

4 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) VE PCR KLONLAMA

4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Uygulamaları

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR=Polymerase Chain Reaction) in vitro'da özel bir DNA dizisini (molekülünü) büyük miktarlarda çoğaltmak (amplifikasyon) için etkili bir işlemdir. Bir DNA dizisini bir milyar katı kadar çoğaltabilen bu işlem üç aşamalı devirsel bir süreçtir. PCR reaksiyonları için ana gereklilikler şunlardır:

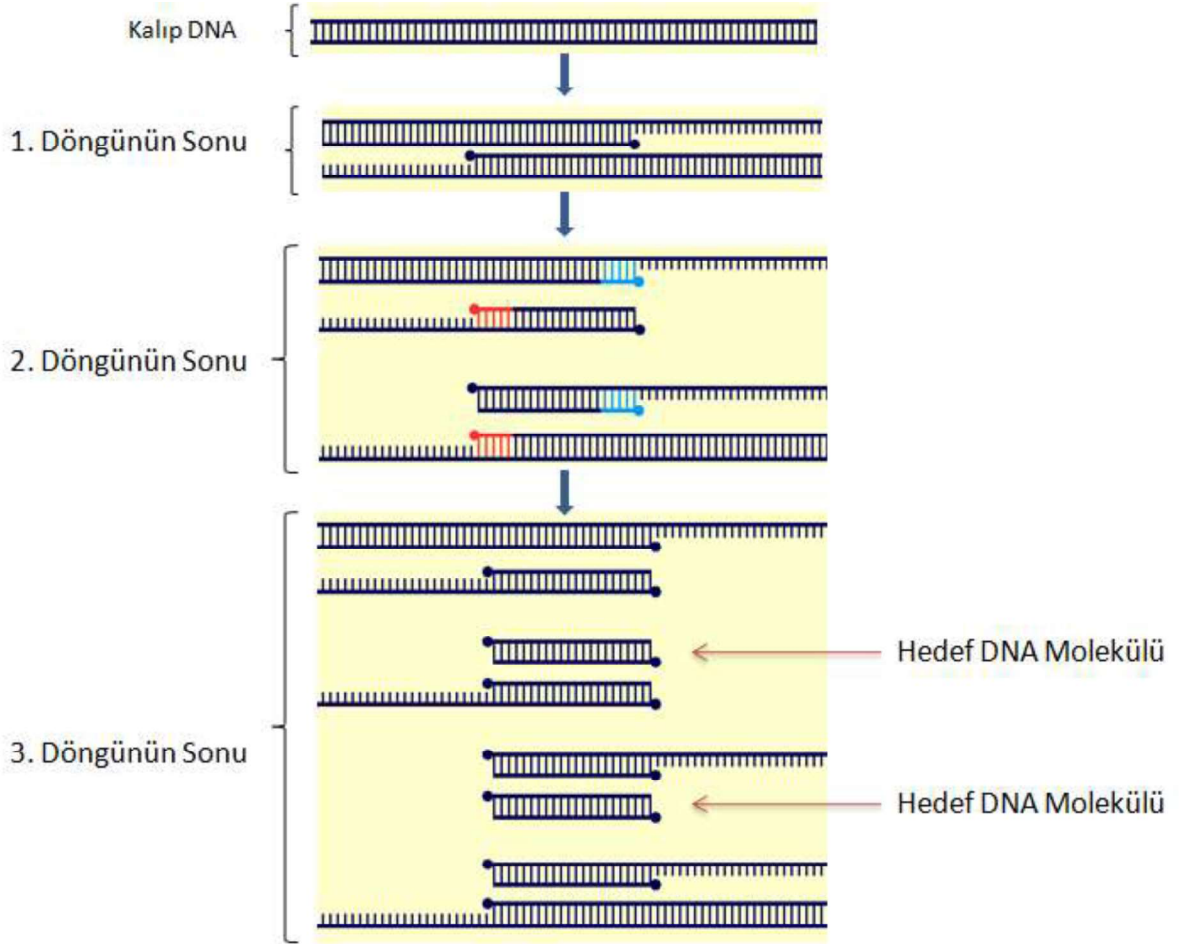
1. Yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda iki adet sentetik oligonükleotit. Bu oligonükleotitler primer olarak iş görürler ve çoğaltılması istenilen hedef DNA zincirinin her iki ucu ile 5'-3' yönünde homolog olmalı ve bir 3'-OH grubu sağlamalıdır (Şekil 4.1). Homolog primer üretmek için ve dolayısıyla bir PCR reaksiyonunu gerçekleştirebilmek için hedef DNA'nın, primerin bağlanacağı bölgesinin baz dizisi bilinmelidir.
2. 100 ila 5 000 bp uzunluğunda olan ve primerlerin bağlanabildiği bir DNA örneği, kalıp DNA (saf veya karışık halde).
3. 95°C ve daha yüksek sıcaklıklarda stabil (aktif) kalabilen bir DNA polimeraz.
4. Dört deoksiribonükleotitler (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP).

