

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA'nın belirli bir bölgesinin tüp içinde çoğaltılması işlemidir.
- Bu teknik ile DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını yapmak mümkündür.
- PCR, 1985 yılında Cetus adlı biyoteknoloji firmasında çalışan Kary Mullis adlı araştırmacı tarafından bulunmuştur. Bu buluşu, Kary Mullis'in 1993 yılında Nobel ödülünü almasını sağlamıştır.

PCR,

- DNA dizi analizinde ve DNA haritalanmasında,
- Genetik hastalıkların teşhisinde,
- DNA parmakizi analizinde,
- İnsan Genom Projesi ve diğer Genom Projelerindeki araştırmalarda,
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde,
- Tarımda,
- Sistematik ve evrim çalışmalarında kullanılmaktadır.

- PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekleşir. Bu basamaklar;

1. Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (94°C),

2. Primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıktaki annealing-birleşme reaksiyonu,

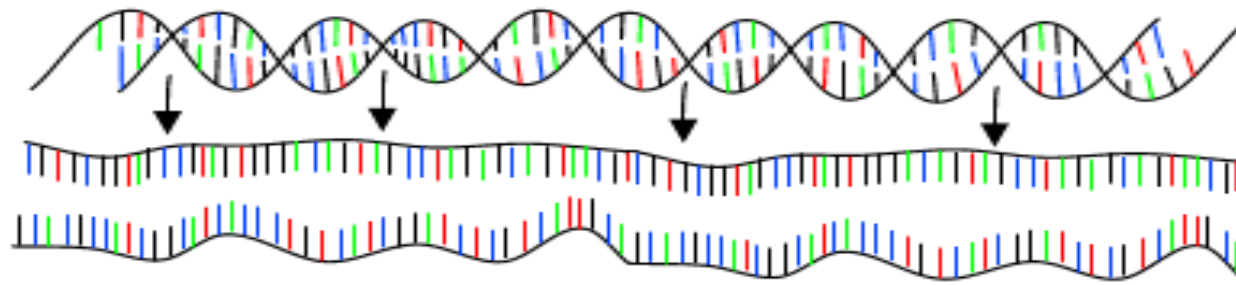
3. Taq DNA polimeraz enziminin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C 'de primerlerin uzaması-tamamlayıcı zincir sentezi olarak tanımlanabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu için,

- Kalıp DNA molekülüne,
- 20-25 baz uzunluğunda ve kalıp zincirin 5've 3' uçlarındaki DNA dizilerine komplementer olan sentetik oligonükleotitlere,
- Serbest dNTP'lere (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq DNA polimeraz enzimine
- Enzimin çalışacağı uygun koşulları sağlayan tampon sistemine ihtiyaç vardır.

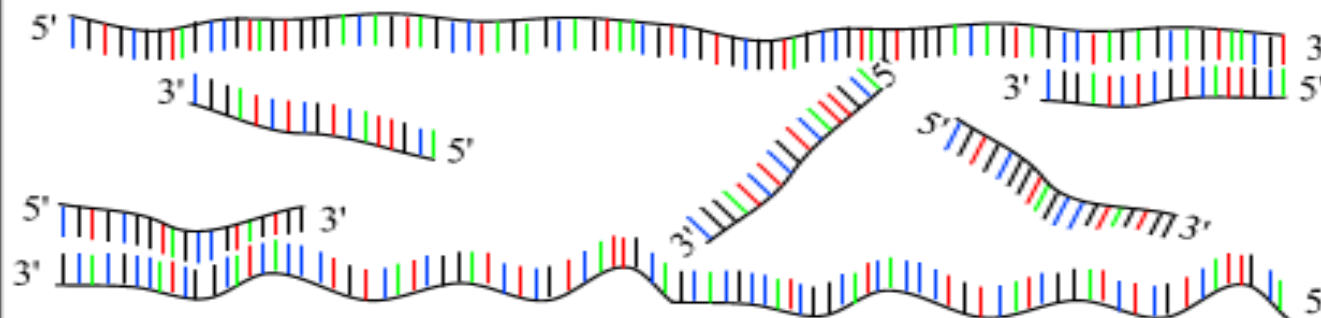
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

