



Предности, ограничувања и примена на Touchdown PCR методата

Арис Цамиќ
Невенка Величкова
Факултет за медицински науки
Универзитет Гоце Делчев - Штип

Краток преглед

Зошто PCR е важна техника?

Механизам и компоненти на реакцијата

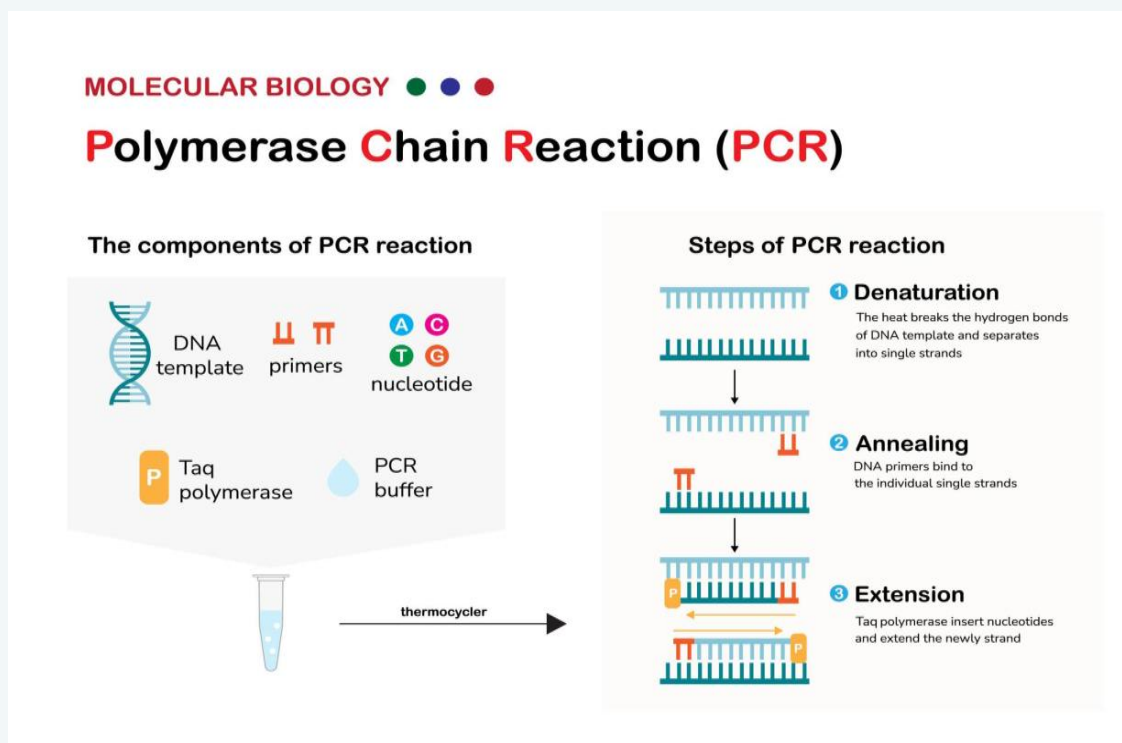
Предности, ограничувања и примена

Резултати од литературната анализа и заклучоци

Што ја разликува Touchdown PCR

Зошто PCR?

Основа на современата
молекуларна дијагностика и генетска
анализа.



