Open Access Journal [doi: 10.46683/jmvi.2020.5] Derleme Yazı / Review Article

Journal of Molecular Virology and Immunology

# Polimeraz Zincir Reaksiyonu Teknolojisinin Temel Prensipleri

# Basic Principles of Polymerase Chain Reaction Technology

Kemal TEKİN[1] [ID], İsmail Selçuk AYGAR[1] [ID], Tuğrul HOŞBUL[2] [ID]

[1]Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].
[2]Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 03.01.2020. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 20.05.2020.
İletişim [Correspondence]: Tuğrul HOŞBUL; Dr.Öğr.Üy., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara, Türkiye. E-posta: tugrulhosbul@gmail.com [Tuğrul HOŞBUL; Asst.Prof., Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey. E-mail: tugrulhosbul@gmail.com]

## Özet

Kary Mullis'in 1984 yılında bulduğu ve kendisine Nobel ödülü kazandıran polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik DNA sekanslarının in-vitro DNA sentezi yoluyla eksponensiyel (üstel) olarak çoğaltılabildiği hızlı ve duyarlılığı yüksek bir tekniktir. PCR temel olarak bir DNA çoğaltma yöntemidir, bu yöntemle RNA çoğaltılmak istenirse önce "revers transkriptaz" enzimi kullanılarak hedef RNA sekanslarının DNA kopyaları (*komplementer DNA, cDNA*) çıkartılır ve PCR ile bu cDNA molekülleri çoğaltılır. PCR'ın kullanılmasıyla belirli bir genetik segmentin, birkaç kalıp DNA molekülünden başlayarak milyonlarca kopyası üretilebilmektedir. Kromozomal DNA'nın in-vivo replikasyonu milyonlarca nükleotidin replikasyonunu kapsar, PCR amplifikasyon ürünleri ise genellikle 1000 bp'den (baz çifti, *base pair; bp*) daha kısa olacak şekilde dizayn edilir. Bununla beraber ekstrem durumlarda özel termostabil DNA bağımlı DNA polimeraz kombinasyonları kullanılarak 35000 bp'den daha uzun PCR amplikonlarının başarılı olarak çoğaltılabildiği bildirilmiştir. Günümüzde bu yöntemin çeşitli varyasyonları mikrobiyoloji, adli tıp ve genetik bilimlerinde araştırma ve tanı amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR temelli yöntemlerin önemli kullanım alanları arasında dizi analizi, klonlama, kantitatif hasta izlemi, moleküler ilaç direnç testleri, filogenetik analizler ve salgın yönetimi ve doku uyumluluk testleri gibi uygulamalar yer alır. Bu makalede PCR yönteminin temel prensipleri ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Amplifikasyon, DNA, Polimeraz, PCR tamponu, Master miks.

## Abstract

The polymerase chain reaction (PCR) discovered by Kary Mullis in 1984, which earned him the Nobel prize, is a fast and highly sensitive technique in which specific DNA sequences can be exponentially amplified via in-vitro DNA synthesis. PCR is basically a DNA amplification method, if it is desired to reproduce RNA; DNA copies (*complementary DNA, cDNA*) of the target RNA sequences are firstly produced by using the enzyme "reverse transcriptase" and these cDNA molecules are amplified by PCR. Using PCR, millions of copies of a specific genetic segment can be produced, starting with several target DNA molecules. In-vivo replication of chromosomal DNA involves replication of millions of nucleotides, while PCR amplification products are generally designed to be less than 1000 bp (*base pair; bp*).

©Copyright JMVI. Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

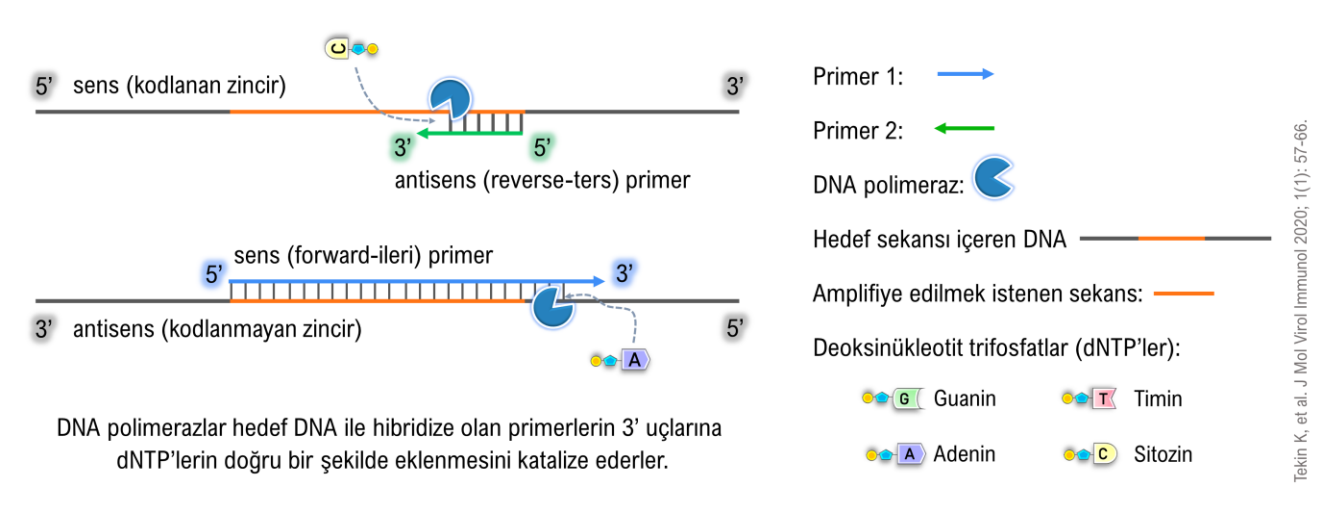
However, in extreme cases it has been reported that PCR amplicons longer than 35000 bp can be successfully amplified using special thermostable DNA-dependent DNA polymerase combinations. Today, various variations of this method are widely used in microbiology, forensics and genetics for research and diagnosis purposes. Important uses of PCR based methods include sequence analysis, cloning, quantitative patient monitoring, molecular drug resistance tests, phylogenetic analysis, and epidemic management and tissue compatibility tests. In this article, basic principles of PCR method are discussed.

