

HGV RNA'nın Saptanmasında Touchdown-PCR'in Öne- mi(*)

Ayhan PEKBAY(**), Meryem ÇETİN(**), Abdülkerim BEDİR(***), Ahmet SANIÇ(**),
Murat GÜNAYDIN(**)

ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanıldığı çalış-
malarda optimizasyon önemlidir. Touchdown PCR (TD-
PCR), optimizasyonda farklı bir yaklaşımı temsil etmekte-
dir ve optimizasyon primerlerin annealing (yapışma) ısısı
üzerine odaklanmaktadır. Annealing ısısı, tek bir siklusun
seyri süresince, ardışık olarak azalarak düzenlenmektedir.
Çalışmamızda, 97 kronik karaciğer hastasında, hepatit G
virusu'nun (HGV) 5'-non-coding bölge (5'-NCR) ve non-
strüktürel-5a (NS5a) kodlayıcı genom bölgelerine yönelik
primerler kullanılarak reverse transcriptase PCR (RT-
PCR) yöntemi ile serumda HGV-RNA varlığı araştırılmış-
tır. NS5a bölgesine yönelik iki primerin erime (Tm) dere-
celeri birbirinden çok farklı olduğu için çok sayıda nons-
pesifik band oluşmuştur. Bunun üzerine touchdown PCR
(TD-PCR) tekniği kullanılarak testler tekrarlanmış, nons-
pesifik bandların oldukça azaldığı veya kaybolduğu ve ist-
enilen ürünlere ait bandların daha belirgin olduğu göz-
lenmiştir.

Termal cycler programında TD-PCR tekniğinin kullanıl-
ması ürün verimini ve özgülüğünü arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler : Touchdown-PCR, optimizasyon

SUMMARY

The Importance of Touchdown-PCR in Detection of
HGV-RNA

Optimization is important in studies by using PCR. Touch-
down (TD) PCR represents a fundamentally different ap-
proach to PCR optimisation. The optimisation is accomp-
lished by focusing on a single variable, primer's annealing
temperature. Moreover, a range of annealing temperatures
is sequentially sampled during the course of a single
cycling program.

In this study, hepatitis G virus RNA (HGV-RNA) was de-
tected by using a RT-PCR with primers for 5'-non-coding
region (5'-NCR) and (Non-structural-5a) NS5a genom re-
gion of HGV in 97 patients with chronic liver disease. We
used TD-PCR technique to eliminate the non-specific
bands, because these had been seen in the PCR tests for
primers of NS5a region whose melting temperatures were
rather different from each other were used. Non-specific
bands were quite decreased or disappeared, and bands be-
longing to desired products were clearly seen by the TD-
PCR cycle profile used.

The use of thermal cycler programming using of TD-PCR
technique induces specificity and maximal productivity.

Key Words : Touchdown-PCR, optimization

GİRİŞ

Kompleks DNA kalıplarından polimeraz zincir reak-
siyonu (PCR) ile amplifikasyonu etkileyen birçok
değişken vardır. Reaksiyon sonuçları, Mg++, H+,
dNTP ve primer kalıplarının konsantrasyonları ve
buna ilave birçok parametre tarafından etkilenmekte-
dir (1). PCR' la optimum sonuç, arzu edilen ürünün
kuvvetli, tek band halinde boyanmış halde jelde tes-
biti ile mümkün olmaktadır. Fakat, zayıf band, bir-
den fazla band veya band yokluğu sıklıkla gözlene-
bilmektedir. Bu nedenle testlerin iyi optimize edil-

mesi gerekmektedir. Touchdown-PCR (TD-PCR)'da
optimizasyon, kullanılan tamponlar ve siklik şartlar-
dan ziyade, annealing (yapışma) ısısı üzerine odakla-
narak gerçekleştirilmektedir. Tek bir siklus progra-
mının seyri süresince yapışma dereceleri ardışık ola-
rak değişecek şekilde düzenlenmektedir (1).

