Open Access Journal [doi: 10.46683/jmvi.2020.8] Derleme Yazı / Review Article

Journal of Molecular Virology and Immunology

PCR Öncesi Hazırlık, PCR Kolaylaştırıcıları ve Dengeleyici Katkılar

Pre-PCR Processing, PCR Facilitators and Stabilizer Additives

Kemal TEKİN[1] [ID], Mustafa KOCAMAN[2] [ID]

[1]SBÜ Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, UHS Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].
[2]SBÜ Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Doku Tipleme Laboratuvarı, Ankara, Türkiye [Tissue Typing Laboratory, UHS Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 14.07.2020. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.07.2020.
İletişim [Correspondence]: Kemal TEKİN; Uzm.Dr., SBÜ Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: ktekin1978@gmail.com [Kemal TEKİN; MD, Department of Medical Microbiology, UHS Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey. E-mail: ktekin1978@gmail.com]

Özet

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli testler günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tanı ve izleminde en sık kullanılan moleküler yöntemlerdir. PCR'ın farklı amaçlar için tasarlanmış nested PCR, ters transkripsiyon PCR, multipleks PCR, real-time PCR ve kantitatif PCR gibi çok sayıda farklı modifikasyonu geliştirilmiştir. Real-time PCR'ın bile birbirinden farklı görüntüleme yöntemleri ve prob tasarımlarının kullanıldığı çok sayıda alt tipi vardır. PCR yöntemi bu modifikasyonları dışında yeni nesil dizi analizi, DNA çip teknolojisi, ters hibridizasyon teknikleri, klonlama çalışmaları, lumineks teknolojisi, PCR-ELISA ve PCR-RFLP gibi temel moleküler tekniklerin bir parçası veya ön basamağı olarak da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu önemli teknik çevresel, klinik, fosil, adli tıp, gıda, bitki, su ve in-vitro ortam örneklerinde başlıca DNA veya RNA varlığını saptamayı ve analiz etmeyi hedefler. Bu örneklerin bazıları PCR üzerine değişen derecelerde inhibitör etkiler gösteren çok sayıda kompleks biyolojik molekül içeren karışımlardır. Bu heterojen karışımlar içerisinde bulunan inhibitör maddelerin ve ayrıca DNA ve RNA yapısını bozabilen enzimlerin uzaklaştırılması önemlidir. Nükleik asit eldesi için bazı durumlarda hücre duvarı yapılarını parçalamak veya bu moleküllere bağlı proteinleri uzaklaştırmak gerekirken, tüm işlemleri DNA ve RNA bütünlüğünü bozmadan yapmak önemlidir. Yetersiz nükleik asit ekstraksiyonu veya inhibitör maddelerin varlığı özellikle az sayıda hedef nükleik asit içeren örneklerde yanlış negatif sonuçlara neden olabilen önemli bir problemdir. Günümüzde DNA ve RNA eldesi için çok sayıda farklı ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemi tanımlanmış ve bu yöntemlerin farklı kombinasyonları otomatize sistemlere entegre edilmiştir. PCR reaksiyonunun verimliliğini artırmanın alternatif bir yolu ise reaksiyon karışımına amplifikasyon kolaylaştırıcıları veya PCR güçlendiricileri olarak adlandırılan stabilizatör katkıların eklenmesidir. PCR temelli yeni bir protokol tasarlanırken veya yeni geliştirilen PCR temelli bir teknikte farklı moleküller kullanılırken ortaya çıkabilecek bilinmeyen yeni inhibitör etkileri izleyerek PCR öncesi koşulların ve amplifikasyon sürecinin optimize edilmesi önem arz etmektedir. Bu makalede her biri farklı avantaj ve dezavantajlara sahip PCR öncesi hazırlık işlemlerinin ve yaygın kullanılan amplifikasyon kolaylaştırıcılarının genel özelliklerinin bir özeti sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kolaylaştırıcı, İnhibitör, Amplifikasyon, Optimizasyon.

Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) based tests are the most commonly used molecular methods in the diagnosis and monitoring of infectious diseases today. Numerous different modifications of PCR have been

©Copyright JMVI. Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

developed and designed for different purposes, such as nested PCR, reverse transcription PCR, multiplex PCR, real-time PCR and quantitative PCR. Even real-time PCR has many types using various imaging methods and different probe designs. Apart from these modifications, the PCR method is also widely used as a part or a preliminary step of basic molecular techniques such as next-generation sequence analysis, DNA chip technology, reverse hybridization techniques, cloning studies, luminex technology, PCR-ELISA and PCR-RFLP. This important technique aims to detect and analyze the presence of DNA or RNA in environmental, clinical, fossil, forensic, food, plant, water and in-vitro media samples. Some of these samples are mixtures containing many complex biological molecules with varying degrees of inhibitory effects on PCR. It is important to remove inhibitory substances in these heterogeneous mixtures as well as enzymes that can disrupt DNA and RNA structure. In order to obtain nucleic acids, in some cases, it is necessary to break down cell wall structures or remove the proteins tightly bound to these molecules and it is important to carry out all these processes without disrupting the integrity of DNA and RNA. Insufficient nucleic acid extraction or the presence of inhibitory agents are important problems that can cause false negative results, especially in samples containing a small number of target nucleic acids. Today, many different extraction and purification methods have been defined for DNA and RNA extraction and different combinations of these methods have been integrated into automated systems. An alternative way to increase the efficiency of the PCR reaction is to add stabilizer additives called amplification facilitators or PCR enhancers to the reaction mixture. It is important to optimize the pre-PCR conditions and amplification process by observing unknown inhibitory effects that may occur when designing a new PCR protocol or using different molecules in a newly developed PCR-based technique. This article provides a summary of the pre-PCR preparation processes, each with different advantages and disadvantages, and the general features of commonly used amplification facilitators.

Keywords: Facilitator, Inhibitor, Amplification, Optimization.

Giriş

PCR genel olarak; (i) örnek alma-toplama, (ii) PCR öncesi örnek hazırlama, (iii) amplifikasyon ve (iv) amplifikasyon ürünlerinin analizi olmak üzere dört ana basamağa ayrılabilir. Reaksiyon karışımı içerisine eklenecek amplifikasyon kolaylaştırıcıları ve reaksiyonda kullanılacak DNA polimerazın seçimi de PCR öncesi örnek hazırlama basamağına dahildir [1]. Reaksiyon optimize edilmesine rağmen PCR'ın başarılı olması dikkat isteyen bir süreci gerektirir. Hatta bazen kompleks örneklerdeki inhibitörlerin varlığı ile ilgili problemlerin üstesinden gelinemez. Bu nedenle, rutin uygulamalar için bir engel ve zorluk oluşturmasına rağmen çeşitli PCR öncesi örnek hazırlama stratejilerine gereksinim duyulur [2]. Rutin analizlerde kullanılan bir PCR yönteminin güvenilir sonuç vermesi ve test performansının reaksiyon süresince yüksek düzeyde tutulması için PCR öncesi örnek hazırlama kritik önem taşımaktadır [1].

Öncelikle çalışılacak örnek karışımı PCR inhibitörlerinin varlığı ve hedef nükleik asit (NA) konsantrasyonunun yeterliliği açısından değerlendirilir. Böylelikle numunenin PCR analizi için uygun olup olmadığı öngörülebilir. Örnekler yapısal içeriklerine göre heterojen veya homojen olarak gruplandırılır. Bu basamakta çoğu kompleks biyolojik örneğin heterojenöz yapıda olduğu dikkate alınmalıdır [1]. Örneğin, viskoz balgam örneklerinin otomatize sistemlerde doğrudan ekstraksiyona tabi tutulması güçtür ve durum; balgam örnekleri gerçek zamanlı PCR ile analiz edilirken nükleik asit izolasyonu öncesinde normal tuz, ditiyotreitol ve proteinaz K ile muamele gibi bir ön homojenizasyon işlemi gerektirir [3]. Son aşamada ise PCR öncesi etkili örnek hazırlama metotları kullanılarak DNA amplifikasyon koşulları optimize edilir [1]. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu için; (i) örnek alma-toplama metodunun optimizasyonu, (ii) PCR öncesi örnek hazırlama metodunun optimizasyonu, (iii) farklı DNA polimeraz ve/veya amplifikasyon kolaylaştırıcıları ile amplifikasyon koşullarının optimizasyonu, (iv) veya bu stratejilerin farklı kombinasyonlarının beraber kullanılması gibi stratejilere başvurulabilir [1,4].

