



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 14

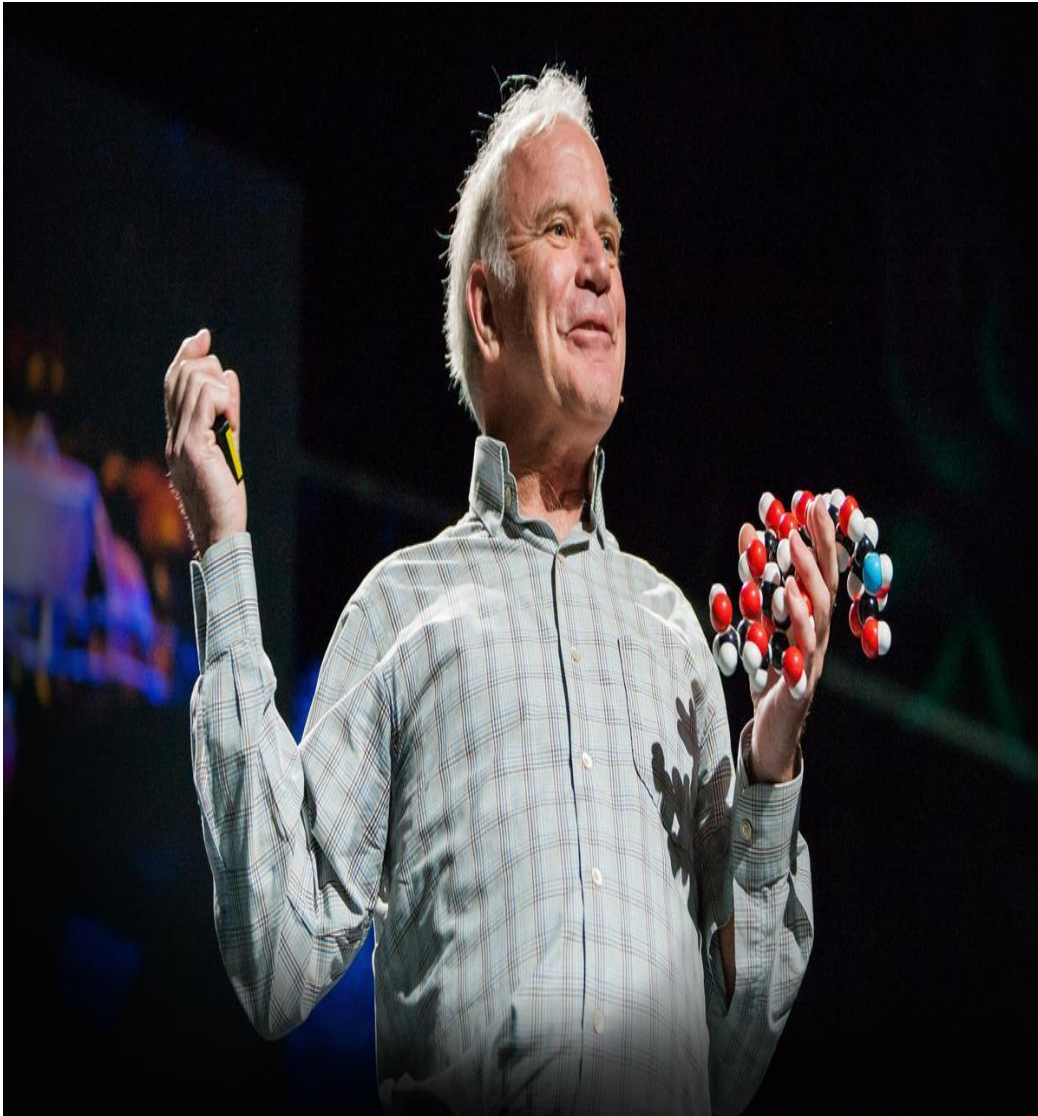
## ПОЛИМЕРАЗДЫҚ ТІЗБЕКТІК РЕАКЦИЯ

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

# Дәріс жоспары:

- ПТР-дің ашылу тарихы
- ПТР-дің компоненттері
- Реакция кезеңдері
- ПТР-дің модификациялары

# Қысқаша тарихы



- Полимеразды тізбекті реакцияны ең алғаш 1983 жылы американдық ғалым К.Мюллис ашқан және ол осы ашқан жаңалығы үшін Нобель сыйлығына ие болған.
- ПТР - әмбебап әдіс. Ол әр түрлі биологиялық материалдардан – шырыш, зәр, қан, қақырық, эпителиалді жасушалар қырындысынан бөтен ДНК-ны анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдістердің көмегімен миллиондаған ДНК фрагменттері ішінен керекті фрагментті табуға мүмкіндік туады.
- ПТР— биологиялық сынамадағы нуклеин қышқылдарының белгілі-бір фрагментінің аз ғана концентрациясын көбейтуге мүмкіндік беретін молекулалық биологияның экспериментальдық әдісі. Яғни, бірнеше сағат ішінде ДНК-ның кез келген бөлшектерін миллиондаған дана күйінде көбейтуге мүмкіндік береді

ПТР әдісінің маңызды артықшылықтарының бірі - жоғары сезімталдық - 95-ден 100% дейін. Алайда, бұл жеңілдіктер келесі шарттардың сақталуы қажет:

1. биологиялық материалдарды дұрыс жинау, тасымалдау,
2. стерильді, бір реттік құралдар, арнайы зертханалар мен білікті қызметкерлердің болуы,
3. анализ кезінде әдістер мен нұсқауларға қатаң қарау

# Қолданылуы:

**ПТР биологиялық практикада** ДНҚ-ны амплификациялаудан басқа ПТР нуклеин қышқылдарына әр түрлі әсер етуге мүмкіндік береді (мутация, ДНҚ фрагменттерін тұтастыру, гендерді клондау, жаңа гендерді бөліп шығару).

