

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

A. Kadir DEVRİM*

Necati KAYA*

Yayın Kodu: 2003/28-D

Özet: DNA'nın genetik bilgiyi taşıdığına ortaya konması, canlıyı araştıran yöntemlerin moleküler düzeye yönelmesine neden olmuştur. Moleküler genetik teknikler sayesinde birçok hastalığın kesin ve hızlı teşhisi yapılmakta ve genetik tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Fötal dönem hastalıkları, DNA parmak izi çalışmaları ve ailesel kanser taramaları mümkün olmaktadır. Babalık tayini, cinayet vakalarının aydınlatılması gibi adli tıp alanında da genetik analizler yapılmaktadır. DNA'nın hızlı ve güvenilir bir şekilde çalışılmasına imkan veren polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfi ve takip eden yıllarda geliştirilmesi ile moleküler genetik alanındaki gelişmeler ivme kazanmıştır. Bu derlemede; PCR tekniğinin temel prensibi, işleyişi ve kullanılabileceği sahalarda hakkında bilgi sunulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Polimeraz zincir reaksiyonu, PCR.

Polymerase Chain Reaction

Summary: The discovery of DNA's genetic information function led the methods that study living beings to move to the molecular level. By means of molecular genetic technics many of diseases have been diagnosed definitely and genetic therapy methods have been improved. The health of fetus can be determined before the birth and by the DNA fingerprinting studies familial cancer researchs can be made. Genetic studies such as paternity determination and enlightening crime events in forensic medicine can be made. The investigation and development of polymerase chain reaction (PCR) allow DNA studies to be safe and rapid. The aim of this review is to give information about basic principles of process and usage of PCR technics.

Keywords: Polymerase chain reaction, PCR.

GİRİŞ

DNA, ilk kez 1869' da Friedrich Miescher tarafından irindeki hücrelerden ve alabalık sperminden izole edilmiştir. Miescher elde ettiği izolata, hücre çekirdeğinde yer almasından dolayı nüklein adını vermiştir. Takip eden 70 yıl boyunca nükleik asitlerin ana iskelet yapısı ve temel yapıtaşları ortaya konmuştur¹.

DNA'lar genetik bilgiyi içeren biyomoleküller olup, protein sentezinde amino asit dizisini belirlerler. Bu bilgi aktarımı, aracı madde olan haberci RNA (mRNA) tarafından yapılır. DNA sadece yüksek organizmaların değil bakterilerin ve virusların da genetik materyalini oluşturur. Ancak DNA miktarı, dolayısıyla bilgi içeriği; yüksek organizmalar, bakteriler ve viruslarda farklılık gösterir².

DNA, hücrelerde replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalından ayrılan ipliklerin, tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Böylece, hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçerler. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle jenerasyonlar

boyunca DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar³. Günümüzde DNA'nın hızlı ve güvenilir bir şekilde çalışılmasına olanak veren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sayesinde doğal hücre bölünmesine benzer şekilde, seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katı kopyalanabilir^{3,4}.

PCR'İN TANIMI

PCR, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş, bir veya birden fazla bölgenin, kimyasal olarak sentezlenmiş olan oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan *Taq* polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik thermocycle sistem yardımıyla in vitro şartlar altında çoğaltılma metodudur^{4,5}.

PCR işleminde amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını amplifiye etmek, yani çoğaltmaktır. Bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak iki oligonükleotid kullanılır. Bu oligonükleotidler tipik olarak farklı dizilere sahiptir. Yine bu oligonükleotidler, kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve amplifiye olacak DNA'nın parçası yanında bulunan dizilere eşitler. Kalıp DNA ilk önce iki oligonükleotidin ve

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

dört deoksiribonükleozid trifosfatın (dNTP) varlığında ısıyla denatüre edilir. Daha sonra tepkime karışımının ısısı, oligonükleotid primerlerinin kalıp dizilere yapışmasına olanak verecek şekilde düşürülür. Primerler yapıştıktan sonra uygun bir ısıya çıkarılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Denaturasyon, annealing (yapışma) ve DNA sentezi döngüleri bu şekilde birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki için kalıp işlevi gördüğünden her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar^{4,6}.

