



Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Oğuz Kağan TÜREDİ^{1,a,*}, Esra ŞEKER^{1,b}

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

^aORCID: 0000-0002-6527-8420

^bORCID: 0000-0003-0969-5286

Geliş Tarihi: 02.02.2023

Kabul Tarihi: 29.03.2023

Bu makale Nasıl kaynak gösterilir: Türedi OK, Şeker E.

(2023). Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi:
Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Harran Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Dergisi, 12(1): 118-125,
DOI:10.31196/huvfd.1246738.

***Yazışma adresi:** Oğuz Kağan TÜREDİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

e-mail: okturedi@aku.edu.tr

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

Özet: Sunulan bu derlemenin amacı diagnostik mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tipleri hakkında kısa bilgi verilmesidir. İlk olarak 1985 yılında Kary Banks Mullis tarafından DNA araştırması için keşfedilen PZR, belirli bir DNA segmentinin primerler aracılığıyla enzimatik amplifikasyonunu sağlayarak çok sayıda kopyasını oluşturan *in vitro* bir yöntemdir. Günümüzde PZR ve PZR tabanlı tanı yöntemlerine ilgi giderek artmakta ve PZR, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının tanısında ve epidemiyolojik araştırmalarda en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemi olarak güncelliğini korumaktadır. Sürekli güncellenen ve yeni teknikler eklenen moleküler tanı yöntemleri rutin tanıda daha ekonomik, ulaşılabilir ve uygulanabilir hale geldiğinde tanılal mikrobiyoloji alanında bu tekniklerin kullanım sıklığı ve çeşitliliği aynı oranda artacaktır.

Anahtar Kelimeler: Diagnostik mikrobiyoloji, Moleküler tanı, PZR, PZR tipleri.

The Most Common Molecular Diagnostic Method in Microbiology: Polymerase Chain Reaction

Abstract: This review briefly explains Polymerase Chain Reaction (PCR) types commonly used in diagnostic microbiology. PCR, first discovered by Kary Banks Mullis in 1985 for DNA search, is an *in vitro* method involving the enzymatic amplification of a specific DNA segment by primers, creating many copies. Today, interest in PCR and PCR-based diagnostic methods is increasing, and PCR remains up-to-date as the most widely used molecular diagnostic method in the diagnosis of infectious diseases of humans and animals and epidemiological studies. When molecular diagnostic procedures are constantly updated, new techniques are added, and become more affordable, accessible, and applicable in routine diagnosis, the frequency and equality of use of these techniques in diagnostic microbiology will increase at the same rate.

Keywords: Diagnostic microbiology, Molecular diagnosis, PCR, PCR types.

Giriş

Her geçen gün yeni bir tekniğin eklendiği moleküler tanı yöntemleri; infeksiyöz hastalıklara tanı konma hızını ve doğruluk oranını artıran, biyoteknolojinin mikrobiyolojik identifikasyon metodlarına sunduğu güvenilir yöntemlerdir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Moleküler tanı yöntemlerinin başlangıcı, Francis Crick ve James Dewey Watson tarafından, daha sonraları "Watson-Crick DNA modeli" olarak bilinecek olan DNA çift sarmalının ilk açıklandığı 1953 yılına dayanmaktadır (Watson ve Crick, 1953). O dönemden 1985 yılına kadar olan süreçte biyoteknoloji alanında pek çok değerli keşif yapılmış olmakla birlikte, moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde en önemli dönem, oligonükleotid sentezi ve proteinler üzerine çalışmalar yapan Kary Banks Mullis tarafından 1985 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) keşfi olarak kabul edilmektedir (Mullis, 1990; Zhu ve ark., 2020). Kary Banks Mullis'e 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazandıran PZR tekniğinin keşfini takiben, diagnostik mikrobiyolojide yeni bir sürece girilmiş, mikroorganizmaların fenotipik identifikasyon yöntemlerinin yerini nükleik asit amplifikasyon teknikleri almaya başlamıştır. Günümüzde pek çok alanda kullanılan PZR ve PZR tabanlı teknikler, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalarda da en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemleri olarak güncelliğini korumaktadır (Şeker ve ark., 2019; Seker ve ark., 2022; Seker ve Kus, 2019; Simsek ve ark., 2021; Zhu ve ark., 2020).

Sunulan bu derlemede, diagnostik mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanılan PZR tipleri hakkında kısa bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): DNA'nın spesifik olarak tespit edilmesi amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Banks Mullis tarafından keşfedilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR); insan, hayvan ve bitki gibi organizmalara ait nükleik asit yapıları üzerindeki özgün bölgeleri, primerler aracılığıyla ve ısıya dayanıklı enzimler kullanılarak *in vitro* ortamlarda çoğaltılmasını sağlayan güvenilir bir moleküler tanı yöntemidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Garibyan ve Avashia, 2013; Green ve Sambrook, 2019a; Zhu ve ark., 2020). Hedeflenen DNA veya Ribonükleik asit (RNA) dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PZR'nin en önemli avantajı, hedef genetik materyal çok az sayıda olsa bile DNA veya RNA dizisinin çoğaltılarak milyonlarca kopyasının çıkarılmasına ve böylece istenilen dizinin kolaylıkla identifiye edilmesine olanak tanınmasıdır (Garibyan ve Avashia, 2013; Green ve Sambrook, 2019a; Lorenz, 2012).

Klasik PZR işleminin aşamaları

1-Nükleik asit eldesi: Nükleik materyallerin elde edilmesi başlarda zaman alan ve toksik, tehlikeli reaktiflerin kullanılmasını gerektiren bir işlemi. Hızlı ve güvenilir ticari ekstraksiyon kit tekniklerinin ortaya çıkmasıyla, ilk teknikler yerini büyük ölçüde tarih kitaplarına bıraktı. Artık kan, serum, tükürük, idrar, dışkı, beyin omurilik sıvısı, dokular ve hücrelerden, daha kısa sürede yüksek kaliteli nükleik materyaller elde edilebilmektedir (Price ve ark., 2009).

2-PZR amplifikasyonu: Döngüsel enzimatik reaksiyon esasına dayalı olan amplifikasyon işlemi, her döngüde bir

önceki döngünün amplifikasyon ürünlerini substrat olarak kullanır. Klasik bir PZR'da, reaksiyon üç basamaktan oluşur: denatürasyon, bağlanma ve uzama. Her bir döngüde bu üç aşama farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Tekin ve ark., 2020).