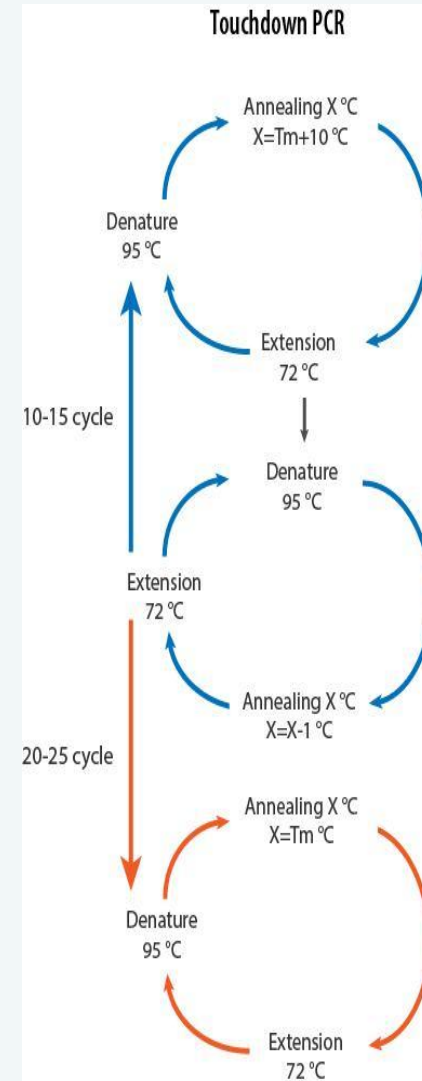
Основен PCR циклус

I денатурација: раздвојување на ДНК нишките

II анелирање: врзување на прајмерите

III елонгација: синтеза на нова ДНК

повторувањето создава голем број копии



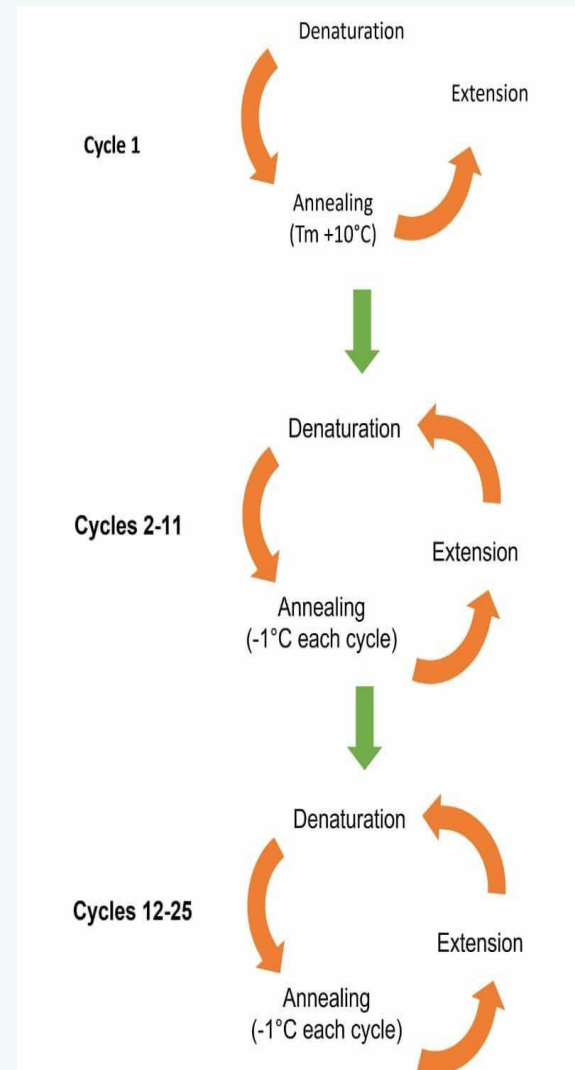
Недостатоци кај класичниот PCR

неспецифична амплификација