**ПТР медициналық практикада:**

- ПТР диагностика жұқпалы аурулар қоздырғышын басқа әдістермен (иммунологиялық, бактериологиялық, микроскопиялық) анықтау мүмкін болмаған жағдайда қолданылады.
- Қазіргі таңда ПТР-ны: археология, медициналық практикада әр түрлі тұқым қуалау, жұқпалы ауруларда, сот медициналық сараптамасында, генетикада әкесін анықтауда қолданады



- 1986 жылы термофильдік бактериялардан ДНҚ-полимеразаларды бөліп алуы арқасында ПТР-да қолдану күшті нәтиже берді. Бұл ферменттер термостабильді және реакцияның көп қайталанатын циклдеріне шыдамдылық көрсетті.
- Оған қоса оларды пайдалану барысында ПТР-ді жүргізуді автоматтандыруға мүмкіндік туды. *Thermus aquaticus* бактериясынан термостабильді Taq полимераза бөлініп алды, бірақ бұл ферментте қателікті түзейтін механизмі жоқ. Архейлерден алынған phi- және rho полимеразалар да репликация реакциясын жүргізе алады. Олардың артықшылығы ДНҚ-да мутациялар өте аз байқалады, бірақ Taq-қа қарағанда реакция жылдамдығы төмендеу. Сондықтан Taq- және phi-полимеразаларды қосып пайдалануға тырысады.

# Амплификатор

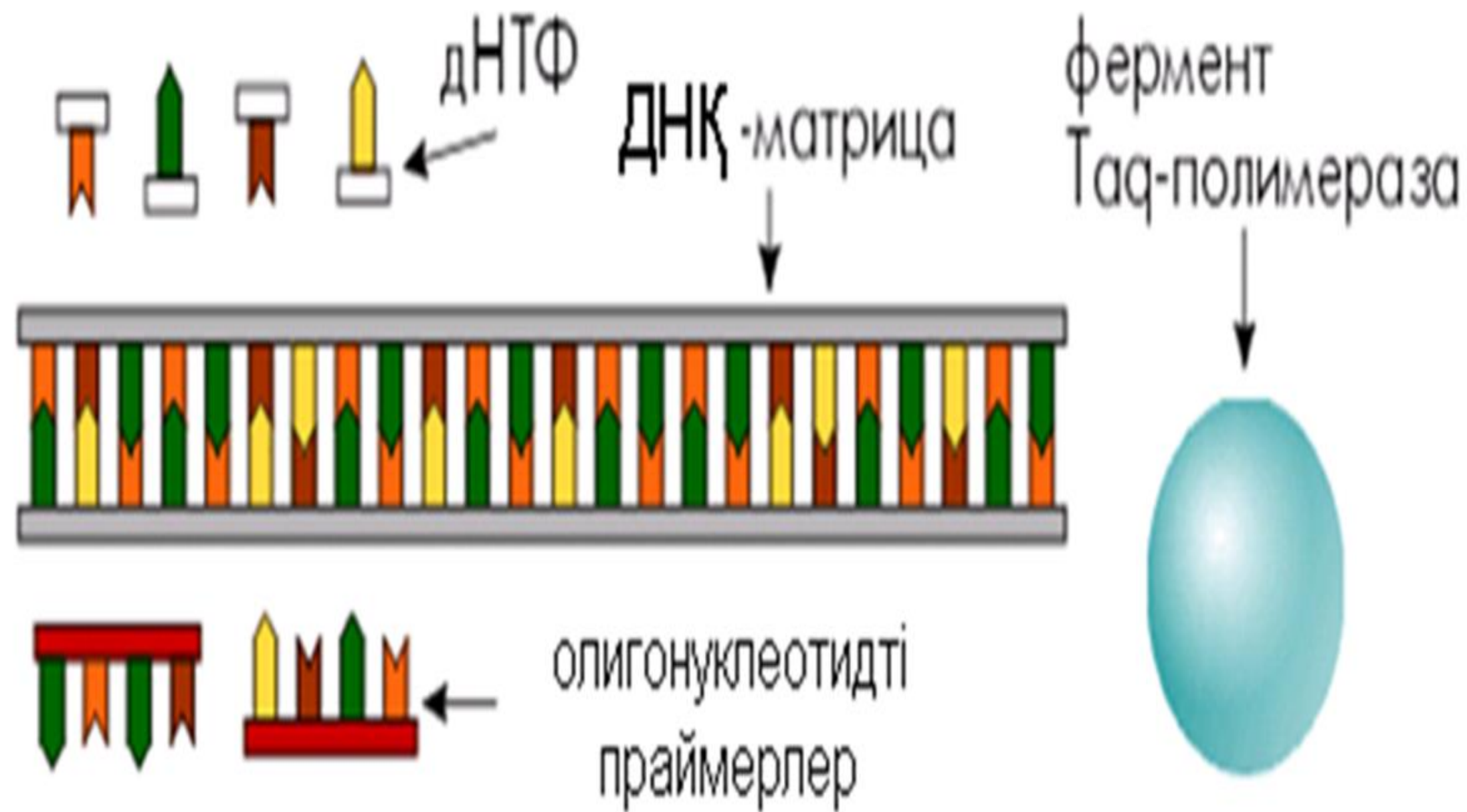


# Реакция компоненттері

ПТР-ды ең қарапайым жағдайда жасау үшін келесі компоненттер керек болады:

- Амплификация жасалатын ДНҚ фрагменті бар ДНҚ-матрица
- Талап етілетін ДНҚ фрагменті әр түрлі тізбектерінің ұштарына комплиментарлы ген спецификалық екі праймер
- Жоғары температураға тұрақты ДНҚ-полимераза - ДНҚ полимеризациясын катализдейтін фермент. ПТР-ді жүзеге асыру үшін қажетті ДНҚ-полимераза жоғары температурада да өзінің активтілігін сақтап қалуы керек. ПТР-ге қажетті ДНҚ полимеразалар термофильді бактериалардан бөлініп алынған: *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Puromoccus furiosus* (Pfu-полимераза), *Puromoccus woesei* (Pwo-полимераза) және т.б.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаттар (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Полимеразаның қызметіне қажетті  $Mg^{2+}$  иондары
- Реакцияға қажетті жағдайларды (рН, ерітіндінің иондық күші) қамтамасыз ететін буферлік ерітінді





- **ДНК-матрица** - ДНК мол-ң бастапқы арнайы фрагменті бар бөлігі;
- **праймерлер** - синтетикалық олигонуклеотидтер (16-30 нуклеотидті жұптар), матрицалық ДНК-ның комплементарлық аумақтары, арасында бір ізділігі бар-нысана (ДНК арнайы фрагменті); ДНК арнайы фрагменті және праймерлер, амплификация жүргізген кезде оларды таңдау маңызды рөл атқарады және талдаудың сапасына әсер етеді;
- **дезоксинуклеотидтрифосфаттар** қоспасы (дНТФ) – төрт дНТФ қоспасынан тұрады, жаңа комплементарлық ДНК тізбегінің синтезі үшін материал болып табылады;
- **Тақ-полимераза** ферменті – жылуға тұрақты ДНК-полимераза, праймер тізбегінің ұзартылуын катализдейді. ДНК синтездейтін нуклеотидті негіздер өсіп келе жатқан тізбекке жалғасып қосылады;
- **буфер-ерітінді**, құрамында ПТР қолайлы жағдай жасайтын және рН-тың тұрақты мәнімен аниондар және катиондардың концентрациясы.

