

# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

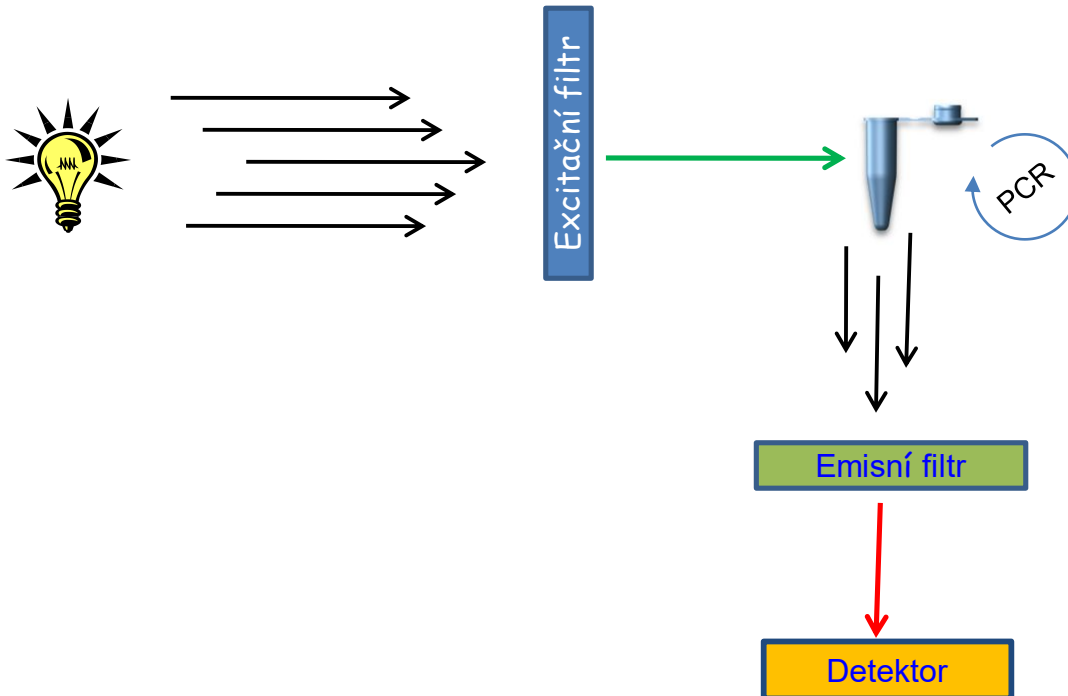


## III. Instrumentace

# Instrumentace

PCR - termocykler

qRT-PCR - termocykler kombinovaný s fluorimetrem



## Zdroje excitačního záření

### Halogenová lampa

- Všechny vlnové délky viditelného světla (320nm – 2600nm)
- Uniformní excitace
- př. ABI 7300, 7500, Stratagene Mx4000/Mx3000p, BioRad iCycler
- Normalizace fluorescence (Rox)

### Laser

- Specifická vlnová délka
- Není nutný excitační filtr
- Omezený výběr fluoroforů
- př. ABI PRISM 7700/7900

### LED

- Úzké pásmo vlnové délky (30-40nm)
- Běžné LED emitují na 430, 450, 505, 592, 612 a 637 nm
- nově i modrá a UV část spektra
- př. Corbett Rotor-Gene, Roche Light Cycler