формирање primer-dimers

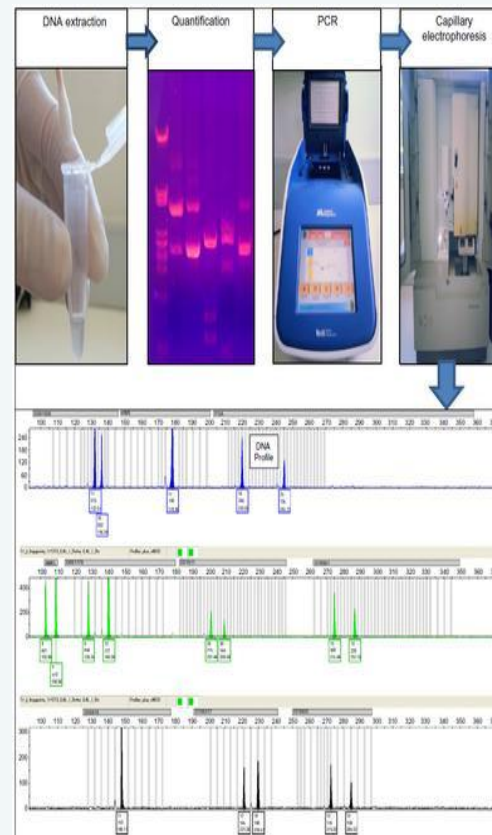
артефакти и слаб принос

посебно ризично кај комплексни или
деградирани примероци

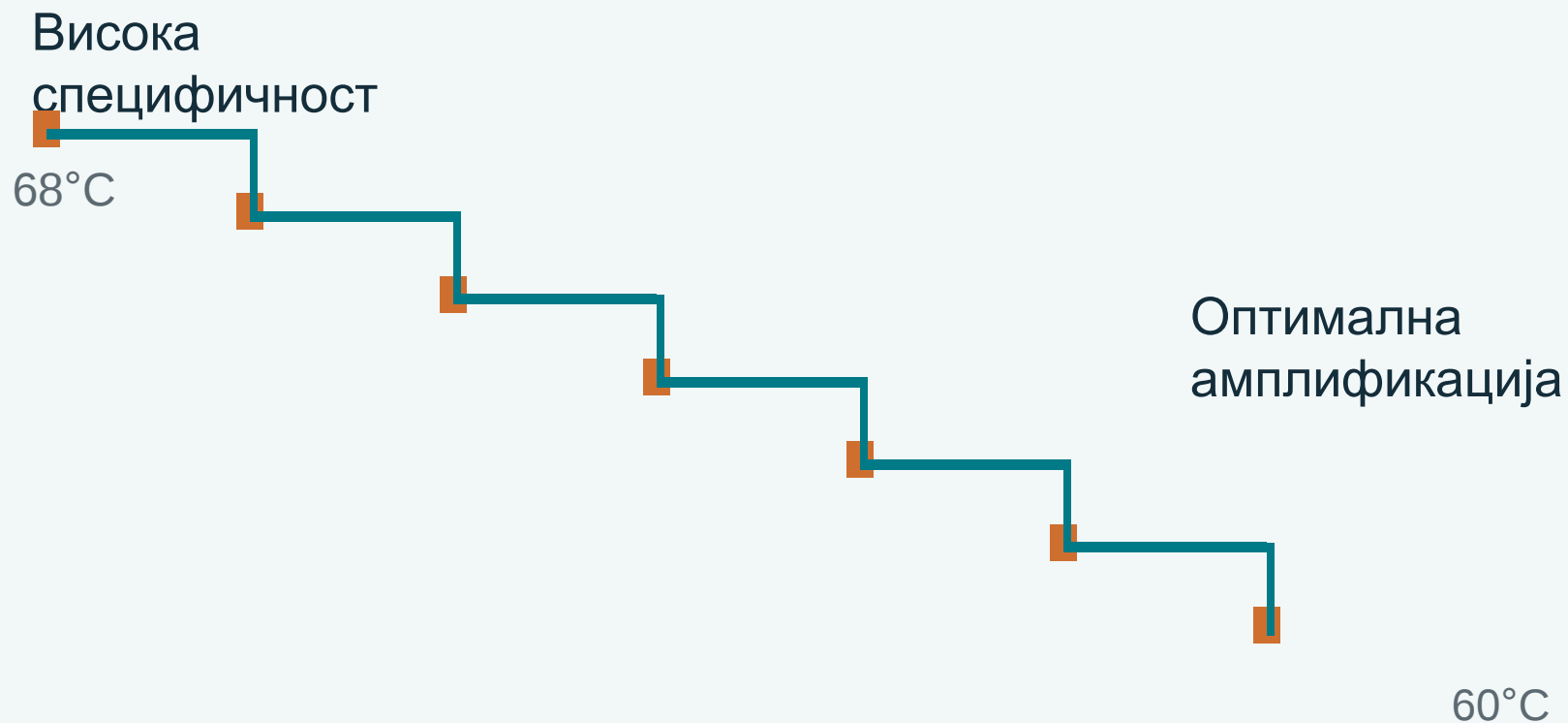


Што е Touchdown PCR?

Модифициран PCR протокол со постепено намалување на температурата на анелирање.



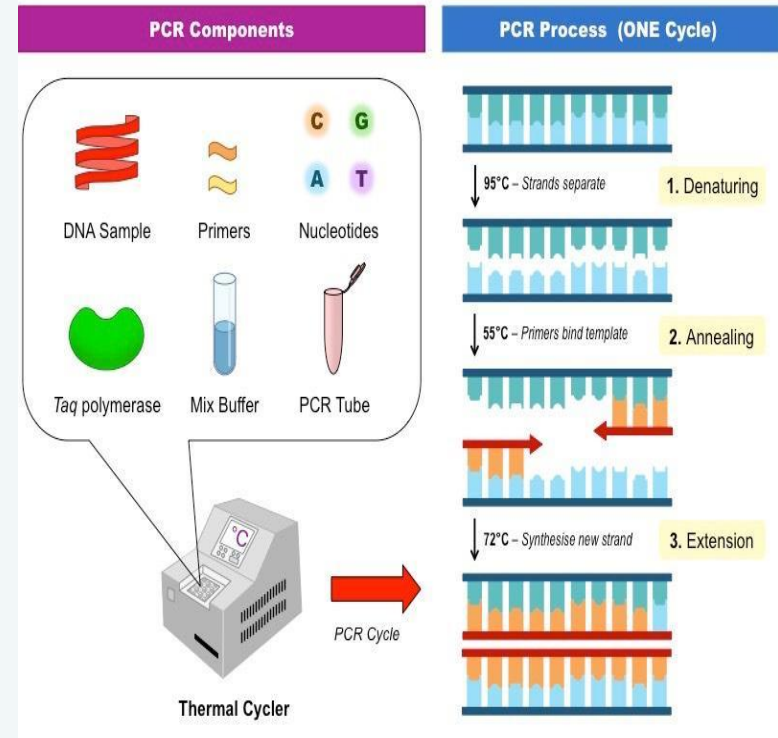
Температурна логика на Touchdown PCR



Циклуси: температурата се намалува
за 0,5-1°C

Принцип на работа

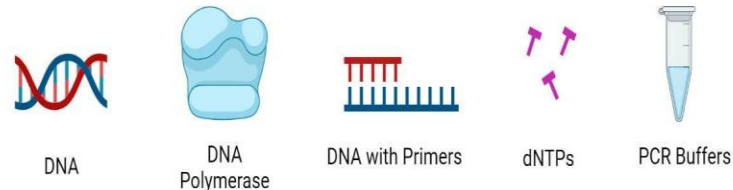
- почетна температура повисока од T_m на прајмерите
- во секој нареден циклус температурата се намалува
- специфичниот продукт се создава рано
- подоцна тој продукт доминира како шаблон