PCR'İN TARİHÇESİ

Günümüzde PCR olarak anılan, in vitro DNA amplifikasyonunun prensibi ilk kez 1974'te kimyasal gen sentezine bir alternatif olarak Panet ve Khorana tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem adını, 1985'te tek kopya genlerinin çoğaltılmasını tanımlayan, Mullis ve arkadaşlarından almıştır^{7,8}. PCR ilk defa 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmış bir tekniktir. 1988 yılında *Thermus aquaticus* adlı bakteriden yüksek sıcaklıklara dayanıklı DNA polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonu için kullanıma sunulması, PCR' in uygulama alanlarını genişletmiştir. Daha sonraki yıllarda çeşitli amaçlarla kullanılan bu metot sayesinde tıp, veteriner, biyoloji ve genetik ile ilgili bilim dallarında çok sayıda yeni buluşlar ve gelişmeler olmuştur⁵.

1980'li yılların ortalarında geliştirilmesinin ardından, temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrosis, 'fragileX' sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta, hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından, spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur^{3,9,10}.

PCR'İN MEKANİZMASI

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler.

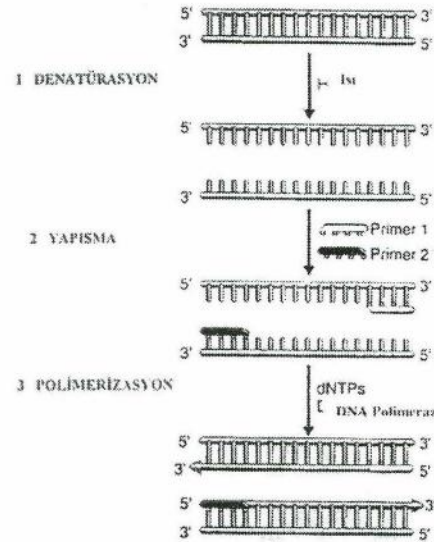
Primerlerin, spesifik olan hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

Bir PCR döngüsü denaturasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ard arda tekrarlanan denaturasyon, primerin bağlanması ve uzaması evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde, diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır⁵.

PCR'İN BASAMAKLARI

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü aşağıda belirtilen 3 basamakta cereyan eder (Şekil 1):

1. Denaturasyon: Denaturasyon, çift zincirli DNA moleküllerinin sıcaklıkla açılmasıdır. G+C' ce zengin dizilerde denaturasyon ısısı artabilir. Denaturasyonun tam olmaması halinde verim düşer. DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise DNA polimeraz aktivitesini düşürür⁵.

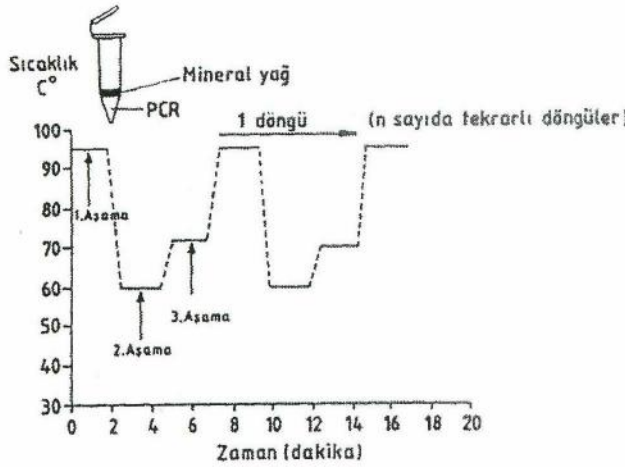


Şekil 1. PCR amplifikasyonu¹¹.
Figure 1. PCR amplification¹¹.

2. Primer Yapışması (Annealing): Primer yapışması için gerekli olan sıcaklık hesaplanırken, her bir A ve T için 4 °C alınır. Yapışma sıcaklığı 55-72 °C arasında değişir (Şekil 2)⁵. Primer yapışması için gerekli za-

manın uzunluğu ve uygulanacak ısı, amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır¹²⁻¹⁴.

3. Zincirin uzaması (Extension): Zincir uzaması 5'→3' yönünde olup, uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. En uygun sıcaklık 72 °C' de 1 dakikadır. 1 dakikada 2 kb' a kadar uzama sağlanabilir. Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlıdır. Tek DNA ile başlandığında en fazla 40 döngü, çok DNA ile başlandığında ise ideal döngü sayısı 30 olmalıdır. Çok döngü, hatalara yol açarak spesifik olmayan arka plan ürünlerini oluşturur. İstenilen ürünün 0,3-1 pmol civarına ulaşması ile birlikte oluşan ürünün üssel olarak azalmasına, plato etkisi denir. Bunun nedeni; substrat kullanımının azalması, enzimin kararsız hale gelmesi, son ürün inhibisyonu, spesifik olmayan ürün veya primer-dimer yapışması ve ürünün tam olarak denatüre olmamasıdır⁵.



