

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

2. Kvantifikační strategie

Přesná kvantifikace závisí na:

Repeatability (Opakovatelnost)

Intra-assay variabilita (stejná analýza v jedné laboratoři)

Reproducibility (Reproducibilita)

Inter-assay variabilita (stejná analýza v různých laboratořích)

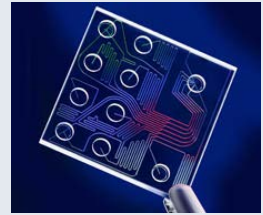
Accuracy (Správnost)

Shoda mezi experimentálně zjištěnou hodnotou a realitou

Precision (Přesnost)

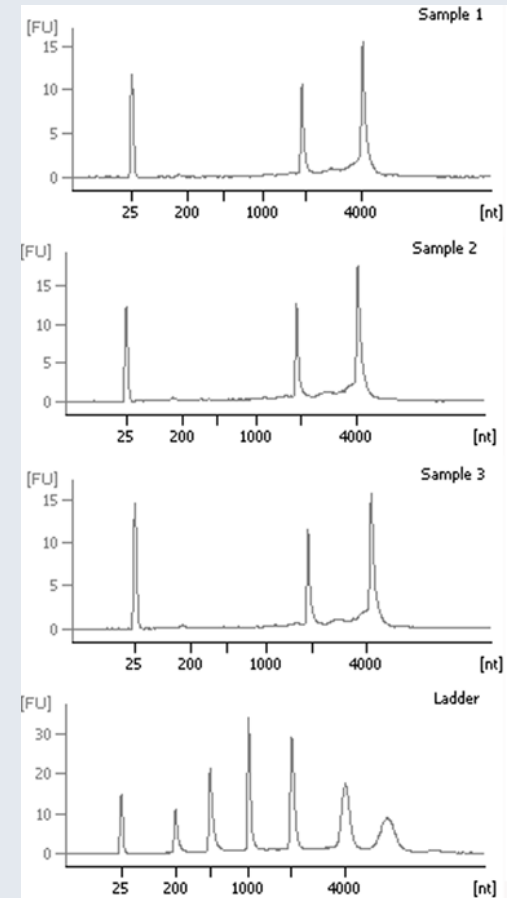
Shoda mezi experimenty („jak přesně pipetujeme“)





Templát – Izolace RNA

- Volba zdroje (charakter tkáně, biopsie, mikrodisekce...)
- Integrita (RNA Integrity Number – RIN) výpočet na základě 28S a 18S rRNA
- Čistota (A260/280; A260/230), přítomnost PCR inhibitorů
- Přesné určení koncentrace RNA
- Celková RNA nebo mRNA?
- Vhodnost metody, automatizace, výtěžek...



