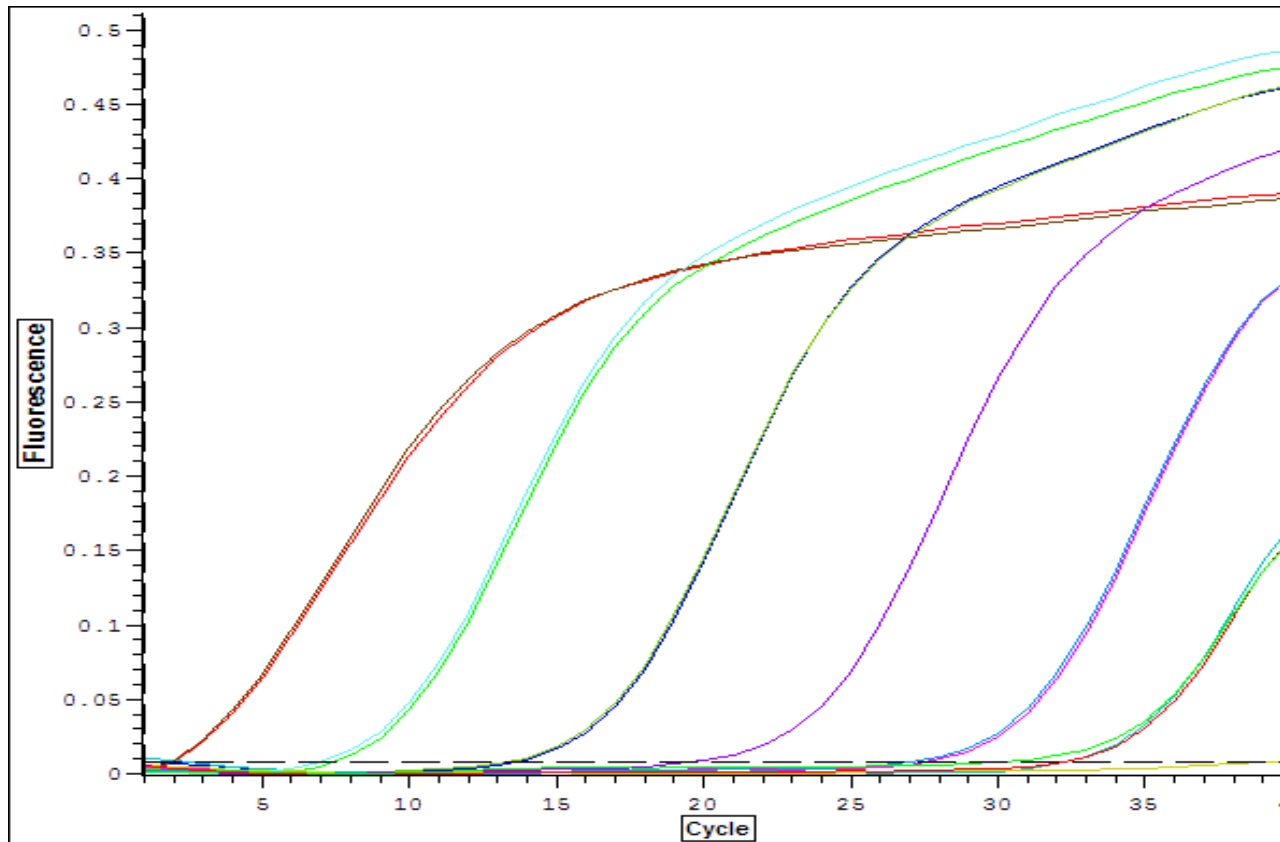


Real – Time PCR

RT-PCR

- **Do czego używamy RT-PCR?**
- **Jak działa RT-PCR?**

Część 1 Co to jest RT-PCR i do czego jest wykorzystywany



Czym jest RT-PCR

Reakcja łańcuchowej polimeryzacji (PCR) jest procesem namnażania specyficznych fragmentów DNA

Real-Time PCR jest wyspecjalizowaną techniką, która pozwala na obserwowanie postępów reakcji w czasie rzeczywistym

RT-PCR pozwala na określenie początkowego stężenia DNA w próbce

Do czego wykorzystujemy RT-PCR

Real-Time PCR stał się kamieniem węgielnym biologii molekularnej:

- **Analiza ekspresji genów**
 - Badania procesów nowotworzenia
 - Badania wpływu leków
 - Badanie infekcji patogenów
- **Diagnostyka**
 - Określenie porażenia patogenem
- **Badania żywności**
 - Obecność GMO w żywności
- **Hodowla Roślin i zwierząt**
 - Określenie kopi genu
 - Genotypowanie

Real-Time PCR – Analiza ekspresji genów

Przykład: MYB24 analiza ekspresji

MYB24 jest czynnikiem transkrypcyjnym

MYB24 kontroluje ekspresję genów syntezy flawonoidów

W celu monitorowania ekspresji czynnika MYB24 wykorzystano technikę RT-PCR

Gene ID: 100259502; updated on 6-Apr-2017

Summary

Gene symbol: LOC100259502
Gene description: transcription factor MYB24
Locus tag: VIT_00011872001
Gene type: protein coding
RefSeq status: MODEL
Organism: [Vitis vinifera](#)
Lineage: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; Vitales; Vitaceae; Vitis

Genomic context

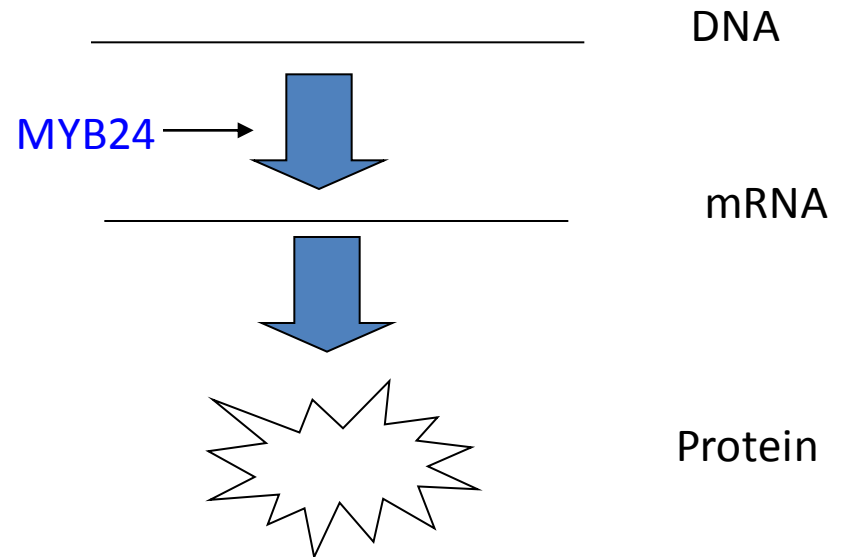
Location: chromosome: 1 See LOC100259502 in [Genome Data Viewer](#) [Map Viewer](#)
Exon count: 3

