

PCR v reálném čase – RQ PCR

Výhody PCR v reálném čase

V klasické PCR, kde detekujeme konečné produkty amplifikace, se může stát, že se v reakci, kde byla už od počátku vysoká rychlost amplifikace vzorku, vyčerpá některá ze složek reakčního mixu. Teoreticky ho pak mohou vzorky, u kterých reakce probíhala pomaleji, “doběhnout” v několika cyklech PCR, což ale na gelu při klasickém způsobu stanovení na gelu nerozeznáme (viz Dodatek).

RQ-PCR oproti tomu detekuje průběh reakce v každém kroku PCR cyklu. To je umožněno měřením intenzity fluorescence, která narůstá závisle na amplifikaci produktů, v přístroji, který obsahuje detektor pro snímání této fluorescence.

Templát TSR8 se využívá při stanovení aktivity telomerázy jako kontrola, jestli byly všechny složky reakčního mixu v pořádku. TSR8 obsahuje sekvenci TS primeru a k němu připojených 8 telomerových repetit.

V PCR jsou produkty amplifikovány pomocí primeru TS a reverzního primeru Hutpr (na obrázku RP), který obsahuje telomerovou sekvenci.

Postup

1. Připravte si devět 0,2 ml sterilních zkumavek
2. Namíchejte si reakční mix pro 10 reakcí (1 reakce navíc, kvůli chybě pipetování)

!!! všechny složky mixu rozpouštějte na ledu, na něm nechejte i namíchaný reakční mix dokud nezačnete pipetovat.

Složení reakčního mixu na 1 reakci:

Reakční pufr	2 μ l
Polymeráza	0,2 μ l
Interkalátor	2,5 μ l
Primer mix	1 μ l
dNTP mix	0,5 μ l
25 mM MgCl ₂	2 μ l
Vzorek	2 μ l
H ₂ O	14,3 μ l

25 μ l

Interkalátor: Gel Star (ředěný 1:1000) – analog Sybr greenu

Polymeráza: Thermo-Start DNA Polymerase (5 U/ μ l)

Primer mix: mix tvořený primery TS(forward) a Hutpr(reverse), konc. 5 μ M

Vzorek: standard TSR8 (0,2 amol/ μ l) a jeho ředění
vzorek o neznámé koncentraci

3. Příprava roztoků pro kalibrační křivku

Ze zásobního roztoku TSR8 připravte sérii ředění další dva roztoky, které budou tvořit kalibrační křivku.

1. ředění (1:4) : ze zásobního roztoku TSR8 (0,2 amol/ μ l) odeberte do čisté zkumavky 5 μ l a přidejte k nim 20 μ l sterilní vody. Získáte 5x ředěný roztok.
2. ředění (1:20): z naředěného roztoku TSR8 (1:4) odeberte do čisté zkumavky 5 μ l a přidejte k nim 20 μ l sterilní vody. Získáte 25x ředěný roztok.

Koncentrace TSR8 v zásobním roztoku je 0,2 amol/ μ l. Spočítejte jeho koncentraci v naředěných roztocích.

4. Pipetování

Rozpis reakcí:

do každé zkumavky napipetujte 23 μ l reakčního mixu a přidejte k nim:

1. 2 μ l sterilní vody (negativní kontrola)
2. 2 μ l TSR8 (1:25)
3. 2 μ l TSR8 (1:25)
4. 2 μ l TSR8 (1:5)
5. 2 μ l TSR8 (1:5)
6. 2 μ l TSR8
7. 2 μ l TSR8
8. 2 μ l neznámého vzorku
9. 2 μ l neznámého vzorku

5. Vzorky stočíte a vložíte do real-time cykleru Rotor Gene 3000 (Corbet Research).

6. Pod dohledem obsluhy spustíte analýzu, která trvá asi 150 minut.

Program na amplifikaci TRAP produktů má následující profil:

a. denaturace, aktivace polymerázy

94 °C/15 min.

b. amplifikace produktů. Tento cyklus je opakován 40x.

94 °C/30 sec

59 °C/30 sec, v tomto kroku probíhá odečítání signálu na detektoru pro SybrGreen

72 °C/30 sec

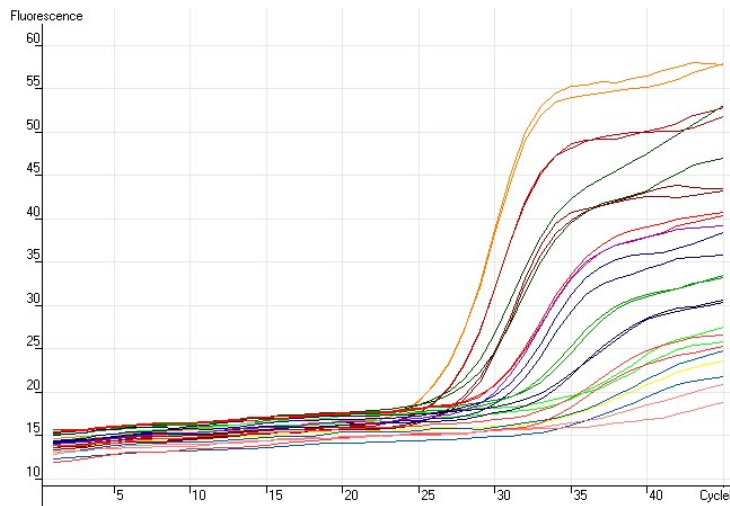
c. dosyntetizování produktů

72 °C/5 min.

7. Vyhodnocení výsledků

Výstup dat z Rotor Gene 3000

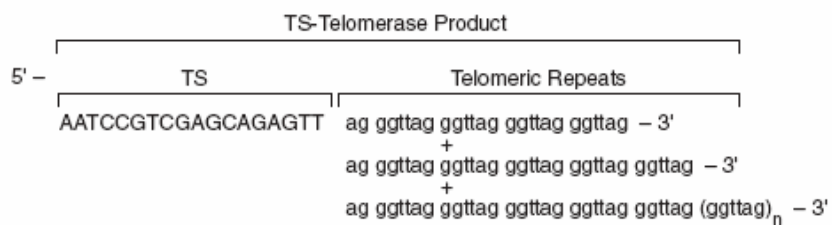
získáme křivky, které udávají závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů PCR reakce. Pomocí softwaru přístroje křivky zanalyzujeme.



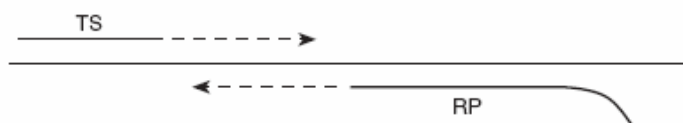
Dodatek

Princip stanovení aktivity telomerázy - klasicky

STEP 1. Addition of Telomeric Repeats By Telomerase



STEP 2. Amplification of TS-Telomerase Product By PCR



Po skončení reakce na gelu detekujeme žebříček produktů, které se liší o šest párů bází, což je délka jedné telomerové repetice.