Bir DNA molekülünün amplifikasyonu için tipik bir PCR işlemi 30 civarında döngü sonucu gerçekleştirilebilir. Her döngü üç aşamadan meydana gelir.

1. **Denaturasyon:** PCR amplifikasyon sisteminde ilk basamak bir reaksiyon tüpü içinde sıcaklığı 95°C'ye yükselterek DNA'yı denatüre etmektir (Şekil 4.2a). Kaynak (hedef) DNA'ya ilave olarak bu tüp büyük sayıda, primer olarak adlandırılan oligonükleotit, sıcaklık dirençli bir DNA polimeraz (yüksek sıcaklıklara sahip su kaynaklarında yaşamaya uyum sağlamış *Thermus aquaticus*'tan elde edilmiş *Taq* DNA polimeraz gibi) ve dört deoksiribonükleotiti içerir.
2. **Renaturasyon (hibridizasyon, annealing):** İkinci aşamada karışımın sıcaklığı yavaşça 55°C'ye indirilir. Bu basamakta primerler kaynak DNA'daki homolog bölgeye bağlanır.
3. **Sentez:** Üçüncü basamakta sıklıkla *Taq* DNA polimeraz için optimum olan ~75°C'ye çıkarılır. DNA sentezi her bir primerin 3'-OH ucundan itibaren başlar.

İlk döngü sonunda test tüpünde orijinal DNA zincirleri ve bu orijinal DNA'nın primerin bağlandığı bölgesinden başlayarak üretilen "uzun kalıp" DNA zincirleri vardır. İkinci döngü sonunda kaynak DNA (orijinal DNA) uzun kalıp DNA ve kısa kalıp DNA

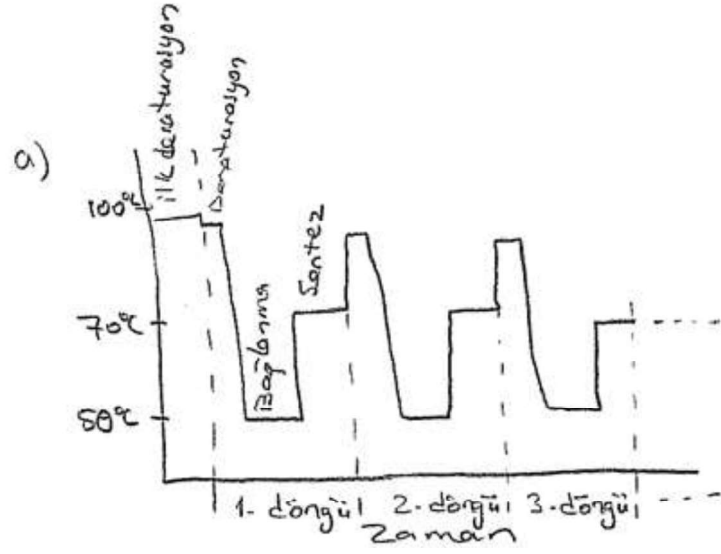
mevcuttur (Şekil 4.1). Kısa kalıp DNA zincirleri uzun kalıp DNA'lar üzerinden üretilmiştir. Üretilen bütün zincirler yeni bir döngüde kalıp işi görür. Dolayısıyla döngü sayısı arttıkça kısa kalıp DNA moleküllerinin (iki primer arasındaki bölge) sayısı logaritmik olarak artar ve 13. döngüden sonra bu kısa zincirler diğer zincirlerden (orijinal DNA ve uzun kalıp DNA zincirlerinden) bir milyon kat daha fazla sayıya ulaşır (Şekil 4.2b).



