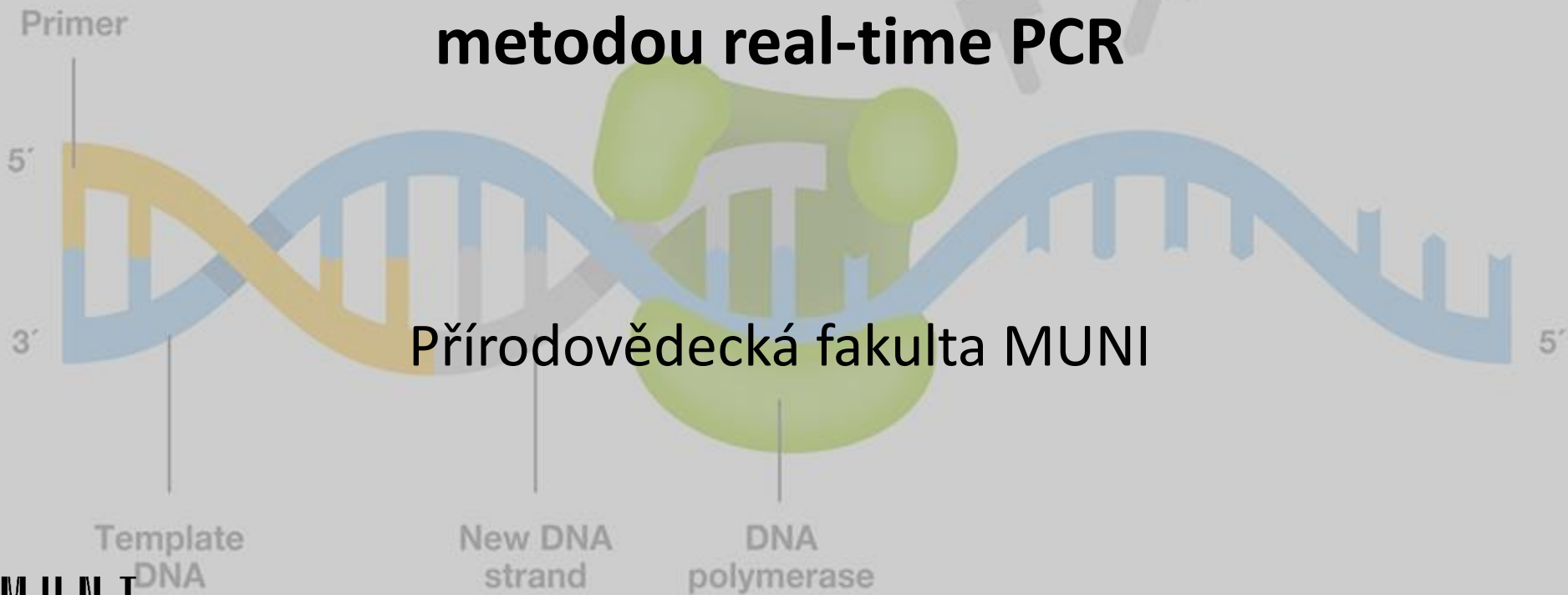


Cvičení č. 5

Detekce virové DNA v biologickém materiálu metodou real-time PCR



CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Teoretický úvod k tématu
- 2) Seznámení se s protokolem ke cvičení
- 3) Nastudování protokolu ke kitu pro detekci virové DNA
- 4) Izolace virové DNA ze vzorku simulované moči
- 5) Real-time PCR se vzorkem izolované virové DNA
- 6) Příklady

Široké využití v mikrobiální diagnostice:

- detekce NK infekčních agens v klinické mikrobiologii
- Hodnocení kvality potravin
- Hodnocení biologického rizika
- Hodnocení kvality vody
- Detekce GM mikroorganismů atd. ...

