

NKUBAP.00.10.AR.14.03 nolu proje
GC NÜKLEOTİD ORANI YÜKSEK VE UZUN
GEN BÖLGELERİNİN ÇOĞALTILMASINI
SAĞLAYAN PCR PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yürütücü: Yrd.Doç.Dr.Duygu YAŞAR ŞİRİN

Araştırmacı: Doç.Dr.Türker BİLGİN

Araştırmacı: Hande AKALAN

2015

ÖNSÖZ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemi kendi başına PCR ürününün boyu ve miktarının belirlenmesiyle genetik tanı ve araştırmalarda direkt kullanılan bir yöntem olmasının yanında DNA dizi analizi gibi birçok ileri teknolojik uygulamanın da öncü basamağını oluşturmaktadır. Bu nedenlerle moleküler genetik laboratuvarının vazgeçilmez işlemlerindendir. Ancak, GC' ce zengin ve uzun gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması moleküler genetik laboratuvarlarında sıklıkla karşılaşılan problemlerindendir. Bu proje ile hedeflenen çıktı; GC' ce zengin ve uzun gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasına olanak sağlayan PCR protokollerinin reaksiyon içeriği ve ısı döngülerini içine alacak şekilde geliştirilmesidir. Bu amaçla, PCR' da kullanışlılığı daha önce bildirilmiş olan modifiye nükleotidler olan 7-deazadGTP ve dITP' ye ek olarak 8oxodGTP, dPTP, 2OH-dATP gibi modifiye nükleotidlerin bu amaçla kullanışlılığı test edilmiştir. İlk defa test edilen bu modifiye nükleotidlerin benzer amaçla kullanışlı olduğu daha öce bildirilmiş olan DMSO, betain gliserol, BSA gibi PCR katkı kimyasalları ile kombine etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca bu proje ile alternatifli primer dizileri ile buna bağlı olarak değişen farklı Tm dereceleri ve diğer PCR ısı ve döngü parametrelerinin etkisi test edilmiştir. Bu deneylerin tümü Frajil X sendromundan sorumlu FMR1 geni CGG tekrarlarındaki artış bölgesini içine alan gen bölgesinin PCR'la çoğaltılması modeli üzerinden denenmiştir. Böylelikle FMR1 geni CGG tekrarlarındaki artışların ilave işleme gerek kalmadan PCR yöntemiyle tespit edilebilirliği test edilmiştir. Frajil X sendromu modelinden yola çıkılarak benzer güçlüklerin yaşandığı diğer gen bölgelerinin de tek basamakta PCR ile çoğaltılması için kullanışlı PCR protokollerinin oluşturulması da çalışmanın diğer özgün değerleri arasındadır.

Proje Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	1
TABLO DİZİNİ	2
ŞEKİLLER DİZİNİ	3
ÖZET.....	4
ABSTRACT	5
GİRİŞ	6
GEREÇ ve YÖNTEM	8
BULGULAR	10
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	18
KAYNAKLAR	20

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. PCR programlarının sıcaklık, süre ve döngü sayıları9

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan PCR programı, primer çifti, enzim sistemi, MgCl₂ konsantrasyonu, dNTP karışımları ve diğer kimyasalların (Tween 20, BSA, Betain, Gliserol, PEG, DMSO, SDS) miktarları ve elde edilen sonuçlar11

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. A Frajil X programı sonuçları (Tablo 3.1 no:1). B GC PCR programı sonuçları (Tablo 3.1 no:3). C uygun Tm belirlemek için yapılan PCR çalışmasının (Tablo 3.1 no:8) agaroz jel görüntüsü. D ve E Tablo 3.1'de koşulları özetlenen 20 numaralı çalışmaya ait agaroz jel görüntüsü17

