

RT-PCR

(reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu)

Dr Gülnur Güler



RT-PCR


(reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu)

- mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için sensitiv bir metod
- İki ana basamak içerir:
 - RT reaksiyonu
 - PCR amplifikasyonu



Doğal revers transkriptaz örnekleri:

- HIV-1 (human immunodeficiency virus)
- M-MLV (Moloney murine leukemia virus)
- AMV (avian myeloblastosis virus)
- Eukaryotik kromozomlarda telomerlerin devamlılığını sağlayan Telomeraz revers transkriptaz

- 
- RT-PCR sensitivitesi yüksek bir deteksiyon tekniđi
 - Düşük kopya sayısı içeren az miktarda RNA ile bu yöntemle detekte edilebilir
 - mRNA'yı cDNA'ya çevirmenin amacı mRNA'yı daha dayanıklı cDNA sayesinde daha kolay ve ayrıntılı inceleyebilmek
 - Genlerin incelenen hücredeki ekspresyon seviyesi belirlenebilir.
 - mRNA sekansları cDNA formunda klonlanabilir ve bir hücrede eksprese edilen tüm genleri içeren cDNA arşivleri oluşturulabilir
 - RT-PCR ile klonlanan cDNA sayesinde genlerin ekspresyonu RNA ve protein seviyesinde daha ayrıntılı incelenebilir.



cDNA (complementary DNA)

- cDNA tek veya çift sarmallı olabilir
- mRNA kalıbından revers transkriptaz kullanılarak sentezlenir
- Bu proses RT reaksiyonu ve tek zincirli cDNA sentezi olarak bilinir
- Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir



RT Reaksiyonu (Reverse Transkripsiyon)