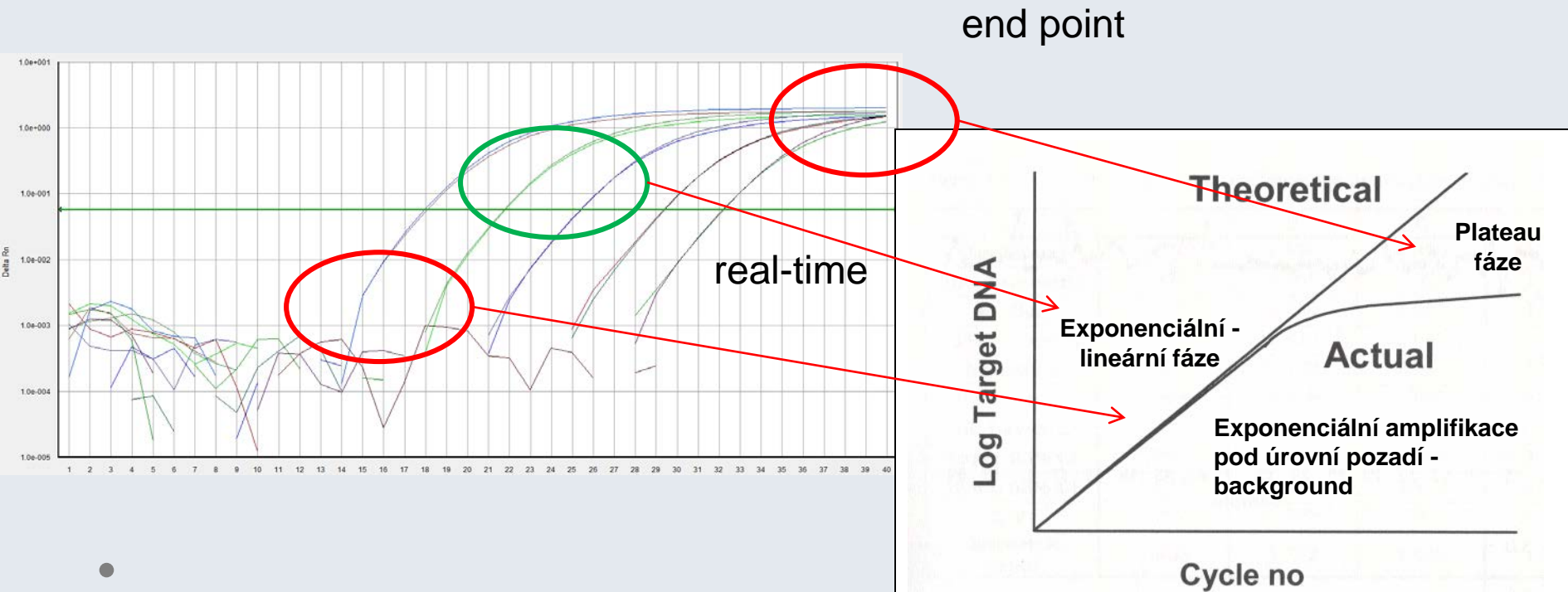
Reverzní transkripce

- Významný zdroj variability v qRT-PCR
- Metoda izolace RNA může významně ovlivnit proces reverzní transkripce
- Volba primerů, enzymu, teplotního profilu
- One step vs. Two step PCR

- Výtěžek cDNA
 - sekvence směrem 5'konci signifikantně nižší výtěžek než 3'
 - RNáza H

End-point vs. Real-Time PCR

- Vztah mezi vstupním množstvím templátu a výsledným množstvím amplikonu je úměrný pouze v exponenciální fázi reakce
- Klasická PCR proto musí být zastavena ještě před dosažením plateau fáze
- Intra-assay variabilita klasické PCR (30-40%); Inter-assay variabilita (50-70%)



Kvantifikační strategie

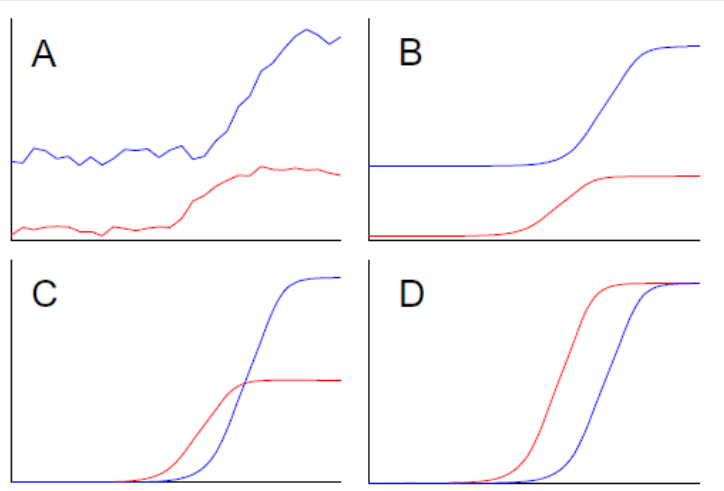
Zpracování dat

A data přímo z přístroje

B vyhlazení dat

C normalizace pozadí (na základě nespecifické fluorescence)

D normalizace amplitudy signálu (na základě plateau)