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
102	current	12X (GCF_000003745.3)	1	NC_012007.3 (3374692..3376552)

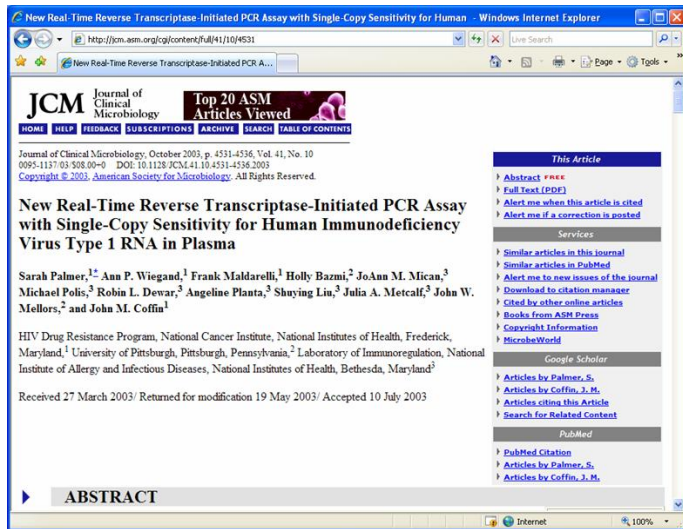
Chromosome 1 - NC_012007.3

Genomic regions, transcripts, and products

Genomic: Genomic, Bibliogra, General, Home, General, NCBI Re, Related, Addition, Genom, Genome, Map Vie, Related, BioProje, Conserv, Full text, Gene ne



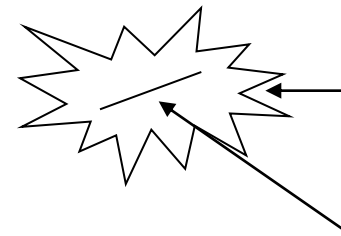
Real-Time PCR – kontrola porażenia patogenem



Przykład: zakażenie wirusowe

Podjęcie zabiegów ochronnych często zależy od stopnia porażenia roślin

Real-Time PCR pozwala na mierzenie ilości RNA wirusa w roślinie



Virus

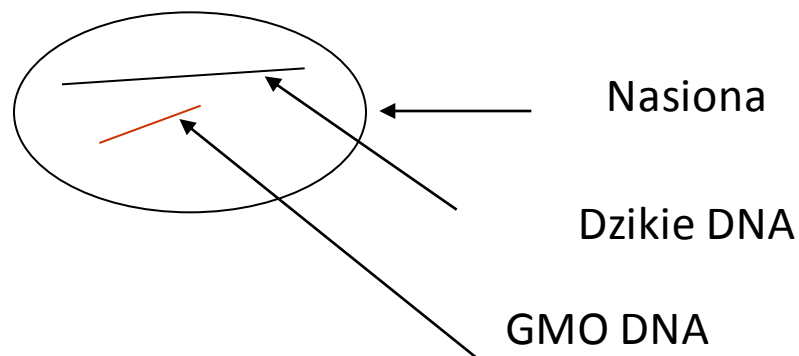
RNA

Real-Time PCR – badanie żywności

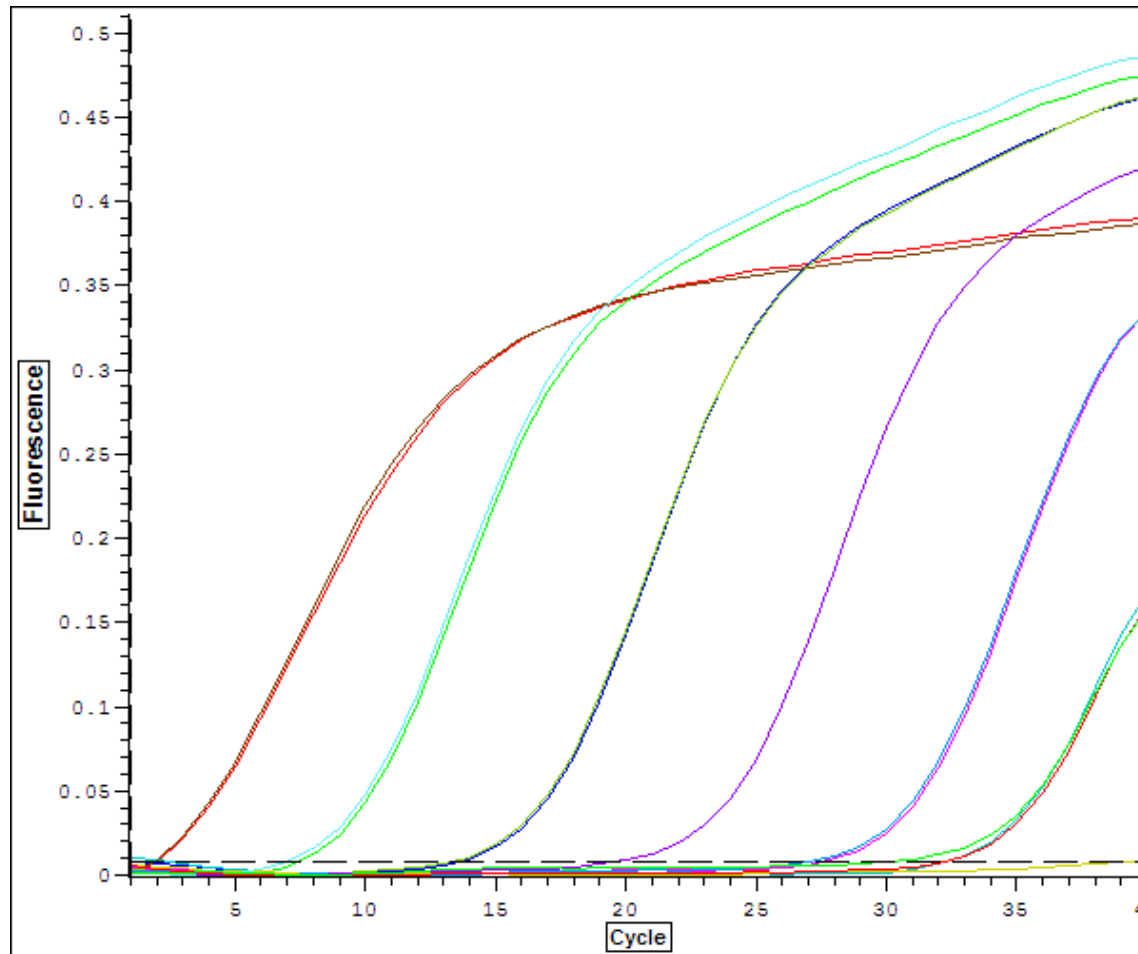
Przykład: określenie zawartości GMO w żywności