ÖZET

Birçok genetik hastalığın tanısında kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ilgilenilen gen bölgelerinin çoğaltılması, sonraki işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan ilk basamaktır. Fakat bazı durumlarda ilgilenilen gen bölgesinin “GC” nükleotidleri içeriği bakımından zengin ve uzun bir bölge olması PCR işlemini başarısızlığa uğratmakta, bu nedenle genetik hastalıkların tanısının zorunlu olduğu durumlarda çok daha fazla zaman, iş gücü ve maliyet gerektiren başka işlemler kullanılmakta veya söz konusu hastalığın laboratuvardaki tanısı gerçekleştirilememektedir. Diğer yandan eğer yürütülen çalışma bir araştırma ise çoğu zaman çalışma başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. GC’ ce zengin bölgelerin PCR yöntemi ile çoğaltılmasında karşılaşılan güçlükleri aşmak için de bu güne kadar PCR katkı kimyasallarının ve modifiye nükleotidlerin kullanımı ayrıca ısı döngülerinin optimizasyonu gibi değişik yaklaşımlar ortaya konmuştur. Bilimsel araştırmaların yanı sıra birçok firma da GC nükleotid oranı yüksek ve uzun olan gen bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayacak kitlerin üretimine çalışmaktadır. Ancak, birçok hastalıkla ilişkili GC’ce zengin gen bölgelerinin PCR’ la çoğaltılmasındaki güçlükler aşılamamıştır. Bu proje ile tanı amaçlı çalışan moleküler genetik laboratuvarlarında sıklıkla çalışılan Frajil-X sendromu, Huntington Hastalığı, Miyotonik Distrofi başta olmak üzere GC’ ce zengin ve uzun gen bölgeleri içermeleri nedeniyle klasik PCR yöntemi ile tanısı konulamayan hastalıkların tanısının hızlı ve ucuz bir yöntemle konulmasına olanak sağlayacak PCR protokollerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: GC-PCR, PCR modifikasyonu, genetik hastalıklar

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) is widely used in diagnosis of many genetic diseases. Amplification of the gene of interest with PCR is the first step required for afterwards process. But in some cases gene of interest is "GC" rich and too long for a sufficient PCR. In this kind of situations diagnosis of genetic diseases require more complicated molecular techniques costing much time and payment. Even the results are often unsuccessful. To overcome these difficulties, usage of chemical additives modified nucleotides and optimization of PCR conditions demonstrated with many research. Also many companies are working on the production of kits which can duplicate GC rich sequences of disease related genes responsible for Fragile X syndrome, Huntington's disease and Myotonic Dystrophy. The aim of this project is to develop a quick and cheap PCR protocol could be used in genetic diagnosis.

Keywords: GC-PCR, PCR modification, genetic diseases

1. GİRİŞ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) birçok genetik hastalığın tanısında ve çalışma materyali DNA veya RNA olan tüm araştırmalarda kullanılan güvenilir, hızlı ve vazgeçilmez bir yöntemdir. Hastalıkla ilişkili olsun ya da olmasın ilgilenilen gen bölgelerinin PCR işlemi kullanılarak çoğaltılması, sonraki işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan ilk basamaktır. Fakat bazı durumlarda (örneğin; Frajil-X sendromu gibi trinükleotid tekrar hastalıkları) ilgilenilen ve PCR ile çoğaltılmak istenilen bölge “G” ve “C” nükleotidlerince zengin ve uzun bir gen bölgesi olabilmektedir. İlgilenilen gen bölgesinin “GC” nükleotidleri içeriği bakımından zengin ve uzun bir bölge olması PCR işlemini başarısızlığa uğratmakta, bu nedenle genetik hastalıkların tanısının zorunlu olduğu durumlarda çok daha fazla zaman, iş gücü ve maliyet gerektiren başka işlemler kullanılmakta veya söz konusu hastalığın laboratuvardaki tanısı gerçekleştirilememektedir. Diğer yandan eğer yürütülen çalışma bir araştırma ise çoğu zaman çalışma başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Standart bir PCR’ de gerekli olan elemanlar; kalıp DNA molekülü, 1 çift primer, Taq polimeraz ve tamponu, dNTP’ ler, MgCl₂ ve ısı döngülerinin sağlanması için gerekli olan PCR cihazıdır. Bazı durumlarda hedefe yönelik olarak PCR yöntemi gerek içerik gerekse ısı döngüleri bakımından modifiye edilerek çeşitlendirilebilir. GC’ ce zengin bölgelerin PCR yöntemi ile çoğaltılmasında karşılaşılan güçlükleri aşmak için de bu güne kadar değişik yaklaşımlar ortaya konmuştur. Bunların başında; Betain, DMSO, Gliserol, BSA gibi Taq polimerazı yüksek sıcaklıklara daha dayanıklı kılan kimyasal ajanlar, formamid, DTT, TMAC gibi denatürant ajanlar ve 7-deaza-dGTP, dITP ile diğer modifiye nükleotidler gibi DNA sarmalını daha gevşek hale getirerek PCR ile çoğaltmaya yardımcı olabilecek modifiye nükleotidler kullanılmış, ayrıca ısı döngüleri açısından da değişik yaklaşımlar önerilmiştir (Hecimovic, Barisic et al. 1997; Nampalli and Kumar 2000). Bu proje kapsamında öncelikle modifiye nükleotidlerin PCR ile çoğaltma işlemi sırasında yeni sentezlenen DNA’ ya sokulması sayesinde GC’ ce zengin ve uzun gen bölgelerinin başarıyla çoğaltılması amaçlanmaktadır. Ayrıca modifiye nükleotidlerin PCR’ de kullanımına ilave olarak daha önce denenmiş olan diğer ajanların modifiye nükleotidler ile birlikte ve farklı kombinasyonlarda kullanılmasıyla en iyi sonuç verecek PCR sisteminin belirlenmesi hedeflenmektedir. Yüksek oranda GC içeriğine sahip olan, farklı uzunluklardaki (1, 3, 5 kilobaz) gen bölgelerinin, modifiye nükleotidler, DMSO, Betain ve Gliserolün çeşitli konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda, alternatifli ısı döngüleriyle PCR işleminin denenmesiyle geliştirilecektir. GC içeriği ve uzunluklarına göre belirlenen gen bölgelerine (başlıca yaygın görülen hastalıklardan sorumlu genler) uygun primer dizileri dizayn edilerek PCR ile çoğaltılacak ve yeni sistemle çoğaltılan gen bölgesi agaroz jel elektroforezi ile belirlenerek jeldeki sinyal miktarı ölçülerek yarı kantitatif bir değerlendirme yapıldıktan sonra spektrofotometrik ölçümler ile oluşan PCR ürününün miktarı belirlenecektir. Bu proje ile tanı amaçlı çalışan moleküler genetik laboratuvarlarında başta toplumumuzda da sıkça görülen Frajil-X sendromu olmak üzere diğer GC’ ce zengin ve uzun gen bölgeleri içermeleri nedeniyle klasik PCR yöntemi ile tanısı konulamayan hastalıkların tanısının hızlı ve ucuz bir yöntemle konulması hedeflenmektedir. Ayrıca, araştırma amaçlı çalışmalarda da ilgilenilen bölge GC’ ce zengin ve uzun bir bölge olduğunda PC GC zengin DNA bölgelerinin başarılı bir şekilde amplifikasyonunu sağlayan yöntemlerin geliştirilmesi özellikle Frajil X sendromu, Hirschsprung hastalığı, Konjenital merkezi hypoventilasyon sendromu gibi kalıtsal hastalıkların moleküler tanısında büyük önem taşımaktadır. Bu hastalık veya sendromlara neden olan genlerin promotor, enhancer veya diğer kontrol

