



Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Farklı Tipleri ve Modifikasyonları Different Types and Modifications of Polymerase Chain Reaction

İrem UNAT¹ [ID]

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, University of Health Sciences, Ankara, Türkiye].

Article Info: Received; 30.10.2022. Accepted; 03.12.2022. Published; 07.12.2022.

Correspondence: İrem Unat; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, University of Health Sciences, Ankara, Türkiye. E-mail: driremcurtt@gmail.com

Özet

Bu çalışmada, tıbbi araştırmalarda ve moleküler biyoloji alanında kullanıma girmesi ile bilimsel çalışmalara ivme kazandıran polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR), teknolojik değişimler ve ilerlemeler ile birlikte geliştirilen farklı tipleri ve uygulama alanlarına güncel bir bakış sunmak amaçlanmıştır. PCR temelli yöntemler genel olarak enfeksiyöz hastalıkların tanısında, mikroorganizma tiplendirmesinde, gen ekspresyonu analizinde, epidemiyoloji ve taksonomi alanlarında, onkolojik çalışmalarda, DNA klonlanmasında, nokta mutasyonlarının analizinde, transpozon elemanlarının yerleştirilmesinde, polimorfizm çalışmalarında, popülasyon tiplendirmesinde, filogenetik analizlerde, ilaç düzeyi analizinde ve otoantikör tespitinde olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Çoklu hedeflerin çoklu primer çiftleri kullanılarak aynı anda amplifikasyonu için multipleks PCR, genetik olarak birbiri ile ilişkili mikroorganizmaların ortak gen bölgelerinin amplifikasyonu için konsensus PCR, mikrobiyal genomlardaki tekrarlayan parmak izi DNA dizilerinin amplifikasyonu için rep-PCR, nonspesifik primer bağlanmalarını azaltmak ve sensitiviteyi arttırmak için nested PCR, istenmeyen yan ürünlerin ve primer dimerlerinin oluşumunu azaltmak için hot start PCR, spesifik olmayan çapa primerleri kullanılarak bilinmeyen gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlamak için anchored PCR, bilinen tek bir primer bağlama bölgesi ile bir DNA parçasının amplifikasyonu için ligasyon aracılı ve homopolimerli PCR, bağlanma sıcaklığını düzenleyerek yanlış eşleşmeleri önlemek için touch-down ve touch-up PCR, abazik primerler kullanılarak gen klonlamak amacıyla DNA parçalarının amplifikasyonu için autosticky PCR, sitozin rezidülerinin metilasyon paternlerini tanımlamak için metilasyon spesifik PCR, bilinmeyen yan DNA bölgelerin sekans analizi için ters (invers) PCR, farklı konsantrasyonlarda primerler kullanılarak tek zincirli DNA sentezlemek için asimetrik PCR, doku kesitlerindeki hücre içi amplifikasyonu görüntülemek için in-situ PCR, random primerler kullanılarak rastgele DNA segmentlerini amplifiye etmek ve popülasyon analizi için RAPD, ELISA ve PCR yöntemleri kombine edilerek düşük konsantrasyondaki ampikonların saptanması için immüno-PCR, amplifikasyonun gerçek zamanlı floresan sinyaller ile takip edilmesi ve kantitasyon için real-time PCR, mutlak kantitatif amplifikasyon için dijital PCR, uzun hedef DNA bölgelerinin amplifikasyonu için long-range PCR, RNA'dan ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenerek hedef amplifikasyonu sağlamak için de reverse transkripsiyon PCR yöntemi kullanılmaktadır. Tarih boyunca hızlı bir gelişim gösteren PCR modifikasyonları hakkında bilgi sahibi olmak, yapılacak analizlere göre uygun yöntemin seçilerek reaksiyonun sensitivite ve spesifitesini ve elde edilen ürünlerin kalitesi ve miktarını arttırmaya ve bu sayede çalışmaların başarıyla sonuçlanmasına katkıda bulunacak, teknolojik gelişmelerle beraber keşfedilecek yeni yöntemler için ise ufuk açıcı nitelikte olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Polimeraz zincir reaksiyonu, PCR, PCR tipleri, PCR modifikasyonları.

Abstract

In this study, it is aimed to provide an up-to-date overview of different types and application areas of polymerase chain reaction (PCR) developed with technological advances. PCR has accelerated scientific studies with its use in medical research and molecular biology. PCR based methods are used in many fields such as diagnosis of infectious diseases, microorganism typing, gene expression analysis, epidemiology and taxonomy fields, oncological studies, DNA cloning, analysis of point mutations, insertion of transposon elements, polymorphism studies, population typing, phylogenetic analysis, drug level analysis, and autoantibody detection. Multiplex PCR is used for simultaneous amplification of multiple targets using multiple primer pairs, consensus PCR is used for amplification of common (*conserved*) gene regions of genetically related microorganisms, rep-PCR is used for amplification of repetitive fingerprint DNA sequences in microbial genomes, nested PCR is used to reduce non-specific primer binding and increase sensitivity, hot start PCR is used to reduce the presence of non-specific products and primer dimers, anchored PCR is used to enable amplification of unknown gene regions using non-specific anchor primers, ligation mediated and homopolymer PCR is used for amplification of a DNA segment with a single known primer binding site, touch-down and touch-up PCR is used to prevent mismatches by regulating annealing temperature, autosticky PCR is used for amplification of DNA fragments for gene cloning using abasic primers, methylation specific PCR is used to determine the methylation patterns of cytosine residues, inverse PCR is used for sequence analysis of unknown flanking DNA regions, asymmetric PCR is used to synthesize single-stranded DNA using primers of different concentrations, in-situ PCR is used to visualize intracellular amplification in tissue sections, RAPD is used for amplifying random DNA segments using random primers and for population analysis, immuno-PCR is used for detection of low concentration amplicons by combining ELISA and PCR methods, real-time PCR is used for quantitation and monitoring of amplification with real-time fluorescent signals, digital PCR is used for absolute quantitative amplification, long-range PCR for amplification of long target DNA regions, and reverse transcription PCR is used to provide amplification by synthesizing cDNA from RNA with reverse transcriptase enzyme. PCR modifications have developed rapidly throughout history. Having knowledge about these modifications will be an eye-opener for new methods to be discovered with technological developments, will contribute to selection of appropriate methods, and will increase the sensitivity and specificity of the reactions.

Keywords: Polymerase chain reaction, PCR, PCR types, PCR modifications.

Giriş

DNA sekanslarının in-vitro olarak amplifiye edilmesi amacıyla geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), fen bilimleri alanında devrim niteliğindeki değişikliklerin önünü açan yüksek duyarlılığa sahip bir moleküler tanı tekniğidir [1]. Biyomedikal bilimlerde, genetik ve biyoteknoloji alanlarında, adli araştırmalarda ve enfeksiyon hastalıklarının tanısında yaygın olarak kullanılan önemli bir moleküler tanı ve uygulama aracı olan PCR yönteminin ayrıca, antropoloji ve arkeoloji gibi bilim alanlarında kullanılan farklı uygulamaları da mevcuttur [1].

Panet ve Khorana'nın başarılı in-vitro DNA amplifikasyonu çalışmalarına dayalı olarak Mullis ve ark. tarafından 1980'lerin başında geliştirilen ve araştırmacılara Nobel ödülü kazandıran PCR günümüzde çok çeşitli laboratuvar ve/veya klinik uygulamada sık tercih edilen bir moleküler teknik haline gelmiştir [2]. PCR'ın belirli özel amaçlara

yönelik ve spesifik koşullarda yüksek duyarlılık ve özgüllükte çalışabilmesi için çeşitli uygulamaları ve modifikasyonları geliştirilmiş ve ayrıca bu yöntemin diğer birçok moleküler teknikle kombine edildiği prosedürler tanımlanmıştır. Bu derleme makalede PCR'ın yaygın kullanılan veya spesifik uygulamalarda tercih edilen özgün tasarımlı modifikasyonlarına (*tiplerine*) güncel bir bakış sunulması amaçlanmıştır.

Multipleks PCR

Standart bir PCR testi bir çift oligonükleotit primerin kullanılması ile belirli bir gen bölgesinin milyonlarca kopyasının çoğaltılması prensibi ile çalışır. Farklı spesifik özelliklere sahip çeşitli primer çiftlerinin aynı reaksiyonda kullanılabilmesi (*multipleks PCR*), PCR'ın tanısallık potansiyeline çok boyutlu bir perspektif kazandırmıştır [3]. Bu uygulama ile bir klinik örnekte iki veya daha fazla sayıda mikrobiyal etkenin veya aynı etkenin farklı

alt tiplerinin varlığı aynı anda araştırılabilmekte, hatta reaksiyon karışımına internal kontroller eklenerek tüm amplifikasyonlar aynı reaksiyon koşullarında tek tüp içerisinde ve tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir [3-5]. Multipleks PCR, tek aşamalı klasik PCR'dan çok daha fazla sayıda kompleks reaksiyonu içerdiği için bu sistemin çalışması öngörülenden daha zordur ve bu testler ancak uzun denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrasında başarılı olarak uygulanabilmektedir [3,4]. Bu nedenle kullanıcılar prensipte bu paralel amplifikasyon reaksiyonlarının her birinin kendi kinetiği ve etkinliği ile ilerleyeceğini ve bu duruma bağlı olarak bir reaksiyonda her hedef için farklı duyarlılık ve özgüllüğün ortaya çıkabileceğini bilmelidirler [3]. Farklı organizmalara veya gen bölgelerine ait farklı hedefleri kapsayan multipleks test tasarımlarında ortaya çıkabilecek en önemli sorunlar; (i) amplifikasyon etkinliği ve hedefin büyüklüğü arasında üssel olarak ters yönlü bir ilişkinin olması, (ii) iki veya daha fazla hedef gen bölgesinin homolog segmentleri veya benzer dizileri paylaşması durumunda farklı amplikonlar arasında heterodubleks formasyonların meydana gelebilmesi, (iii) tasarlanan primerlerin birbiri ile etkileşebilmesi ve bu durumun test performansı üzerine olumsuz etkilere yol açabilmesi olarak sıralanabilir [3]. Başarılı bir multipleks PCR testi için primerlerin nispi konsantrasyonları, PCR test tamponunun konsantrasyonu, magnezyum klorür ve dNTP konsantrasyonları arasındaki denge, termal döngü sıcaklıkları ve hedef DNA ve Taq DNA polimeraz miktarlarının optimizasyonu en önemli değişkenlerdir [4,6]. Tek primer çiftinin kullanıldığı simpleks PCR ile karşılaştırıldığında multipleks PCR'da zincir sentezinin tamamlanması daha uzun sürmekte ve bu yüzden de multipleks test tasarımlarda ekstensiyon (*zincir uzaması*) basamağı genellikle daha uzun süreli olacak şekilde programlanmaktadır [3]. Test etkinliğini etkileyen diğer önemli parametreler arasında bağlanma ısı (T_{ann}) ve reaksiyon tamponunun yoğunluğu yer alır [3]. Multipleks PCR testlerinde PCR ürünlerini saptamak ve görüntülemek için spesifik probler, faklı floroforlar veya SYBR green gibi nonspesifik boyalar kullanılabilmektedir [5,7].

Multipleks PCR testlerinin tek reaksiyon tüpünde birden fazla etkenin veya genin varlığını saptama prensibi ile temelde işgücü ve maliyetin

azaltılması hedeflemektedir [7]. Multipleks PCR yaklaşımı, bu avantajları ile hem klinik hem de araştırma laboratuvarında hızlı ve kullanışlı bir araç haline gelmiştir [4]. Multipleks PCR temelli tanı-tarama test panellerinin oluşturulmasında enfeksiyondan etkilenen sistem (etken dağılımı), testin kullanılacağı popülasyonun yaş grubu ve epidemiyolojik özellikleri gibi farklı parametreler dikkate alınır [8,9]. Günümüzde kullanıcı tasarımı veya ticari olarak kullanıma sunulan multipleks PCR testleri tanısal mikrobiyolojide solunum yolu enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve gastroenterit etkenlerinin laboratuvar tanısında yaygın olarak kullanılmakta ve ayrıca bazı etkenler için tarama testi olarak tercih edilmektedir [5,8,10-12].

