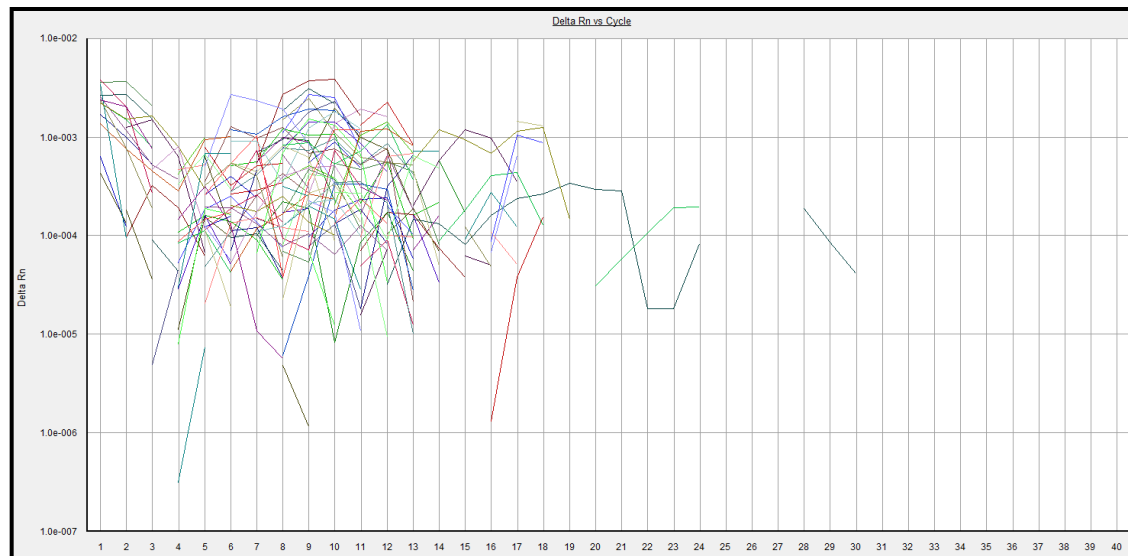


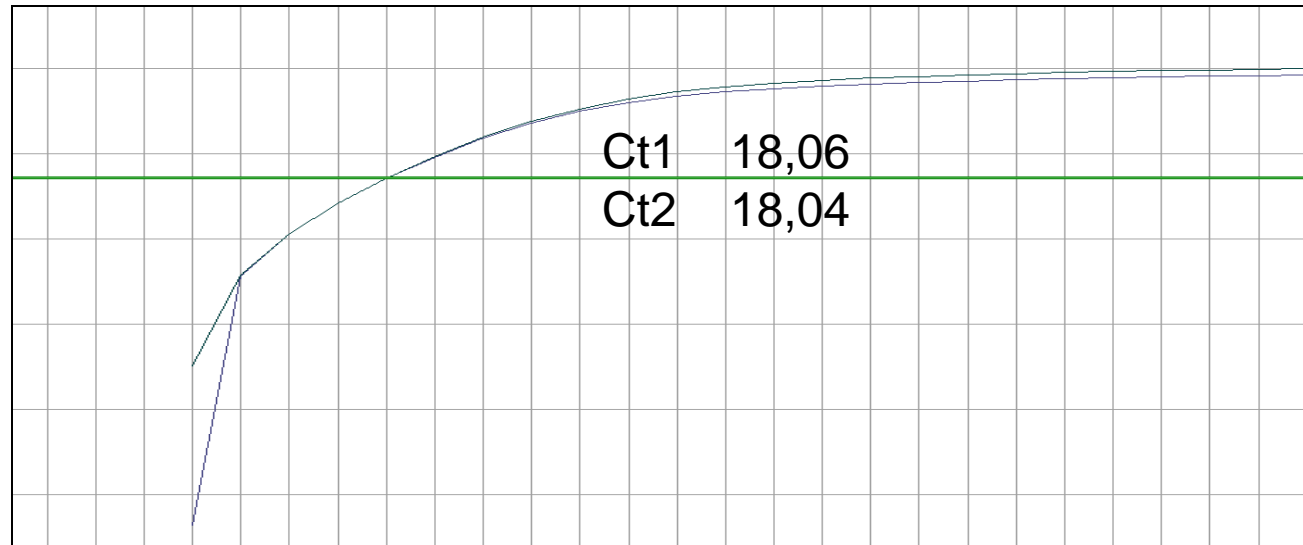
# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