Keywords: Amplification, DNA, Polymerase, PCR buffer, Master mix.

## Giriş

Canlı hücrelerde DNA replikasyonu son derece karmaşık bir süreçte gerçekleşir. DNA replikasyon işleminin çok az hata oranı ile yüksek etkinlikli (*high fidelity*) bir şekilde gerçekleşebilmesi ve düzenlenmesi için çok sayıda hücresel proteinin ve diğer moleküllerin (RNA primerleri gibi) uyumlu bir şekilde çalışmasına gereksinim duyulur. Basitçe tanımlayacak olursak, ilk olarak hücrelerdeki çift zincirli DNA yapısı çözülür ve ana molekülün "her bir zinciri" tamamlayıcı yeni bir DNA zinciri (iplikçiği) üretmek için bir kalıp olarak kullanılır. İyi bilinen Watson ve Crick modellemesine göre bu kopyalama nükleotidlerin birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanabilme yeteneklerine dayanır: Adenin (A) her zaman Timin (T) ile ve Guanin de (G) her zaman Citozin (C) ile çift oluşturur. Bu nedenle hedef iplikçiğin özgün dizisi yeni DNA iplikçiğinin baz dizisini belirler [1,2]. PCR'da laboratuvarlarda her gün kullandığımız birkaç basit komponent yardımıyla, doğal DNA replikasyon süreçlerinin temel unsurları bir test tüpü içinde taklit edilerek hedef DNA sekansları (60-30000 bp) amplifiye edilmektedir [3]. Görünüşte basit bir metot gibi algılanmasına rağmen, gerçekte çok sayıda parametrenin test sonucunu etkileyebildiği karmaşık bir reaksiyondur. Sıcaklık, pH, başlangıç kalıp DNA konsantrasyonu, reaksiyona eklenen deoksinükleotid trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), DNA polimeraz ve $Mg^{++}$ miktarlarındaki değişiklikler ve reaksiyon karışımını oluşturan komponentler arasındaki moleküler etkileşimler PCR reaksiyonunun dinamiğini etkileyen parametrelerin en önemlileridir. PCR ile reaksiyon başlangıcında çok düşük sayıda bulunan moleküllerden çok miktarda DNA amplifiye edilebildiği için reaksiyon karışımı birkaç DNA molekülü ile kontamine olduğunda teorik olarak yanlış pozitif sonuçlar alınabileceği dikkate alınmalıdır. Tüm bunlara rağmen, çok yönlü bir yöntem olan PCR; DNA manipülasyonu ve analizi için muazzam bir güce sahiptir [1,4].

Basit bir tampon sistemi içerisinde gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında DNA polimeraz tarafından serbest deoksinükleotidler kullanılarak yeni zincir sentezi gerçekleştirilir, böylece hedef DNA molekülünün bilinen bir bölgesi kopyalanır (Şekil 1). DNA polimerazların zincir uzamasını başlatabilmesi için çoğaltılacak sekans üzerindeki özgün bölgelere bağlanacak primer denilen çok kısa nükleotid dizilerine ihtiyaç vardır. Hücresel DNA sentezinde primaz (DNA bağımlı RNA polimeraz) enziminin sentezlediği yaklaşık 10 nükleotid uzunluğundaki RNA oligonükleotidler (*Okazaki fragmanları*) replike olacak bölgeye bağlanırlar ve polimerazlar (DNA bağımlı DNA polimerazlar) aracılığı ile yeni zincir sentezlenir. PCR'da ise DNA polimerazın senteze başlayabilmesi için otomatize makinelerde üretilen bir çift sentetik primere (oligonükleotid) ihtiyaç duyulur. Primerlerden biri sens (kodlanan) zincire komplementer iken diğeri antisens (kodlanmayan) zincire komplementer olarak sentezlenir. Bu primerler kalıp DNA segmentinin uç bölgelerindeki komplementer bölgeler ile hibridize olarak yeni zincir sentezi için başlangıç noktalarını oluştururlar ve amplikon büyüklüğünü belirlerler. Tek zincirli DNA sekansları olan bu primerler 6 ila 30 nükleotid arası uzunluğa sahip olabilirler. Fakat optimal primer uzunluğu 16-24 nükleotiddir. PCR aracılı DNA amplifikasyonu "döngüsel enzimatik reaksiyon" esasına dayalı bir işlemdir ve her döngüde bir önceki döngünün amplifikasyon ürünleri substrat olarak kullanılır. Klasik bir PCR'da reaksiyonun her bir döngüsü farklı sıcaklıklarda gerçekleşen denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç basamaktan oluşur [1,2,4,5] (Şekil 2).




**Şekil 1.** PCR'da primer-hedef bağlanması ve yeni zincir sentezi [6-9].

***Birinci basamak***

Ayrılma veya denatürasyon (melting) basamağıdır. Canlı hücrelerde replikasyon sırasında DNA çeşitli enzimler (helikazlar, girazlar ve ligaz) ve çeşitli yardımcı öğelerin (DNAa, DNAb, DNAc, tek zincir bağlayan protein ve bir grup polimeraz subünit proteinleri) katkısı ile ikiye ayrılmaktadır. PCR'da ise ilk olarak hücresel proteinler DNA'dan (genellikle kimyasal yolla) uzaklaştırıldıktan sonra reaksiyon karışımının ısıtılması ile kalıp DNA'nın sekonder ve tersiyer yapıları ortadan kaldırılır ve iplikçikler birbirinden ayrılır. Bu basamakta reaksiyon karışımı 91-97°C'ye ısıtılarak, çift zincirli DNA'nın karşılıklı bazları arasındaki hidrojen bağları parçalanır ve her bir kalıp DNA'dan iki adet tek zincirli DNA iplikçiği elde edilir. Tekrarlayan her ısıtma aşamasında yeni sentezlenen çift zincirli moleküller (amplimer veya amplikon olarak bilinirler) de denatüre olurlar ve her tek iplikçik (orijinal kalıp DNA'lar ve yeni sentezlenmiş iplikler) yeni bir primer bağlanma bölgesi sağlar (yani daha fazla DNA sentezi için yeni bir kalıp olarak görev alır) [1,2,4,9]. Denatürasyon basamağı için genel olarak 30-60 sn'lik süre yeterli olmaktadır. Ancak daha uzun tutulması durumunda DNA polimerazların yapısında bozulmaya yol açabileceği unutulmamalıdır [10]. Hot start DNA polimerazların kullanıldığı bazı protokollerde 8-10 dakika süren bir başlangıç denatürasyon basamağı uygulanabilmekte ve takip eden döngülerde yine 30-60 sn'lik denatürasyon süreleri yeterli olmaktadır [8].