# Instrumentace

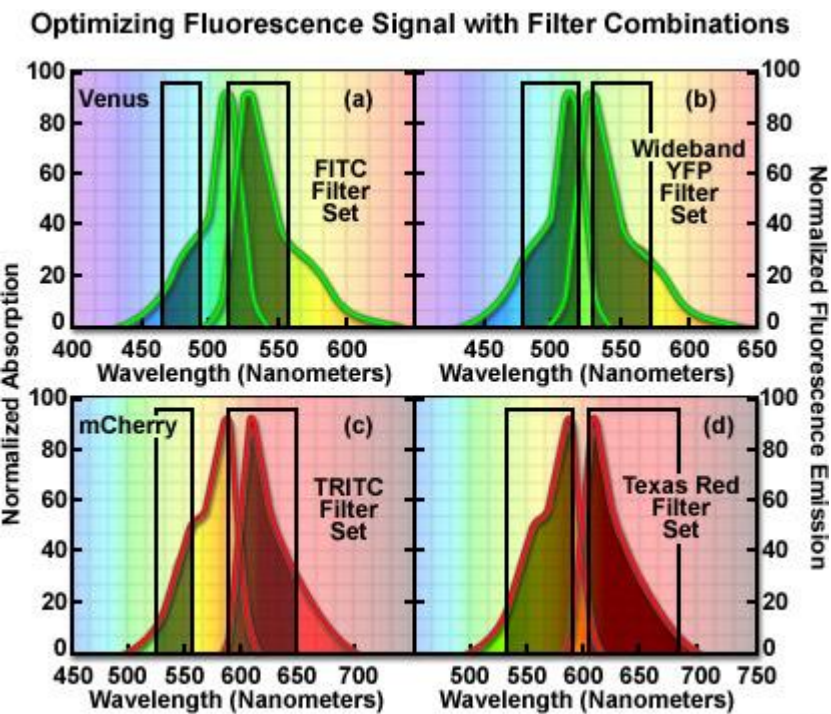
## Filtry

Excitační/emisní – selekce excitační/emisní vlnové délky

Optická kvalita filtru často určuje výkonost přístroje

Bandpass a Long Pass Filtry

Volba fluoroforu



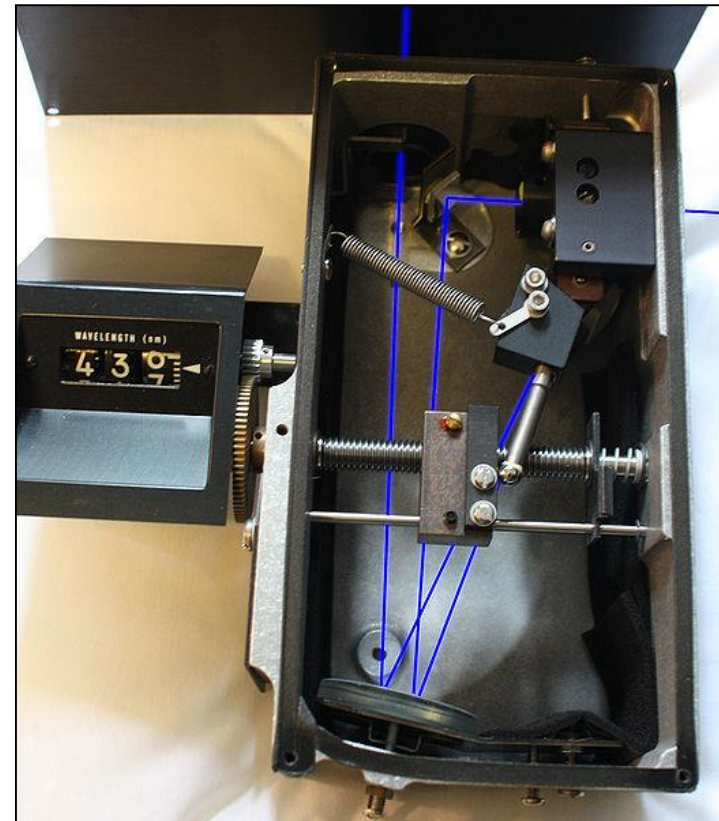
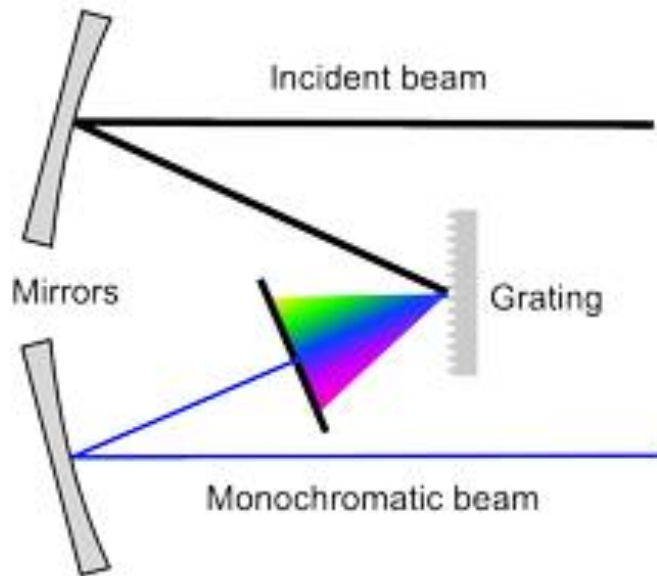
# Instrumentace

