

PCR (Polymerase chain reaction) = PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

PCR, 1985 yılında Cetus şirketinden Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup, belirli bir DNA parçasının kopyalanmasına ve çoğaltılmasına olanak sağlayan *in vitro* bir yöntemdir.

DNA ikili sarmalının yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasından sonra sıcaklık düşürülür, ve bu sayede oligonükleotid primerler çoğaltılacak olan DNA parçası üzerinde karşılıklı olarak eşlenik sekanslara bağlanırlar. PCR solüsyonundaki DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda çalışabilen bir enzimdir ve PCR döngüleri arasında ikili sarmalın açılması için kullanılan yüksek sıcaklığa dayanabilir. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık polimerizasyonun gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa düşürülür: Primerler uzatılır ve primerlerin arasında kalan bölge sentezlenir. Sarmallar tekrar denature edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar tekrar gerçekleşir; Bu işlem genelde 20 ila 50 döngü arasında tekrarlanır.

Bir ısı döngüleyici ve programlanabilir su banyosu sayesinde süreç için gerekli olan sıcaklık değişimleri ayarlanabilir. Bu süreçte, DNA polimeraz olarak termofil bakteri *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ve yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Süreç oldukça basittir, ancak kontaminasyon yaratan herhangi bir DNA da bu şekilde çoğaltılabilir.

DNA'nın başka bir DNA ile kontaminasyonu PCR kullanıcısı için istenmeyen bir olaydır. Çok küçük DNA miktarları bile amplifikasyon için yeterli olduğu için, örnek hazırlanması sırasında yanlışlıkla karışan DNA'dan dolayı bir çok yanlış DNA bandının elde edilmesi mümkündür.

PCR laboratuvarlarında kontaminasyonun en yaygın sebebi PCR yönteminin bir ürünü olarak elde edilmiş DNA'dan kaynaklanır. Bu kontaminasyon pipetleme ve PCR örneklerinin manipülasyonu esnasında oluşan aerosollardan oluşur. Bu sebeple bir çok laboratuvar da PCR makinasından, ve PCR sonrası tüplerin açıldığı yerlerden uzak, ayrı bir örnek hazırlama bölümü bulunur. Memeli DNA'sı kontaminasyonun diğer bir kaynağı da deri hücreleridir. Bu nedenle deney sırasında ve en önemlisi örnek hazırlanması aşamasında eldiven giyilmesi gereklidir.

Temel PCR Kuralları:

- Örneklerinizi PCR makinasından uzakta hazırlayın. Birçok laboratuarda örnek hazırlamak için PCR makinasından ve PCR sonrası tüplerin açıldığı yerden uzakta ayrı bir bölüm bulunur. Örnek hazırlamak için ayrılmış bir yer olsun ya da olmasın örneklerinizi kesinlikle PCR makinasının veya PCR ürününün daha sonra manipülasyonunun yapılacağı yere yakın bir yerde hazırlamayın. Örnek hazırlama konusunda kesin kurallar koymak için fikir birliğine varmaya çalışın.
- PCR reaksiyonu hazırlamak için kullandığınız pipetleri ve diğer malzemeleri ayırın. Pozitif taşınımlı bir pipet (positive displacement pipettor) aerosolları önleyeceği gibi örneklerin birbirine taşınması ihtimalini de azaltır. Filtreli pipet uçları da örnekten örneğe taşınmayı engeller.
- Eldiven giyin ve sıklıkla değiştirin. Bu örneklerin elden gelebilecek epitel hücreleriyle kontaminasyonunu engeller.
- DNA'yı tüm PCR tüplerine en son koyun.

Çoğaltılacak DNA parçasına ve kullanılan primerlere göre değişiklik gösteren PCR ayarları genelde aşağıda belirtilen sıcaklıklar gibi ayarlanır.

1. Denatürasyon (94-97°C, 15 s. İlk denatürasyon basamağı daha uzun olmalıdır)
2. Primer bağlanması (55-72 °C, 30 s.)
3. Primerlerin uzatılması (72°C, 1.5 dk.)

Belirli bir DNA parçasının PCR yöntemi ile çoğaltılması. İlk iki veya üç siklattan sonra tek sarmallı çıkıntılar yok sayılır ve ürünün büyük çoğunluğu çift sarmallı hedef sekanstan oluşur. (Zyskind ve Bernstein 1992'nin izni ile yeniden çizilmiştir.)