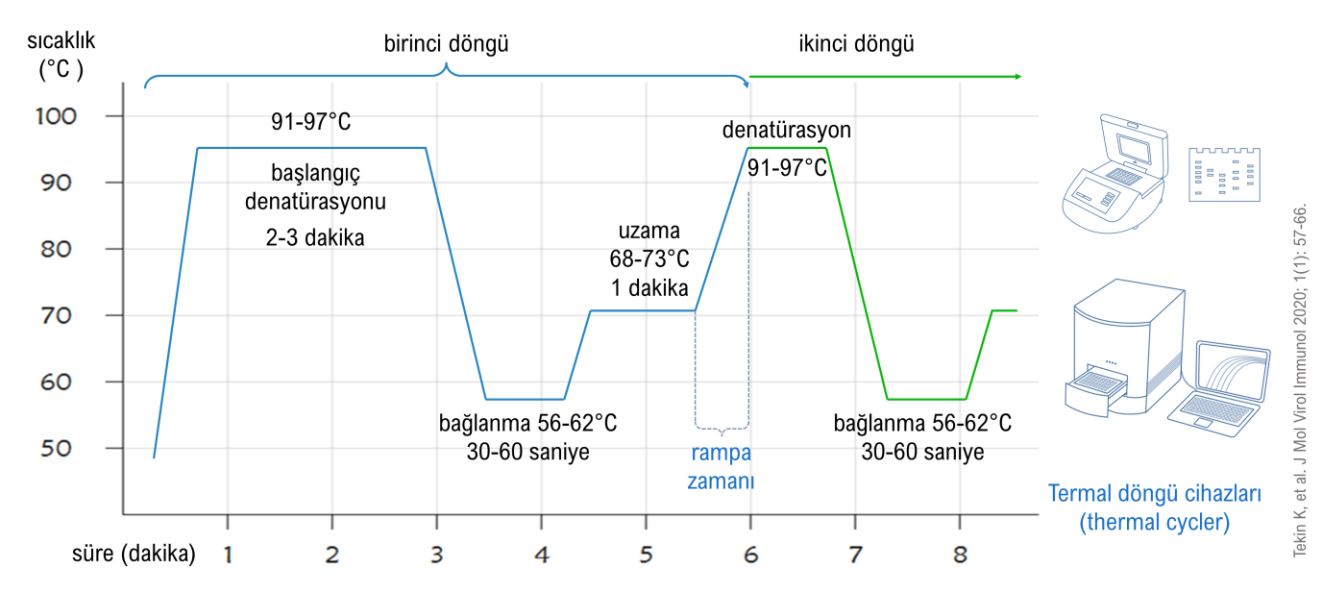
***İkinci basamak***

Bağlanma (annealing) basamağıdır. İlk basamakta ısıtılan karışımın sıcaklığı bu basamakta 56-62°C'ye düşürülür. Böylece, özgün primerlerin kalıp DNA zinciri üzerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanması (hibridize olması) sağlanır [1,4]. Bu basamağın süresi ve sıcaklık derecesi primerlerin uzunluklarına, baz içeriklerine ve konsantrasyonlarına göre ayarlanır. Uzunluğu 18-30 baz ve G/C oranı yaklaşık olarak %50 olan primerlerin kullanıldığı bir reaksiyonda 55°C'de 1 dakika süreli bir bağlanma basamağı başlangıç için yeterli olmaktadır. Bazen 1-2°C'lik bir fark bile non-spesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına yol açabilmektedir. Eğer bağlanma sıcaklığı 60°C'ın üzerinde ise bağlanma ve uzama basamakları birleştirilerek tek basamakta gerçekleştirilebilir [8].

***Üçüncü basamak***

Ekstansiyon (zincir uzaması) basamağıdır. Bu basamakta reaksiyon karışımı genel olarak 68-73°C'ye ısıtılır, böylece DNA polimerazın yeni zincir sentezini katalize edebilmesi için uygun sıcaklık ortamı sağlanmış olur. Deoksinükleotid trifosfatlar DNA polimerazın katalize ettiği bir reaksiyonla kalıp DNA'ya bağlı durumdaki primerlerin serbest 3' hidroksil uçlarına eklenirler. Yeni zincir kalıp DNA üzerinde 3'→5' yönünde saniyede yaklaşık olarak (kullanılan enzime göre değişmek üzere) 35-100 baz uzar ve böylece çift zincirli yeni moleküller üretilmiş olur [1,4,11]. Bir dakikalık zincir uzama süresi 2 kb uzunluğunda bir

ürün elde etmek için genellikle yeterli olmaktadır. Kalıp DNA kopya sayısının düşük olduğu ilk basamaklarda ve kalıp DNA konsantrasyonunun enzim konsantrasyonuna göre çok fazla olduğu son döngülerde uzama sürelerinin uzun tutulması (3 dakika gibi) faydalı olabilir [8].