Określenie % zawartości GMO w produktach żywnościowych (znaczenie ze względu na przepisy prawne, import eksport EU/USA)

Ośrodki kontrolujące używają Real-Time PCR do określenia stosunku transgenu w odniesieniu do „dzikiego” DNA.



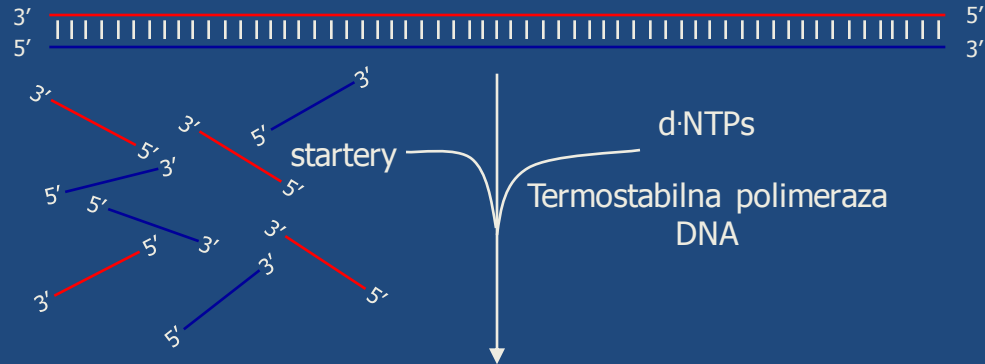
Jak działa RT-PCR?



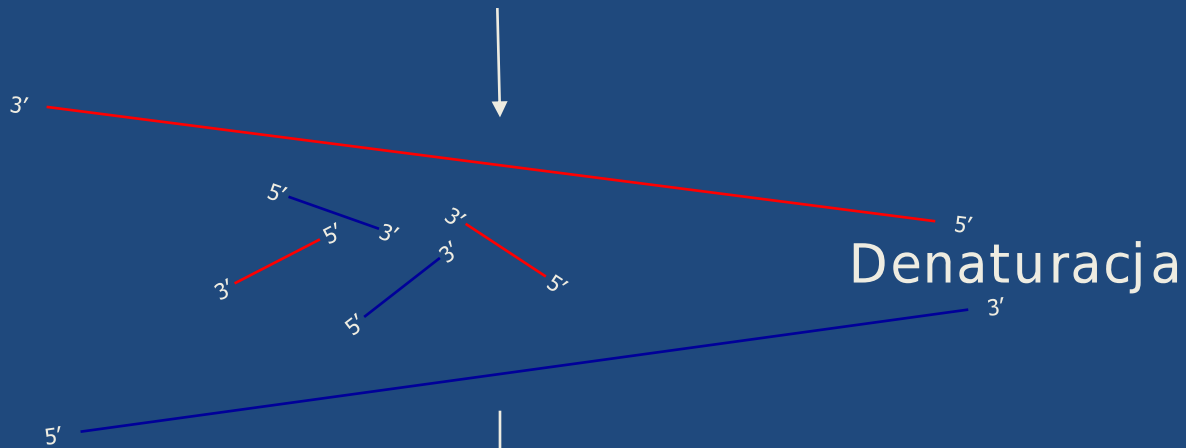
Jak działa RT-PCR?

- Przypomnijmy standardowy PCR....