Зат	Қолданылатын концентрация	Әсер ету механизмі
Acetamide	~5%	Еруінің жоғарылауы
Betaine Na	0,5-2M	Ферменттің тұрақтылығы, Tm АТ- и GC-ға бай келесі түзелулер
DMSO	2-15%	Еруінің жоғарылауы
Formamide	1-5%	
Glycerol	5-20%	Ферменттің тұрақтылығы
Twin 20, Triton X-100	0,1-0,5%	Ферменттің тұрақтылығы
BSA	0,1	Ферменттің тұрақтылығы

# Праймерлер

Праймерлер - ДНҚ фрагменттерінің басталу және аяқталу аймағына сәйкес келетін ұзындығы 18-25 нуклеотидті ДНҚ-ның қысқа тізбектері.

## Негізгі параметрлер:

Балқу температурасы  $t_m$ : 58-65°C. Праймердің балқу температурасы ПТР кезінде маңызды фактор болып табылады. Балқу температурасын дәл есептеу керек, ал отжиг температурасы балқу температурасынан 5 °C төмен болуы керек. Тым жоғары немесе тым төмен температура ДНҚ полимераза белсенділігінің төмендеуіне әкеледі.

праймер  $t_m$  айырмашылықтар 5 ° C аспау керек

$$T_m = 77,1 + 11,7 \lg[K^+] + \frac{41(G + C) - 528}{L} - 0,75[\%DMSO]$$

Праймер ұзындығы: 18-30 н.ж. Егер ұзындығы тым қысқа немесе тым ұзын болса, праймерлер ДНҚ тізбегіне байланбайды. Ұзындығы өте қысқа праймерлер ДНҚ тізбегінің әртүрлі орындарында спецификалық емес байланыса алады.

Праймердегі гуанин мен цитозин G / C құрамы: ~ 40-60%. Праймерлердің 3 'соңында минималды G / C (соңғы бес нуклеотидтің үшеуінен көп емес). 3'-терминалда гуанин немесе цитозин болуы керек, себебі матрицалық молекуламен үш сутегі байланысын қалыптастырады, бұл ретте гибридтеу тұрақты болады

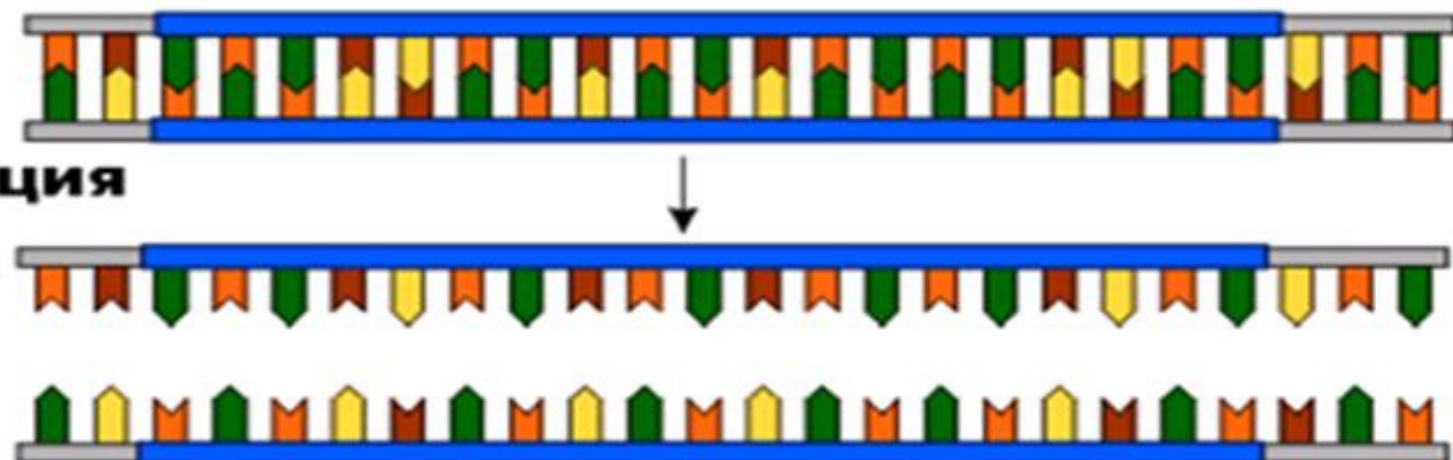
Екінші құрылым: минимум. Димерлер: жоқ.

# Реакция кезендері

- **Денатурация.** ДНҚ тізбектері ажырау үшін 0,5-2 мин. қос тізбекті ДНҚ матрицаны  $94-96^{\circ}\text{C}$  дейін қыздырады. Бұл кезенді денатурация деп атайды, өйткені ДНҚ тізбектері арасындағы сутектік байланыстар үзіледі.
- **Суыту.** Тізбектер ажырағаннан кейін температураны  $50-60^{\circ}\text{C}$  дейін төмендетеді. Сол кезде праймерлер бір тізбекті матрицамен комплементарлы байланысады. Температура жоғары болса, праймер нашар байланысады, ал төмен болса праймер баска бөлікпен байланысып, дұрыс нәтиже бермейді. Праймер Таg-полимераза үшін бастаушы қызметін атқарады. Праймер 3'-үшінде ОН- тобы бар, содан кейін ДНҚ,- полимераза репликация реакциясын бастап, матрица аяғына дейін жатады.
- **Элонгация.** Синтез жүргізу үшін температураны  $72^{\circ}\text{C}$  дейін жоғарылатады. Реакция ұзақтығы 1-2 мин ДНҚ синтезі  $5' \rightarrow 3'$  бағытта жүреді.

