

3.3 Variationen über ein Thema von PCR

Hallo! In dem letzten Video haben wir gesehen, wie PCR durchgeführt wird. Dies ist eine sehr nützliche Technik, um die gewünschte DNA-Fragmente zu verstärken. Nach erfunden, wurden Varianten der Technik entwickelt, die ihre Anwendungen zu multiplizieren. Das ist, was wir in diesem Video sehen.

RT-PCR

Sie werden sich erinnern, dass der PCR eine Technik zur Verstärkung von DNA ist. Aber es gibt viele Viren, die RNA-Genom haben. Bedeutet dies, dass wir die Technik für sie einsetzen können? Ja, kann es verwendet werden wenn wir einen kleinen Schritt eingeben. Nach Isolierung und Reinigung von RNA, können wir Reverse Transkriptase oder RT um ein komplementäres DNA-Molekül zu synthetisieren, das dient als DNA für die konventionelle PCR ab. Ein rekombinantes Polymerase-Enzym ist derzeit verfügbar. Es ist abgeleitet von *Thermus Thermophilus*, und es hat zwei Funktionen: es synthetisiert DNA aus RNA, als RT, und es synthetisiert DNA aus DNA wie in konventionellen PCR. Es ist hitzebeständig, so dass die Reaktionen bei hohen Temperaturen, Vermeidung von Problemen der Temperaturen unter 42 ° c durchgeführt werden kann Diese Technik nennt man RT-PCR.

Nested-PCR

Obwohl PCR sehr empfindlich ist, manchmal gibt es sehr wenig spezifische DNA (eine, die erkannt werden sollen) in der Stichprobe analysiert werden und eine zweite Verstärkung benötigt das erste Produkt der Verstärkung als Ziel verwenden. Diese Technik nennt man nested-PCR und zwei paar Zündkapseln, einem externen einen und dem anderen zum ersten internen beschäftigt. Eine Besonderheit dieser Technik ist, dass nach der ersten Verstärkung (20 Zyklen), das Produkt wird verdünnt, und so, Inhibitoren in der ursprünglichen Probe beseitigen kann. Auf der anderen Seite hat es den Nachteil, dass, da es mehr Handling erfordert, gibt es ein erhöhtes Risiko einer Kontamination mit Fremd-DNA.

Multiplex-PCR

Eine weitere Variante der PCR ist Multiplex genannt. Es nutzt verschiedene Paare von Primern, jeder von ihnen spezifisch für ein anderer Virus. Verschiedene Krankheitserreger können somit in die gleiche Reaktion, z. B. verschiedene respiratorische Viren erkannt werden.

qPCR o Echtzeit (rt) PCR

Die letzte Technik, die wir sehen werden ist quantitative oder Real-Time PCR. Es wird abgekürzt als qPCR oder RtPCR, aber verwechseln Sie es nicht mit RT-PCR, die wir bereits gesehen haben. Im Gegensatz zu der konventionellen PCR wird Verstärkung der Probe DNA-Molekül bei jedem Zyklus der Verstärkung und nicht am Ende überwacht. Dies wird erreicht durch fluoreszierende Reagenzien, genannt Fluorochromes, von denen gibt es zwei Arten. Ach ja, und auch da gibt es Thermocycler, die haben einen Sensor, der die Fluoreszenz zu messen, für ein paar kurze Sekunden in einer bestimmten Zeit des Zyklus.

Die erste Art der Fluorochrome ist eingeklemmt zwischen der doppelsträngigen DNA. Die am weitesten verbreitete SYBR Green heißt. Das Problem ist, dass es auch zwischen nicht-spezifische Strukturen gebildet durch die Primer, stören die Messung eingefügt werden kann. Es hat den Vorteil, den die gleichen Reagenz, das Fluorochrom kann mit den paar Zündkapseln (und damit Senkung der Betriebskosten) verwendet werden, sondern nur eine Zielsequenz erkannt werden, mit der u-Bahn.

Die zweite Art von Fluorochrom fließt am Ende eine kurze Sequenz der DNA oder Oligonukleotid, das glüht speziell mit der Sequenz verstärkt werden, nennen wir "Sonde". Auf der anderen Seite

hat die Sonde ein Molekül namens "Durstlöscher". Es ist ein Hemmstoff der Fluoreszenz. Wenn die Sonde frei oder lose ist es emittiert keine Fluoreszenz, aber wenn es mit dem Ziel DNA glüht, fortschreitender Taq Polymerase es spaltet die Sonde (weil Taq Exonuclease Tätigkeit hat), trennt der Quencher die Fluorochrom, und letztere emittiert Fluoreszenz, wenn es durch einen Laserstrahl getroffen wird. Wie die PCR die Anzahl der DNA-Moleküle verstärkt, erhöht sich die Anzahl der Ziele, die die Sonden binden. Dieses System ist spezifischer als die anderen, da die Sonde spezifisch ist. Darüber hinaus können die Sonden mit verschiedenen Farben, so dass mehrere Ziele im gleichen Rohr verwandelt sie in ein Multiplex erkannt werden gekennzeichnet werden.

Verschiedenen Verdünnungen der Positivkontrolle sind in der Regel enthalten, um im Vergleich zu ihnen DNA-Konzentration in der Probe zu bestimmen. Die ausgewiesenen Werte sind in der Regel in einem logarithmischen Diagramm als Fluoreszenz in jedem Zyklus dargestellt. Die Zykluszahl, an der die Fluoreszenz den Schwelle Zyklus überschreitet, heißt Schwelle Zyklus oder CT A höhere Ct bedeutet, dass die Probe länger dauert, bis diese Schwelle erreicht und so hat es weniger ursprünglichen DNA-Konzentration.

In diesem Video wir, die meisten gesehen haben Varianten des PCR verwendet: die RT-PCR, die verschachtelten PCR, Multiplex und die quantitative PCR. Die PCR und seine Varianten sind verbreitet. Stellen Sie sicher, dass Sie alles, bevor Sie fortfahren verstehen. Wir sehen uns im nächsten Video!

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit.