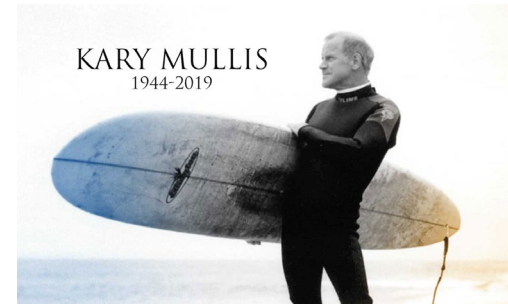


İstenilen gen nasıl tanımlanır ve klonlanır?



- **Polimeraz zincir tepkimesi**

- 1980'lerde geliştirildi – hücre dışı DNA sentez yöntemi
- Belirli bir DNA dizisinin kısa sürede pek çok kopyasını üretmek için bir teknik
- Yöntem
 - Çoğaltılacak DNA, nükleotitler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampon ve DNA polimeraz bir tüpe eklenir.
 - İleri ve geri primerler eklenir – çoğaltılması istenilen bölgeye özgü tamamlayıcı küçük DNA parçaları (20–30baz uzunluğunda)
 - Tüp termal döngü cihazı (PCR cihazı) olarak adlandırılan cihaza yerleştirilir ve tepkime gerçekleşir.