Kompleks biyolojik numunelerde bulunan inhibitör maddeler hücre parçalanmasının yetersiz olmasına, termostabil DNA polimerazın inaktivasyonuna ve nükleik asitlerin bloke edilmesine neden olarak PCR etkinliğini

bozabilmekte ve sonuçta özellikle düşük hedef nükleik asit içeren örneklerde yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir [5,6]. Bu sorunu aşmak ve PCR uyumlu örnekler elde edebilmek için çeşitli ön işlemlere başvurulmaktadır. Bununla beraber, PCR öncesi örnek hazırlama tekniklerinin karmaşıklığı, deneyim gerektirmesi ve çok sayıda örneğin test edildiği durumlar için kullanımının zor ve zaman alıcı olması sebebiyle; PCR inhibisyonunun üstesinden gelmek için kullanılabilecek alternatif bir strateji olarak kompleks biyolojik numunelerin varlığında PCR etkinliğini arttırma stratejisi geliştirilmiştir [5,7]. Bu strateji inhibitörlere daha dayanıklı alternatif bir termostabil DNA polimeraz seçilmesi veya sığır serum albümini (BSA, *bovine serum albumin*) ve gp32 gibi amplifikasyon kolaylaştırıcılarının kullanılması gibi seçenekleri içerir.

Bu makalede PCR öncesi hazırlıkta kullanılan ön hazırlık işlemlerinin avantaj ve dezavantajları ele alınmış ve amplifikasyon kolaylaştırıcısı ve stabilizatör olarak PCR karışımına eklenebilen maddelere ve etki mekanizmalarına değinilmiştir.

PCR Öncesi Örnek Hazırlama Stratejileri

Örnek hazırlamanın temel amaçları şu şekilde sıralanabilir; amplifikasyon kapasitesini düşüren inhibitör maddeleri azaltmak, kalıp-hedef DNA oranını arttırarak PCR testinin uygulama pratikliğini arttırmak, heterojen bir örneğin homojenitesini arttırarak testi tekrarlanabilir hale getirmek.

PCR öncesi hazırlık aşamasında ilk olarak nükleik asit ekstraksiyon metotları ile hücrelerden DNA ve RNA serbestleştirilir ve ilave pürifikasyon metotları ile ekstraktlar daha da saflaştırılabilir. DNA ve RNA eldesi; Chelex (iyon değişim reçine) ekstraksiyonu, katyonik manyetik boncuklar ve silika esaslı filtreler (silika değişim reçinesi), organik ve non-organik ekstraksiyon yöntemleri, çevresel DNA'nın selüloz nitrat filtreler üzerinde yakalanması-konsantrasyonu ve ardından filtrelerden DNA ekstraksiyonu, gibi farklı prosedürlerle gerçekleştirilebilir [8-10]. Bu yöntemler nükleik asitlerin etkili bir şekilde eldesini sağlar ve birçok otomatize sistemde kullanılmaktadır. DNA ekstraktının yüksek basınca maruz bırakılması ve DNA'nın bir jel üzerinde küçük bir alanda toplanması gibi ekstraksiyon yöntemleri de tanımlanmıştır [8]. Bahsedilen yöntemlerle yapılan kapsamlı saflaştırmanın en önemli dezavantajı, genellikle %10 ila %80 gibi geri kazanım oranları ile önemli miktarda DNA kaybına yol açmasıdır. PCR öncesi hazırlıkta kapsamlı saflaştırmanın yerine, numune hazırlama adımının en aza indirildiği hızlı ekstraksiyon yaklaşımları veya tamamen dışarıda bırakıldığı doğrudan PCR (*direct PCR*) protokolleri de kullanılmaktadır. Ticari testlerde sıkça sunulan bu alternatif yaklaşımın zaman ve iş yükü avantajı yanında DNA kaybının minimalize edilmesi gibi önemli bir avantajı da bulunmaktadır. Bununla beraber, önemli bir dezavantaj olarak hızlı ekstraksiyon ve direkt PCR yöntemleri ile çalışılan örnekler yüksek miktarda PCR inhibitörü içerebilmektedir [8].

Sık kullanılan PCR öncesi örnek hazırlama metotları, (i) biyokimyasal, (ii) immünolojik, (iii) fiziksel ve (iv) fizyolojik yöntemler olmak üzere dört ana kategoriye ayrılabilir [1].

1. *Biyokimyasal metotlar*

Biyokimyasal yöntemler organik ve non-organik ekstraksiyon yöntemleri ile RNA veya DNA ekstraksiyonunu kapsar. Organik yöntem olarak fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ve non-organik yöntem olarak proteinaz K uygulaması veya proteinlerin NaCl, LiCl, Na-asetat, amonyum asetat gibi tuzlarla uzaklaştırılması gibi yaklaşımlar tanımlanmıştır. Biyokimyasal DNA ekstraksiyon metotlarının en önemli avantajı PCR için yüksek kalitede homojen örnek eldesine imkan vermeleridir. Bu işlem için birçok ticari kit hazırlanmıştır, hatta günümüzde bu sistemi kullanan otomatize ve etkinliği güçlü ekstraksiyon metotları kullanıma girmiştir. DNA ekstraksiyonunun kalitesini karşılaştıran çeşitli çalışmalar, bu kitlerin yüksek saflıkta ve konsantrasyonda DNA elde edilmesine olanak sağladığını göstermiştir. Ancak bu yöntemler genel olarak zaman alıcıdır ve ticari kitler genel olarak daha pahalıdır. Biyokimyasal yöntemlerle DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra PCR koşullarını iyileştirmek için manyetik yakalama ve DNA silis bağlayıcıların kullanılması gibi bazı ek ön-işlemler de gerçekleştirilebilir [1,11].