3-Elektroforez: Elektroforez, elektrik alanında hareket eden yüklü molekülleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Genellikle DNA, RNA veya protein gibi biyomoleküllerin ayrılması için kullanılır (Kavsaoğlu ve Mersinkaya, 2019). PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi veya poliakrilamid jel elektroforezi ile görüntülenebilir. Bu görüntüleme işlemi, etidyum bromid ve SYBR green gibi çeşitli boyalarla boyanarak veya radyoaktif veya nonradyoaktif maddelerle işaretlenerek gerçekleştirilebilir (Tekin ve ark., 2020).

Konvansiyonel PZR işleminde çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı olan bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primerle sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesi esasına dayanan PZR amplifikasyonunun temel mekanizması; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension, polymerization) olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon, kalıp DNA'nın 92-95 °C'de 1-2 dakika tutulması ile çift iplikçikli yapısını sağlayan hidrojen bağlarının kopması ve tek iplikçik oluşturmak üzere DNA sarmalının açılmasını ifade etmektedir. Denatürasyon süreleri değişebilir. Bu süre, DNA'nın tam olarak tek zincirli hale gelmesine yeterli olmalıdır. Ancak, bazı spesifik uygulamalar için farklı sıcaklık ve süreler gerekebilir. Bu nedenle, denatürasyon süresi konusunda genel bir kural yoktur ve kullanılacak koşullar deneysel olarak optimize edilmelidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Green ve Sambrook, 2019a; Wang ve ark., 2014). DNA tek iplikçik haline dönüştükten sonra, oligonükleotid primerler hedef DNA'da kendilerine tamamlayıcı oldukları bölgeler ile kurulan hidrojen bağları aracılığıyla birleşirler. Primer bağlanması (annealing) olarak isimlendirilen bu basamakta en verimli sonucun alındığı bağlanma sıcaklığı genel olarak 50-65 °C arasındadır. Primer bağlanma sıcaklığını hesaplayan basit formül vardır. $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ Bu formül, adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftleri arasındaki hidrojen bağı sayısının etkisini hesaba katmayan daha basit bir yaklaşımdır. Bu nedenle, T_m değeri deneysel olarak optimize edilmelidir (Kahya ve ark., 2013). Bağlanma işlemi primerin uzunluğuna ve kompozisyonuna bağlı olarak 30-60 saniyeden 5 dakikaya kadar değişebilir. Üçüncü aşama olan polimerizasyon ise, DNA'nın tek iplikçığı üzerine bağlanan primerlerin sentez için başlangıç teşkil ettiği DNA segmentinin kalan kısmının, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi aracılığı ile çift iplikçik haline dönüştürülmesi aşamasıdır (Buckingham ve Flaws, 2007; Green ve Sambrook, 2019a; Lorenz, 2012). DNA polimeraz enzimi, 5'→3' yönünde aktivite göstererek, uygun tampon ve dört çeşit (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3' hidroksil uçlarından bağlanarak DNA'nın karşıt ipliğinin uzamasını sağlar. Böylelikle, ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA'nın kopyası oluşturur. Polimerizasyon için en uygun ısı, *Thermus aquaticus*'tan (*Taq*) elde edilen *Taq* DNA polimerazın

aktivitesini en iyi gösterdiği ısı olan 65-72 °C olup, reaksiyon süresi 2-3 dakikadır. Bu aşamada en yaygın kullanılan DNA polimeraz enzimi *Taq* DNA polimeraz olmakla birlikte, *Thermus thermophilus*'dan (*Tth*), hipertermofilik *Pyrococcus furiosus*'tan (*Pfu*), termostabil *Thermococcus gorgonarius*'tan (*Tgo*) ya da hipertermofilik *Thermotoga maritima*'dan (*Tma*, *UltmaTM*) elde edilen DNA polimerazlar da kullanılabilir (Buckingham ve Flaws, 2007; Çadircı ve ark., 2017, Kengen, 2017). Bir PZR döngüsünü oluşturan polimerizasyon aşaması (denatürasyon, primer bağlanması ve uzama) ardı ardına 25-40 kez tekrarlanarak, başlangıçtaki hedef DNA segmentinin milyonlarca kopyası elde edilmiş olur (Buckingham ve Flaws, 2007; Lorenz, 2012; Wang ve ark., 2014).

PZR'nin keşfinden bugüne, biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmelere bağlı olarak çok farklı PZR yöntemleri geliştirilmiştir (Green ve Sambrook, 2019a).

1. DNA Dizisinin Sırası Bilindiğinde Kullanılan PZR Metotları

1.1. Konvansiyonel PZR (Conventional PCR): Yukarıda da bahsedildiği şekilde konvansiyonel PZR, kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon çözeltiler ve MgCl₂ gibi bileşenlerden oluşan temel PZR mekanizmasını içeren ve DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve zincir uzaması aşamalarının ardı ardına 25-40 kez tekrarlanması sonrası hedef DNA segmentinin çoğaltılması esasına dayanan standart PZR çeşididir (Buckingham ve Flaws, 2007; Mohammed ve ark., 2015; Porta ve Enners, 2012). Genelde tek hedef bölgenin amplifikasyonunu sağlayacak bir primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen bu PZR, monopleks PZR veya single-step PZR olarak da adlandırılır.

1.2. Geri Transkriptaz PZR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR): Reverz transkriptaz enzimi aracılığıyla hedeflenen RNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA, cDNA) çevrilmesi ve tamamlayıcı DNA'nın konvansiyonel PZR ile çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem, mRNA veya viral RNA varlığı ve miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen ekspresyonu çalışmalarında ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında da kullanılabilen duyarlı bir PZR tipidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Mo ve ark., 2012).

1.3. Multipleks (Çoklu) PZR (Multiplex PCR): Aynı örnekte çoklu hedeflerin tek bir reaksiyon içerisinde eş zamanlı tespiti amacıyla, reaksiyon karışımına farklı hedef DNA sekanslarına spesifik birden fazla primer çiftinin ilave edilmesiyle gerçekleştirilen ve temel mekanizması konvansiyonel PZR'a çok benzeyen bir yöntemdir (Buckingham ve Flaws, 2007).