Konsensus (*Broad-Range*) PCR

Herhangi bir patojenin veya enfeksiyöz bir etkenin tanımlanamadığı numunelerde muhtemel etkeni saptayabilmek için geniş kapsamlı tarama testlerine ihtiyaç duyulur [13]. Konsensus PCR aynı ailede yer alan (panflavivirus) veya farklı cinslerde sınıflandırılan birden fazla türün (panfungal) ya da bir türün farklı genotiplerinin (HPV MY09/11, HPV GP5/6) kapsamlı (*konsensus, universal*) genel tarama primerleri ile saptanması prensibine dayanır [7,14,15]. Konsensus dejenere primerlerin (farklı baz varyasyonlarını içeren çoklu primer seti [16]) kullanıldığı pan-viral grup PCR testleri bilinen veya henüz keşfedilmemiş yeni virüs türlerini tanımlamada kullanılmıştır [13]. Dejenere primer setlerinin (MY09/11 primer seti gibi) kullanıldığı konsensus PCR yaklaşımının bir örneği olan HPV genel tarama testleri ise dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Konsensus PCR metodu, tüm bakteriler için ortak olan korunmuş gen (16S RNA) bölgelerinin amplifikasyonu ve sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin nükleotit dizi analizi ile tanımlanması yaklaşımı ile hemen her bakteri türünü saptama potansiyeline sahiptir [17]. Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda broad range PCR'ın kalp kapakçıkları, beyin omurilik sıvısı (BOS), eklem sıvısı ve eklem dokusu örnekleri, kan ve apseler de dahil olmak üzere farklı örneklerdeki bakteriyel ve fungal enfeksiyon etkenlerini saptamadaki etkinliği test edilmiştir [17,18]. Bununla beraber, Konsensus PCR testlerinin bazı dezavantajları da

bulunmaktadır. Bu yaklaşımın kısıtlılıkları; tür-tip spesifik PCR ile kıyaslandığında daha düşük duyarlılıkta sonuçlar vermesi, dejenere primerler başta olmak üzere konsensus primer tasarımının daha zor olması ve spesifik tanımlamaya imkan vermediği için konsensus PCR ile pozitif olarak değerlendirilen örneklerde dizi analizi ya da cins-tür-tip spesifik testler gibi ikincil metotlarla yeniden tanımlamanın gerekli olmasıdır [7,16,19].

Tekrarlayıcı Sekans Temelli PCR (rep-PCR)

Ökaryotik genomların büyük bölümü, RNA'ları ve proteinleri kodlayan benzersiz (*unique*) DNA dizilerinden oluşur, ancak tek kopya fragmanlar arasına serpiştirilmiş çok sayıda tekrarlayıcı gen bölgeleri içerirler [20]. Benzer şekilde farklı gram negatif ve gram pozitif bakteri türlerini kapsamak üzere prokaryotik genomlarda da tekrarlayan gen dizilerinin varlığı gösterilmiş ve bu dizilerin çeşitli sınıfları tanımlanmıştır [20,21]. Bu tekrarlayan dizilerin hedeflendiği tekrarlayıcı intergenik PCR (*repetitive intergenic PCR*, rep-PCR) bakteriyel genomlarda bulunan bu sekanslarının analizi ile bakterilerin DNA parmak izlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [21,22]. rep-PCR tekniği, aynı türün yakın ilişkili serovarları arasında ayırım yapmada ve filogenetik ve epidemiyolojik ilişkileri analiz etmede başarı ile kullanılmıştır [20].

Farklı bakteri türlerinin tanımlanması ve tiplendirilmesi için yöntemin farklı uygulamaları geliştirilmiş olup, ERIC1 PCR, ERIC2 PCR, BOX-PCR ve (GTG)₅-PCR bunlardan bazılarıdır [22]. Bakteri tiplendirmede yaygın kullanılan sekanslar tekrarlayıcı ektragenik palindromik (*repetitive extragenic palindromic*, REP) ve enterobakteriyel tekrarlayıcı intergenik konsensüs (*enterobacterial repetitive intergenic consensus* ERIC) dizileridir [20,22]. *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri de dahil olmak üzere çok sayıda bakteri türünde bulunan ERIC sekansları birçok gelişmiş moleküler-genomik tekniğin varlığına rağmen günümüzde halen farklı bakteri suşlarını (örn., *Escherichia coli*) saptamak ve tanımlamak için hızlı ve uygun maliyetli bir parmak izi (*fingerprint*) yöntemi olarak kullanılmaya devam etmektedir [23]. *Clostridium difficile* izolatlarının tiplendirilmesinde rep-PCR'ın uygulanabilirliğinin değerlendirildiği bir çalışmada [21], rep-PCR ile elde edilen sonuçların darbeli alan jel elektroforezi (*pulsed-field gel*

electrophoresis, PFGE) yöntemi ile üretilen model farklılaşmaları ile yüksek düzeyli uyum sergilediği, PCR ribotipleme yöntemine göre ise daha yüksek düzeyde bir ayırım gücü gösterdiği bildirilmiştir.

Yuvalanmış (Nested) PCR

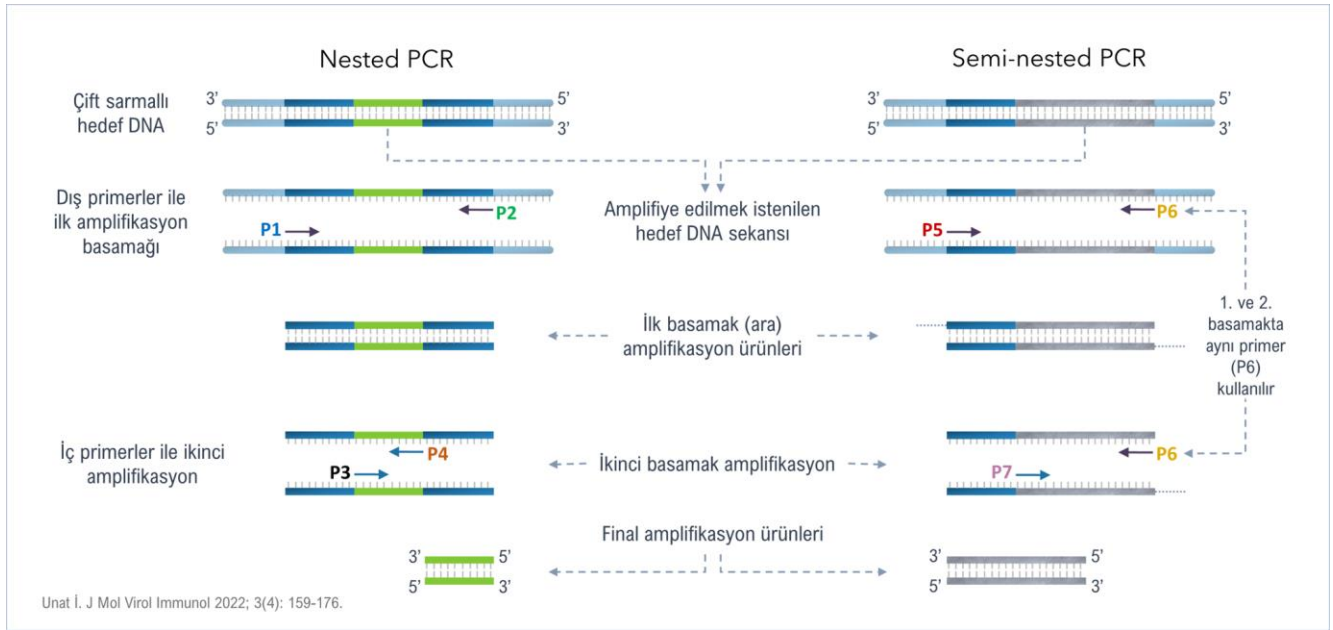
Enfeksiyon hastalıklarının tanısında düşük kopya sayılı hedef nükleik asitlere karşı yüksek miktarda istenmeyen konak DNA'sı bulunan klinik örneklerde veya görece yüksek miktarda DNA polimeraz inhibitörü(leri) içeren çeşitli biyolojik ve çevresel örneklerde hedef gen amplifikasyonu istenilen düzeylerde gerçekleştirilemeyeceği için hedef genomların saptanmasında karşılaşılan problemleri çözmek için nested PCR protokolleri tanımlanmıştır [3]. Nested PCR'ın tipik protokolü "bir çift" dış (*outer*) primer ile 30-35 siklusa oluşan ilk amplifikasyon basamağı ile başlar, reaksiyon döngüleri tamamlandığında elde edilen ürünler "bir çift" iç (*inner*) primerin kullanıldığı ikinci bir ardışık amplifikasyon işlemine tabi tutulur ve böylece iki aşamalı PCR protokolü tamamlandığında hedef gen bölgesi yüksek kopya sayılarında elde edilmiş olur [3,24]. Yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü sıklıkla iç primerlerin pozisyonları belirlemektedir [3]. Nested PCR'da ilk aşamada ve ikinci aşamada kullanılan primerler farklı olduğu için nonspesifik ürünlerin istenmeyen amplifikasyonu ve kontaminasyonlar minimize edilir ve böylece reaksiyon özgüllüğü geliştirilmiş olur [3,24,25].

Nested PCR yöntemi tüberküloz, leptospiroz, Q humması, layşmanyazis, fungal ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların tanısı, genetiği değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi ve gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmıştır [24-27]. Nested PCR yaklaşımı PCR duyarlılığını artırmak için kantitatif real-time prosedürlerine de adapte edilmiştir. Bunun bir örneği SARS-CoV-2'nin ORF1ab ve N genlerini hedefleyen tek tüpte tek basamaklı yeni bir kantitatif gerçek zamanlı nested PCR protokolüdür [28]. Nested PCR ayrıca gen ekspresyonu çalışmalarında bir polimorfik gen ailesinin belirli bir üyesini seçici olarak çoğaltmada veya heterojen hücre tipi popülasyonu içeren klinik numunelerde çok düşük miktarlarda bulunan spesifik mRNA'ların cDNA kopyalarını çoğaltmada PCR duyarlılığını ve/veya özgüllüğünü arttırmak için kullanılabilir [24].

Nested PCR'in farklı bir uygulama örneğinde dış primerlerin bağlanma bölgeleri bir grup organizma için "familya, cins veya tür düzeyinde ortak (konsensus)" bir segmentten, iç primerlerin bağlanma yerleri ise "tür, serovar veya biyovarlar için spesifik" genomik bölgelerden seçilerek aynı reaksiyonda hem saptama hem de tiplendirme yapılmıştır [3]. Nested PCR yöntemi bu özelliği ile moleküler epidemiyoloji ve taksonomi alanlarında yeni verilerin elde edilmesinde kullanılmıştır [3].

Nested PCR'in ikinci çoğaltma basamağında dış primerlerden sadece birinin değiştirildiği,

diğerinin ise bir iç primer gibi kullanıldığı (Şekil 1) semi-nested PCR protokolleri de tanımlanmıştır. Literatürde bu yaklaşımın kullanıldığı yakın tarihli çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Semi-nested PCR ile fungal keratit etkenlerinin tanımlanması (*ITS1/ITS4* ve *ITS1/ITS2* primer çiftleri ile) [29], multipleks semi-nested PCR yaklaşımı ile Grup A rotavirusların G ve P genotiplerinin tanımlanması [30], ve ayrıca *Leishmania* türleri [31] ve *Borrelia* türleri [32] gibi çeşitli paraziter ve bakteriyel etkenlerin semi-nested PCR ile tanımlanması bu çalışmalara birer örnek olarak verilebilir.



Şekil 1. Nested PCR ve semi-nested PCR yöntemlerinde reaksiyon basamakları [33].

Demirlenmiş (Anchored) PCR

PCR yönteminin temel prensibi oligonükleotit primerlerin bağlanma bölgeleri arasındaki hedef DNA'yı amplifiye etmek için bir çift spesifik primer setinin kullanılmasıdır. Birçok durumda, bilinen bir DNA segmentine bitişik olarak bulunan bilinmeyen dizilerin karakterize edilmesi istenir, ancak bu durumda reaksiyonun yürütülebilmesi için gerekli olan iki spesifik primerden biri mevcut değildir. Bu sınırlamanın üstesinden gelebilmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerden biri olan "demirlenmiş-anchored PCR" yönteminde, reaksiyon karışımına bilinmeyen gen bölgelerine bağlanabilen bir çapa primeri (*spesifik olmayan primer*) eklenir ve böylece reaksiyonun ilgilenilen gen bölgesini amplifiye edecek şekilde yürütmesi mümkün olur [34,35].

Tek yönlü PCR (*single sided PCR*) olarak da adlandırılan bu teknik ile, sadece N-terminal dizisi bilinen bir proteini kodlayan bir genin tam dizisinin amplifikasyonu yapılabilmektedir. Çapa primeri olarak "terminal deoksiniükleotidil transferaz ile hedef cDNA'nın 3' ucuna sonradan eklenen poli G bölgelerini" hedeflemek üzere poli C primerleri de (*homopolimerler*) tasarlanabilmektedir [34]. Nihai PCR ürünleri, bir restriksiyon enzimi ile kesilerek dizi analizi için bir bakteri vektörüne klonlanabilir. Alternatif olarak, elde edilen PCR ürünleri doğrudan dizilenebilir [34]. Bazı durumlarda ürün verimliliğini arttırmak adına bir nested primer ile ikinci bir amplifikasyon gerekebilir [34]. Anchored PCR yaklaşımı multipleks PCR sistemi olarak da tasarlanmış ve çoğaltılan gen bölgeleri yeni nesil tekniklerle sekanslanarak tanımlanmıştır [36].

Ligasyon Aracılı PCR (LM-PCR)

LM-PCR (*ligation-mediated PCR*), anchored PCR'a benzer şekilde, tek bir primer bağlanma bölgesi bilinen bir DNA parçasının amplifikasyonu için tasarlanmış bir diğer PCR yöntemidir [37]. LM-PCR'da ilk olarak total genomik DNA bir veya iki restriksiyon enzimi ile kesilir veya kırılır (*bu yaklaşım ayrıca Maxam-Gilbert reaksiyonunda da kullanılır*), kırılma sonrasında 5' ve/veya 3' yapışık uçları olan kör uçlu bir dubleks DNA elde edilir [1,37,38]. İkinci adımda, komplementer yapışkan uçlara sahip çift sarmallı bağlayıcıların (*sentetik DNA adaptörleri*) restriksiyon fragmanlarına bağlanması gerçekleşir [37]. Hedef DNA'nın her iki ucu adaptörlere bağlandıktan sonra, entegre DNA dizisine özgü bir primer ve adaptöre özgü bir başka primer kullanılarak "hedef bölge" genomun geri kalanından bağımsız olarak amplifiye edilir [38]. Sonraki aşamada bir internal (*nested*) primer kullanılarak ikinci bir amplifikasyon gerçekleştirilebilir ve nihai PCR ürünleri Southern blotlama ile veya etidyum bromid ile boyanarak görüntülenebilir [1]. PCR sonucunda elde edilen farklı uzunlukta DNA ürünleri elektroforetik seperasyona tabi tutulduğunda benzersiz (*uniq*) bir bant deseni veya kapiler jel elektroforezi görüntüleri elde edilebilir (*parmak izi desenleri*) [37]. Bu parmak izi deseni farklılıkları, genetik farklılık göstergeleri olarak yorumlanır.

Çok sayıda basamak içermesi, reaksiyon başına analiz edilebilen dizilerin kısa boyutlarda olması (~ <200 bp), restriksiyon fragmanlarının sirkülerleştirilmesi-multimerleştirilmesi nedeni ile düşük başarı oranı LM-PCR yönteminin en önemli kısıtlılıklarıdır [38,39]. Bu sorunları aşmak adına yöntemin farklı modifikasyonları geliştirilmiştir [37-39]. Bu modifikasyonların bazıları çok sayıda farklı bakteri türünün tiplendirilmesi ve moleküler epidemiyolojik analizlerde kullanılmıştır [37].

LM-PCR bilinmeyen bir lokusta bilinen bir DNA dizisinin entegrasyon bölgelerinin belirlenmesinde; (•) insersiyonal mutajenlerin, entegre vektörlerin ve doğal olarak oluşan mobil genetik elemanların entegrasyon bölgelerinin tanımlanması veya (•) yeniden mobilize edilmiş endojen genetik elementlerin tümör gelişimine nasıl katkıda bulunduğu araştırılması gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptir [40]. LM-PCR yöntemi ayrıca

bir genomik analiz tekniği olarak; DNA'nın kısa uzantılarının (*stretches*) karakterize edilmesi, sitozin metilasyon paternlerinin belirlenmesi, DNA hasarı oluşumu ve onarımının izlenmesi ve protein-DNA ayak izlerinin in-vivo belirlenmesi çalışmalarında kullanım alanı bulmuştur [1,38].

Homopolimerli PCR

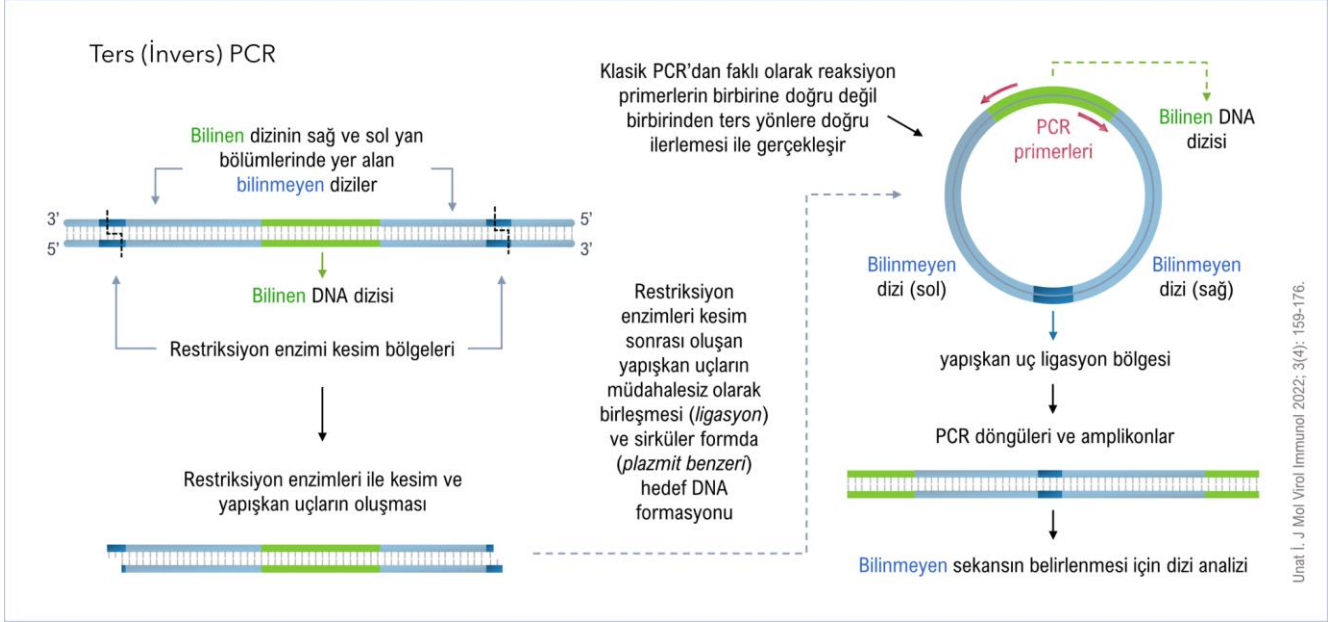
LM-PCR ve anchored PCR'a benzer bir diğer PCR modifikasyonu olan bu yöntemde çift iplikçikli ve uçları kesilerek küntleştirilmiş DNA'nın 5' ucu fosforile edilip 3' ucuna sentetik poli dC içeren homopolimer kuyruklar eklenir. Böylece 5' ucunda "bu dizilere komplementer" deoksiguanozin dizisi içeren oligonükleotit primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır [41]. Böylece primer bölgesi olarak sadece bir sekansın bilindiği, 1 nanogram ya da daha az miktarda DNA içeren örneklerde PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir. Bu yaklaşım *Vibrio cholerae* ve *Streptococcus pneumoniae* genomları için başarı ile uygulanmıştır. Uygun maliyetli olması ve minimal iş gücü gerektirmesi bu yöntemin avantajlarından [41].

Ters (İnvers) PCR

İlk kez Ochman ve ark. tarafından 1988 yılında tanımlanan bu yöntemde [42], bilinen DNA dizisi primerleri kullanılarak hedef dışı yan bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilir [43]. Klasik PCR'da reaksiyon iki primer arasındaki bölge boyunca içeriye doğru gerçekleşirken, geometrik olarak çoğaltılan hedef gen bölgesinden farklı olarak, hedeflenmeyen yan bölgelerdeki DNA sekansları sadece lineer çoğalma gösterdiği için bu bölgelerin DNA sekansına erişim mümkün olmamaktadır [43]. İnvers PCR yöntemi bilinen DNA bölgesini kesmeyen buna karşın bilinmeyen gen bölgesinde yapışkan uçlar oluşturan RE enzimlerinin kullanılması ile başlar [44]. Oluşan yapışkan uçlar müdahalesiz olarak gerçekleşen ligasyon süreci ile birbirine bağlanır ve sirküler formda monomerik DNA yapıları oluşur [42,43]. Sonrasında oligonükleotit primerler, bilinen diziyeye bağlanarak DNA sentezinin bilinmeyen yan bölgelere doğru (ters yönde) uzamasını sağlar (Şekil 2). Bu yöntem sayesinde bilinmeyen yan bölgelerin hızlı ve geometrik amplifikasyonu gerçekleştirilir [43]. Amplifikasyon ürünü olarak reaksiyon sonunda uçlarında kısa bilinen DNA

uzantıları ve en ortada restriksiyon enzimi kesim bölgesi olan ve bilinmeyen dizileri içeren doğrusal moleküller elde edilir [44]. Bu ürünlerin sekans analizi ile bilinmeyen DNA dizisi belirlenerek ileri analizlerde ve karşılaştırmalarda kullanılır [45]. Başta genom düzenleme, insersiyon bölgelerinin

belirlenmesi, metagenomdaki mobil genetik elementleri ve bunlarla ilişkili genleri tanımlama, transpozon yerleştirilmesi ve nokta mutasyonu analizi olmak üzere ilgili birçok alanda yürütülen bu analizlerde invers PCR önemli bir yardımcı teknik olarak görülmektedir [43,45,46].



Şekil 2. Ters (invers) PCR reaksiyonunun çalışma prensibi ve reaksiyon basamakları [47].

Autosticky PCR

Moleküler biyolojide merkezi öneme sahip bir yöntem olan PCR, klonlama amaçlı kullanılacak DNA parçalarının amplifiye edilmesinde kullanılır. Sık kullanılan deneysel bir yaklaşım amplifikasyon primerleri tasarlanırken primer dizisi içerisinde restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri için kesim bölgelerinin eklenmesi ve takiben PCR ürününün ilgili enzimler ile parçalanması ile amplifikasyon ürününün doğrusallaştırılmış (*lineerize edilmiş*) bir klonlama vektörüne ligasyonunu içerir [48]. Bu yaklaşımın bazı önemli dezavantajları vardır. RE kesim bölgesi(leri)nin DNA fragmanının sonlanma bölgesine çok yakın olması durumlarında RE enzimlerinin verimliliği düşebilmekte, ve ayrıca DNA fragmanının iç bölgelerinde bulunan diğer RE kesim bölgeleri klonlamayı komplike hale getirebilmektedir [48]. Restriksiyon enzimlerinin uç duyarlılığı ve amplifiye diziler üzerindeki dahili restriksiyon kesim alanlarından kaynaklanan sorunların üstesinden gelmek için tasarlanan autosticky PCR istenilen 5' çıkıntılarının üretilmesini hedefler [49].

Nükleik asitlerde, şeker-fosfat omurgasında eksik baz içeren (abazik) gen bölgeleri bulunur. DNA kalıbındaki abazik bölgeler DNA polimeraz enzimi için bir bilgi içermezler ve tamamlayıcı iplikçik sentezini engelleyici veya yavaşlatıcı bir rol oynarlar. Autosticky PCR'da amplifikasyon abazik bölgeler içeren primerler ile gerçekleştirilir. İlk olarak, PCR ürünü olan iplikçiklerden biri içerisinde abazik oligonükleotitler dahil edilir. Bu iplikçik PCR'ın ilerleyen döngüleri sırasında kalıp olarak kullanıldığında, polimerazın zincir uzaması primer kaynaklı abazik pozisyonda durur ve bu durum autosticky PCR ürününün ucu üzerinde tek iplikli 5' çıkıntılar oluşmasına yol açar. Bu çıkıntılar amplifikasyon ürününün ilgili enzimler tarafından kesilen bir vektöre özgün olarak bağlanmasına olanak verir [48].

Metilasyon Spesifik PCR

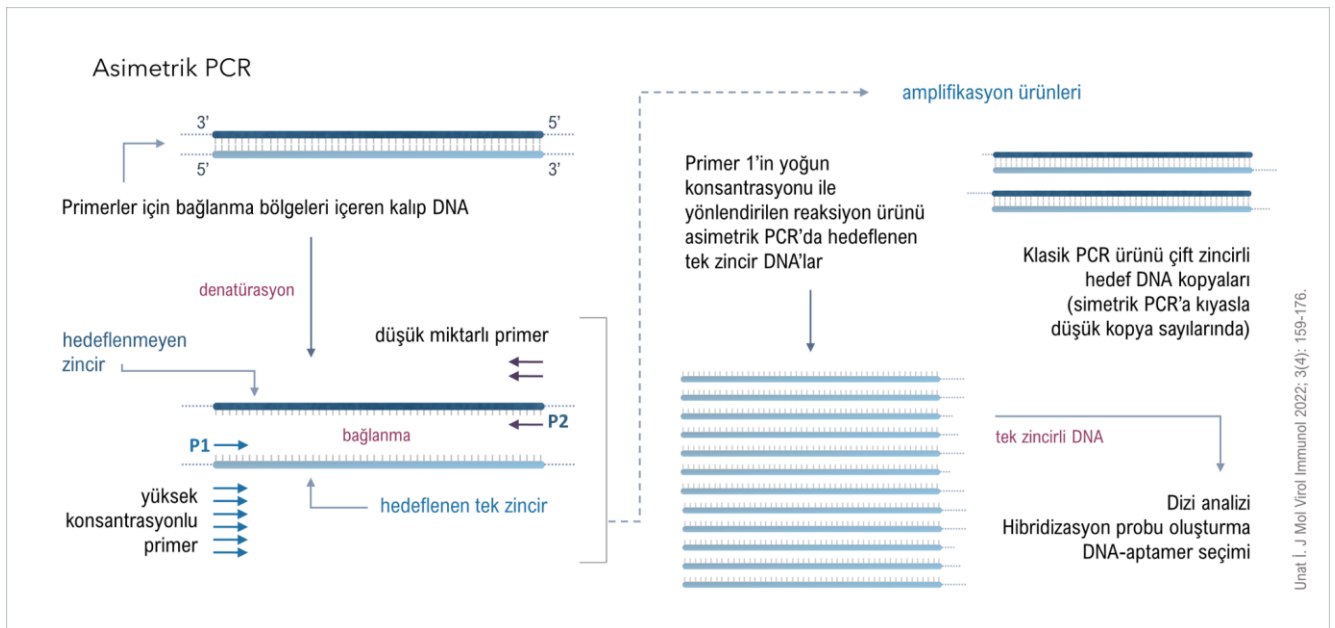
İnsan genomunda CpG dinükleotitlerinin varlığı açısından zengin DNA bölgelerinde sitozin rezidüleri sıklıkla metilasyona uğramaktadır [48]. CpG adaları boyunca sitozin nükleotidlerinde

oluşan promotör DNA metilasyonu, gen susturulması ile sonuçlanır ve kanser gelişiminde büyük bir epigenetik değişikliği temsil eder [50]. Yüksek düzeyde metilize olan (*methyiated*) genler genel olarak eksprese edilmezler ve sıklıkla tümöral hücrelerdeki genlerin aşırı ekspresyonu veya baskılanması ile ilişkilidirler [48]. Metilasyon spesifik PCR genomik DNA yapısındaki metilasyon paternlerini tanımlamada ve bu paternleri kanser hücreleri için belirteç olarak çoğaltmada kullanılır [50]. Çeşitli vücut sıvılarında promotör DNA metilasyonunun tespiti, perioperatif klinik tedavi periyotları sırasında kanser hücrelerinin erken tespitine izin vermesi nedeniyle değerlidir [50].

Metilasyon spesifik PCR yöntemi özellikle promotör veya enhancer gen bölgeleri gibi regülatör gen bölgelerindeki sitozin rezidülerinin metilasyon paternlerini tanımlamada kullanılır [48]. Metilasyon paternleri sıklıkla karşılığı olan genin transkripsiyonel durumu ile koreledir. Metilasyon spesifik PCR'ın çalışma prensibi sodyum bisüfit ile muamele edildikten sonra metilize olan ve olmayan DNA'lar arasında ortaya çıkan sekans farklılıklarının saptanması üzerine kuruludur. Bisüfit, metilize olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken, metilize sitozinlerde bir dönüşüm gerçekleşmez. İlgili gen bölgesindeki metilize olan ve olmayan DNA'lar için spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yaklaşımı ile hedef DNA amplifiye ve analiz edilir [48].

Asimetrik PCR

Asimetrik PCR, tek iplikçikli DNA'nın tercihli sentezi (*bir DNA zincirini yüksek kopya sayılarında amplifiye etmek*) amacıyla geliştirilen bir PCR yöntemidir. Tek iplikçikli DNA eldesi; sekanslama, hibridizasyon probu oluşturma ve DNA-aptamer seçiminde olduğu gibi, iki tamamlayıcı diziden sadece birine ihtiyaç duyulduğunda faydalıdır. Bu PCR yöntemi tersiyer yapılar içindeki hedeflere yüksek spesifite ile bağlanma kapasitesine sahip oligonükleotitlerin (*aptamer*) sentezinde kullanılır [51]. Bu yöntemde simetrik PCR'dan farkı olarak primerler konsantrasyonları farklı olacak şekilde kullanılır (Şekil 3). Düşük konsantrasyona sahip primer çift iplikçikli DNA sentezinde rol oynarken reaksiyon ilerledikçe tükenir ve yüksek konsantrasyona sahip primer "diğer primerin limitleyici etkisinden kurtulduğu için" hedef DNA bölgesini lineer olarak sentezlemeye devam eder [51]. Test optimizasyonu oldukça zor ve reaksiyon etkinliği düşük bir yöntem olan asimetrik PCR'da sık karşılaşılan bir diğer sorun da non-spesifik ürünlerin ortaya çıkmasıdır ve bu dezavantajları nedeni ile bu yöntem günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır [52]. Bununla beraber, hedef DNA'nın ve primerlerin nihai konsantrasyonları, PCR döngülerinin sayısı ve bağlanma sıcaklığı gibi parametrelerin optimizasyonları ile bu sorunları çözmeye yönelik yeni araştırmalar yapılmaya devam etmektedir [53].



Şekil 3. Asimetrik PCR'da reaksiyon basamakları ve elde edilen tek zincirli ürünlerin kullanım alanları [54].

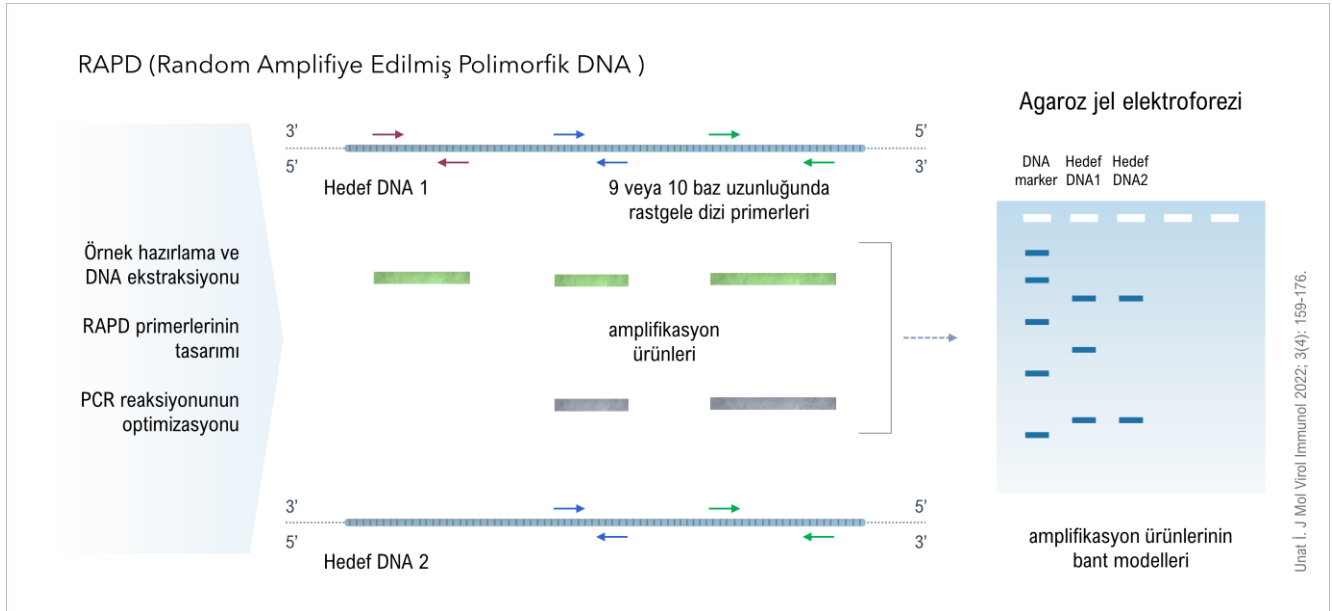
Asimetrik primerlerin tasarımında primer konsantrasyonundan ziyade genellikle %GC ya da $2(A+T)+4(G+C)$ değerleri dikkate alınmaktadır. Primerlerden birinin düşük konsantrasyonda olması ilgili primer için erime (*melting*) sıcaklığının hedef bölgeye bağlanma (*annealing*) sıcaklığının altına düşmesine neden olur [52]. Bu sorunun önüne geçmek için eksponansiyel amplifikasyon sonrası lineer PCR (*Linear-After-The-Exponential*, LATE-PCR) adı verilen farklı bir asimetrik PCR yaklaşımı önerilmiştir. Bu tasarımda primerlerin erime sıcaklıkları primer konsantrasyonlarına göre ayarlanarak asimetrik PCR'ın kantitatif real-time temelli simetrik PCR'a yakın düzeyde bir etkinlik göstermesi sağlanmıştır [52]

RAPD

Random amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) yöntemi ile random primerler kullanılarak genom üzerindeki rastgele hedeflenmiş bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilir (Şekil 4) [55]. Çok sayıda farklı konsantrasyonlarda elde edilen PCR ürünlerinin (*amplikonlar*) agaroz ya da akrilamid jel elektroforezi ile görüntülenmesiyle elde edilen

sonuçlar; popülasyon tiplendirilmesinde, soyağacı analizlerinde, filogenetik araştırmalarda ve genetik haritalamada kullanılmaktadır [55–57]. RAPD özellikle polimorfizm çalışmalarında genom sekansının önceden bilinmesine gerek olmadığı için oldukça avantajlı bir yöntemdir [58]. Fakat çok sayıda random primer kullanıldığı için reaksiyon koşullarındaki en küçük değişimler dahi amplifikasyon sonuçlarını etkileyebilmektedir, bu nedenle güvenilir sonuçlar elde edebilmek için reaksiyon optimizasyonu oldukça önemlidir [58].

RAPD'ye kıyasla daha gelişmiş bir teknik olan AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), yakın ilişkili türler veya suşlar arasındaki genomik varyasyonların tanımlanması için kullanılır. AFLP tekniği, RAPD ve RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) yöntemlerinin bir kombinasyonu olup, ilk olarak genomik DNA'nın parçalanması için restriksiyon enzimlerinin kullanılmasını ve ardından bu fragmanların PCR ile seçici olarak amplifikasyonunu içerir [59]. AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*) yöntemi ve DAF (*DNA amplification fingerprinting*) yöntemi RAPD benzeri diğer PCR modifikasyonlarıdır [60].



Şekil 4. Random amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) yöntemi ile genomik varyasyon analizi [61].