RNA eldesi için tasarlanmış biyokimyasal ekstraksiyon metotları da bulunmaktadır. RNA

eldesi DNA ekstraksiyonuna çok benzer şekilde fenol-kloroform ekstraksiyonu ile yapılabilir. Ancak bu prosedür bazı temel farklılıklar içerir. Örneğin, DNA pH 8 fenolde, RNA ise pH 4.5 fenolde sıvı fazda kalır. RNA eldesinde genomik DNA'nın elimine edilmesi de önemlidir ve bu işlem çalışılan örneğin asidik solüsyonlarla muamele edilmesi ile sağlanır [12]. RNA ekstraksiyonu için geliştirilen yöntemlerinin en önemli dezavantajı ise hücre lizisi sırasında mRNA yıkımı nedeniyle total RNA eldesinin istenilen düzeyde olmamasıdır. Bu nedenle total RNA eldesi için hücreleri cam boncuklar ile mekanik olarak parçalama yaklaşımı enzimatik parçalamaya tercih edilebilmektedir [1,11].

PCR öncesi örnek hazırlığında protein adsorbsiyonu (kan örneklerinde) ve lektin bazlı seperasyon (sığır eti içeren örneklerde) gibi adsorbsiyon prensibine dayalı biyokimyasal metotlar da kullanılabilir [1,11].

2. *İmmünolojik metotlar*

Bu kategori başlıca antikor kaplı manyetik boncukların kullanılması temeline dayalı yöntemleri içerir. Genellikle immün-yakalama sonrası lizis ve yıkama işlemleri gerekir, ancak bu yöntemle virüsler direkt olarak çalışılabilmektedir. Yakalama sonrası gerçekleştirilen işlemlere göre değişmekle beraber yöntem genel olarak uygun kalitede (kalıp nükleik asit oranı yüksek) homojen örnek eldesine olanak sağlamaktadır. Fakat bu yöntem birçok laboratuvar için pahalı ve zaman alıcıdır. Ayrıca, yöntemin spesifitesi bir bakımdan kullanılan antikorlara bağlı olduğundan çapraz reaksiyon durumlarında yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca, karmaşık matrisler (fekal materyaller gibi) antijen-antikor etkileşimini engelleyebilmektedir [1].

3. *Fiziksel metotlar*

PCR öncesi örnek hazırlama amacıyla kullanılan fiziksel metotlar; sıvı-sıvı (çift sıvı) fazlı sistemler, santrifüjleme ile yoğunluk farkına göre yüzdürme (*buoyant density centrifugation*), santrifüjleme, filtrasyon ve dilüsyon gibi çeşitli yöntemleri içermektedir. Bu metotların çalışma prensipleri hedef hücreleri yoğunluk ve büyüklük gibi fiziksel özelliklerine göre ayırmaya dayanır. Bu yöntemlerden biri olan çift sıvı fazlı sistemler hedef hücrelerin birbiri ile karışmayan iki faz arasında ayrıştırılmasını amaçlar [1]. Örneğin, fekal örneklerde *Helicobacter pylori* araştırılması için polietilen glikol ve dekstran temelli bir sistem kullanılmıştır [13].

Bir diğer fiziksel metot olan buoyant-density santrifüjleme yönteminin avantajı hedef organizmayı konsantre etmesi ve böylece hızlı saptamaya imkan vermesidir. Bu nedenle hızlı saptamanın önemli olduğu durumlarda tercih edilebilir bir yöntemdir. Bu işlem sonucunda PCR'da direkt olarak kullanılabilen tam (*whole*) hücreler elde edilir. Numunenin homojenliği biyolojik örnek matrisinin türüne göre farklılıklar gösterebilir. Numune matrisini oluşturan bileşenlerin ve elde edilmek istenilen hücrelerin aynı yoğunluğa sahip olması durumunda amplifikasyon inhibe olabilir. Fiziksel metotlar, immünolojik ve fizyolojik metotlarda karşılaşılabilen PCR protokolünün duyarlılığını etkileme problemini taşımadıkları için daha tercih edilebilir yöntemlerdir. Ayrıca bu yöntemler nispeten kullanıcı dostudur [1].

