

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

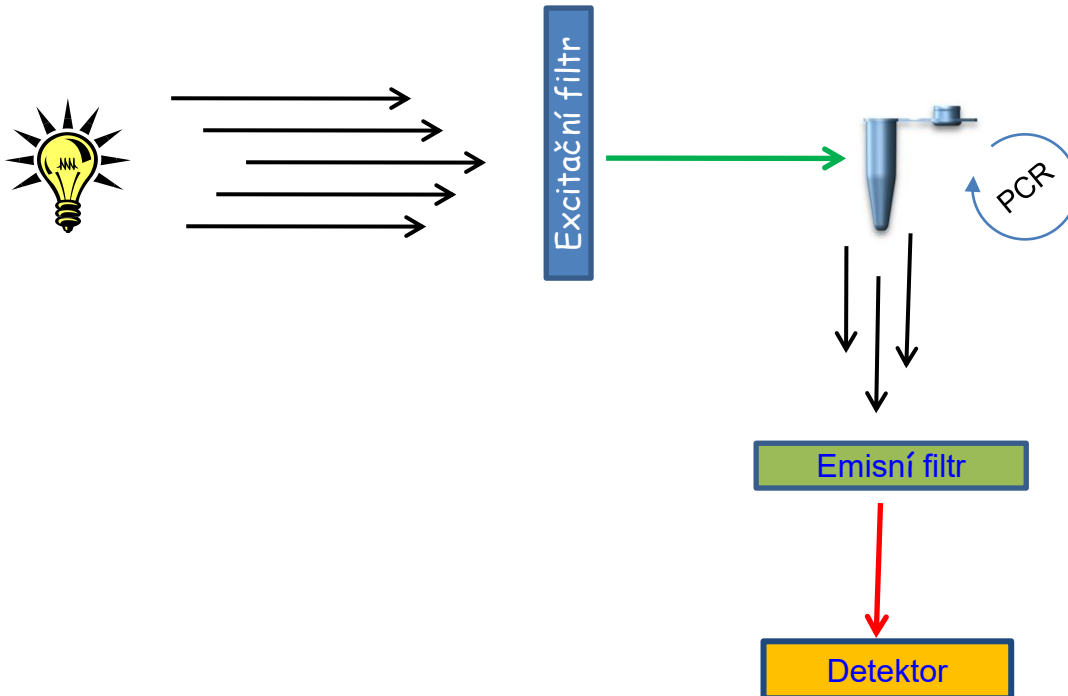


III. Instrumentace

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

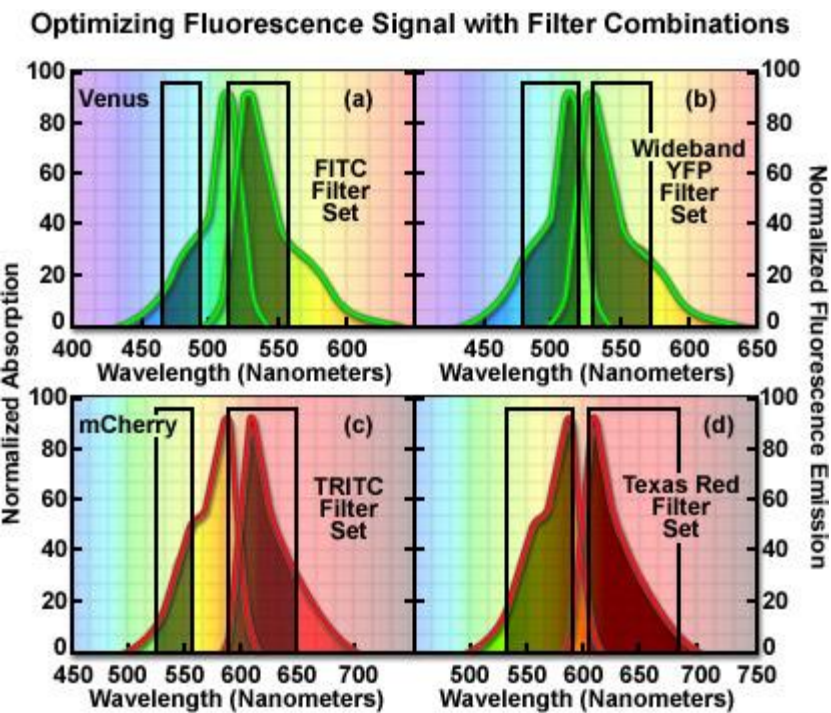
Filtry