İmmüno PCR (iPCR, PCR-ELISA)

PCR, yüksek duyarlılığı ile viral ve bakteriyel enfeksiyonların ve kalıtsal hastalıkların klinik tanısında ve genetik haritalamada yaygın olarak kullanılırken, klinik tanıda bir enfeksiyon etkeninin

DNA veya RNA'sı dışında etkene özgü proteinlerin ve bu proteinlere karşı üretilen antikörlerin, ve ayrıca toksin varlığının, tümör ile ilgili antijen ve büyüme faktörlerinin, hastalık ilişkili protein faktörlerin, hormonların, ilaç düzeylerinin ve

otoantikörlerin tespitine de gereksinim duyulur ve bu amaç için en çok tercih edilen yöntem Enzime bağlı immünosorbent testi (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) tekniğidir [62]. İlk olarak 1992 yılında tanımlanan PCR-ELISA yönteminde ELISA testi ile PCR tekniği kombine edilmiş ve her iki yöntemin avantajları ve güçleri birleştirilmiştir [63].

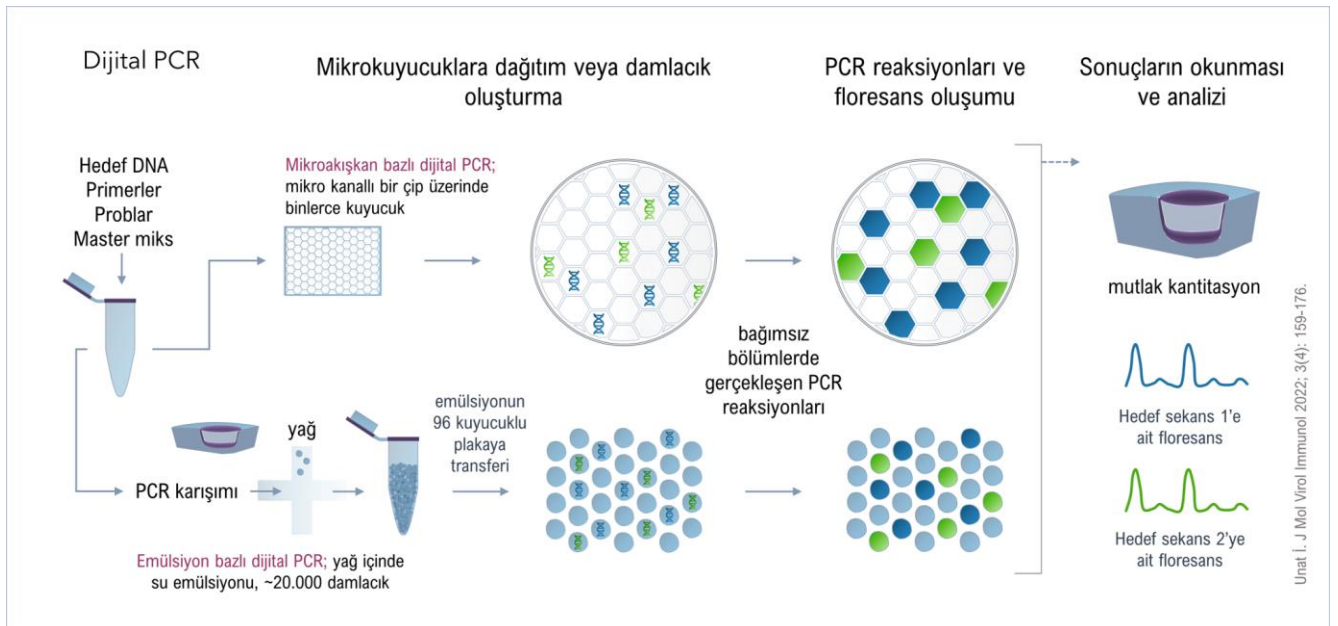
İmmüno PCR'da hedef DNA, mikrotitre plaka kuyucukları üzerinde immobilize edilmiş antijen-antikör (*monoklonal*) kompleksine spesifik olarak bağlanır ve yakalanır. Amplifiye hedef DNA'nın saptanması için hem biyotinlenmiş DNA hem de immüno globulin G (IgG) için güçlü ve spesifik bağlanma afinitesine sahip bir streptavidin-protein A kimerası kullanılır [63]. Streptavidin bağlı DNA (*biyotinlenmiş*) ve protein A bağlı antikör (IgG-Fc bölgesi) ile oluşturulan antikör-DNA konjugatı, hedef nükleik asitlerin çok düşük konsantrasyonlarda (*femtogram/ml*) olduklarında bile saptanabilmesine imkan verir. Reaksiyon geleneksel ELISA'da olduğu gibi direkt, indirekt, sandviç veya kompetitif iPCR testleri olarak gerçekleştirilebilmektedir [62]. Protein yerine nükleik asit tespiti yapılan yöntem, konvansiyonel PCR yöntemine göre çok daha hassas, analitik süresi daha kısa ve saptama limiti daha düşük bir yöntemdir.

Yüksek özgüllük ve duyarlılığı ve yarı (*semi*) kantitatif analiz yeteneğiyle, tıp, veterinerlik ve

tarım endüstrisi gibi çeşitli alanlarda güçlü bir saptama aracı olarak kullanım için büyük bir potansiyel taşımaktadır [64]. Çok düşük konsantrasyonlardaki nükleik asitleri tespit edilebilmesi sayesinde viral enfeksiyonların erken tanısında etkin bir test olduğu gösterilmiştir [62]. Kompleks optimizasyon, deneyimli çalışanlara ihtiyaç duyulması ve reaksiyon süresinin uzunluğu gibi dezavantajları olmakla beraber, yöntemin otomatize sistemlere adapte edilmesiyle bu dezavantajların azaltılarak test prosedürlerinin kolaylaştırılabileceği öngörülmektedir [62].

Dijital PCR

Geleneksel kantitatif real-time PCR'dan farklı olarak dijital PCR ile amplifikasyon ürünlerinin kantitasyonu yüksek duyarlılıkla yapılabilmekte ve ölçümler kalibrasyon gerektirmediği için sonuçlara çok daha hızlı ve kesin bir şekilde ulaşılmaktadır [65]. İşlem, temelde amplifiye edilecek örneğin dilüsyonuna ve binlerce sayıda bağımsız kuyucuğa veya damlacığa ayrılmasına dayanır. Bu kuyucuk veya damlacıklardan hedef molekülü içerenlerde amplifikasyon gerçekleşmekte ve pozitif sinyaller alınmakta, buna karşılık hedef molekül içermeyen kuyucuk-damlacıklardan sinyal alınmamaktadır (Şekil 5). Amplifikasyon sonunda kuyucuk sayısı ve pozitif sinyallerin sayısı analiz edilerek hedef moleküllerin başlangıç miktarı yüksek doğrulukta (*mutlak kantitasyon*) tayin edilmektedir [65,66].



Şekil 5. Emülsiyon bazlı ve mikroakışkan bazlı dijital PCR yöntemlerinin çalışma prensipleri [67].

Hedef molekül miktarının (*kopya sayısının*) az olduğu örneklerde amplifikasyon ve kantitasyonu yapabildiği ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajları bulunan dijital PCR yöntemi, bir hücre popülasyonunun sadece küçük bir bölümünde bulunması beklenen önceden tanımlanmış nadir mutasyonların (*tek nokta mutasyonları da dahil olmak üzere*) seçici tespiti, bakteri ve virüslerin kantitatif analizi ve prenatal fetal DNA tarama testlerinde kullanılmaktadır [65,68-70].

In-situ PCR

In-situ PCR yöntemi doku kesitlerinin lam üzerinde fikse edilerek, hedef gen bölgelerinin (DNA veya RNA) fikse edilmiş hücreler içerisinde (in-situ) çoğaltılmasına dayalı bir tanı yöntemidir [71]. In-situ PCR'da amplifikasyon ürünleri işaretli nükleotitlerin kullanıldığı direkt saptama yöntemi ile (*immünohistokimyasal*) ya da sentetik probolar kullanılarak indirekt in-situ hibridizasyon ile görüntülenebilmektedir [72].

Klasik PCR'da nükleik asit izolasyonu için hücreler ve dokuların parçalanmasından dolayı amplifikasyon ürünlerinin hücre içi kantitasyonu bilinmemekte ve histolojik hücre tipleri ile ve hücrelerin histopatolojik özellikleri ile bu ürünlerin ilgisi kurulamamaktadır [72]. In-situ PCR ile hedef nükleik asitlerin hücre içinde çoğaltılarak lokalize edilebilmesi ile; viral yük tayini, hücre içi yabancı DNA lokalizasyonu, tümör genleri-metastazlarını saptama ve doğal çevresel ortamda bakteri türü tanımlaması gibi birçok işlem kolaylaştırılmıştır [71,72]. In-situ PCR'ın bir diğer kullanım alanı da viral enfeksiyonlarda histolojik incelemelerde ilgili hücrelerde viral gen ekspresyonunun veya viral nükleik asit varlığının saptanması ile viral hücre ve doku tropizminin gösterilmesidir [73,74].

Yöntemin en önemli dezavantajları ise hücre fiksasyonu optimizasyonunun zorluğu sebebiyle işlem sırasında doku tahribatı gerçekleşebilmesi, düşük amplifikasyon etkinliği, amplifikasyonun kantite edilmesinin zor olması ve nitelikli işgücü gerektiren bir yöntem olmasıdır [72].

Real-time PCR

Bu yöntem, her amplifikasyon döngüsünde gerçek zamanlı floresan sinyal ölçümü yapılması ve sinyal artış yoğunluğuna göre spesifik bir

zamandaki amplikon miktarının tayinine dayanır [75,76]. Amplifikasyon ürünlerinin eş zamanlı (*gerçek zamanlı*) görüntülenmesi iki ana yaklaşım ile gerçekleştirilir; (•) nonspesifik floresan boyalar (SYBR green, EvaGreen, etidyum bromür) ve (•) floresan etiketli sekans spesifik oligonükleotit probolar [75,77,78]. Nonspesifik floresan boyalar, çift iplikçikli DNA'ya bağlandıklarında aktifleşir ve floresans verirler. Bu boyalar nonspesifik ürünlere ve primer dimerlere bağlandıklarında da floresans verebildikleri için rutin tanısal kullanımda daha yüksek spesifiteye sahip oligonükleotit probolar öne geçmiştir [75]. Oligonükleotit probolar hedef sekansla hibridize olabilen, 5' ucunda florofor ile etiketli fakat 3' ucundan uzama özelliği olmadığı için primer gibi etki etmeyen moleküllerdir [79]. Sekans spesifik proboların; hidroliz proboları, saç tokası-hairpin probolar ve hibridizasyon proboları gibi çok sayıda farklı tipi bulunmaktadır (Şekil 6) [76]. Floresan sinyalin saptanabilir düzeye geldiği siklus (*döngü*) sayısına, literatürde farklı isimler de kullanılmakla beraber, "eşik siklusu" (*cycle threshold, CT*) adı verilmektedir [76].

