

# JEL ELEKTROFOREZ

Nükleik asit ve proteinlerin boyut, yük ve “topografya”sına göre ayırımında kullanılan bir yöntemdir.

# JEL ELEKTROFOREZ

- Bu yöntemle protein veya nükleik asitlerin bir **destek içerisinde, elektriksel iletkenliğin sağlandığı** bir elektriksel alanda yada sahada, yüklerine, büyüklüklerine veya 3 boyutluk yapılarına göre ayrıştırılması yöntem veya tekniğidir.
- Agaroz, Poliakrilamid veya nişasta jel **DESTEK** olarak kullanılır (FLOW CELL, MICRO-BEAD, MICROARRAY).
- Elektriksel iletkenlik tampon yada buffer adı verilen solüsyonla sağlanır.
- DNA Agaroz Jel Elektroforesiz (DNA-AJE) tekniğinde negatif ve pozitif kutuplar arasında yerleştirilen jel, TBE veya TAE tamponunun iletkenliği yardımıyla pozitif kutba doğru hareket ettirilir.

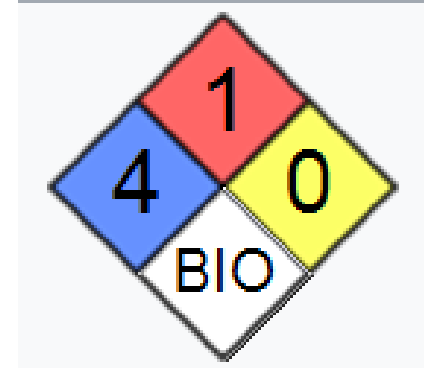
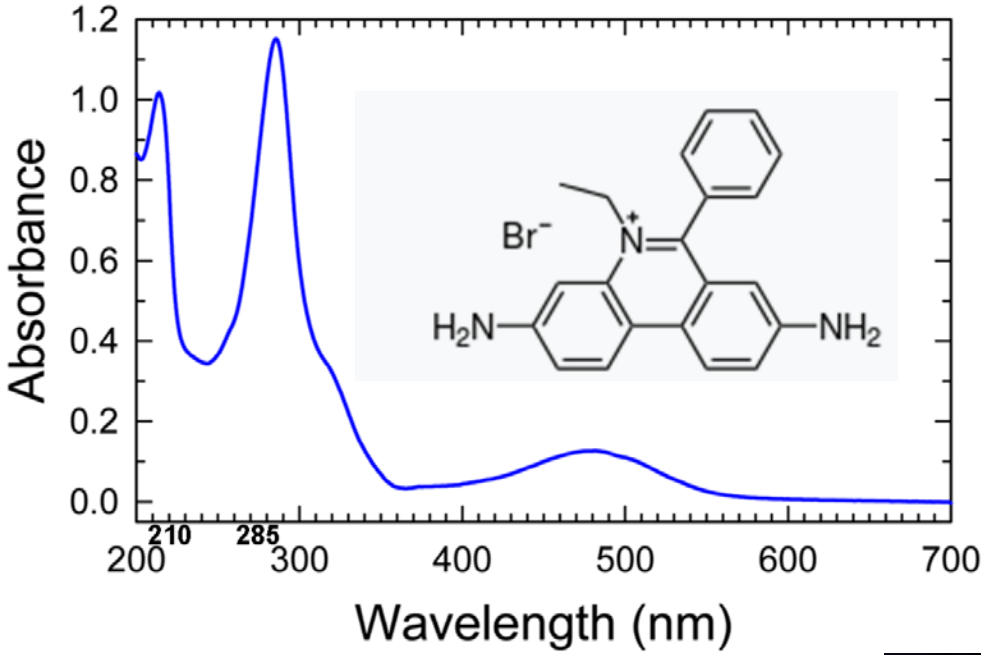
# HAREKET HIZI VE YÖNÜ

- Nükleik asitler fizyolojik pH (7,4) negatif yüklüdür.
- TBE (TRIS-BORAT-EDTA) VEYA TAE (TRIS-ASETİK ASİT- EDTA) pH: 8,3-8,5
- Elektriksel alanda hareket hızları büyüklüklerinin tersi oranındadır.
- 5-8 Volt/cm
- %0,7-%5 AGARUZ KONSANTRASYONU

# SODYUM DODESİL SÜLFAT (SDS)

- SDS proteinlerdeki kükürt köprülerini bozarak (Kırarak) proteinleri parçalar ve aynı zamanda proteinlerin negatif yük kazanmasına neden olur. Farklı büyüklüklerdeki protein molekülleri SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZ yöntemi ile proteinler birbirlerinden ayırt edilirler.

# ETİDİUM BROİT



renk

dalga boyu aralığı

kırmızı

~ 700–635 nm

turuncu

~ 635–590 nm

sarı

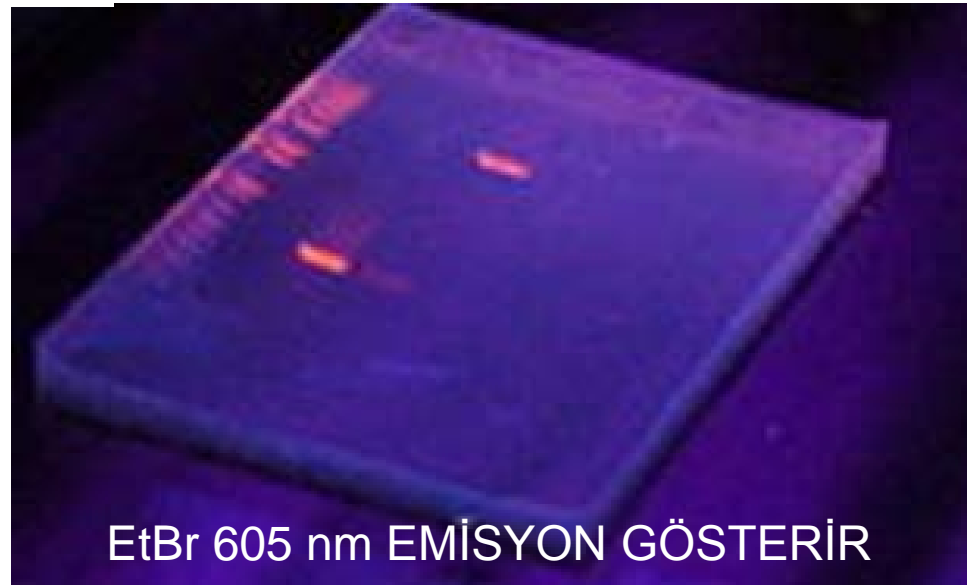
~ 590–560 nm

yeşil

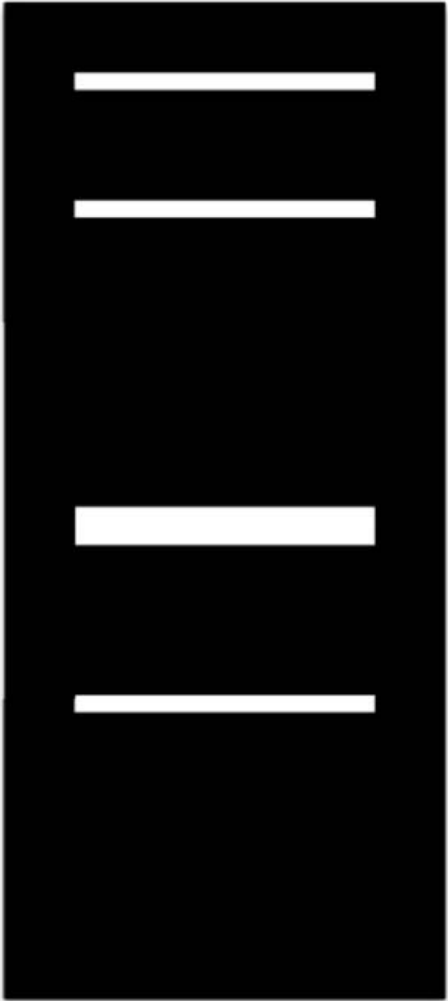
~ 560–490 nm

DNA MOLEKÜLLERİNE  
BAĞLANDIĞINDA FLORESAN  
ÖZELLİĞİ 20 KAT ARTAR.

