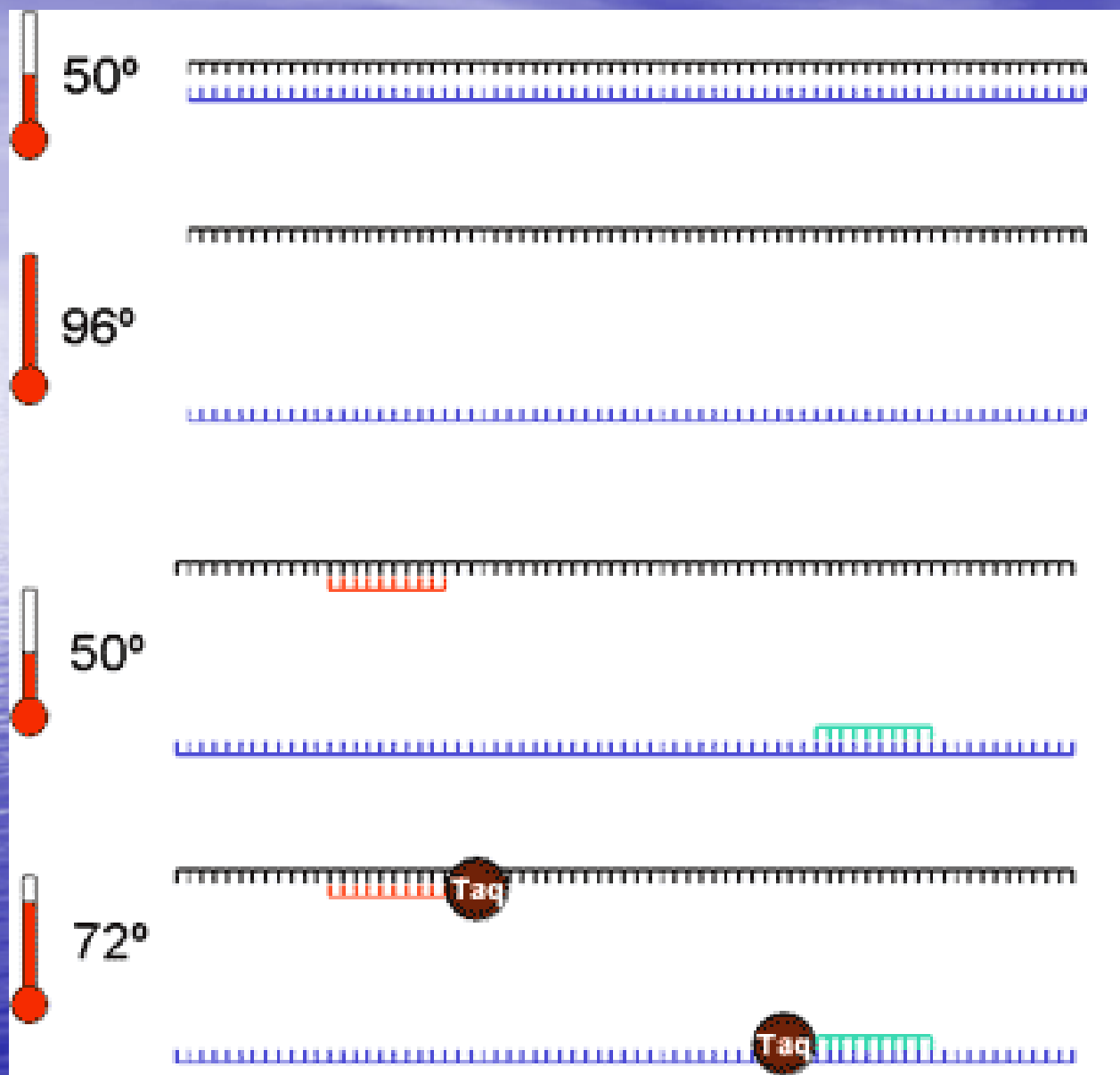


Real-Time RT-PCR

Dr. Liviu Athos TĂMAȘ și Dr. Edward Paul ȘECLĂMAN

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Amplificarea selectivă a unui fragment particular al ADN-ului (de exemplu un exon al unei gene umane)
- Permite obținerea în 2 ore a unei cantități de ADN detectabilă pe gel de agaroză prin colorare cu bromură de etidium (teoretic metoda PCR poate amplifica un segment provenit de la o singură moleculă de ADN; după 30 de cicluri se vor obține aproximativ 1 miliard de copii alături de alte câteva zeci de fragmente ADN diferite)