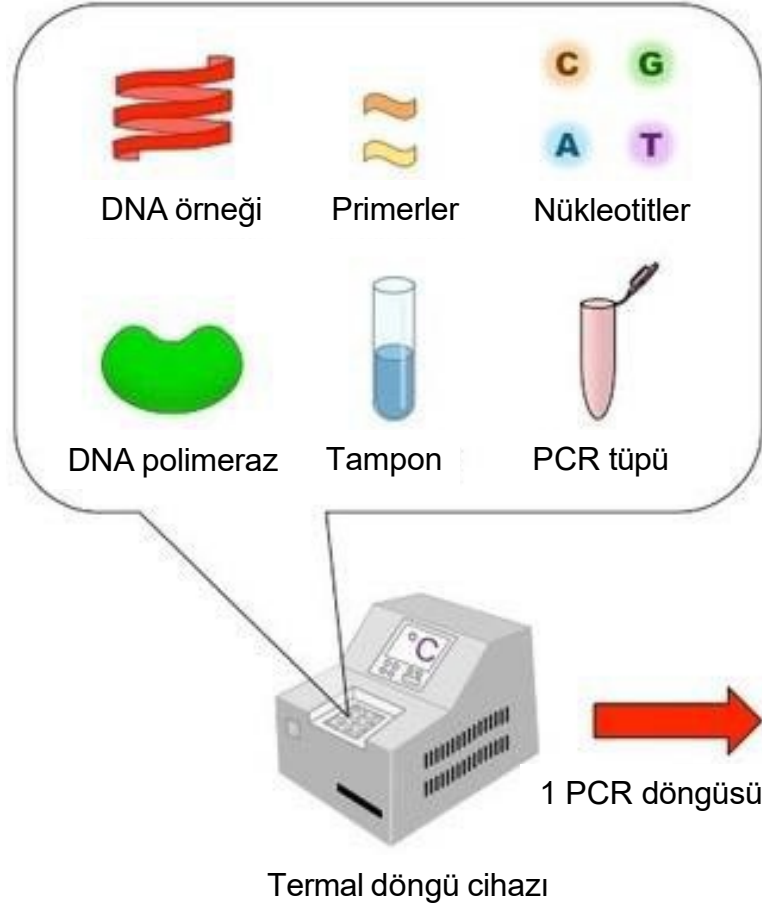
ThermoFisher
SCIENTIFIC



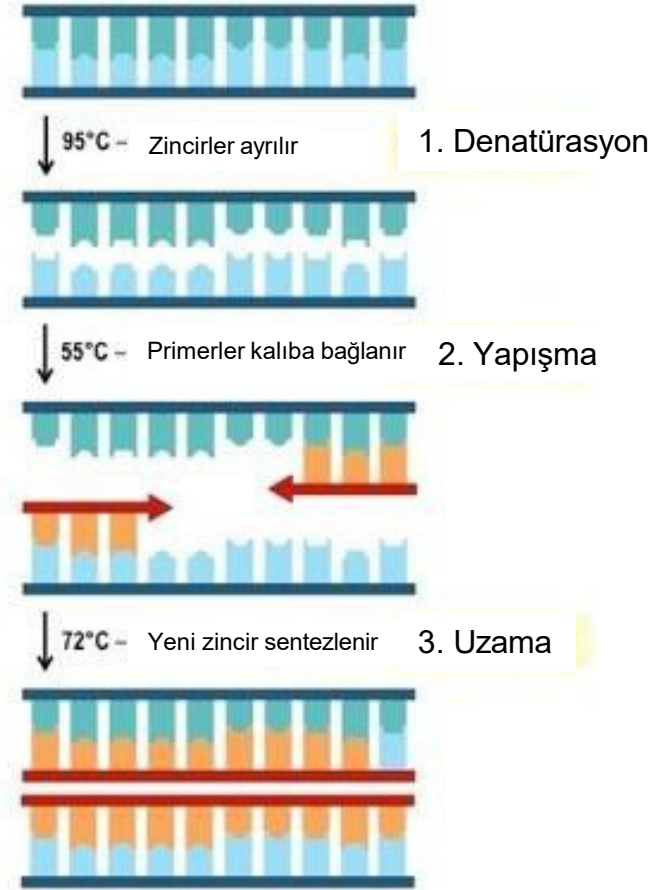
3.3 İstenilen gen nasıl tanımlanır ve klonlanır?

- PCR cihazı DNA'yı bir dizi tepkimeden geçirir – PCR döngüleri
 - **Her döngü 3 basamaktan oluşur**
 1. Denatürasyon (ayrılma) – 94 °C - 96 °C ısıtma
 2. Birleşme (hibridizasyon) – Primerler 55 °C - 65 °C'de hedef DNA dizisindeki tamamlayıcı bazlarla H-bağı yapar
 3. Uzama – DNA Pol hedef DNA'yı 70 - 75 °C'de kopyalar
 - Her döngü sonunda DNA miktarı 2'ye katlanır
 - Aynı döngü 20–30 defa tekrarlanır

PCR bileşenleri



PCR tepkimesi (1 döngü)



2 Primerler (Forward ve Reverse Primer)	Hedef DNA bölgesinin iki ucuna bağlanan kısa DNA dizileri (genellikle 18–25 baz)	DNA polimerazın senteze başlayacağı noktayı belirler, özgüllüğü sağlar.
3 dNTP'ler (Deoksinükleotid trifosfatlar: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	DNA sentezinde kullanılacak yapı taşları	Yeni DNA zincirinin sentezi için gereken nükleotidler sağlar.
4 DNA Polimeraz (genellikle Taq Polimeraz)	<i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen ısıya dayanıklı enzim	Her döngüde DNA sentezini yapar; yüksek sıcaklıklarda bozulmadan çalışır.
5 $MgCl_2$ (Magnezyum klorür)	Polimeraz enziminin kofaktörü	Enzimin aktif hale gelmesini ve DNA'ya bağlanmasını sağlar.
6 Tampon (Buffer)	Genellikle Tris-HCl, KCl ve Mg^{2+} içeren çözelti	pH ve iyonik ortamı sabit tutar; enzimin optimum koşullarda çalışmasını sağlar.

Tris HCl (pH 8.3–8.8)

Reaksiyonun pH'sını sabit tutar.

