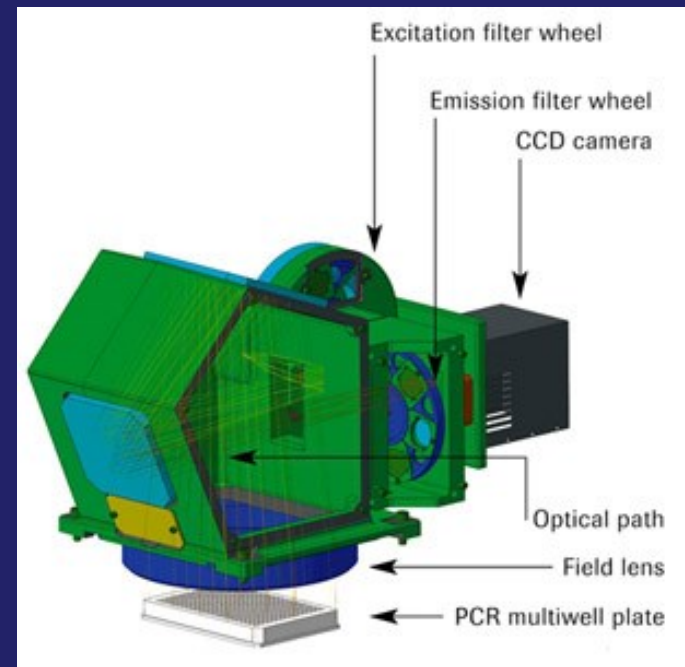


RealTime PCR

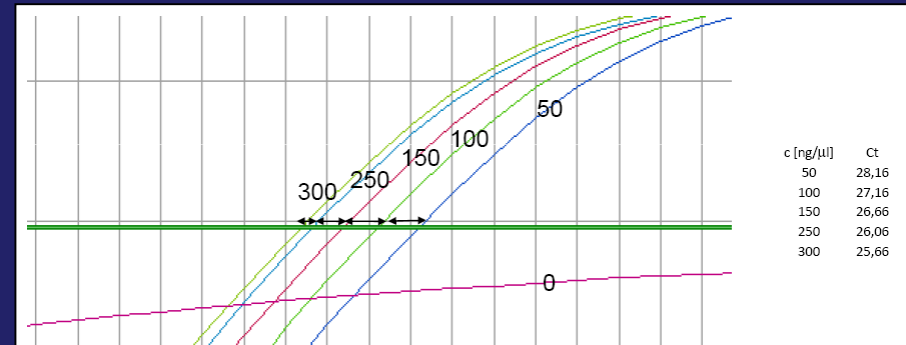
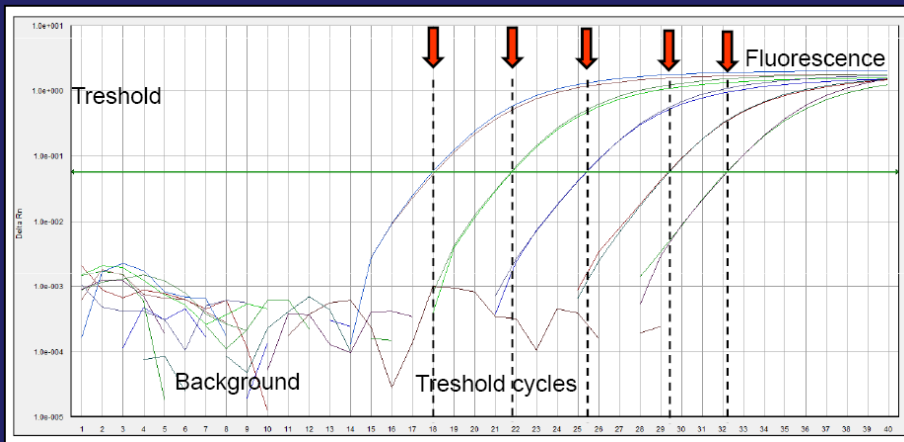


1. Kvantitativní vztah mezi množstvím PCR produktu a intenzitou fluorescence

- účinnost PCR musí být u všech vzorků stejná
- amplifikační práh (Ct) musí ležet v exponenciální fázi (lineární část křivky)

2. Fluorescence R

- zajištěna vazbou fluorescenčního interkalačního bariva na DNA (SyberGreen), použitím hydrolyzační sondy apod.
- sledujeme změnu fluorescence v čase vůči pozadí



3.