PCR

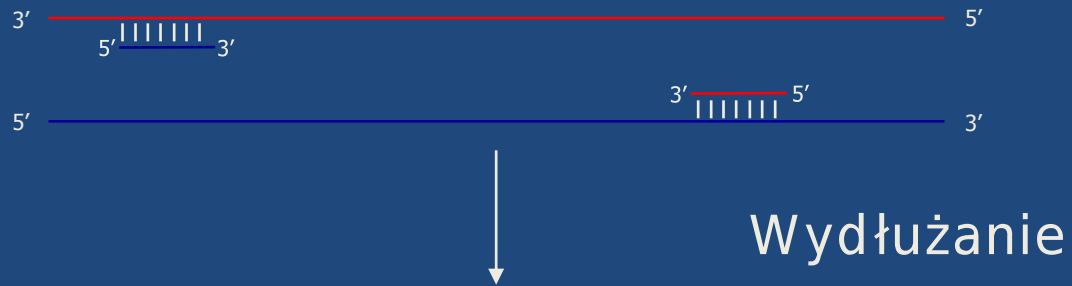


Dodane do próbówki reakcyjnej

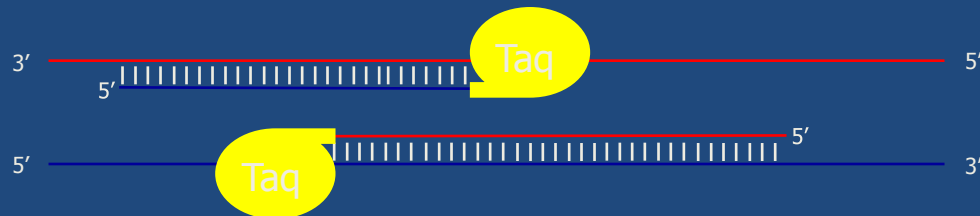


Amplifikacja

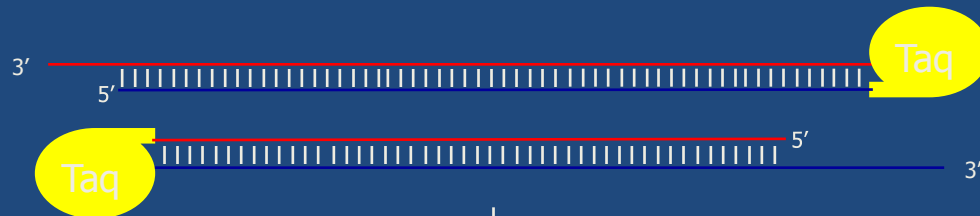
PCR



Wydłużanie

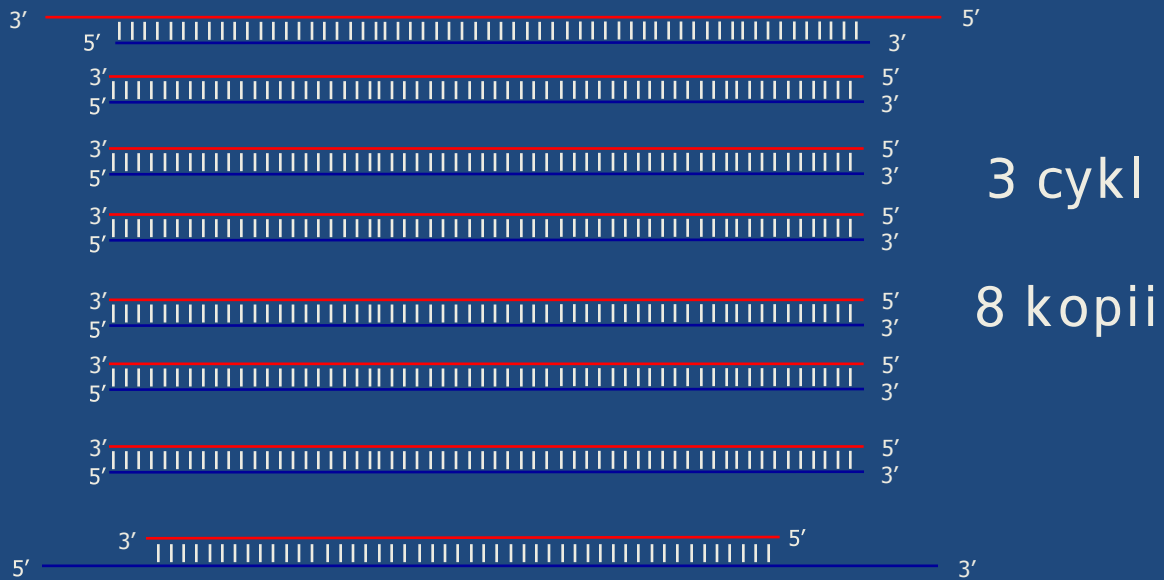
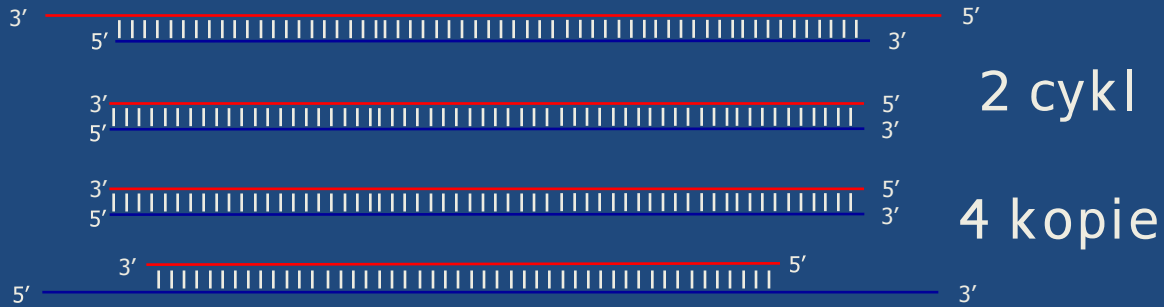


Kontynuacja wydłużania



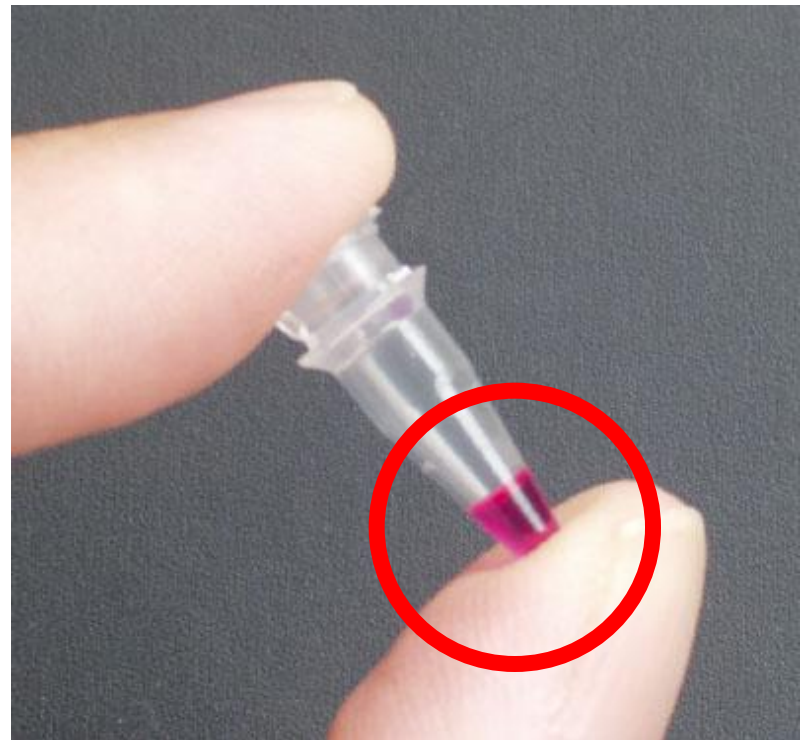
Powtarzanie

PCR



RT-PCR

- **Wyobraźmy sobie próbkę PCR po 25 cyklach...**



Co znajduje się w próbówce w 25 cyklu?

**Mieszanka nukleotydów,
starterów, amplikonów,
enzymów itp..**

**Mamy 1,000,000 kopii
amplikonu w tym momencie**



RT-PCR

Co zawierała nasza próbówka w 24 cyklu?

Skład był niemal identyczny z tą różnicą, że było tylko 500,000 kopi amplikonu.

A w 23?

Prawie to samo, tylko 250,000 kopi amplikonu.