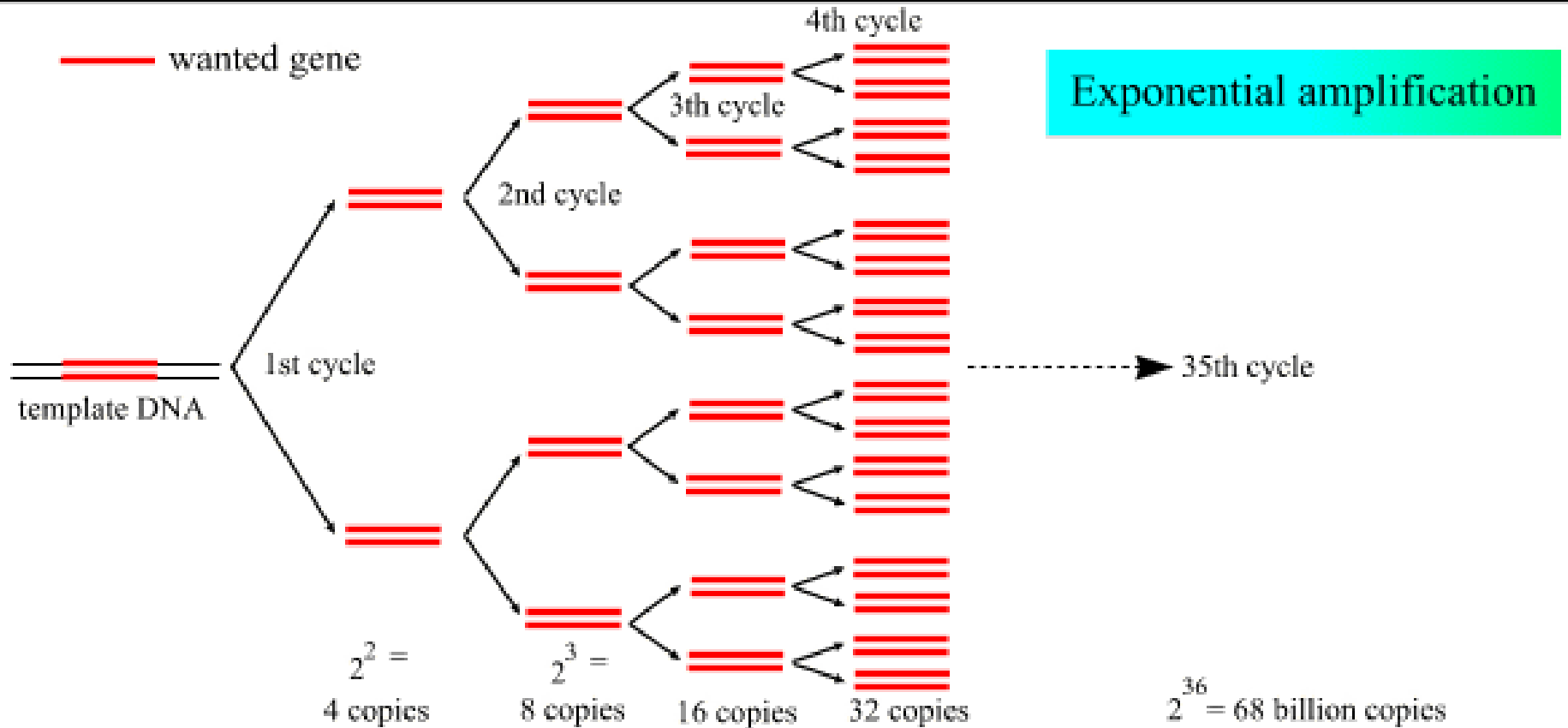
KCl (veya NaCl)

Primerlerin hedef DNA'ya özgül şekilde bağlanmasını kolaylaştırır (iyonik denge).

MgCl₂

DNA polimerazın çalışması için zorunlu kofaktördür. Mg²⁺ iyonu olmazsa polimeraz DNA sentezi yapamaz.

- <https://www.youtube.com/watch?v=V2JYy6-DE9c>



(Andy Vierstraete 1999)

3.3 İstenilen gen nasıl tanımlanır ve klonlanır?