1.4. İmmuno-PZR (Immuno-PCR, iPCR): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve PZR tekniklerinin avantajlarını bir araya getiren ve antijen-antikor etkileşimini görselleştiren bu teknik, marker DNA'nın daha fazla amplifikasyonu ile bir DNA-antikor konjugatı kullanımı esasına dayanır. Hem antikora hem de DNA'ya bağlanabilme özelliği gösteren bağlayıcı moleküller (linker) aracılığıyla, DNA'nın spesifik olarak antijen-antikor kompleksine bağlanması ve bağlanmış DNA'nın uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılması olarak tanımlanan yöntem,

ELISA gibi klasik antijen belirleme yöntemlerine göre çok daha duyarlı ve güvenilir bir antijen saptama yöntemidir (Ryazantsev ve ark., 2016).

1.5. Yuvalanmış PZR (Nested PCR): PZR'nin sensitivite ve spesifitesini artırmak için tasarlanmış bu teknik, iki çift amplifikasyon primeri ve iki ardışık PZR reaksiyonunun kullanımını içeren bir PZR modifikasyonudur. PZR'nin 15-30 döngülük ilk turunda bir primer seti kullanılarak, ilk amplifikasyonda hedef DNA'nın uzun bir dizisi çoğaltılır. İlk amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerle kalıp DNA olarak kullanılır ve ikinci primer seti kullanılarak ikinci bir amplifikasyon gerçekleştirilir ve ilk amplifikasyon ürünü olan DNA'nın küçük bir bölgesi çoğaltılır (Hirschhorn ve ark., 2022). İlk primer seti hedef DNA'nın dış ve büyük bölgesine bağlanırken, ikinci primer seti hedef DNA'dan üretilen ürün DNA'nın iç kısmına bağlanır (Carr ve ark., 2010). Bu uygulamada çoğaltılması istenen hedef DNA'nın, konvansiyonel PZR sonucu elde edilen DNA'dan 10⁴ kat daha hassas olduğu, böylece istenmeyen dizi elde edilme durumunun ortadan kalktığı belirtilmektedir (Sevindik, 2013).

1.6. Sıcak başlangıçlı PZR (Hot-start PCR): Bu yöntem, PZR'nin ilk aşamalarında oda ısısı veya daha düşük sıcaklıklarda spesifik olmayan DNA amplifikasyonu nedeniyle oluşacak istenmeyen ürünlerin ve primer dimerlerin varlığını azaltan, konvansiyonel PZR'nin modifiye edilmiş bir şeklidir. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek ve PZR'de verim kaybını en aza indirmek için, *Taq* DNA polimerazın inaktivasyonu veya bağlanmasının inhibe edilmesi ve *Taq* polimerazın reaksiyona geç eklenmesi gibi ek ısıtma ve separasyon yöntemleri kullanılır. Reaksiyon karışımlarının yüksek sıcaklıklarda tamamlanmasının sağlanması için düşük sıcaklıklarda *Taq* DNA polimeraz aktivitesini bloke eden modifikasyonlar, modifiye edilmiş dNTP'lerin kullanımını veya temel reaktiflerden birinin denatürasyondan sonra eklenmesi gibi uygulamalar tercih edilir. Bu ek uygulamalar, reaksiyon karışımındaki spesifik enzimlerin optimal bağlanma sıcaklığına ulaşılan kadar inaktif kalmasını veya inhibe edilmesini sağlar (Hirschhorn ve ark., 2022).

1.7. Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (Touchdown PCR): PZR'de sıkça karşılaşılan sorunlardan biri, düşük sıcaklıklarda primerlerin daha az spesifik olarak bağlanması ve non-spesifik bant görüntüsü ile PZR sonuçlarını yanıltmasıdır. Bu sorunun çözümü amacıyla geliştirilen bu teknikte, primerlerin bağlanması aşaması için seçilen sıcaklık başlangıçta primerlerin hesaplanan erime sıcaklığı (*T_m*) değerinden 5°C-10°C daha yükseğe ayarlanır ve bu koşullar altında mükemmel primer-kalıp hibritlerinin oluşumu sağlanır. Sonraki döngülerde yani PZR'nin sonlarına bağlanma sıcaklığı, primerler için hesaplanan *T_m* değerinin 2°C-5°C altında olacak şekilde kademeli olarak düşürülür. Buradaki amaç, PZR sonuna kadar hedef dizinin birkaç geometrik amplifikasyon döngüsünden geçecek olması ve bu nedenle PZR'nin baskın ürünü haline gelecek olmasıdır. PZR'nin erken aşamalarında karşılaşılabilecek hataları en aza indirmek için bu yöntemin her zaman bir sıcak başlatma protokolü ile birlikte gerçekleştirilmesi önerilmektedir (Green ve Sambrook, 2018).

1.8. Kolorimetrik PZR (Colorimetric PCR): Kolorimetrik PZR'da, belirli bir DNA dizisi çoğaltılır ve sonuçta oluşan ürünler bir renk ölçütü ile tespit edilir. Bu yeni yaklaşım RT-PZR'nin spesifitesini ve ELISA'nın kullanım kolaylığını bir araya getirmektedir. Reaksiyonda heminin bağlanması üzerine peroksidazın katalitik aktivitesini taklit eden DNAzimler gibi biyokatalizörlerin kullanıldığı ve bu biyokatalizörler tarafından oluşturulan kolorimetrik tepkimelerin ölçüldüğü bir PZR yöntemidir. PZR hedef DNA dizisini çoğalttıkça, boya maddesi çoğaltılmış DNA'ya bağlanır ve DNA'nın çoğaltılmış miktarına bağlı olarak renk değişir. Hedef genin çoğaltıldığı, reaksiyon tüplerindeki renk değişikliği ile anlaşılır (Seok ve ark., 2014).

1.9. Dijital PZR (Digital PCR, dPCR): Üçüncü nesil PZR olarak da tanımlanan dijital PZR, DNA veya RNA moleküllerinin, rastgele çok sayıda küçük hacimli bölmelere (nanometre hassasiyetinde) ayrıldığı ve amplifikasyon sonrasında her bölmedeki moleküllere ait absorbansın hesaplandığı bir yöntemdir (Mao ve ark., 2019). Konvansiyonel PZR'nin biyoteknolojik olarak iyileştirilmiş ve geliştirilmiş şekli olan dijital PZR ile konvansiyonel PZR arasındaki temel fark, nükleik asit miktarlarını ölçme yönteminde yatmaktadır. Dijital PZR daha fazla sayıda kopyası oluşması nedeniyle daha yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptir (Perkel, 2015). Bitki patojenleri, genetiği değiştirilmiş organizmalar, dirençli bakteriler, virüsler, nadir görülen mutasyonların tespitinde ve yeni nesil dizileme analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pavšič ve ark., 2016).

