

3.3 Variazioni su un tema di PCR

Ciao!

Nell'ultimo video abbiamo visto come ha eseguito la PCR, una tecnica molto utile per amplificare i frammenti di DNA desiderati. Dopo essere inventato, varianti sono state sviluppate per la tecnica che moltiplicano le loro applicazioni. Che è quello che vedremo in questo video.

RT-PCR

Vi ricorderete che la PCR è una tecnica per l'amplificazione del DNA. Ma ci sono molti virus che hanno genoma RNA. Desideri questo dire che la tecnica non è vale la pena per loro? Sì, OK, se si immette un piccolo passo. Dopo isolamento e purificazione di RNA, utilizzare la trascrittasi inversa o RT per sintetizzare una molecola di DNA complementare che serve come DNA di partenza per la PCR convenzionale. Sono attualmente disponibili da un enzima polimerasi ricombinante derivato da *Thermus thermophilus*, che ha doppia funzione: Esso sintetizza DNA da RNA, che agiscono come RT, e sintetizza DNA dal DNA come PCR convenzionale. È resistente al calore, così tutte le reazioni possono essere effettuate ad alta temperatura, evitando i problemi di temperature inferiori a 42°C. Questa tecnica è denominata RT-PCR.

Nested-PCR

Anche se la PCR è molto sensibile, a volte c'è molto poco DNA specifico (che vogliamo rilevare) nel campione da analizzare, e devi fare una seconda amplificazione utilizzando il primo prodotto di amplificazione come uno stampo. Questa tecnica è chiamata PCR annidata e impiega due accoppiamenti degli iniettori, esterna ed altri interni al primo. Una caratteristica di questa tecnica è che dopo l'amplificazione prima (20 cicli), il prodotto viene diluito, e così in grado di eliminare gli inibitori presenti nel campione originale. D'altra parte, ha lo svantaggio che, bisogno di una manipolazione più, Non c'è aumento del rischio di contaminazione con DNA estraneo.

PCR Multiplex

Un'altra variante della PCR è chiamata Multiplex. Esso consiste nell'utilizzo di diverse coppie di primers, ciascuno di essi specifici per un virus diverso. Così possono essere rilevati nello stesso reazione di diversi patogeni diversi, ad esempio, diversi virus respiratori.

qPCR o real time (rt)PCR

Una tecnica finale che vedremo È la PCR quantitativa o in tempo reale. È abbreviato come qPCR o rtPCR, ma non confondetevi con RT-PCR che abbiamo già visto. A differenza della PCR convenzionale, amplificazione del DNA molecola monitor problema durante ogni ciclo di amplificazione e non alla fine. Questo si ottiene attraverso reattivo fluorescente, fluorocromi chiamati, che ci sono due tipi. Oh e anche perché ci sono thermocyclers si dispone di un sensore per misurare la fluorescenza per pochi secondi brevi in un tempo specifico di ogni ciclo.

Il primo tipo di fluorocromo è interposto tra il DNA double-stranded. Il più ampiamente usato è uno chiamato SYBR Green. Il problema è che può essere inserito anche tra non specifiche strutture formate da iniettori, interferire con la misurazione. Ha il vantaggio che il reagente stesso, il fluorocromo, Può essere utilizzato con tutte le coppie di primer (e così si abbassa il costo), ma una sequenza può essere rilevata soltanto da diana del tubo.

Il secondo tipo di fluorocromo è incorporato alla fine di una breve sequenza di DNA

oligonucleotide di cui che ibrida specificamente con la sequenza da amplificare, a cui verrà chiamato "sonda". A un'altra estremità, la sonda ha una molecola chiamata "quencher". È un inibitore della fluorescenza. Quando la sonda è libera o sciolta non emette fluorescenza, ma quando ibrida con il DNA bersaglio, lo stato di avanzamento della sonda viene bloccato dalla Taq polimerasi (perché Taq ha attività exonucleasica), che separa il quencher dal fluorocromo, e quest'ultimo emette fluorescenza quando viene influenzato da un fascio laser. Come PCR si va dal numero di molecole di DNA, amplificando aumentando gli stampi in modo che le sonde si uniscano. Questo sistema è più specifico rispetto agli altri, poiché la sonda è specifica e in aggiunta, sonde con colori diversi, possono essere contrassegnate per rilevare bersagli multipli nello stesso tubo e trasformarlo in un cinema multisala.

Essi includono spesso diverse diluizioni di un controllo positivo, al fine di determinare rispetto alle loro la concentrazione del DNA nel problema del campione. I valori riportati sono solitamente rappresentati in un grafico logaritmico come in ogni ciclo di fluorescenza. Il numero di ciclo in cui la fluorescenza supera la soglia ciclo è chiamato soglia o CT. Ct più significa che il campione richiede più tempo per raggiungere tale soglia e così ha meno concentrazione di DNA iniziale.

In questo video abbiamo visto il la maggior parte utilizzati varianti della PCR: la RT-PCR, il multiplex, la PCR multiplex e quantitativa. La PCR e tutte le varianti sono utilizzate molto. Assicurarsi di aver compreso tutto prima di continuare. Vediamo nel video qui sotto!

Grazie per la vostra attenzione.