



Molecular Solutions
for Diagnostics,
Research and
Therapeutics

www.
letgenbio.
com

No: 005
Temmuz 2021

PCR Amplifikasyonunuzu Optimize Etmek için 4 İpucu

PCR başarısı, deneysel tasarımınıza bağlı olarak değişebilir. Küçük hatalar genellikle düşük verim veya yanlış negatif/ pozitif ürünlerle sonuçlanabilir. PCR reaksiyonunuzun başarısını sağlamak için 4 temel ipucu:

1. Primer Tasarımı



- En uygun primer konsantrasyonunu bulun.
- İkincil yapı oluşumunu önlemek için 18-30 nükleotid uzunluğunda bir primer ve %40-60 GC içeriği önerilir.
- Primer homolojisini kontrol edin. Primerleriniz arasında veya dahili olarak herhangi bir bağlanma, PCR verimliliğinin düşmesine neden olacaktır.
- Primerlerin bağlanma dereceleri 2 (A+T)+4 (G+C) formülü ile hesaplanır.
- Bir G veya C ile bitirin. Primer dizinizin 3' ucunu bir G veya C ile kapatmak, uzatma bölgesinde primer uzamasını güçlendirecektir.

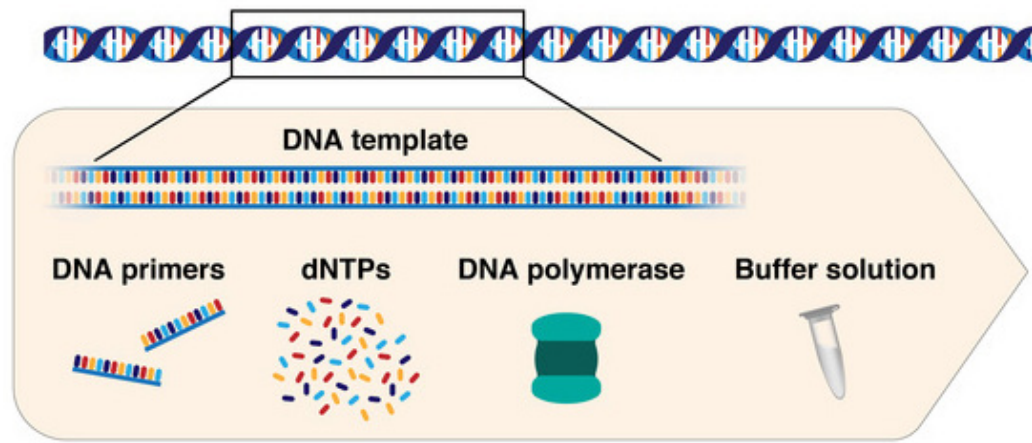
2. Hedef Dizi



- Bir PCR reaksiyonu, DNA şablonunuzun hem kalitesinden hem de miktarından etkilenebilir.
- Kaliteli bir DNA dizisi, reaksiyonun özgüllüğünü ve ürün verimini arttıracaktır.
- Kontaminasyonu önlemek için dikkatli olun! Protein ya da kimyasal kontaminasyon, spesifik olmayan bağlanmalara neden olabilir veya PCR'ı tamamen inhibe edebilir.
- DNA absorbansınızın 260nm/280nm oranının ≥ 1.8 olduğunu kontrol edin.

3. Reaksiyon Reaktifleri

- Tehlikeli reaktifler PCR reaksiyonunuzun verimliliğini etkiler. Birçok laboratuvar da hazır ticari bileşenler kullanılsa da bilinmesi gereken ve dikkate alınması gereken bileşenler: DNA Polymerase, dNTP, magnezyum konsantrasyonu.



4. Termal Profil

- Thermocycler protokolleri ve koşulları, PCR için oldukça standardize edilmiştir. İşte dikkate alınması gereken üç ana husus:
 - » Modifiye edilmiş PCR koşulları:
 - » Bağlanma Sıcaklığı: primer diziliminizin erime sıcaklığından 3 °C'de altında ayarlamanızı en uygunu olacaktır. Daha ileriki optimizasyon için annealing sıcaklığı 1-2 °C'lik adımlarla arttırılabilir.
 - » Uzatma süresi: Her 1 kb ampikon için 1 dakikalık uzatma süresi ayarlamanız önerilir. Optimal uzama oranları, DNA polimerazın işlenebilirliğine bağlı olabilir.