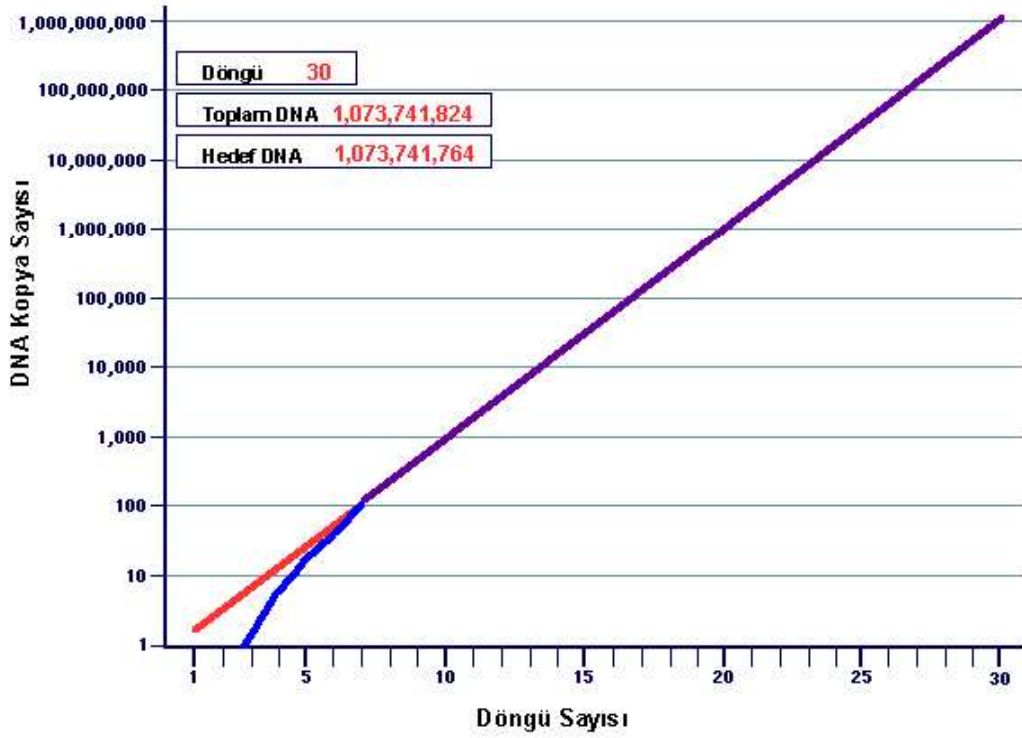
Şekil 4.1: PCR ile bir kaynak DNA'nın primerler arasındaki hedef bölgesinin amplifikasyonu.

PCR bilimsel, tıbbi ve rekombinant DNA işlemlerinde sağladığı kolaylıklardan dolayı biyoteknolojik amaçlarla çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

PCR bilinen bir DNA dizisinin karışık bir numune içerisinde mevcudiyetinin belirlenmesinde etkili bir işlemdir. Bu işlem sırasında hedef DNA'nın saflaştırılmasına ihtiyaç yoktur. Bu nedenle PCR bir hastalığın belli bir virüs tarafından mı oluşturulduğunu belirlemede kullanılabilir. Eğer şüpheli virüsün DNA dizisi biliniyorsa araştırmacı bu diziden faydalanarak primerler tasarlayarak hasta dokuda bu DNA'nın (dolayısıyla virüsün) varlığını PCR amplifikasyonu ile belirleyebilir.



b)



Şekil 4.2: a) Bir PCR döngüsündeki sıcaklık değişimleri, b) PCR sırasında zamana bağlı ürün birikimi.

