

*Termociclador
a tiempo real*

Termociclador a tiempo real

Marca
Stratagene

Modelo
Mx 3005P

Especificaciones técnicas

- Placa Peltier de 96 muestras. Uniformidad de temperatura $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ a 72°C .
- Sistema de excitación con 5 filtros de excitación y lámpara de cuarzo-tungsteno.
- Sistema de detección con 5 filtros de emisión.
- Filtros: Alexa Fluor® 350, SybrGreen®/FAM™, Cy3®, Texas Red®/ROX, Cy5®.
- Rango de excitación de 350 a 750nm y rango de emisión de 350 a 700nm.
- Rango de temperatura de 30 a 100°C .
- Volumen de muestra de 0 a $200\mu\text{L}$.
- Rango dinámico de 10 órdenes de magnitud ($1-10^{10}$).
- Hasta 5 canales de lectura (PCR múltiple).
- Software:
 - > Visualización a tiempo real de la curvas de amplificación.
 - > Calculo automático de T_m en análisis del Melting Curve.
 - > Análisis estadístico comparando experimentos de expresión génica.

Descripción de la técnica

La PCR cuantitativa (qPCR) sigue el mismo principio de amplificación de ADN de la PCR convencional pero además permite detectar como progresa a tiempo real. En el medio de reacción se adiciona una molécula marcada con un grupo fluorescente (fluorocromo) y al hacer incidir un haz de luz a una longitud de onda apropiada sobre la muestra se detecta la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado.

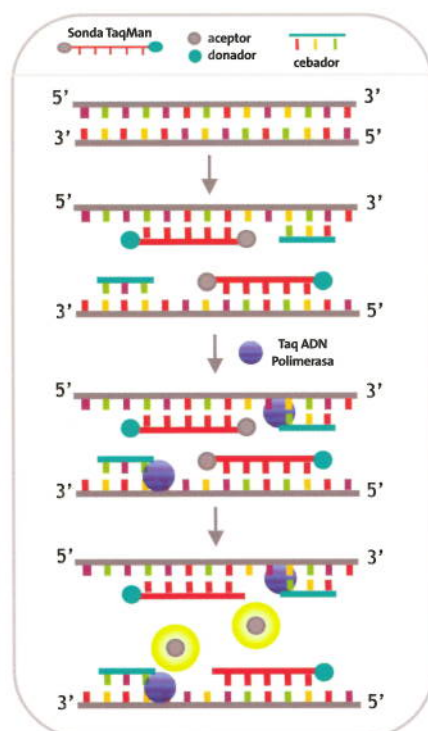
La técnica de la PCR a tiempo real puede realizarse con diferentes tipos de fluorocromos:

- 1.- Agentes intercalantes que aumentan notablemente la emisión de la fluorescencia cuando se unen al ADN de doble cadena. El principal inconveniente es la baja especificidad, dado que se unen indistintamente a productos generados inespecíficamente o a dímeros de los cebadores. El fluorocromo más utilizado es el SYBR®Green.
- 2.- Sondas de hibridación específicas marcadas con dos tipos de fluorocromos, uno dador y uno aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas. Las más usadas son las sondas de hidrólisis o TaqMan, molecular beacons y sondas FRET.

El resultado de una qPCR se visualiza en el gráfico de amplificación. Se muestra el aumento del nivel de fluorescencia en el eje Y, en comparación al número de ciclos en el eje X. La curva consta de una fase inicial donde la producción de ADN está por debajo del nivel de detección del equipo. Una segunda fase lineal en la que se observa un incremento exponencial de la PCR, donde la cantidad de producto, y por lo tanto la señal, se duplica después de cada ciclo. La última fase muestra un aumento de señal mínima, debido al agotamiento de los componentes de la reacción.

Aplicaciones

- > En entornos de investigación, la qPCR se utiliza principalmente para proporcionar mediciones cuantitativas de la transcripción de genes. La tecnología puede ser utilizada para determinar cómo la expresión de un gen en particular varía en el tiempo, como por ejemplo la respuesta de los cultivos de tejidos y células a una administración de un agente farmacológico, la progresión de la diferenciación celular, o la respuesta a los cambios en las condiciones ambientales.
- > Cuantificación absoluta o relativa de ADN o ARN.
- > Detección de polimorfismos en un único nucleótido.
- > Análisis de la expresión génica.
- > Detección de organismos modificados genéticamente.



Ejemplo funcionamiento sonda TaqMan

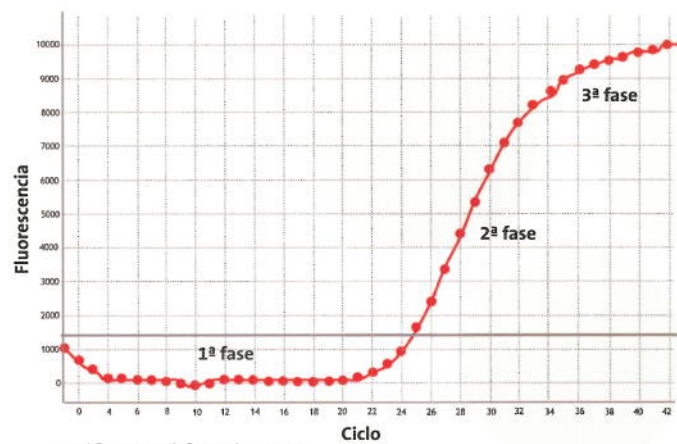
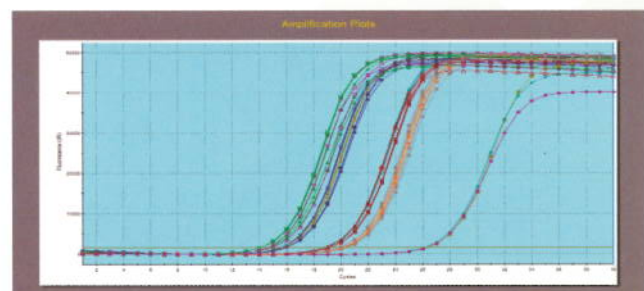


Gráfico amplificación ADN



Curvas de amplificación para la cuantificación del gen 16SrDNA