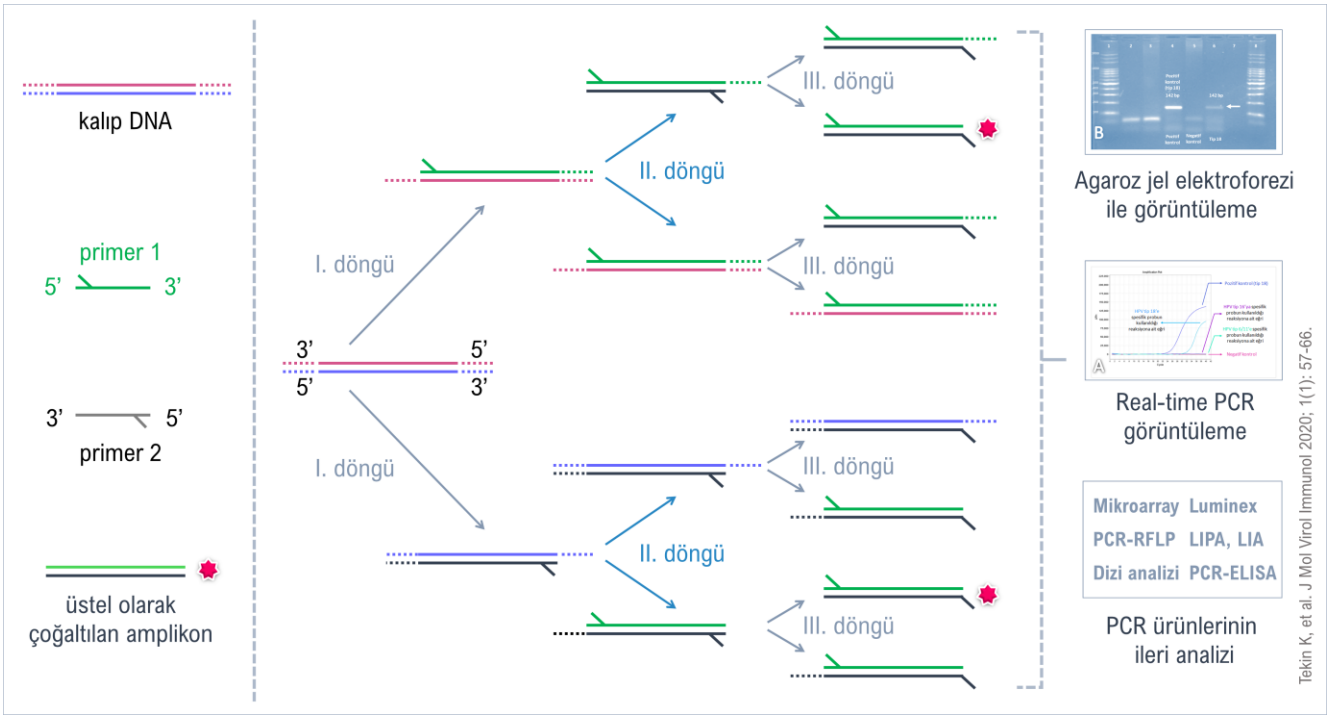

**Şekil 2.** Örnek bir PCR döngüsü ve reaksiyon basamakları [6,9,12-15].

Rampa zamanı, ısı döngü (termal cycler) cihazının sıcaklığı artırma ve azaltma hızını (°C/sn) ifade eder. Hızları 1-20°C/sn aralıklarında değişebilen çeşitli cihazlar bulunmaktadır. PCR optimizasyonu için çeşitli parametrelerin araştırıldığı bir çalışmada [16] rampa zamanı 8°C/sn olan SmartCyclerR cihazı ile HSV-1 ve 2 için geliştirilmiş bir PCR protokolü için rampa zamanı 4°C/sn'ye düşürülünce daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Bu parametre ısı döngü cihazlarında kolayca konfigüre edilebilmektedir [15]. Rampa zamanının kısa tutulması hem zaman kaybını azaltır hem de nonspesifik bağlanmalar gibi hataların oluşmasını önler. Döngüsel reaksiyonlar devam ederken istenilen uzunluktaki ilk beklenen PCR ürününü, ilk döngüde birinci primerin hedef DNA'ya bağlanmasıyla oluşan yeni iplikçik üzerine ikinci döngüde diğer primerin bağlanması ve zincir uzamasının tamamlanmasıyla oluşur [1]. İkinci döngü sonunda oluşan PCR ürününün sadece tek zinciri istenen uzunluktadır. İstenilen büyüklükteki ilk çift zincirli ürünler ise üçüncü döngü tamamlandığında ortaya çıkar (Şekil 3).

Her bir PCR döngüsünde çoğaltılan hedef DNA sayısının teorik olarak iki katına çıkması beklenir. Bir başka deyişle reaksiyon verimliliği %100 olduğunda reaksiyonun başlangıcında var olan her kalıp DNA molekülünden PCR'ın 20. döngüsünden sonra $2^{20}$ (yaklaşık olarak $10^6$) yeni iplikçik oluşması beklenir. Ancak, sürecin verimliliği hiçbir zaman %100 olmaz ve genellikle istenilen miktarda ürün elde etmek için daha çok reaksiyon döngüsüne gereksinim duyulur. Başlangıç hedef konsantrasyonu ve uygulama şekline bağlı olarak değişmekle beraber, hedef DNA bölgesini amplifiye etmek için döngü bahsi geçen sıcaklıklarda genellikle 25-35 kez tekrarlanır [1].

Gerekli döngü sayısı temel olarak kalıp DNA kopya sayısına bağlıdır ve bu miktar göz önüne alınarak ayarlanmalıdır. Pratik bir kural olarak etidyum bromid ile boyalı bir jelde görünür bir sinyal oluşturan $10^5$ hedef kopya sayısına ulaşmak için 25 PCR döngüsüne ihtiyaç duyulur.

Genellikle 25-35 döngü ile istenilen miktarda PCR ürünü elde edilmekle beraber, kalıp DNA kopya sayısı az ise döngü sayısı 40'a çıkarılabilir. Bir başka ifadeyle, tahminen $10^4$, $10^3$ ve $10^2$ kalıp DNA kopya sayısına sahip örnekler için sırasıyla 30, 35 ve 40 PCR döngüsünün gerekeceğini söyleyebiliriz [8].




**Şekil 3.** Zincir uzarken DNA sentezi diğer uçtaki primer bölgesini geçince (polimerazın sentezi ne kadar devam ettireceği kesin olarak belli değildir ve enzimden enzime değişiklik gösterir) uzunlukları kesin olarak belli olmayan ve hedeflenen sekansa göre daha büyük olan "**uzun ürünler**" oluşur. Bir sonraki döngüde asıl kalıp DNA ile beraber bu uzun ürünler de primerlerin bağlanabileceği yeni kalıplar olarak görev alırlar. Her döngü sonunda uzun ürünlerin kopya sayısı aritmetik olarak artarken kısa ürünlerinin sayısı logaritmik (üstel) bir artış gösterir [8,12,17,18].

