

PCR 1985 yılında Kary B. Mullis tarafından geliştirilmesinden itibaren çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu yöntem patojenin hedef DNA'sının in vitro koşullarda enzimatik olarak amplifikasyonuna dayanmaktadır. Düşük miktarlarda olan DNA enzimatik olarak çoğaltılarak çok sayıda kopyası elde edilmekte ve farklı görüntüleme yöntemleri ile incelenebilmektedir.

DNA'nın PCR ile çoğaltılması oligonükleotid primerler kullanılarak gerçekleştirilir. Primerler DNA zincirinin çoğaltılacak bölgelerinin uç kısımları ile komplementer tek kollu kısa DNA molekülleridir. Kullanılan yöntemle göre değişmekle beraber 10-30 bp büyüklüğündedir.

Normal bir PCR reaksiyonu farklı sıcaklıklarda 3 aşamada 25-50 döngü arasında gerçekleşmektedir. Bu aşamalar;

1. Denatürasyon: 94°C sıcaklıkta çift sarmal DNA yapısının ayrılarak tek sarmal hale getirildiği basamak.
2. Annealing: 35-65°C sıcaklık aralığında hedef DNA iplikçisine primerlerin bağlandığı basamak.
3. Extension (Uzama): Sıcaklığın 72°C'ye çıkartılarak bağlanan primerlerin DNA polimeraz aracılığıyla ikinci iplikçisi sentezlediği basamak.

PCR'in spesifitesini primerlerin özgünlüğü belirlemektedir. Bununla birlikte annealing sıcaklığı, polimerazın miktarı ve işlevi, primer konsantrasyonu gibi etkenler de PCR reaksiyonunu etkilemektedir. PCR mixinde Buffer (KCl, TrisHCl, MgCl₂), DNA polimeraz enzimi, dNTP, Forward-Reverse primerler, hedef DNA bulunmaktadır.

PCR işlemi bittikten sonra DNA'ların görsel hale getirilmesi için ELEKTROFOREZ denilen aşamaya geçilir. Elektroforez DNA moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre bir elektrik akımı altında ayırma tabi tutulması işlemidir

PCR'nun Avantajları

- Çabuk
- Duyarlı
- Yüksek spesifikliğe sahip

PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar

- Yalancı pozitif veya negatiflik
- Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme

- Özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirmesi
- Standardizasyon gerekliliđi
- Maliyet

Standart PCR

- Bitki patojenlerinin tespit ve tanısı için spesifik Forward/Reverse primerleri ile yapılan rutin PCR yöntemidir.

Step	Temperature, °C	Time, min	Number of Cycles
Initial Denaturation	95	1-3	1
Denaturation	95	0.5	25-40
Annealing	Tm-5	0.5	
Extension	72	1 min/kb	
Final Extension	72	5-15	1