Množství polymerázy

Koncentrace primerů

Tvar mikrozkušavek

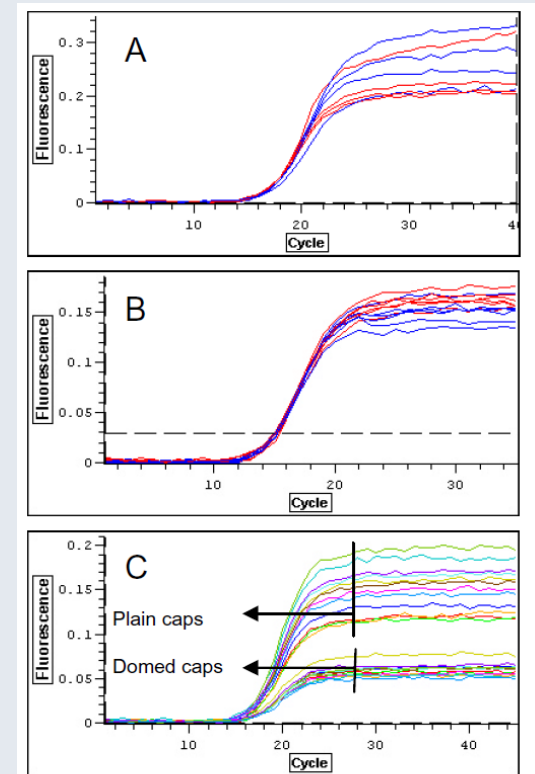
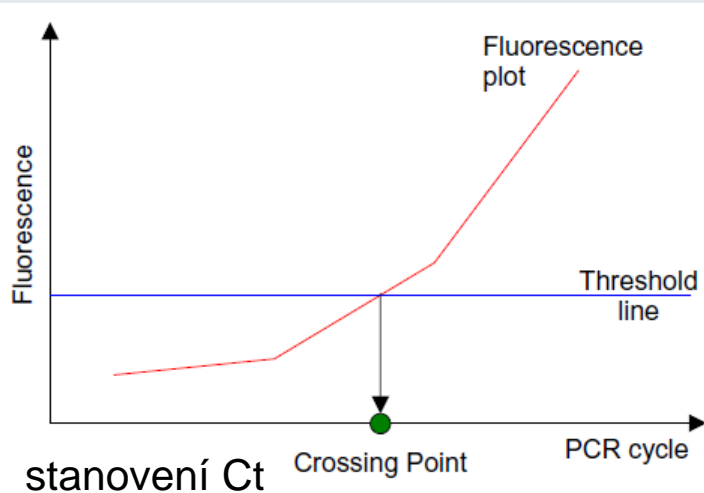


Figure 7

Effect of different factors on plateau position. A: More enzyme in blue than in red samples B: More primers in blue than in red samples C: Domed and plain caps



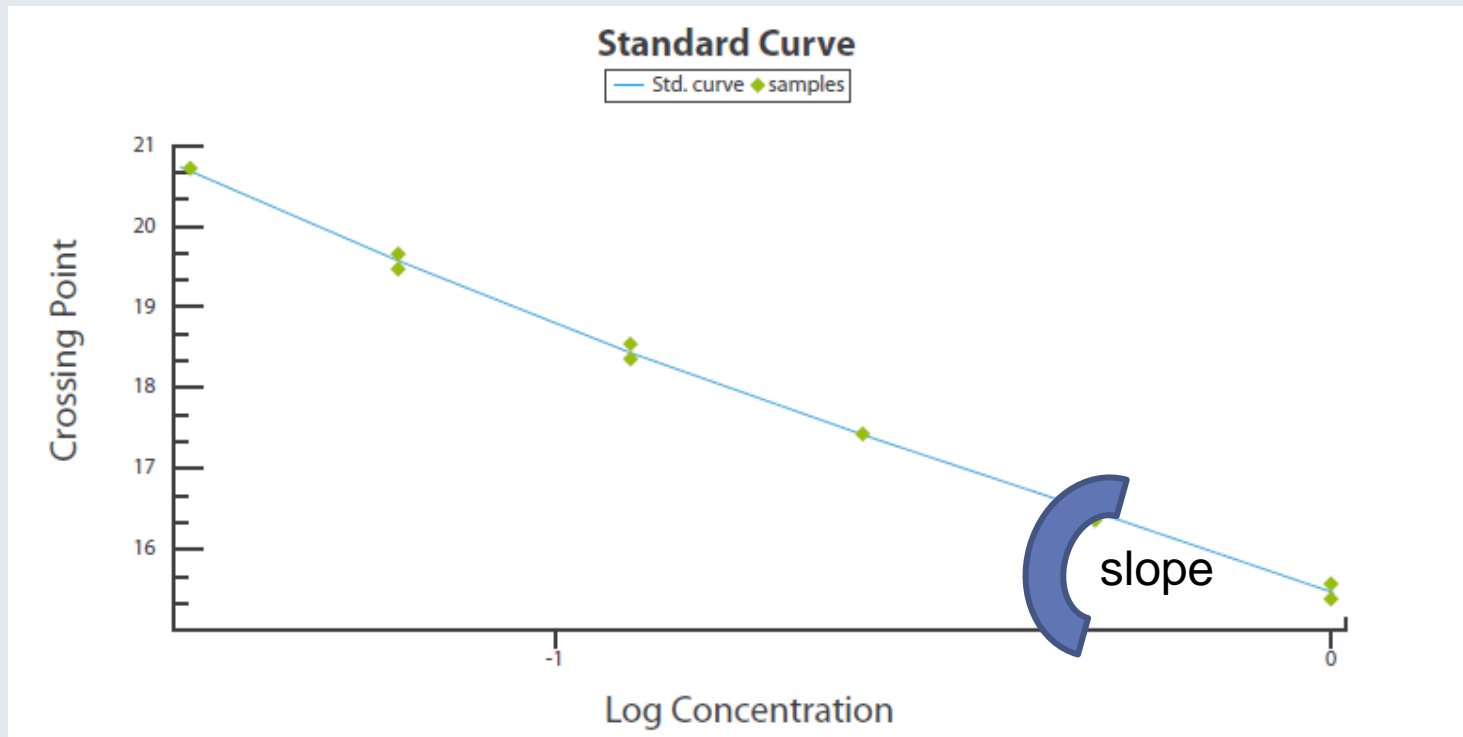
PCR efficiency (účinnost)

