

PCR eřitleri

Doç. Dr. İnci Bařak Mųřtak

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi

Mikrobiyoloji ABD

Nested PCR

- Nested PCR'da 2 farklı PCR uygulanır
- Bunlar 2 farklı primer çifti kullanılarak yapılır
- İlk PCR'da hedef DNA bölgesini de içeren daha uzun bir DNA dizisi çoğaltılırken, ikinci PCR'da direkt hedef bölgesi çoğaltılır
- PCR sensitivitesi artırılmış olur!!!

- https://www.google.com/search?q=nested+pcr&source=lnms&tbnm=vid&sa=X&ved=2ahUKEwjKsdvq5Pv9AhVxcfEDHW-iD_UQ_AUoAnoECAEQBA&biw=1600&bih=757&dpr=1#fpstate=ive&vld=cid:51972fa3,vid:2M_EJnCpGrM

RT-PCR

- **Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**
- RNA genomuna sahip virusları saptamak ve RNA transkriptlerini saptamak için kullanılır
- Öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirilir
- Daha sonra buradan reverse transcriptase enzimi kullanılarak **cDNA** sentezi gerçekleştirmek için bir primer template RNA'ya bağlanır

- RT-PCR'in ilk aşamasında RT enzimi ile cDNA iplikçığı sentezlenir
- RT enzimi mRNA iplikçığıne komplementer nukleotid bazlarını primerin önüne ekleyerek cDNA'yı sentezler
- Bunun için spesifik primer, rastgele primerler ya da oligo dT primerler kullanılır

- Daha sonra RNA template iplikçik RNase H enzimi kullanılarak uzaklaştırılır
- Ve cDNA PCR ile amplifikasyonda kullanılabilir

- Bundan sonra oligonukleotid primer cDNA'ya bağlanarak Taq polymerase enzimi ortamdaki nukleotidleri ekleyerek çift iplikçikli cDNA'yı sentezler
- Bundan sonraki olaylar aynı PCR'da olduğu gibi gerçekleşir

RT-PCR'in avantaj ve dezavantajları

- Yüksek sensitivite
- Yüksek spesifite özellikle spesifik primerler kullanıldığında!!!
- 1-2 gün içerisinde sonuç alınır
- PCR'in dezavantajları ile aynı
- RT-PCR fonksiyonel proteinleri değil, transkriptleri belirler

Touchdown PCR

- **Bu metotta, primerlerin bağlanma sıcaklıkları her bir siklusun primer bağlanma adımında 1 derece (ya da 0.1-10C) düşürülerek daha spesifik bağlanmaların oluşturulması sağlanır**
- Touchdown PCR tekniğinin ilk sikluslarında yüksek bağlanma sıcaklıkları uygulanır. Bu sikluslarda primerler hedef DNA dizileri ile daha spesifik bağlanmalar gerçekleştirir, ancak sensitivite düşüktür
- Daha sonraki sikluslarda primer bağlanma sıcaklıkları düzenli olarak azaltılarak primerlerin optimal bağlandıkları sıcaklıklara değin indirilir. Böylelikle önceki sikluslarda non-spesifik bağlanmalar engellenmiş olur.
- İzleyen sikluslarda optimal bağlanma sıcaklıklarına yaklaşan primerler spesifik hedeflerine daha duyarlı bağlanmaya başlarlar. Bu da test duyarlılığını artırır.

- Avantajı yüksek spesivite
- Dezavantajı özel thermal cyclerlar gerektirmesi
- Bu teknikte non-spesifik diziler primer bağlanma sıcaklığına bağlı bir yarışma ile dışlanırlar

RAPD-PCR

- **R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**N
- DNA dizi segmentlerinin rastgele amplifiye edildiği PCR'dır
- RAPD'de 8-12 nukleotidlik kısa primer dizileri kullanılarak uzun genomik DNA templateleri PCR'a tabi tutulur. Fazla sayıda fragmentlerin amplifiye olmasıyla oluşan bantlar incelenerek moleküler teşhis ya da tiplendirme gerçekleştirilir

- https://www.youtube.com/watch?v=i5_ecgyY3dY