Tüm bu işlemler ısıyı hızla değiştirebilen ve önceden belirlenmiş bir zaman için tüpleri istenilen sıcaklıkta tutabilen programlanabilir ısı döngü cihazları kullanılarak yapılır. Isı döngü cihazları kullanıma girmeden önce, belirlenen sıcaklıklarda üç su banyosu hazırlanır ve PCR reaksiyon-tüpleri sıcak su banyoları arasında elle taşınır ve bu durum birçok zorluğu beraberinde getirirdi. Bu nedenle yeni geliştirilen otomatize sistemlerin kazandırdığı kolaylıklar, PCR'ın yaygın olarak kullanılabilir olmasındaki en önemli ilerlemelerden biri olmuştur. Diğer bir önemli ilerleme de yöntemin tanımlandığı ilk zamanlar kullanılan ve her denatürasyon basamağında yapısı bozulduğu için reaksiyona yeniden eklenen ve aşırı miktarlarda denatüre enzim moleküllerinin birikimi nedeniyle reaksiyon dengesini olumsuz etkileyen ve ayrıca her ekleme sırasında reaksiyon tüpünün açılması nedeniyle kontaminasyon riskini arttıran Klenow polimerazların yerine PCR döngülerindeki yüksek sıcaklıklarda inaktive olmayan termostabil DNA polimerazların (*Taq* DNA polimeraz gibi) kullanılmaya başlanması olmuştur. Buna ek olarak reaksiyonun uzama basamağının yüksek sıcaklıklarda yürütülmesinin reaksiyon özgüllüğünü arttırıcı ek yararları da vardır. Mesela, Klenow polimerazın en iyi çalıştığı 37°C gibi düşük sıcaklıklarda, primerler nonspesifik eşleşmeler gösterebilirler ve bu da testin spesifitesinde düşmeye neden olur. Termostabil DNA polimerazların ısı döngü cihazlarında kullanılmasıyla reaksiyonlar tamamen kapalı bir sistem içerisinde gerçekleştirilmiş ve PCR'ın en önemli dezavantajı olan kontaminasyon sorunu büyük ölçüde aşılmıştır [1,15].

### PCR'da Reaksiyon Karışımı

Tipik bir PCR reaksiyon karışımı DNA polimeraz, spesifik olarak dizayn edilmiş bir primer seti, kalıp DNA, dNTP'ler ve bir reaksiyon tamponundan (Tris-HCl, KCl ve $Mg^{++}$) oluşur. Reaksiyon karışımının içeriği seçilen enzim, hedef DNA sekansının baz içeriği ve uzunluğu, PCR kolaylaştırıcılarının kullanılıp kullanılmaması ve inhibitör maddelerin varlığı gibi reaksiyon

spesifitesini etkileyebilen faktörlere göre optimize edilmelidir.

Ayrıca karışıma EDTA, BSA (sığır serum albümini-bovine serum albumin) ve bazı deterjanlar (Tween 20 ve Triton X) gibi ilave maddelerin eklenmesiyle bazı enzimler için inhibitör etkili maddeler elimine edilebilir, primer bağlanmasının spesifitesi arttırılabilir ve enzim aktiviteleri maksimum düzeylere çıkarılabilir [4,5,15].

**Tablo 1.** Örnek bir PCR karışımının bileşenleri (total hacim 50 µl) [4,6,13-15,19].

| Bileşen | Final miktar-konsantrasyon |
|---|---|
| Kalıp DNA | 10 fg - 10 µg* |
| Oligonükleotid primerler (her birinden) | 0.1 - 1 µM |
| dNTP'ler (her birinden) | 20 - 200 µM |
| *Taq* polimeraz | 0.2 – 2.0 ünite** |
| Tris-Cl (pH 8.3) | 10 mM |
| KCl | 50 mM |
| BSA veya jelatin | 100 - 1000 µg |
| $MgCl_2$ | 0.5 - 5 mM (genelde 1.5 – 2.5) |
| PCR kolaylaştırıcıları | Reaksiyon protokolüne göre değişir |
| Su | 50 µl'ye tamamlanır |

*1-10 µl rehidrasyon tamponu veya su içerisinde.
** Çeşitli termostabil polimerazların farklı özelliklerine göre miktar değişebilir.

Konvansiyonel PCR genel olarak 5-100 µl'lik bir volümde gerçekleştirilir. Bununla beraber, nanoteknolojinin gelişimi ile PCR reaksiyonlarını minyatürleştirme eğilimi ortaya çıkmış ve PCR reaksiyonunun mikro kuyucuklarda başarıyla yapılabildiği bildirilmiştir [8,15,20]. PCR reaksiyonu için ilk olarak ana (master) miks hazırlanır. Ana miks PCR reaksiyonunun kalıp DNA dışındaki diğer tüm komponentlerini içeren karışımdır ve tek tüp içerisinde hazırlanıp homojenize edildikten sonra numaralandırılmış tüplere dağıtılır. Daha sonra bu tüplere, kalıp DNA-RNA içeren (veya varlığı araştırılan) örnekler ayrı ayrı eklenir. Ana miks hazırlanmasının mantığı tüm reaksiyon tüplerindeki karışımın aynı olmasını sağlamaktır. Böylece bir cihazda aynı anda çalışılan tüpler arasında reaksiyonun tek değişken komponentinin araştırılan örnek olması sağlanır. Ayrıca tekrarlayan pipetaja bağlı kontaminasyon riski de en aza indirgenmiş olur [4].

### *DNA polimerazlar*

PCR reaksiyonlarında genellikle *Taq* polimeraz tercih edilir ve reaksiyon başına 0.2–2.0 ünite kullanılabilir. Diğer ticari termostabil polimerazlar da kullanılabilir, fakat proofreading (düzeltme) kabiliyetleri ve diğer özellikleri ayrıca değerlendirilmelidir [15]. Örneğin, genel olarak 50 µl'lik bir PCR karışımı için 1-1.5 ünite *Taq* DNA polimeraz gerekirken, 1.25-2.5 ünite *Pfu* DNA polimeraz gerekmektedir [10].