PCR avantajları:

- Kısa bir zaman içinde çok az bir başlangıç örneğinden milyonlarca kopya DNA üretir
- 1 molekül DNA ile başlanan bir PCR tepkimesinin sonunda kaç kopya olduğunun hesaplanması: 2^N
N: döngü sayısı

Hastalık

Hedef DNA/RNA

Örnek Test Türü

COVID-19

SARS-CoV-2 RNA

RT-PCR (ters
transkripsiyon PCR)

HIV

Viral RNA

RT-PCR

Hepatit B / C

Viral DNA / RNA

PCR veya RT-PCR

Tüberküloz

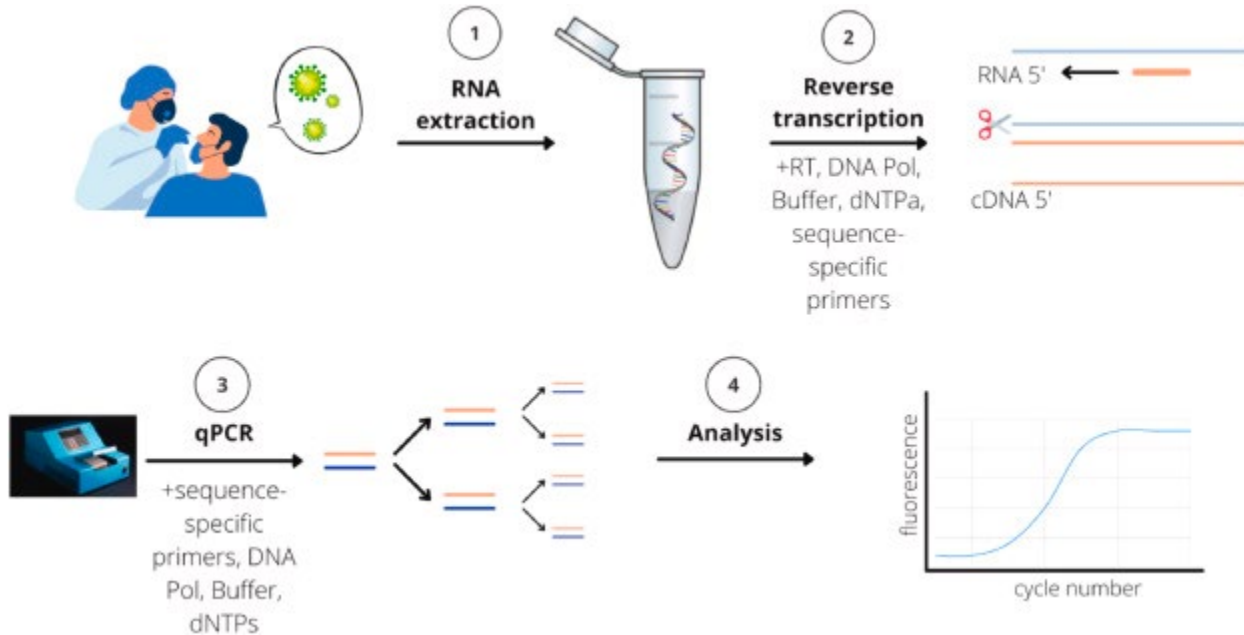
*Mycobacterium
tuberculosis* DNA

Konvansiyonel PCR

HPV enfeksiyonu

Viral DNA

PCR



PCR Türü

Özelliđi

Kullanım Alanı

**RT-PCR (Reverse
Transcription PCR)**

RNA'yı DNA'ya çevirip
çoğaltır

RNA virüsleri (COVID-19, HIV)

qPCR (Real-Time PCR)

DNA miktarını anlık olarak
ölçer

Viral yük tayini, gen
ekspresyon analizi

Multiplex PCR

Aynı anda birden fazla geni
tespit eder

Panel testler, patojen
kombinasyonları

Nested PCR

Hassasiyeti artırır

Düşük DNA içeren örnekler

Digital PCR

Çok düşük DNA kopyalarını
bile sayısal olarak tespit eder

Kanser biyobelirteçleri, likit
biyopsi



3.3 İstenilen gen nasıl tanımlanır ve klonlanır?

- Uygulamalar
 - Gen ifadesi çalışmaları
 - Bakteri ve virüs enfeksiyonlarının tespiti
 - Genetik hastalık tanısı
 - Olay yerinde bulunan az miktarda dokudan elde edilen DNA'nın tespiti
 - Fosillerden elde edilen DNA tespiti
 - Tarımda tohum saflığının belirlenmesi
 - Sistematik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde)

3.4 Rekombinant DNA teknolojisinde laboratuvar teknikleri ve uygulamalar