1 - кезең

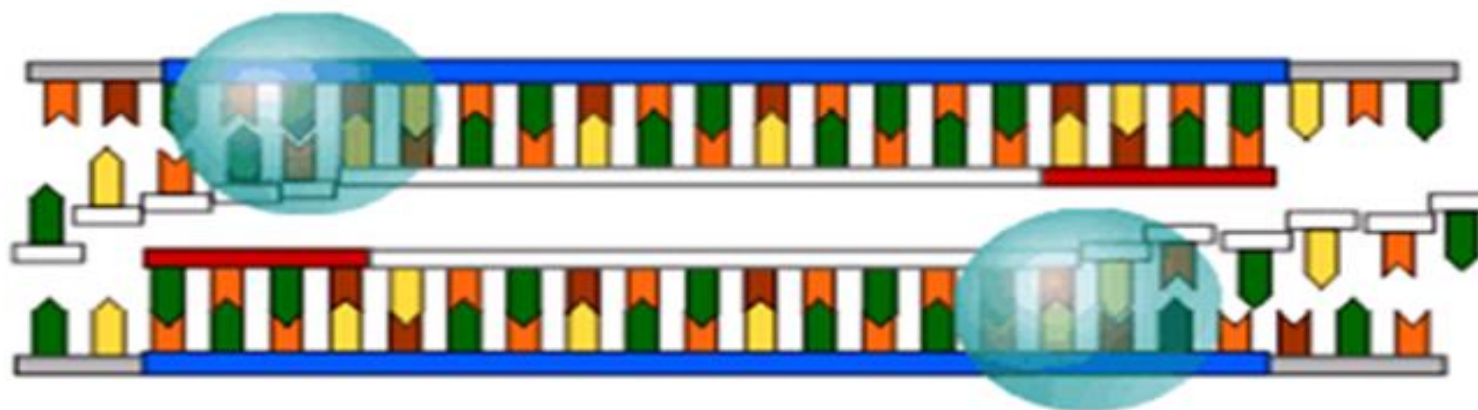
**Денатурация**  
**93-95°C**



2 - кезең  
Праймерлерді  
күйдіру  
**50-65°C**

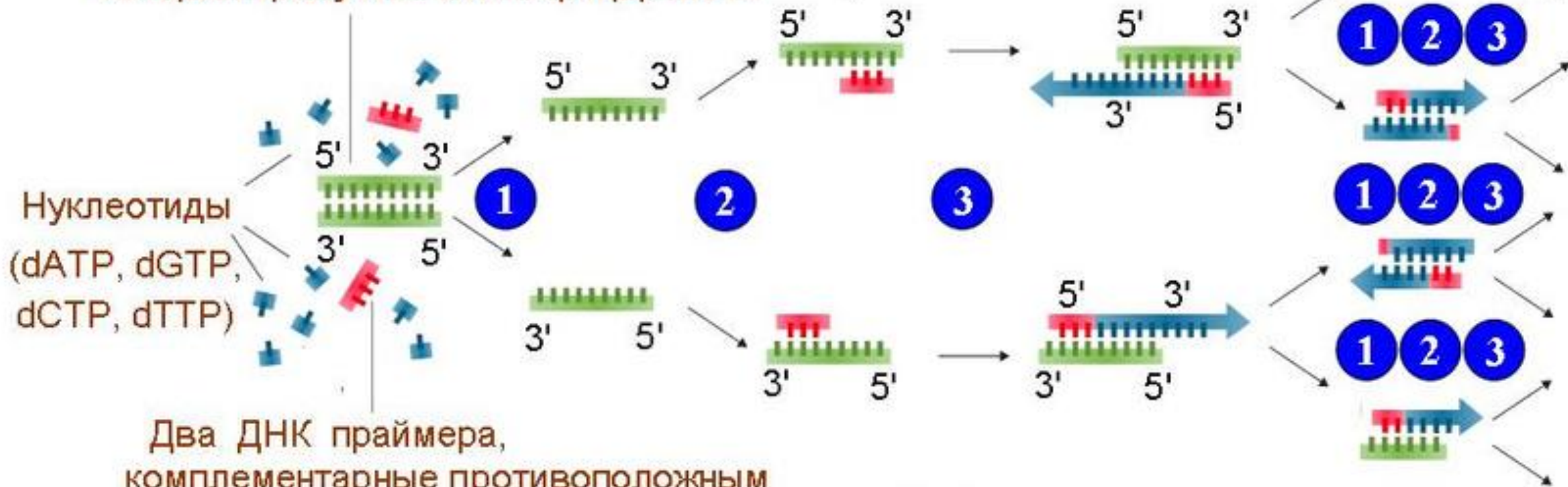


3 - кезең  
ДНҚ тізбегін  
салып бітіру  
**72°C**



# Полимеразная цепная реакция - ПЦР

ДНК-матрица, с участком ДНК,  
который требуется амплифицировать



**1** Денатурация при 94 - 96°C

**2** Отжиг при ~ 68°C

**3** Элонгация при 72°C

Ізделген ДНҚ фрагменттерінің сипаттамаларының көшірмелерінің саны жеткілікті болуы үшін амплификацияны 20-40 айналымдардан өткізеді. Амплификацияның бірінші айналымында пайда болған ДНҚ-ның жаңа тізбектері екінші тізбекке матрица ретінде қызмет атқарады, сонымен қатар ампликон деп аталатын, ДНҚ-ның бастапқы арнайы фрагменті пайда болады. Амплификацияның келесі айналымдарында ампликондар жаңа тізбектердің синтез үшін матрица қызметін атқарады