4. *Fizyolojik metotlar*

Bu yöntemler, bakteriyel çoğaltma veya hücresel komponentlerin (genom, sitoplazma ve hücre yüzeyinin bütünü gibi) biyosentezi prensipleri ile çalışır. Selektif (seçici), non-selektif ve zenginleştirici besiyerleri (sıvı veya agar-plak) kullanılarak PCR öncesi canlı hücrelerin konsantrasyonlarının arttırılması amaçlanır. Düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmaları bu yöntemlerin önemli avantajlarıdır. Fakat elde edilen yoğun canlı hücreler yüksek konsantrasyonda makromoleküller içerdiğinden, bu durum DNA polimeraz fonksiyonlarını veya primer-hedef bağlanmasını etkileyerek PCR reaksiyonunun biyokimyasal dengelerinde kaymalara yol açabilir. Bu nedenle bu tür örneklerin çalışma öncesi dilüe edilmesi önerilir [1,11].

Sonuç olarak PCR öncesi örnek hazırlama metotlarının her biri PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğünü farklı derecelerde etkiler. Bazı metotlar yüksek maliyetli veya zaman alıcıdır, ya da istenilen kalitede örnek sağlayamaz (Tablo 1). Örnek hazırlama metodunun seçimi ve optimizasyonunda özellikle yöntemin inhibitör maddeleri uzaklaştırabilme özelliği dikkate alınır.

Günümüzde örnek hazırlama ve DNA amplifikasyonunu aynı anda yapabilen otomatize sistemler dizayn edilmiş olup daha yaygın olarak kullanılmaları beklenmektedir [1]. Çoğu PCR protokolü farklı kategorilerden örnek hazırlama metotlarını kombine eder [7]. Bir fizyolojik ön-zenginleştirme işleminden sonra ikinci bir metot olarak biyokimyasal DNA ekstraksiyonu veya fiziksel yöntemlerden birini kullanmak yaygın başvurulan kombinasyon stratejileridir [1]. Ticari DNA ekstraksiyon kitlerinde ise tipik olarak proteinaz K sindirimi ile katı faz DNA saflaştırması kombine edilir [7]. Gelecekte hızlı, güvenilir ve kullanımı kolay PCR protokollerine karşı büyüyen talebe cevap verebilmek amacıyla, tanısal PCR testlerinin gelişimine yönelik araştırmalar büyük olasılıkla PCR öncesi örnek işleme stratejileri üzerine yoğunlaşacaktır [1]. Halen devam etmekte olan SARS-CoV-2 pandemisi bu büyüyen talebin bir örneği niteliğinde olup, PCR temelli ticari tanı kitleri hızlı ekstraksiyon sistemlerini tanı kitinin bir parçası olarak sunmaktadır.

Tablo 1. Çeşitli PCR öncesi örnek hazırlama metotlarının karşılaştırmalı performansları [4,14].

Örnek hazırlama metodu / alt kategori	Ürün	Ürünün homojenliği	Ürün konsantrasyonu	İnhibitörlerin uzaklaştırılması	Gereken süre	Maliyet
Biyokimyasal / DNA ekstraksiyonu	DNA	İyi	Orta	Evet	3-6 Saat	Yüksek
İmmünolojik / İmmünomanyetik yakalama	Hücre / DNA	Orta	Orta	Orta	2-4 Saat	Yüksek
Fiziksel / Buoyant dansite santrifügasyon	Hücre	Orta	İyi	Orta	30 dakika	Orta
Fizyolojik / Zenginleştirme	Hücre	Düşük	İyi	Düşük	6-24 Saat	Düşük
Hızlı ekstraksiyon kitleri / Organik ekstraksiyon	DNA / RNA	Düşük	Orta	Düşük	<15 dakika	Orta

PCR Kolaylaştırıcıları

Ana (*master*) miks basit olarak DNA polimeraz, primerler, nükleotidler ve reaksiyon tamponundan (Tris-HCl, KCl ve $MgCl_2$) oluşur. PCR metodolojisi geliştirilirken amplifikasyonun etkinliğini arttırmak için master miksin temel içeriğine çok sayıda eklemeler yapılmıştır. Bu ek maddeler amplifikasyon kolaylaştırıcıları (*amplification enhancers*, *amplification facilitators*) olarak adlandırılırlar. Bu maddeler; kalıp DNA'nın termal stabilitesini arttırma veya azaltma, DNA polimerazın hata oranını etkileme, test sisteminin duyarlılığını etkileme ve kompleks biyolojik örneklerden kaynaklanan amplifikasyon inhibisyonunu önleme gibi reaksiyonun farklı basamaklarını etkileyebilirler [1]. PCR kolaylaştırıcılarının etkinlikleri de kullanıldıkları konsantrasyona göre değişiklik gösterir [5]. Bu maddeler genel olarak (i) proteinler, (ii) organik çözücüler, (iii) non-iyonik deterjanlar, (iv) biyolojik-uyumlu çözeltiler ve (v) polimerler olmak üzere beş alt gruba ayrılır (Tablo 2).