elemanı içeren bölgeleri uzun tekrarlar halinde GC nükleotidlerini içermektedir. (Musso, Bocciardi et al. 2006).

PCR ile amplifikasyonu zor olan GC içeriği yüksek gen bölgelerinin analizi için Expand long PCR yöntemi ile bu bölgelerin klonlanması elde edilen ürünün görüntülenebilmesi içinde southern blot yöntemi rutin tanıda uygulanmaktadır (Hecimovic, Barisic et al. 1997; Pandey, Phadke et al. 2004; Sofocleous, Kolialexi et al. 2009; Filipovic-Sadic, Sah et al. 2010). Oldukça uzun süreli ve oldukça pahalı olan bu yöntemler hem büyük miktarlarda genomik DNA ihtiyaç duymakta hem de manipülasyon açısından da yüksek deneyim gerektirmektedir (Filipovic-Sadic, Sah et al. 2010). CG zengin bölgelerin analizini gerçekleştirmek için kullanılan yaklaşımlardan biride metilasyon spesifik PCR ve Gene Scan analizidir (Zhou, Lum et al. 2006; Filipovic-Sadic, Sah et al. 2010). Günümüzde bu tip bölgelerin amplifikasyonunu sağlamaya yönelik birçok potansiyel çözüm üretilmiş olsa da GC zengin dizilerin PCR ile amplifikasyonunu optimal şekilde sağlayacak protokollerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Musso, Bocciardi et al. 2006). Buradan yola çıkarak planladığımız projemizde nükleotid analogları, PCR katkı kimyasalları ve PCR optimizasyon deneyleri ile kısa sürede sonuç veren ve düşük maliyetli yeni protokoller oluşturulmaya çalışılacaktır.

