

Optymalizacja real-time PCR

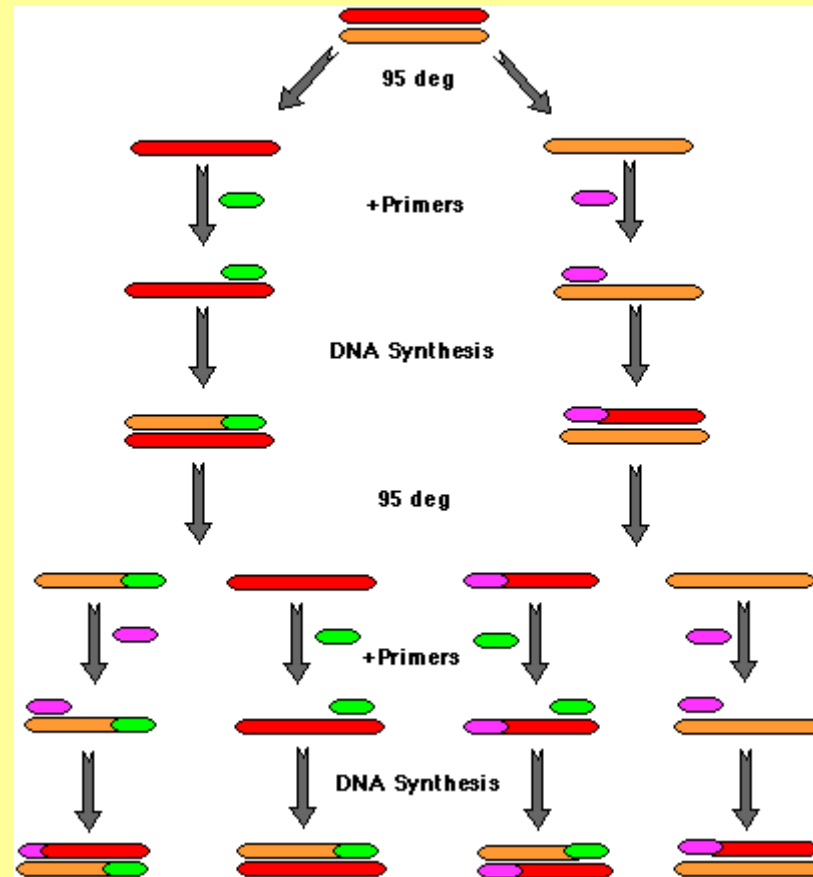
Kamila KLAMECKA

Plan

- istota PCR
- Real-time PCR
- Stosowane metody
- Sprzęt
- Problemy
- Część eksperymentalna

PCR – Polymerase Chain Reaction

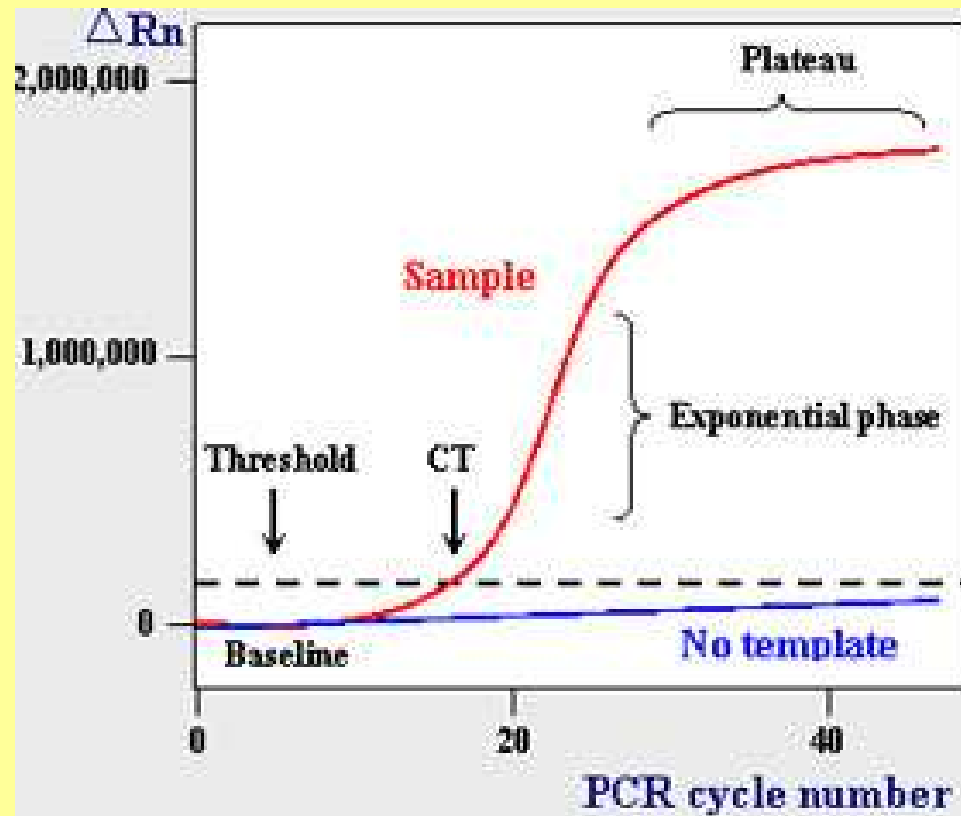
- Dwuniciowa cząsteczka DNA ulega rozpleceni
 - Na matrycy każdej nici powstaje komplementarna
- ⇒ Podczas jednego cyklu ilość DNA podwaja się