Tablo 2. Amplifikasyon aktivatörleri (kolaylaştırıcılar, stabilizatörler, dengeleyiciler) [1,2,15-18]

Proteinler	Organik solventler	Non-iyonik deterjanlar	Biyolojik-uyumlu çözeltiler	Polimerik yapılı bileşikler
Sığır -*Bovine*- Serum Albümin (BSA)	Dimetil süfoksit (DMSO)	Tween 20	Betaine	Polietilen glikol 400
gp32 (T4 bakteriyofaj proteini)	Formamid	Tween 80	Gliserol	Polietilen glikol 4000
A-makroglobulin	Tetrametilen sülfoksit (sülfolan)	Triton-X 100	Asetamid	Dekstran 500
Kazein	Tetrametil amonyum klorid (TMAC)	Laureth-12		Dekstran 40
Lima fasulyesi tripsin inhibitörü		Nonidet P-40		
Soya fasulyesi tripsin inhibitörü				
Pitaz				

1. *Proteinler*

Çoğu PCR tamponu termostabil DNA polimerazların stabilizasyonuna yardım eden proteinöz bir bileşen içerir. BSA, jelatin ve T4 bakteriyofajın gen32'si tarafından kodlanan DNA bağlayıcı bir protein olan gp32 amplifikasyon kolaylaştırıcısı olarak yaygın kullanılan protein yapıda moleküllerdir. BSA'nın amplifikasyon karışımına eklenmesi; kan, fekal örnekler, kas dokusu ve hem içeren maddelere bağlı gelişen inhibisyonu azaltır. BSA bu maddelere bağlanarak onların etkilerini nötralize eder ve böylece PCR inhibisyonunu engelleyebilir [1]. Bir çalışmada *rTth* DNA polimerazın BSA ile kombine edilmesiyle %20 oranında kan içeren örneklerde bile PCR'ın amplifikasyon duyarlılığında azalma olmaksızın başarıyla uygulanabildiği gösterilmiştir [16]. Ayrıca, DNA polimerazın fekal örneklerde proteinazlara bağlı yıkılması amplifikasyon inhibisyonuna yol açtığı için, BSA ve gp32 bu proteinazlar için hedef substrat gibi davranarak inhibisyonun etkisini azaltırlar. BSA sıklıkla özel solüsyonlar içerisindeki proteinlerin stabilizasyonu için de kullanılmaktadır ve bu özelliği ile DNA polimerazların stabilizasyonunu sağlayarak amplifikasyonu kolaylaştırmaktadır. Protein gp32 ise tek zincirli DNA'ya bağlanarak onu nükleazlar tarafından parçalanmaya karşı korur ve böylece büyük miktarda pıhtılaşmış organik materyal içeren kan örneklerinde DNA polimerazlardan faydalanılabilirliği arttırır [1,2].

Reaksiyon karışımına her ml için 100-1000 µg otoklavlanmış jelatin veya nükleaz içermeyen BSA eklenebilir. Yine gp32, 0.5-10 nM konsantrasyonlarda kullanıldığında hedef moleküllerin çok uzun olduğu reaksiyonlarda PCR'ı stimüle etmektedir [15].

BSA humik maddelerin polimerizasyon önleyici etkilerini azaltan güçlü bir kolaylaştırıcıdır. Bununla birlikte, BSA humik asitin floresan söndürme şeklindeki inhibisyonunu önlemede yetersizdir. Örneğin, 2 ve 10 µg BSA ile yürütülen reaksiyonlarda EvaGreen boyasının floresans söndürmesi birbirine benzer seviyelerde gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak, boyalar ve humik asit arasındaki bağlanmanın, BSA ve humik asit ile karşılaştırıldığında daha yüksek afiniteli olması düşünülmüştür [8].

Bir diğer protein yapılı kolaylaştırıcı olan α-2-makroglobülin ise termostabil DNA polimerazın proteolizini önlemek için bazen işlenmemiş DNA ekstraktları ile kombine olarak kullanılabilen bir proteaz inhibe edici enzimdir [15,19].