0,25-1 MİKROGRAM/ML JEL



EtBr 605 nm EMİSYON GÖSTERİR



Nicked

Linear

Supercoiled

Circular, single-stranded

# YÜKLEME TAMPONU

GLİSEROL

BROMOFENOL MAVİSİ (Bromophenol Blue)

KİSİLEN SAYONOL (Xylene cyanol)

VEYA

SUKROZ

BROMOFENOL MAVİSİ (Bromophenol Blue)

KİSİLEN SAYONOL (Xylene cyanol)

# ELEKTROFOREZ TAMPONU

TRIS VE BORİK ASİT: SOLÜSYONUN pH'SINI DÜZENLER

EDTA: METAL ŞELATLAYICI

## **VEKTÖRLER (MODİFİYE EDİLMİŞ PLAZMİTLER):**

**Genellikle halka şeklinde, çift DNA sarmalından oluşan, üzerinde replikasyon yeteneğine sahip bir bölge ile, çoklu klonlama bölgesi ve seleksiyon markırı içeren DNA molekülleridir. İki ana kısma ayrılabilir.**

**Ekspresyon ve klonlama vektörleri transfer edildiği alıcı organizmalarda, bu organizmadan bağımsız olarak replikasyon (çoğalma) özelliği gösterirler. Vektörlerin replikasyonları sadece alıcı hücre içerisinde gerçekleşir. Bu nedenle replikasyon orijini içerirler.**



**Ekpresyon vektörleri klonlama vektörlerinden farklı olarak ÇKB eklenen genin ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (PROMOTÖRLER, (transkripsiyon ve translasyon başlama işaretleri, ribozoma bağlanma DNA dizileri) TERMİNASYON (transkripsiyon ve translasyon bitiş, poliadenilasyon işaretleri) içermektedir.**

Her iki vektör sadece gen aktarımı yapılan hücrelerin seçimi için seçici bir işaret geni (seleksiyon markır geni yada genleri) içerirler.

Ekspresyon vektörleri aktarılan genin bitkide anlatım yapıp yapmadığının anlaşılmasına yardımcı olmak üzere Raportör gen yada genlerden de oluşur.

Ayrıca her iki vektör sisteminde yabancı DNA'nın vektöre eklenebilmesi için özel restriksiyon enzim tanıma sekanslarından oluşur. Çoklu klonlama bölgeleri (ÇKB).

Ayrıca bazen transfer edilecek genin yerleştirildiği DNA dizilerinin sağ ve sol taraflarında ise homoloji tabanlı rekombinasyonu sağlamak amacıyla özel DNA dizileri yerleştirilir.


## **TRANSFORMASYON VEKTÖRLERİ:**

**Ekspresyon Vektörleri Aynı Zamanda Transformasyon Vektörü olarak da kullanılır.**

**Transfer edilecek genin organellere mi yoksa nükleusa mı entegre edileceğine göre bu vektörlere özel diziler eklenerek entegrasyonun doğruluğu artırılmaktadır. Plastid (kloroplast) vektörleri, LTR ve RTR olarak gösterilen sağ ve sol plastid hedefleme bölgeleri ile organellere hedeflenirler.**

**Belirlenmiş DNA sekansları seçilen bölgeye homologdurlar ve 1-2 kb boyutundadırlar. 50 kb DNA (20-30 genlik) girişi için uygundur.**

**Plastid tekrar vektör (pPRV) serileri, trnV-rps12 bölgesine girişi hedeflerler.**



**Plastid transgenleri, 5'-PL (promotör ve lider) ve 3'-T kaset (T-terminatör)de eksprese olurlar.**

**PL kasedi, promotör ve translasyon kontrol dizisi içerir.**

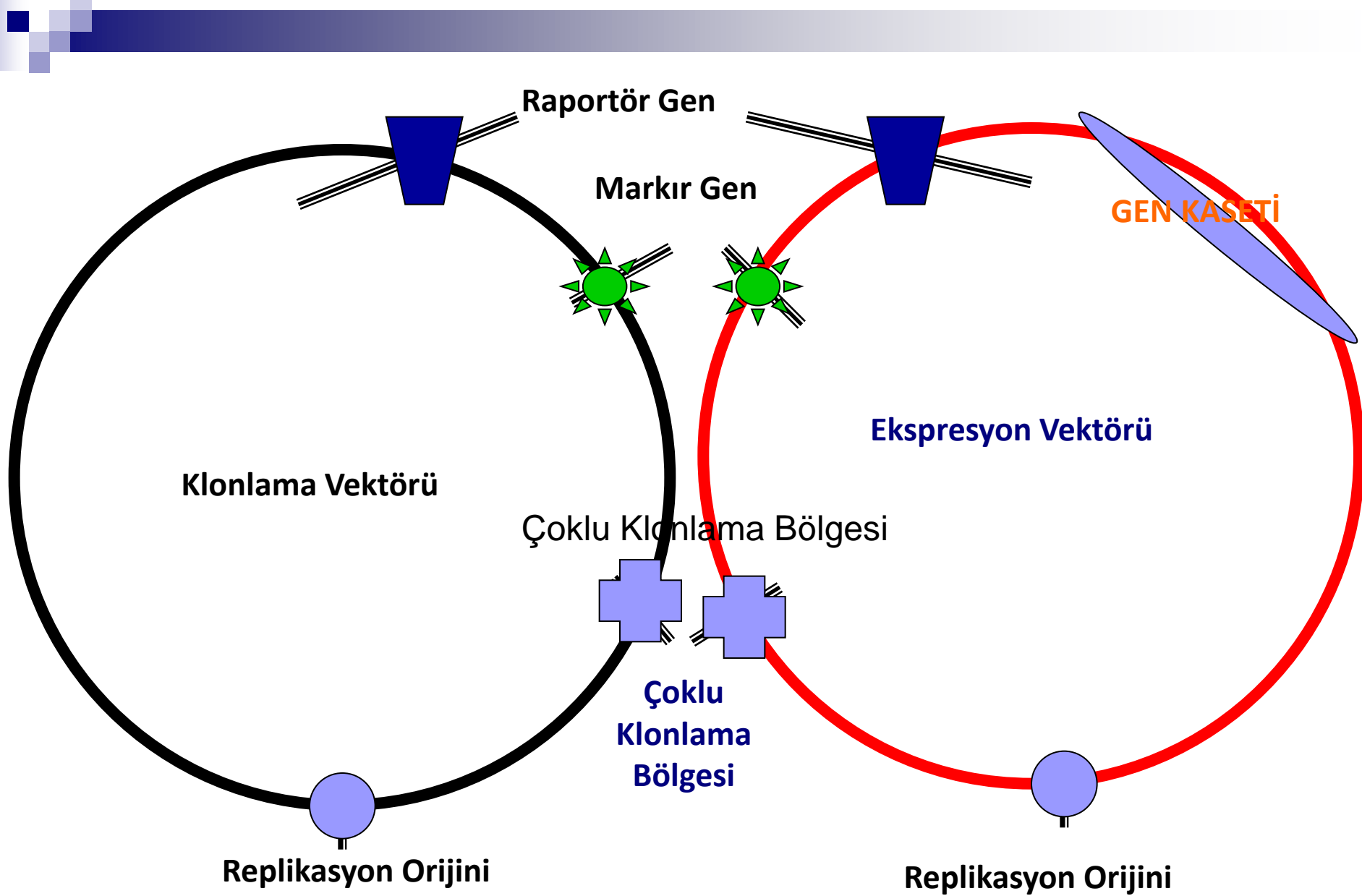
**Translasyon kontrol dizisi, mRNA 5'-translasyona uğramayan bölge (UTR) veya 5'-translasyon kontrol bölgesi (TCR) olabilir.**