Excitační/emisní – selekce excitační/emisní vlnové délky

Optická kvalita filtru často určuje výkonost přístroje

Bandpass a Long Pass Filtry

Volba fluoroforu



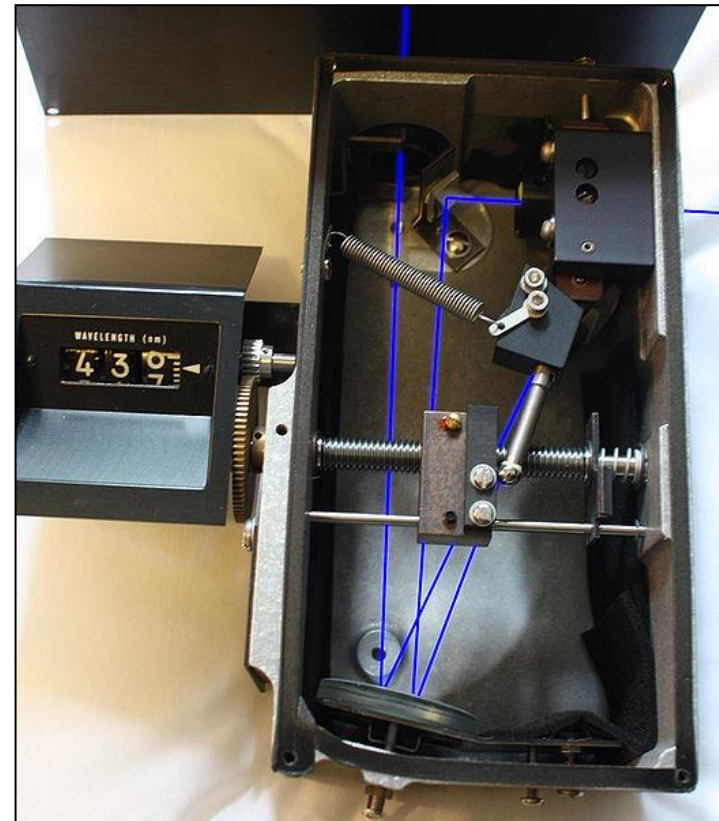
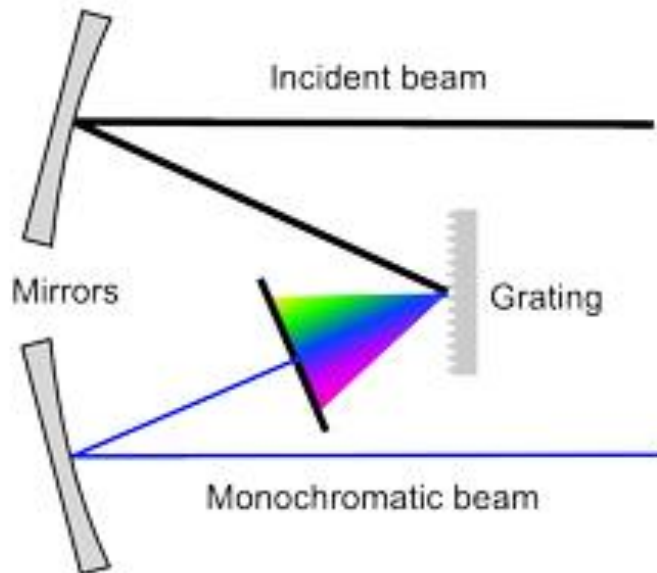
Instrumentace

