

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Temel amacı istenilen DNA bölgesini in-vitro olarak zenginleştirmek olan PCR, 1983 yılında Kary Mullis tarafından bulunmuştur. PCR tekniği geliştirilmeden önce DNA vektör organizmalara aktarılarak, canlı hücre içinde çoğaltılıyordu. Ancak bu yöntem günlerce, hatta haftalarca sürebiliyordu. PCR'ın keşfiyle birlikte DNA zenginleştirme işlemi çok daha kısalmıştır. Hem zamandan tasarruf sağlaması, hem de oldukça düşük miktarda DNA ile çalışabilmesi sebebiyle de bir çok laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

PCR reaksiyonu için aşağıdaki reaksiyon bileşenlerine ihtiyaç vardır:

1. Hedef DNA'ya,
2. Isıya dayanıklı DNA polimeraza (*Taq polimeraz*),
3. Serbest dNTP'lere,
4. 2 adet yaklaşık 18-25 baz çifti uzunluğunda, kısa DNA'lardan oluşan (oligonükleotit) primere,
5. Tampon sistemine,
6. Magnezyuma (*dNTP'lerdeki a fosfatlara bağlanır, β ve γ fosfatların ayrılmasına yardımcı olur. Yani *Taq polimerazın dNTP bağlamasını kolaylaştırır. Mg konsantrasyonu arttıkça *Taq polimeraz daha etkin çalışır ama özgülüğü düşer. Bu nedenle istenmeyen bantlar görülür. Annealing sırasında da etkilidir. Düşük Mg konsantrasyonunda primerler zincire daha zor bağlanır. Yüksek Mg konsantrasyonunda ise baz eşleşmesi o kadar güçlü olur ki, bazı durumlarda 95°C'de bile zincirler birbirinden ayrılmayabilir.***

PCR'ın 3 ana bileşeni vardır. Bunlar:

1. Denatürasyon: Ortam sıcaklığı yaklaşık 95°C'ye yükseltilir. Sıcaklık artışı çift zincirli DNA'nın zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını kırılmasını sağlar. Bunun sonucunda primerlerin bağlanabileceği iki ayrı zincir oluşur.
2. Primerlerin hedef bölgeye bağlanması (Annealing): Ortam sıcaklığının 55-60°C'ye düşürülmesiyle birlikte primerler zincirlere bağlanır.
3. Extension: *Taq Polimerazın çalışması için gereken optimum sıcaklık 72°C'dir. Ortam sıcaklığının 72°C'ye yükseltilmesiyle birlikte *Taq Polimeraz istenilen bölgeyi sentezlemeye başlar.**

PCR yapılmadan önce çalışılan bölgenin sentezlenmesi için o bölgeye özgü primerler dizayn edilir. Genellikle primer boyutu 18-22 baz çifti arasında seçilir. Bu sayı düşürülürse primerin özgülüğü azalır, yükseltilirse de primerin bağlanması kalıp DNA'ya bağlanması güçleşir. Bunun dışında Tm derecesi, Ta derecesi, primerin G-C

miktarı, G-C klamplarının engellenmesi, tekrarlanan bölgelerin engellenmesi(ATATAT gibi), artarda aynı nükleotitin sıralanmasının engellenmesi, 3' ucun kararlılığı ve kalıp DNA'da katlanma yapabilecek bölgelerden kaçınmak primer dizayn ederken dikkat edilmesi gereken hususlardır.

Hot-Start PCR: *Taq polimeraz*, oda sıcaklığında hatta buzda bile çalışabilen bir enzimdir. Bazı durumlarda düşük sıcaklıklarda primerler zincire bağlanabilir. Primerlerin bağlanması sonucunda da *Taq polimeraz* reaksiyonu katalizleyip DNA sentezini sağlayabilir. Böyle durumlarda istenmeyen bölgeler sentezlenebilir. İstenmeyen bölgelerin istenmeyen zamanlarda sentezlenmesini engellemek için Hot-Start PCR yöntemi kullanılmaktadır. Hot-Start PCR'da *Taq polimeraz* baskılanmıştır. Denatürasyon sırasında baskılayıcının etkisi ortadan kalkar; *Taq polimeraz* aktif hale geçer. Bunun sonucunda oldukça verimli bir şekilde PCR ürünleri elde edilir. Eski DNA çalışmalarında veya bozulmuş olma ihtimalleri yüksek olan örneklerle çalışıldığında Hot-Start PCR yöntemi, klasik PCR'a göre oldukça etkilidir.

Touch-down PCR: Bir PCR süreci içine birden fazla *annealing* zamanı programlanabilir. Özellikle eski DNA örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda primerlerin çalışmasını garantileyebilmek için önerilen tekniklerden biridir. Örneğin kullanılan primerlerin Tm sıcaklık derecelerine göre yüksek *annealing* sıcaklığından düşük sıcaklıklara geçiş yapılan döngüler planlanabilir. Sonuç olarak primerin çalışması garanti altına alınabilir.

Örnek: Tm sıcaklığı 61°C olan iki primer için aşağıdaki gibi bir düzenleme mantıklı olabilir.

	1. Döngü: 10 tekrar			2. Döngü: 28 tekrar				
95°C	96°C	58°C	72°C	96°C	55°C	72°C	72°C	16°C
1 dak.	30 san.	15 san.	30 san.	30 san.	15 san.	30 san.	1 dak.	sonsuz

Hazırlayan:

Can Elverici

Hacettepe Üniversitesi,

Fen Fakültesi,

Biyoloji Bölümü,

Biyocoğrafya Araştırma Laboratuvarı

Beytepe, 06800, Ankara, Türkiye