1.10. Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) veya Kantitatif PZR (Quantitative PCR, qPCR): Bu teknik, PZR ile çoğaltılan DNA parçalarının çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli problar ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı, amplikon konsantrasyonundaki değişiklikleri gerçek zamanlı olarak algılayabilen ve tespit edebilen PZR tabanlı bir tekniktir (Kralik ve Ricchi, 2017). Test, birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boyu farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılan ve farklılık gösteren Real-Time PZR cihazlarında gerçekleştirilir. Real-Time PZR temelde; spesifik olmayan çift iplikçikli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan "SYBR Green I" tabanlı qPCR ve spesifik DNA bölgesinin çoğaltılması ve saptanmasında floresan işaretli probların kullanıldığı "TaqMan®" tabanlı qPCR olarak ikiye ayrılır. SYBR Green I yönteminde reaksiyonun başında reaksiyon karışımında çift iplikçikli DNA, primerler ve SYBR Green I floresan boyası bulunur. Primerler bağlanıp uzama başladığında SYBR Green I boyası çift iplikçikli DNA'ya bağlanır ve floresan yayılım başlar. DNA miktarındaki artışa paralel olarak, yayılan floresan sinyalin Real-Time PZR cihazı monitöründe okunan miktarı da eş zamanlı olarak artar. TaqMan® prob yönteminde ise, çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve 5' ucu "fluorophore (6-karboksifloresin, 6-FAM)" ve 3' ucu "quencher (6-karboksitetrametil-rodamin, TAMRA)" floresan boya ile işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılır. Amplifikasyon sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasına TaqMan® problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar ve probun bağlı olduğu bölgeye

ulaşıldığında Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün artışı oldukça, floresan da ona paralel olarak artmaya devam eder (Cao ve Shockey, 2012; Kralik ve Ricchi, 2017).

1.11. In situ PZR (In situ PCR): In situ PZR, lam üzerine fikze edilmiş hücre, doku veya doku parçalarındaki hedef DNA veya RNA'nın kolorimetri veya floresan kullanılarak belirlenmesinde kullanılan semikantitatif bir yöntemdir. Dokulardaki veya tek hücrelerdeki transkript seviyelerinin kesin olarak ölçümünde, in situ PZR'nin RT-PZR gibi kantitatif bir transkript saptama tekniği ile birlikte kullanılması gerekmektedir (Bagasra, 2007).

1.12. COLD-PZR (COLD-PCR): COLD-PZR'nin temel prensibi her DNA dizisi için, bu dizilerin kendine özgü T_m değerinden daha düşük olan kritik bir denatürasyon sıcaklığına dayanır. Düşük denatürasyon sıcaklığına dayalı bu teknik, mutasyon tipi ve konumundan bağımsız olarak hem bilinen hem de bilinmeyen azınlık alellerin birlikte amplifikasyonu ile sonuçlanan tek adımlı bir amplifikasyon yöntemidir (Li ve Makrigiorgos, 2009; Phung ve ark., 2020). COLD-PZR; düşük düzeydeki somatik DNA mutasyonlarının belirlenmesinde ve mutasyon içeren bir DNA karışımından DNA parçalarının çoğaltılmasında yaygın kullanım alanına sahiptir (Li ve Makrigiorgos, 2009).

2. DNA Dizisi Bilinmediğinde Kullanılan PZR Metotları

2.1. Polimorfik DNA'nın Rastgele Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR): RAPD-PCR; ilgili türün genomik DNA'sının, 9-10 nükleotidli rastgele seçilmiş tek primer eşliğinde ve düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu tekniğin konvansiyonel PZR'den en önemli farkı, hedef organizmanın DNA dizisi hakkında herhangi bir spesifik bilgi gerektirmeksizin polimorfizmin belirlenmesini sağlamaktır (Buckingham ve Flaws, 2007; Öz Aydın, 2004). RAPD-PCR, prokaryotik ve ökaryotiklerin taksonomisinde, genetik çeşitlilik çalışmalarında, genom yapısının araştırılmasında, evrimsel sorunların çözülmesinde, ebeveyn belirlemede, genetik varyasyonun belirlenmesinde, bağlantı haritalarının oluşturulmasında, özgün bir gen lokusunun belirlenmesinde, adli tıpta, klinik tanı ve epidemiyoloji gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Öz Aydın, 2004).

2.2. Asimetrik PZR (Asymmetric PCR): Asimetrik PZR; sekanslama ve hibridizasyon problemlerinin kullanımını gerektiren durumlarda, DNA'nın çift sarmalından sadece birinin amplifikasyonu sağlayan bir PZR tekniğidir. Hedeflenen DNA sarmalının sentezini desteklemek için molariteleri eşit olmayan primerlerin eklenmesi dışında, tüm işlem konvansiyonel PZR'ye benzerlik gösterir. Bu teknikte, reaksiyonda kullanılacak primerlerden biri miktarca diğerinden yüksek tutularak, çoğunlukla o primerin bağlanacağı bölgenin çoğaltılması sağlanır (Nehdi ve ark., 2020; Sanchez ve ark., 2004).

2.3. Üstel Sonrası Doğrusal PZR (Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR): LATE-PCR; Real-Time PZR temelli bir amplifikasyon tekniğidir. Asimetrik PZR araştırmacılar tarafından optimizasyonu zor ve verimsiz olduğu

düşünüldüğü için LATE-PZR tekniği geliştirilmiştir. Asimetrik PZR tekniğinde, bir primerin konsantrasyonunun sınırlandırılması, erime sıcaklığını reaksiyon sıcaklığından daha düşük bir seviyeye çekerek verimi azaltabilir. Bu nedenle, bu yöntemde primerlerin optimize edilmesi oldukça zordur. Ancak, LATE-PZR, yeni bir primer tasarımı modeli sunarak, primer oranından bağımsız olarak simetrik PZR deneyleri kadar verimli deneyler yapabilmeye imkân sağlar. Bu teknik, primerlerin belirli bir bölgesinin erken aşamalarında hedefe özgü olmasını sağlayarak, asimetrik PZR'ye göre daha verimli ve öngörülebilir bir amplifikasyon grafiği oluşturur. Bu sayede, primerlerin konsantrasyon oranları ile uğraşmadan, daha az optimize edilmiş primerlerle bile yüksek verim elde etmek mümkündür. LATE-PZR yönteminin, özellikle az miktardaki numunelerdeki hedef sayıların gerçek zamanlı kantitatif analizi için kullanışlı bir teknik olduğu, klinik teşhis, biyosavunma, adli tıp ve DNA dizileme gibi alanlar için verimliliği yüksek uygulamalara uyarlanabileceği vurgulanmaktadır (Pierce ve Wangh 2007; Sanchez ve ark., 2004).