## Monochromátor

Volba libovolné vlnové délky

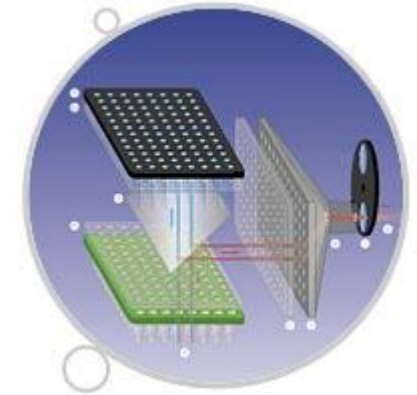
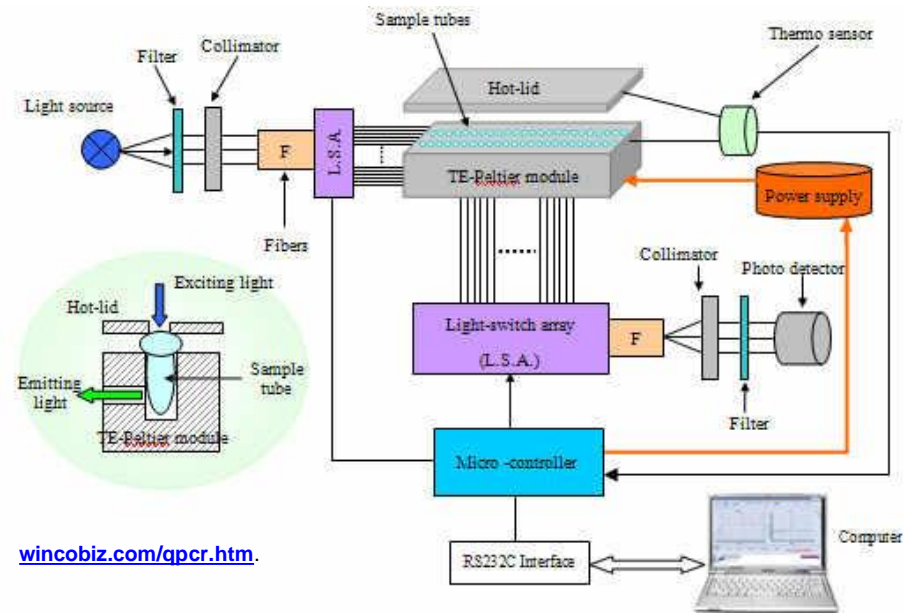
Difrakční mřížka

Fotodetektory  
Snímací zařízení (CCD)

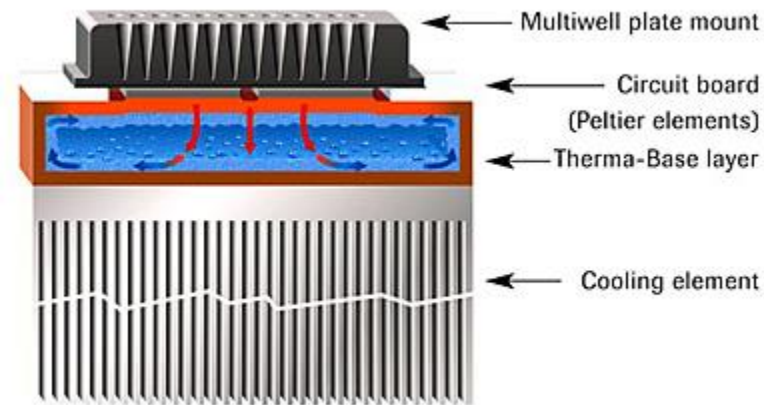


# Instrumentace

## Teplotní uniformita



[wincobiz.com/qpcr.htm](http://wincobiz.com/qpcr.htm)