### *Reaksiyon tamponu*

PCR tampon sistemleri, en uygun primer/kalıp DNA hibridizasyonuna (optimum özgüllük) ve aynı anda termostabil DNA polimerazın optimum amplifikasyon aktivitesine (optimal hassasiyet) imkan vermelidir. Termostabil DNA polimeraz aktivitesinin en yüksek verimlilikte devamı için, enzime uygun pH koşullarının geniş bir sıcaklık aralığında korunması ve PCR termal-döngüsü ilerledikçe reaksiyon karışımında meydana gelen büyük değişikliklerden (mevcut dNTP konsantrasyonu gibi) etkilenmemesi gerekir. Birçok termostabil DNA polimeraz kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analizler basit tris-HCl tampon sisteminin en iyi performansı gösterdiğini ve gliserin/NaOH sistemlerinin ikinci en iyi seçenek olduğunu ortaya koymuştur. Fosfat tamponları zayıf performanslıdır, çünkü fosfat iyonları ile PCR

karışımında bulunan fosforlu bileşikler arasında (primerler ve dNTP) herhangi bir olumsuz fiziksel etkileşim meydana gelmesi büyük bir olasılıktır ve fosfat iyonları magnezyum iyonları ile şelat oluşturabilir ve sonuçta termostabil DNA polimeraz inhibe olabilir. Öncelikli tercih edilse de, tris-HCI ısı değişikliklerine oldukça hassas olma eğilimindedir, her 5°C sıcaklık artışı ile birlikte tampon pH'sında 0.1 birim bir azalma meydana gelir. Bu nedenle, tris-HCl PCR tamponları oda ısısı derecesinde 8.4'lük bir pH sergilemek için formüle edilmiştir, bu 74°C'de (termostabil DNA polimerazların çoğu için optimum DNA amplifikasyon sıcaklığı) PCR karışımı pH'sının yaklaşık olarak 7.4 (termostabil DNA polimerazların çoğu için optimum pH) olabileceği anlamına gelmektedir [19].

PCR tamponları genel olarak Tris, KCl ve $MgCl_2$ içerirler. Tris; Tris-HCl, TE (Tris-EDTA), TAE (Tris-asetat-EDTA) ve TBE (Tris-Borat-EDTA) şeklinde farklı kombinasyonlar halinde kullanılabilmektedir. Tris-HCl (pH 8.3-8.4) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde kullanılır. *Örnek bir reaksiyon karışımı hazırlama*: 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ içeren 10X konsantre tampon önce sulandırılarak 2X konsantrasyonda tampon elde edilir. PCR karışımında final konsantrasyonları 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$ olacak şekilde ayarlanacaksa 25 µl'lik bir PCR karışımı için 2X konsantre karışımdan 12.5 µl alınır [15,19,21].

Sodyum ($Na^+$), potasyum ($K^+$) ve amonyum ($NH_4^+$) iyonları (tek değerli katyonlar) PCR karışımında bulunduklarında DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgasını kaplayarak primer ve hedef DNA arasındaki itici elektrik güçleri zayıflatır ve böylece termostabil DNA polimeraz aktivitesini uyarırlar. $K^+$'un DNA polimeraz aktivitesini uyardığı optimum konsantrasyon değeri yaklaşık 50 mM'dır. $K^+$ konsantrasyonu 75 mM'ın üzerine çıktığında DNA polimerazı stimüle edici etkisi ortadan kalkar ve 100 mM'ın üzerinde ise DNA polimerazı inhibe eder. Büyük amplikonlar çoğaltılmak istendiğinde (>1000 bp) düşük, küçük amplikonlar çoğaltılmak istendiğinde ise yüksek $K^+$ konsantrasyonları ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. $NH_4^+$ iyonları ise DNA iplikleri arasındaki hidrojen bağları için primerlerle yarışırlar ve böylece hedef DNA hibridizasyonu daha yüksek bağlanma sıcaklıklarında gerçekleşebilir. Bu durum, yanlış eşleşmeleri ve nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşmasını azaltır. Bazı durumlarda PCR karışımında potasyum ve amonyum iyon konsantrasyonları optimum oranda olduğunda magnezyum konsantrasyonun optimizasyonuna gerek kalmayabilmektedir [19].

$Mg^{++}$ DNA polimerazın kofaktörüdür ve reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu polimerizasyonun başarılı olabilmesi için kritik öneme sahiptir. Farklı PCR protokolleri için optimal magnezyum iyon konsantrasyonları arasındaki farklılıklar, farklı termostabil DNA polimerazların kullanılmasına ve/veya magnezyum iyonlarını ayıran ya da yarışmalı etki gösteren kimyasal maddelerin (örneğin, EDTA ve kalsiyum iyonları) varlığına bağlı olabilir. $MgCl_2$ son konsantrasyonu 0.5-5.0 mM (en sık 1.5-2.5 mM) aralığında olacak şekilde, magnezyum klorid tuz solüsyonundan hazırlanarak kullanılır. Bu değer farklı reaksiyonlar için genellikle dNTP konsantrasyonu ile kombine olarak optimize edilir [15,19]. Farklı primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma etkinlikleri $Mg^{+2}$ konsantrasyonuna bağımlı olarak değişir. $Mg^{++}$ konsantrasyonu ne kadar yüksekse primerler kalıp DNA'ya o kadar kolay bağlanırlar. Bu nedenle farklı primerlerin kullanıldığı her PCR testi için serbest $Mg^{++}$'un optimum konsantrasyonu değişmektedir. Bu durum kullanıcılar tarafından bilinmeli ve reaksiyon koşulları buna göre düzenlenmelidir [4]. Yüksek konsantrasyonlardaki $Mg^{++}$ DNA'yı daha stabil hale getirerek çift zincirli yapının yetersiz ayrışmasına yol açar ve PCR'ı inhibe eder. Genel olarak aşırı miktardaki $Mg^{++}$ primer-kalıp DNA yanlış eşleşmelerini arttırarak nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin sentezine ve birikmesine neden olurken, yetersiz miktarda $Mg^{++}$ polimeraz aktivitesinin düşük olmasına ve amplifikasyonun çok zayıf veya hiç olmamasına yol açar. Bunun dışında termostabil DNA polimeraz aktivitesi yüksek $Mg^{++}$ konsantrasyonları ile doğrudan inhibe olur, 10 mM'lık $Mg^{++}$ konsantrasyonun polimeraz aktivitesini %50 azalttığı gösterilmiştir. Son olarak yüksek $Mg^{++}$ konsantrasyonları DNA polimerazın hatalı zincir sentez oranını arttırmaktadır [4,19].

