

Ek PCR Reaktifleri Ne Yapar?

Her PCR reaksiyonunun sorunu aynıdır: Hedef DNA'nın çok az amplifikasyonuna rağmen hedef dışı DNA'ların daha fazla amplifikasyona uğraması. Ancak bazı ek reaktifler kullanarak PCR reaksiyonlarınızın sorununu çözebilirsiniz. Hangi PCR reaktifinin ne işe yaradığını ve sizin için en iyi koşulu belirleyebilmek sizin elinizdedir.

PCR ek reaktifleri genellikle aşağıdaki iki yoldan biri ile çalışır:

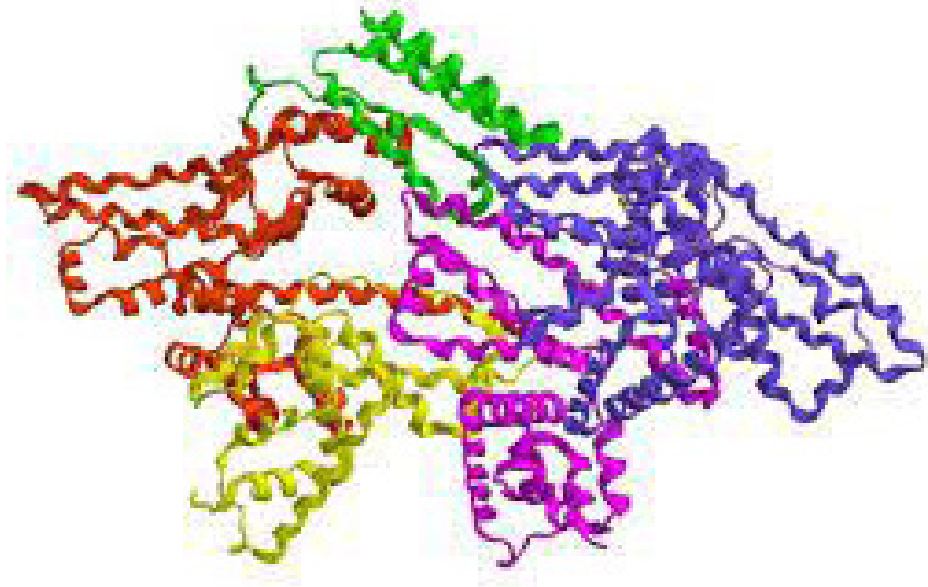
- 1 İkincil yapıları azaltıp hedef DNA'nın amplifikasyonunu arttırarak ↑
- 2 Spesifik olmayan bağlanmaları azaltıp hedef dışı DNA'ların amplifikasyonunu azaltarak ↓

• Magnezyum Etkisi

Polimeraz aktivitesi için Mg^{+2} gereklidir. Yeterli Mg^{+2} olmadığında taq polimeraz inaktif halde kalır. Doğru Mg^{+2} konsantrasyonu özgünlüğü arttırır. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu spesifik olmayan bağlanmaları arttırır.

• BSA

Sığır serum albümin, çeşitli moleküler biyoloji uygulamalarında, özellikle de restriksiyon enzim sindirimleri ve PCR'de yaygın olarak kullanılan bir ilavedir. PCR'de BSA, fenolik bileşikler gibi kirleticilerle mücadelede yardımcı olabilir. Ayrıca reaksiyon bileşenlerinin tüp duvarlarına yapışmasını önlediği de bildirilmektedir.



• Betain

GC açısından zengin ve zor DNA hedeflerinde amplifikasyonu geliştirir. Amplifiye edilmesi zor olduğu bilinen dizilerde kullanımı idealdir. DNA Tm sıcaklığını düşürülmesini sağlar.

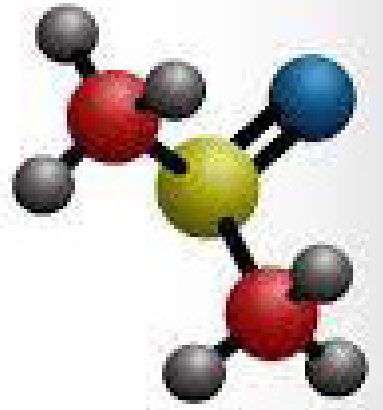
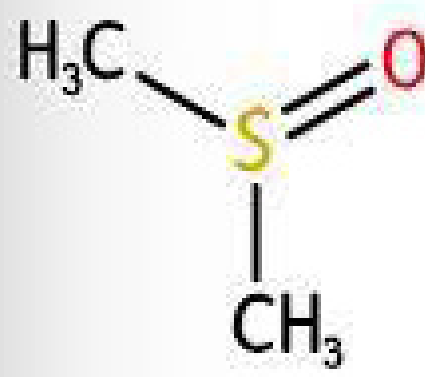


• İyonik olmayan Deterjanlar

Triton X-100, Tween 20, NP-40 gibi kimyasal bileşenlerin kullanımı da ikincil yapıları azalttığı düşünülmektedir. Bu reaktiflerin kullanımı PCR verimini arttırabilir fakat spesifik olmayan amplifikasyonları da arttırabilir. Bundan dolayı dikkatli kullanılmalıdır.

• DMSO

İkincil DNA yapılarını azalttığı düşünülür. Bundan dolayı GC içeriği zengin yapıların PCR analizi yapılırken eklenmesi önerilebilir. Ancak DMSO, Taq polimeraz aktivitesinin düşmesine de neden olabileceğinden aralarındaki dengenin kurulması son derece önemlidir.



• Formamide

Organik bir PCR ek reaktifidir. Spesifik olmayan bağlanmayı azaltarak kirli PCR reaksiyonlarını temizlemek için çalışır.

Tüm bu bileşenler PCR sonuçlarını iyileştirse de analiziniz için en iyisinin ne olduğunu ilk aşamada tahmin etmek mümkün değildir. Bir PCR reaksiyonunu optimize edebilmek için çok fazla deneme yapmak gerekir.