Rys. z: members.aol.com

Real-time PCR

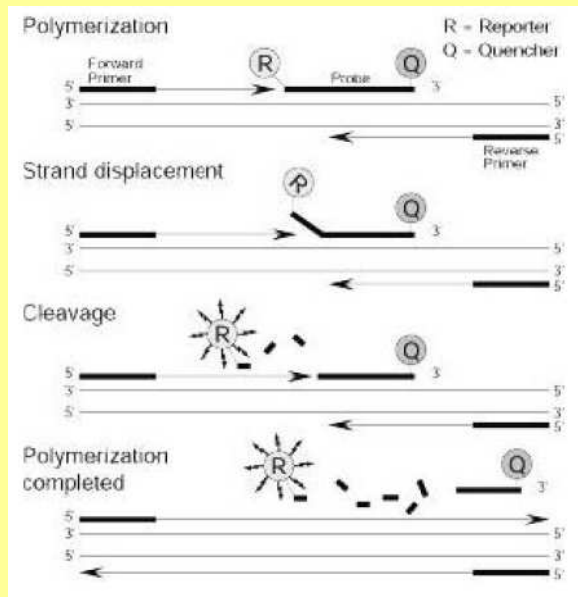
- C_T – (cycle at threshold) określa moment, w którym aparatura wykrywa produkt
- Real-time PCR pozwala śledzić akumulację produktu na bieżąco