## **Ekspresyon Vektörlerinde Bulunan Gen Kasetlerinde:**

**mRNA'ların 5'-UTR'ı mRNA stabilitesi için gereklidir ve bu dizi mRNA'nin ribozomlara yerleşmesini kolaylaştırır.**

**Transformasyon kasetindeki mRNA 3'-UTR'yi dizisi ise T-3'-UTR, transkripsiyon ve translasyon sonlandırmada görev yapar ve mRNA stabilitesi için gereklidir.**

**Vektörler ayrıca az ve çok sayılı vektörler olarakta isimlendirilirler. Az sayılı vektörler hücre içerisinde az sayıda olup genellikle 1-10 arasında bulunurlarken çok sayılı vektörler 100-1000 kopya halinde bulunurlar.**



## **En Çok Kullanılan Raportör Genler**

**Vektörün ve Transfer Edilmek İstlenen Gen Yada Genlerin Alıcı Hücreye Transfer Edilip Edilmediğini Raporlayan Genlerdir.**

- **Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)**
  - **Antibiyotik kloramfenikol**
- **$\beta$ -galaksidaz**
  - **Mavi Renk**
- **Ateşböceği lusiferaz enzimi**
  - **Floresan Protein**
- **Yeşil Floresan Protein (GFP)**
  - **Floresan Protein**

# Markır Genleri (Seleksiyon Genleri)

- Bu genlerin ürünlerinden yararlanılarak Vektör üzerindeki genlerin alıcı hücreye entegrasyonu sonucu transfer gerçekleşmiş hücrelerin çoğalmalarına imkan tanınırken transfer edilmeyen hücrelerin ölmeleri sağlanır.
- Antibiyotik Dayanıklılık Genleri
  - Kanamycin
- Herbisit Dayanıklılık Genleri
  - Glyphosate 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)
- Metabolit Genleri
  - Fosfomannoz İzomeraz (Phospomannose Isomerase, PMI veya ManA geni): Ortamda şeker olarak mannoz varsa hücre yaşayabilmektedir.



## ■ Antibiyotik Dayanıklılık Markır Genleri:

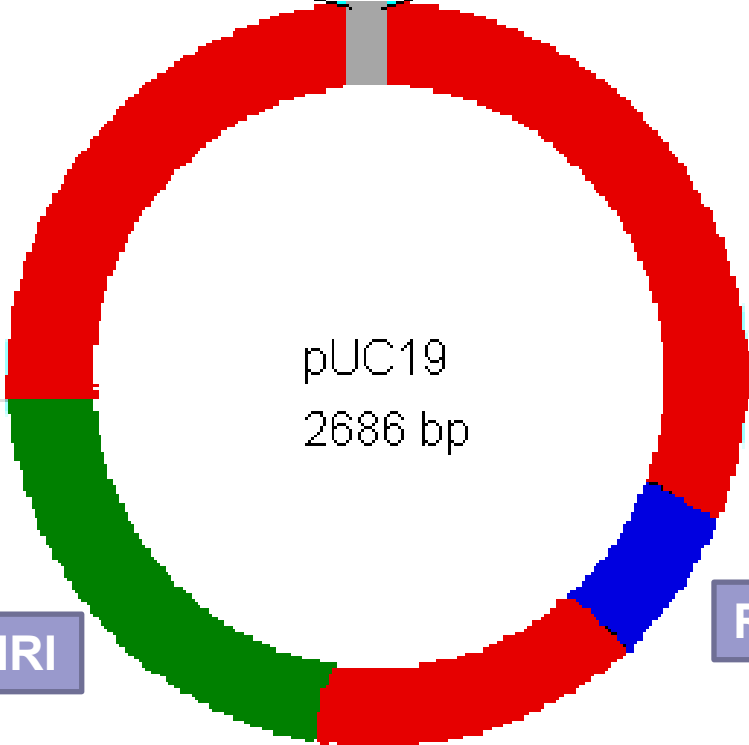
- *Neo* geni: Bu gen neomisin fosfotransferaz II (neomycin phosphotransferase II, NPTII) enzimini sentezler ve bu enzim ise aminoglycoside inaktif eder. NPTII enzimini taşıyan organizmalar ise kanamycin ve neomycin antibiyotik besisi ortamında yaşayabilirler.

## ■ Herbisite Dayanıklılık Markır Genleri:

- Buctril markalı herbisit oxynil ve bromoxynil kimyasal içeriklidir. Bu herbisit dikotiledon bitkilerde fotosentezin ışık everesi reaksiyonunu durdurmakta ve dolayısıyla bitki yaşayamamaktadır.
- *Klebsiella pneumoniae* bakterisinden izol edilen bir gen (*bxn*) tarafından sentezlenen nitrilaz (nitrilase) enzimi oxynil ve bromoxynil'i inaktif hale dönüştürebilmektedir. Bu enzim bromoxynil'li 3,5 dibromo-4-hydroxybenzoic acid'te (DBHA) dönüştürmektedir.