PRINCIP REAL-TIME PCR

- **Kombinovaná amplifikace a detekce cílové NK**
současně v jedné zkumavce pomocí světelného signálu z fluoroforů (základ stejný jako klasická PCR)
- Je možno dynamicky (v reálném čase) posuzovat průběh syntézy PCR produktu
- Možné **kvalitativní** (NK je/není ve vzorku přítomna) i **kvantitativní** (ve vzorku je X molekul NK) vyhodnocení

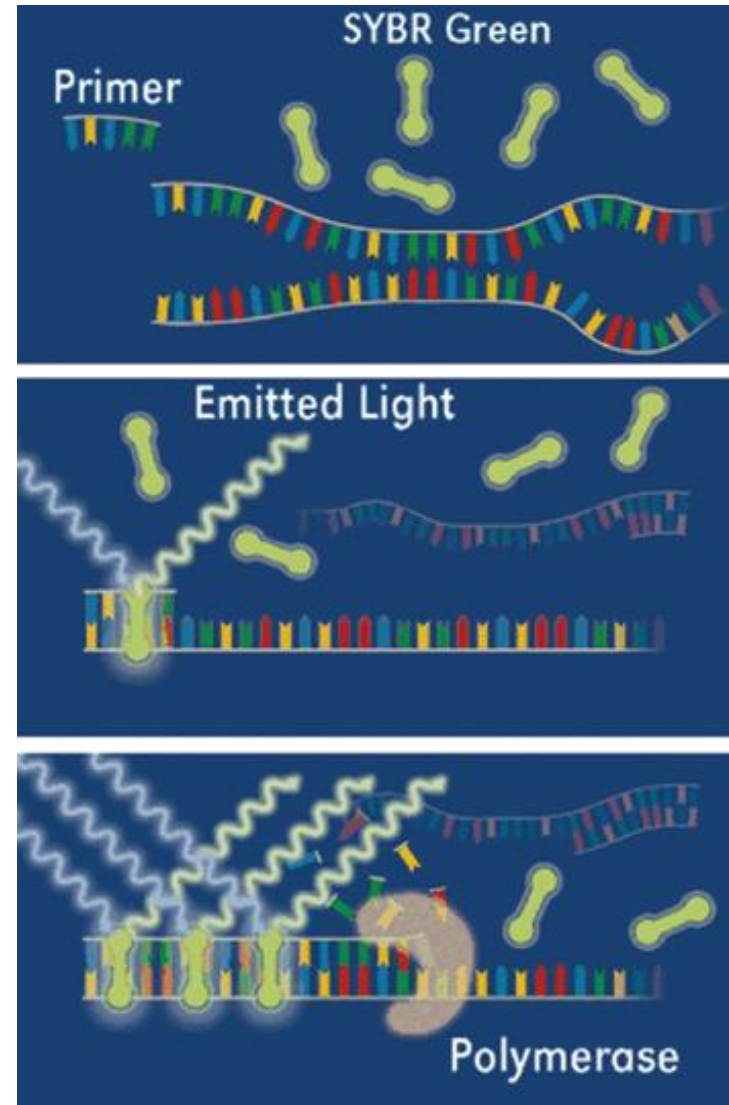
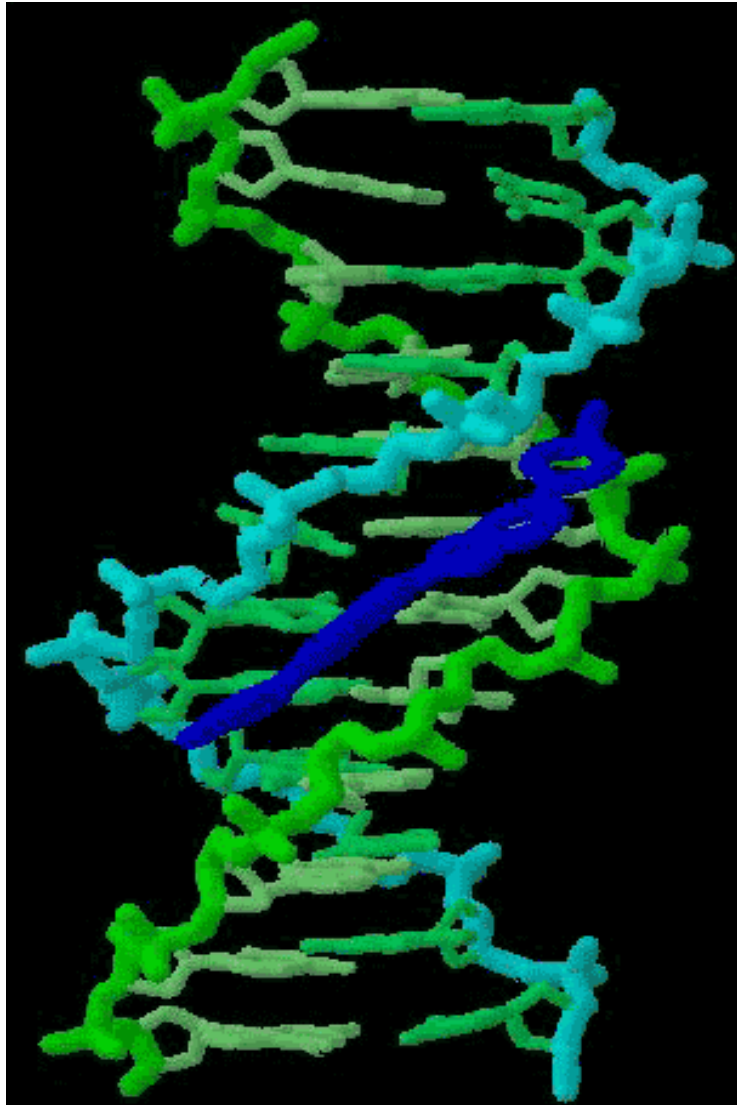
DĚLENÍ REAL-TIME PCR DLE POUŽITÝCH FLUOROFORŮ