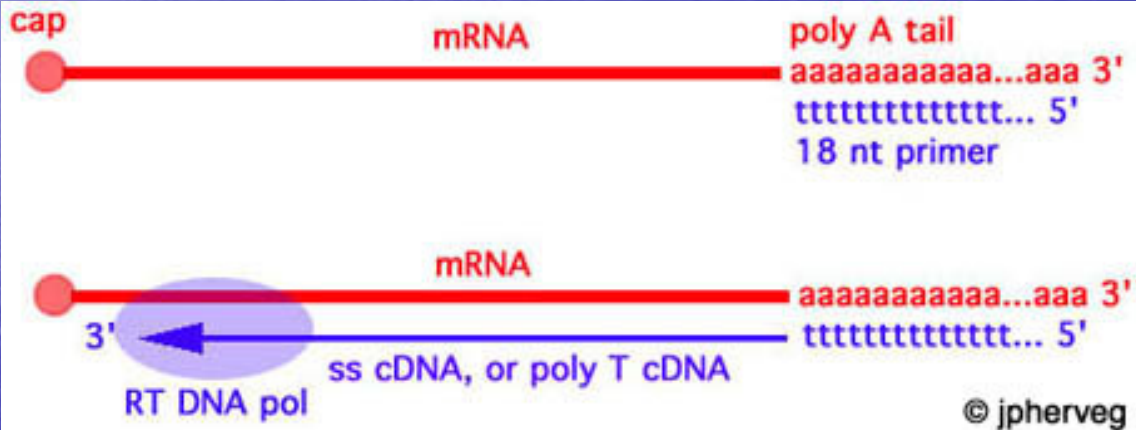
ADN dublu catenar

Denaturare

Legarea primerilor

**Legarea polimerazei
și extensia**

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)



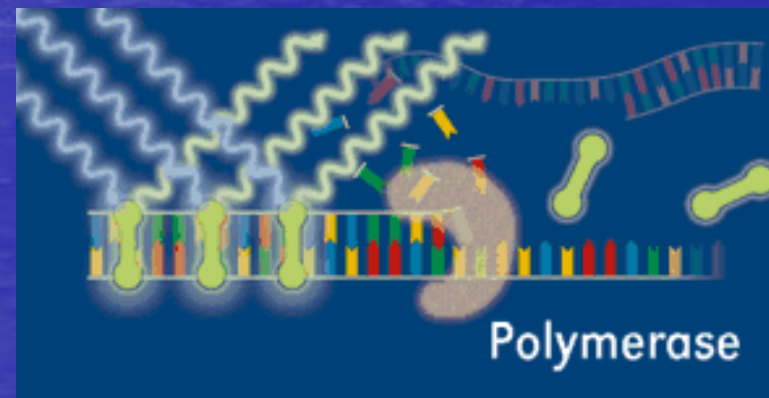
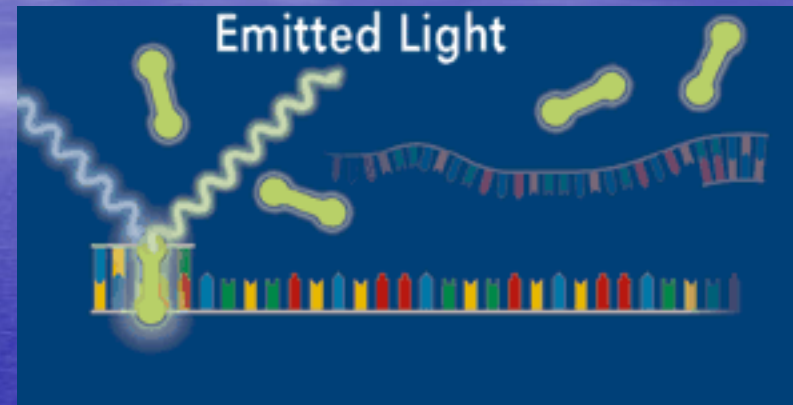
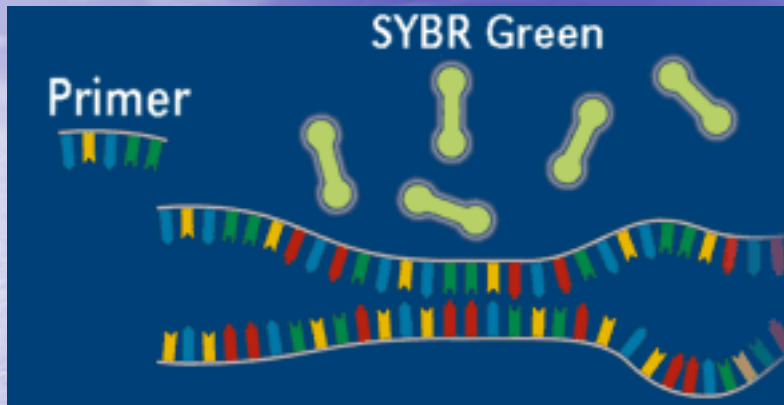
Real time PCR