SacI                      SmaI                      XbaI                      PstI                      HindIII  
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT  
EcoRI                      KpnI                      BamHI                      SalI                      SphI

ÇOKLU KLONLAMA BÖLGESİ



SELEKSİYON MARKIRI

REPLİKASYON ORİJİNİ

SacI SmaI XbaI PstI HindIII  
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT  
EcoRI KpnI BamHI SalI SphI

ÇOKLU KLONLAMA BÖLGESİ

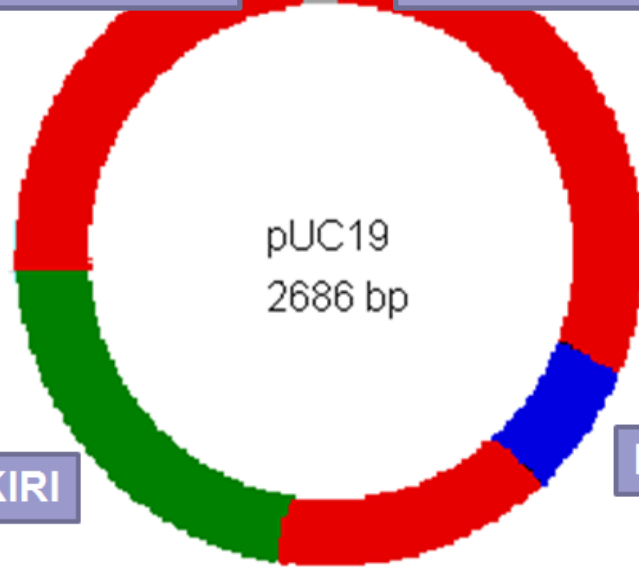
TERMİNATÖR

PROMOTÖR

pUC19  
2686 bp

SELEKSİYON MARKIRI


REPLİKASYON ORJİNİ



# PCR NEDİR?

- DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir.

- Bu teknik (PCR) Cetus firmasının insan genetiği departmanında çalışan araştırmacı Kary MULLIS tarafından 1985'te bulunmuş ve patenti alınmıştır.
- 1993 yılında bu alışma K. MULLIS'e NOBEL ödölünü kazandırmıştır.
- PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgün bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir in vitro DNA sentezi yöntemidir.
- PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir.

- 
- Termofilik bir bakteri olan, ısıya karşı çok dayanıklı *Thermus aquaticus*' tan DNA polimeraz enziminin elde edilmesi
  - Bu enzimin geliştirilmesi aynı zamanda otomatik PCR cihazının geliştirilmesine de imkan tanımıştır.
  - Böylece PCR reaksiyonunda gerekli olan sıcaklık ve zaman ayarlamaları otomatik olarak bu cihazlar vasıtasıyla yapılmış ve teknik daha güvenilir bir hale getirmiştir.

# PCR'IN PRENSİBİ ve TEKNİĞİ

- Günümüzde PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılan program doğrultusunda yapan Thermocycler adı verilen PCR otomoları yardımıyla sağlanmıştır.
- PCR, DNA'nın bir bölümünün invitro yöntemle hızlı ve çok sayıda çoğaltan bir tekniktir. PCR klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların veya bazı spesifik sekansların invitro olarak çok kısa sürede (birkaç saat) enzimatik amplifikasyonlarını amaçlar.

# PCR'IN PRENSİBİ

- PCR'in prensibi tekrarlanan üç basamağa dayanır.
  1. Denatürasyon (Ayrılma: Çift sarmalların açılması)
  2. Hibrididasyon (pirimerlerin tamamlayıcı dizilere hibridizasyonu)
  3. Polimerizasyon (primerlerin uçlarından uzatılarak kalıp DNA kadar ilerletilmesi)



# DENATURASYON

- PCR işleminin ilk aşamasında amplifiye edilecek kalıp DNA başlangıçta 94-98°C'ye kadar 4-8 dakika sıcaklık artırılır.
- İlk Denatürasyon işleminden sonraki denatürasyon genellikle 94-95°C 30 sn ile 2 dakika uygulanır.
- PCR basamakları için kullanılan bu dereceler ve süreler çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Hedef DNA'nın Guanin ve Citosin bakımından zengin olduğu durumlarda denaturasyon için 95°C'den daha yüksek sıcaklık uygulanabilir.

# HİBRİDİZASYON (ANNEALING)

- DNA'nın sıcaklıkla denatüre edilmesi yani çift sarmallı DNA sarmalının birbirinden ayrılması ve sıcaklığın 35-50°C'ye düşürülmesi ile primerler DNA kalıbı üzerinde uygun dizlerden hibridize olur
- Primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek sarmal DNA'nın, anti paralel olarak diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimeraz'ın çalışması yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanırlar.
- Hibridasyon genellikle primerlerin erime ısısının 5°C altında gerçekleşir (35-65°C).

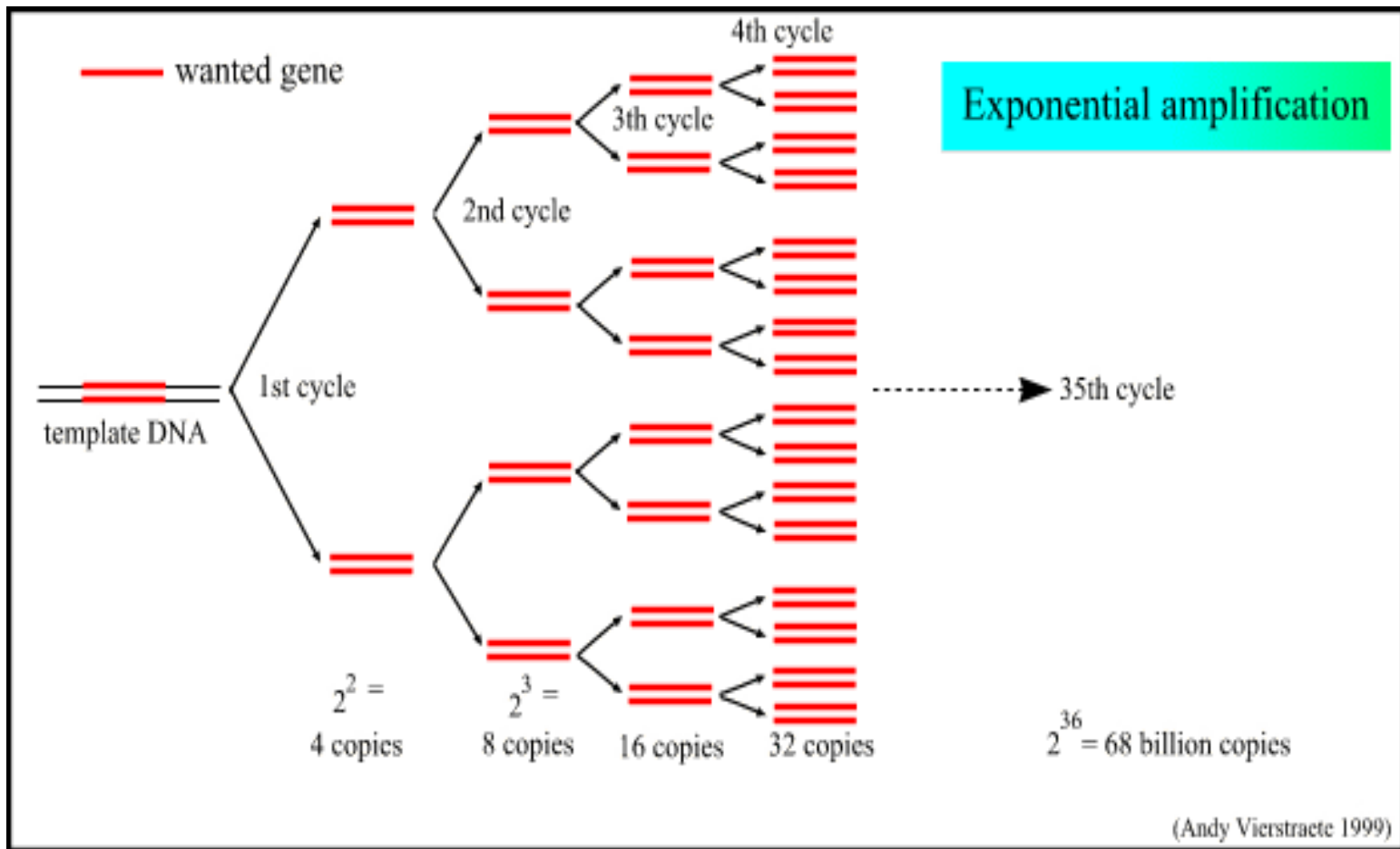
# 3-POLİMERİZASYON (SENTEZ)