2. *Organik solventler*

PCR kolaylaştırıcısı olarak en sık kullanılan organik solventler dimetil sülfoksit (DMSO) ve formamiddir. Bu solventlerin her ikisi de primer-kalıp yanlış eşleşmelerini önleyerek amplifikasyon spesifitesini arttırırken, primerlerin termal stabilitesini ve DNA polimerazların termal aktivitesini de olumlu yönde etkilerler [1]. DMSO termostabil DNA polimeraz aktivitesini az da olsa inhibe etmesine rağmen, DNA zinciri içine saniyede eklenen nükleotid sayısı bu bileşiğin varlığında önemli ölçüde geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımına DMSO %2-10 ve formamid %2-5 (hacim/hacim) konsantrasyonlarda eklenebilir [15].

Bir diğer organik solvent olan tetrametilen sülfoksitin (sülfolan) çift zincirli DNA'nın ayrılmasını kolaylaştırmada DMSO ile kıyaslandığında daha güçlü etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu molekülün düzlemsel yapısı nedeniyle çift sarmallı DNA'nın hidrojen bağları ile daha güçlü etkileşime girdiği düşünülmektedir. Tetrametilen sülfoksit ayrıca çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri arasındaki sterik ve elektrostatik itmeyi düşürmeye de yardımcı olabilir. Tetrametil amonyum klorid (TMAC) ise formamide alternatif olarak kullanılabilen bir diğer kolaylaştırıcıdır [15].

3. *Non-iyonik deterjanlar*

Non-iyonik deterjanlar polimerazların fiziksel yapısını proteazların etkilerinden veya ısı kaynaklı inaktivasyondan korumak amacıyla PCR tamponlarına eklenirler. Bu maddeler ayrıca primerler veya hedef DNA üzerinde oluşabilecek sekonder yapıların ayrıştırılmasına (çözülmesine) da yardım ederler. En sık kullanılan PCR kolaylaştırıcısı non-iyonik deterjanlar tween 20, triton-X ve Laureth-12'dir. Tween 20'nin eklenmesinin *Taq* DNA polimerazın aktivitesini stimüle ettiği ve enzimin yanlış sonlanmalarını azalttığı gösterilmiştir. Fakat bunun mekanizması ile ilgili bilgiler tam olarak açık değildir [1,15].

4. *Biyolojik-uyumlu çözeltiler*

Betain ve gliserol PCR'da amplifikasyon kolaylaştırıcısı olarak en yaygın kullanılan biyolojik-uyumlu çözeltilerdir. Bu çözeltiler özel koşullarda organizmaların veya hücresel sistemlerin biyolojik aktivitelerini sürdürebilmeleri için kullanılırlar. Bu özelliği ile gliserol termostabil enzimlerin saklama tamponlarında da kullanılır [15]. Gliserol ayrıca protein domainleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri arttırır ve proteinlerin denatürasyona dayanabilecekleri sıcaklığı yükseltir. Gliserol amplifikasyonu kolaylaştırıcı bir özellik olarak DNA'nın zincir ayrılma ısısını da azaltabilir [1]. Betain ise hem asidik hem bazik komponentleri olan bir moleküldür (*zwitterion*) ve AT ve GC baz eşleşmelerinin termodinamik stabilitesini dengelemeye yardımcı olur [15]. Betain ve gliserolün amplifikasyon karışımında spesifiteyi arttırdığı ve GC'den zengin bölgelerin neden olduğu sekonder yapıları azalttığı belirlenmiştir [17]. Betainin yüksek tuz konsantrasyonlarında termostabil DNA polimerazın denatürasyonunu engelleyen bir ozmotik-koruyucu olarak görev yaptığı da bildirilmiştir [15].

5. *Polimerik yapılı bileşikler*

Polietilen glikol (PEG) ve dekstran amplifikasyon kolaylaştırıcısı olarak kullanılabilen polimerlerdir. PEG'ün organik çözücülerinkine benzer yollarla amplifikasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Ayrıca PEG'ün fekal örneklerdeki inhibisyonu azalttığı da gösterilmiştir. PEG BSA'ya benzer olarak enzim stabilizasyonu yoluyla enzimatik aktivitenin sürdürülebilirliğini de sağlamaktadır. Bu özelliği ile DNA polimerazın stabilizasyonunu sağlayarak amplifikasyonu arttırabileceği bildirilmektedir [1].