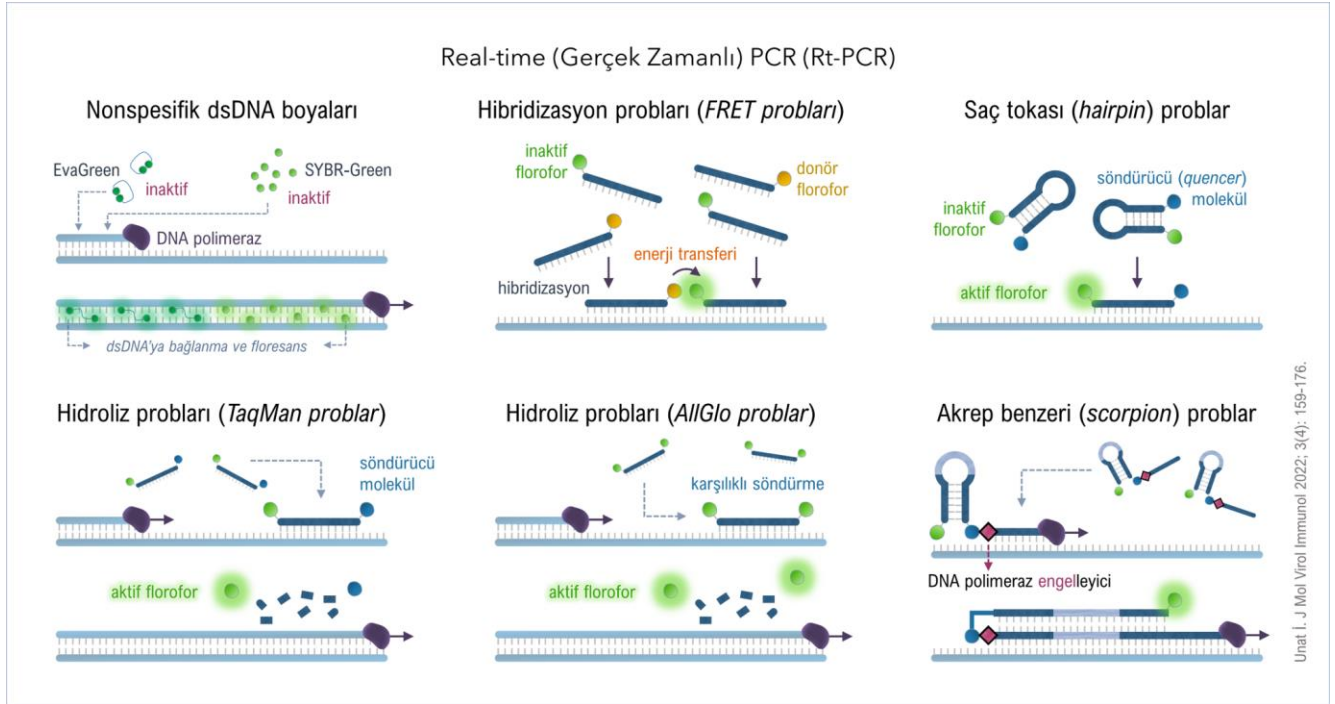
Hidroliz proboları, ya da bilinen ticari adı ile TaqMan probolar, 5' ucunda raportör ve 3' ucunda söndürücü boya içeren yaygın kullanılan real-time probolardır [76,79]. Söndürücü boya, prob intakt olduğu sürece floresan enerjisini ısıya çevirerek sinyali azaltmaktadır. Amplifikasyon ürünlerine bağlanan probolar zincir uzaması aşamasında Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine substrat olduklarında hidrolize olurlar. Probolar hidrolize olduklarında söndürücü boya işlevini kaybetmekte ve floresan sinyal yoğunluğu artmaktadır [76,79]. Prob hidrolizi sadece Taq polimeraz ile hedef sekans çoğaltılması söz konusu olduğu zaman gerçekleşmekte ve böylece ölçülen sinyal düzeyi amplifikasyon ürünlerinin miktarını göstermektedir [76].

Hairpin probolar (saç tokası probolar veya *molecular beacons*) da hidroliz probolarında olduğu gibi raportör ve söndürücü boya içermekte fakat tasarım özelliklerinde farklılık göstermektedir [76]. Saç tokası benzeri yapıda olması ve ters terminal tekrarlar (*inverted terminal repeat, ITR*) içermesi sebebiyle, probolar hedef bölgeye bağlı olmadığında raportör ve söndürücü boya birbirine yaklaştığı için floresan sinyali azalmakta, prob

hedef bölgeye bağlandığında ise söndürücü boyanın etkinliği azalarak floresan sinyal yoğunluğu artmaktadır [76]. Hairpin problemler, TaqMan problemlere göre yanlış eşleşmelerin daha az olması ve bu sayede daha kesin sonuç alınabilmesi ve ayrıca florofofor/söndürücü boya çeşitlerinin ve seçeneklerinin çok daha fazla olması gibi bazı avantajlara sahiptir [76].

Bir diğer prob tasarımı olan floresan rezonans enerji transferi (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) problemleri hibridizasyon problemleri olarak da bilinirler. Bu tasarımda biri donör floresan diğeri de alıcı boya olmak üzere iki oligonükleotit prob bulunmaktadır [76]. Problemler hedef sekansa hibridize olduğunda, donör boya enerjisini alıcı boyaya aktarır ve floresan sinyal artar. Amplifikasyonun gerçekleşmediği durumda ise hibridizasyon problemleri birleşmediği için enerji transferi ve floresan sinyal ortaya çıkmamaktadır [76].

Real-time (Gerçek Zamanlı) PCR (Rt-PCR)



Şekil 6. Real-time PCR testlerine adapte edilmiş floresan boya ve çeşitli prob sistemleri [80].

Real-time PCR testleri yüksek sensitivite ve spesifiteleri, kısa sürede sonuç verebilmeleri ve tekrarlanabilir sonuçlar sunmaları gibi avantajları ile; enfeksiyöz patojenleri tanımlamada, suş tiplendirmede, antimikrobiyal duyarlılık profillerini tanımlamada, toksin üretimini saptamada, mRNA-gen ekspresyon analizlerinde ve spesifik gen ve allellerin tespitinde dünya genelinde sık kullanılan güvenilir moleküler tanı testleri haline gelmiştir [75,79]. İşlemlerin kapalı tüplerde gerçekleşmesi ve jel elektroforezi gibi amplifikasyon sonrası tanımlama işlemlerine gereksinim olmaması gibi geliştirmeler sayesinde kontaminasyon sorunu geleneksel PCR'a göre büyük oranda azaltılmıştır [76]. Kantitatif real-time PCR günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında başta viral hepatitler, sitomegalovirus ve BK virus olmak

üzere ve birçok enfeksiyon etkeninin doğrulayıcı tanısında ve tedavi etkinliğinin takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır [81].

Revers Transkripsiyon PCR (RT-PCR)

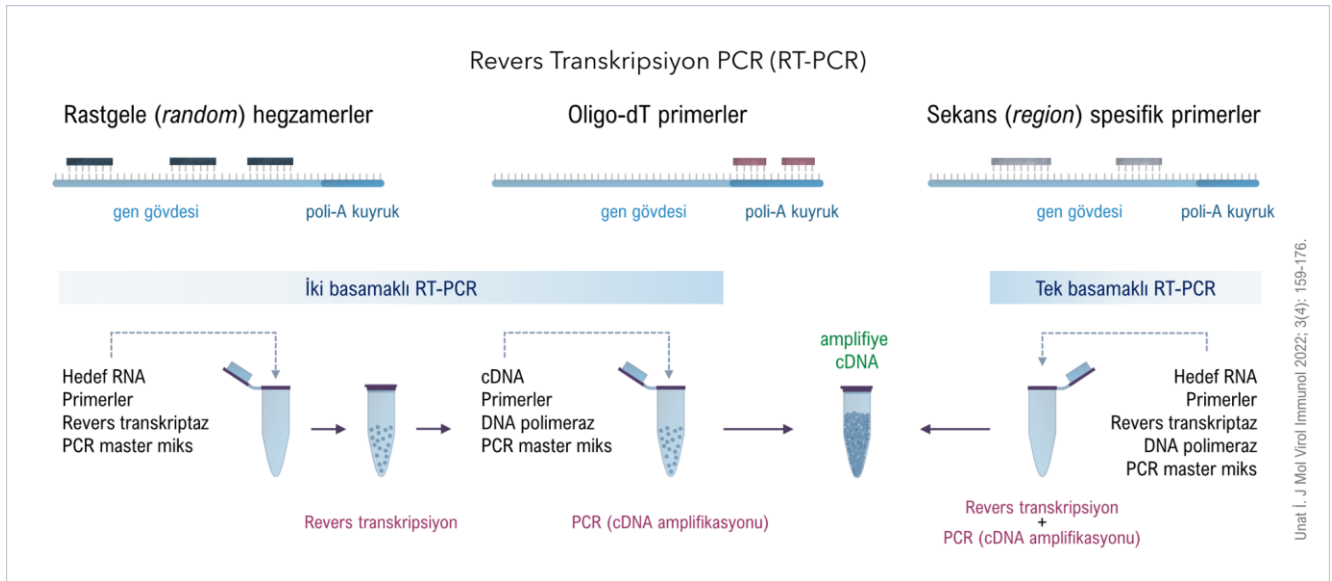
PCR yöntemi temelde DNA çoğaltma prensibi ile çalışmakta olup, RNA hedeflerin doğrudan çoğaltılması için ilk olarak RNA moleküllerinin DNA komplementerlerinin (cDNA) eldesine gereksinim duyulur. RT-PCR RNA'nın reverse transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA'ya dönüştürüldüğü bir başlangıç basamağının ardından bu cDNA'nın PCR ile çoğaltıldığı bir amplifikasyon yöntemidir. RT-PCR esas olarak klonlama ve gen ekspresyon çalışmalarında ve virüslere ait RNA genomlarının saptanmasında kullanılır [82]. Klasik RT-PCR'da bir çift sekans spesifik primer kullanılarak test

edilen örnekte spesifik bir gen bölgesinin varlığı araştırılabilirken, konvansiyonel PCR’da olduğu gibi farklı primer setlerinin beraber kullanılması ile multipleks RT-PCR da yapılabilmektedir [82].

RT-PCR’da ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştiren enzim olan RNA bağımlı DNA polimeraz optimal pH ve tuz konsantrasyonunda ve deoksिनükleotitlerin (dNTP) varlığında tek iplikçikli hedef RNA moleküllerini çift iplikçikli cDNA’ya çevirmektedir. Oluşan cDNA molekülleri PCR için şablon görevi görmektedir [83]. RNA bağımlı DNA polimeraz enzimi, ek olarak düşük düzeyde DNA bağımlı DNA polimeraz ve RNA/DNA hibridlerini parçalayan RNAz-H aktivitelerine de sahiptir [84]. RT-PCR testlerinde ters (revers) transkripsiyon için en sık retroviruslardan elde edilen ters transkriptaz enzimi, Moloney murine leukemia virustan elde edilen M-MLV reverse transkriptaz, avian myeloblastosis virustan elde edilen AMV reverse transkriptaz ve M-MLV RT’nin

başka bir formu olan, daha yüksek termal stabiliteye ve daha düşük RNAz H aktivitesine sahip SuperScript III enzimleri kullanılmaktadır [84]. Moleküler biyolojide kullanım alanı oldukça geniş olan RT-PCR ile elde edilen ürünler ile cDNA gen kütüphaneleri de oluşturulabilmektedir [84].

Revers transkripsiyon için mRNA’nın 3’ ucundaki poli-A kuyruğuna bağlanan oligo dT primerler kullanılabilirdiği gibi, RNA’daki herhangi bir bölgeye bağlanabilen random primerler (hekzamer ya da dekamer) ya da gen spesifik primerler kullanılabilir (Şekil 7) [84]. Oligo dT primerler kullanıldığında, hedef RNA sekansının genomun 3’ ucuna yakın olması oluşan ürün miktarını arttırmaktadır. Hücre içi RNA’ların çoğu (pre-mRNA, rRNA, intergenik RNA, antisense RNA) ve bazı sentetik RNA molekülleri poli-A kuyruğu içermediği için oligo dT primerler ile sıklıkla random ve gen spesifik primerler mikş edilerek bir karışım halinde kullanılmaktadır [84].



Şekil 7. Revers transkripsiyon PCR’da kullanılan primerler ve tek ve iki basamaklı reaksiyon sistemleri [85].

RT-PCR için, tek basamaklı ve iki basamaklı tasarlanmış farklı test prosedürleri geliştirilmiştir. İki basamaklı sistemde ilk olarak RNA’dan reverse transkripsiyon ile cDNA sentezlenmekte, oluşan cDNA’lar da PCR ile amplifiye edilmektedir [83]. Bu metot, pipetleme hatalarına yol açabilmesine rağmen hedef RNA’nın düşük miktarda olduğu durumlarda faydalı olduğu bulunmuştur [83]. Tek basamaklı RT-PCR prosedürlerinde ise reverse transkriptaz enzimi ve Taq DNA polimeraz tek

tüpte ve tek tamponla mikş edilerek reaksiyon gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde reaksiyon boyunca tüpü açmaya gereksinim duyulmadığı için kontaminasyon riski azalmakta ve işlem süresi daha kısa sürmektedir [83].

Ters transkripsiyonun moleküler biyoloji alanında kullanıma girmesi yeni genlerin keşfinde, gen klonlanma çalışmalarında, gen ekspresyon analizlerinde, mikrobiyal hastalıkların tanısında çok önemli kullanım kolaylıkları sağlamıştır [84].

Reverse transkripsiyon reaksiyonunun etkinliği ve RNA stabilitesini sağlamak için; kontaminasyonun engellenmesi, RNAz içermeyen (*RNAse-free*) test ortamı, uygun primer seçimi, ortamda uygun tuz konsantrasyonunun sağlanması, reaksiyonların sıcaklığına dikkat edilmesi ve uygun basamaklı prosedürlerin seçilmesi dikkat edilmesi gereken önemli noktalar [84].