Nükleotid analogu 7-deaza-dGTP ve d-ITP (2'deoksiinosin -5'trifosfat)'nin DNA zincirindeki varlığının zincirlerin ayrılma derecelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu şekilde PCR sonucu oluşan ampliconların denatürasyon sıcaklığı genomik DNA'dan düşük tutulabilmekte ve özgülük artırılabilir (Dierick, Stul et al. 1993; Auer, Sninsky et al. 1996; Musso, Bocciardi et al. 2006). Ancak literatürde diğer nükleotid analoglarının GC zengin bölgelerin çoğaltılmasındaki kullanılabilirliğini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. GC zengin bölgelerin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla birçok PCR katkı kimyasalı (PCR additives) farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Bu kimyasallara örnek olarak düşük moleküler ağırlıklı ürünler DMSO (Dimetilsülfoksit), diğer sülfoksitler, Formamid ve Non iyonik deterjanlar (Triton x 100, Tween 20, nonidet p40), TMAC (tetrametil amonyum klorit) ayrıca Betain ve türevleri gibi uyumlu çözeltiler verilebilir (Henke, Herdel et al. 1997; Kovarova and Draber 2000; Spiess, Mueller et al. 2004; Musso, Bocciardi et al. 2006). DMSO (Dimetilsülfoksit) ve Formamid'in sekonder yapıların oluşumunu engelleyerek PCR etkinliğini belirgin bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir (Chakrabarti and Schutt 2001; Farell and Alexandre 2012). Gliserol de; DMSO (Dimetilsülfoksit) ve Formamid gibi primer ve kalıp hibridizasyonunda Tm değerini değiştirmekte ayrıca enzimin ısıya direncini artırarak PCR etkinliğini arttırabilmektedir (Nagai, Yoshida et al. 1998). Bovin serum albumin (BSA) birçok moleküler teknikte termal stabiliteyi ve enzimlerin yarı ömrünün uzamasını sağladığı için kullanılmaktadır. Birçok çalışma PCR'da da amplifikasyon etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Bu etkiyi PCR'da *Taq* polimerazı inhibitörlerinden koruyarak sağladığı düşünülmektedir (Farell and Alexandre 2012).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Planladığımız çalışmada % 80'den fazla GC nükleotid oranına sahip 600 baz çifti ve daha uzun DNA klonlarının PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma başlıca aşağıda tanımlanan üç ana parametrenin değerlendirilmesine olanak sağlayacak şekilde dizayn edilmiştir.

Planlanan projede

1) Modifiye nükleotidler;

- 7-deaza-dGTP
- 8-oxo- dGTP
- d-PTP (2'deoksi-P-nüklesit-5'trifosfat)
- 2OH-dATP
- d-ITP (2'deoksiinosin -5'trifosfat)

2) PCR katkı kimyasalları (PCR additives)

- DMSO (Dimetilsülfoksit)
- Betain ve türevleri
- Gliserol
- BSA (bovin serum albumin)
- Formamid
- Non iyonik deterjanlar (Triton x 100, Tween 20, nonidet p40)
- TMAC (tetrametil amonyum klorit)

PCR etkinliği üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3) PCR'da ısı döngü sayısı, süre ve sıcaklığın optimizasyonun sağlanması.

Proje kapsamında 6 farklı PCR programı çalışılmıştır. Çalışılan PCR programlarının sıcaklık, süre ve döngü sayıları Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1. PCR programlarının sıcaklık, süre ve döngü sayıları

Frajil X PCR Programı		
95 °C	40"	35 Döngü
52 °C	30"	
72 °C	1'30"	

GC zengin bölge PCR programı		
95 °C	40"	35 Döngü
58 °C	30"	
72 °C	1'30"	

Touchdown PCR program 1		
98 °C	15"	Her döngüde 0,5 °C azalan 20 siklus
65,5-56 °C	40"	
72 °C	1'30"	
95 °C	15"	20 siklus
52 °C	40"	
72 °C	1'30"	

Touchdown PCR program 2		
98 °C	15"	Her döngüde 0,5 °C azalan 20 siklus
65,5-56 °C	40"	
72 °C	1'30"	
95 °C	15"	20 siklus
58 °C	40"	
72 °C	1'30"	

Touchdown PCR program 3		
98 °C	15"	Her döngüde 0,5 °C azalan 13 siklus
56-50 °C	40"	
72 °C	1'30"	
95 °C	15"	25 siklus
52 °C	40"	
72 °C	1'30"	

3. BULGULAR

Çalışmalarda kullanılan PCR programı, primer çifti, enzim sistemi, MgCl₂ konsantrasyonu, dNTP karışımları ve diğer kimyasalların (Tween 20, BSA, Betain, Gliserol, PEG, DMSO, SDS) miktarları ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.1' de verilmiştir. Yapılan tüm PCR çalışmaları en az iki örnekle tekrarlanmıştır. Sonuçlar PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir. Şekil 3.1'de bazı PCR çalışmalarının agaroz jel görüntüleri örnek olarak verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan PCR programı, primer çifti, enzim sistemi, MgCl₂ konsantrasyonu, dNTP karışımları ve diğer kimyasalların (Tween 20, BSA, Betain, Gliserol, PEG, DMSO, SDS) miktarları ve elde edilen sonuçlar