2.4. Demirlenmiş PZR (Anchored PCR, A-PCR): Hedef DNA'nın yalnızca bir ucundaki nükleotid sekansının bilindiği çift iplikçikli DNA fragmentlerine uygulanan, proteinin yalnızca N-terminal sekansı bilindiğinde bir genin tam sekans amplifikasyonuna izin veren bir PZR modifikasyonudur. Tekniğin amacı, bilinen sekans bölgesinden yararlanılarak hedeflenen DNA sekansının amplifikasyonudur. Amplifiye edilecek DNA sekansı, bilinen bir diziyeye bağlanır ve bilinen dizi reaksiyonda ikinci primer olarak kullanılır (Zheng ve ark., 2014).

2.5. Ters PZR (Inverse PCR, Inverted PCR, IPCR, Inside-out PCR): Ters PZR, bilinen bir DNA dizisinde yakın olarak bulunan ve bilinmeyen bazlara sahip olan DNA segmentlerinin amplifikasyonunu amaçlayan bir PZR yöntemidir. Bilinmeyen DNA bölgesinin yakınındaki bilinen konumu tanımlayarak, bilinen DNA bölgesini tamamlayıcı primerlerin tasarlanması, bilinmeyen bölgenin amplifiye edilmesine yardımcı olur. Bu yöntemde, önce bilinen DNA sekansı ve onun yan bölgesindeki baz sıraları bilinmeyen segmentler bir restriksiyon enzimi ile lineer olarak kesilir. Ardından restriksiyon fragmentleri ligasyonla sirküler hale dönüştürülür. Tekrar kesilerek lineer forma dönüştürülür. İki ucunda baz sıraları bilinen sekanslar, ortada ise bilinmeyen sekanslara sahip DNA segmenti tekrar restriksiyon enzimi ile lineer olarak kesilir. Bilinen sekanslara komplementer olarak tasarlanmış iki ayrı primer yardımı ile amplifikasyon gerçekleştirilir (Green ve Sambrook, 2019b).

3. PZR Sonrası Genotiplendirme ve Sekans Analiz Yöntemleri

3.1. Genotiplendirme Yöntemleri: PZR sonrası amplifiye edilmiş DNA ürünlerinin genotiplendirmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler; Elektroforez, Restriksiyon Fraksiyon Uzunluğu Polimorfizmi, Tek nükleotid Polimorfizmi, Allel Spesifik PZR, Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi gibi benzer veya küçük farklılıkları bulunan yöntemler geliştirilmiştir.

3.1.1. Jel Elektroforez Yöntemi: Jel elektroforez yöntemi; DNA, RNA veya protein gibi makromoleküllerin boyutlarına ve elektriksel yüklerine göre ayrılması ve analizi

için kullanılan bir yöntemdir. DNA jel elektroforez işlemi, çoğu zaman DNA'nın PZR ile çoğaltılmasından sonra yapılır. Ayrıca; kütle spektrometresi, DNA sekans analizi, blotlama tekniklerinde, özellikle de southern blotlama tekniğinde kullanılır. Moleküler teknikler bakımından en çok kullanılanı darbeli alan jel elektroforezidir (Drabik ve ark., 2016).

3.1.2. Restriksiyon fraksiyon uzunluğu polimorfizmi (RFLP) Yöntemi: RFLP tekniğinin ilk olarak bitkilerde, DNA dizilerindeki varyasyonları incelemek için kullanılan başarılı bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde, bir organizmanın DNA'sı belirli restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesilen parçalar jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrıştırılır. Bu parçalar, farklı uzunluklarda olabilir ve farklı organizmalar arasında değişebilir. Bu nedenle DNA'daki genetik farklılıkların tespitinde kullanılabilirler. RFLP teknikleri doğası gereği zorlayıcı, zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı yerini daha az karmaşık, daha uygun maliyetli PZR tabanlı tekniklere bırakmıştır. Çeşitli PZR tabanlı teknikler arasında; basit dizi tekrarları (Single sequence repeat, SSR), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'lar (RAPD), dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölge (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR), bölünmüş çoğaltılmış polimorfik DNA'lar gibi çeşitli belirteçler, çoğaltılmış fraksiyon uzunluğu polimorfizmleri (AFLPs) ve SSR'ler arası (ISSR) analizi gibi benzer birçok yöntem geliştirilmiştir (Bhatia ve ark., 2013; Deschamps ve ark., 2012).

3.1.3. Tek nükleotid Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphisms, SNP) Yöntemi: Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP), DNA dizisinde bir nükleotidin diğer bir nükleotid ile değiştirilmesi sonucu oluşan en küçük genetik varyasyon türüdür. İnsan genomunun yanı sıra diğer organizmaların genomlarında da en yaygın genetik varyasyon türüdür. SNP'ler, genetik materyalin genomik varyasyonlarını oluşturur ve bireyler arasındaki genetik farklılıkların ana nedenlerinden biridir. SNP'ler, hem kodlayıcı hem de kodlamayan bölgelerde ortaya çıkabilir ve gen ekspresyonu, protein fonksiyonu ve hastalık duyarlılığı gibi birçok biyolojik işlevi etkileyebilir. SNP'ler, genetik ilişki çalışmalarında genetik işaretleyiciler olarak kullanılabilir ve özellikle karmaşık hastalıkların genetik temellerinin anlaşılmasında önemli bir araçtır. SNP'ler, yüksek hızlı DNA dizileme, mikroarrayler, PZR tabanlı yöntemler gibi çeşitli teknikler kullanılarak tespit edilebilir. SNP analizi, genomik çalışmaların yanı sıra, kişiselleştirilmiş tıp, farmakogenetik ve araştırma alanlarındaki diğer birçok uygulamada da yaygın olarak kullanılmaktadır. Genomdaki frekanslarının uygun maliyetli ve paralel bir şekilde belirlenmesindeki göreceli kolaylığı nedeniyle en yaygın kullanılan genotiplendirme yöntemi olarak ortaya çıkmıştır (Deschamps ve ark., 2012).