- Tek sarmallı RNA'nın

- Kalıp RNA

- Revers transkriptaz enzimi

- Revers transkriptaz buffer

- Primer

- dNTP'ler

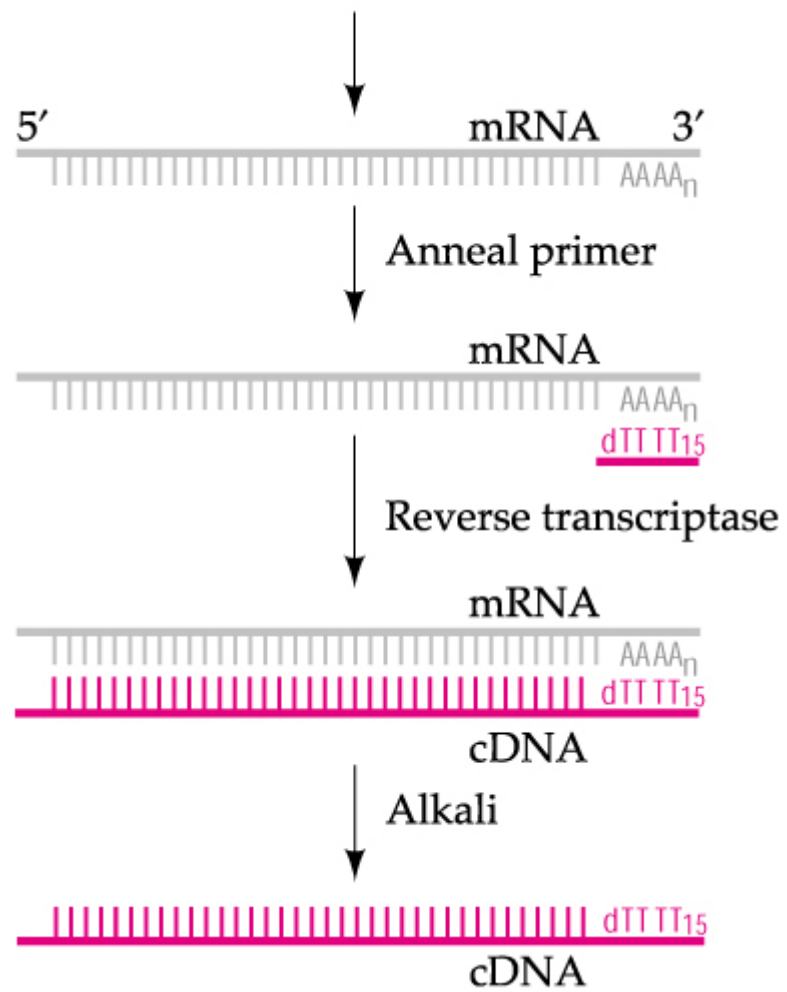
- RNaz inhibitör

kullanılarak cDNA'ya transkripsiyonu

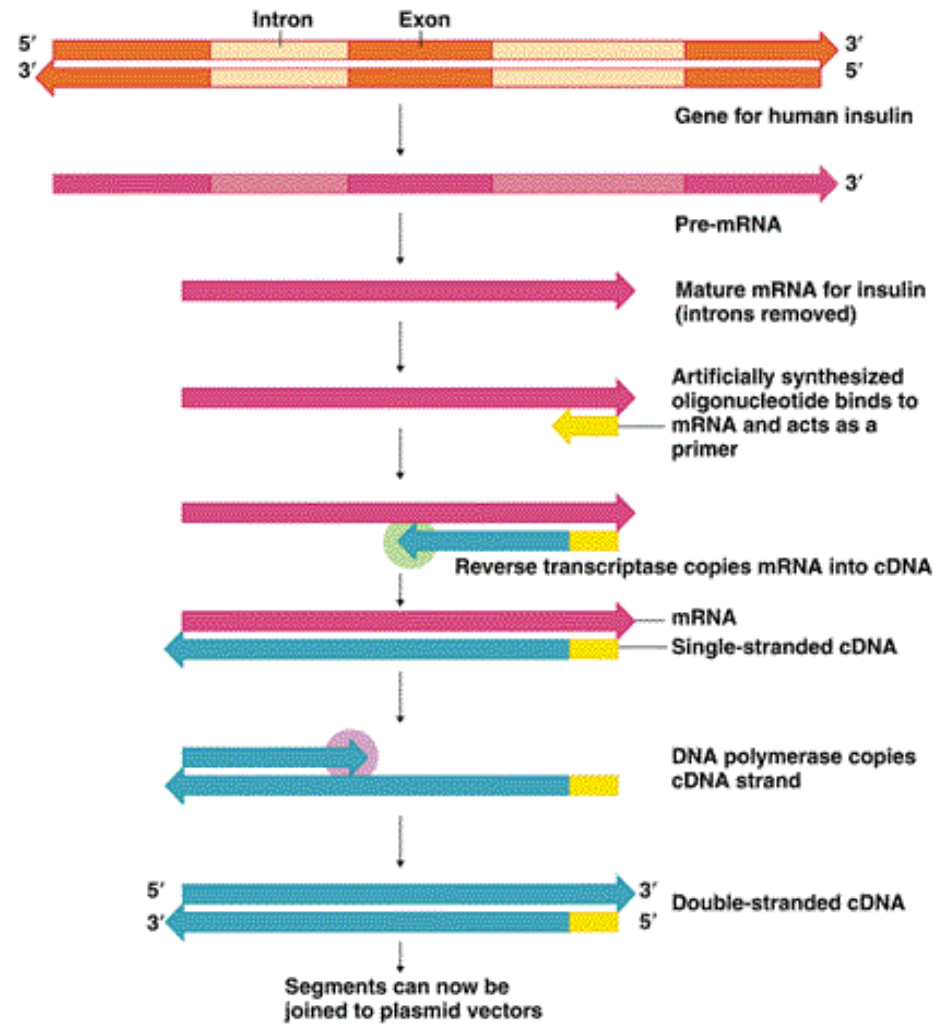



RT Reaksiyonu (Reverse Transkripsiyon)

- Bir RT reaksiyon için 1-2 μg RNA kullanılır
- Reaksiyon basamakları:
 - RNA ve primer, RNA'nın sekonder yapısını denature etmek için 70C'ye ısıtılır, sonra hızlıca buz üzerine alınarak primer'in DNA'ya bağlanması sağlanır
 - RT reaksiyonun diğer komponentleri reaksiyona eklenir. Bunlar: dNTPler, RNaz inhibitörü, revers transkriptaz ve RT buffer
 - 42C'de 1 saat RT reaksiyonun ekstansiyonu
 - 70C'ye ısıtarak enzim inaktivasyonu



Tobin/Dusheck, Asking About Life, 2/e
Figure 13.7

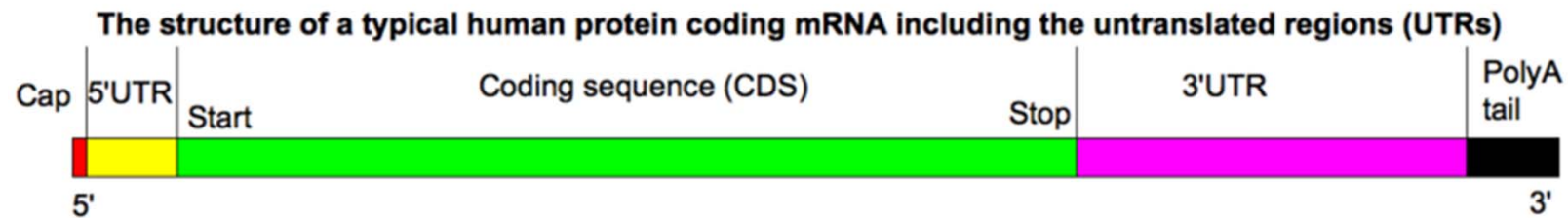


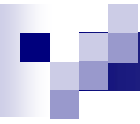


- RT reaksiyonu için üç tip primer kullanılabilir:

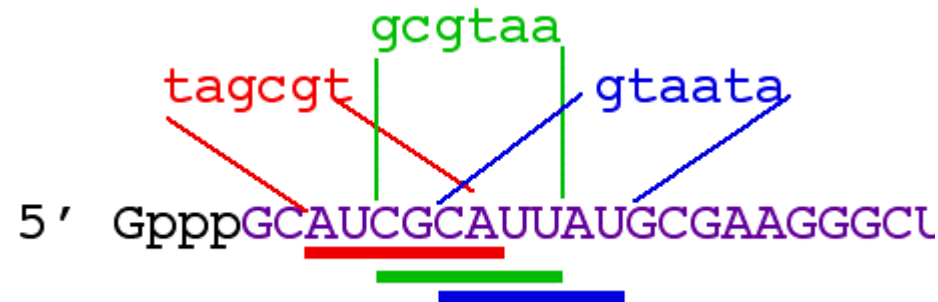
- oligo (dT) primerler,
- random (hexamer) primerler
- gen spesifik primerler


- oligo (dT) primerler mRNA'nın poly(A) kuyruğuna hibridize olur. RNA yüksek kalitede ise tercih edilirler. Çünkü polimerizasyonun, 3' ucundan istenilen transkriptin sonuna dek devamlılık gösteriyor olmalı.





- random (hexamer) primerler fragmente mRNA (<500 baz) için önerilir, çünkü bu durumda istenen sekansla polyA kuyruğu arasında kesinti olabilir.
- Random primerler tek zincirli küçük DNA fragmanları (oligonükleotidler). Bazların mümkün olan her kombinasyonundan olşurlar



- 
- Özellikle az miktarda olan transkriptleri amplifiye etmek içinse ilgilenilen gene spesifik primerleri kullanmak daha iyi.