Rys. z www.rt-pcr.com

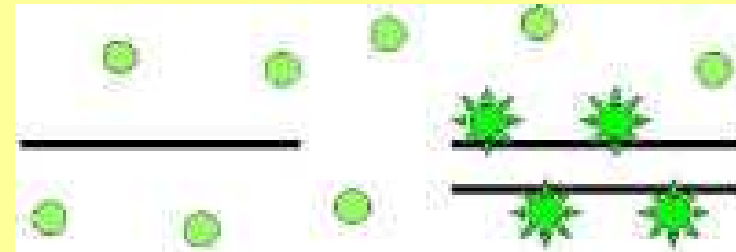
Wizualizacja ilości produktu

TaqMan



Jedno miejsce wiązania sondy
dla całej cząsteczki DNA
Rys. z www.hgbiochip.com

SYBR Green

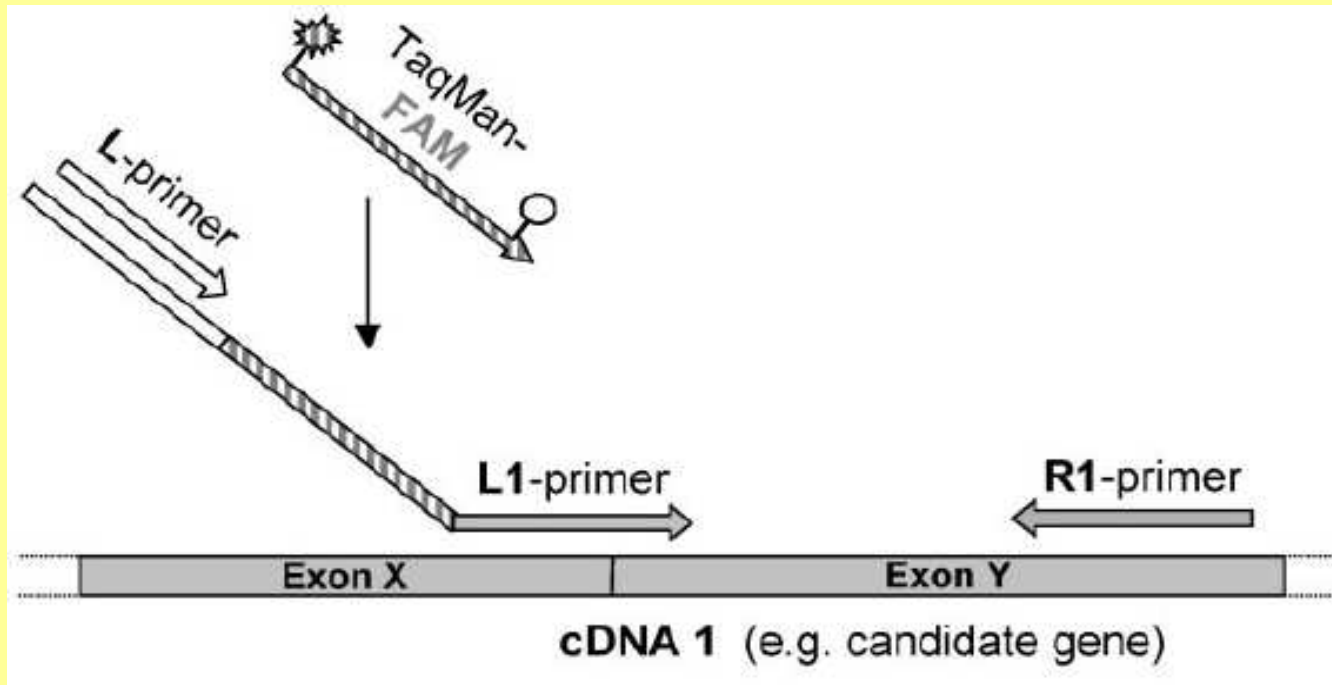


SG wiąże się niespecyficznie z każdym
dwuniciowym fragmentem DNA

Porównanie SG i TM

- SYBR Green: tani, prosty, niespecyficzny względem sekwencji, ale siła sygnału zależna od długości fragmentu DNA (nie od liczby kopii)
- TM – sonda reaguje z DNA ilościowo (sygnał powiązany z liczbą kopii), konieczne projektowanie nowych sond dla każdego produktu => wysoki koszt
- tTM – łączy zalety obu powyższych: niski koszt i specyficzność

tailed-TaqMan

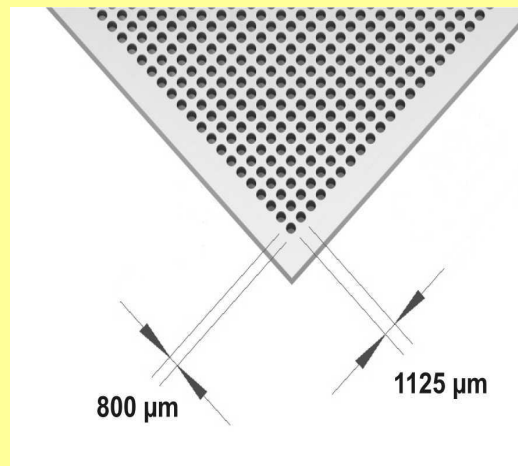


Miejsce wiązania sondy przesunięte na „ogon” (poza powielaną sekwencją) umożliwia użycie uniwersalnej sondy przy amplifikacji różnych fragmentów DNA

(za: **Multiplexed Real-Time PCR Using Universal Reporters**, *Andreas M. Rickert, Hans Lehrach, and Silke Sperling*)

Cel pracy

- Uzyskanie w małej objętości (200nl) wyników porównywalnych do dużej (10 μ l)
- Redukcja niespecyficznego sygnału