Механизам: селективна амплификација

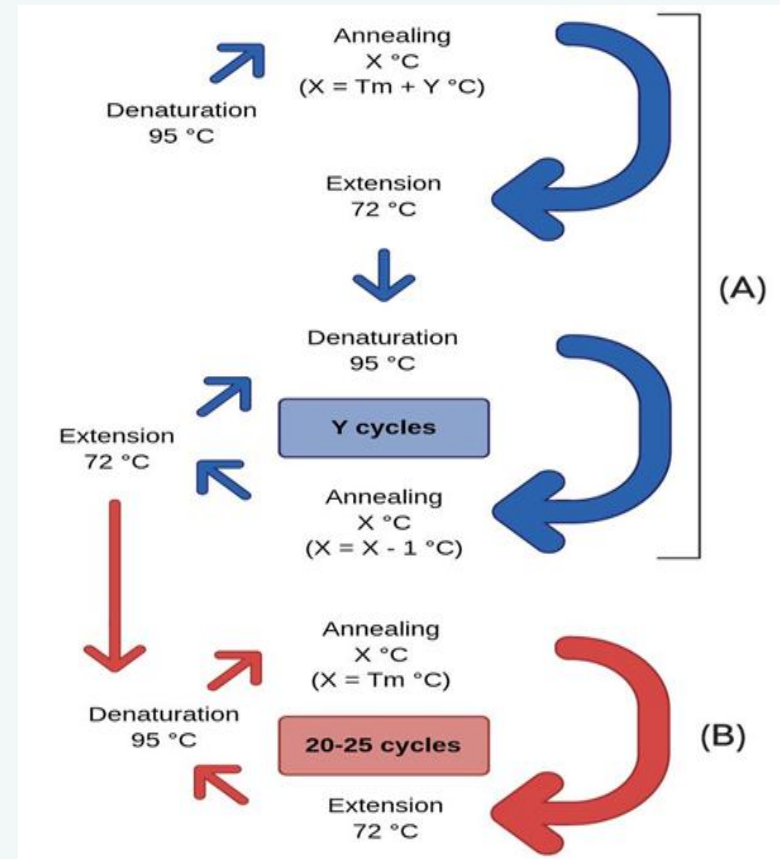
- само најкомплементарните прајмери се врзуваат во првите циклуси
- се намалува конкуренцијата од несакани секвенци
- се добива почист и посигурен PCR-продукт
- важно кај ниска концентрација на ДНК

Components of PCR (Enzymes used in PCR)



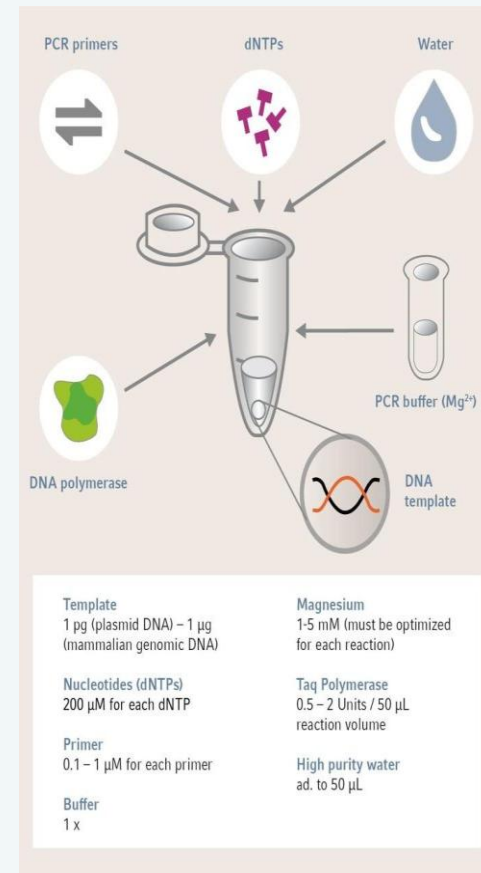
Компоненти на реакцијата

- ДНК-шаблон
- прајмери со внимателно избран T_m
- ДНК-полимераза и dNTP
- $MgCl_2$, пуфер и стерилни услови



Прајмери и оптимизација

- должина и GC-содржина
- избегнување секундарни структури
- намалување primer-dimers
- усогласување на T_m со touchdown протоколот



Главни предности

- зголемена специфичност на реакцијата
- почист PCR-продукт
- подобрена чувствителност
- помала потреба од повеќекратна оптимизација
- економична модификација на постојниот PCR



