

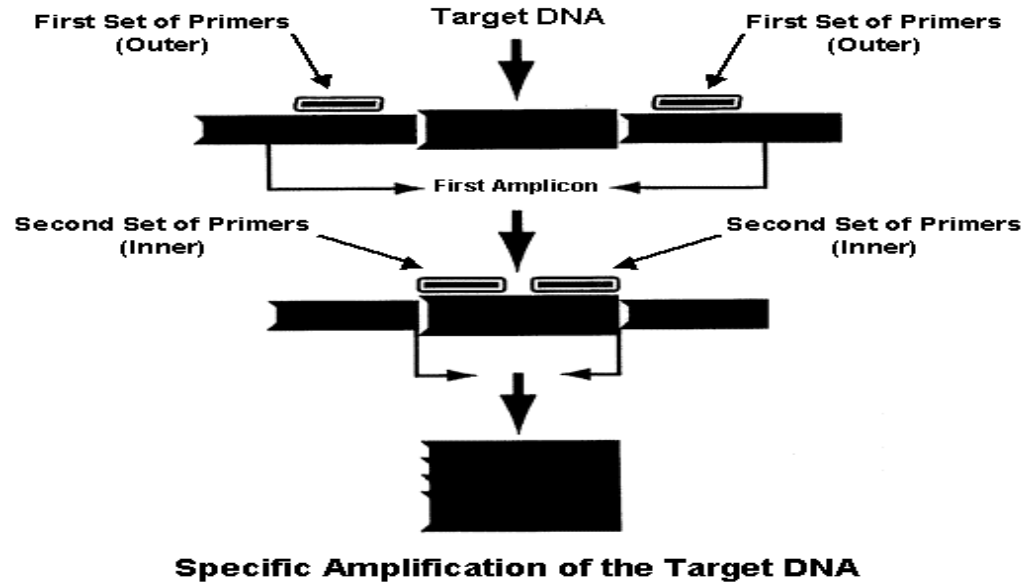
6. Hafta

PCR eřitleri

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

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!!!



RT-PCR

- Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)
- RNA genomuna sahip virusları saptamak ve RNA transkriptlerini saptamak için kullanılır
- Öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirilir.

Method:



FIG. 1. RNA template. Prior to initiating reverse transcription the template RNA must be isolated from the sample to be tested. This figure shows a polyadenylated mRNA.



FIG. 2. Priming for reverse transcription. To generate cDNA using the enzyme reverse transcriptase (RT), a primer is annealed to the template RNA. The primer can be gene specific primers, random primers or oligo-dT primers for mRNA. In this example, oligo-dT primers are used to initiate cDNA synthesis from mRNA.

Daha sonra buradan reverse transcriptase enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirmek için bir primer template RNA'ya bağlanır.

RT-PCR

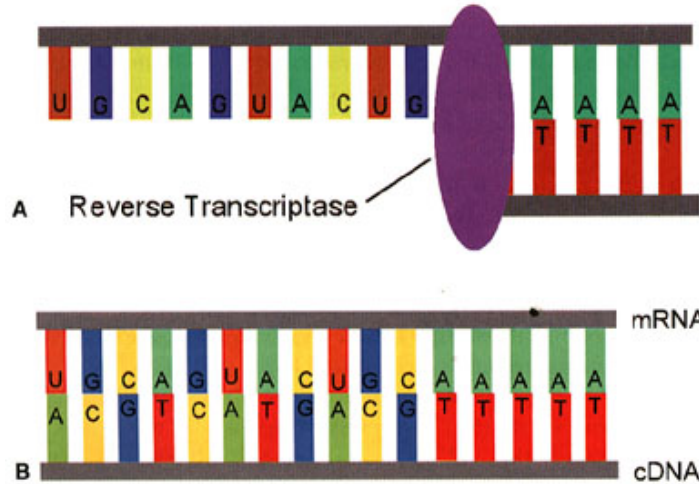


FIG. 3. First strand synthesis. The first strand of cDNA is synthesized using RT. Beginning at the primer annealing site (A), RT adds complementary nucleotide bases to the mRNA strand creating a strand of cDNA (B).

RT-PCR'ın 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.

RT-PCR



FIG. 4. Removal of RNA. The template strand of RNA is removed by treatment with RNase H. The cDNA can now be used for amplification by PCR.

Daha sonra RNA template iplikçik RNase H enzimi kullanılarak uzaklaştırılır. Şimdi cDNA PCR ile amplifikasyonda kullanılabilir.

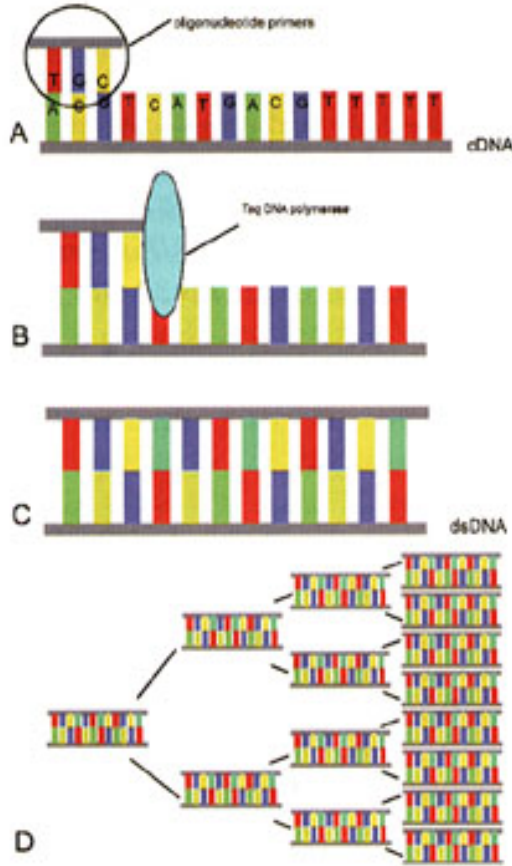


FIG. 5. The PCR reaction. The oligonucleotide primer is allowed to anneal to the template cDNA (A). *Taq* polymerase adds complementary nucleotides beginning at the primer annealing site (B). The resultant product is a double stranded cDNA (C). The three step process of denaturation, primer annealing and extension are repeated to yield a detectable PCR product (D). The product can be visualized on an ethidium bromide stained agarose gel following electrophoresis.

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

- Avantajları
- Yüksek sensitivite
- Yüksek spesifite öz. de spesifik primerler kullanıldığında!!!
- 1-2 gün içerisinde sonuç alınır.
- Dezavantajları
- 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 0.1-1°C) 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.
- Bu teknikte non-spesifik diziler primer bağlanma sıcaklığına bağlı bir yarışma ile dışlanırlar.
- Avantajı yüksek spesivite
- Dezavantajı özel thermal cyclerlar gerektirmesi

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.

RAPD-PCR Elektroforez Sonucu