Diğer PCR Modifikasyonları

Touch-down PCR ve Touch-up PCR

Touch-down PCR modifikasyonu başlangıç döngülerindeki yanlış eşleşmelerin neden olduğu istenmeyen olumsuz etkilerin üstesinden gelmek için başvurulan etkili bir yaklaşımdır [86]. Bu yaklaşımda, ilk PCR döngüsündeki bağlanma ısı optimum test sıcaklığına göre daha yüksek bir dereceden başlatılır ve sonraki her döngüde sıcaklık kademeli olarak azaltılarak optimum ısıya ulaşıldığında sabitlenir [3].

Hedef nükleik asit kopya sayısının düşük olduğu durumlarda başvurulan touch-up PCR yaklaşımında ise bağlanma ısı ilk birkaç döngüde optimum değer altında tutularak saptama duyarlılığının artırılması hedeflenir [3]. Bu durum eşzamanlı olarak çoğalan nonspesifik ürünlerin belirli bir miktarının tolere edilmesini gerektirir. Sonraki döngülerde bağlanma ısı optimum dereceye kadar artırılır ve kalan döngüler optimum bağlanma ısısında gerçekleştirilir [3]. Örneğin, amplifikasyonun özgülüğünü arttırmak için PCR reaksiyonunun başlangıç döngülerinde, bağlanma sıcaklığının 60°C'den 72°C'ye yavaş yavaş artırıldığı 5-6 döngülük bir düzenleme yapılabilir. Her döngüde bağlanma ısısının 1°C artırılması ile bağlanma ısısının sabit tutulduğu bir yöntem karşılaştırılmış ve bağlanma ısısının artırıldığı yaklaşımla sabit ısı yönteme göre daha fazla PCR ürünü elde edildiği bildirilmiştir [87].

Hot Start PCR

PCR testlerinde amplifikasyon karışımının hazırlandığı başlangıç aşamalarında primerler arasında veya primerler ile hedef sekansa benzer özellikler gösteren hedef dışı bölgeler arasında nonspesifik bağlanmalar gerçekleşebilmektedir. Hot-start PCR yaklaşımının temel amacı ilk denatürasyon aşamasından önce gerçekleşen nonspesifik primer bağlanmaları sonrasında DNA

polimeraz enziminin aktifleşmesini ve istenmeyen amplifikasyonların oluşmasını ve ayrıca başlangıç döngüsünde primer-dimer oluşumunu azaltmaktır [3]. Nonspesifik bağlanmaların ve reaksiyonların çoğu, amplifikasyon karışımının hazırlanması ile gerçek reaksiyonun başlangıcı arasındaki sürede meydana gelmektedir [3]. Hot-Start PCR'in en yaygın tipi, reaksiyon başlangıcında inaktif formda olan ve 94-96°C'de 10 dakika ısıtıldıktan sonra aktifleşen ısıya dayanıklı (*termostabil*) hot-start DNA polimerazların kullanıldığı PCR protokolleridir [3]. Klasik PCR protokollerinin çoğu ve kullanılan reagenler hot-start protokollerin özel koşullarına adapte edilebilecek şekilde geliştirilmiştir [3]. Hot start termostabil Taq DNA polimeraz enziminin kullanıldığı bu PCR modifikasyonu SYBR Green temelli multipleks real-time testlerinde ve TaqMan problemlerinin kullanıldığı tip spesifik PCR testlerinde başarılı olarak kullanılmıştır [5].

Bir diğer uygulama ise, 5' ucunda ortam ısısında kendi üzerine bağlanan veya oligomerize olan ek oligonükleotit dizileri taşıyan ve halka (*loop*) primerler olarak adlandırılan primerlerin kullanılmasıdır [3]. Bu primerler sadece reaksiyon karışımının ısıtıldığı yüksek sıcaklık derecelerinde lineerize olurlar (*doğrusal şekil alırlar*) ve sonuçta hot-start başlangıç koşulu sağlanmış olur [3].

COLD-PCR

COLD-PCR "düşük denatürasyon sıcaklığında ko-amplifikasyon" olarak tanımlanır. Bu yöntem tek nükleotit uyumsuzluklarının çift sarmallı DNA molekülünün erime sıcaklığını değiştireceği ve amplifikasyon verimliliğini düşüreceği prensibi ile çalışır [88]. Yöntem vahşi tip ve mutasyon içeren sekansları içeren karışımlarda minör alelleri seçici olarak çoğaltmak için tasarlanmış ve mutasyon saptama duyarlılığını 100 kata kadar artırabileceği bildirilmiştir [89].

Long-Range PCR

Klasik PCR'da nükleotit polimerizasyonundaki hatalar ve termal döngü sırasında kalıp DNA'nın zamanla bozunması gibi sebepler nedeniyle amplikon büyüklüğü/uzunluğu sınırlanmaktadır. Long-range PCR modifikasyonu ile konvansiyonel PCR protokollerine göre çok daha uzun hedef gen bölgeleri çoğaltılabilmektedir [90]. Long-range PCR'da genellikle birden çok ve özel termostabil

polimeraz enzimi (*long-range DNA polimerazlar*) kullanılarak klasik PCR'da genellikle 1000 bp uzunlukta olan amplikonlar yerine daha büyük DNA parçalarının (20.000 bp, 30.000 bp veya daha uzun) amplifikasyonları başarılı olarak gerçekleştirilebilmektedir [90–92]. Long-range PCR, özellikle yeni nesil dizileme platformlarıyla birleştirildiğinde, düşük kopya sayılı örnek içeren numunelerdeki hedef genomik bölgelerin dizilenmesi ve bu dizilerdeki genetik varyasyonları saptamak için esnek, hızlı, verimli ve uygun maliyetli bir seçenek olmaya devam etmektedir [91].

Sonuç

PCR tekniği günümüzde yaygın kullanım alanı bulan, farklı disiplinlerde en çok onay almış tanı testini içeren, üzerinde en çok çalışılmış ve çok

sayıda alt tipi ve modifikasyonu bulunan dünya genelinde kabul görmüş bir moleküler tanı yöntemidir. Yöntemin saptama duyarlılığı ve reaksiyon verimliliği sürekli geliştirilirken, test maliyetlerindeki düşüşler ve artan otomatize sistemler ile PCR testlerinin kullanımı her geçen gün daha da yaygınlaşmaktadır. Çok sayıda ticari test alternatifini içeren bu yöntem aynı zamanda araştırmacıların kendi testlerini tasarlamalarına yönelik kolaylıklar sunmaktadır. Sürekli bir şekilde geliştirilen alt sistemleri ile (otomatize izolasyon sistemleri, farklı özelliklere sahip enzimler ve boyalar, esnek primer ve prob tasarımları, hassas ve hızlı tanıya imkan sunan cihaz ve ekipmanlar) geniş bir ürün desteği imkanı bulunmaktadır. Bu makalede rutin moleküler tanı laboratuvarlarının en etkili araçlarından biri olan PCR yönteminin farklı tiplerine genel bir bakış sunulmuştur.

Çıkar beyanı: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazar sorumludur. **Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir. **Teşekkür:** İlk kez bu makalede yayımlanmakta olan şekiller Fatih Şahiner'in [ID] izni ile kullanılmıştır.

Kaynaklar

1. Corley RB. Recombinant DNA Techniques: Cloning and Manipulation of DNA. In: Corley RB (ed), A Guide to Methods in the Biomedical Sciences. 2005, Springer Science Inc, Boston, USA. pp:39-67.
2. Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. In: StatPearls. 2022, StatPearls Publishing. NBK535453 [PubMed]
3. Sachse K. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp:3-29.
4. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal 2002; 16(1): 47-51. [Crossref]
5. Şahiner F, Kubar A, Yapar M, Şener K, Dede M, Gümrül R. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. J Microbiol Methods 2014; 97: 44-50. [Crossref]
6. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques 1997; 23(3): 504-11. [Crossref]
7. Sahiner F. Current problems and recent advances in the molecular diagnosis of genital human papillomavirus infections. Mikrobiyol Bul 2014; 48(4): 689-706. [Crossref]
8. Visseaux B, Collin G, Ichou H, Charpentier C, Bendhafer S, Dumitrescu M, et al. Usefulness of multiplex PCR methods and respiratory viruses' distribution in children below 15 years old according to

- age, seasons and clinical units in France: A 3 years retrospective study. PLoS One 2017; 12(2): e0172809. [Crossref]
9. Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. Evaluation of a Novel Multiplex PCR Panel Compared to Quantitative Bacterial Culture for Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. J Clin Microbiol 2020; 58(5): e02013-19. [Crossref]
10. Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. Int J STD AIDS 2016; 27(14): 1275-82. [Crossref]
11. Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. Clin Lab Med 2015; 35(2): 461-86. [Crossref]
12. López-Amor L, García-Prieto E, Fernández-Suárez J, Escudero D, Vázquez F, Fernández J. Evaluation of a commercial multiplex PCR for diagnosis of central nervous system (CNS) nosocomial infections. J Microbiol Methods 2020; 171: 105865. [Crossref]
13. Tao Y, Paden CR, Queena K, Zhanga J, Tyagib E, Tong S. Broad-Range Virus Detection and Discovery Using Microfluidic PCR Coupled with High-throughput Sequencing. BioRxiv 2020.06.10.145052. [Crossref]
14. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 36(5): 1169-75. [Crossref]