Spre deosebire de metoda convențională, în metoda *real time* fragmentul amplificat (ampliconul) este vizualizat pe măsură ce procesul de amplificare înaintază. Această urmărire în "timp real" a procesului de amplificare este posibilă prin marcarea cu molecule fluorogenice a primerilor, probelor sau ampliconului

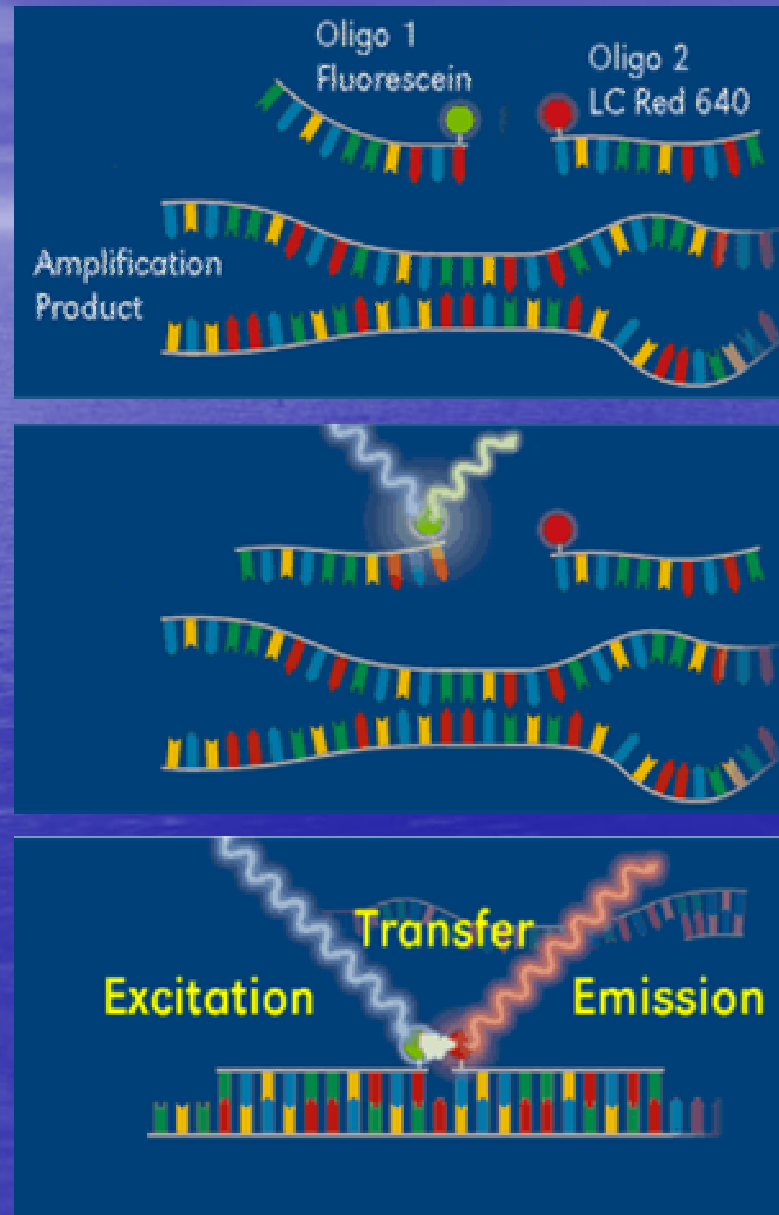
Tipuri de real time PCR

1. Real time PCR cu SYBR green
2. Real time PCR cu probe Taqman
3. Real time PCR cu oligoprobe liniare - fluorescent resonance energy transfer (FRET)