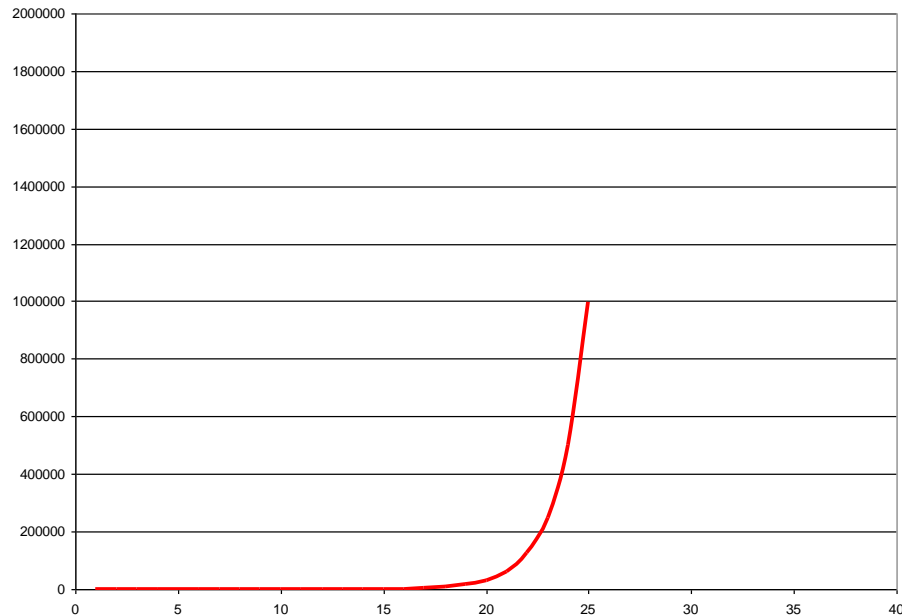
A co w 22?

Mniej więcej to sam. 125,000 kopi amplikonu.



RT-PCR

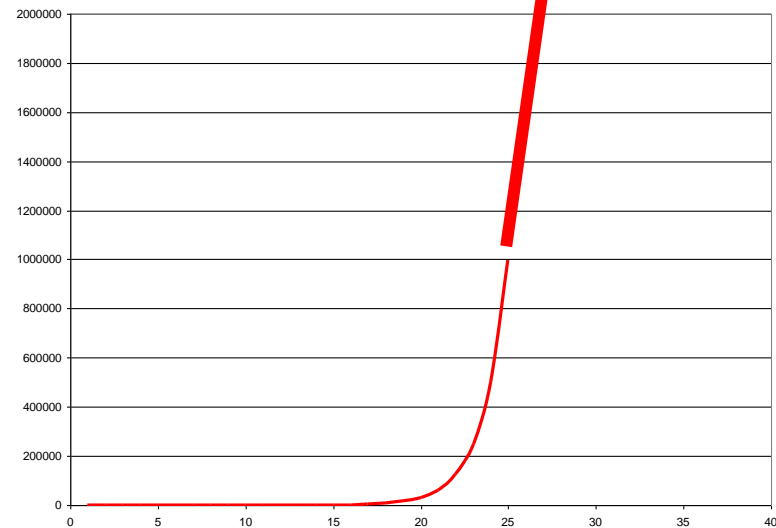
- **Gdybyśmy wykreślili ilość amplikonu od początku reakcji do cyklu 25 wykres wyglądałby tak:**



RT-PCR

Jesteśmy w 25 cyklu z 1,000,000 kopiami amplikonu.

Jak będzie wyglądała nasza próbówka w 26 cyklu?



RT-PCR

Co będzie w cyklu 26?

Prawdopodobnie będzie 2,000,000 amplikonów.

A w 27?

może 4,000,000 amplikonów.

A w cyklu 200?

W teorii 1,000 amplikonów...

Or 10^{35} ton of DNA...

Żeby łatwiej wyobrazić sobie tę liczbę to jest masa **10 milionów** planet wielkości ziemi !!!!



RT-PCR

Stos DNA wielkości 10 milionów planet nie koniecznie zmieściłby się w próbówce do PCR.

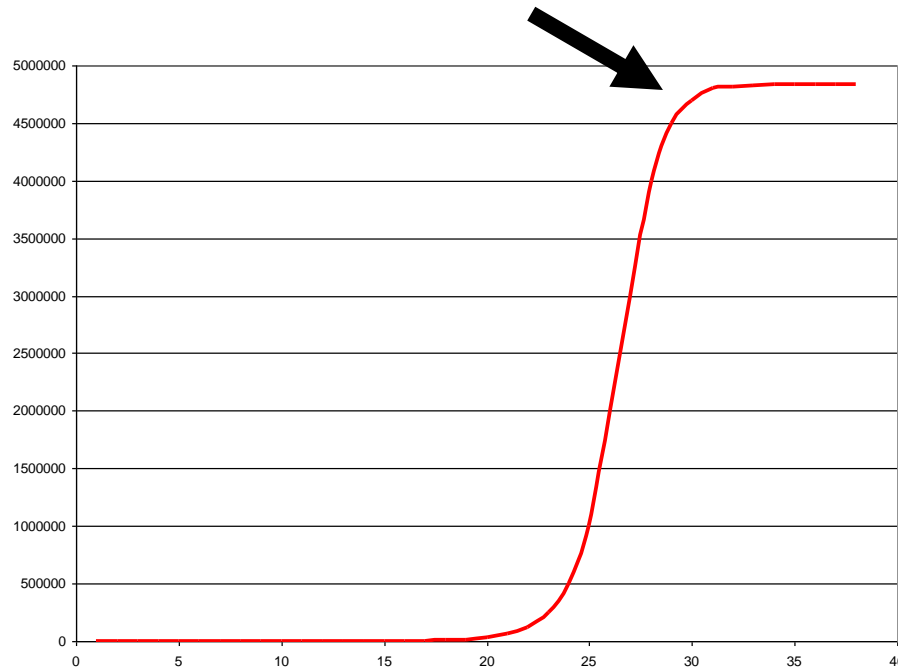
W praktyce w reakcji łańcuchowej w raz z wzrostem stężenia amplikonu i spadkiem stężenia starterów, polimerazie coraz trudniej znaleźć jest startery przyzcpione do matrycy

Wzrost wykładniczy nie trwa wiecznie!