- Sentez basamağında ise primerlerin DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla primer uçları kalıp DNA sarmalını kullanarak uzatma işlemi gerçekleşir.
- Bütün DNA molekülleri sentez reaksiyonun sonunda çift sarmallı olarak bulunur.
- TaqDNA polimeraz enzimi, 5'-3' yönünden olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanırlar, primerlerin 3' terminusuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

# PCR'IN PRENSİBİ ve TEKNİĞİ

- Primerler çiftler halinde biri çift zincir DNA'yı oluşturan zincirlerden birine, diğeri de o zincirin komplementlerine (tamamlayıcısını) eşleşecek şekilde farklı dizilimlerde tasarlanır.
- Amplifikasyon (çoğalma) için DNA dizisinin bilinmesi gerekli değildir. Primerlerin hibridize olacakları DNA dizilerinin bilinmesi yeterlidir.
- PCR için saf DNA kullanmaya gerek yoktur. Kaba hücre özütü, total DNA preparatı, bir damla kan yada sperm başarılı bir PCR için başlangıç materyali olabilir.


- Kalıp DNA molekülünün kopyalama sayısı reaksiyon bitiminde  $(2^n - 2n) \times$  formülü ile hesaplanır.
- $n$  döngü sayısı,  $2^n$  bir ve ikinci döngüdeki ürün  $\times$  orijinal DNA kalıp sayısıdır.



- PCR'da Genelde 30-40 döngü sayısı 100ng-1µg DNA'nın 50 ng genomik DNA'dan sentezlenmesi için yeterlidir.
- PCR'de etkinlik çoğaltılacak DNA uzunluğu ile ters orantılı bir ilişki mevcuttur.
- Hibritlenme sıcaklığının yüksekliği ile PCR'nin doğruluğu orantılıdır.
- DNA polimeraz enzimi 1.0-2 U olup bu miktarı aştığı takdirde spesifik olmayan ürünler şekillenebilir.

## Primerler

- Konsantrasyonu için ise 0.1-3  $\mu\text{M}$  tavsiye edilmiştir.
- Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan primerler, özellikle primer dimer adı verilen spesifik olmayan bantların oluşmasına yol açar.
- Primer dimerler küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirine bağlanması yada DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotidleri kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır.

- 
- Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikçikli DNA segmentleri olan primerler kullanılma amaçlarına göre, 5- 40 oligonükleotid den oluşmuşlardır.
  - Bunlar, hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak bağlanır ve burada (3' terminus) DNA sentezinin ilerlemesine teşkil eder.



## Primerlerin dizaynı

Prokaryotikler için primer uzunluğu 18-22 nükleotidden ve ökaryotikler için ise 24-28 nükleotidden ibaret olmalıdır. Uzun primerler spesifiteyi arttırır.

Primerler birbirlerine ve kendi kendilerine bağlanmasından kaçınılmalıdır.

Adenin/timin ve guanin/citozin oranları yaklaşık olarak %50 veya hedef DNA'dakine benzer olmalıdır.

Primerler sürekli olarak 5' ucundan 3' ye doğru sentezlenmeli ve yazılmalıdır.

6. Konsantrasyonları en etkin 0.1-0.5  $\mu$ Molar arasında olmalıdır.

## Deoksinükleotit trifosfat

- Yeni DNA sarmalının sentezi için; dATP, dTTP, dGTP, dCTP; hepsi dNTPs olarak adlandırılan dört farklı deoksinükleotit trifosfata gereksinim vardır.
- Nükleotidlerin PCR karışımındaki konsantrasyonları 20-200  $\mu$ Molar olmalı ve 4 nükleotid de aynı oranda kullanılmalıdır.

## Magnezyum iyonları

- Mg<sup>++</sup> iyon konsantrasyonunun primer bağlanması, kalıp DNA ve PCR ürünlerindeki çift sarmal yapının ayrılması, primer-dimer yapısı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır.
- Gereğinden fazla miktarda Mg<sup>++</sup> ortamda bulunması nonspesifik ürünlerin oluşumuna yol açarken; gerektiğinden az miktarlar ise istenen ürünün yeterince sentezlenmemesine neden olur.

## **Tampon (TRIS, KCl, NH<sub>4</sub> vb)**

**(10X):** 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, pH:  
8,3-8,4

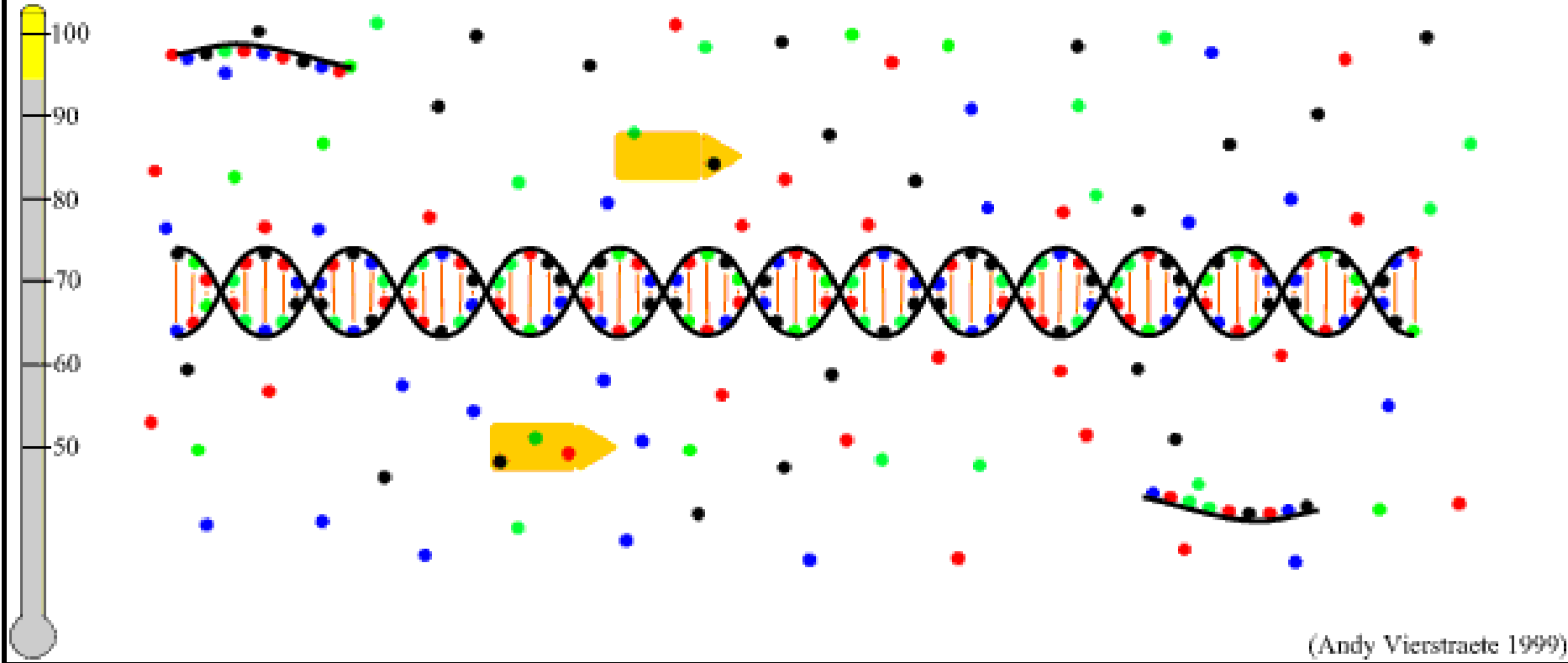
**Enzim aktivitesi için uygun pH ve iyon dengesini sağlamak amacıyla kullanılır.**

# POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR: PZR)

- In Vitro ortamda belirli bir DNA'nın (günümüzde 100 kb altında) milyonlarca kopyasının belirli şartlar ve kimyasallar yardımıyla sentezlenmesidir.
- Termal Döngü Cihazı: Kısa zaman aralığında sıcaklığın 0 ile 100C arasında değiştirme yeteneğine sahip cihaz.
  - Kalıp DNA
  - Primer
  - Termal Dayanıklı DNA Polimeraz
  - Nükleotit Tri Fosfat
  - İyonlar
  - Tampon

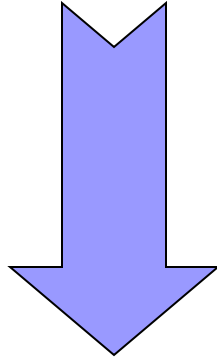
PCR :

Denaturation 94°C

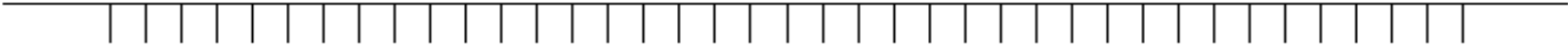


**DENATÜRASYON, RENATÜRASYON, POLİMERİZASYON**

# 1. Basamak: Denatürasyon

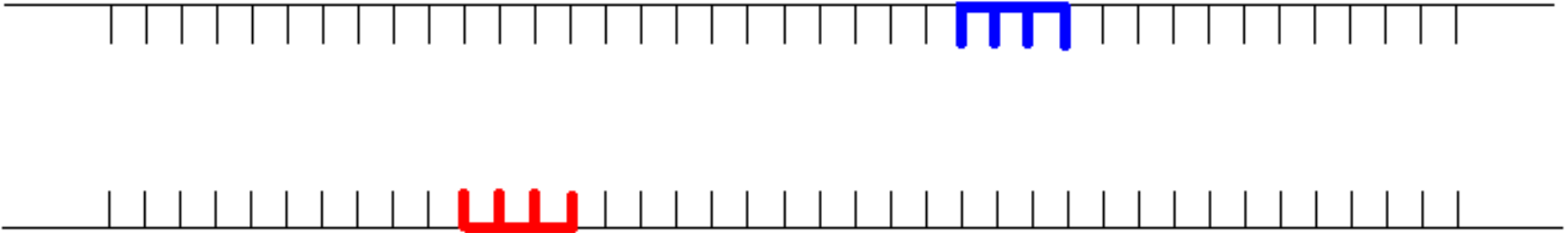


Sıcaklığın 94-96 °C yükseltilmesi ile çift sarmallı heliksin tek sarmallara dönüşümü



# Primerler

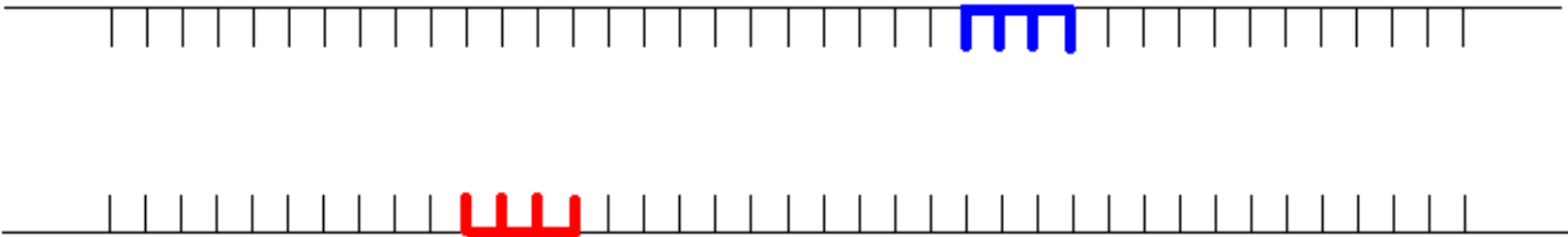
- Küçük uzunluklarda DNA dizileri olup 5 ila 30 baz uzunluğundadır (genellikle 18-22 nükleotit uzunluğunda). Bazen çok spesifik şekilde dizi edilerek özel genlerin belirlenmesinde kullanıldıkları gibi bazı durumlarda konsensus dizileri içererek farklı DNA parçalarının PCR analiz edilmelerinde kullanılırlar.