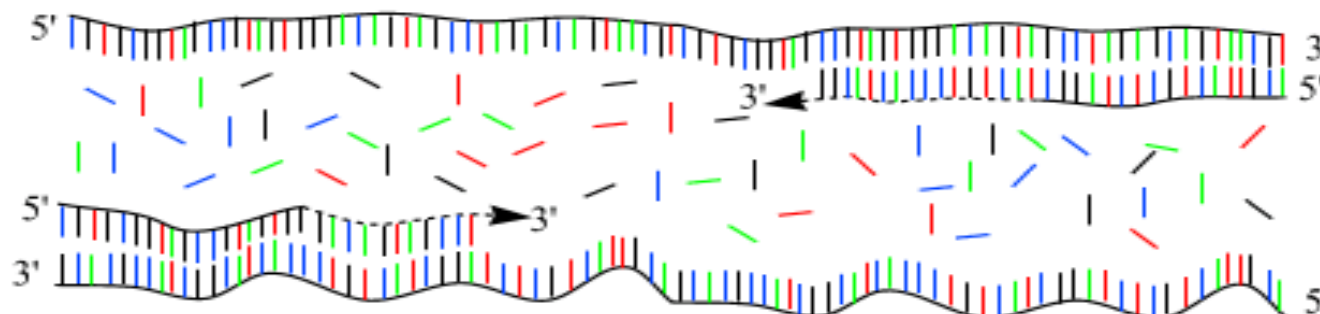
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

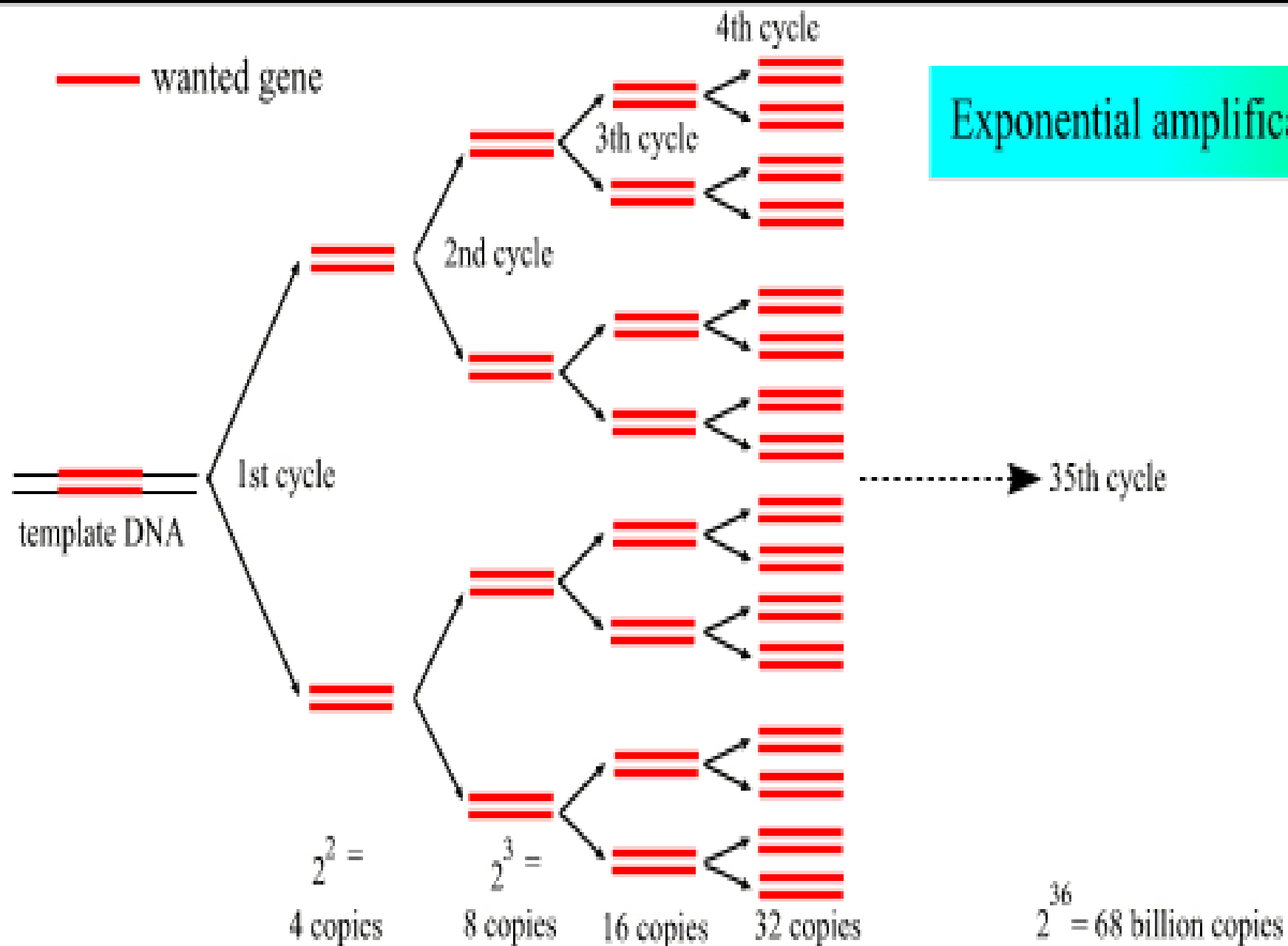
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

