.
7. Chomezynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol-chloroform extraction, *An Bioc* 1987; 162:156.
8. Rivas R, Vizcaino N, Buey MR, et al. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast, *J Mic Met* 2001; 47.
9. Souzae F, Noudu-Thome A, Tron CY, et al. Quantitative RT-PCR: Limits and Accuracy, *Biotechniques* 1996; 280.
10. Ye RW, Wang T, Bedzyk L, et al. Applications of DNA microarrays in microbial systems, *J Microbiol Methods* 2001; 47:257.
11. Mori M, Mimori K, Yoshikawa Y, et al. Analysis of the gene-expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma, *Surgery* 2002; 131:39.
12. Walker J, Flower D, Rigley K. Microarrays in hematology, *Curr Opin Hematol* 2002; 19:23.

**Yazışma Adresi:**

Araş.Gör. Burcu OKUTUCU  
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyokimya Bölümü  
35100 Bornova İZMİR  
Tif: 0232 3884000 / 1774