Detectarea directă a ampliconului prin agenți fluorescenți de legare ADN



Detectarea directă a ampliconului prin oligoprobe liniare



Oligoprobe Taqman™ (5' Nuclease oligoprobes)

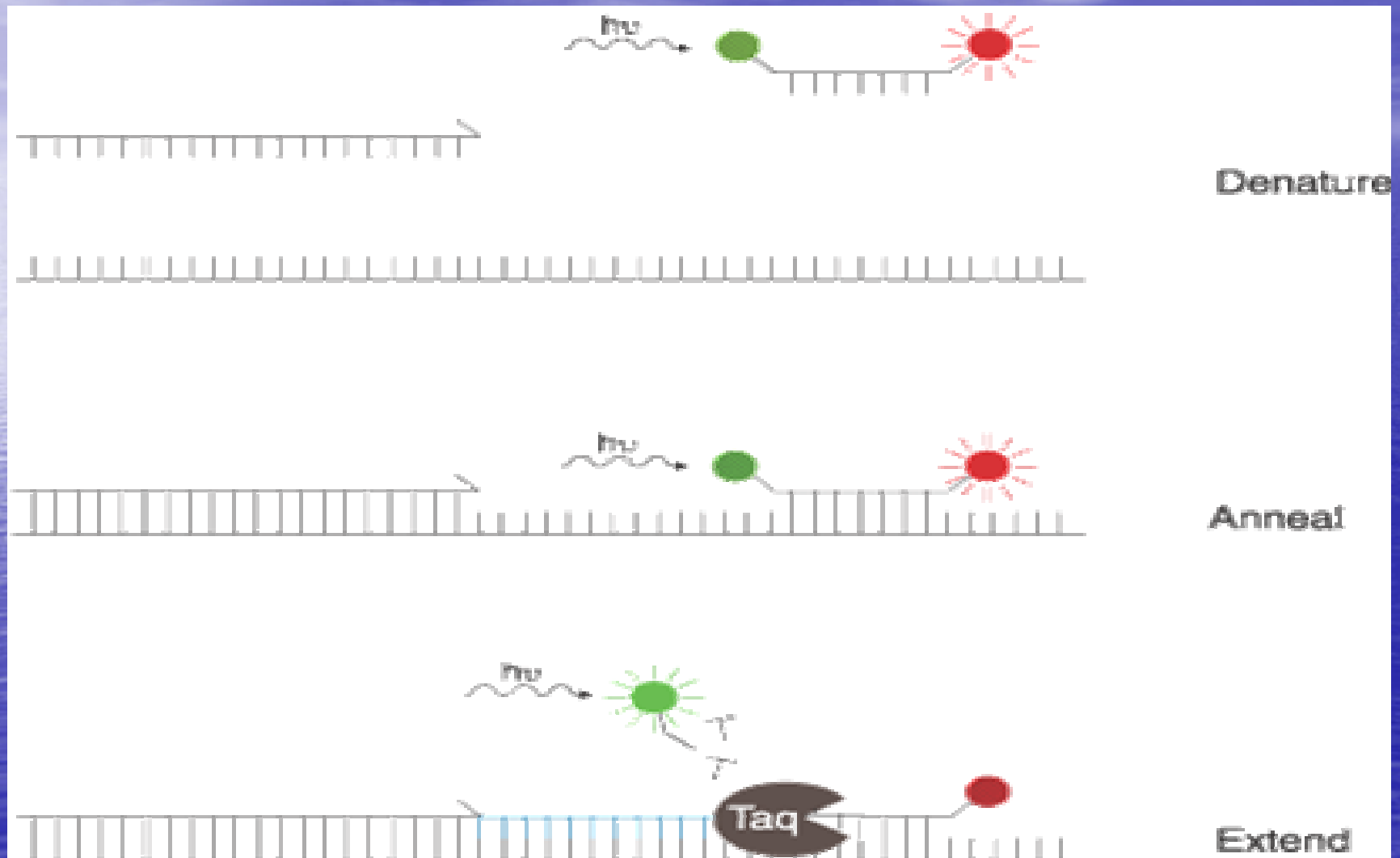
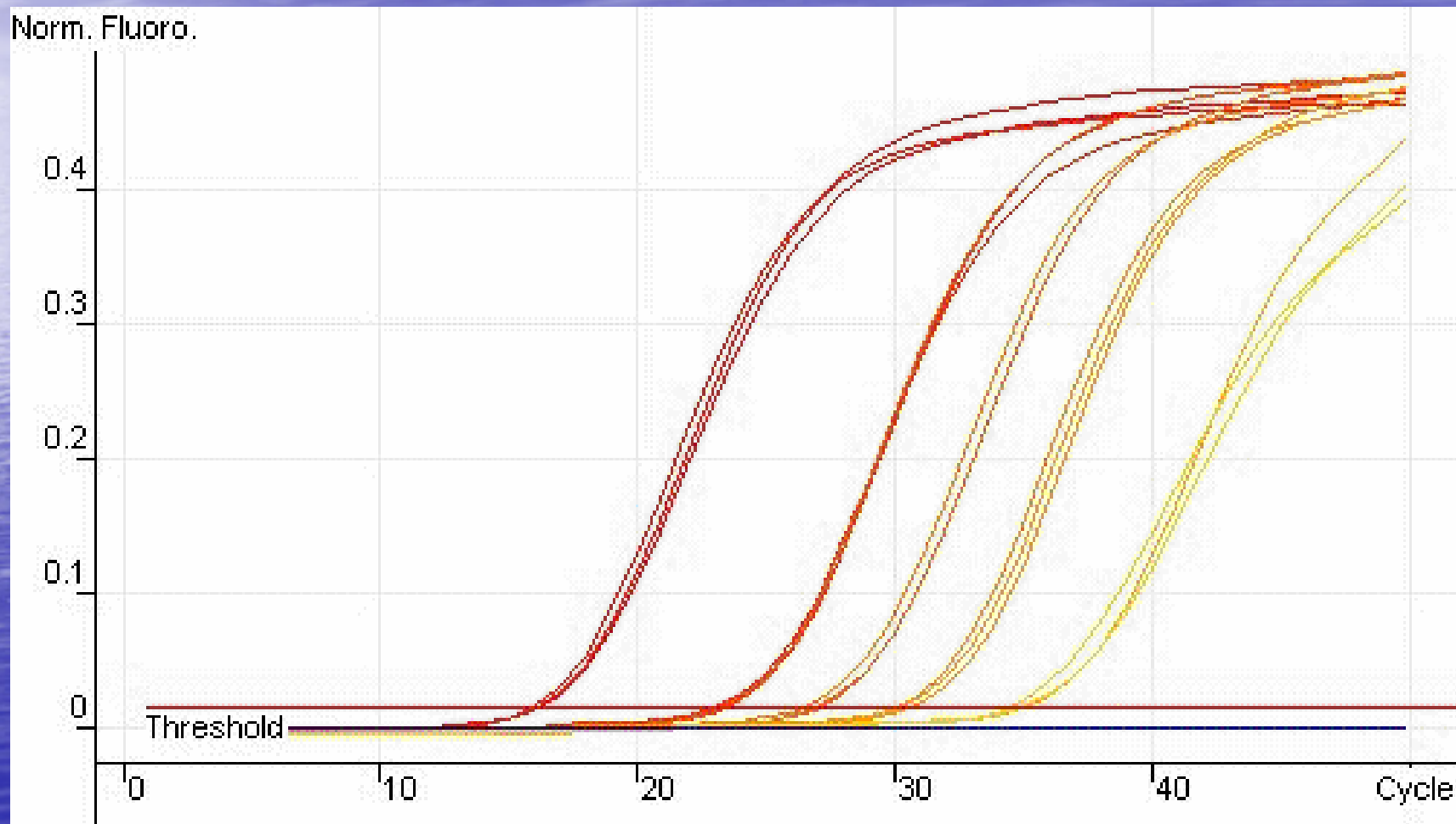


Diagrama în timp real a amplificării



Aplicații ale tehnicii real time PCR

- 1. Diagnosticul bolilor genetice**
- 2. Încărcătura virală – viremia: HIV, hepatita B și C**
- 3. Detecția celulelor tumorale și a efectului tratamentului anti-canceros**
- 4. Detecția diverselor specii microbiene și a proporției acestora**