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl ₂	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
1	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	Bant + *çok sayıda ekstra bant (primerler çalışıyor)
2	GC Programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		*	Bant +
	GC Programı	e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		*	Bant -
3	GC Programı	e.2.3 primer	One Taq sistem	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		*	Bant +
4	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		High GC enhancer	Bant + *çok sayıda ekstra bant
5	Frajil X programı	FraX primer	One Taq sistem	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		*	Bant +++

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl ₂	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
6	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*		*	Bant -
	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	50 µg/ml BSA	*	*	*	*		*	Merdiven şeklinde nonspesifik bant
7	Touch down PCR 1	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*		*	Bant -
	Touch down PCR 2	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	50 µg/ml BSA	*	*	*	*		*	Bant -
8	Gradyent PCR	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*		*	Gradyent PCR uygun Tm belirlemek için
9	Touch down PCR 2	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*		*	Bant + (zayıf)
	Touch down PCR 3	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	50 µg/ml BSA	*	*	*	*		*	Bant -
10	Touch down PCR 3	FraX primer	2 U Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*		*	merdiven şeklinde bant
11	Touch down PCR 1	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*		*	Bant -
12	Touch down PCR 2	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	50 µg/ml BSA	*	*	*	*		*	Bant -

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
13	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	%10 Gliserol	%10 PEG	%10 DMSO	*	*	Bant -
	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	%15 Gliserol	%15 PEG	%15 DMSO	*	*	Bant -
	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	%20 Gliserol	%20 PEG	%20 DMSO	*	*	Bant -

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
14	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +
	GC programı	Zic2.e.1.B primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	Zic2.e.1.B primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dPTP	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	Zic2.e.1.B primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dITP	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	8-oxo 0,75+dNTP 0.25	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +
	GC programı	Zic2.e.1.B primer	Fermentas Taq	1,5 mM	8-oxo 0,75+dNTP 0.25	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dPTP 500mM	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	4:1 7deAZAdGTP:dITP	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 M Betain	*	*	%10 DMSO	*	*	1000 bç ve 250 bç bant görüldü
15	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	TSH bant +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	3:1 7deAZAdGTP:dNTP	*	*	*	*	*	*	*	*	TSH bant +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dPTP 500mM	*	*	*	*	*	*	*	*	TSH bant + / e.2.3. bant +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	%75 dITP+%25 dNTP	*	*	*	*	*	*	*	*	TSH bant +
	GC programı	e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 M Betain	*	*	%10 DMSO	*	*	e.2.3. bant + ve 500 bç'de ekstra bant
	GC programı	e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	3:1 7deAZAdGTP:dNTP	*	*	1,2 M Betain	*	*	%10 DMSO	*	*	e.2.3. bant -
16	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	Bant ++
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	3:1 7deAZAdGTP:dNTP	*	*	*	*	*	*	*	*	Bant -