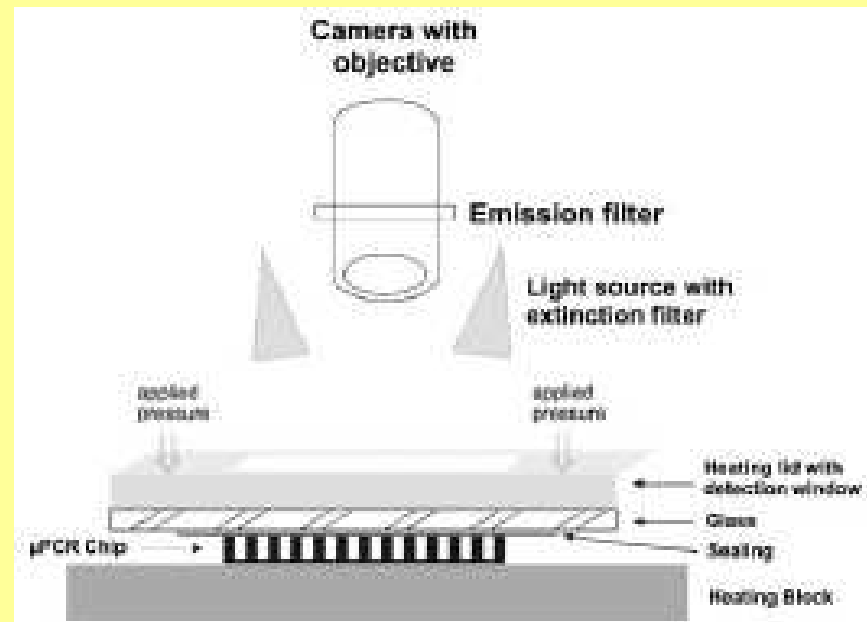


μ PCR chip – wymiary pojedynczej studzienki

Miniaturyzacja – platforma sprzętowa



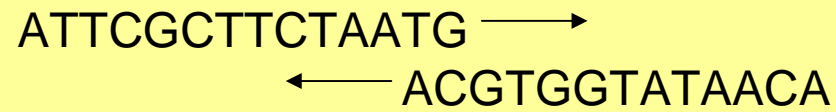
SciClone - robot



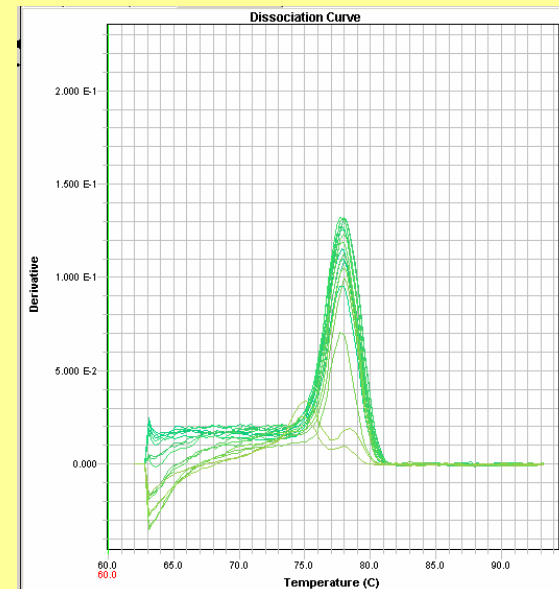
Termocykler - schemat

Problemy

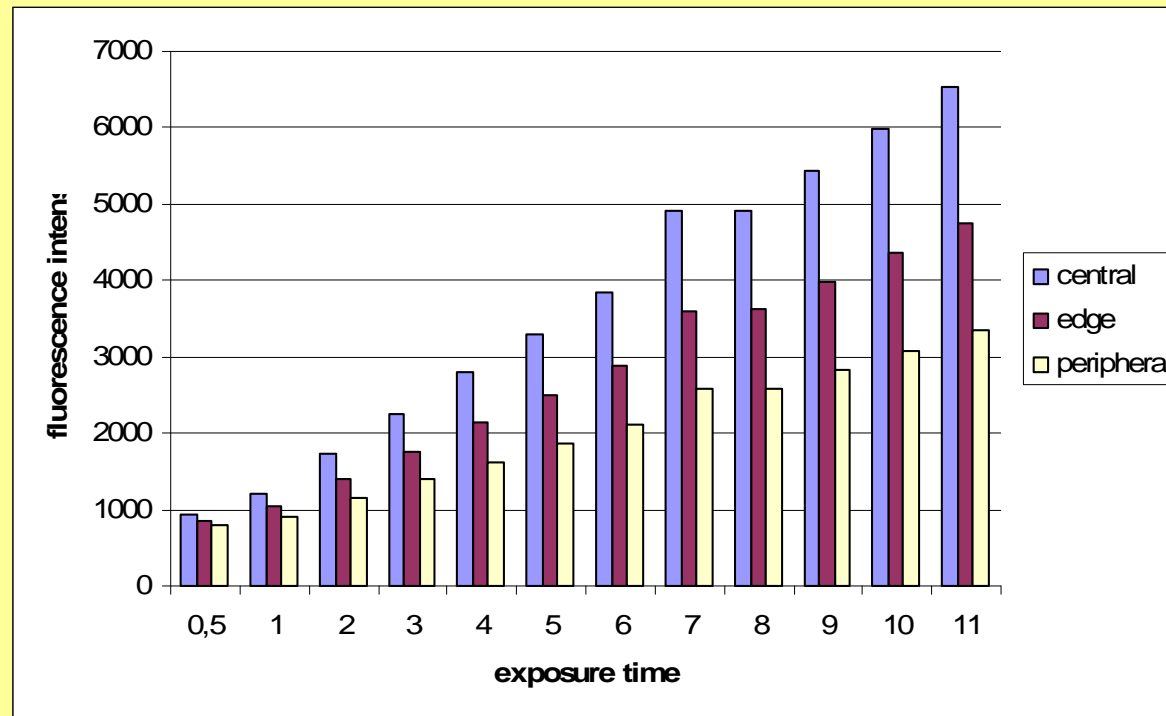
- Dimeryzacja starterów (SYBR Green, tailed TaqMan)