3.1.4. Allel Spesifik PZR (AS-PCR) Yöntemi: Allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu (AS-PCR), PZR ürünlerinin etidyum bromür boyalı agaroz veya poliakrilamid jelde analiz edilmesiyle insan DNA'sındaki herhangi bir nokta mutasyonunun doğrudan tespit edilmesine izin veren bir PZR uygulamasıdır. AS-PCR, DNA şablonu ile uyumsuzluk oluşturan bir oligonükleotid primerin Taq DNA polimeraz tarafından primer uzatmasına dirençli olacağı için çalışır. Bu nedenle, bilinen tüm alellere özgü oligonükleotid primerler

sentezlenebilir ve bilinmeyen genotipteki DNA'lardaki alelleri tespit etmek için kullanılabilir. AS-PCR, genetik ve bulaşıcı hastalıkların teşhisini içeren DNA tabanlı teşhis tekniklerinde kullanılmaktadır (Ugozzoli ve Wallace, 1991).

3.1. 5. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis, HRM): Klinik uygulamalar için ilk olarak Carl Wittwer ve ark. (1997) tarafından tanımlanan yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi, Real-Time PZR yönteminin uygulamaya girmesiyle geliştirilmiş otomatize bir yöntemdir. PZR işleminden sonra Real-Time PZR cihazında aynı tüpte otomatize ve programlamayla takip eden bir prosedüre sahip HRM yönteminde, verilerin elde edilmesi Real-Time PZR'den sonra 10-15 dakika içinde gerçekleşebilmekte ve bu veriler 2 saniyedeki 0,1-1 °C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesiyle elde edilmektedir. İlgili DNA bölgesinin Real-Time PZR ile çoğaltılmasını takiben, Real-Time PZR işleminde artan sıcaklık ve azalan floresan boya miktarına bağlı olarak, HRM eğrileri adı verilen sigmoidal erime eğrileri oluşturulur. HRM, erime sıcaklıklarındaki farklılıklara dayalı olarak diziler arasındaki ince farkları algılayabilen, Real-Time PZR sonuçlarını analiz etmek için verimli, doğru ve hızlı bir tekniktir. Mikrobiyal genotiplendirme amacıyla kullanılan birçok yöntem olmasına karşın, HRM yöntemi var olan yöntemlere kıyasla daha hızlı ve kolay analiz olanağı sağlamaktadır. HRM eğrileri analiz edilerek; tür tanımlama, hedef dizideki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) farkları, nokta mutasyonlar, spesifik genotiplerin özellikleri dahil olmak üzere nükleik asit dizilerindeki genetik varyasyonların belirlenmesi mümkündür. Ayrıca, HRM teknolojisi bakteri, virus ve parazitlerdeki direnç gelişiminden sorumlu spesifik mutasyonların analizi için de önemli bir yöntemdir. Bununla birlikte, özellikle tür, örnek sayısı ve filogenetik yakınlık arttıkça sınıflandırma sürecinin zorlaştığı bildirilmiştir (Erali ve ark., 2008; Ozkok ve Celik, 2022; Zhou ve ark., 2022).

3.2. Sekans Analizi: Watson ve Crick'in 1953'te DNA'nın üç boyutlu yapısını keşfetmeleriyle birlikte, DNA replikasyon işlemlerinin ve nükleik asitleri kodlayan proteinlerin keşifleri başladı. Ancak protein zincirlerinin sırasını anlamak için geliştirilen stratejiler, DNA molekülünün çok daha uzun ve birbirine daha çok benzeyen, ayırt etmeyi zorlaştıran daha az birimden oluşması nedeniyle nükleik asit araştırmalarına kolayca uygulanabilecek gibi görünmüyordu. Bu yüzden ilk sekans uygulamalarında daha saf olarak bulunan tek zincirli RNA üzerine odaklanıldı. Robert Holley ve meslektaşları 1965 yılında *Saccharomyces cerevisiae*'den ilk tam nükleik asit dizisini çoğaltmayı başardılar. Daha sonra Frederick Sanger ve arkadaşları, DNA dizisinin sekansını belirleyen bir teknik geliştirdiler (Heather ve Chain, 2016).

DNA dizileme, DNA molekülündeki nükleotitlerin (A, T, C, G) kompozisyonunu ve diziliş sırasını belirleme olarak tanımlanmaktadır. Temelde biri klasik zincir sonlandırma yöntemine dayanan Maxam-Gilbert ve Sanger sekanslama metodu, diğeri ise çok sayıda DNA molekülünü hızlı bir şekilde işleyebilen Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi olmak üzere iki ana DNA dizileme yöntemi bulunmaktadır.

3.2.1. Sanger Sekanslama: Zincir sonlandırma dizileme yöntemi olarak da bilinen Sanger sekanslama, Sanger ve ark. (1977) tarafından geliştirilmiş, günümüzde de yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikte amaç, DNA fragmanlarının jel üzerindeki uzunluklarının dikkate alınarak DNA molekülünün baz kompozisyonunu ve dizilişini ortaya çıkarmaktır. Sanger metodunda, tek iplikçikli kalıp DNA, serbest OH grubu içeren tek yönlü primer, DNA polimeraz, DNA zincirlerinin monomerleri olan deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTPs) ve dideoksiribonükleotit trifosfatlar (ddNTPs) kullanılır. Bu yöntemde, kalıp DNA'ya tamamlayıcı bir DNA primeri, DNA sentezi için bir başlangıç noktası olarak kullanılır. Dört dNTP varlığında, polimeraz enzimi, kalıp DNA zincirine tamamlayıcı dNTP'yi ekleyerek primeri uzatır. Nükleotit zincirine hangi nükleotidin dahil edildiğini belirlemek için, sentez reaksiyonunu sonlandırmada farklı bir floresan boya ya da radyoaktif ile işaretlenmiş dört ddNTP kullanılır. Bu ddNTP'ler, dNTP'lerle kıyaslandığında DNA zincirlerinin uzatılması için gerekli olan 3' hidroksil grubundan yoksundur ve bu nedenle bir sonraki dNTP'nin 5' fosfatı ile bir bağlantı oluşturamaz ve sonuçta zincir sonlandırıcı olarak görev yaparlar. Reaksiyon dört ayrı tüpte gerçekleştirilir. Her bir tüpte dNTP'lerin tamamı, çok düşük konsantrasyonda da farklı bir ddNTP kullanılır. Her tüpte gerçekleşen PZR reaksiyonunda kullanılan dNTP'ler eklenip reaksiyon devam ederken, 3' hidroksil grubundan yoksun olan ddNTP'ler zincire eklendiğinde reaksiyon durur. Bu ddNTP'lerin bağlandığı farklı konumlarda reaksiyon sonlandığı için farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. PZR sonrasında oluşan reaksiyon ürünleri jel elektroforezinde görüntülenir (Heather ve Chain, 2016). Nükleotid dizisi belirleme işlemi, jel elektroforez sonrası daha küçük olan parçaların daha uzun mesafeler kat ettiği prensibine dayanır. Sanger yöntemi otomatize edildikten sonra yaklaşık 30 yıl boyunca altın standart olarak kabul edilerek kullanılmıştır. İlk nesil DNA dizileme cihazları, biraz daha kısa dizileme okumaları yapabilen 1 kilobazdan (kb) daha küçük parçaları dizileme kapasitesine sahiptir. Daha uzun bölgelerin dizilenmesi için ise İnsan Genom Projesi'nde kullanılan "shotgun dizileme" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde öncelikle hedeflenen bölge parçalara ayrılır ve dizileme sonrasında bu parçalar bir araya getirilerek bütün bir DNA dizisi oluşturulur (Darcan ve Türkyılmaz, 2018).