## VII. Troubleshooting

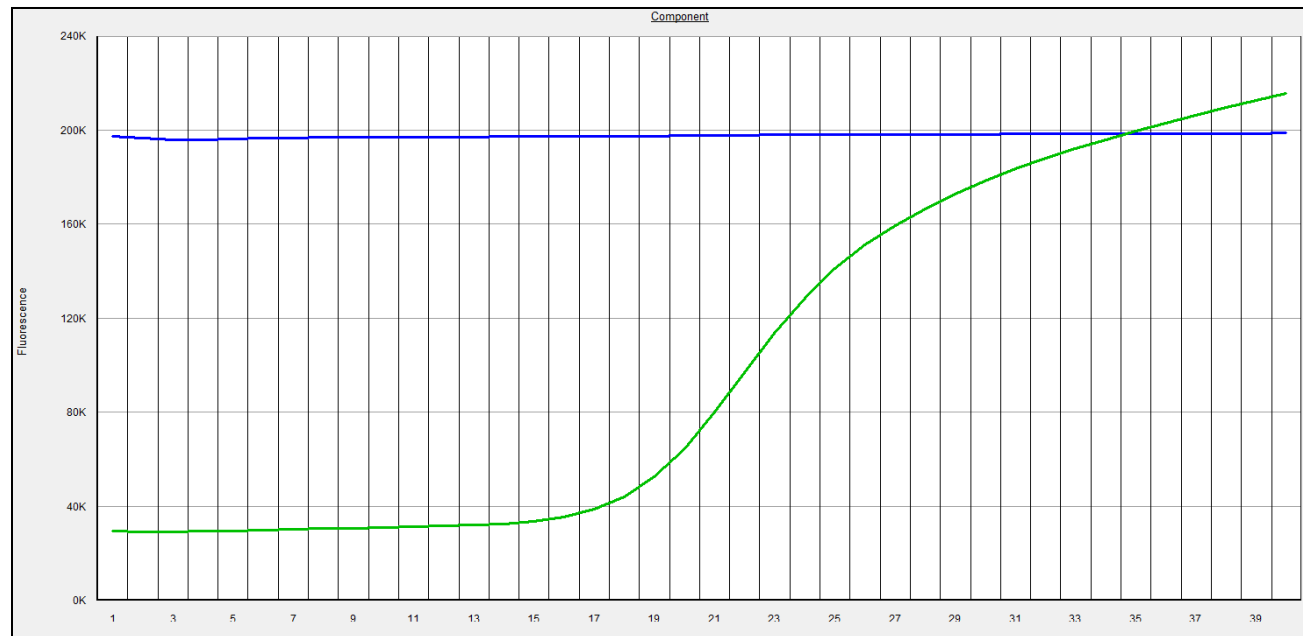
# Problémy v qRT-PCR analýze

## Jak vypadá správný amplifikační výstup?



## Duplikátní reakce

- Exponenciální amplifikace
- Identická amplifikace
- Podobné/shodné Ct
- Odpovídající fluorescence jednotlivých reportérů

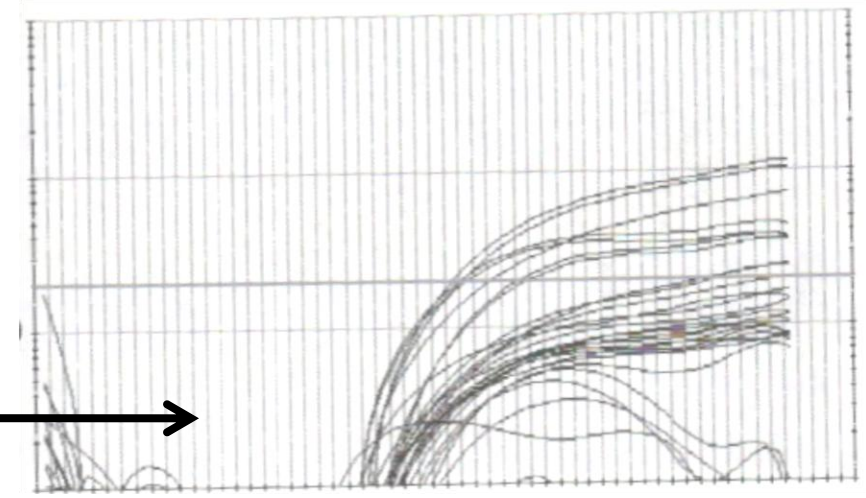


# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 1:

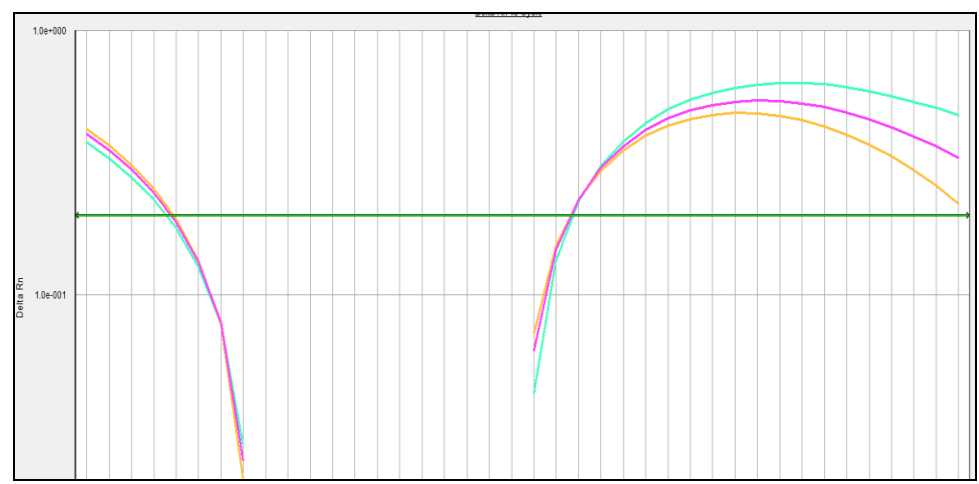
### Příliš mnoho templátu

- Vysoká hodnota pozadí
- Fluorescence v prvních cyklech (ze kterých se počítá baseline) je vyšší, než fluorescence na konci reakce



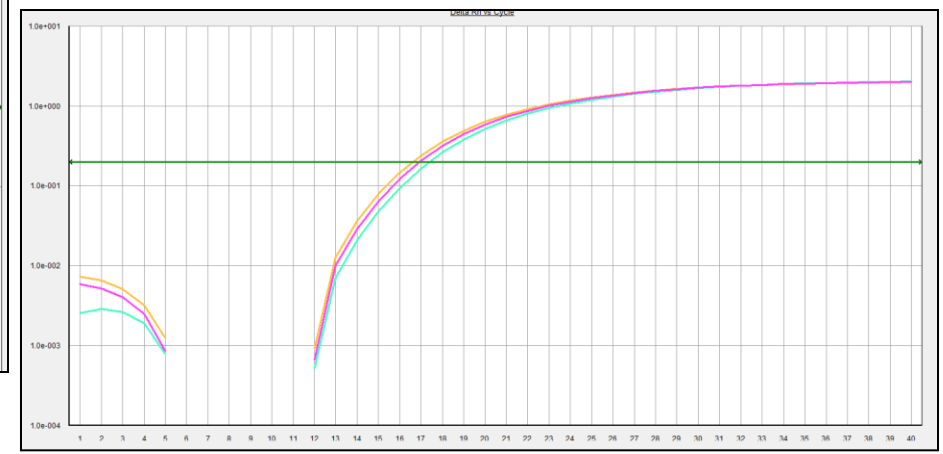
### Řešení:

- Ředit templát 1:100 – 1:1000 a zopakovat PCR
- Změnit manuálně treshold nebo nastavení baseline



Baseline 3.-13 cyklus →

← Baseline 3.-25. cyklus



# Problémy v qRT-PCR analýze

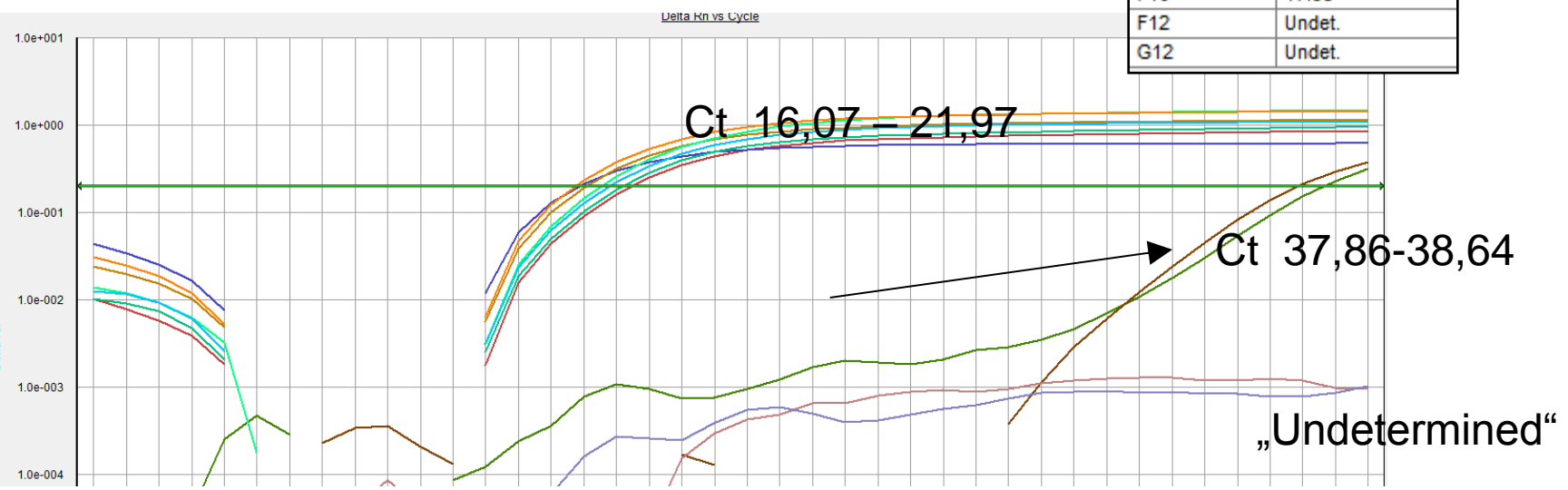
## Problém 2:

**Amlifikace není exponenciální**

Pravděpodobně přítomnost inhibitorů  
v konkrétním vzorku

**Řešení:** Ředění templátu 1:10-100

| Well | Ct     |
|------|--------|
| A10  | 17.46  |
| A10  | 21.97  |
| A12  | 15.85  |
| A12  | 19.26  |
| B10  | 38.64  |
| B10  | Undet. |
| B12  | 37.86  |
| B12  | Undet. |
| C10  | 17.18  |
| C10  | 20.35  |
| C12  | 16.07  |
| C12  | 19.16  |
| D10  | Undet. |
| D10  | Undet. |
| D12  | Undet. |
| D12  | Undet. |
| E10  | 16.49  |
| E10  | 21.55  |
| E12  | 15.71  |
| E12  | 20.11  |
| F10  | 16.75  |
| F10  | 17.93  |
| F12  | Undet. |
| G12  | Undet. |



# Problémy v qRT-PCR analýze

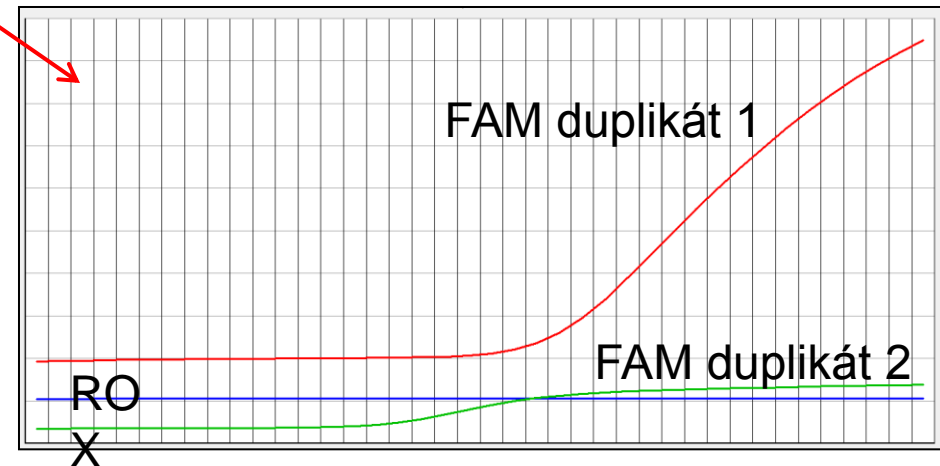
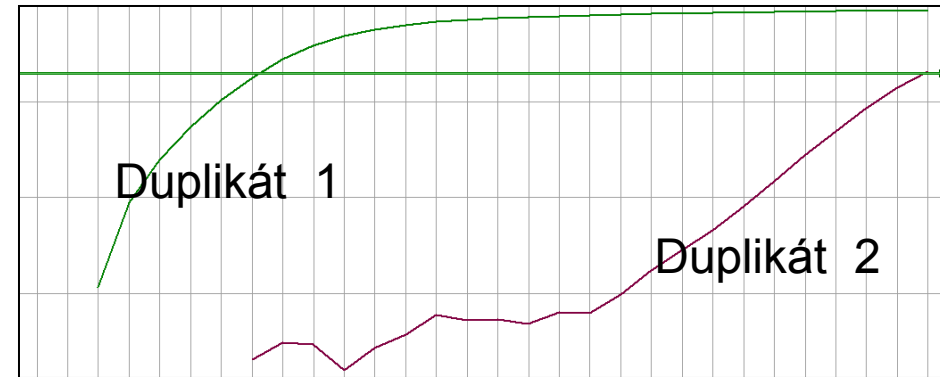
## Problém 3:

### Ct duplikátních reakcí se výrazně liší

- pravděpodobně nedošlo k amplifikaci
- gelová elektroforéza PCR reakcí  
nebo
- multikomponentní záznam fluorescence
- nepřesné pipetování, Monte Carlo efekt,  
přítomnost inhibitoru v reakci

### Řešení:

- Zopakovat reakce  
nebo (pokud už nemáme vzorky)
- vzít v úvahu Ct z exponenciální reakce
- přijít na příčinu problému (otestovat příslušnou  
jamku v bloku, reagentie atd.)