# Instrumentace

## Parametry RT cyklu

Citlivost – minimální kvantifikovatelné množství templátu – fluorescence, kterou je přístroj schopný odlišit od úrovně pozadí (šum)

Dynamický rozsah – rozsah koncentrací – rozsah intenzity fluorescence

Linearita – intenzita fluorescence je ideálně lineární

ale:

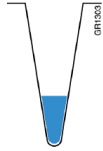
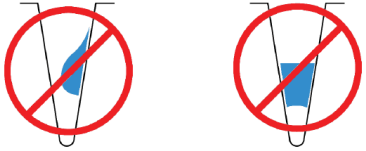
- koncentrace:

- vysoká koncentrace vzorku – nemusí dojít k excitaci
- i u „normálních“ koncentrací, může dojít k preferenčnímu absorbování světla povrchovými vrstvami vzorku, vzdálenější část vzorku už není excitována světlem o stejné intenzitě

- optická dráha

- laboratorní plastik

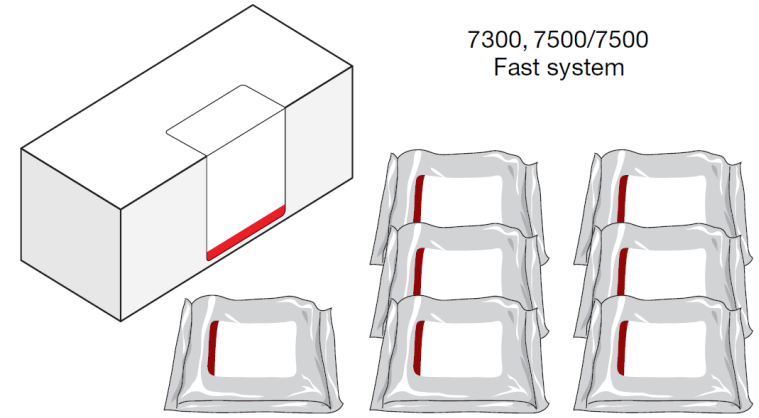
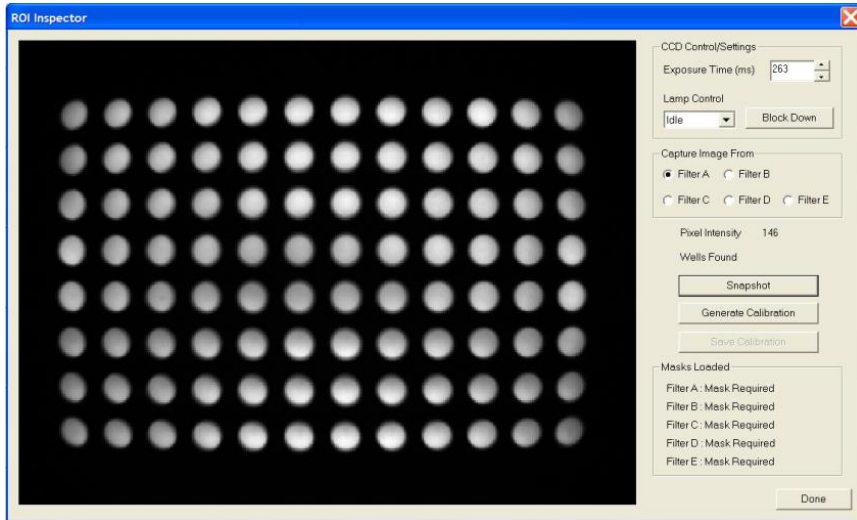
- homogenita vzorku