Ayrıca adli olaylarda, suçlunun kimliğinin belirlenmesinde de bu metot bir çok kolaylık sağlar. Bilindiği gibi, olay yerinde kalan doku kalıntılarında elde edilecek DNA'nın analizi ile suçluların bulunması, etkili bir yoldur. Ancak bu yolu sınırlayan faktör, kalıntı halindeki dokuların çok az olması ve yeterli DNA elde edilememesidir. PCR amplifikasyonu ile iz miktarda da olsa bir DNA örneği mevcutsa, bu tip analiz için yeterli miktarda DNA

üretilebilir. Sözelimi küçük bir kan izindeki lökosit hücreleri, küçük bir deri parçası veya bir sperm grubu gerekli DNA üretimi için yeterlidir.

Bilimsel amaçlar için PCR doğal olarak oluşmuş mutasyonların belirlenmesinde ve in vitro mutant üretiminde yaygın olarak kullanılır.

Bütün organizmaların özellikle yüksek organizmaların genomunda tekrarlayan diziler denilen DNA bölgeleri vardır ve bu bölgelerin nükleotit dizileri hemen hemen daima aynıdır. Dolayısıyla bu bölgenin nükleotit dizisinden faydalanılarak primerler üretilebilir ve bu bölgeler arasındaki DNA bölgeleri çok değişik amaçlarla analiz edilebilir. Primerlerin sağlanabildiği her durumda bir DNA bölgesi PCR amplifikasyonu ile çoğaltılabilir.

4.2 PCR Klonlama

Klonlanacak gen veya DNA bölgesinin nükleotit dizisi biliniyorsa PCR daha etkili ve kolay bir klonlama yöntemi sağlar. Klonlanmak istenen gen bölgesinin her iki tarafındaki bölgeler ile homolog, iki PCR primeri tasarlanarak sadece bu hedef bölge amplifiye edilebilir. Bu amplifikasyon ürünü, uygun bir vektöre bağlanarak elde edilen klonların taşıdığı DNA'nın doğru DNA olup olmadığı test edilir. Amplifiye edilen fragment karışımında, hemen hemen saf olarak bulunduğundan, elde edilen klonların hemen tamamı hedef DNA bölgesini taşıyor olmalıdır. Bu teknik bir gen kütüphanesi içinde nadir olarak mevcut olan, özel bir klonu aramaktan çok daha kolay ve etkilidir. Ancak bu yöntem için sınırlayıcı faktör, hedef DNA bölgesinin, en azından primerlerin bağlanacağı nükleotit dizisinin bilinmesi zorunluluğudur.

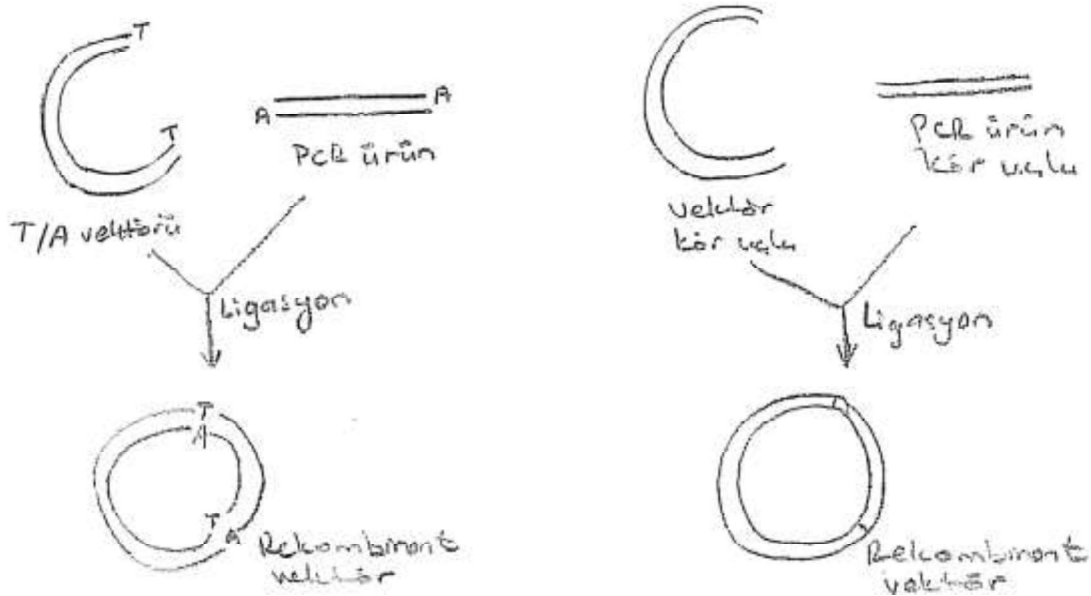
PCR amplifikasyonu ile hedef bölge amplifiye edilerek ürün elde edilir. Eğer istenmeyen bantlar varsa doğru ürün jel elektroforez ile saf olarak elde edilir. Bu ürün uygun bir klonlama vektörüne bağlanır. PCR klonlamada kullanılmak üzere farklı tip vektörler geliştirilmiştir. Bu vektörlerden bazıları klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Yani kesilerek 5' fosfat grupları koparılmıştır. Dolayısıyla PCR ürünü doğrudan bu vektörlere bağlanabilir. Temelde iki tip PCR klonlama vektörü vardır: T/A PCR klonlama vektörleri ve kör uç PCR klonlama vektörleri.