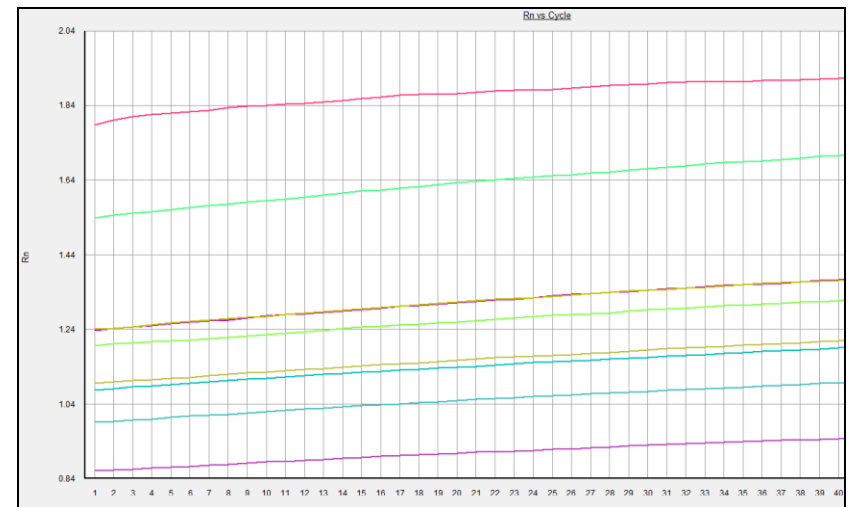
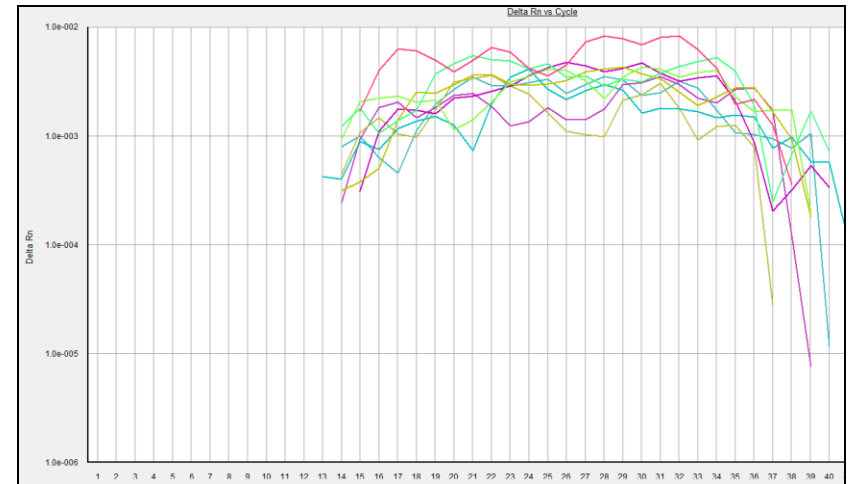
# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 4:

### Nedošlo k amplifikaci u žádného vzorku

#### Řešení:

- Zopakovat reakce včetně pozitivní kontroly
- Pokud opět nedošlo k amplifikaci u žádného vzorku, zkontrolovat společné chemikálie (voda, master mix, sonda)
- Zkontrolovat reakci na agarózovém gelu a vyloučit selhání sondy, eventuálně provést reakci spolu se SYBR green
- Pokud se problém vyskytuje pouze u některých vzorků je problém s těmito vzorky (kvalita templátu, inhibice)



# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 5:

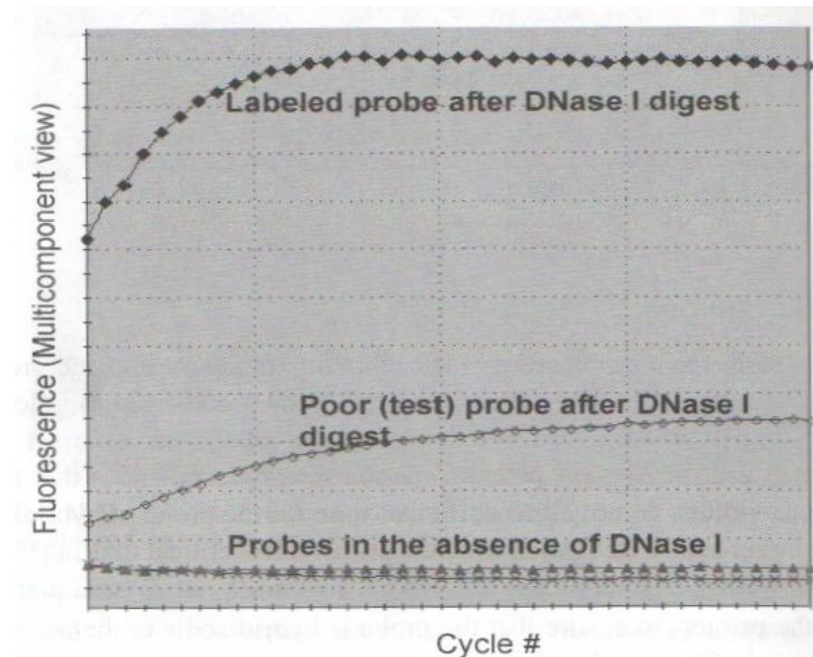
### Nefunguje sonda

#### Řešení:

- Vyloučit lidskou chybu, přítomnost inhibitorů, nekvalitní templát, chyby v RT
- Kontrola pomocí SYBR Green nebo v agarózovém gelu
- Pokud je vyloučeno selhání amplifikace, provést test s **DNázou I**