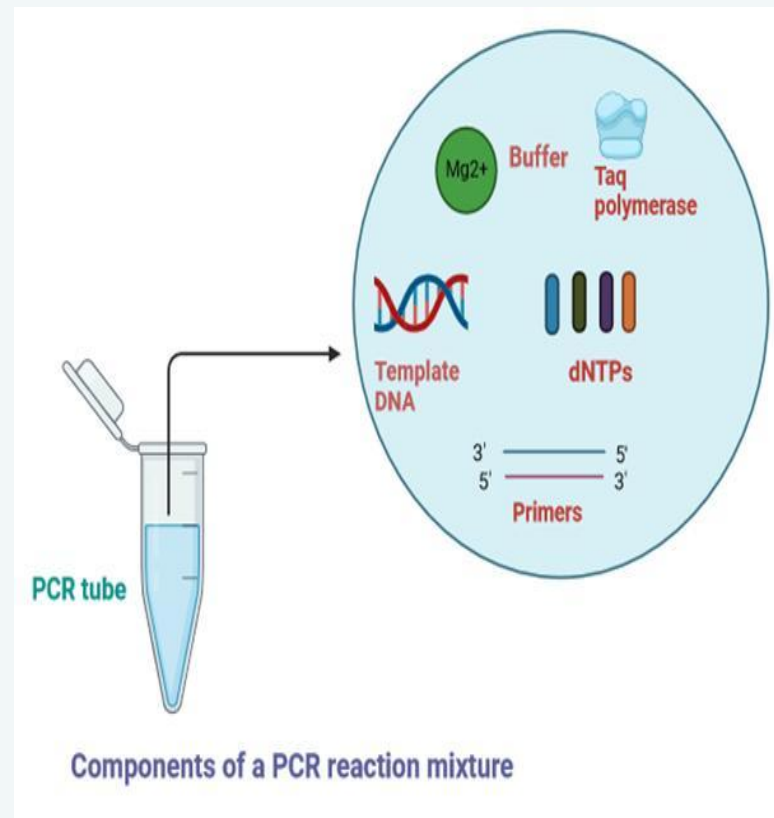
Ограничувања

- потребен е внимателен дизајн на прајмери
- неправилна почетна температура може да ја блокира реакцијата
- премногу брзо намалување ја намалува специфичноста
- потребна е проверка со контроли и репродуктивност



Примена во медицинска дијагностика

- детекција на наследни заболувања
- анализа на SNP, делеции и инсерции
- идентификација на патогени микроорганизми
- поддршка во молекуларна лабораториска дијагностика



Примена во истражување и форензика

- работа со мали количини ДНК
- деградирани или сложени примероци
- биодиверзитет и генетска идентификација
- онколошки и биотехнолошки истражувања

Molecular Quality Controls



Класичен PCR vs. Touchdown PCR

Класичен PCR

- фиксна температура на анелирање
- поголем ризик од неспецифични продукти
- побрз и поедноставен протокол
- добар избор за оптимизирани реакции

Touchdown PCR

- постепено намалување на температурата
- поголема специфичност во раните циклуси
- помалку primer-dimers и артефакти
- корисен кај сложени или чувствителни примероци