RT-PCR Prosedürleri

- İki Tüpte, İki basamaklı prosedür:
 - RT optimal koşullarda yapıldığı için RT-PCR ürünü daha uzun
 - RT ürünü farklı transkriptlerin analizi için kullanılabilir.
- Bir tüpte iki basamaklı prosedür:
 - İlk basamakta c-DNA sentezlenir , sonra tüpe PCR reagentleri eklenir ve PCR reaksiyonu ilerler
 - Az miktarda örnek varlığında faydalı
 - RT ve PCR reaksiyonu kendi optimal koşullarında yapılır
 - Uzun sekanslar amplifiye edilebilir
 - Multiple transkript incelenebilir

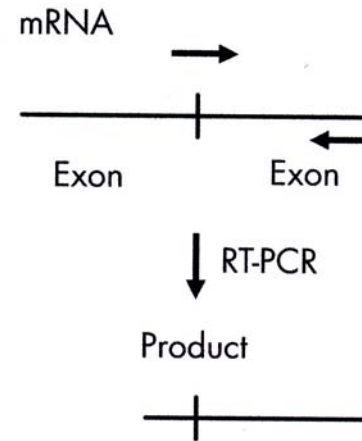
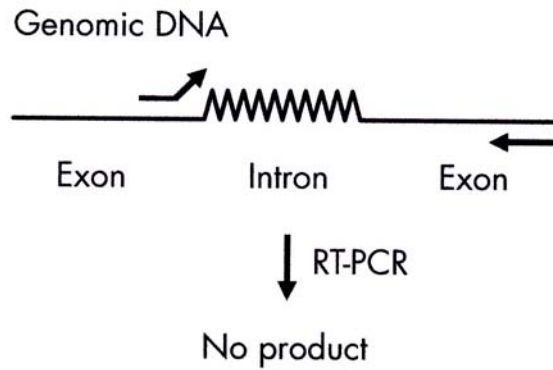
RT-PCR Prosedürleri

- Bir tüpte bir basamaklı prosedür
 - cDNA sentezi ve PCR amplifikasyon aynı buffer, bölgeye spesifik primerlerle yapılır.
 - Reaksiyon boyunca tüpü açmak gerekmez, kontaminasyon riski azalır.
 - Sekans spesifik primerler kullanıldığı için spesifik bir transkriptin incelenmesine olanak verir.
 - Bu metotta kullanılan 50-72C'de çalışan termoaktif revers transkriptaz yanlış primer bağlanmalarını azaltır.
 - Bu sıcaklık sekonder mRNA yapılarının oluşmasını önler
 - Daha kısa sürer
 - Az pipetleme olduğu için pipetleme hataları azalır
 - Tüm cDNA PCR için kullanılır

RT-PCR primer dizaynı

- RNA DNA ile kontamine olabilir. Bu nedenle RT-PCR primerleri ya bir intronu da içermeli ya da iki farklı ekzonu içermeli
- Öncelikle geninizi eksprese eden bir örnekten RNA ekstrakte edip cDNA sentezlemeli ve primerlerinizi kontrol etmelisiniz.
- 1-2 ug RNA RT reaksiyonu için, tek basamaklı RT-PCR için 50 ng gerekli
- RT ve PCR reaksiyonları için her zaman kontrollerin olmalı.
- RNA'dan arındırılmış ortamda çalışılmalı
- RNA loading kontrol olarak beta-aktin, GAPDH gibi bir 'housekeeping' geni hedefleyen primerler da amplifikasyon yapılmalı