Келесі циклды жоғарыдағыдай ретпен жүргіземіз

94-96° С қыздырып тізбектерді ажырату

50-60°С праймерін қосу

70-72° С ДНҚ синтезі

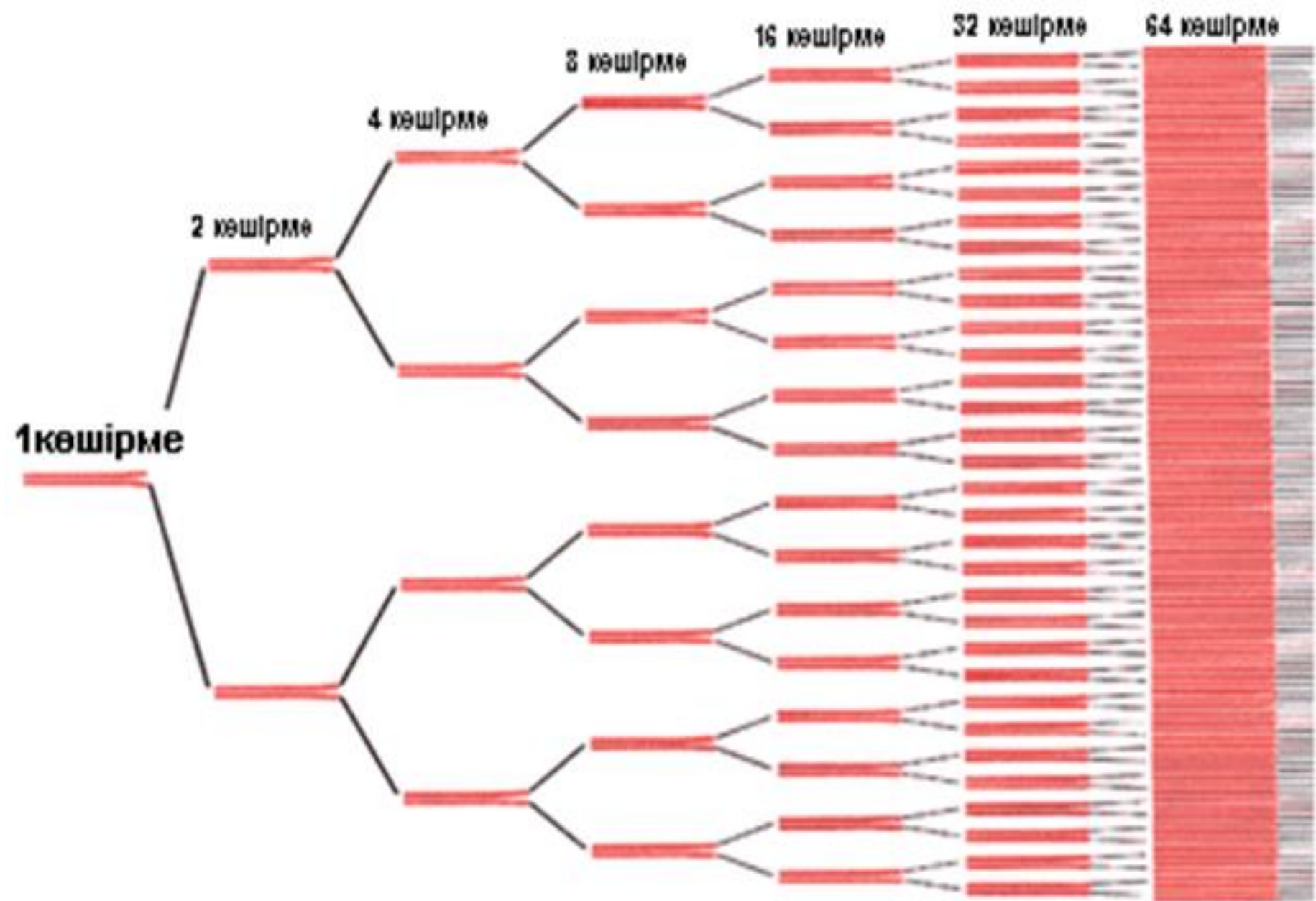
Екінші цикл нәтижесінде керекті реттерден тұратын таза екі бір тізбекті ДНҚ түзіледі.

Үшінші циклде 8 молекула ДНҚ синтезделеді. Солардың екеуі керекті реттерден ғана тұратын қос тізбекті ДНҚ болады, ал төрт қос тізбекті ДНҚ-ның бір тізбектері керекті реттерден тұрады. Циклдерді ары қарай жалғастырған сайын тек керекті реттерден ғана тұратын қос тізбекті ДНҚ геометриялық прогрессия принципімен арта береді.

Төртінші циклде олардың саны 8-ге, бесінші циклде 22, ал 20 циклде - 1.048536, 30 циклде - 1,073741764-ке жетеді. Мұндай керекті реттері бар ДНҚ-ны ампликон дейді. Егер бір цикл 3 минутта болады деп есептелінсе, онда 2 сағат ішінде ДНҚ-ның миллиардтаған копиясын (ампликонды) алуға болады.

Осылайша, дайындалған ерітіндіде **2<sup>n</sup>** формуласы бойынша ампликондар жиналады, мұндағы n - амплификации айналымдардың саны. Сондықтан, егер бастапқы ерітіндіде тек қана бір ДНҚ-ның екі тізбекті молекула болса, **30 циклде** ерітіндіде теория тұрғысынан **1 млрд** ампликон молекулалары жинақталуы тиіс. Агароздық гелде электрофорез әдісімен фрагментті көз мөлшерімен анықтауға осындай мөлшер жеткілікті.