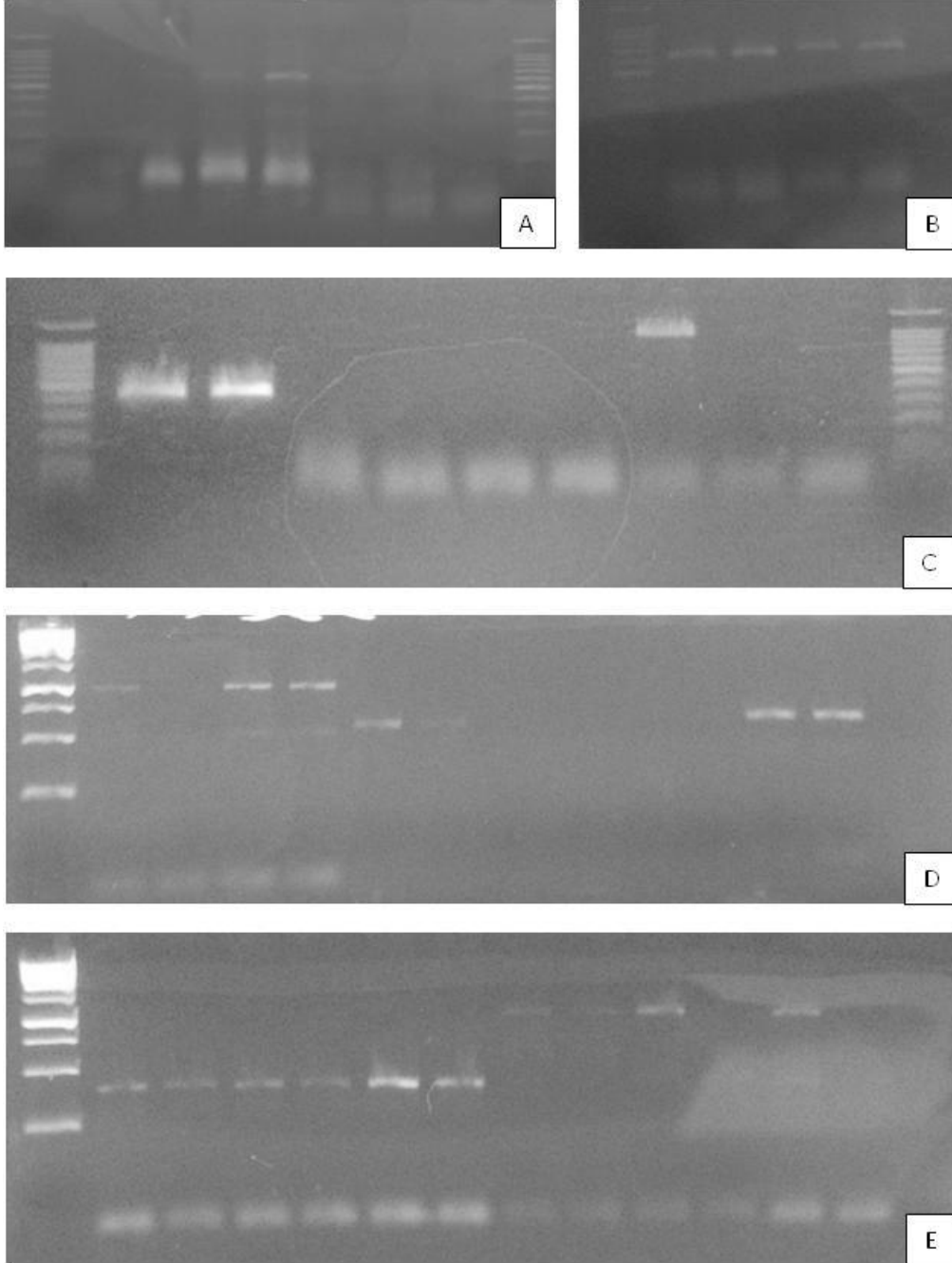
No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
17	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%5 DMSO	*	*	En iyi TSH bandı
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%7,5 DMSO	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%10 DMSO	*	*	En iyi e.2.3 bandı
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%12,5 DMSO	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%15 DMSO	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%17,5 DMSO	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,4 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM Betain	*	*	*	*	*	En iyi TSH bandı
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM Betain	*	*	*	*	*	Silik TSH bandı, iyi e.2.3 bandı
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	2 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	2,4 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%5 DMSO	*	*	En iyi TSH bandı
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%7,5 DMSO	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%10 DMSO	*	*	En iyi e.2.3 bandı
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%12,5 DMSO	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%15 DMSO	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	%17,5 DMSO	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,4 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM Betain	*	*	*	*	*	En iyi TSH bandı
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM Betain	*	*	*	*	*	Silik TSH bandı, iyi e.2.3 bandı
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	2 mM Betain	*	*	*	*	*	
	GC programı 25 siklus	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	2,4 mM Betain	*	*	*	*	*	

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
18	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%10 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bant +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 mM	*	*	%10 DMSO	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%10 DMSO	*	*	bant -
19	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%5 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%7,5 DMSO	*	*	TSH + / e.2.3 +++
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%10 DMSO	*	*	TSH + / e.2.3 +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%12,5 DMSO	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	0,8 mM	*	*	%15 DMSO	*	*	TSH + / e.2.3 +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%5 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%7,5 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%10 DMSO	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%12,5 DMSO	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,6 mM	*	*	%15 DMSO	*	*	bant -