- Ciemne brzegi zdjęć



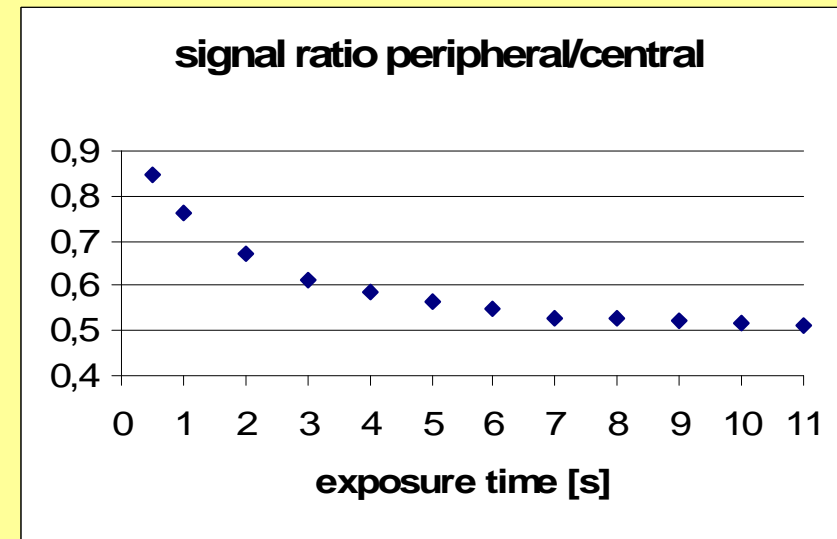
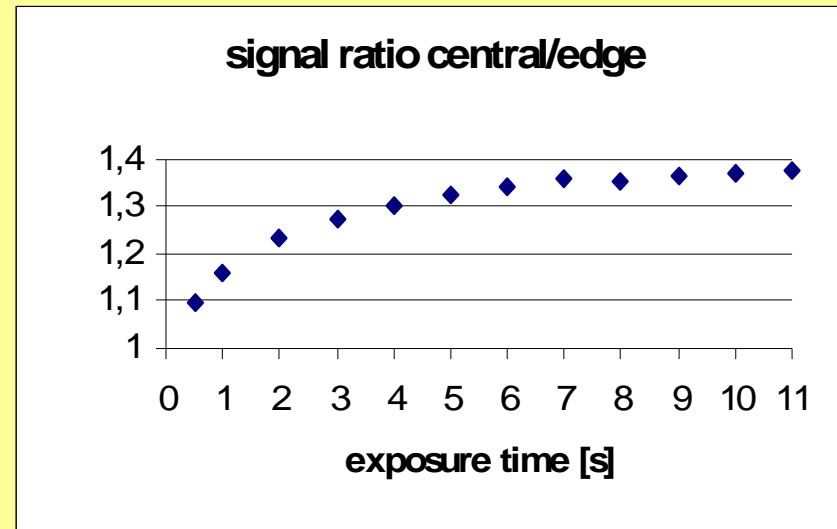
Czas ekspozycji