# ПТР-дің модификациялары

- Бір-біріне кіргізілген ( nested PCR)
- Кері транскрипциялық ПТР ( RT PCR )
- Сандық ПТР
- Ұзын фрагментті ПТР ( Long range PCR)
- Инвертирлік ( Inverse PCR ), Асимметриялық ПТР ( asymmetric PCR ),
- Кездейсоқ амплификацияланған полиморфтық ДНҚ-лар ( RAPDs)
- In situ ПТР ( Primis) ISH әдісі секілді
- Мультикомплекттік ПТР (multi PCR)
- Метил-спецификалық ПТР

- **РПА** (Recombinase Polymerase Amplification) - ДТС / RNA күшейту 15 минут ішінде жылу циклді (изотермиялық реакциясыз) қажет болған жерде пайдаланылады [18] [19]
- **Кірістірілген ПТР** (Nested PCR (Eng.)) - реакцияның қосалқы өнімдерінің санын азайту үшін қолданылады. Екі жұп праймерлер қолданылады және екі дәйекті реакция орындалады. Алғашқы реакция өнімі ішінде праймерлердің екінші жұбы ДНҚ аймағын күшейтеді.
- **Инвертелген ПТР** (Кері ПТР (Eng.)) - қажетті тізбектегі шағын бөлік белгілі болған жағдайда қолданылады. Бұл әдіс, әсіресе, ДНҚ-ның геномға енгізілгеннен кейін көрші дәйектілікті анықтау қажет болған кезде пайдалы. Инвертелген ПТР-ны енгізу үшін шектеулермен ДНҚ кесу сериясы жүргізіледі, одан кейін фрагменттерді жалғау (лигатура) орындалады. Нәтижесінде белгілі фрагмент белгісіз аймақтың екі жағында да пайда болады, содан соң ПТР әдеттегідей орындалуы мүмкін.
- **Кері транскрипциясы бар ПТР** (Reverse Transcription PCR, RT-PCR (ағылшын)) - RNA кітапханасынан белгілі бір тізбекті күшейту, оқшаулау немесе анықтау үшін қолданылады. Дәстүрлі ПТР алдында бір ретті DNA молекуласы рРТҚ арқылы mRNA үлгісінде синтезделеді және ПТР үлгісі ретінде пайдаланылатын бір реттік қапталған cDNA алынады. Бұл әдіс осы гендерді қайда және қашан көрсетілетінін жиі анықтайды.
- **Асимметриялық ПТР** (Ағылшын асимметриялық ПТР) - бастапқы ДНҚ тізбегінің біреуін күшейту қажет болған кезде жүзеге асырылады. Кейбір дәйекті және гибридизациялық талдауларда қолданылады. ПТР кәдімгідей жүзеге асырылады, тек бір праймердің үлкен артықшылығы қабылданады. Әр түрлі шоғырлануы бар праймерлерді пайдаланатын *Exponential-PCR* (LATE-PCR) және жоғары концентрациялы праймер жоғары концентрациялы праймерден жоғары (балқу нүктесі) таңдалады. ПЦР жоғары қыздыру температурасында жүзеге асырылады, осылайша реакцияның барлық циклдарында тиімділігін сақтауға болады.

**Сатылы ПТР (Touchdown PCR (англ.) )** —Алғашқы циклдар оңтайлы қыздыру температурасынан жоғары температурада жүзеге асырылады, содан кейін әрбір бірнеше циклде жану температурасы оңтайлы түрде біртіндеп төмендейді. Бұл праймердің толық ұзындығы бойынша толықтыратын тізбекті гибридизациялауды қамтамасыз ету үшін жасалады, ал оңтайлы тозаңдату температурасы кезінде праймер ішінара қосалқы тізбемен гибридталады. Геномдық ДНҚ бойынша праймердің ішінара гибридизациясы, егер праймерге байланыстыратын көптеген учаскелер болса, арнайы емес күшейтуге әкеледі. Көптеген жағдайларда ПТР алғашқы он циклін 72-75 ° С температурада жүргізуге болады, содан кейін оңтайлы, мысалы, 60-65 ° С дейін төмендейді.

•**Молекулалық колония әдісі** (ПТР гелінде, Ағылшын колониясы - ПТР колониясы) - ПЦР барлық компоненттерімен акриламидті гельді полимерлеу және PCR жүргізу. Талдаған ДНҚ бар нүктелерде молекулалық колониялардың қалыптасуымен күшейту жүреді.

•**cDNA ұштарының жылдам күшейткішімен PCR** (туғаннан кейінгі cDNA ұштарының жылдам өрнектелуі, RACE-PCR).

•**Ұзын үзінділердің ПТР (Long-range PCR)** - ұзартылған ДНҚ аймақтарын амплификациялауға арналған ПТР түрлендіруі (10 мың және одан да көп негіздер). Екі полимераза қоспасын қолданыңыз, олардың біреуі - *Tag* полимераза (ДНҚ-ның ұзын тізбегін синтездеуге қабілетті), екіншісі - 3'-5'-экзонуклеазы белсенділігі бар *Pfu* полимераза. Екінші полимераза бірінші полимеразамен енгізілген қателерді түзету үшін қажет. *Tag* -полимераза ДНҚ синтезін тоқтатады, егер қосымша нуклеотид қосылса. Бұл қосымша нуклеотид *Pfu* полимеразасымен жойылады. Полимераза қоспасы 50: 1 қатынасында немесе 100: 1-ден аз болса, онда *Tag*-полимеразы 25-100 есе көп қабылданады

•**Раппе** (Полиморфтық ДНҚ-ны Кездейсоқ амплификациялау), полиморфтық ДНҚ-ны кездейсоқ амплификациялай отырып, ПТР генетикалық жүйедегі ұқсас ағзаларды, мысалы, өсірілетін өсімдіктердің, ит тұқымдарының немесе тығыз байланысты микроорганизмдердің әртүрлі сорттарын ажырату қажет болғанда қолданылады. Бұл әдіс бойынша әдетте бір кішкентай праймер (шамамен 10 б.п.) қолданылады. Бұл праймер зерттелген ағзалардың кездейсоқ ДНҚ аймақтарына ішінара қосымша болады. Шартты таңдау арқылы (праймер ұзындығы, оның құрамы, температурасы және т.б.) екі организм үшін ПТР үлгісінде қанағаттанарлық айырмашылыққа қол жеткізуге болады.

•**Топқа тән ПТР** (топқа тән ПТР) - осы тізбектер бойынша консервативті праймерлерді қолданатын бір немесе бірнеше түрлердің ішінде тиісті тізбектерге арналған ПТР. Мысалы, рибосомалық гендер үшін әмбебап праймерлерді таңдау **18с** және **26с** түрге тән аралық кеңістікті күшейту үшін: ген тізбегі **18с** және **26с** түрлер арасындағы консервативті, сондықтан зерттелген барлық түрлер үшін осы гендер арасындағы ПТР орындалады. Бұл әдіске керісінше **бірегей PCR** (ең бірегей ПТР), онда міндет барлық байланыстылардың тек бірізділігін күшейту үшін праймерлерді таңдау болып табылады.

