
Lightcycler RT-PCR

Dodavatel	ROCHE s.r.o.
Rok pořízení	2018
Cena	0,6 mil. Kč vč. DPH
Financování	OP VVV <u>CORE FACILITIES</u> CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002515
Zodpovědná osoba	prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

DNA je nositelem genetické informace a určuje vývoj celého organismu. Objev její struktury a funkce znamenal velký průlom a následně došlo i k velkému rozvoji molekulárně-biologické analýzy. Tato analýza je jednou z nejdůležitějších součástí diagnostiky a je široce využívána nejen v základním a aplikovaném genetickém výzkumu, ale i v oborech, jako je archeologie, zoologie, botanika, klinická diagnostika, nebo kriminalistika. Z medicínského hlediska molekulárně-biologickou analýzu využívají zejména obory jako farmakogenetika/genomika, nutrigenomika, prenatální a preimplantační diagnostika, mikrobiologie a další klinické obory, jejichž součástí je obecně analýza nukleových kyselin.

Na naší katedře používáme jako experimentální model buněčné kultury, které jsou dnes již nenahraditelným nástrojem používaným ve výzkumu. Mimo jiné slouží například pro studium protinádorové léčby a cílené terapie. V posledních dvou dekadách se jejich použití při studiu nádorové biologie ukázalo jako neocenitelné, z důvodu lepšího porozumění vývoje nádoru, progresu metastáz a interakcí s nádorovým stromatem. Použití buněčných linií se stalo nedílnou součástí studia molekulárně-biologických technik, charakterizace genetických a epigenetických procesů a také studia prognostických a prediktivních markerů pro možnou individualizaci terapie.



Lightcycler 96 je přístroj umožňující kvantitativní stanovení množství DNA a detekci genové exprese pomocí absolutní, nebo relativní kvantifikace genu v reálném čase na základě měření fluorescence. Jedná se o gradientový real-time PCR přístroj, který využívá technologii Peltierových článků umožňujících rychlé změny teplot vyžadované pro tuto techniku. Dále může být prováděna vysokorozlišovací analýza (HRM) umožňující detekci mutací vzorků pomocí křivek teplot tání se specificky navrženými sondami pokrývajícími jednotlivé mutace. Touto analýzou je umožněna detekce rozdílů mezi dvěma testovanými DNA sekvencemi a to až na úrovni rozdílů jednotlivých nukleotidů např. pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) nebo pro analýzu mutací.

Přístroj je vybavený 96-jamkovým blokem, ve kterém mohou být vzorky analyzovány v samostatných zkumavkách, 8-zkumavkových stripech nebo 96-jamkových destičkách, což umožňuje otestovat až 96 vzorků najednou během jedné analýzy. Díky tomu dochází jak ke zrychlení přípravy vzorků, tak samostatné analýzy a tím i zvýšení efektivity zpracování.

V naší laboratoři jsme dosud využívali PCR cyklér, který měl zabudovanou kameru, kolem které byly jednotlivé vzorky posouvány a tím docházelo ke snímání fluorescence. V přístroji Lightcycler96 je fluorescence všech vzorků snímána současně pomocí CCD kamery, která je namířena na každou jamku zvlášť, čímž nedochází k pohybu kamery ani vzorků. Tím je zajištěna kompaktnost všech měření a nárůst fluorescence je tak měřen vždy za stejných podmínek.

Pro měření fluorescence během analýzy je jako zdroj excitace použita LED dioda a na přístroji je možné využít a kombinovat 4 různé excitační a 4 emisní (detekční) filtry, což umožňuje zároveň analyzovat různé fluorofory během jedné reakce. Lightcycler96 disponuje těmito excitačními/emisními možnostmi: excitace 470 nm/emise 514 nm (mj. pro

detekci fluoroforů: SYBR, FAM, ResoLight dye); excitace 533 nm /emise 572 nm (mj. pro detekci fluoroforů: VIC, Hex, Yellow555); excitace 577 nm/emise 620 nm (mj. pro detekci fluoroforů: Red610, Texas Red), excitace 645 nm/emise 697 nm (mj. pro detekci fluoroforů: Cy5).

Díky nákupu přístroje Lightcycler96 jsme doplnili přístrojové vybavení molekulárně-biologické laboratoře, což nám pomůže získávat informace o buněčných procesech na úrovni DNA a také umožní komplexnější posouzení všech fyziologických a patologických procesů, což by mohlo v budoucnu zefektivnit léčebné strategie některých závažných onemocnění. Tento přístroj je využíván studenty Lékařské a Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v rámci jejich postgraduálního studia a umožňuje jim efektivnější zpracování biologických vzorků. Získané výsledky studenti použijí pro publikační aktivitu, reprezentaci fakulty na tuzemských a mezinárodních konferencích a v neposlední řadě i k úspěšnému dokončení jejich studia.

Autor textu: RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.