Threshold cycle Ct

- učený na základě hodnoty fluorescence pozadí, kvantitativní výstup pro každý vzorek
- udává počáteční množství kopií templátu, definovaný v exponenciální fázi PCR
- čím menší Ct, tím větší počet kopií templátu na začátku reakce
- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu $2^1 = 2$
- desetinásobný rozdíl v množství cyklů odpovídá

$$2^n = 10 \quad n = \log_{10} / \log_2 = 3,32$$

4.

Účinnost RealTime PCR - E

- účinnost PCR je 100% jen výjimečně
- běžně rozmezí $E = 1,60 - 2,10$, $R^2 > 0,989$

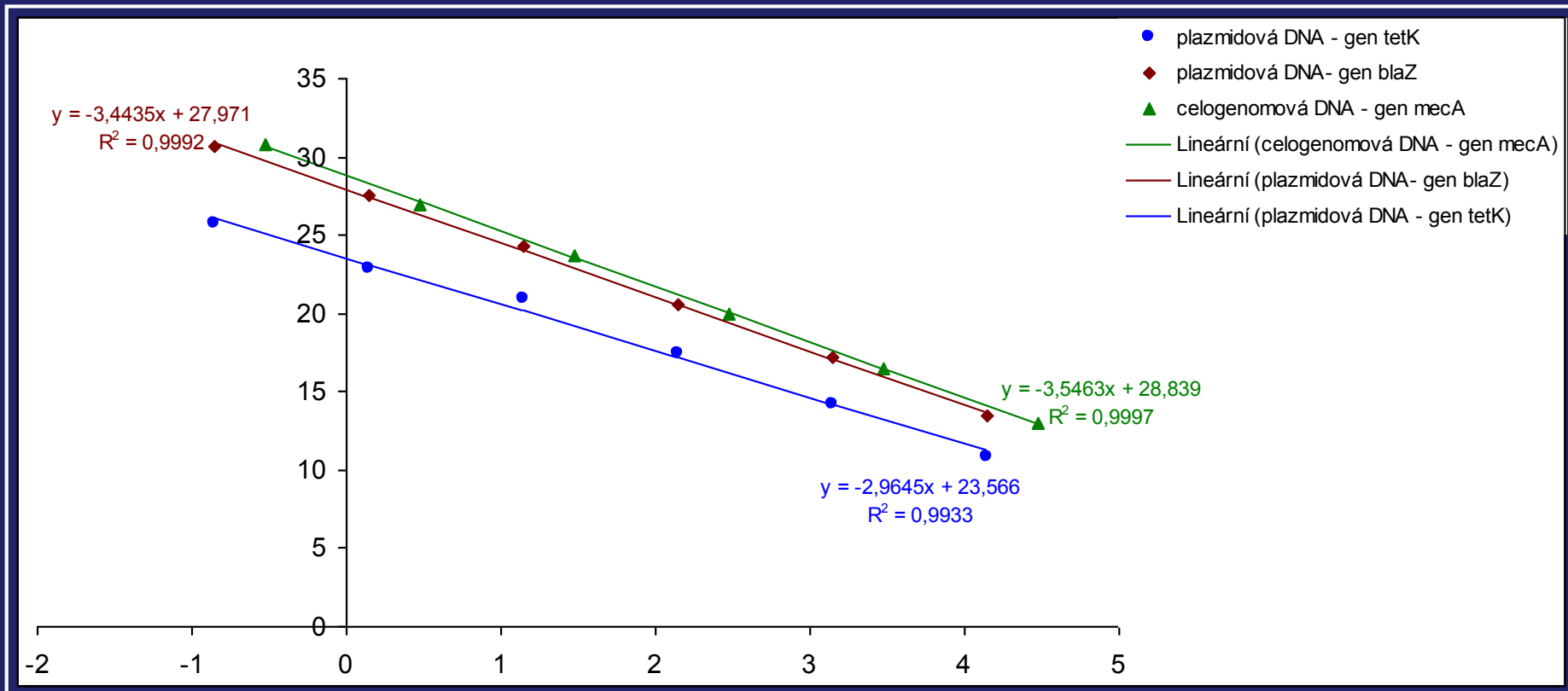
Určení počtu kopií plazmidů na buňku (PCN)

size of chromozomal DNA (bp) * amount of plasmid DNA (pg)