•**ПТР ыстық бастау арқылы** (Ағылшын ПТР) - ДНҚ полимеразы көмегімен ПТР модификациясы, онда полимеразды белсенділік антиденелермен немесе антиденелерді имитациялайтын Affiody түріндегі кішкентай молекулалармен, яғни ПТР-де бірінші денатурациядан бұрын реакцияны орнатқан кезде, бөлме температурасында блокталады. Әдетте, бірінші денатурация 95 ° С кезінде 10 минутта жүргізіледі.

•**Виртуалды PCR** геномның, хромосоманың, дөңгелек ДНҚ-ның немесе ДНҚ-ның әлеуетті күшейтуін болжау үшін праймерлік тізбектердің тізбесін (немесе ДНҚ-зондтарын) пайдалана отырып, теориялық полимеразалық тізбекті реакцияны компьютерлік талдаудың математикалық әдісі (силикс PCR, сандық PCR, электрондық PCR, e-PCR) кез-келген ДНҚ бөлімі.

# Real Time PCR

Нақты уақыттағы ПТР әдісі өнімнің жинақталу процесін бақылауға мүмкіндік беретін флуоресценция сигналын детектеуге негізделген. ПТР (Realtime PCR) әдісінің мәні электрофорезсіз арнайы құрылғы көмегімен амплификация өнімдерінің жинақталуын зерттеу болып табылады. Амплификация өнімдерінің жинақталу кинетикасы матрицаның алғашқы санымен байланысты болғандықтан, бұл оның санын дәлме-дәл бағалауға мүмкіндік береді. Классикалық ПТР қарағанда бұл әдістің ерекшелігі зерттелетін өнімдерде ДНҚ/РНҚ нақты сандық анықтауға болатындығы және электрофорез сатысының болмауы, ПТР зертханасында жұмыс жасауға қойылатын ерекше қатаң талаптар және алынған нәтижелерді автоматты түрде тіркеу және түсіндірілуі. Электрофорез сатысының болмауының артықшылығы, жалған оң көрсеткіш санын азайтуға мүмкіндік береді.

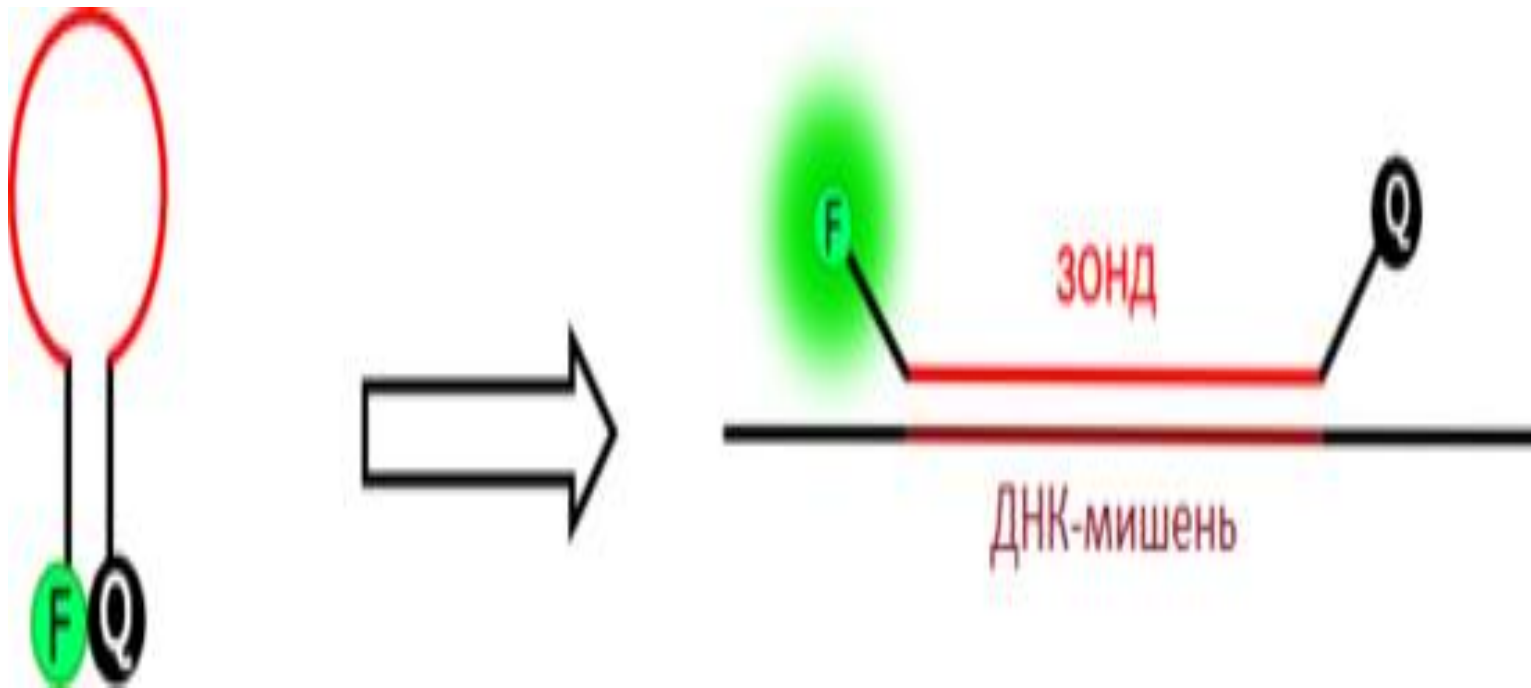
# Зондтардың әртүрлілігі

## Екі еселенген ДНҚ-ны таңбалау. ДНҚ-мен спецификалық емес байланысатын химиялық агенттерді қолдану

- ✓ Бұл жағдайда затбелгі (метка) ДНҚ қос спиральына араласуға қабілетті химиялық қосылыс болып табылады. Спецификалық емес бояғыштар ДНҚ-ның бір тізбегімен емес, қос тізбегімен байланысады. Мұндай зонд, РСR өнімдерімен өзара әрекеттескенде конформациясын өзгертіп, флуороформға айналады. Детекция әр циклдың соңында денатурация басталмай тұрып өткізіледі. Осындай бояуларға мысал ретінде кеңінен қолданылатын SibrGreen1 болуы мүмкін. Реакциялық қоспаға SibrGreen1 бояғышын қосқанда ДНҚ-ның қос тізбегімен байланысып, флуоресцент интенсивтілігі көбейеді. Денатурация процесі кезінде ДНҚ тізбегінен алыстайды және флуоресцент интенсивтілігі азаяды. Полимеризация сатысында бояғыш ПЦР-дің өнімімен қайтадан бірігеді. Полимеризация аяқталғанда бояғыш нуклеин қышқылымен толығымен байланысады. Және бұл флуоресцент интенсивтілігінің тез көбеюіне әкеледі.