Günümüzde termostabil enzim üreticilerinin hazır olarak sunduğu spesifik tamponlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tamponların Tris, KCl ve $MgCl_2$'ün üçünü bir arada içerebilenleri olduğu gibi, $MgCl_2$ tampondan ayrı olarak da sunulabilmektedir [15]. Tamponun içeriğine göre her birinin son konsantrasyonları reaksiyon koşullarına uygun olarak ayarlanmalıdır. Örneğin; $MgCl_2$ standart reaksiyonlarda KCl'li *Taq* buffer ile 1.5 mM ve $(NH_4)_2SO_4$'lı *Taq* buffer ile 2.0 mM konsantrasyonda kullanılır [10].

### *Oligonükleotid primerler*

PCR reaksiyonu primerlerin geniş konsantrasyon aralığında (0.1-1 µM) başarılı olarak çalışabilmektedir. Genel olarak 0.4 µM'lık bir konsantrasyon (10 pmol/25 µl) optimizasyon için iyi bir başlangıç noktasıdır. Ancak, hedef bölgenin uzun olduğu veya dejenere primerlerin kullanıldığı reaksiyonlarda optimizasyon için en az 0.5 µM'lık değerden başlanmalıdır. İşlemlerin kolaylaştırılması amacıyla çalışma öncesi her primerin aynı konsantrasyonda seyreltilerek (örneğin; 50 veya 100 pmol/µl) stoklanması önerilmektedir [8,10,15].

### *Deoksinükleotid-trifosfatlar*

Deoksinükleotid-trifosfat (dNTP)'ler nükleik asit moleküllerinin ana yapı taşlarıdır ve yeni zincir sentezi için PCR karışımında bulunması zorunlu öğelerden biridir. DNA dizisinin yapısında birbirinden ayrı dört dNTP yer alır; deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksitimidin trifosfat (dTTP), deoksisitozin trifosfat (dCTP) ve deoksiguanozin trifosfat (dATP). dNTP konsantrasyonu PCR reaksiyonunun verimliliğini ve spesifitesini etkiler. Standart bir konvansiyonel PCR reaksiyonunda dNTP'lerin her biri genellikle eşit miktarlarda olmak üzere 20-200 µM konsantrasyonda kullanılır. dNTP konsantrasyonu çoğaltılacak amplikon uzunluğuna ve baz içeriğine göre ayarlanabilir. Ticari formdaki dNTP'ler her nükleotid için 2, 10 veya 25 mM'lık hazır formlarda sunulmaktadır. dNTP'ler serbest $Mg^{++}$'a 1:1 molar oranda bağlandıklarından çok yüksek konsantrasyonda olduklarında ortamdaki serbest $Mg^{++}$ oranının düşmesine ve DNA polimerazın hatalı zincir sentezi yapmasına neden olabilirler [4,8,10,15,19].

Bazı PCR uygulamaları ve protokollerinde, dört dNTP'den birinin yerine bir dNTP analoğu (örn., inozin, 7-deaza-2'-deoksiguanozin) ya da modifiye edilmiş bir dNTP (örn., biotin, fluorofor veya radyoaktif işaretli dNTP) kullanılabilir. Bu tür modifikasyonlar, daha sonraki bazı post-PCR uygulamalarının gerçekleştirilebilmesine imkan verir [19].

### *Kalıp DNA*

Ekstraktsiyon ile elde edilen veya reverse transkripsiyon ile RNA'dan dönüştürülen DNA'nın 10 fg ila 10 µg'lık miktarı 1–10 µl tampon veya su içinde rehidrate edilerek kalıp DNA olarak kullanılabilir. Genel olarak 50 µl reaksiyon karışım hacmi için optimal kalıp DNA; plazmid ve faj DNA'sı için 0.01-1 ng, bakteriyel DNA için 1-10 ng, genomik DNA için 0.1-1 µg aralığında olmalıdır. Bu değerlerin üzerindeki miktarlarda nonspesifik ürün oluşma riski artmaktadır [10,15].

### *PCR kolaylaştırıcıları*

Çeşitli proteinler ve kimyasallar PCR'da amplifikasyon etkinliğini arttırmak için isteğe bağlı olarak reaksiyon karışımına eklenebilir [22]. Çoğu PCR tamponu termostabil DNA polimerazın reaksiyon karışımı içerisinde stabilizasyonuna yardım eden Jelatin veya BSA gibi proteinöz bir bileşen içerir. Jelatin veya BSA reaksiyon karışımına her ml için 100-1000 µg eklenebilir. PCR reaksiyonlarında kullanılabilen bir başka protein olan gp32 (gene 32 protein) ise tek zincirli DNA'ya bağlanarak DNA yapısının stabil olmasını sağlar ve reaksiyon verimliliğini arttırır. gp32 0.5-10 nM konsantrasyonlarda kullanıldığında hedeflenen bölgenin çok uzun olduğu reaksiyonlarda PCR'ı stimüle eder [19].

PCR kolaylaştırıcısı olarak organik solventler de kullanılır. En sık kullanılanlar dimetil sülfoksit (DMSO) ve formamid'dir. DMSO primer-kalıp yanlış eşleşmelerini önlemeye yardımcı olmak amacıyla, konsantrasyonu % 2-10 (hacim/hacim) olacak şekilde PCR tamponuna dahil edilebilir. Formamid hatalı baz eşleşmelerini engelleyerek non-spesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşumunu azaltır ve PCR tamponu içinde %2-5 (hacim/hacim) konsantrasyonlarda kullanılabilir [23].

Dithiothreitol (DTT) güçlü bir indirgeyici ajandır. Termostabil DNA polimerazın aktif konformasyonel yapısının korunmasına yardım eder ve *Taq* DNA polimeraz için 5 mM konsantrasyonlarda kullanılabilir [19].