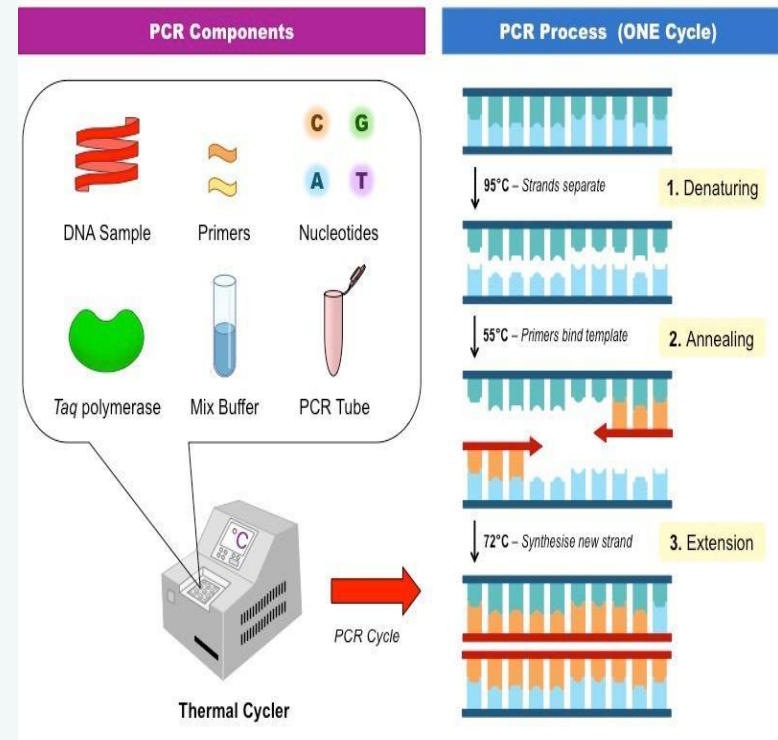
Лабораториска безбедност

- одделни простории за подготовка, примероци и анализа
- стерилни пипети, филтер-врвови и ракавици
- редовна дезинфекција на работни површини
- строга превенција на ДНК контаминација



Контрола на квалитет

- позитивна контрола: потврдува дека реакцијата работи
- негативна контрола: открива контаминација
- правилно чување на реагенси
- документирање и повторливост на протоколот



Материјали и методи на трудот

- прегледно истражување
- анализа на научни трудови, учебници и стручни публикации
- дескриптивен и компаративен пристап
- фокус на споредба: класичен PCR и Touchdown PCR

Резултати и Дискусија

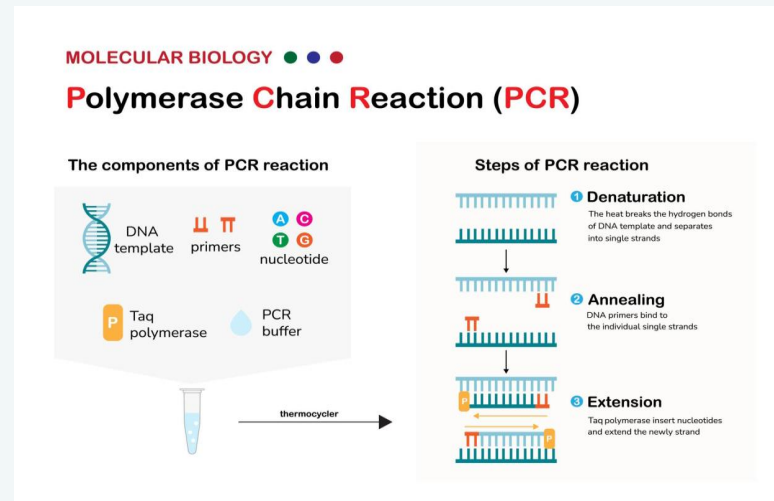
- Don et al. ја воведуваат touchdown стратегијата
- Hecker & Roux ја потврдуваат вредноста на оптимизацијата
- подоцнежните извори ја прошируваат примената
- заеднички заклучок: повисока специфичност и почист продукт



- ефикасноста зависи од температурата, прајмерите и $MgCl_2$
- методата е особено корисна кога класичниот PCR дава нејасни резултати
- најголема вредност има при чувствителни примероци
- може да се комбинира со qPCR и секвенционирање

Заклучок

- Touchdown PCR ја подобрува специфичноста на ДНК-амплификацијата
- го намалува создавањето неспецифични продукти
- има широка примена во дијагностика и истражување
- останува практична и економична модификација на PCR
- има потенцијал за понатамошен развој со современи технологии



Ви благодарам на
вниманието

