

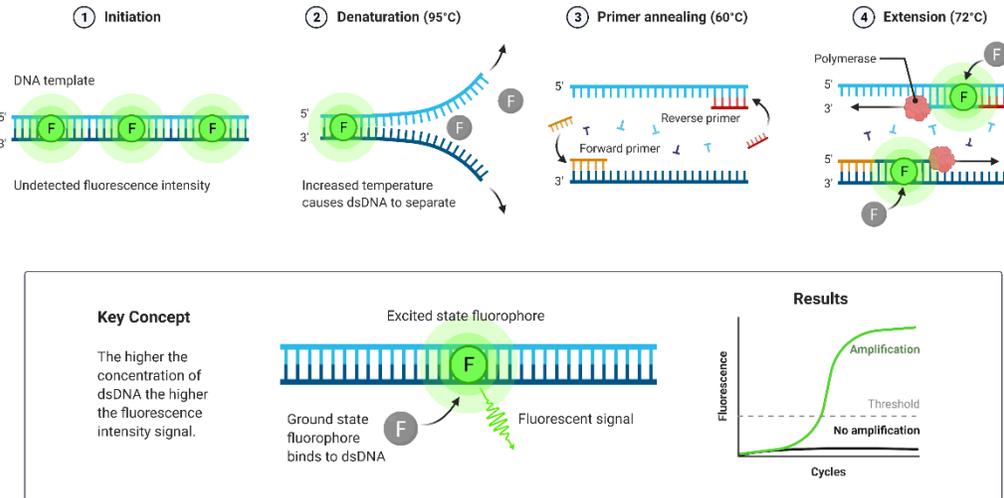
# Система для цифровой ПЦР QIAcuity 5plex



к.б.н., с.н.с. Анисенко Андрей Николаевич  
[a\\_anisenko@mail.ru](mailto:a_anisenko@mail.ru), лаб.корпус А, к. 328

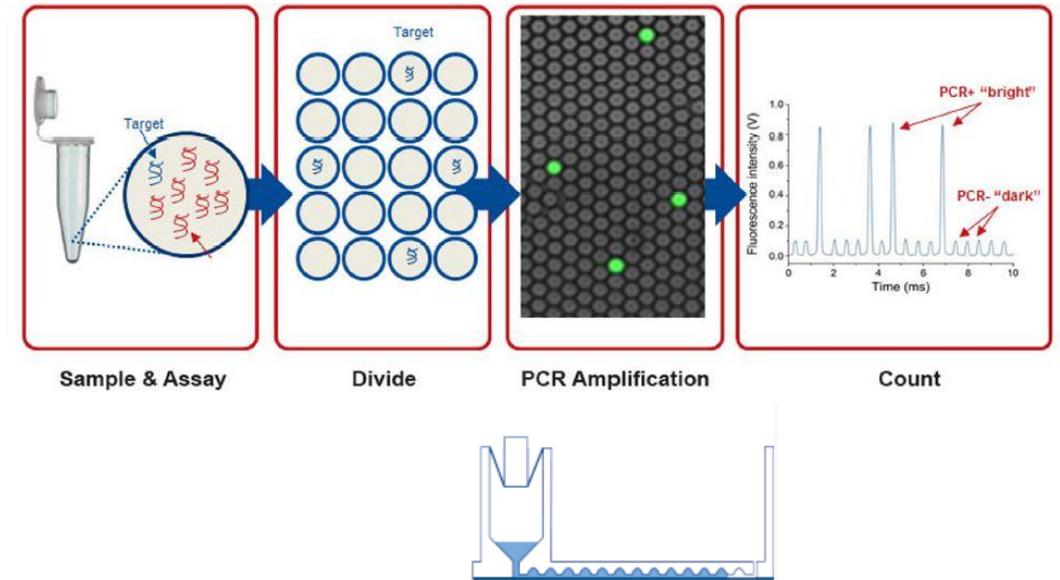
# 1. ПЦР в реальном времени (real time PCR, qPCR)

## Fluorescent Dye-Based Real Time PCR (qPCR)



- В реакционную смесь вводится специфический краситель на ДНК (SYBR Green I) или специфичные ДНК-зонды с флуорохромом (например, TaqMan-зонды)
- После каждого цикла элонгации измеряется уровень флуоресценции, который коррелирует с количеством двуцепочечной ДНК

# 2. Цифровая ПЦР (digital PCR, dPCR)



- Аналогичные красители или зонды
- Реакция идет в масляных микрокаплях или в планшетах спец. образца, каждая лунка которого разделена на микролуны
- После завершения ПЦР (все циклы) подсчитывается число позитивных капель или микролунок относительно общего числа

# Сравнение методов

## qPCR

- Определение относительного содержания целевого гена
- Возможны и абсолютные измерения, но требуется контроль с заранее известным содержанием гена
- Широкий динамический диапазон ( $10^6$ - $10^8$ )
- Высокие требования к эффективности праймеров
- Критическое влияние ингибиторов ПЦР на точность измерений

## dPCR

- Абсолютные измерения без стандартов
- Возможность работы с меньшими количествами исходного биоматериала
- Выше чувствительность, что позволяет детектировать присутствие редких мутаций в образце, обогащенном «нормальными» вариантами аллеля.
- Праймеры могут быть не оптимизированы
- Устойчивость системы к присутствию ингибиторов ПЦР

# Для чего использовать?



Обнаружение редких мутаций



Вариация числа копий



Анализ экспрессии генов, микроРНК



Обнаружение патогенов



Обнаружение ГМО



Валидация методов секвенирования нового поколения



Анализ микробиоты



Определение характеристик эталонных образцов



Жидкая биопсия

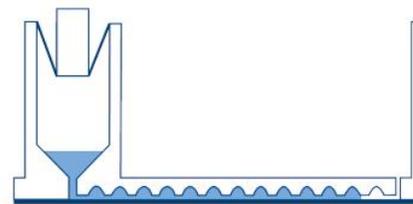
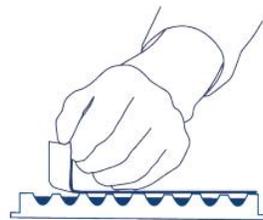
# Как работает?



Количество планшетов – 1 шт.

Каналы (5plex):  
FAM, HEX, TAMRA, ROX, Cy5  
+  
Референсный канал

# Как работает?



Pipette reaction mixtures to dPCR plate

Apply rubber plate seal to digital PCR plate and place in instrument

Instrument automatically partitions, thermal cycles, and reads plate



# Что потребуется?

1. Планшеты:
  - 24 луночные (8.5 или 24 тыс. наблюдений)
  - 96 луночные (только 8.5 тыс. наблюдений)
2. Держатель для планшетов
3. Пленка
4. Реагенты:
  - QIAcuity Probe PCR Kit (ПЦР с зондами)
  - QIAcuity EG PCR Kit (ПЦР с интеркалирующим красителем)

Цена одной лунки с реагентами составляет ~250 р.

Пустые ячейки планшета нельзя повторно использовать!!!!