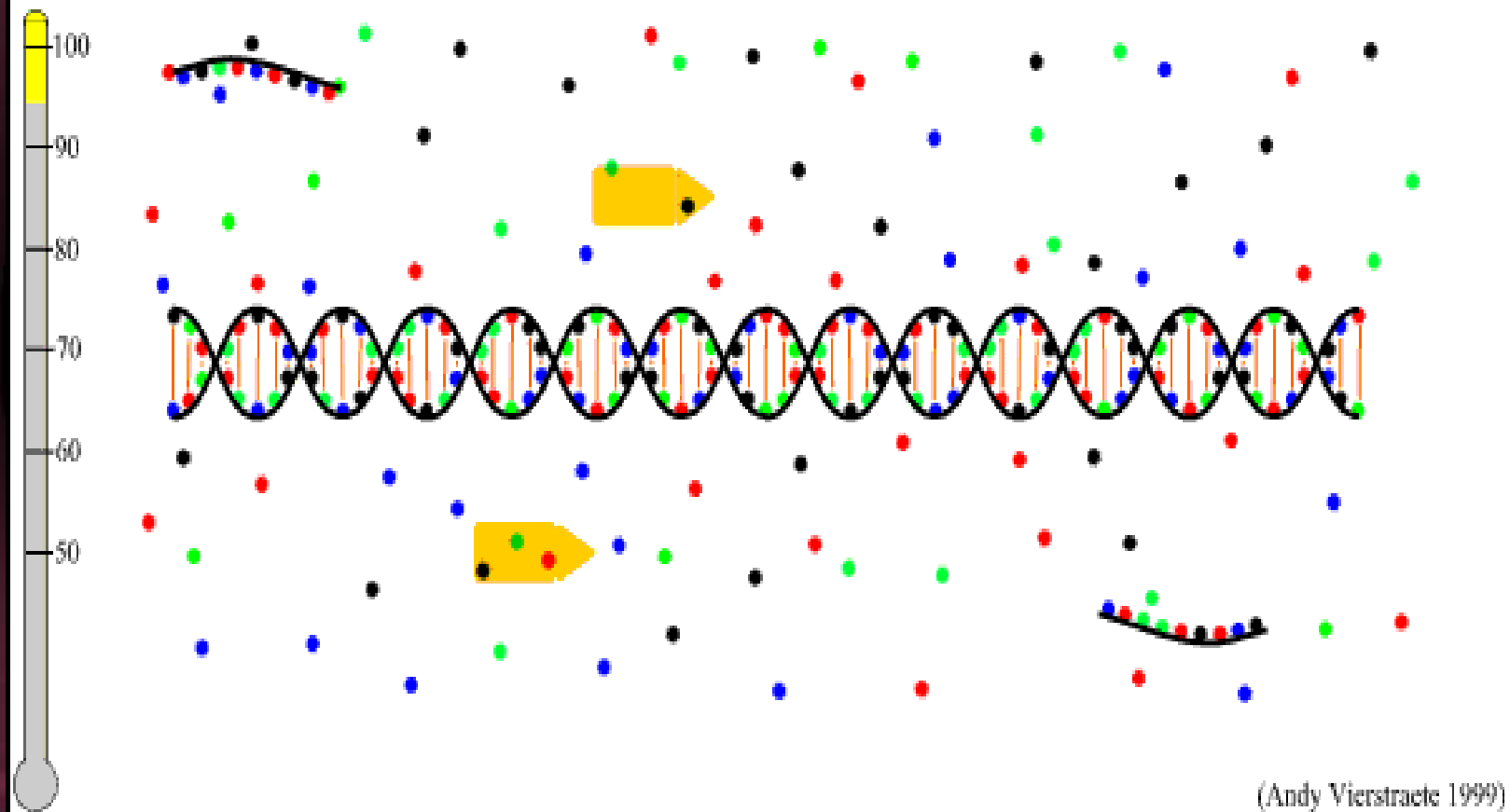
2 minutes 72 °C

only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)

PCR : Denaturation 94°C



PCR Demo

Tek örnek için PCR karışımının hazırlanması (100 μ l toplam hacim):

- DNA 100 ng
- 10xTampon 10 μ l
- dNTP 2 μ l (200 μ mol olacak şekilde)
- 25mM MgCl₂ 6 μ l
- F primer 100 pmol
- R primer 100 pmol
- sdH₂O 80 μ l
- Taq polimeraz 2.5 ünite

PCR koşulları:

- 94°C denatürasyon
- 55-60 °C annealing
- 72 °C polimerizasyon

Annealing derecesi primerin baz içeriğine ve uzunluğuna bağlı olarak değişken bir değerdir. Her primer için hesaplanması gerekmektedir.

Primerlerin annealing derecelerinin hesaplanması:

- $2 (A+T)+4 (G+C)$

Örnek dizi:

5'-ccttaagctggtgtccaaat-3'

- $2(11AT)+4(9GC)=58^{\circ}C$

5'-gctagcaatatattgtaagcat-3'

- $2(14AT)+4(7GC)=56^{\circ}C$

PCR Aleti-Thermal Cycller