3.2.2. Maxam-Gilbert Sekanslama: Maxam ve Gilbert tarafından; Sanger sekanslama yöntemiyle aynı yıl geliştirilen bir DNA dizileme yöntemidir. DNA'nın kimyasal modifikasyonuna dayanır ve belirli baz dizilerinden kesilerek daha sonra toplanır. Bu yöntemde, bir dizileme jelinden kırk klon analiz edilebilir. Ancak, tehlikeli kimyasallar kullanılabildiği için Sanger yöntemine göre daha az tercih edilen ve daha yavaş bir yöntemdir. Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemleri birinci nesil dizileme olarak adlandırılır. Son 20 yılda birçok insan, hayvan ve bitki genomu çalışmasında kullanılmıştır. Bu yöntemlerin zahmetli olması ve ideal DNA dizileme teknolojisi gereksinimleri nedeniyle, yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiştir (Kekeç ve ark., 2022).

3.2.3. Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS): İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte DNA dizileme alanında birçok platform geliştirilmiştir.

Yeni Nesil Sekanslama, milyonlarca örneği farklı platformlar kullanarak aynı anda sekanslamak için kullanılan tekniklere verilen bir isimdir. Yeni Nesil Sekanslama yöntemleri, diğer analiz yöntemlerinde fark edilemeyecek düzeydeki mutasyonları tespit edebilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yeni Nesil Sekanslama'da birbirinden farklı ve çeşitli platformlar kullanılsa da akış şeması temelde ilk olarak bir kütüphane hazırlanması, ardından sekanslama yapılması ve son olarak da elde edilen verilerin çeşitli biyoinformatik yöntemlerle analiz edilmesi olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle her biri kendi yeni yöntemlerini barındıran, avantajları ve dezavantajları bulunan Yeni Nesil Sekanslama platformları ortaya çıkmaktadır. Sekanslama yöntemi kullanılan platforma göre değişiklik göstermekle beraber, güncel olarak en çok tercih edilen platformlara örnek olarak Roche 454, Solexa, Illumina, Pirosekanslama, İyon Yarı İletken dizileme ve SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) verilebilir (Heather ve Chain, 2016, Luo ve ark., 2012; Patrinos ve ark., 2016). Son nesil sekans yöntemlerinden; elektrik akışını kullanarak sekansları belirleyen yeni geliştirilen Nanopore sekans teknolojisi, klasik florasan okumalara alternatif bir seçenek sunar. Nanoporeler, her bir bazın elektrik yükünü belirlemek ve sekansı kaydederek belirlemek için kullanılır. Bu sayede, Nanopore sekanslama yöntemiyle daha uzun sekanslar okunabilmektedir (Wang ve ark., 2021).

Sonuç

Mikrobiyoloji alanında kullanılan geleneksel teşhis yöntemleri, yavaş üreyen ve teşhisi uzun zaman alan infeksiyöz etkenlerin ya da doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu nedenle izole edilemeyen infeksiyöz ajanların tanısı gibi durumlarda sınırlı bir kullanım alanına sahip olabilmektedir. Bunun yanı sıra, optimizasyonunun zaman alması, optimizasyon için uzmanlaşmış deneyimli personele ihtiyaç duyulması, sarf malzeme, alet ve ekipmanlarının pahalı olması gibi dezavantajlarına rağmen günümüzde PZR ve PZR tabanlı diagnostik teşhis yöntemlerine ilgi giderek artmakta ve PZR, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalarda da en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemi olarak güncelliğini korumaktadır. Sürekli olarak güncellenen ve yeni tekniklerin eklendiği moleküler tanı yöntemleri daha ekonomik, daha ulaşılabilir ve rutin teşhiste daha uygulanabilir olduğunda, bu tekniklerin diagnostik mikrobiyoloji alanında kullanım sıklığı ve çeşitliliği de aynı oranda artacaktır.

Çıkar çatışması

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının, sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi % 12 olduğunu beyan ederiz.

Etik izin

Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik" Madde 8(k) uyarınca HADYEK'in iznine tabi değildir.

Açıklama

Bu derleme, Oğuz Kağan TÜREDİ'nin doktora seminerinden özetlenmiştir.

Yazar Katkıları

Fikir/İçerik: OKT, EŞ
Tasarım: OKT, EŞ
Kontrol/Danışmanlık: EŞ, OKT
Veri Toplama ve/veya İşleme: OKT, EŞ
Analiz ve/veya Yorum: OKT, EŞ
Kaynak Taraması: OKT, EŞ
Yazım: OKT, EŞ
Eleştirel İnceleme: EŞ, OKT

Kaynaklar

- Bagasra O, 2007: Protocols for the *in situ* PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat Protoc*, 2 (11), 2782-2795.
- Bhatia D, Wing RA, Singh K, 2013: Genotyping by sequencing, its implications and benefits. *Crop Improv*, 40 (6), 101-111.
- Buckingham L, Flaws ML, 2007: Molecular Diagnostics Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. FA Davis Company., Philadelphia, USA.
- Cao H, Shockey JM, 2012: Comparison of TaqMan and SYBR green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem*, 60 (50), 12296-12303.
- Carr J, Williams DG, Hayden RT 2010: Molecular detection of multiple respiratory viruses. In: *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory* (First Ed), Wayne WG (Ed), 289-300, Academic Press, Elsevier Inc, USA.
- Çadircı BH, Bebek O, Çam D, 2017: Thermococcus gorgonius DNA polimerazının rekombinant olarak üretimi. *Selçuk Üniv Fen Fak Fen Derg* 43 (1), 1-9.
- Darcan C, Türkyılmaz O, 2018: Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniv Fen Bilim Derg*, 5 (1), 41-49.
- Deschamps S, Llaca V, May GD, 2012: Genotyping by Sequencing in Plants. *Biology*, 1 (3), 460-483.
- Drabik A, Bodzon-Kulakowska A, Silberring J, 2016: Gel Electrophoresis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, (Second Edition), 165-167, Academic Press, Elsevier Inc, USA.
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT, 2008: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*, 85 (1), 50-58.
- Gariyban L, Avashia N, 2013: Research techniques made simple: Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3), 1-4.
- Green MR, Sambrook J, 2018: Touchdown polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protoc*, 2018 (5), 350-353.
- Green MR, Sambrook J, 2019a: Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*, 436-456.
- Green MR, Sambrook J, 2019b: Inverse polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*, 2019 (2).