Bu çalışmada, birbirlerinden oldukça farklı erime
(Tm) derecelerine sahip primer kalıplarını kullandı-
ğımız durumda, klasik PCR yönteminde gözlenen
nonspesifik ürünlerin kaybolmasında, TD-PCR tek-
niğinin etkinliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kronik karaciğer hastalığı olan 97 hastadan alınan
serum örneklerinde reverse transkriptaz PCR yöne-
mi ile hepatit G virus RNA'sı (HGV-RNA) varlığı
araştırılmıştır. 200 ml serum örneğinden guanid-

(*)10th ECCMID (28-31 Mayıs 2000, Stockholm) Kongresi'nde
sunulmuştur.

(**)Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

(***)Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana-
bilim Dalı,Samsun

rum tiyosiyanat - fenol kloroform chloroform yöntemi (2,3) ile RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA ekstraktları, hemen çalışılmayacaksa -20°C 'de saklanmıştır. PCR çalışmasında önce 90°C 'de 2 dakika RNA denatürasyonundan sonra, Non-strüktürel-5a (NS5a) kodlayıcı genom bölgesi ve 5' non-coding bölge (NCR)'ye yönelik iki farklı antisense primerler kullanılarak komplementer DNA elde edilmiştir. Komplementer DNA 94°C 'de 1 dakika denatüre edildikten sonra, NS5a ve 5' NCR bölgelerine yönelik sens ve antisens primerler kullanılarak her bir bölge için ayrı ayrı olmak üzere, 30 sikluslu bir amplifikasyon programı ile iki kez PCR yapılarak komplementer DNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan primerler (2): NS5a sense primer
5'-TCTTTGTGGTAGTAGCCGAGAGAT-3' NS5a
antisense primer:
5' CGAATGAGTCAGAGGACGGGGTAT-3'
5' NCR sense primer :
5' CGGCCAAAGGTGGTGGATG 62-3'
5' NCR antisense primer :
5'-GACGAGCC62 TGACGTCGGG-3'.

NS5a bölgesi için kullanılan sense ve antisense primerlerin erime dereceleri birbirlerinden oldukça

Siklus programı (NS5a bölgesi) (2,3) :

94°C 4 dakika : 1 defa
94°C 75 saniye
55°C 75 saniye
72°C 60 saniye
72°C 7 dakika : 1 defa

→ 30 siklus

Siklus programı (5' NCR bölgesi) (2,3) :

94°C 4 dakika : 1 defa
94°C 75 saniye
59°C 75 saniye
72°C 60 saniye
72°C 7 dakika : 1 defa

→ 30 siklus

farklı olduğu için, yapılan PCR sonucunda çok sayıda non-spesifik bandlar gözlemlendi. Bunun üzerine, NS5a bölgesi primerleri ile yapılan PCR, her bir örnek için daha önce elde edilmiş komplementer DNA'lar kullanılarak TD-PCR siklus programı ile yeniden yapılmıştır (1). TD-PCR yönteminde, an-

nealing ısısı özel olarak, aynı program içerisinde git-tikçe azalacak şekilde düzenlenmiştir. Annealing dereceleri, herbir derece için iki siklus uygulanarak 63°C 'den 56°C 'ye kadar birer derece ($1^{\circ}\text{C}/2\text{siklus}$) düşürülmüş ve son bölümünde 52°C 'de 24 siklus içeren tek aşamalı bir amplifikasyon programı uygulanmıştır (1,2).

Elde edilen ürünlerin değerlendirilmesinde, etidyum

TD PCR yönteminde uyguladığımız siklus programı :

Denatürasyon	⇒	94°C'de 1 dk
Denatürasyon	⇒	94°C'de 75 sn
		63°C'de 75 sn
		62°C'de 75 sn
		61°C'de 75 sn
		60°C'de 75 sn
Annealing	⇒	59°C'de 75 sn 2'şer siklus (Toplam 16 siklus)
		58°C'de 75 sn
		57°C'de 75 sn
		56°C'de 75 sn
		52°C'de 75 sn 24 siklus
Ekstension	⇒	72°C'de 60 sn
Toplam: 40 siklus		

bromid ile boyanmış agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. NS5a bölgesi için 135 ve 5'-NCR bölgesi için 185 baz çifti büyüklüğündeki ürünlere ait band saptanan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR çalışması kros kontaminasyondan kaçınarak ve her 20 örnek için 1 pozitif, 2 negatif kontrol alınarak, Kwok ve Higuchi (4) tarafından önerilen koşullar altında yapılmıştır.