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
20	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	*	*	*	*	TSH bandı + /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	35µg/ml	*	*	*	*	*	*	TSH bandı + /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	45µg/ml	*	*	*	*	*	*	TSH bandı +++ /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	55µg /ml	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	65µg /ml	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	75µg/ml	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	%5 Gliserol	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	%7,5 Gliserol	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	%10 Gliserol	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	%15 Gliserol	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	%20 Gliserol	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	%5 PEG	*	*	*	TSH bandı + /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	%10 PEG	*	*	*	TSH bandı + /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	%15 PEG	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	*	*	% 0,1 SDS	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	*	*	% 0,01 SDS	*	TSH bandı + /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*		*	*	*	*	% 0,05 SDS	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,02 Tween 20	*	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,03 Tween 20	*	*	*	*	*	*	*	TSH bandı - /e.2.3 bandı -
21	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	1,2 mM	*	*	%5 DMSO	*	*	e.2.3 bandı +++
		TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	3:1 7deAZAdGTP:dNTP	% 0,1 Tween 20	*	1,2 mM	*	*	%5 DMSO	*	*	bant -

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
22	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	1,2 M	*	*	% 5 DMSO	*	*	Bant +
	Frajil X programı	FraX primer	One Taq sistem	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	Bant +
23	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	% 5 DMSO	*	*	TSH bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 M	*	*	*	*	*	TSH bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	*	*	*	TSH bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	*	*	1,2 M	*	*	% 5 DMSO	*	*	e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	*	*	% 5 DMSO	*	*	e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	1,2 M	*	*	*	*	e.2.3 bandı +
	GC programı	TSH primer + e.2.3 primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	1,2 M	*	*	% 5 DMSO	*	*
24	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	1,2 M	*	*	% 5 DMSO	*	*	Bant +
	Frajil X programı	FraX primer	One Taq sistem	1,5 mM	dNTP mix	*	*	*	*	*	*	*	*	Bant +
25	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	%10 Gliserol	*	% 10 DMSO	*	*	bant +
	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	3 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	%10 Gliserol	*	% 10 DMSO	*	*	bant +++
26	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	3 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	1,2 M	*	*	% 10 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bandı +
	Frajil X programı	FraX primer	Fermentas Taq	3 mM	dNTP mix	% 0,1 Tween 20	*	*	%10 Gliserol	*	% 10 DMSO	*	*	TSH ve e.2.3 bandı +

No	PCR PROGRAMI	PRİMER ÇİFTİ	ENZİM SİSTEMİ	MgCl2	dNTP	Tween 20	BSA	Betain	Gliserol	PEG	DMSO	SDS	Diğer	Sonuç
27	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix normal	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix 7-deazadGTP %100	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix dITP li %100	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix dPTP li %100	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix 8-oxodGTP li %100	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix A %100	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix normal %50 / 7-deazadGTP %50	*	*	*	*	*	*	*	*	bant -
28	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix normal	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +++
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix 7-deazadGTP %75	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix dITP li %75	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix dPTP li %75	*	*	*	*	*	*	*	*	bant ++
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix 8-oxodGTP li %75	*	*	*	*	*	*	*	*	bant +++
	GC programı	TSH primer	Fermentas Taq	1,5 mM	dNTP mix A %75	*	*	*	*	*	*	*	*	bant ++



Şekil 3.1. A Frajil X programı sonuçları (Tablo 3.1 no:1). B GC PCR programı sonuçları (Tablo 3.1 no:3). C uygun T_m belirlemek için yapılan PCR çalışmasının (Tablo 3.1 no:8) agaroz jel görüntüsü. D ve E Tablo 3.1'de koşulları özetlenen 20 numaralı çalışmaya ait agaroz jel görüntüsü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

GC' ce zengin ve uzun gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasındaki güçlükler tüm dünyada moleküler genetik laboratuvarlarında en sık karşılaşılan problemlerdendir. Bu nedenle bu problemi aşmaya yönelik akademik ve ticari alandaki çalışmalar sürmektedir. GC' ce zengin ve uzun gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasındaki güçlüklerin aşılmasını sağlayan PCR protokollerinin geliştirilmesi ulusal ve uluslararası seviyede önemlidir. Böylece moleküler genetik laboratuvarlarında araştırma çalışmalarında karşılaşılan güçlüklerin aşılmasının yanında, moleküler genetik tanı laboratuvarlarında, ülkemizde ve tüm dünyada kıyasla yaygın görülen frajil X sendromu başta olmak üzere bazı genetik hastalıkların tanısında, düşük maliyetli ve kısa sürede sonuç alınan yöntemlerin geliştirilmesi akademik olduğu kadar ekonomik açıdan da fayda sağlayacaktır. Diğer yandan genetik tanıdaki güçlükler ve yüksek maliyetler nedeniyle yukarıda anılan genetik hastalıklar açısından tanı almamış olgular için, düşük maliyetli yüksek verimli genetik testlerin geliştirilmesi hem kendilerinin hem de diğer aile üyelerinin genetik tanısının kesinleştirilmesi yanında prenatal tanı endikasyonu olan hastalıklar açısından aileye prenatal tanı imkanı ve sağlıklı çocuk sahibi olma sağlayacaktır.