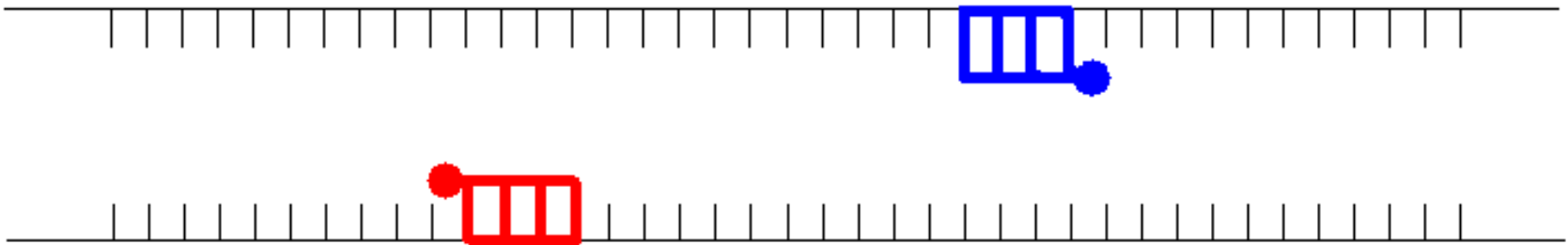
## 2. Basamak Annealing

- Primerlerin bağlanması 50-65°C



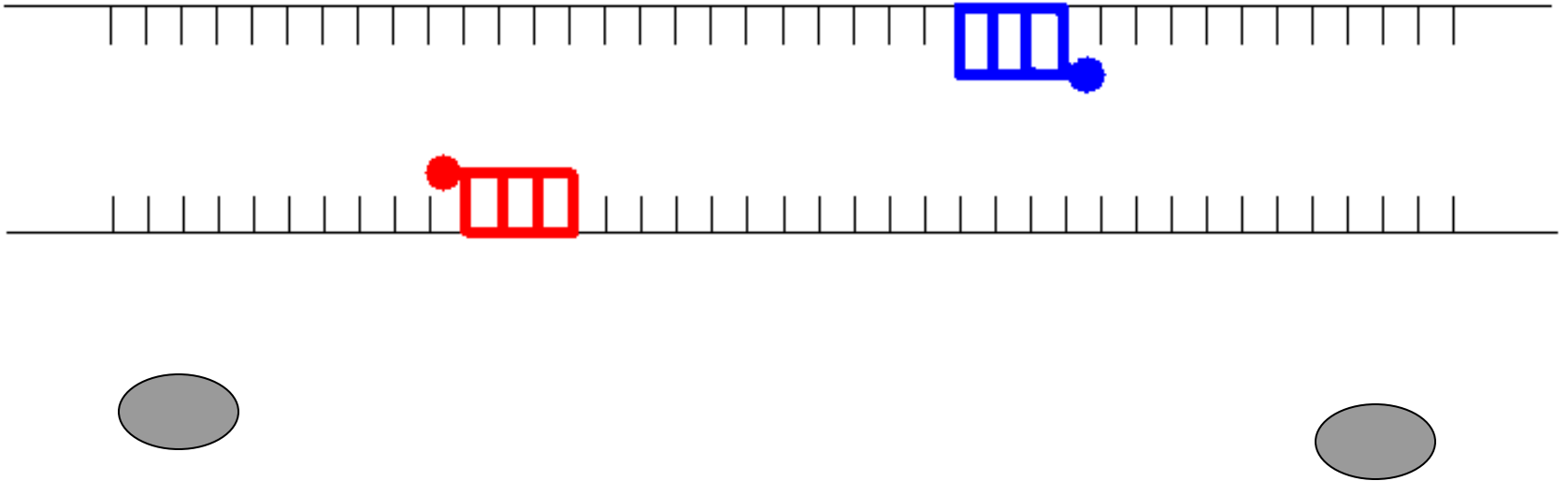
# Annealing

- Primerlerin bağlanması 50-65°C



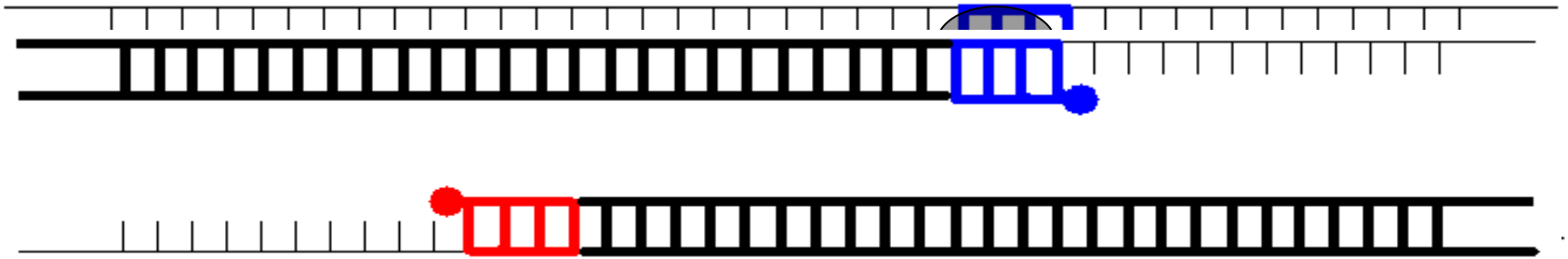
# Polimerizasyon

- Sıcaklık tekrar  $72^{\circ}\text{C}$  yükseltilir ve DNA polimeraz enzimi  $\text{Mg}^{++}$  kofaktörlüğünde deoksiribonükleotit trifozfatları polimerleştirerek yeni sarmallar sentezler