- 15.** Vina-Rodriguez A, Sachse K, Ziegler U, Chaintoutis SC, Keller M, Groschup MH, et al. A Novel Pan-Flavivirus Detection and Identification Assay Based on RT-qPCR and Microarray. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 4248756. [[Crossref](#)]
- 16.** Linhart C, Shamir R. The degenerate primer design problem: theory and applications. *J Comput Biol* 2005; 12(4): 431-56. [[Crossref](#)]
- 17.** Tkadlec J, Peckova M, Sramkova L, Rohn V, Jahoda D, Raszka D, et al. The use of broad-range bacterial PCR in the diagnosis of infectious diseases: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(6): 747-52. [[Crossref](#)]
- 18.** Marbjerg LH, Holzknicht BJ, Dargis R, Dessau RB, Nielsen XC, Christensen JJ. Commercial bacterial and fungal broad-range PCR (Micro-Dx™) used on culture-negative specimens from normally sterile sites: diagnostic value and implications for antimicrobial treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; 97(2): 115028. [[Crossref](#)]
- 19.** Sahiner F, Gümral R, Sener K, Yiğit N, Dede M, Yapar M, et al. Investigation of HPV-DNA in cervical smear samples by two different methods: MY09/11 consensus PCR and type-specific real-time PCR. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 624-36. [[PubMed](#)]
- 20.** Ugorski M, Chmielewski R. REP and ERIC repetitive DNA sequences in bacteria--diagnostic significance. *Postepy Hig Med Dosw* 2000; 54(1): 3-15. [[PubMed](#)]
- 21.** Spigaglia P, Mastrantonio P. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2454-7. [[Crossref](#)]
- 22.** Köstereli S, Onuk EE. *Yersinia ruckeri* İzolatlarının Genotiplendirilmesinde PCR Tabanlı DNA Fingerprinting Tekniklerinin Karşılaştırmalı Analizi. *Acta Aquat Turc* 2019; 15(3): 262-71. [[Crossref](#)]
- 23.** Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. *Iran J Pathol* 2017; 12(1): 25-34. [[PubMed](#)]
- 24.** Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019; 2019(2): pdb.prot095182 (175-8). [[Crossref](#)]
- 25.** Deepachandi B, Weerasinghe S, Soysa P, Karunaweera N, Siriwardana Y. A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): 623. [[Crossref](#)]
- 26.** Sevindik E, Abacı ZT. Nested PCR ve Kullanım Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2013; 6(2): 22-6.
- 27.** Marinho RC, Martins GR, Souza KC, Sousa ALM, Silva STC, Nobre JA, et al. Duplex nested-PCR for detection of small ruminant lentiviruses. *Braz J Microbiol* 2018; 49 Suppl 1(Suppl 1): 83-92. [[Crossref](#)]
- 28.** Wang J, Cai K, Zhang R, He X, Shen X, Liu J, et al. Novel One-Step Single-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2. *Anal Chem* 2020; 92(13): 9399-404. [[Crossref](#)]
- 29.** Ashraf MJ, Shamsizadeh F, Morovati H, Hejazinia S, Kord M, Ansari S, et al. Accompanying a semi-nested PCR assay to support histopathology findings of fungal keratitis in formalin-fixed paraffin-embedded corneal samples. *J Clin Lab Anal* 2022: e24764. [[Crossref](#)]
- 30.** El-Gayar MH, Saleh SE, Mohamed AF, Aboulwafa MM, Hassouna NA, Allayeh AK. Isolation, Propagation and Genotyping of Human Rotaviruses Circulating among Children with Gastroenteritis in Two Egyptian University Hospitals. *Biology (Basel)* 2022; 11(10): 1413. [[Crossref](#)]
- 31.** Moin-Vaziri V, Zare F, Seyyed Tabaei SJ, Saberi R, Hajjaran H. Successful Isolation of Leishmania RNA Virus (LRV) from *Leishmania major* in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Central Iran: An Update on Cases. *Acta Parasitol* 2022; 67(3): 1290-8. [[Crossref](#)]
- 32.** Papadopoulou K, Falk TM, Metze D, Böer-Auer A. No evidence of *Borrelia* in cutaneous infiltrates of B-cell lymphomas with a highly sensitive, semi-nested real-time polymerase chain reaction targeting the 5S-23S intergenic spacer region. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2022; 36(6): 836-45. [[Crossref](#)]
- 33.** Şahiner F. Nested PCR and semi-nested PCR (Figure 1, Molecular Biology). In: *tibbiviroloji.com* (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at: <http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.1.nested.pcr.png> [Published; December 1, 2022]
- 34.** Loh E. Anchored PCR: Amplification with single-sided specificity. *Methods* 1991; 2(1): 11-9. [[Crossref](#)]
- 35.** Ferradini L, Roman-Roman S, Azogui O, Genevée C, Viel S, Hercend T, et al. The use of anchored polymerase chain reaction for the study of large numbers of human T-cell receptor transcripts. *Mol Immunol* 1993; 30(13): 1143-50. [[Crossref](#)]
- 36.** Beg S, Bareja R, Ohara K, Eng KW, Wilkes DC, Pisapia DJ, et al. Integration of whole-exome and anchored PCR-based next generation sequencing significantly increases detection of actionable alterations in precision oncology. *Transl Oncol* 2021; 14(1): 100944. [[Crossref](#)]
- 37.** Krawczyk B, Kur J, Stojowska-Swędryńska K, Śpibida M. Principles and applications of Ligation Mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Acta Biochim Pol* 2016; 63(1): 39-52. [[Crossref](#)]
- 38.** Dai SM, Chen HH, Chang C, Riggs AD, Flanagan SD. Ligation-mediated PCR for quantitative in vivo footprinting. *Nat Biotechnol* 2000; 18(10): 1108-11. [[Crossref](#)]
- 39.** Yu D, Zhou T, Sun X, Sun Z, Sheng X, Tan Y, et al. Cyclic Digestion and Ligation-Mediated PCR Used for Flanking Sequence Walking. *Sci Rep* 2020; 10(1): 3434. [[Crossref](#)]

- 40.** Dawes JC, Webster P, Iadarola B, Garcia-Diaz C, Dore M, Bolt BJ, et al. LUMI-PCR: an Illumina platform ligation-mediated PCR protocol for integration site cloning, provides molecular quantitation of integration sites. *Mob DNA* 2020; 11: 7. [[Crossref](#)]
- 41.** Lazinski DW, Camilli A. Homopolymer tail-mediated ligation PCR: a streamlined and highly efficient method for DNA cloning and library construction. *Biotechniques* 2013; 54(1): 25-34. [[Crossref](#)]
- 42.** Ochman H, Ajioka JW, Garza D, Hartl DL. Inverse polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y)* 1990; 8(8): 759-60. [[Crossref](#)]
- 43.** Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 1988; 120(3): 621-3. [[Crossref](#)]
- 44.** Clark DP, Pazdernik NJ. DNA Synthesis In Vivo and In Vitro (Chapter 4). In: Clark DP, Pazdernik NJ (eds), *Biotechnology* (2nd edition). 2015, Academic Cell-Elsevier, USA. pp:97-130. [[Crossref](#)]
- 45.** Tansirichaiya S, Winje E, Wigand J, Al-Haroni M. Inverse PCR-based detection reveal novel mobile genetic elements and their associated genes in the human oral metagenome. *BMC Oral Health* 2022; 22(1): 210. [[Crossref](#)]
- 46.** Silva D, Santos G, Barroca M, Collins T. Inverse PCR for Point Mutation Introduction. *Methods Mol Biol* 2017; 1620: 87-100. [[Crossref](#)]
- 47.** Şahiner F. Inverse PCR (Figure 2, Molecular Biology). In: *tibbiviroloji.com* (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at: <http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.2.invers.pcr.png> [Published; December 1, 2022]
- 48.** Gál J, Kálmán M. Autosticky PCR. In: Chen BY, Janes HW (eds), *PCR Cloning Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 192 (2nd edition). 2002, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. pp:141-51. [[Crossref](#)]
- 49.** Gál J, Schnell R, Szekeres S, Kálmán M. Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (autosticky PCR). *Mol Gen Genet* 1999; 260(6): 569-73. [[Crossref](#)]
- 50.** Yamashita K, Hosoda K, Nishizawa N, Katoh H, Watanabe M. Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment. *Cancer Sci* 2018; 109(12): 3695-706. [[Crossref](#)]
- 51.** Nehdi A, Samman N, Aguilar-Sánchez V, Farah A, Yurdusev E, Boudjelal M, et al. Novel Strategies to Optimize the Amplification of Single-Stranded DNA. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 401. [[Crossref](#)]
- 52.** Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(7): 1933-8. [[Crossref](#)]
- 53.** Heiat M, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaee MJ, Farnoosh G. Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnol Appl Biochem* 2017; 64(4): 541-8. [[Crossref](#)]
- 54.** Şahiner F. Asymmetric PCR (Figure 3, Molecular Biology). In: *tibbiviroloji.com* (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at: <http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.3.asimetrik.pcr.png> [Published; December 1, 2022]
- 55.** Valentini A, Timperio AM, Cappuccio I, Zolla L. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. *Electrophoresis* 1996; 17(10): 1553-4. [[Crossref](#)]
- 56.** Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, et al. The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci* 2022; 23(22): 14382. [[Crossref](#)]
- 57.** Duarte ER, Hamdan JS. RAPD differentiation of *Malassezia* spp. from cattle, dogs and humans. *Mycoses* 2010; 53(1): 48-56. [[Crossref](#)]
- 58.** Khandka DK, Tuna M, Tal M, Nejdat A, Golan-Goldhirsh A. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2852-6. [[Crossref](#)]
- 59.** Khare P, Sahu U. Recent advances in the diagnostic methods of Leishmaniasis (Chapter 3). In: Samant M, Pandey SC (eds), *Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis*. 2021, Academic Press, USA. pp: 45-62. [[Crossref](#)]
- 60.** Öz Aydın S. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University* 2004; 6: 113-30.
- 61.** Şahiner F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Figure 4, Molecular Biology). In: *tibbiviroloji.com* (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at: <http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.4.rapd.pcr.png> [Published; December 1, 2022]
- 62.** Ryazantsev DY, Voronina DV, Zavriev SK. Immuno-PCR: Achievements and Perspectives. *Biochemistry (Mosc)* 2016; 81(13): 1754-70. [[Crossref](#)]
- 63.** Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992; 258(5079): 120-2. [[Crossref](#)]
- 64.** Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 653014. [[Crossref](#)]
- 65.** Kanagal-Shamanna R. Digital PCR: Principles and Applications. *Methods Mol Biol* 2016; 1392: 43-50. [[Crossref](#)]
- 66.** Lambrescu I, Popa A, Manole E, Ceafalan LC, Gaina G. Application of Droplet Digital PCR Technology in

Muscular Dystrophies Research. *Int J Mol Sci* 2022; 23(9): 4802. [[Crossref](#)]

67. Şahiner F. Digital PCR (Figure 5, Molecular Biology). In: tibbiviroloji.com (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at:

<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.5.dijital.pcr.png> [Published; December 1, 2022]

68. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16): 9236-41. [[Crossref](#)]

69. Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, Del Re M, Cacciola R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(6): 1305. [[Crossref](#)]

70. Shekhawat DS, Sharma C, Singh K, Singh P, Bhardwaj A, Patwa P. Critical appraisal of droplet digital polymerase chain reaction application for noninvasive prenatal testing. *Congenit Anom (Kyoto)* 2022; 62(5): 188-97. [[Crossref](#)]

71. Bagasra O. Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat Protoc* 2007; 2(11): 2782-95. [[Crossref](#)]

72. Long AA, Komminoth P. In situ PCR. *Methods Mol Biol* 1997; 71: 141-61. [[Crossref](#)]

73. Hussein EA, Hair-Bejo M, Omar AR, Arshad SS, Hani H, Balakrishnan KN, et al. Velogenic newcastle disease virus tissue tropism and pathogenesis of infection in chickens by application of in situ PCR, immunoperoxase staining and HE staining. *Microb Pathog* 2019; 129: 213-23. [[Crossref](#)]

74. Mabruk MJ. In situ hybridization: detecting viral nucleic acid in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(5): 653-61. [[Crossref](#)]

75. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 2017; 8: 108. [[Crossref](#)]

76. McChlery SM, Clarke SC. The use of hydrolysis and hairpin probes in real-time PCR. *Mol Biotechnol* 2003; 25(3): 267-74. [[Crossref](#)]

77. Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 2011; 4: 263. [[Crossref](#)]

78. Gerasimova YV, Kolpashchikov DM. Enzyme-assisted target recycling (EATR) for nucleic acid detection. *Chem Soc Rev* 2014; 43(17): 6405-38. [[Crossref](#)]

79. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19. [[Crossref](#)]

80. Şahiner F. Fluorescent signal systems in real-time PCR (Figure 6, Molecular Biology). In: tibbiviroloji.com (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>),

Türkiye. Available at:

<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.6.real.time.pcr.png> [Published; December 1, 2022]

81. Sahoo S, Mandal S, Das P, Bhattacharya S, Chandy M. An analysis of the standard curve parameters of cytomegalovirus, BK virus and hepatitis B virus quantitative polymerase chain reaction from a clinical virology laboratory in eastern India. *Indian J Med Microbiol* 2022; 40(1): 81-5. [[Crossref](#)]

82. Lübeck PS, Hoorfar J. PCR Technology and Applications to Zoonotic Food-Borne Bacterial Pathogens. In: Sachse K, Frey J (eds), *PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*. 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. pp:65-86.

83. Kelleher KL, Leck KJ, Hendry IA, Matthaei KI. A one-step quantitative reverse transcription polymerase chain reaction procedure. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; 6(3): 100-7. [[Crossref](#)]

84. Haddad F, Baldwin KM. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol Biol* 2010; 630: 261-70. [[Crossref](#)]

85. Şahiner F. Reverse transcription PCR (Figure 7, Molecular Biology). In: tibbiviroloji.com (<http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/sh/m.p1.htm>), Türkiye. Available at: <http://tibbiviroloji.com/4/tr/molecular/tr.7.revers.transkripsiyon.pcr.png> [Published; December 1, 2022]

86. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(14): 4008. [[Crossref](#)]

87. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(21): 6409-12. Erratum in: *Nucleic Acids Res* 1991; 19(3): 698. [[Crossref](#)]

88. Phung TTB, Chu SV, Vu ST, Pham HT, Nguyen HM, Nguyen HD, et al. COLD-PCR Method for Early Detection of Antiviral Drug-Resistance Mutations in Treatment-Naive Children with Chronic Hepatitis B. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10(7): 491. [[Crossref](#)]

89. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008; 14(5): 579-84. [[Crossref](#)]

90. Chua EW, Maggo S, Kennedy MA. Long Fragment Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol* 2017; 1620: 65-74. [[Crossref](#)]

91. Jia H, Guo Y, Zhao W, Wang K. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Sci Rep* 2014; 4: 5737. [[Crossref](#)]

92. Tekin K, Aygar İS, Hoşbul T. Basic Principles of Polymerase Chain Reaction Technology. *J Mol Virol Immunol* 2020; 1(1): 57-66. [[Crossref](#)]