Şekil 2. PCR sıcaklık döngüleri: 1.Aşama: Denaturasyon, 2. Aşama: Primerin bağlanması, 3.Aşama: Sentez³.
Figure 2. PCR cycles: Stage 1: Denaturation, Stage 2: Annealing, Stage 3: Extension³.

PCR TEMEL BİLEŞENLERİ

PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli maddeler; kalıp DNA, primerler (oligonükleotidler), dNTP karışımı, DNA polimeraz enzimi, Mg²⁺ ve PCR tamponudur^{3,5,12,13}.

Primerler (Oligonükleotidler)

Seçilmiş primer dizilimi, PCR ürününün büyüklü-

ğünü ve yerini tanımlar¹²⁻¹⁴. Genel olarak primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Tipik primerler ise %50-60 G+C bileşimine sahip 18-28 baz uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken, çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır³. Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır. Konsantrasyonları 0,1 ile 0,5 mM arasında değişebilir. Bundan daha büyük konsantrasyona sahip primerlerin kullanılması kalıntıyı artırarak hatalı dizilimlere sebep olabilir⁵.

dNTP

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) polimerizasyon basamağında görev alırlar. *Taq* DNA polimeraz, düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 mM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılıdır. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün büyüklüğüne ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Uygulanacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir (3).

Kalıp DNA

PCR' da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden elde edilir³. Hedef dizileri içeren DNA, tek veya çift zincirli şekilde polimeraz zincir tepkime karışımına eklenebilir. Kalıp DNA'daki hedef dizilerin konsantrasyonu değişiklik gösterir ve genellikle araştırmacının kontrolü altında değildir^{6,13,14}.

Taq DNA Polimeraz

Thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Enzim 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. 3' → 5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur⁵⁹. Dolayısıyla sentezin yönü 5' uçtan 3' uca olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP' lerin nükleofilik etkileri nedeniyle, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar³. Yüksek konsantrasyonlarda enzim kullanımı spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına, düşük konsantrasyonlarda ise yetersiz ürün

oluşmasına sebep olabilir⁵. Termostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen *Taq* DNA polimeraz'dır. Bunun dışında *T. aquaticus*'tan *Amplitaq*, *T. flavis*'ten *Hot Tub* ve *Pyrotase*, *T. thermophilus*'tan *Tth*, *Pyrococcus furiosus*'tan *Pfu*, *Thermococcus litoralis*'ten *Vent* gibi diğer termostabil enzimler de kullanılmaktadır³.

Mg⁺² Derişimi

Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve primer-kalıp DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂'ün PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0,5-5,0 mM'lık değerler arasında olmalıdır. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar³.

PCR Tamponu

PCR'da kullanılan tamponlar arasında DNA polimeraz enzimlerine özgü olanlar daha yaygındır³. PCR için uygun olan tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCl'dir. Tamponun pH'ı ise 8,3-8,8 arasında değişir. Bu tampona 50mM kadar KCl çözeltisinin eklenmesi primer yapışmasını kolaylaştırır. Ancak 50 mM'ın üzerindeki KCl ve NaCl çözeltilerinin eklenmesi *Taq* DNA Polimeraz aktivitesini düşürür. %10 ve daha az derişimdeki DMSO (dimetil sülfoksit) da yararlıdır. Jelatin, bovin serum albumini (BSA), Tween-20 ve Laureth-12 gibi non-iyonik maddelerin enzim stabilitesine etkisi vardır, fakat zorunlu değildir⁵.

PCR'IN KULLANIM ALANLARI

Tanı

Konvensiyonel metotlar ile tanısı mümkün olmayan birçok fungal ve bakteriyel hastalıklar ile virus, viroid, mikoplazma ve riketsia gibi patojenlerin sebep olduğu hastalıkların tanısı PCR ile kolayca yapılabilir^{5,15-17}. Patojene ait genlerden bir veya birkaçına spesifik olan oligonükleotid primerler belirlenerek hastalıklı dokulardan bu primerlere spesifik genleri taşıyan genetik materyaller, PCR ile kolayca amplifiye edilebilir. Elde edilen PCR ürünleri agarose jel üzerinde elektroforez edildikten sonra patojenlere spesifik DNA bant veya bant profilleri saptanır. Böylece hastalık sebebi olan etmenin tanısı ve aynı zamanda hastalı-

ğın teşhisi yapılmış olur^{5,18}.