Correct	Incorrect
 <p>Liquid is at bottom of well.</p>	 <ul style="list-style-type: none"><li>• Not centrifuged with enough force, or</li><li>• Not centrifuged for enough time</li></ul>

Fluorescenční standardy – kalibrace přístroje

# Instrumentace

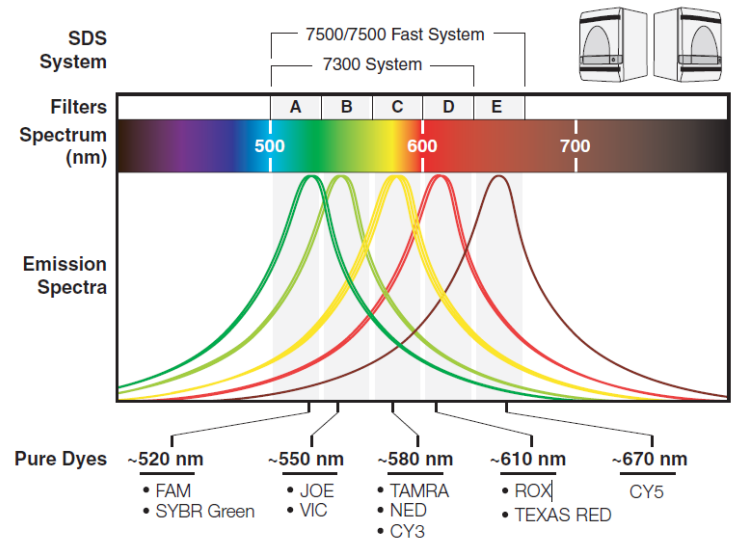
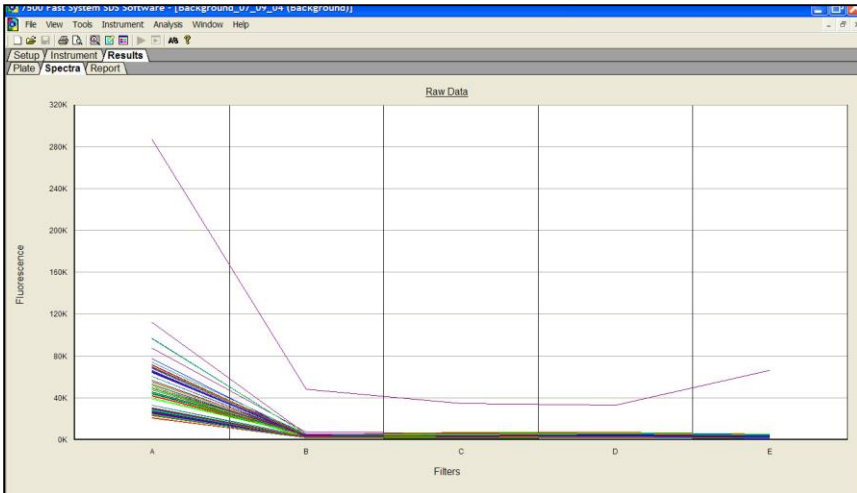
## Kalibrace



Applied Biosystems  
Real-Time PCR System  
Spectral Calibration Kit

7300, 7500/7500  
Fast system

Pure Dye Plates  
(FAM™, JOE™, NED™,  
ROX™, SYBR® Green,  
TAMRA™, and VIC® dyes)