#### DNázal

- oddělí fluorofor od zhášeče a umožní fluorescenci
- problémy ve značení nebo purifikaci sondy



# Problémy v qRT-PCR analýze

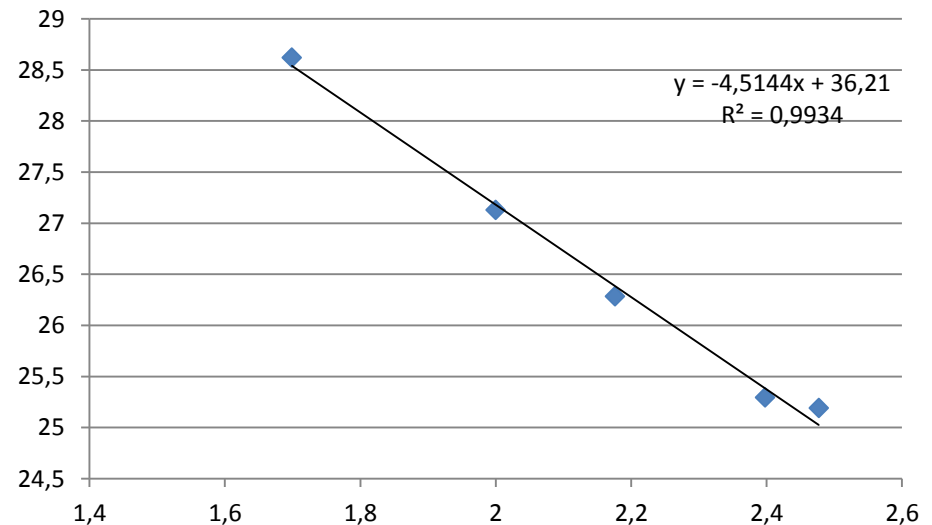
## Problém 6:

### Směrnice kalibrační křivky je menší než -3,3

- Efektivita PCR reakce je menší než 100%

### Řešení:

- chyba výpočtu, inhibitory v reakci, chyba při pipetování
- nové standardy
- kontaminace templátu, koncentrace  $MgCl_2$





# Problémy v qRT-PCR analýze

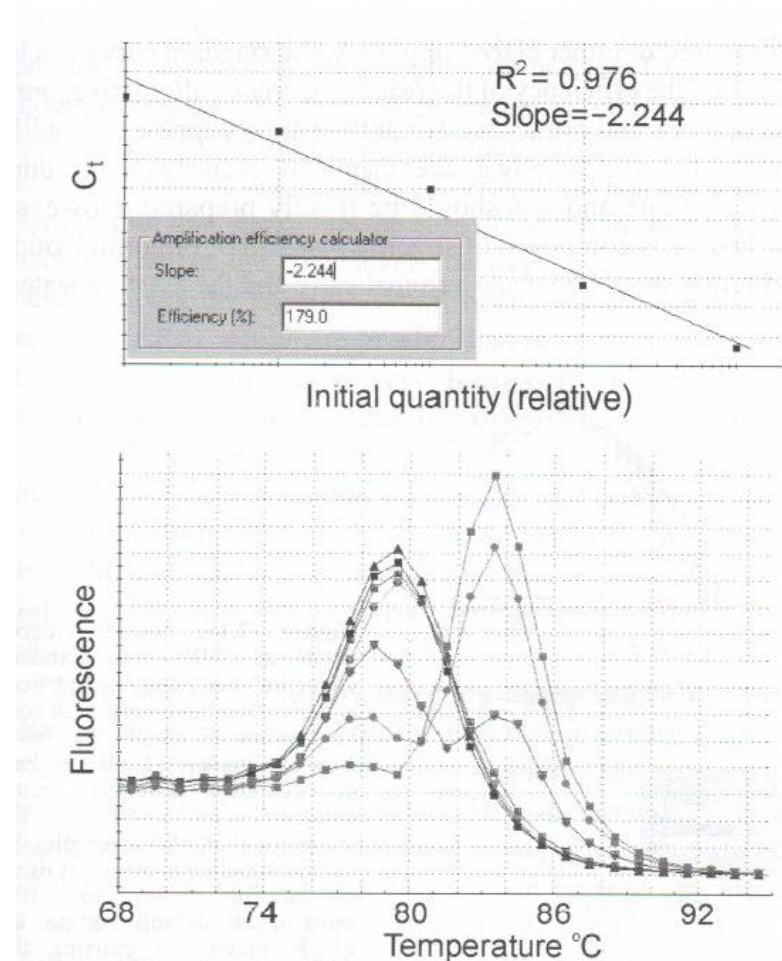
## Problém 7:

### Směrnice kalibrační křivky je větší než -3,3

- Účinnost PCR vyšší než 100%
- V případě specifické detekce (TaqMan) většinou pipetovací chyby nebo chyby ředění
  - event. změnit některé parametry analýzy (zejména baseline)
- SYBR Green – možné nespecifické produkty (primer dimery)

### Řešení:

- nová reakce
- optimalizace PCR



# Problémy v qRT-PCR analýze

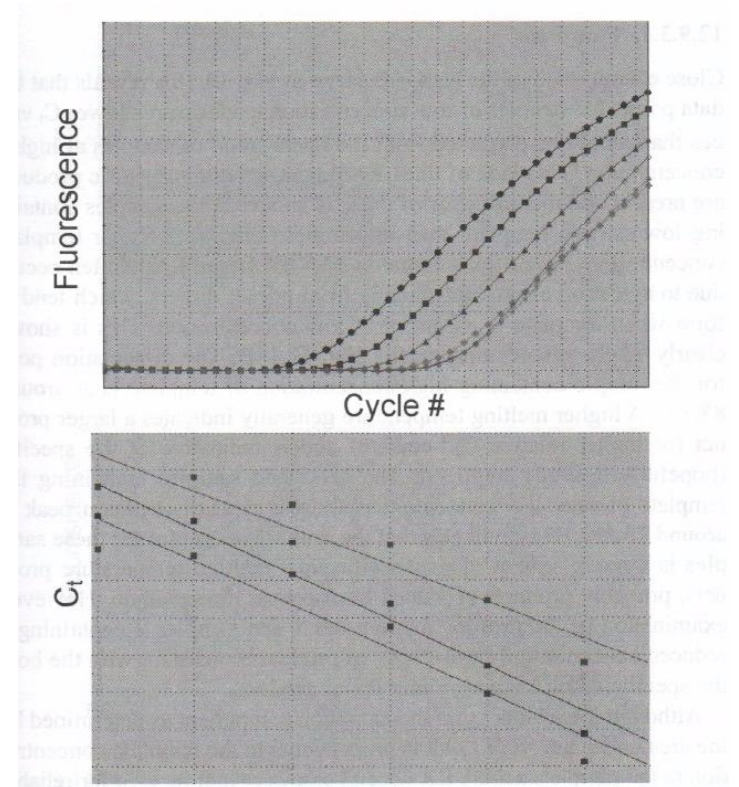
## Problém 8:

### Nelze naředit standardy na nižší koncentraci

- Přítomnost kontaminující DNA

### Řešení:

- nové standardy
- ověřit čistotu RNA vstupující do procesu



# Problémy v qRT-PCR analýze

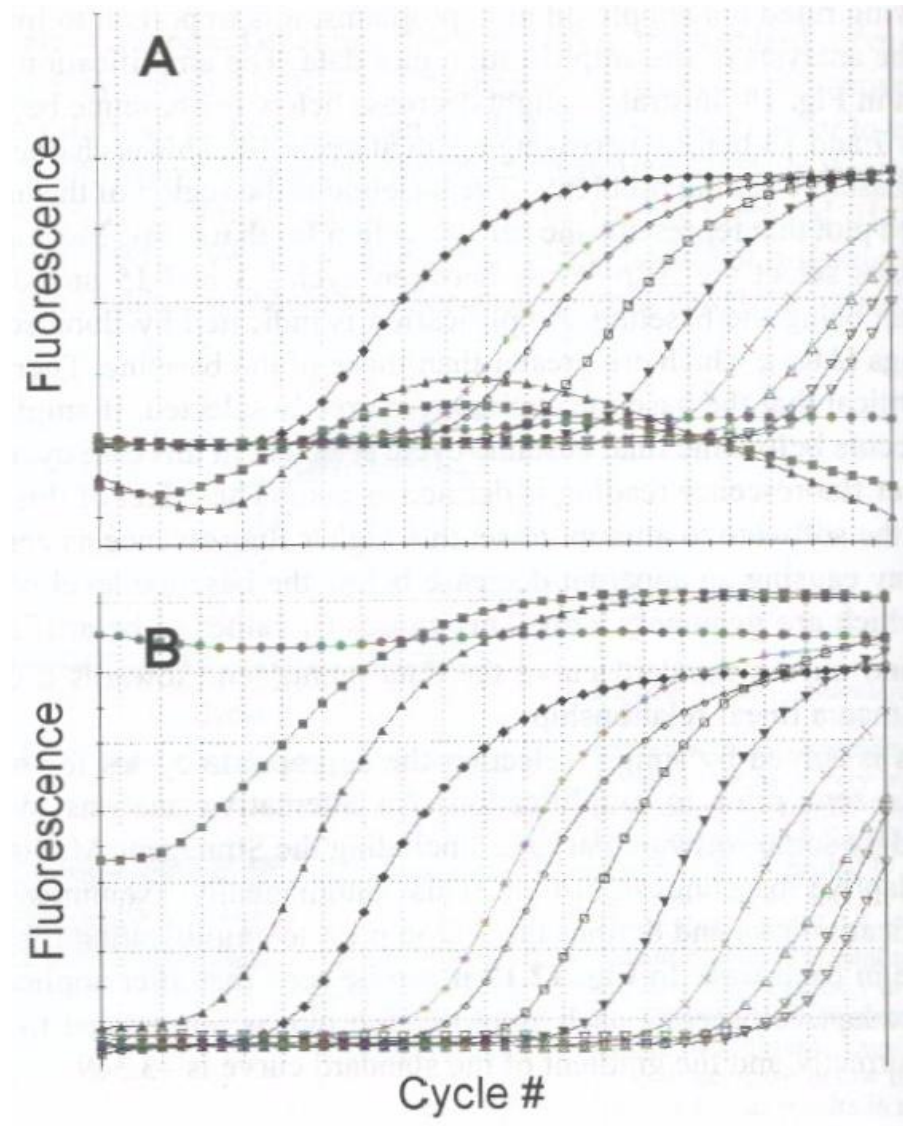
## Problém 9:

### Amplifikační grafy vypadají divně

- příliš mnoho templátu
- chybné nastavení baseline

### Řešení:

- naředit vzorky
- změnit nastavení baseline – vyloučit cykly, ve kterých je abnormální fluorescence
- změnit algoritmus výpočtu

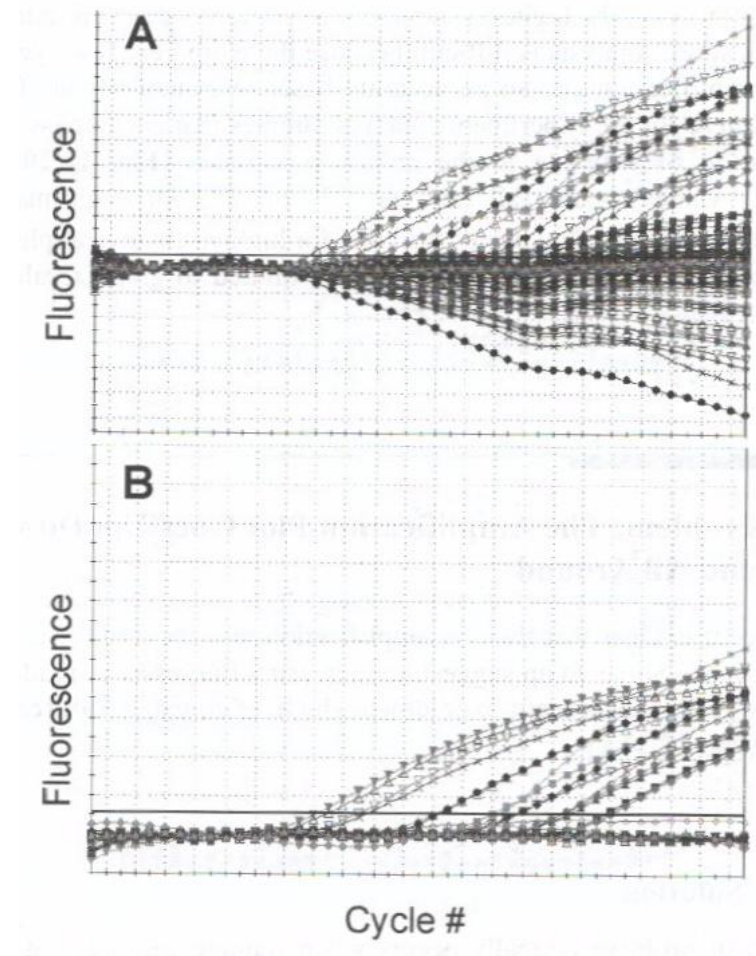


# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 9:

### Amplifikační grafy vypadají „divně“

- změnit algoritmus výpočtu – tzv. adaptivní nastavení baseline – pro každý cyklus jednotlivě



Po této předášce máte představu o tom, jak:

- Má vypadat správný průběh real-time PCR
- Jak nemají vypadat výstupy
- Kdy nevěřit svým datům a jak je ověřit
- Jak vyřešit některé běžné problémy s amplifikací