1) **Nespecifické metody:** nespecifická vazba fluoroforu přímo do vznikajících produktů PCR (ds DNA), např.

SYBR® Green I

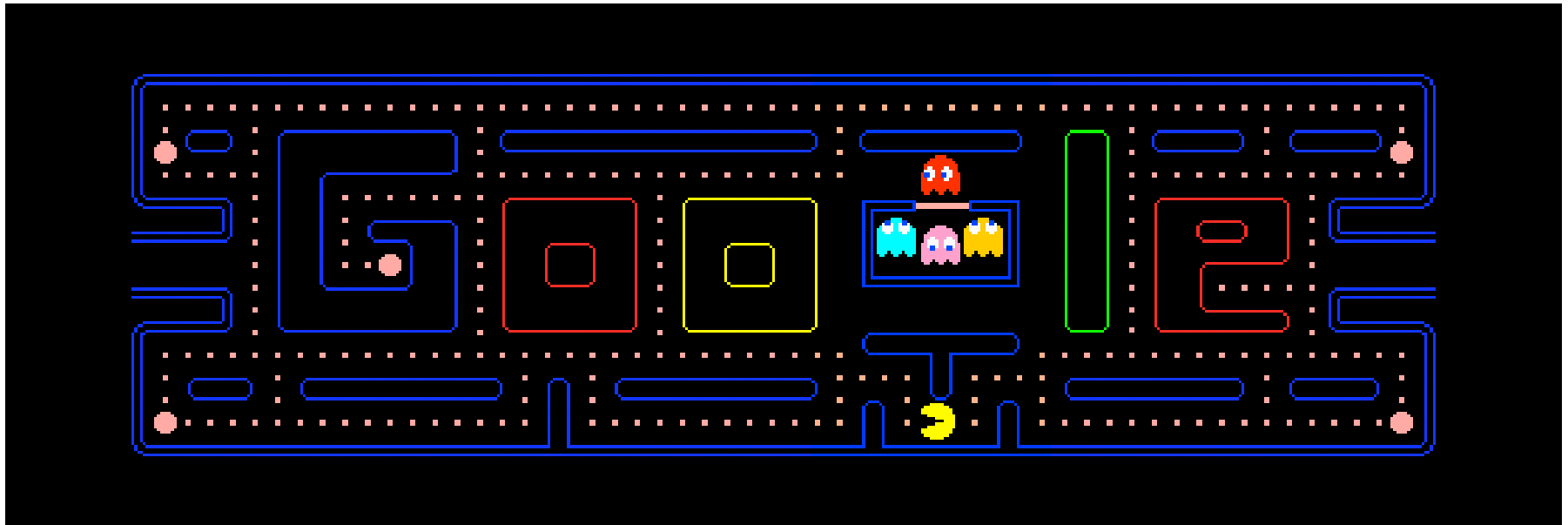
- **Výhody:** jednoduché provedení, nízká cena
- **Nevýhody:** možná detekce i nespecifických produktů (fluorofor se váže do všech dsDNA produktů)