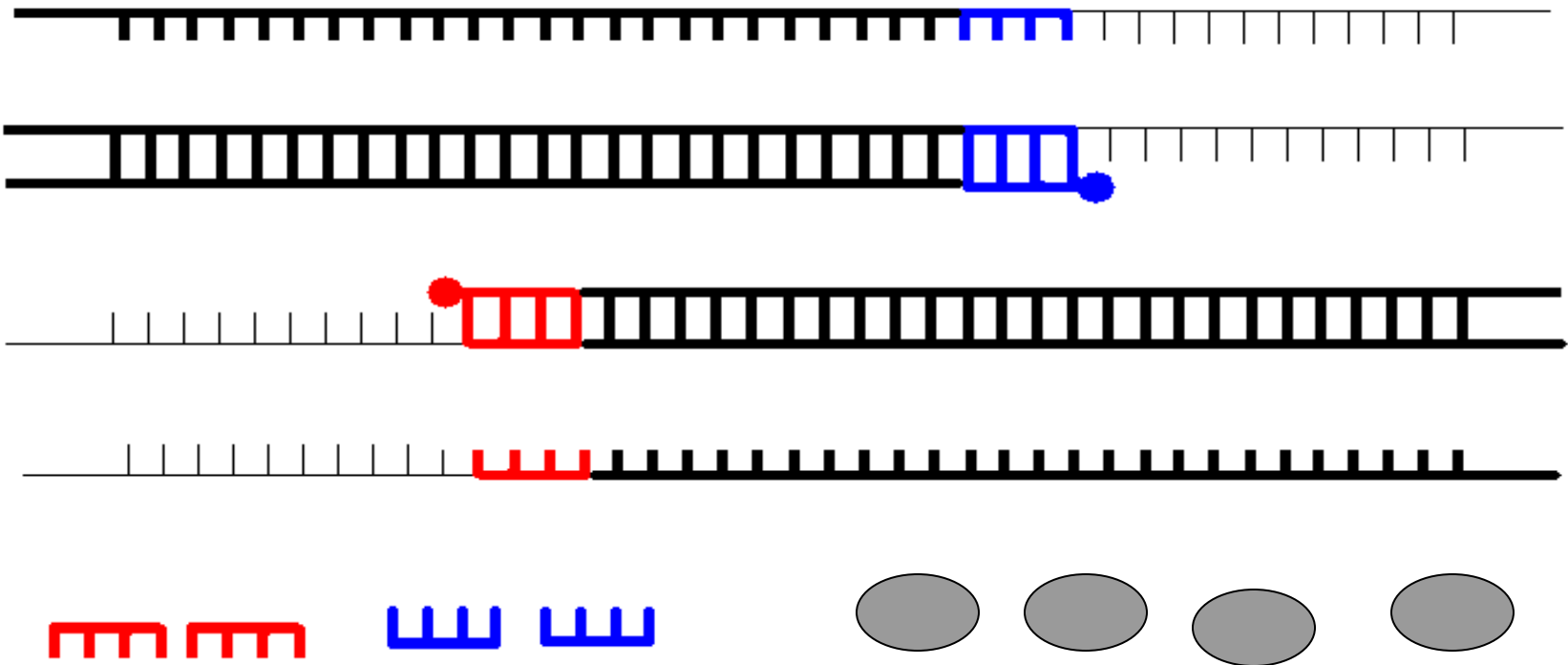


- **Polimerizasyon:**

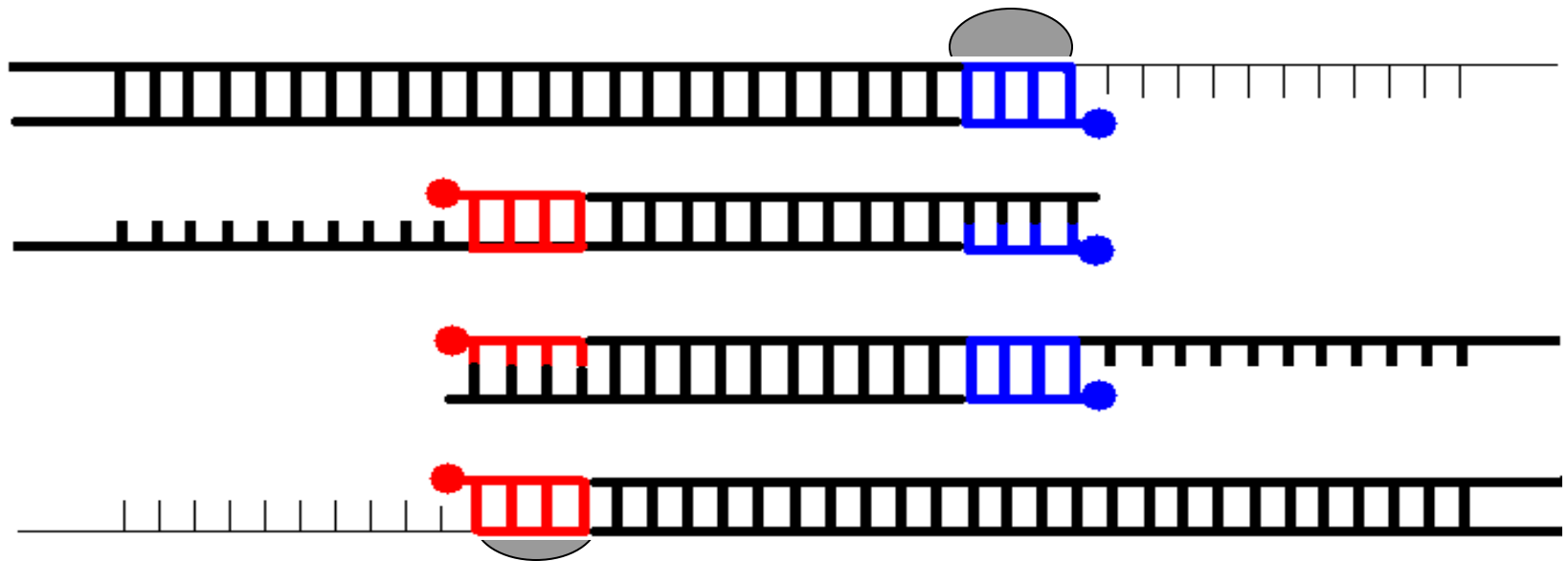
- Sıcaklık tekrar  $72^{\circ}\text{C}$  yükseltilir ve DNA polimeraz enzimi  $\text{Mg}^{++}$  kofaktörlüğünde deoksiribonükleotit trifozfatları polimerleştirerek yeni sarmallar sentezler




- Denatürasyon, Annealing ve Polimerizasyon 30-40 kez tekrarlanır



# PZR



- 
- PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerin saptanmasında en yaygın kullanılan metot, bu ürünlerin uygun moleküler ağırlıkta bir marker ile birlikte Ethidium bromide ile boyalı agarose jel üzerine yükleyerek elektroforez işlemine tabi tutmak ve neticede ayrılan bantları UV transimulatör ile gözle görülür bir hale getirmektir.
  - Bunun yanısıra bu teknikten daha duyarlı fakat hazırlanması ve kontrolü daha zor olan Poliakrilamide gel elektroforez (PAGE) metodu da kullanılabilir.

# PCR'IN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

- PCR'in en önemli avantajı hiç şüphesiz çok kısa süre içerisinde çabuk netice vermesi ve diğer rutin tekniklere oranla daha sensitif ve spesifik olmasıdır.
- PCR tekniğinin en önemli dezavantajı kontaminasyon problemidir.
- Bu durum yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesine (düşük sensitivite) sebep olur.



# PCR'DA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI VE ÖNLENMESİ

- PCR'in en önemli avantajlarından biri olan çok yüksek duyarlılığı aynı zamanda bir dezavantaj olabilir.
- PCR'da en büyük risk, amplifiye edilmiş DNA'nın yeni bir reaksiyonundaki kontaminasyonudur.
- Yeni eldivenin PCR çalışma alanında kullanılması aynı şekilde kirlenmeleri de önler.
- Birçok kontaminasyonun kaynağının çalışanların eldivenlerine bulaşmış DNA'lar olduğu unutulmamalıdır.

# PCR'DA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI VE ÖNLENMESİ

- Reaktiflerin bulunduğu tüplerin kapakları açılıp kapatılırken özen gösterilmeli; kolay açılan kapaklı tüpler tercih edilmelidir.
- Deneylerde PCR için özel olarak hazırlanmış otomatik pipetler kullanılmalıdır.
- PCR ürünlerinin incelenmesinde kullanılan aletler (elektroforez tankları vs.) DNA içermemelidir.
- Kalıp DNA'nın hazırlanması mümkünse ayrı bir yerde ve PCR çalışma yerinden uzak yapılmalıdır.

# PCR'DA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI VE ÖNLENMESİ

- Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol her PCR'da birlikte yürütülmeli ve bu şekilde muhtemel bir kontaminasyonun olup olmadığı saptanmalıdır.
- DNA-plazmidi pozitif kontrol olarak diğer bir laboratuarda hazırlanmalı ve pipetlenmelidir.

# PCR'DA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI VE ÖNLENMESİ

- Sıklıkla, çift veya daha çok DNA bandı oluşması veya daha az yada hiç reaksiyon olmaması gibi problemler ortaya çıkabilmektedir.
- Çift veya daha fazla bandlar, asimetric PCR, çok fazla kalıp DNA ilavesi, primer-dimerlerin oluşması, primerlerin tamplate DNA'nın birden fazla yerine bağlanması veya yabancı bir genin bulunması nedeniyle şekillenmektedir.

# PCR'DA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI VE ÖNLENMESİ

- Çok az veya hiç reaksiyon ürünü olamaması, çok düşük kalitede veya çok düşük miktarda tamplate DNA oluşmasına, uygun olmayan denatürasyon-bağlanma-çoğalma süresi zamanı veya sıcaklığına yada primer ile birleşecek DNA alanında sekunder yapı oluşumuna bağlıdır.
- Bu bakımdan her durumda PCR protokolü yeniden gözden geçirilmeli ve gerektiğinde optimize edilmelidir.

## The Meaning of DNA-Fingerprint Similarity

DNA-fingerprint similarity is generally defined as the fraction of shared bands. For individuals  $x$  and  $y$ , it is the number of common fragments in their fingerprint profiles ( $n_{xy}$ ) divided by the average number of fragments exhibited by both individuals,

$$S_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} . \quad (1)$$