- Gürsoy NC, Otlu B, 2017: Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res*, 1 (Special issue), 56–67.
- Heather JM, Chain B. 2016: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1), 1-8.
- Hirschhorn JW, Schandl CA, Nolte FS, 2022: Polymerase chain reaction and other nucleic acid amplification technology. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, McPherson RA, Pincus MR (Ed), 1387-1400, Elsevier Inc, USA.
- Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT, 2013: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 32 (1), 31-38.
- Kavsaoglu AR, Mersinkaya İ, 2019: Python ile Mini Jel Elektroforez Kontrol Yazılımı ve Sistem Tasarımı. *GU J Sci Part C*, 7 (4), 969-984.
- Kekeç I, Sipahi N, İkiz S, 2022: New generation genome sequencing methods. *J Surg Med*, 6 (4), 503-506.
- Kengen SWM, 2017: *Pyrococcus furiosus*, 30 years on. *Microb Biotechnol*, 10 (6), 1441-1444.
- Kralik P, Ricchi M, 2017: A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*, 8, 108.
- Li J, Makrigiorgos GM, 2009: COLD-PCR: A new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 2): 427-432.
- Lorenz TC, 2012: Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, (63): 1–15.
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. 2012: Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*, 7 (2), 7 (3), e30087.
- Mao X, Liu C, Tong H, Chen Y, Liu K, 2019: Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am J Transl Res*, 11 (12), 7209-7222.
- Mo Y, Wan R, Zhang Q, 2012: Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods Mol Biol*, 926, 99-112.
- Mohammed S, Birhan G, Admassu B, Shite A, Yeneneh H, 2015: Review on polymerase chain reaction and its diagnostic merit over conventional techniques in animal disease. *Int J Basic Appl Sci*, 7 (5), 262-281.
- Mullis KB, 1990: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262 (4), 56-65.
- Nehdi A, Samman N, Aguilar-Sánchez V, Farah A, Yurdusev E, Boudjelal M, Perreault J, 2020: Novel strategies to optimize the amplification of single-stranded DNA. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 401.
- Öz Aydın S, 2004: RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Journal of Scientific Reports-A*, 6, 113-130.
- Patrinou GP, Danielson PB, Ansorge WJ, 2016: Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. In *Molecular Diagnostics: Third Edition*. Elsevier Ltd. Amsterdam, NL.
- Pavšič J, Žel J, Milavec M, 2016: Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Anal Bioanal Chem*, 408, 107–121.
- Perkel J, 2015: Guiding our PCR experiments. *BioTechniques*, 58 (5), 217.
- Pierce KE, Wangh LJ, 2007: Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies. Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Methods Mol Med*, 132, 65–85.
- Price CW, Leslie DC, Landers JP, 2009: Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab Chip*, 9, 2484-2494.
- Porta AR, Enners E, 2012: Determining annealing temperatures for polymerase chain reaction. *Am Biol Teach*, 74 (4), 256–260.
- Phung TTB, Chu SV, Vu ST, Pham HT, Nguyen HM, Nguyen HD, Le NT, Nguyen DV, Truong PT, Vu VTT, Nguyen ATV, 2020: COLD-PCR method for early detection of antiviral drug-resistance mutations in treatment-naive children with chronic Hepatitis B. *Diagnostics*, 10 (7), 491.
- Ryazantsev DY, Voronina DV, Zavriev SK, 2016: Immuno-PCR: achievements and perspectives. *Biochem (Mosc)*, 81 (13), 1754-1770.
- Sanger F, Nicklen S, ve Coulson AR, 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 (12), 5463–5467. Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ, 2004: Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci*, 101 (7), 1933-1938.
- Seker E, Kus FS, 2019: Prevalence, virulence factors and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 on feces of adult ruminants slaughtered in three provinces of Turkey. *Vet Arhiv*, 89 (1), 107-121.
- Seker E, Ozenc E, Turedi OK, Yilmaz M, 2022: Prevalence of *mecA* and *pvl* genes in coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms in Turkey. *Anim Biotechnol*, DOI: 10.1080/10495398.2022.2094802
- Seok Y, Byun JY, Mun H, Kim MG, 2014: Colorimetric detection of PCR products of DNA from pathogenic bacterial targets based on a simultaneously amplified DNAzyme. *Microchim Acta*, 181, 1965-1971.
- Sevindik E, 2013: Nested PCR and applications area. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 22-26.
- Simsek M, Demir C, Seker E, 2021: Investigation of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (*bla_{NDM-1}*) gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriales* strains isolated from a university hospital in Turkey. *Med Sci*, 10 (2), 571-576.
- Şeker E, Özenç E, Baki Acar D, Yilmaz M, 2019: Prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococci* isolated from Pirlak Sheep with subclinical mastitis in Turkey. *Kocatepe Vet J*, 12 (4), 424-429.
- Tekin K, Aygar İS, Hoşbul T, 2020: Basic Principles of Polymerase Chain Reaction Technology. *J Mol Virol Immunol*, 1 (1): 57-66.
- Ugozzoli L, Wallace RB, 1991: Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, 2 (1), 42-48.
- Wang X, Lim HJ, Son A, 2014: Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *J Toxicol Environ*, 29 (1), e2014007.
- Wang Y, Zhao Y, Bolla A, Wang Y, Au KF, 2021: Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol*, 39 (11), 1348-1365.
- Watson JD, Crick FH, 1953: Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (4356), 737-738.
- Witter CD, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP, 1997: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22, 130-138.
- Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, Chen J, Robinson HE, Shim HS, Chmielecki J, Pao W, Engelman JA, lafrate AJ, Leet LP, 2014: Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med*, 20, 1479-1484.
- Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P, 2020: PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69 (4), 317-325.