Ticari ürünler olan One Taq sistem ve High GC enhancer çalışmamızın pozitif kontrolleridir. Her iki ürünle kurulan PCR reaksiyonlarında pozitif sonuç alınmıştır. Çalışmanın ilk basamağını uygun PCR koşullarının belirlenmesi oluşturmaktadır. Bu nedenle GC zengin bölgeye özgü primerler olan e.2.3 primerleri yanı sıra TSH primerleride kullanılarak multipleks PCR uygulanmış her çalışma için PCR reaksiyonunun çalıştığı teyit edilmiştir. Uygun Tm derecelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar dışında beş farklı PCR protokolü denenmiştir. Daha önceki çalışmalarda etkin bulunan touchdown PCR yöntemi bizim çalıştığımız gen bölgelerinin amplifikasyonu için uygun olmadığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda farklı PCR programları yanı sıra Tween 20, BSA, Betain, Gliserol, PEG, DMSO, SDS gibi daha önceki çalışmalarda PCR etkinliğini arttırdığı belirlenmiş kimyasallar farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. %0.1 Tween 20, 1,2 nM Betain ve % 5 DMSO PCR reaksiyonuna eklendiğinde PCR etkinliğinin arttığı gözlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasını PCR reaksiyonuna eklenen modifiye nükleotidler;

- 7-deaza-dGTP
- 8-oxo- dGTP
- d-PTP (2'deoksi-P-nüklesit-5'trifosfat)
- d-ITP (2'deoksiinosin -5'trifosfat)

oluşturmaktadır. Özellikle; 7-deaza-dGTP Frajil X genetik tanısında birçok laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Modifiye nükleotidler GC zengin dizilerde ya nükleotid analogu olarak davranarak GC ile eşleşmekte yada dizideki Guanin veya Sitozin yerine adenin ve timin geçmesini sağlayarak GC içeriğini değiştirmektedir. Yukarıda adı geçen dört farklı modifiye nükleotid farklı oranlarda dNTP ile karıştırılarak PCR

reaksiyonları kurulmuştur (Tablo 3.1). Ancak beklenenin aksine çalıştığımız gen bölgesi için PCR etkinliğini arttırmamıştır. Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilmekte ve yayına hazırlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Auer, T., J. J. Sninsky, et al. (1996). "Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase." *Nucleic Acids Res* **24**(24): 5021-5025.
- Chakrabarti, R. and C. E. Schutt (2001). "The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides." *Nucleic Acids Res* **29**(11): 2377-2381.
- Dierick, H., M. Stul, et al. (1993). "Incorporation of dITP or 7-deaza dGTP during PCR improves sequencing of the product." *Nucleic Acids Res* **21**(18): 4427-4428.
- Farell, E. M. and G. Alexandre (2012). "Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates." *BMC Res Notes* **5**: 257.
- Filipovic-Sadic, S., S. Sah, et al. (2010). "A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome." *Clin Chem* **56**(3): 399-408.
- Hecimovic, S., I. Barisic, et al. (1997). "Expand Long PCR for fragile X mutation detection." *Clin Genet* **52**(3): 147-154.
- Henke, W., K. Herdel, et al. (1997). "Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences." *Nucleic Acids Res* **25**(19): 3957-3958.
- Kovarova, M. and P. Draber (2000). "New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions." *Nucleic Acids Res* **28**(13): E70.
- Musso, M., R. Bocciardi, et al. (2006). "Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences." *J Mol Diagn* **8**(5): 544-550.
- Nagai, M., A. Yoshida, et al. (1998). "Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR." *Biochem Mol Biol Int* **44**(1): 157-163.
- Nampalli, S. and S. Kumar (2000). "Efficient synthesis of 8-oxo-dGTP: a mutagenic nucleotide." *Bioorg Med Chem Lett* **10**(15): 1677-1679.
- Pandey, U. B., S. R. Phadke, et al. (2004). "Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation." *Neurol India* **52**(1): 36-42.
- Sofocleous, C., A. Kolialexi, et al. (2009). "Molecular diagnosis of Fragile X syndrome." *Expert Rev Mol Diagn* **9**(1): 23-30.
- Spiess, A. N., N. Mueller, et al. (2004). "Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose." *Clin Chem* **50**(7): 1256-1259.
- Zhou, Y., J. M. Lum, et al. (2006). "Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis." *Clin Chem* **52**(8): 1492-1500.