Mutasyonların neden olduğu çeşitli kalıtsal hastalıkların teşhisi için yine PCR metodu kullanılmaktadır. Bunun için öncelikle mutasyonun meydana geldiği DNA bölgesi PCR ile amplifiye edilir. Sonra amplifiye edilen DNA bölgesinin baz dizilişi saptanarak mutasyon noktaları taranır^{5,19}. Ayrıca son yıllarda merkezi sinir sistemi ve immun sistem gibi kompleks hetero- genöz dokuların gen analizini tek hücre seviyesinde yapabilecek sistemler üzerinde çalışılmaktadır²⁰. Bunun yanında PCR kullanılarak memeli genomunun haritalanması da yapılmaktadır²¹. PCR sayesinde 300 bp'lik bölgelerdeki kromozomal proteinlerin bile hızlı ve duyarlı bir şekilde haritalandırılması mümkün olmaktadır²².

Prenatal tanıda da, PCR genişçe kullanılmaktadır. Bazı kalıtsal hastalıkların teşhisi ve fötusun kan grubu tayini doğum öncesinde PCR ile yapılabilir. Özellikle Duchenne muskuler distrofisi ve talasemi gibi hastalıkların gebelik sürerken teşhisi yapıp, genetik danışmanlıkla birlikte annenin izni alınarak terminasyona gidilebilmekte ve böylece sakat doğumların önüne geçilebilmektedir^{5,18}.

Yine sık rastlanan, tedavi edilebilir bir genetik hastalık olan venöz tromboemboli olgularının erken teşhisinde de ve ayrıca tümör evrelerinin moleküler değerlendirilmesi ile tümöral olguların tekrarlama durumlarının araştırılmasında da PCR uygulamalarından yararlanılmaktadır^{23,24}. Deniz kirliliğine neden olan mikrobiyal etkenlerin tanısında da PCR kullanılmaktadır⁵.

Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitki veya Mikroorganizmaların Saptanması

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak genetik akrabalığı bulunmayan canlılar arasında çeşitli genlerin transferi kolayca yapılmaktadır. Tarımsal önemi fazla olan kültür bitkilerinin, verim ve kalitesini sınırlandıran faktörlere (kötü çevre şartları ve hastalıklar) karşı dayanıklılık kazandırılması ve bu bitkilerden elde edilen gıdaların besin değerinin artırılması için ihtiyaç duyulan ve değişik canlılarda bulunan bazı genler klonlama tekniği ile bir kültür bitkisine aktarılabilir. Aynı şekilde son yıllarda kirlenmiş doğanın temizlenmesinde kullanılmak üzere genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler ve mikroorganizmalar üretilerek piyasaya sunulmuştur. Sağlık alanında ihtiyaç duyulan birçok kimyasal (çeşitli antibiyotik ve enzimler) günümüzde artık genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalar

tarafından üretilmektedir. Genetik yapısı değiştirilmiş bitki ve mikroorganizmaları fenotipik özelliklerine göre doğal ebeveynlerinden ayırmak mümkün değildir. Bu tür bitki, mikroorganizma veya onların ürünlerinin saptanması için PCR metodundan faydalanılmaktadır^{5,26}.

Moleküler Klonlama (DNA Klonlaması)

PCR kullanımı, tüm moleküler biyoloji sahasında yaygınlaşmıştır. Bu alanlardan biri de moleküler klonlamadır²⁷. Bir canlı hücre içerisindeki genetik materyal (DNA veya RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin sınırsız miktarda ve saf olarak çoğaltılmasına moleküler klonlama veya DNA klonlaması denir. Bu amaçla takip edilen metot kısaca şöyle özetlenebilir: İlk önce çalışılmak istenen genetik materyal saf olarak izole edilir ve restriksiyon enzimleriyle kesilir^{5,28}. Elde edilen küçük DNA parçaları vektör kromozomlara (plazmid veya kozmid) aktarılır. Bu işlem klonlama olarak adlandırılır. Klonlanmış (rekombinant DNA) vektörler konakçı bakteri hücrelerine transfer edilir. Bu şekilde bir kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan küçük DNA parçacıklarından her birinin ayrı bir bakteri hücresine aktarılması ile genomik DNA kütüphanesi oluşturulur.

PCR teknolojisindeki gelişmelerden sonra, DNA klonlaması oldukça kolay ve pratik olmuştur. Bunun için sadece, DNA üzerinde klonlanması arzu edilen bölgenin baz dizisi hakkında ön bilgiye ihtiyaç vardır. Bu bilgiye dayanarak sentezlenen oligonükleotid primerler kullanılarak, DNA üzerinde istenilen bölgeler amplifiye edilir. Nitekim, kalıp DNA üzerindeki spesifik bir bölgenin PCR ile amplifiye edilmesi sonucu ortaya çıkan kopyaların her birisi bir DNA klonudur. Eğer PCR'da kullanılan primerler, kalıp DNA üzerinde bilinen bir genin tamamını amplifiye ediyorsa, klonlanmış DNA parçası bir klon olarak vektörlere transfer edilerek, in-vivo şartlarda ekspresyonu sağlanabilir⁵. Bu amaçla Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılabilmektedir²⁹.

DNA Baz Dizilişlerinin Belirlenmesi

Klonlanmış DNA'ların baz dizilerinin belirlenmesine ilk defa 1960'lı yıllarda başlanılmıştır⁵. 1977'de teknik daha da gelişerek insan mitokondriyal genomunun dizi analizine, 1982'de ise Lambda bakteriyofaj genomunun dizi analizine olanak vermiştir³⁰. Bugün gerek genomik DNA ve gerekse mRNA'ların PCR ile amplifiye edildikten sonra, elde edilen DNA parçacıklarının baz dizileri istenirse manuel veya tam otomatik

'Gene Sequencer' cihazı ile direkt olarak belirlenmektedir. Bu bağlamda spesifik genler bakımından farklı türler arasındaki genetik varyasyon da ortaya konabilmektedir^{5,31,32}.

Genetik Akrabalıkların Belirlenmesi ve Adli Tıp Vakalarının Aydınlatılması

Bugün akrabalıkların belirlenmesinde DNA analizleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Gerek insanlarda ve gerekse diğer canlılarda kromozom üzerinde kısa ve sıklıkla tekrarlanan bazı baz dizilişleri vardır. Örneğin insanlarda GTGTGT ... olarak tekrarlanan bu tür DNA bölgelerine VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) denir. Bir gen üzerindeki VNTR bölgesinin 2 alleli vardır ve bunlar kalıtsal olarak ebeveynlerden yeni döllere geçer. İnsan genomu üzerinde birden fazla (4-40) VNTR bölgesinin bulunduğu bilinmektedir. Genom üzerinde kalıtsal olarak bulunan farklı VNTR bölgelerinin aynı anda PCR ile amplifiye edilmesi ve sentezlenen DNA parçacıklarının elektroforez ile ayrıştırıldıktan sonra elde edilen DNA bant (2 bant/VNTR) profili (genetik fingerprint) test edilen insan için değişmeyen bir kimliktir. Bu teknik son yıllarda birçok ülkede adli vakaların aydınlatılmasında kullanılmaktadır^{5,18,33}. Bu amaçla suç işlenen mekanlarda suçluya ait olduğuna inanılarak toplanan doku veya hücrelerden (kıl,kan vb.) önce DNA izole edilir. Sonra bu DNA örneği ile suç zanlısı kabul edilen kişilerden alınan DNA örnekleri ayrı ayrı PCR ile amplifiye edilir. Elde edilen DNA fingerprintleri, birbiri ile karşılaştırılarak gerçek suçlu saptanır⁵.

KAYNAKLAR

- 1 **Lehninger AL:** Biochemistry. 309-331, Kalyani Publishers, New Delhi-1995.
- 2 **Kaya N:** Biyokimya.208-219, Atatürk Üniversitesi Yayınları No:743, Erzurum-1993.
- 3 **Temizkan G, Arda N:** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 57-66, BİYOGEM Yayınları No:1, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul-1999.
- 4 **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD:** Molecular Biology of the Cell. 3rd Edition, 316-317, Garland Publishing, New York-1994.
- 5 **Şahin F, Çiftçi M, Pirim İ:** Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kurs Notları. AÜ Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2000.
- 6 **Dieffenbach CW, Dveksler GS:** PCR Primer: A Laboratory Manual. 1-287, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York-1995.
- 7 **Taylor GR, Robinson P:** The polymerase chain reaction: From Functional Genomics to High-School Practical Classes. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 35-42, 1998.