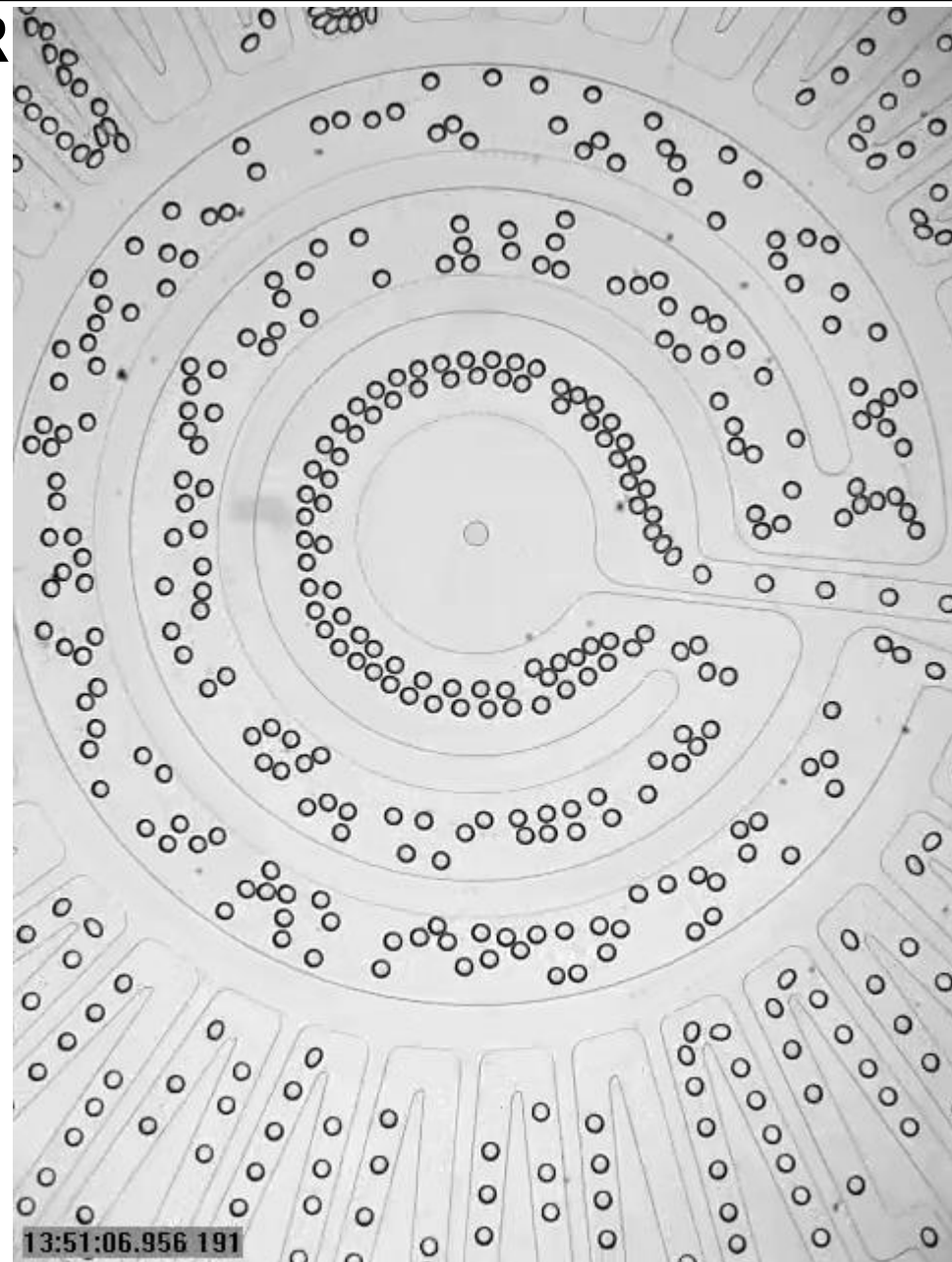


## High-throughput droplet PCR

Tvorba „droplets“

1 droplet = 1 PCR

Fluorescenční analýza



Andrew deMello

<http://www3.imperial.ac.uk/people/a.demello/research>

# Droplet Digital PCR (dd-PCR)

- determination of absolute values
- high accuracy, sensitivity
- better reproducibility even for very small amounts of starting material

MM specific  
IgH sequence  
in total DNA

Sample partition  
20 000 droplets  
random distribution  
of target DNA

PCR amplification  
each droplet provides  
**positive** or **negative**  
fluorescent signal  
indicating **presence** or  
**absence** of target DNA