Bunların dışında non iyonik deterjanlardan Tween 20, Triton-X ve Laureth-12, polimerik yapılı bileşiklerden polietilen glikol (PEG) ve dekstran, biyolojik uyumlu (geçimli) çözeltilerden betain ve gliserol, ayrıca α-2-Macroglobulin, pirofosfataz, amonyum sülfat veya spermidin, amplifikasyon kolaylaştırıcısı olarak PCR tamponlarına eklenebilecek diğer maddelerdir. Ancak yine de PCR karışımına bu maddelerden hangilerinin eklenmesi gerektiği konusunda bir fikir birliği yoktur. Farklı termostabil DNA polimerazlar için farklı ve bazen olumsuz etkiler gösterebilirler. Bu katkı maddelerinin kullanıldığı tüm PCR protokolleri için dNTP ve $Mg^{++}$ konsantrasyonları ayrıca optimize edilmelidir [19,23].

***Karışımda kontaminasyon kontrolü***

Nakil (carry-over) kontaminasyonun (reaksiyon karışımının önceki çalışmalarda çoğaltılan amplikonlarla kontamine olması) kontrolü için kullanılan uygulamalardan biri, PCR karışımı içerisine urasil içeren çift zincirli DNA'yı parçalayan bir DNA tamir enzimi olan urasil-N-glikozilaz (UNG)'nin eklenmesidir. Ana miks içine dTTP yerine dUTP katıldığında UNG doğal DNA'nın veya primerlerin yapısını bozmaz, ancak içeriğinde dUTP bulunan kontamine ürünleri oda ısısında kısa sürede parçalar. Reaksiyon öncesi ısı 95°C'ye yükseltildiği ve enzim denatüre olduğu için yeni sentezlenen moleküller bu enzimden etkilenmezler [4,10]

**PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi ve Analizi**

PCR ürünleri etidyum bromid ve SYBR green gibi çeşitli boyalarla boyanarak, ya da radyoaktif (32p veya aSS) veya nonradyoaktif maddelerle (biyotin ve digoksigenin gibi) işaretlenerek agaroz jel elektroforezi veya poliakrilamid jel elektroforezi ile görüntülenebilir. Amplikonlar reaksiyon sırasında floresan boya (SYBR green), çift işaretli probların hidrolizi (TaqMan), hibridizasyon probları (LightCycler), moleküler fenerler (beacons), peptid nükleik asit (PNA) probları, kilitli nükleik asit (LNA) primer ve probları, TaqMan küçük oluk bağlayıcı (MGB) problar ve akrep probların (scorpions) kullanılmasıyla gerçek zamanlı (real-time) olarak da saptanabilir. Bunların dışında enzimatik sinyal algılama (örn., ELISA ve flow sitometri), line probe assay (Lipa), mikroarray, dizi analizi (örn., pirosekanslama), kütle spektrometresi (MS) ve benzeri birçok yöntem PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve analizinde kullanılmaktadır [15,24,25].

**Çıkar beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. **Finansal Destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

## Kaynaklar

**1.** McPherson MJ, Moller SG, An introduction to PCR (Chapter 1). In: McPherson MJ, Moller SG (eds), PCR: The Basics. 2000, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK. pp:1-7.

**2.** van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. A Brief Comparison Between In Vivo DNA Replication and In Vitro PCR Amplification (Chapter 2). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:9-15.

**3.** Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-50. [Crossref]

**4.** Lübeck PS, Hoorfar J. PCR Technology and Applications to Zoonotic Food-Borne Bacterial Pathogens. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp:65-86.

**5.** Sachse K. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp:3-29.

**6.** Rio DC. Reverse transcription-polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc. 2014; 2014(11): 1207-16. [Crossref]

**7.** Chang D, Tram K, Li B, Feng Q, Shen Z, Lee CH, et al. Detection of DNA Amplicons of Polymerase Chain Reaction Using Litmus Test. Sci Rep 2017; 7(1): 3110. [Crossref]

**8.** Chan KC, Lo YM. Introduction to the Polymerase Chain Reaction. In: Lo YM, Chiu RW, Chan KC (eds),

Clinical Applications of PCR (2nd edition). 2006, Humana Press, Totowa, New Jersey. pp:1-10.

**9.** van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. The Polymerase Chain Reaction (Chapter 1). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:1-7.

**10.** Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. Troubleshooting Guide for PCR. Available at: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-troubleshooting.html [Accessed November 18, 2019].

**11.** Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: Bartlett JMS, Stirling D (eds), Methods in Molecular Biology 226, PCR Protocols (2nd edition). 2003, Humana Press, Totowa. pp:89-99.

**12.** Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Front Microbiol 2017; 8: 108. [Crossref]

**13.** Şahiner F, Kubar A, Yapar M, Şener K, Dede M, Gümral R. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. J Microbiol Methods 2014; 97: 44-50. [Crossref]

**14.** Şahiner F, Gümral R, Yıldızoğlu Ü, Babayiğit MA, Durmaz A, Yiğit N, Saraçlı MA, Kubar A. Coexistence of Epstein–Barr virus and Parvovirus B19 in tonsillar tissue samples: Quantitative measurement by real-time PCR. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2014; 78(8): 1288-93. [Crossref]

**15.** van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. The PCR in Practice (Chapter 3). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:17-24.

**16.** Bentley HA, Belloni DR, Tsongalis GJ. Parameters involved in the conversion of real-time PCR assays from the ABI prism 7700 to the Cepheid SmartCycler II. Clin Biochem 2005; 38(2): 183-6. [Crossref]

**17.** Quan PL, Martin Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. Sensors (Basel) 2018; 18(4): 1271. [Crossref]

**18.** Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. Troubleshooting Guide for PCR. Available at: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html [Accessed November 18, 2019].

**19.** van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Deoxynucleotide Triphosphates and Buffer Components (Chapter 6). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:91-102.

**20.** Nagai H, Murakami Y, Morita Y, Yokoyama K, Tamiya E. Development of a microchamber array for picoliter PCR. Anal Chem 2001; 73(5): 1043-7. [Crossref]

**21.** Brody JR, Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal Biochem 2004; 333(1): 1-13. [Crossref]

**22.** Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol 1996; 62(3): 1102-6.

**23.** Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Löfström C. Pre-PCR Processing of Samples. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp:31-50.

**24.** Jenkins FJ. Basic methods for the detection of PCR products. PCR Methods Appl 1994; 3(5): S77-82. [Crossref]

**25.** Liu D. Chapter 1: Introductory Remarks. In: Liu D (ed), Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. 2011, CRC press, USA. pp:1-12.