Monochromátor

Volba libovolné vlnové délky

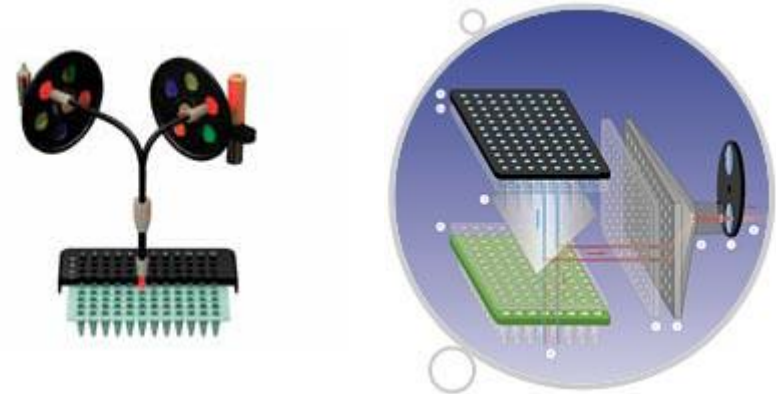
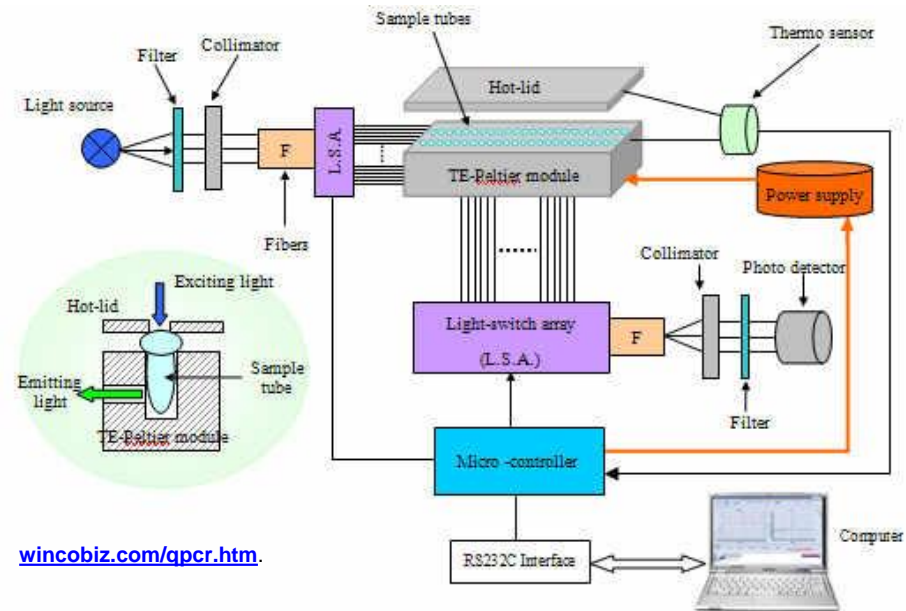
Difrakční mřížka

Fotodetektory
Snímací zařízení (CCD)

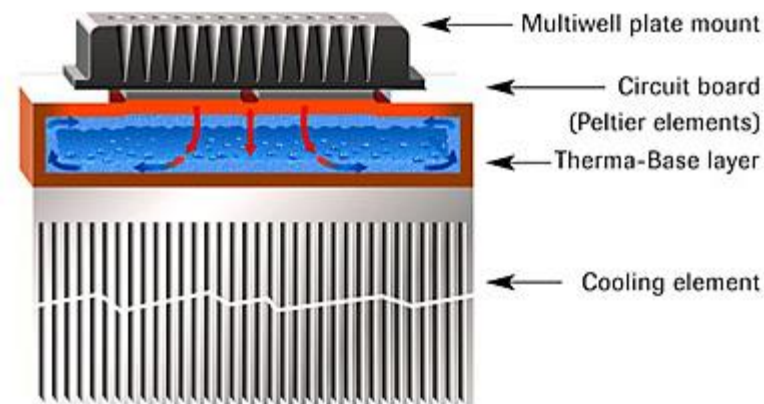


Instrumentace

Teplotní uniformita



wincobiz.com/qpcr.htm



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:

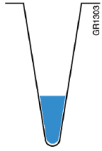
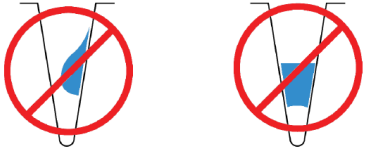
- koncentrace:

- 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

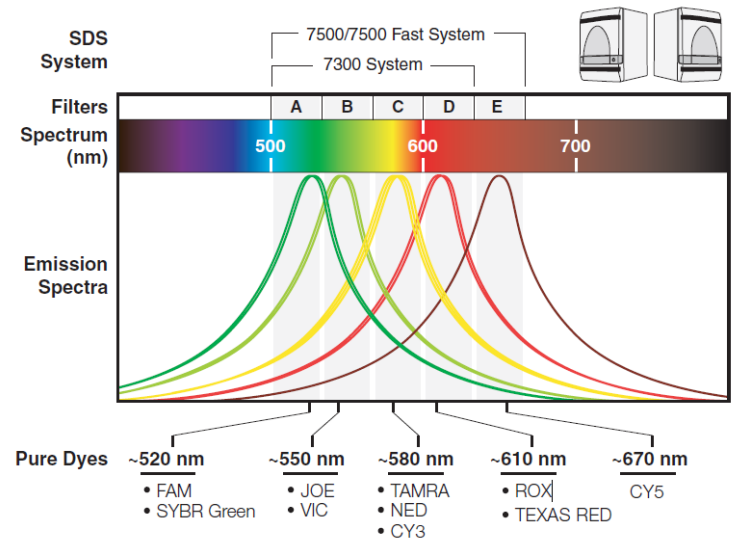
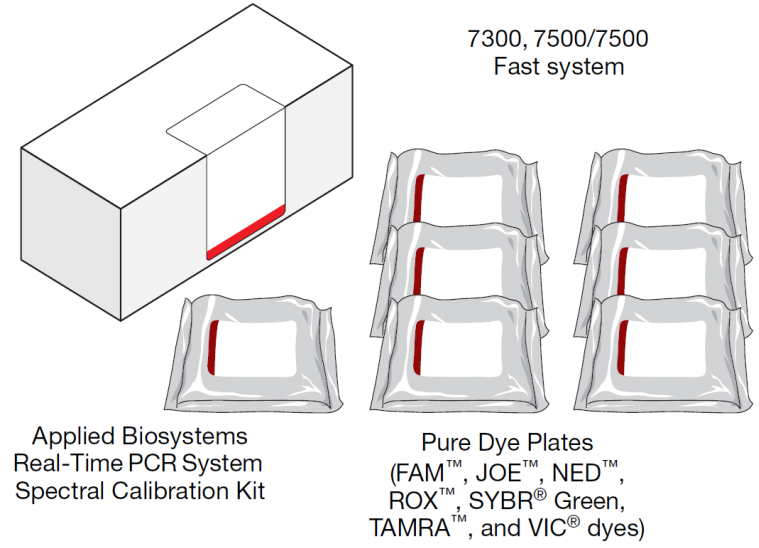
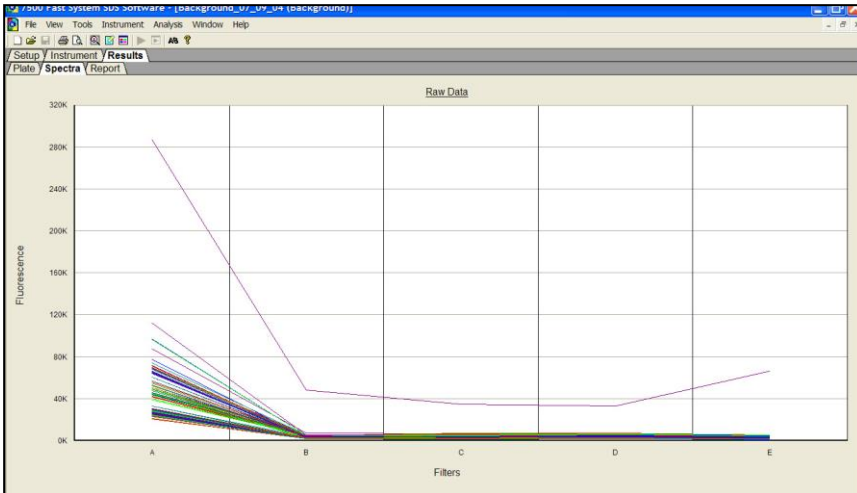
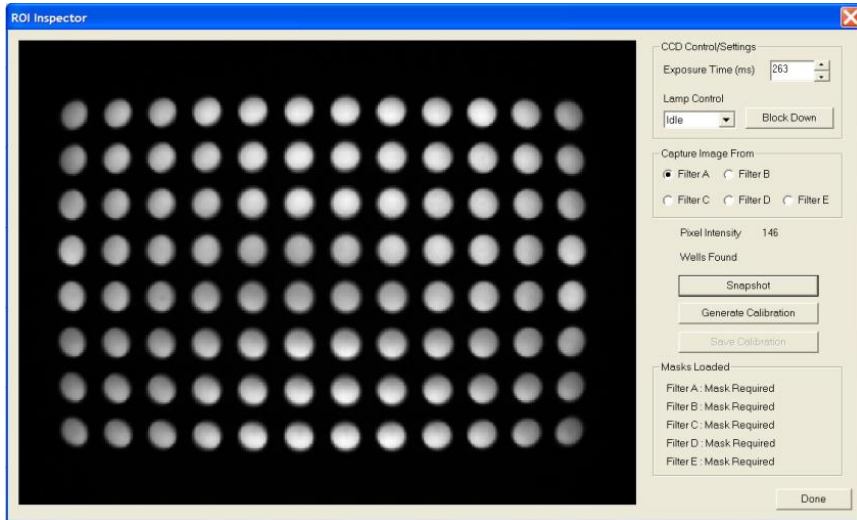
- homogenita vzorku