DĚLENÍ REAL-TIME PCR DLE POUŽITÝCH FLUOROFORŮ



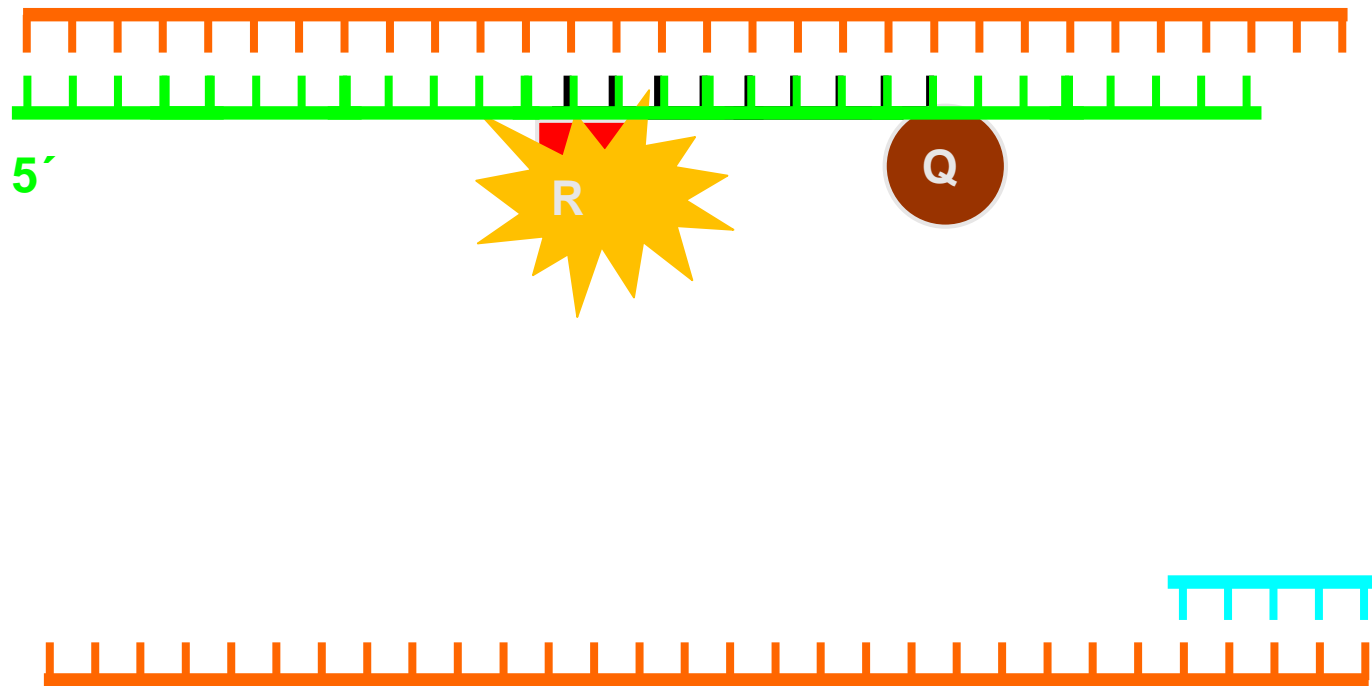
DĚLENÍ REAL-TIME PCR DLE POUŽITÝCH FLUOROFORŮ

- 2) Specifické metody: na PCR produkty se váží hybridizační sondy značené fluoroforem, např. **TaqMan®**, lineární či vlásenkové sondy **FRET**,