BULGULAR

Klasik PCR yöntemi ile TD-PCR yöntemi karşılaştırıldığında HGV-RNA saptanma oranında değişiklik gözlenmemiş, ancak klasik PCR yönteminde, zaman zaman arzu edilen ürüne ait bandlardan bile daha

Resim 1: HGV NS5a bölgesine ait ürünlerin %1.5 lik agaroz jeldeki görüntüsü



güçlü oluşabilen non-spesifik bandlar TD-PCR yöntemi ile çok zayıf bandlar halinde görülmüş ya da tamamen kaybolmuştur (Şekil 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

PCR reaksiyonunda spesifite için üç duruma ihtiyaç duyulmaktadır: "Hot start = Sıcak başlangıç", "touchdown siklus profili" ve "hafif derecede azaltılmış spesifik primer ve dNTP molar konsantrasyonları". Bu durumlar altında yapılan PCR yönteminde, yeterli düzeyde ürün elde edilir ve hatalı primer yapışmaları en az düzeye inerek spesifik amplifikasyon sağlanır (5).

TD-PCR, primer kalıplarının derecesi tam olarak bilinmese bile, PCR optimizasyonu için çok yönlü, tek aşamalı bir yöntemi sunmaktadır. Yöntem, optimizasyon için farklı bir yaklaşım getirmekte ve buffer ve siklus koşullarından ziyade, tek değişken olarak annealing ısısı esas alınmaktadır (1).

Protokolde annealing ısısı primerlerin erime ısısına (T_m) uygun gelecek şekilde ilerleyen siklularda azalarak düzenlenmektedir. Optimum annealing ısısı üzerinde reaksiyona başlanmaktadır; bu durum, hedef ampikonlar için karşılaştırmalı bir avantaj sağlamaktadır. Ancak spesifik ürünlerin verimi yüksek annealing ısılarında azalır ve T_m 'i aşan ısılarda kaybolabilir. Hecker ve Roux (1), her iki siklusta 1°C azaltarak 60°C 'den 46°C 'ye kadar annealing sıcaklıklarını azalttıkları ve ek olarak 50°C 'de 10 siklus uyguladıkları TD-PCR çalışmasında tek ve güçlü bandların oluştuğu ürünleri elde etmişlerdir. Sonuçlar 40 siklusun en az 30'unun, klasik PCR'da nonspesifik ürünlerin yaygın olarak oluştuğu annealing ısısının altındaki derecelerde gerçekleştiğini göster-

mektedir. Yine bu çalışmada, yapılan karşılaştırmalı çalışma sonuçları, son siklularda düşük ısı uygulanmasının yüksek ısı uygulanmasına oranla verimi artırdığını göstermiştir. Çalışmamızda da T_m derecesinin üzerinde siklus programı başlatılmış ve her iki siklusta 1°C ısı düşülerek, T_m 'in altında annealing ısısı ile (52°C 'de) 24 siklus uygulanmıştır; sonuçta istenmeyen bandlar azalmış, spesifik ürünlere ait tek ve güçlü bandlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak TD-PCR'in, düşük annealing ısılarındaki oluşabilen yalancı yapışmaların ve yüksek annealing ısılarında gözlenebilen ürün yokluğunun üstesinden gelebilecek ve tek ve güçlü ürünlerin elde edilebileceği, etkili bir teknik olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Hecker KH, Roux KH: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR, *Biotechniques* 20: 478(1996).
2. Günaydın M, Bedir A, Akpolat T ve ark: Prevalence of serum HGV-RNA among hemodialysis patients in Turkey, *Infection* 25: 45 (1997).
3. Linnen J, Wages JrJ, Keck ZYZ, et al: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent, *Science* 271: 505(1996).
4. Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positives with PCR, *Nature* 339: 237 (1989). Erratum 339: 490 (1989).
5. Ault GS, Ryschkewitsch CF, Stoner GL: Type-specific amplification of viral DNA using touchdown and hot start PCR, *J Virol Met* 46:45 (1994).