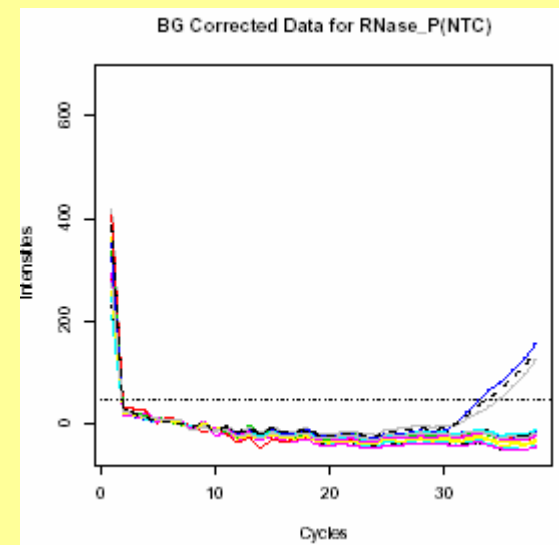
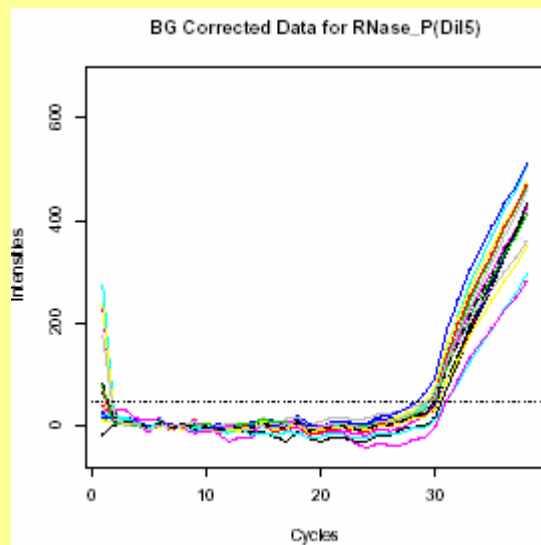
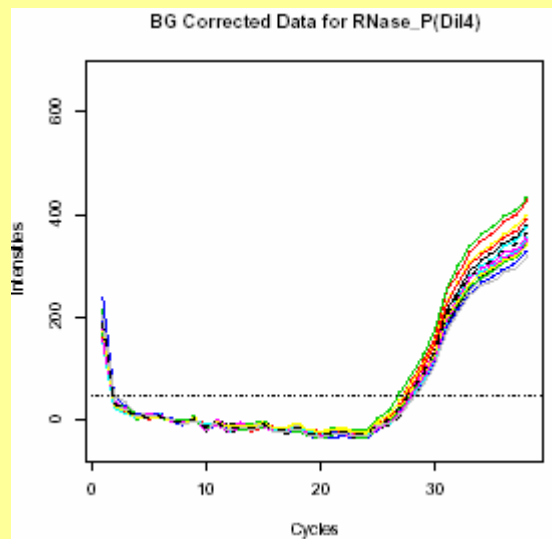
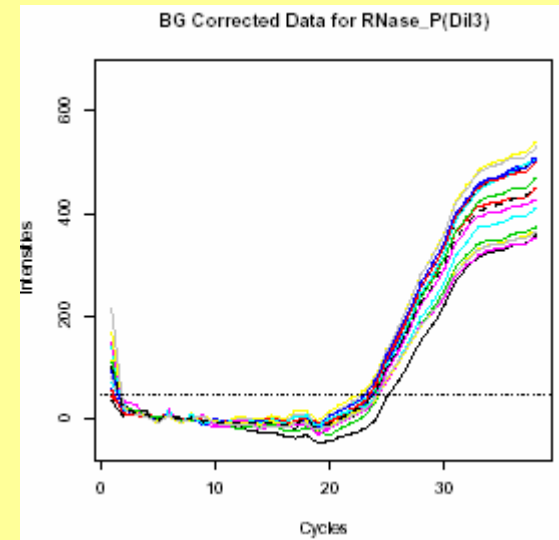
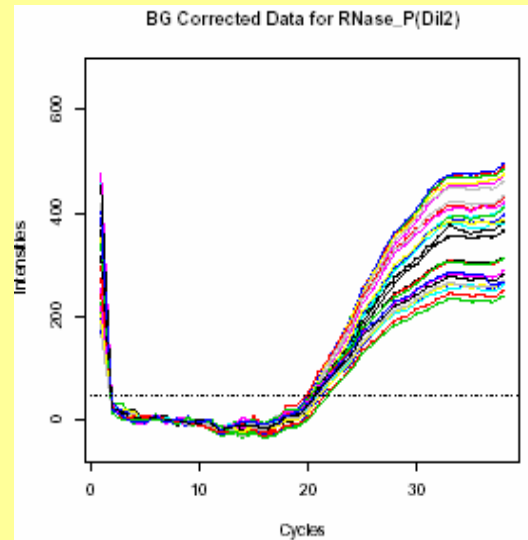
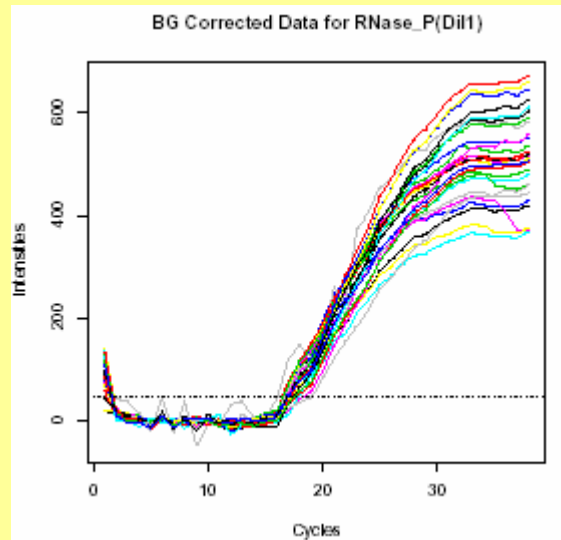
Porównanie intensywności fluorescencji dla trzech losowo wybranych punktów w zależności od czasu naświetlania.