DĚLENÍ REAL-TIME PCR DLE POUŽITÝCH FLUOROFORŮ

Princip technologie TaqMan

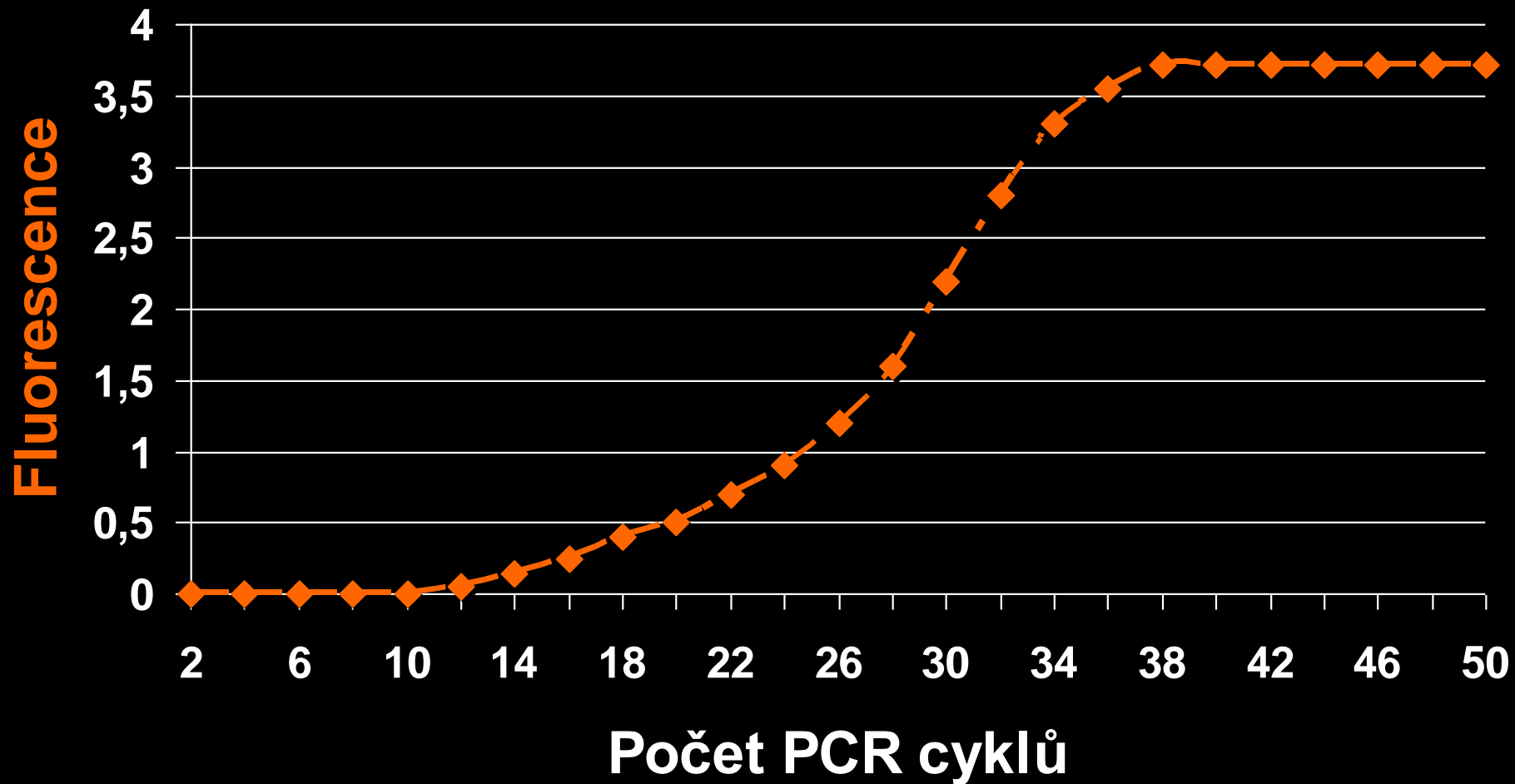


R: např. 6-karboxyfluorescein (FAM)