T/A PCR klonlama vektörleri kesilerek kör uçlu doğrusal hale getirilir, sonra zincirin her iki 3' ucuna birer adet T nükleotiti eklenir (Şekil 4.3). Bu vektörler *Taq* DNA polimeraz gibi bazı enzimler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin klonlanması için kullanılır. Bu enzimler ürünün her iki 3' ucuna birer adet A nükleotiti ekler. Dolayısıyla T/A vektörleri 1 bp'lik dahi olsa bir yapışkanlık sağlamaktadır. Ayrıca A ekleyen enzimlerle elde edilen ürünlerin kör uçlu vektörlere bağlanması için ilave bir A koparma işleminin yapılması

gerekmektedir. Bu işleme gerek kalmamasından dolayı da T/A vektörleri oldukça kullanışlıdır.

Taq DNA polimeraz gibi hızlı enzimler doğruluk kontrolü yapmazlar ve düşük bir oranda da olsa sentezde hata yapabilirler. Bu hatalar sonraki uygulamalarda sorunlara neden olabilir. Bu olumsuzluğun üstesinden gelmek üzere doğruluk kontrolü yapan sıcaklık dayanıklı polimerazlar kullanılır (*Pfu* DNA polimeraz, *Ventile* DNA polimeraz gibi). Bu polimerazlar, ürünlerin 5' ucuna herhangi bir nükleotit eklemesler, dolayısıyla da T/A vektörlerine bağlanamazlar. Kör uçlu PCR ürünlerini klonlamak üzere kesilerek kör uçlar oluşturulmuş vektörler kullanılır (Şekil 4.3).

Hangi vektör kullanılırsa kullanılsın sonuçta vektör ve hedef DNA moleküllerinin uçları kovalent olarak birbirlerine bağlanmalıdır. Bunun için genellikle DNA ligaz enzimi kullanılır ve moleküller kovalent olarak birleştirilir. Ancak bazen DNA ligaz yerine topozomeraz enzimleri de kullanılabilir. Bu enzim doğrusallaştırılmış vektörün uç kısmına kovalent olarak tutturulur. Hedef DNA molekülüyle karıştırıldıklarında, bu molekülü etkili bir şekilde vektöre bağlayarak kendileri ayrılırlar. Her nasıl olursa olsun, vektör ve hedef DNA birbirine bağlandıktan ve konak hücreye transferden sonra, restriksiyon endonükleaz, PCR ve Southern blot analizleriyle klonun doğruluğu araştırılır.



Şekil 4.3: T/A ve kör uçlu PCR klonlama vektörleri kullanılarak kör uçlu veya ucuna A eklenmiş bir PCR ürününün klonlanması.