Czas ekspozycji - c.d.

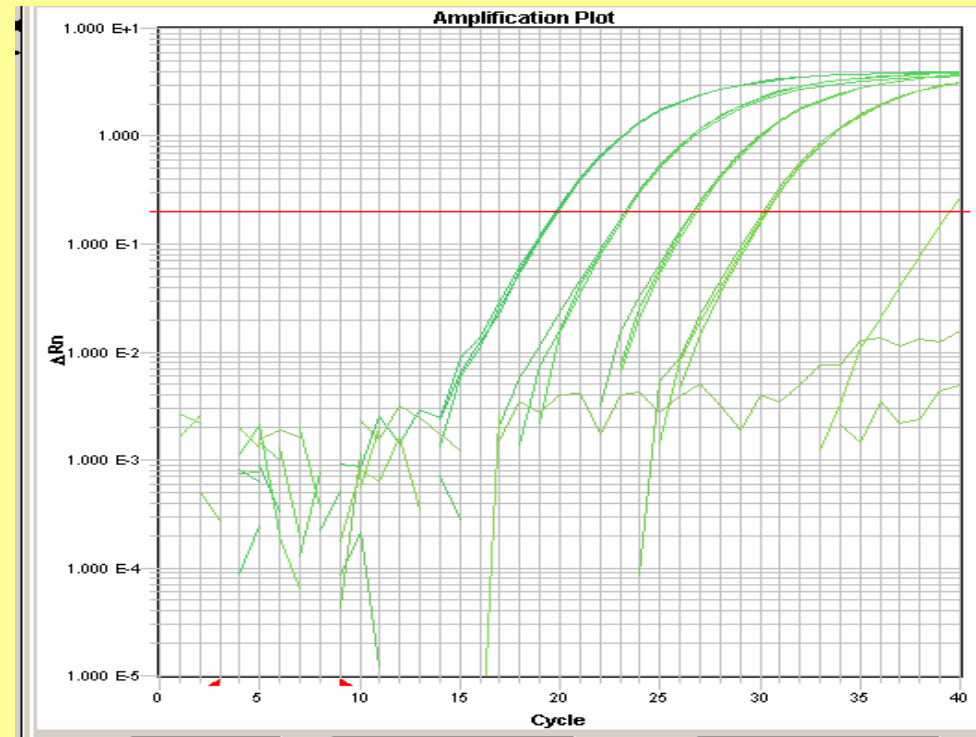
Dla 5-6 sekund naświetlania znikome różnice w jakości sygnału w porównaniu z dłuższym czasem. Jest to optymalny czas dla używanej aparatury.



