

*Termociclador
a temps real*

Termociclador a temps real

Marca
Stratagene

Model
Mx 3005P

Especificacions tècniques

- Placa Peltier de 96 mostres. Uniformitat de temperatura $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ a 72°C .
- Sistema d'excitació amb 5 filtres d'excitació i làmpada de quars-tungstè.
- Sistema de detecció amb 5 filtres d'emissió.
- Filtres: Alexa Fluor® 350, SybrGreen®/FAM™, Cy3®, Texas Red®/ROX i Cy5®.
- Rang d'excitació de 350 a 750nm i rang d'emissió de 350 a 700nm.
- Rang de temperatura de 30 a 100°C .
- Volum de mostra de 0 a $200\mu\text{L}$.
- Rang dinàmic de 10 ordres de magnitud ($1-10^{10}$).
- Fins a 5 canals de lectura (PCR múltiple).
- Software Mx3005P:
 - > Visualització a temps real de les corbes d'amplificació.
 - > Càlcul de T_m automàtics en l'anàlisi de Melting Curve.
 - > Anàlisis estadístics comparant experiments d'expressió gènica.

Descripció de la tècnica

La PCR quantitativa (qPCR) segueix el mateix principi d'amplificació d'ADN de la PCR convencional però a més permet detectar com progressa a temps real. En el medi de reacció se li addiciona una substància marcada amb un grup fluorescent (fluorocrom) i al fer incidir un feix de llum a una longitud d'ona apropiada sobre la mostra es detecta la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat. L'emissió de fluorescència produïda en la reacció és proporcional a la quantitat d'ADN format.

La tècnica de la PCR a temps real es pot dur a terme amb diferents tipus de fluorocroms:

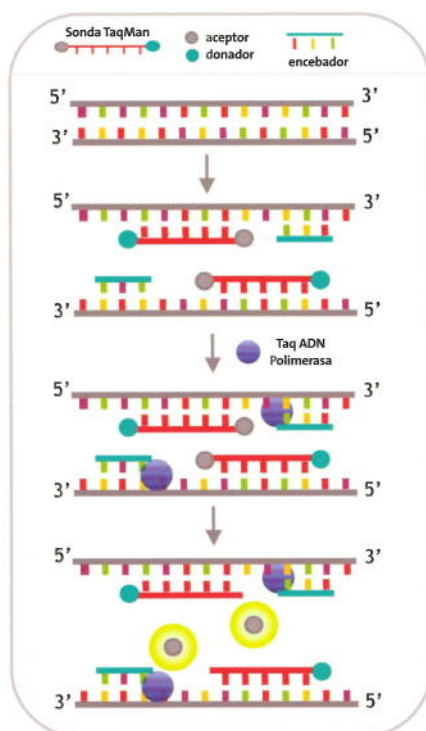
1.- Agents intercalants que augmenten notablement l'emissió de la fluorescència quan s'uneixen a l'ADN de doble cadena. El principal inconvenient és la seva baixa especificitat, donat que s'uneix indistintament a productes generats inespecíficament o a dímers d'encebadors. El fluorocrom més usat és el SYBR®Green.

2.- Sondes d'hibridació específiques marcades amb dos tipus de fluorocroms, un donador i un acceptor. El procés es basa en la transferència d'energia fluorescent mitjançant ressonància entre les dues molècules. Les més utilitzades són les sondes d'hidròlisi, denominades també TaqMan, molecular beacons i sondes FRET.

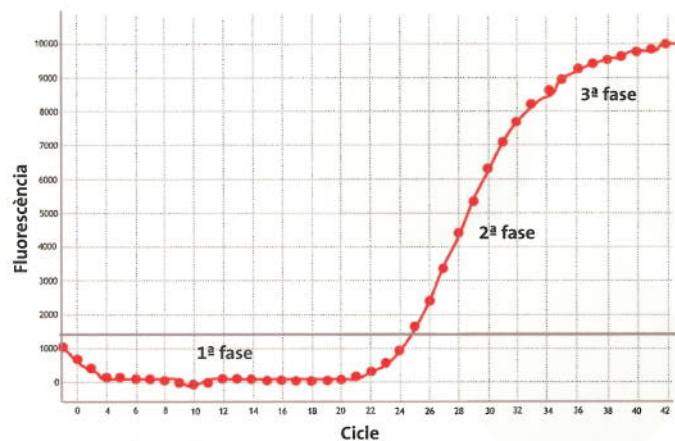
El resultat d'una qPCR es visualitza en un gràfic d'amplificació on s'expressa a l'eix de les ordenades la fluorescència detectada i el nombre de cicles en les absises. La corba consta d'una fase inicial on la producció d'ADN està per sota del nivell de detecció de l'equip. Una segona fase lineal en la que hi ha un increment exponencial de la PCR, i on la quantitat de producte, i per tant la senyal, es duplica després de cada cicle. L'última fase de la corba mostra un augment de senyal mínima degut a l'esgotament dels components de la reacció.

Aplicacions

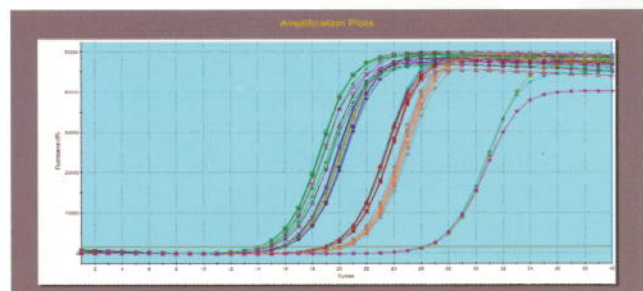
- > En entorns de recerca, la qPCR s'utilitza principalment per proporcionar mesures quantitatives de la transcripció de gens. La tecnologia pot ser utilitzada per determinar com l'expressió d'un gen en particular varia en el temps, com per exemple la resposta dels cultius de teixits i cèl·lules davant un agent farmacològic, la progressió de la diferenciació cel·lular, o la resposta als canvis en les condicions ambientals.
- > Quantificació absoluta o relativa d'ADN o ARN.
- > Detecció de polimorfismes en un únic nucleòtid.
- > Anàlisi de l'expressió gènica.
- > Detecció d'organismes modificats genèticament.



Exemple funcionament sonda TaqMan



Gràfic d'amplificació ADN



Corbes d'amplificació per la quantificació del gen 16SrDNA