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

Fluorescenční standardy – kalibrace přístroje

Instrumentace

Kalibrace

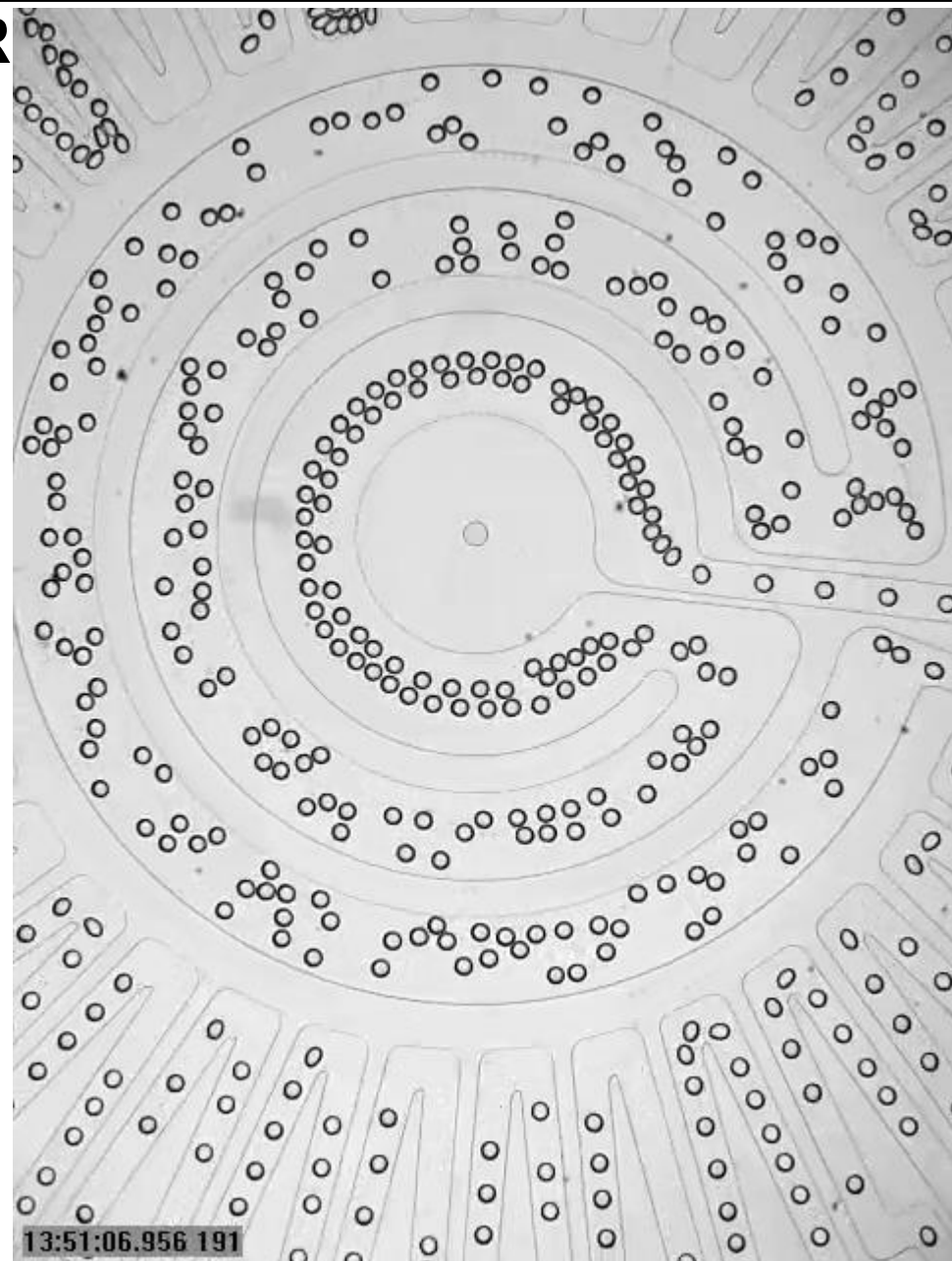
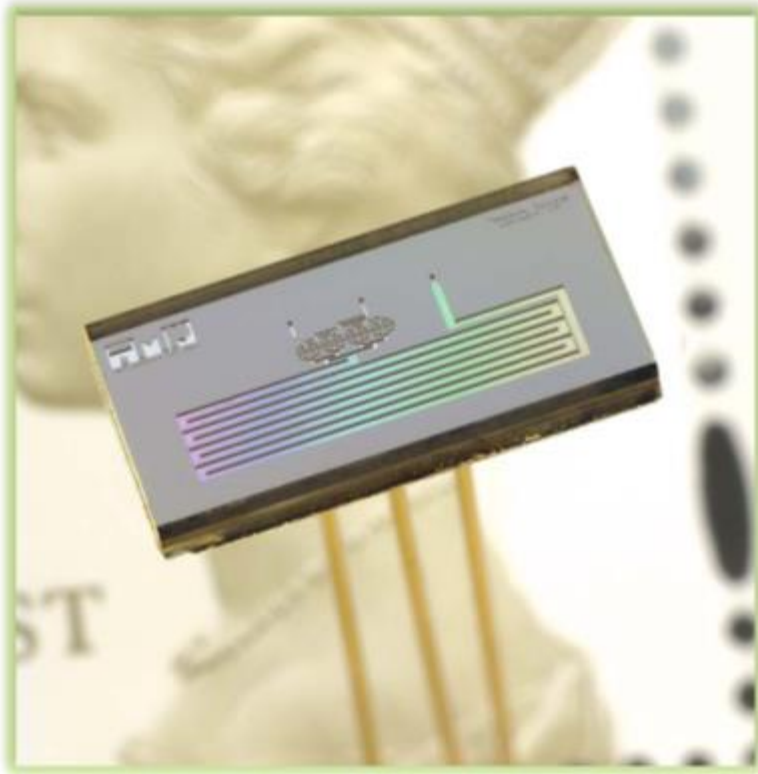


High-throughput droplet PCR

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