A Primer spans an intron/exon boundary



B Primers flank an intron

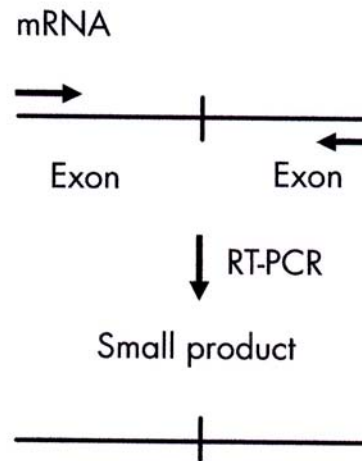
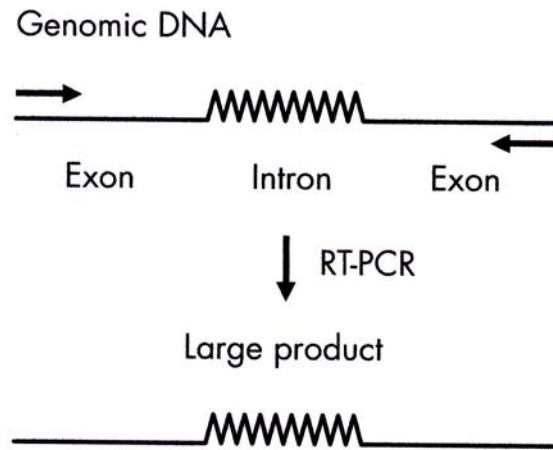


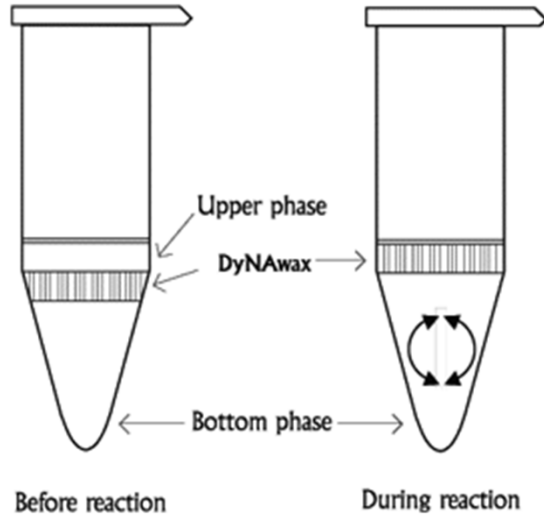
Figure 1. Primer design to **A** eliminate or **B** detect amplification from contaminating genomic DNA



'Hot Start' PCR

- PCR reaksiyonun hazırlanması sırasında polimeraz aktivitesinin inhibisyonunu sağlar. PCR siklusları öncesi polimeraz reaksiyonun engellenmesi non-spesifik amplifikasyonları azaltır ve PCR hedef ürününü artırır.
- Manuel olarak (Tüm diğer reagentler 95C'ye ulaştıktan sonra polimeraz eklenmesi), Wax-barrier yöntemi ve taq'a yönelik antikorlarla gerçekleştirilir..
- Ama en sık kullanılan yüksek ısılara ulaşmadan çalışmayan bir DNA polimeraz kullanmak

- Parafin altında temlate primerlar, buffer ve su, üstünde enzim, nükleotidler, buffer ve su. Wax 60-70C'de erir ve buzda solidifiye olur





'Touchdown' PCR

- **Touchdown PCR** nonspesifik amplifikasyonun azalmasını sağlar.
- PCR'in erken sikluslarında hedef optimum annealing ısısının daha yüksek ısı ile başlanır. Annealing ısı her siklusda yavaş yavaş azaltılarak optimum ısıya kadar ulaşılır ve kalan sikluslar bu ısı ile tamamlanır.
- Bu yaklaşım ilk sikluslarda daha spesifik bağlanma sağladığından doğru ürünün non-spesifikler aleyhine artırılmasını sağlar



'Touch-Down' Protokol

95° C	10 min
-------	--------

95° C	45 sec	15 cycle every step in cycle temperature decrease 0,5 ° C
71° C	45 sec	
72° C	1 min	

95° C	45 sec	20 cycle
64° C	45 sec	
72° C	1 min	

72° C	10 min
-------	--------