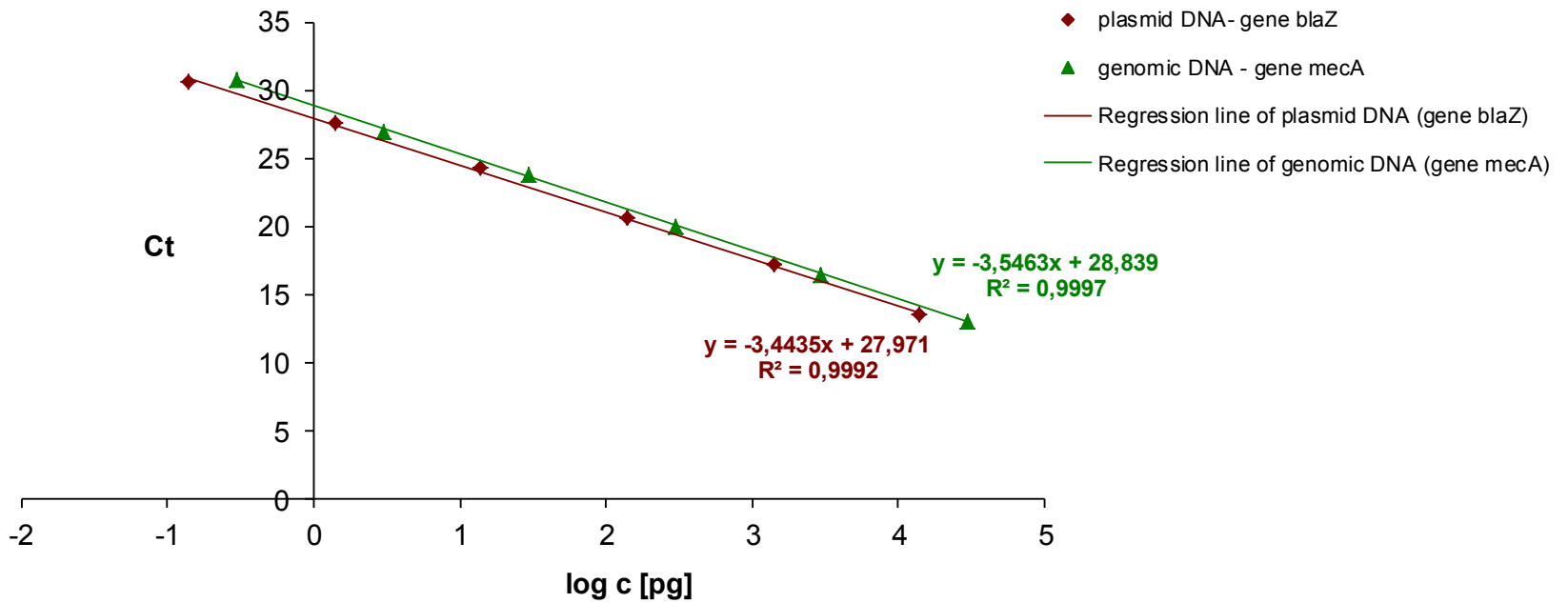
PCN per genom =

size of plasmid DNA (bp) * amount of genomic DNA (pg)

Quantitative real-time polymerase chain reaction for
determination of plasmid copy number in bacteria
(Chai Lian Lee et al,2006)

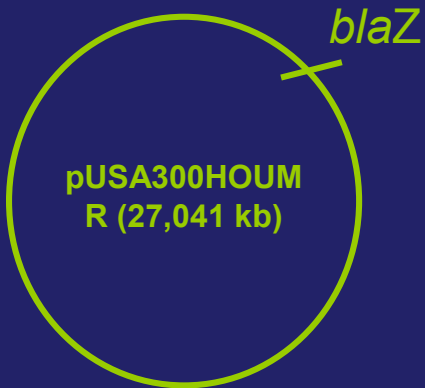


Plasmid copy number in bacterial cell





$$\text{PCN (pT181)} = \frac{2,809 \cdot 10^6 * 6,69 \cdot 10^1}{4,4 \cdot 10^3 * 927} = 45 \text{ kopií}$$



$$\text{PCN (pT181)} = \frac{2,809 \cdot 10^6 * 1,04 \cdot 10^3}{2,7 \cdot 10^4 * 927} = 1,2 \text{ kopií}$$