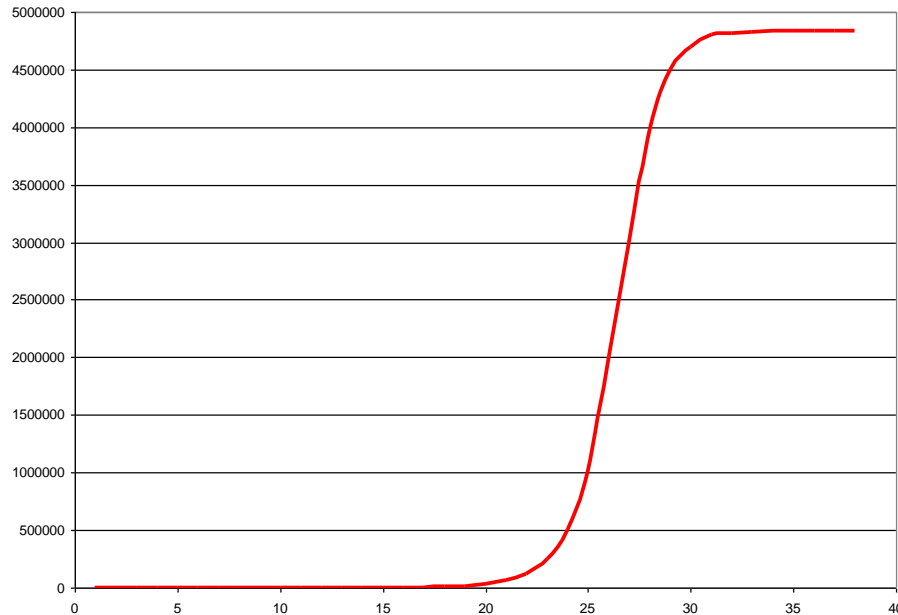
RT-PCR

- **Jeżeli narysujemy wykres ilości DNA po 25 cyklu zobaczymy, że wygląda on mniej więcej tak:**