Sonuç

PCR temelli tanısal testlerin güvenilirliği ve duyarlılığında kritik öneme sahip parametreler arasında DNA veya RNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması ve inhibitör etkinliği olan moleküllerin uzaklaştırılması kritik öneme sahiptir. Bu amaçla çok sayıda PCR öncesi hazırlık prosedürü geliştirilmiş ve günümüzde bu prosedürlerin bazıları otomatize sistemlere adapte edilmiş ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine SARS-CoV-2 pandemisi gibi yüksek kapasiteli test çalışılmasına gereksinim duyulan ve hızlı sonuç almanın önemli olduğu durumlarda tercih edilen hızlı ekstraksiyon kitlerinin ve yaklaşımların hız ve kullanım kolaylığı gibi avantajları yanında inhibitörlerin yeterince uzaklaştırılamaması bazı dezavantajları olduğu da dikkate alınmalıdır.

Tüm canlılarda ve virüsler de dahil olmak üzere biyolojik varlıklarda dikkati çeken bir nokta her bir molekülün birden çok işleve sahip olmasıdır. Bu noktadan biyolojik dünyada israf yoktur diyebiliriz. PCR reaksiyonlarını inhibe eden moleküller de dahil olmak üzere her biri ayrı görevlere ve işlevlere sahip olan bu moleküller biyolojik dünyada DNA replikasyonu yanında yüzlerce farklı reaksiyonda birbiri ile etkileşerek mükemmel bir nizam (düzen) ve hassas bir mizan (ölçü) içinde görev yapmaktadır. Deneysel koşullarda sadece DNA replikasyonu üzerine odaklanmamıza rağmen PCR protokollerinin optimizasyonunda zorlanmaktayız. Çok işlevli bu dengeleyici molekülleri amacımıza yönelik olumlu ve olumsuz özelliklerini ve etkilerini dikkate alarak kullanırken farklı dozlardaki etkinliklerini ve farklı moleküllerle olan etkileşimlerini dikkatli bir şekilde incelemek ve reaksiyonları optimize etmek büyük önem arz etmektedir.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur. **Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Löfström C. Pre-PCR Processing of Samples. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp:31-50.

2. 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 Inc, Totowa, NJ, USA. pp:65-86.

3. Yu F, Qiu T, Zeng Y, Wang Y, Zheng S, Chen X, et al. Comparative Evaluation of Three Preprocessing Methods for Extraction and Detection of Influenza A

Virus Nucleic Acids from Sputum. Front Med (Lausanne) 2018; 5: 56. [Crossref]

4. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol 2004; 26(2): 133-46. [Crossref]

5. Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4463-70.

6. Dalla-Costa LM, Morello LG, Conte D, Pereira LA, Palmeiro JK, Ambrosio A, et al. Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. J Microbiol Methods. 2017; 140: 61-6. [Crossref]

7. Kapp JR, Diss T, Spicer J, Gandy M, Schrijver I, Jennings LJ, et al. Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: a diagnostic RING trial. J Clin Pathol 2015; 68(2): 111-8. [Crossref]

8. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. Anal Bioanal Chem 2020; 412(9): 2009-23. [Crossref]

9. Kumar G, Eble JE, Gaither MR. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. Mol Ecol Resour 2020; 20(1): 29-39. [Crossref]

10. Zhou Y, Zhang Y, He W, Wang J, Peng F, Huang L, et al. Rapid Regeneration and Reuse of Silica Columns from PCR Purification and Gel Extraction Kits. Sci Rep 2018; 8(1): 12870. [Crossref]

11. Rådström P, Lövenklev M, Wolffs P, Löfström C, Knutsson R. Pre-PCR processing strategies. In: Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin AM (eds), PCR Technology: Current Innovations. 2003, 2nd, CRC/Taylor & Francis, New York. pp:37-45.

12. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA. Phenol: Product Information. Available at: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p3653pis.pdf [Accessed May 22, 2020].

13. Lantz PG, Matsson M, Wadström T, Radström P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous twophase system for sample preparation prior to PCR. J Microbiol Methods 1997; 28(3): 159-67.

14. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. RNA Rapid Extraction Solution. Available at: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM9775#/AM9775 [Accessed June 18, 2020].

15. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Deoxynucleotide Triphosphates and Buffer Components (Chapter 6). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:91-102.

16. Al-Soud WA, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol 1998; 64(10): 3748-53.

17. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res 1997; 25(19): 3957-8. [Crossref]

18. Hedman J, Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. Methods Mol Biol 2013; 943: 17-48. [Crossref]

19. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. The PCR in Practice (Chapter 3). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:17-24.