Wyniki - 200 nl TM



Wyniki – 10 μ l TM

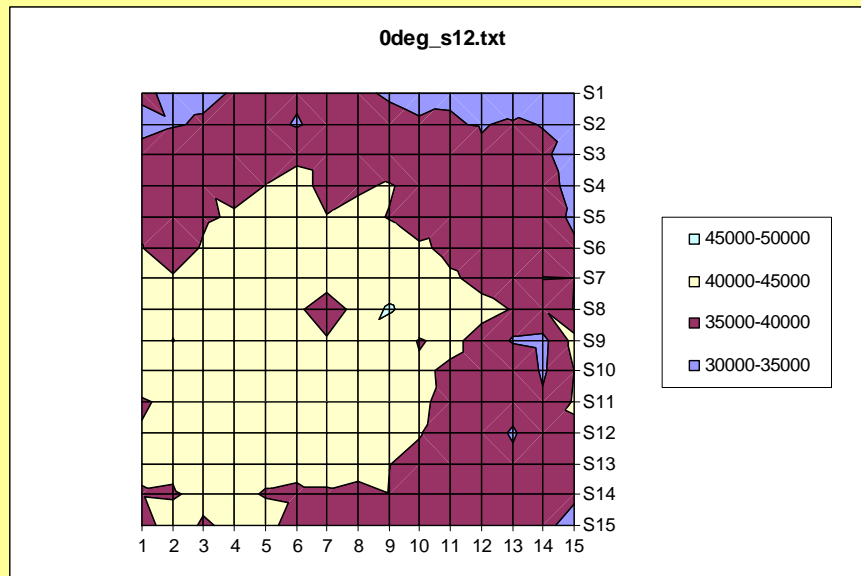


Wyniki

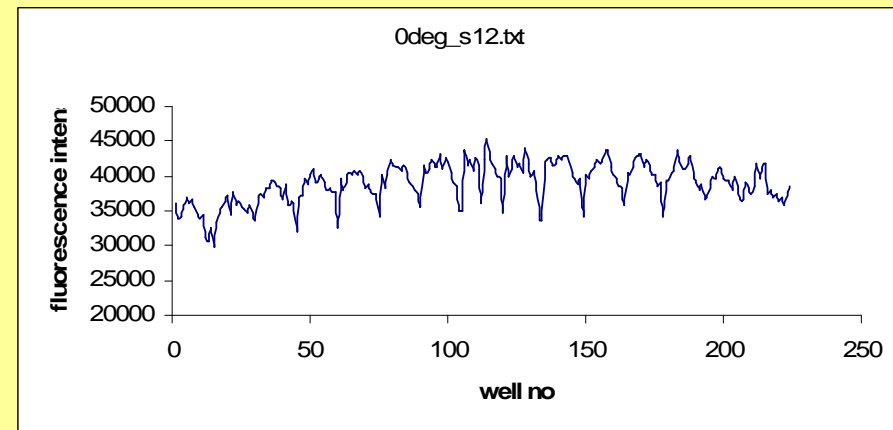
Porównanie wartości C_T dla TM w dużej i małej objętości:

	10ul	200nl
Dil1	19	18
Dil2	22,6	20,7
Dil3	26,2	23,9
Dil4	30	27,8
Dil5	-	30

Osłabienie sygnału na brzegach

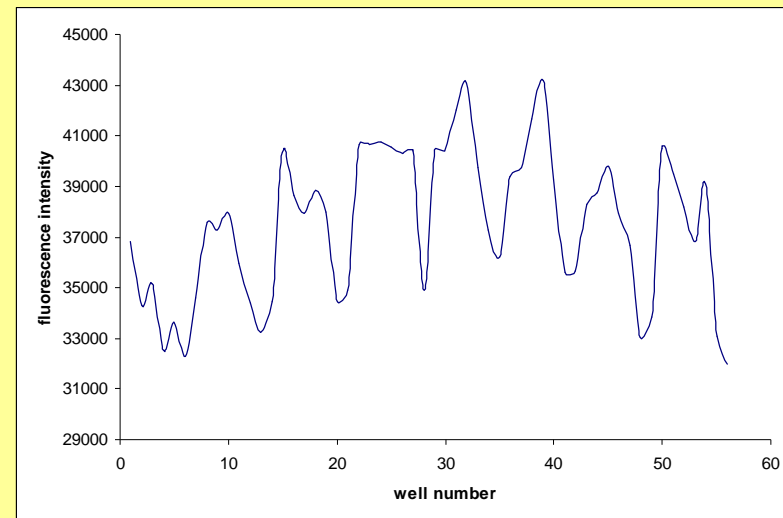
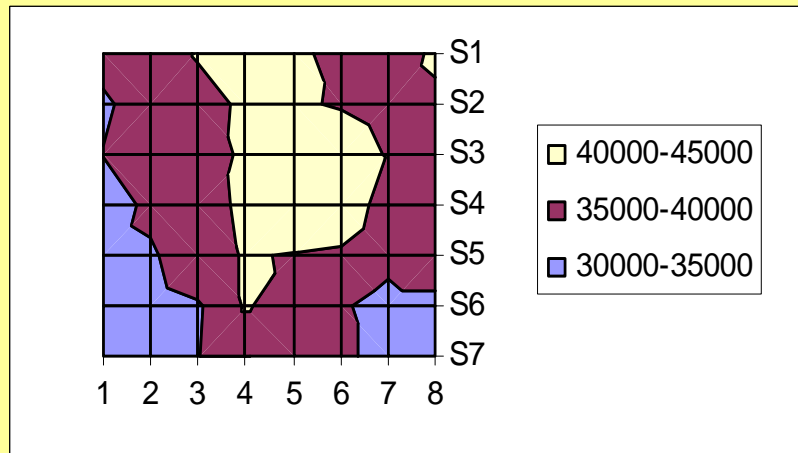


Intensywność sygnału dla całego chipa
– sygnał słabnie w kierunku obrzeży



15 łuków odpowiada 15 rzędom
studzienek na chipie

Osłabienie sygnału na brzegach



Przezroczysty chip (7x8); 0,5 μ M FAM; czas naświetlania: 0,5sec. Ten sam wzór sygnału => spadek intensywności nie jest spowodowany zacięciem

Podsumowanie

- Obiecujące wyniki w 200 nl
- Platforma sprzętowa wymaga dalszej optymalizacji
- Zwieńczona sukcesem optymalizacja pozwoli na ponad 22-krotne zmniejszenie kosztów analizy metodą PCR