- 8 **Persing DH:** Polymerase chain reaction: Trenches to Benches. *J Clin Microbiol*, 29:7, 1281-1285, 1991.
- 9 **Erllich HA, Gelfand D, Sninsky JJ:** Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643-1651, 1991.
- 10 **Taylor GR, Logan WP:** The polymerase chain reaction: New variations on an old theme. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 24-29, 1995.
- 11 **Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ:** Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. 426-434, Mart Matbaacılık A.Ş., 2001.
- 12 **Howe CJ, Ward ES:** Nucleic acids sequencing: A practical approach. 53-114, IRL Press at Oxford University Press, Oxford-1989.
- 13 **Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ:** PCR Strategies. 39-67, Academic Press, San Diego-1995.
- 14 **McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR:** PCR 2: A Practical Approach. 7-118, Oxford University Press, Oxford-1995.
- 15 **Banks M:** DNA restriction fragment length polymorphism among British isolates of Aujeszky's Disease virus: Use of the polymerase chain reaction to discriminate among strains. *Br Vet J*, 149, 155-162, 1993.
- 16 **Johnson JR:** Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *J Mic Meth*, 41, 201-209, 2000.
- 17 **Mandrell RE, Wachtel MR:** Novel detection techniques for human pathogens that contaminate Poultry. *Curr Opi Biot* 10, 273-278, 1999.
- 18 **Grainger J, Madden D:** The polymerase chain reaction: turning needles into haystacks. *Biologist*, 40:5, 197-200, 1993.
- 19 **Tag CG, Gressner AM, Weiskirchen R:** An unusual melting curve profile in LightCycler multiplex genotyping of the hemochromatosis H63D/C282Y gene mutations. *Clin Bioc* 34, 511-515, 2001.
- 20 **Dixon AK, Richardson PJ, Pinnock RD, Lee K:** Gene-Expression Analysis at the Single-Cell Level. *TIPS*, 21: 65-70, 2000.
- 21 **Schalkwyk LC, Francis F, Lehrach H:** Techniques in mammalian genome mapping. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 37-43, 1995.
- 22 **Orlando V:** Mapping Chromosomal Proteins in vivo by Formaldehyde-Crosslinked-Chromatin Immunoprecipitation. *TIPS*, 25: 99-103, 2000.
- 23 **Press RD, Deloughery TG:** Trombotik risk değerlendirmesi: Sık rastlanan, tedavi edilebilir genetik bir hastalık için moleküler ve konvansiyonel testler. *Biyokimya Dergisi*, 3: 42-46, 1999.
- 24 **Bustin S, Dorudi S:** Molecular Assesment of Tumour Stage and Disease Recurrence Using PCR-based Assays. *Molecular Medicine Today*, 389-396, 1998.
- 25 **Pommepuy M, Le Guyader F:** Molecular approaches to measuring microbial marine pollution. *Current Opinion in Biotechnology*, 9:292-299, 1998.
- 26 **Jansson JK:** Tracking genetically engineered microorganisms in nature. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 275-283, 1995.
- 27 **Rashtchian A:** Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 30-36, 1995.
- 28 **Davis LG, Dibner MD, Battey JF:** Basic Methods in Molecular Biology. 23-58, Elsevier, New York-1986.
- 29 **Lie YS, Petropoulos CJ:** Advances in Quantitative PCR Technology: 5' Nuclease Assays. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 43-48, 1998.
- 30 **Sterky F, Lundeberg J:** Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology*, 76: 1-31, 2000.
- 31 **Zhou H, Liu W, Lamont SJ:** Genetic variation among chicken lines and mammalian species in spesific genes. *Poultry Science*, 80, 284-288, 2001.
- 32 **Tillib SV, Mirzabekov AD:** Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr Opi Biot*, 12, 53-58, 2001.
- 33 **Newton CR:** PCR Essential Data. 1-56, John Wiley & Sons Ltd , Chichester-1995.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Dr. A. Kadir DEVRİM
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, 36100 Kars-TÜRKİYE
Tel : +90 474 2426801
Fax : +90 474 2426853
e-mail: akdevrim@hotmail.com