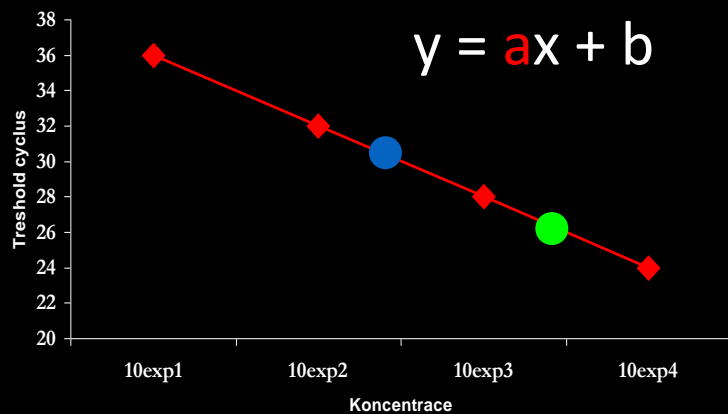
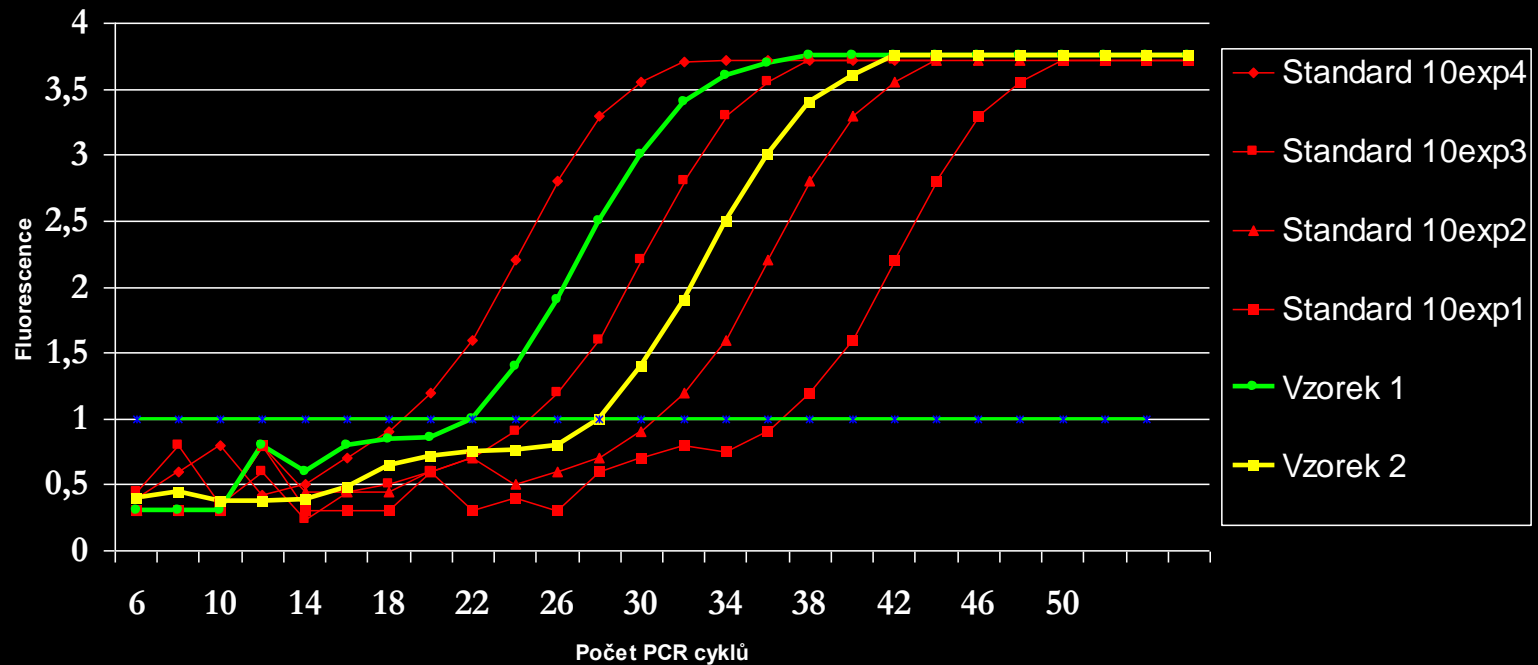
Q: např. tetramethylrhodamin (TAMRA)

FRET: Försterův rezonanční přenos energie

VÝSLEDEK REAL-TIME PCR JE VŽDY STEJNÝ



KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ POMOCÍ KALIBRÁTORŮ



Vzorek	Typ vzorku	Ct	Koncentrace (kopií/ul)
1	Neznámý	25,64	3,50E+03
2	Neznámý	29,23	2,50E+02
K1	Standard	23,97	1,00E+04
K3	Standard	27,16	1,00E+03
K3	Standard	30,68	1,00E+02
K4	Standard	33,53	1,00E+01

PŘÍSTROJE PRO REAL-TIME PCR



ZABRÁNĚNÍ KONTAMINACE URACIL-DNA GLYKOSYLÁZOU