## Элонгация кезіндегі таңбалау. Флуоресцентті зондтарды қолдану

- ✓ 5' және 3' соңына флуорофор мен сөндіргіші тігілген зонд қолданылады. Егер зондтың реттілігі өте ұзақ болмаса, тіпті ДНК-байланыстағы күйде, екі химиялық реактивтер бір-бірімен өзара әрекеттесе алады және флуоресценция шығарылмайды. Элонгация кезінде 5'-3'-экзонуклеазалық белсенділігі бар ДНК полимераза, бір нуклеотидтен зондты мақсатты ДНК-дан ажыратады. Осы процестің нәтижесінде флуорофор да, оның сөндіргіші де ерітіндіге сіңіп бір-біріне жақын тұста табылу ықтималдығы кішкентай болады және флуоресценция қалпына келеді





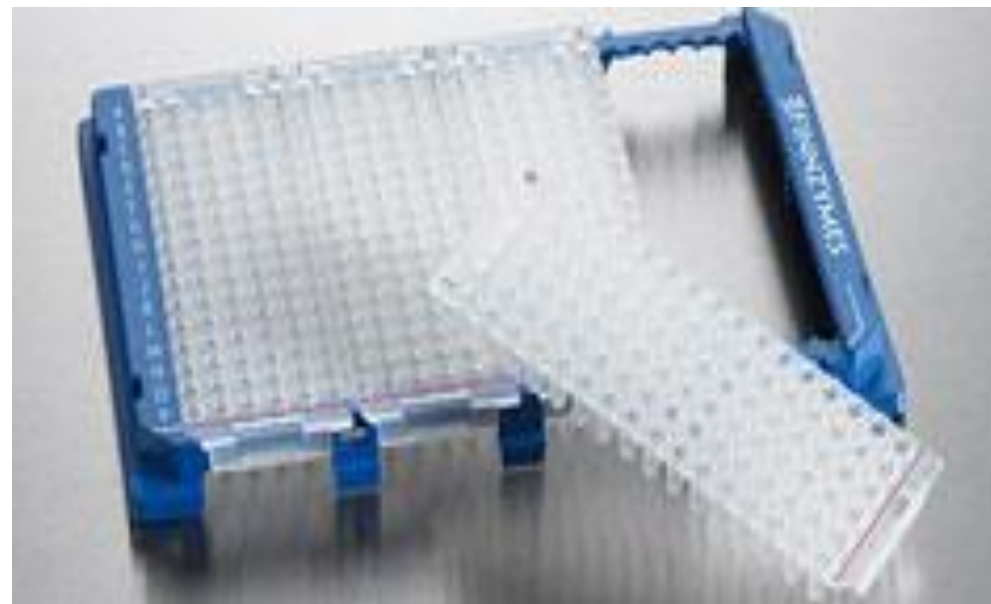
# Амплификатор

PCR Real Time – флюориметрмен бірге арнайы амплификаторда жүргізеді. ПТР процесінде амплификация результаты есептеліп шығады. Кеңінен қолданылмайтын себебі – құралдың қымбат тұруы.



- Амплификатор (термоциклер) құралы 0,1 °С дәлдікпен мезгіл мезгіл пробиркаларды салқындатып, қыздырып тұрады. ПТР үшін флуоресценттік детектормен жабдықталған құралдар жасалған. Автоматталған қақпағы және микропланшеттер үшін бөлімдері бар құралдар шығарылады, оларды автоматталған жүйелерге қосуға болады.

- Зерттеу ұзақ уақытты қажет етпейді. Қазіргі жаңа технологияның дамыған кезеңінде қоздырғышты бөліп алу және өсіру, одан нуклеин қышқылын бөліп алу үрдістері толығымен стандартталған және автоматтандырылған. Әдістің автоматизациялығы қолмен жүргізілетін зерттеу кезінде кездесетін мүмкін қателіктерді азайтады. Нәтиже бірнеше сағаттың ішінде алынуы мүмкін.



## ***Кәдімгі ПТР мен нақты уақыттағы ПТР арасындағы айырмашылық неде?***

- Кәдімгі ПТР көп уақытты қажет етеді, өйткені күшейтілген ПТР өнімдерін талдау үшін гель электрофорезін қолданады. Керісінше, нақты уақыт режимінде ПТР аз уақытты алады, өйткені реакцияның алғашқы фазаларында күшейтуді анықтай алады.
- Нақты уақыттағы ПТР деректерді ПТР экспоненциалды өсу кезеңінде, ал дәстүрлі ПТР реакцияның соңғы нүктесінде жинайды.
- Кәдімгі ПТР нәтижелері өте дәл болмауы мүмкін, бірақ нақты уақыттағы ПТР нәтижелері өте дәл.
- Нақты уақыттағы ПТР кәдімгі PCR-ге қарағанда сезімтал.
- Кәдімгі ПТР ажыратымдылығы өте төмен, ал нақты уақыттағы ПТР жоғары ажыратымдылыққа байланысты өте аз өзгерістерді анықтай алады.
- Кәдімгі ПТР-ді анықтауда қысқа динамикалық диапазон бар, ал нақты уақытта ПТР-де кең динамикалық диапазон бар.
- Кәдімгі ПТР айырмашылығы, нақты уақыт режимінде ПТР-де автоматтандырылған анықтау әдістері бар.
- Кәдімгі ПТР нақты уақыттағы ПТР-ге қарағанда өте күрделі және еңбек сыйымдылығы жоғары.
- Нақты уақыттағы ПТР-ге қарағанда, қарапайым ПТР өлі және тірі бактерияларды ажырата алмайды.