

## 3.2 Von ein paar Kopien der DNA zum Millionen

Herzlich Willkommen Sie in einer neuen Tranche von diesem spannenden Thema. Denken Sie daran, dass wir im letzten Video wie zum Extrahieren von DNA aus Zellen gesehen. Eine der häufigsten Anwendungen der DNA ist in der Diagnostik, mit einer Technik namens Polymerasekettenreaktion oder PCR.

Dies ist eine sehr sensible Technik. Benutze es wären wir in der Lage, die sprichwörtliche "Nadel im Heuhaufen" zu erkennen, und einige Wissenschaftler in Anlehnung an "Heuhaufen von einer Nadel zu machen". Und zwar deshalb, weil ein paar Moleküle der DNA, wie Sie sehen werden, millionenfach multipliziert werden. Es ist eine vielseitige Technik, die viele verschiedene Anwendungen; und schnell Ergebnisse innerhalb von wenigen Stunden zu erreichen.

Sind nicht alle Vorteile. Der größte Nachteil ist wohl die Möglichkeit der Kontamination mit anderen DNAs, falsch positive Ergebnisse geben.

Eine PCR machen wir in unserem virtuellen Labor, unsere DNA zu verstärken. Zuerst bereiten wir die Reagenzien. Mal sehen, was wir brauchen. Ach, ja, brauchen wir einige Sequenzen 18-25 Nukleotide in der Länge, Grundierungen, Primer oder Oligonukleotide genannt. Diese Sequenzen sind spezifisch für die DNA, die wir verstärken wollen. Wir brauchen zwei: einen Sinn und ein weiteres Antisense, jeweils Glühen eines die Stränge der Ziel DNA in Regionen getrennt zwischen 200 und 1500 Nukleotide.

Was brauchen wir? Ah, wir brauchen dNTPs, d. h. die Deoxy-Purine ATP, CTP, GTP und TTP, die bilden DNA.

Auch, ah, ja, wir brauchen ein Enzym DNA-Polymerase, Taq, aus einer sehr hitzebeständig Bakterienarten, genannt *Thermus Aquaticus* gewonnen mit dem Namen. Taq synthetisiert einen Strang der DNA komplementär.

Schließlich brauchen wir einen Puffer mit der entsprechenden Konzentration von Magnesium; und nicht zu vergessen, um positive und negative Kontrollen umfassen.

Wir kombinieren die genauen Mengen in Eppendorf-Röhrchen oder im Multi-well-Platten, abhängig von der Anzahl der Proben. Wir verwenden eine Gerät namens Thermocycler, die wir programmieren können, um Temperaturen nach Reihe von drei Phasen, die etwa 25 - 30 Mal wiederholt werden oder Zyklen zu ändern.

Die erste Phase ist die Denaturierung bezeichnet. Es besteht bei der Vorlage der DNA-Probe 94° oder 95° C, die zwei DNA-Stränge zu trennen.

Wenn sie, es getrennt sind schreitet in die nächste Phase, genannt glühen. Es erfolgt bei Temperaturen zwischen 50 und 65 ° C, abhängig von der Reihenfolge der Primer. In dieser Phase werden die Primer spezifische DNA-Sequenz, erkennen, wenn es vorhanden ist, und sie werden mit ihm hybridisieren. Denken Sie daran, dass es eine für den positiven Strang und andererseits der Antisense für die negativen Strang.

In der letzten Phase der Erweiterung bei 72° C fügt der Taq Polymerase dNTPs nach, wo die Primer geglüht haben, Ausweitung der DNA-Strang bis zum Ende. So gibt es zum sein eine doppelsträngige DNA zurück. Danach beginnt es wieder bei 94 oder 95 ° C für die Denaturierung der verstärkten Produkts, das, wie Sie bemerkt haben, hat sich verdoppelt. Die Mehrzahl der Enzyme inaktivieren würden, bei dieser Temperatur, aber da der Taq aus hitzebeständigen Bakterien gewonnen wird, es wird nicht durch Temperatur beschädigt und es muss nicht in jedem Zyklus hinzugefügt werden.

Die Anzahl der DNA-Moleküle wird in jedem Zyklus dupliziert, so dass theoretisch über 1 Million Exemplare von der ursprünglichen Fragment stammen nach 20 Zyklen, begrenzt durch die Primer. Verstehst du jetzt, warum die Wissenschaftler sagen, dass eine Nadel Heuhaufen beigezogen werden kann? Beeindruckend. Jetzt müssen wir nur die Verstärkung, visualisieren das Ergebnis in der Regel zu trennen, durch Elektrophorese auf einem Agarosegel, oder durch andere Techniken.

Im folgenden Video sehen wir verschiedene Versionen der PCR und wie die Höhe der Nukleinsäure anwesend zu quantifizieren.

Ich danke Ihnen sehr für Ihre Aufmerksamkeit.