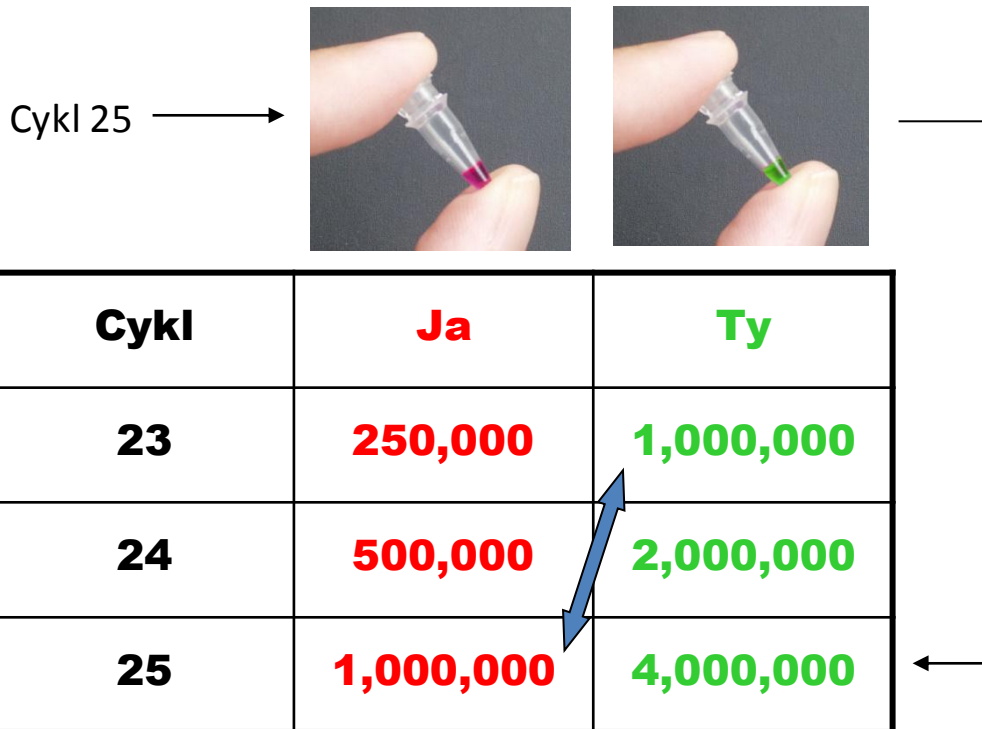
RT-PCR

- **Jak to wszystko może być użyteczne do mierzenia stężenia DNA??**



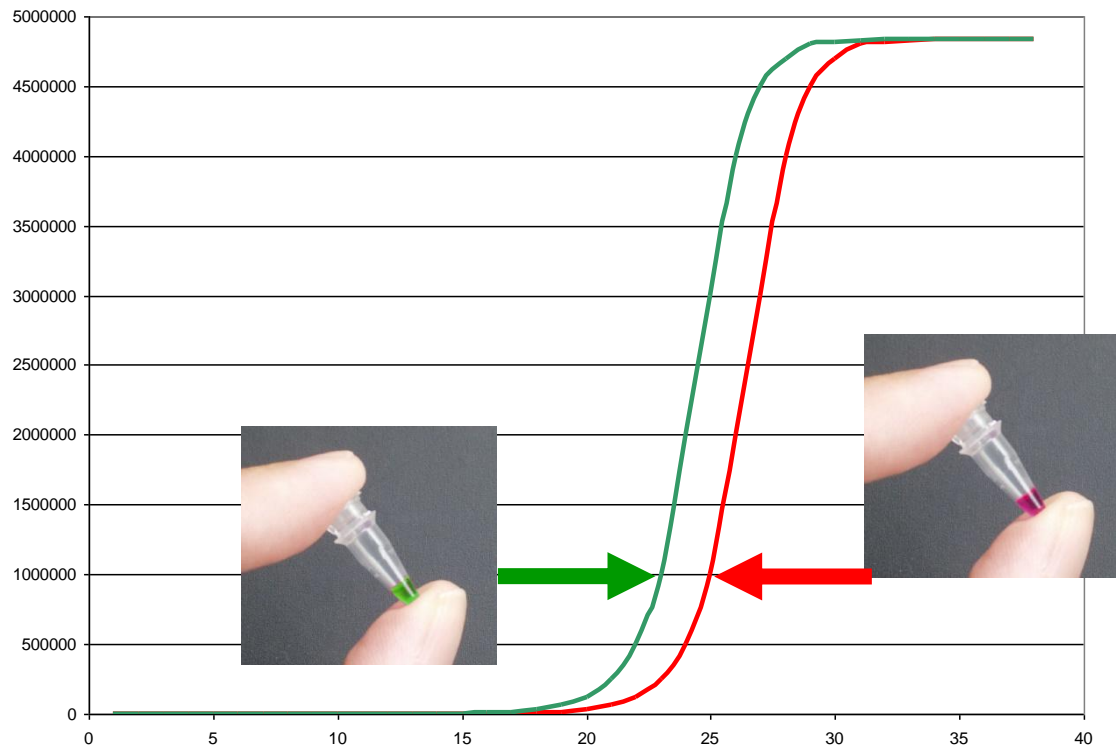
RT-PCR

Wyobraź sobie, że zaczynasz z próbką z 4 razy mniejszą ilością DNA niż ja. Wyobraź sobie nasze próbki w 25 cyklu i kilka cykli wcześniej



RT-PCR

Jeżeli zacząłeś z 4 razy większą ilością DNA osiągniesz liczbę 1 000 000 kopi amplikonu 2 cykle wcześniej ode mnie



RT-PCR

- Co jeśli zaczniesz z ilością DNA 8 razy mniejszą ode mnie?

Cykl 25



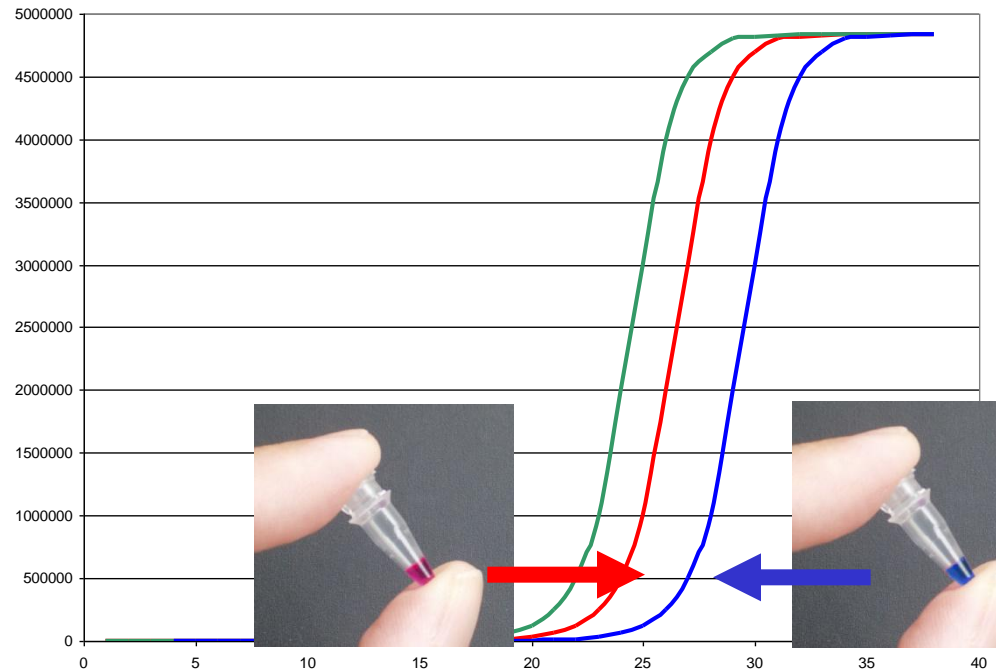
Cykl	Ja	Ty
25	1,000,000	125,000
26	2,000,000	250,000
27	4,000,000	500,000
28	8,000,000	1,000,000

RT-PCR

**Co jeżeli zaczniesz
z 8 razy mniejszą
ilością DNA?**

**Masz tylko 125 000
kopií w cyklu 25**

**A liczbę 1 000 000
kopií uzyskasz w
cyklu 28, 3 cykle
później niż ja**

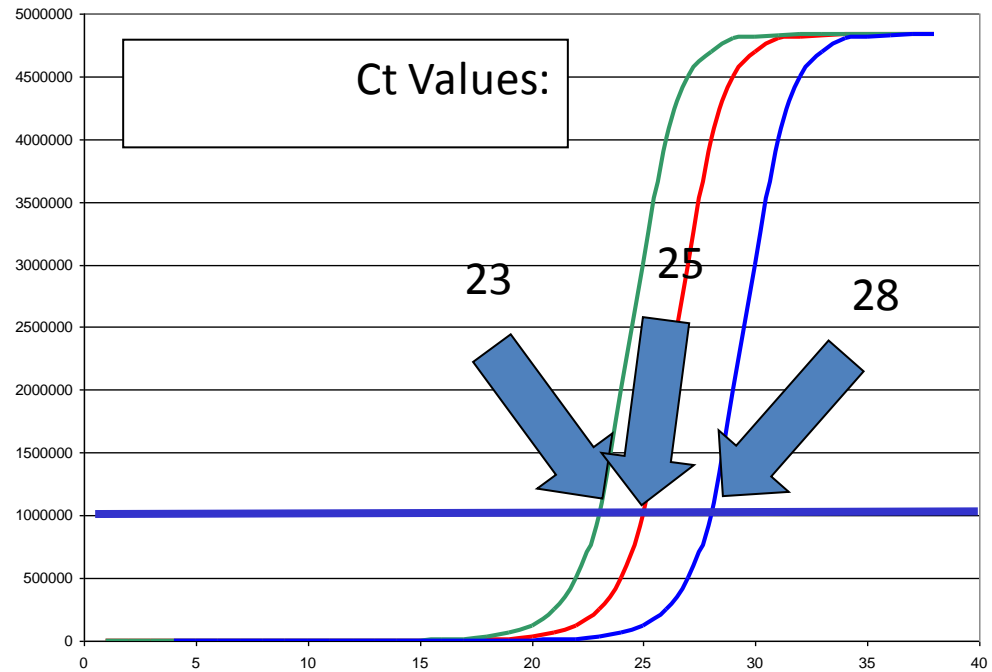


RT-PCR

“Ct Value” – wartość cyklu w której ilość kopi osiąga arbitralną wcześniej ustaloną wartość np. 100 000

Ct values jest bezpośrednio związana z początkową ilością DNA formułą:

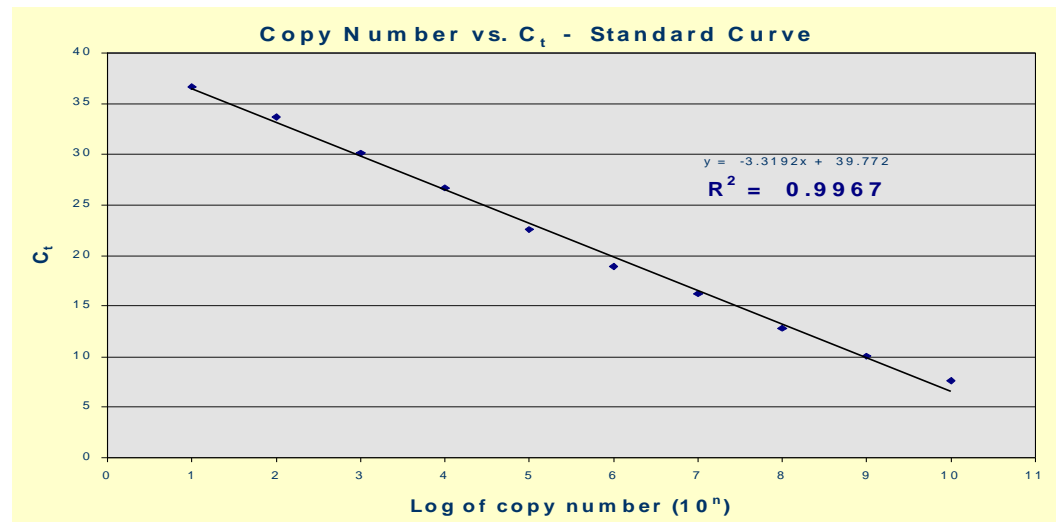
$$\text{Ilość} = 2^{\text{Ct}}$$



RT-PCR

Jest bezpośrednia zależność pomiędzy ilością DNA a wartością Ct value.

Ilość DNA $\approx 2^{\text{Cycle Number}}$



Jak mierzymy ilość DNA w reakcji PCR?

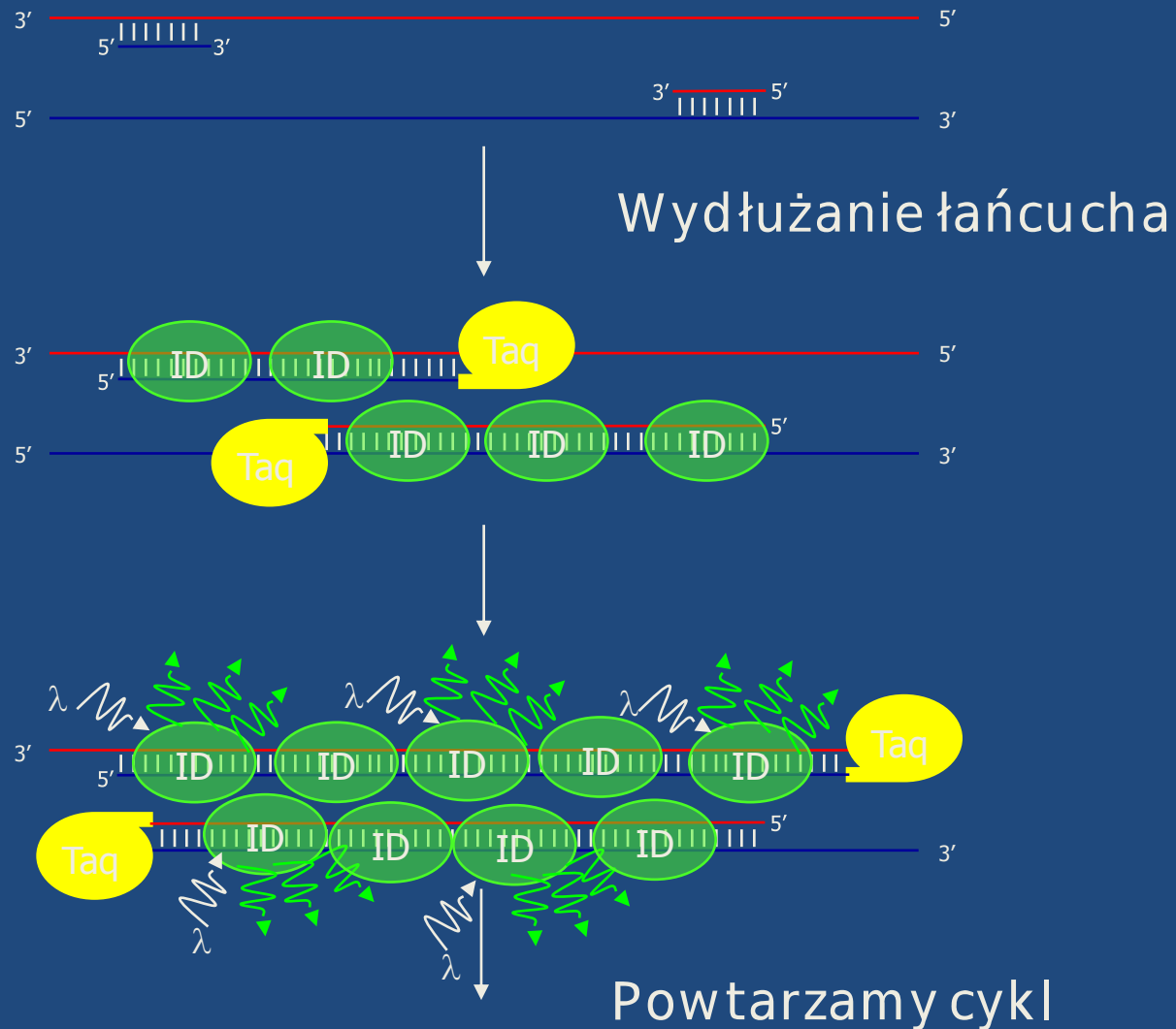
Używamy odczynników, które świecą fluorescencyjnie w obecności DNA

Bromek etydyny i SYBR Green są przykładami takich substancji

Łączą się z dwuniciowym DNA i emitują fluorescencję pod wpływem światła UV

SYBR Green jest bardziej czuły od bromku etydyny

Jak mierzymy ilość DNA



Jam mierzymy ilość DNA

- Z każdym cyklem rośnie ilość DNA więc rośnie siła fluorescencji (więcej barwnika łączy się z dwuniciowym DNA)