- Measure of rate at which polymerase converts the reagents to amplicon
- Maximum increase per cycle is 2-fold - 100% efficiency
- 100% efficiency may not happen repeatedly
- It is necessary to create standard dilution curve - need slope of the reaction

Standard curve

- 10-fold dilution - 8 points
- Will define dynamic range of reaction
- For each point- in triplicates, get Ct values
- Need tight technical replicates
- Reproducibility- replicates (no more than 0.5 Ct difference)
- R values- how well data fit on curve
- R^2 - how well data points lie on line (linearity of PCR)
- $R^2 < 0.95$ - not pipetted correctly or inhibitors
- $R^2 > 0.985$ OK

PCR efficiency

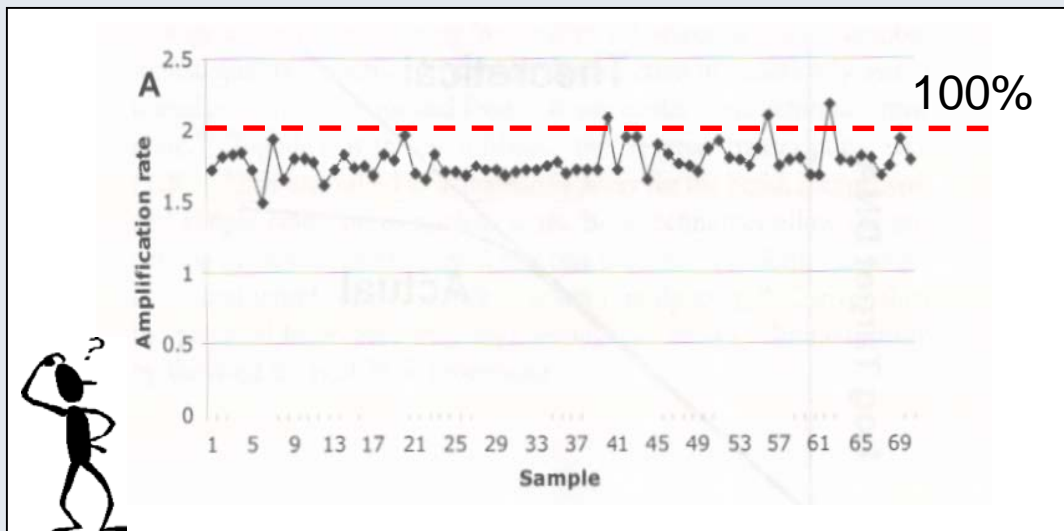


PCR efficiency

- Efficiency = $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) * 100$
- If slope -3.32, then PCR 100% efficient
- If slope lower (-3.9) - less than 100% E
- If slope higher (-2.5) - sample quality or pipetting errors
- every 3.32 cycles - 10 fold increase in amplicon
- Efficiency between 90-100% OK

PCR efficiency

- Length of amplicon
- GC content of amplicon
- Secondary structures in primers, probes, amplicon
- Concentration of reagents
- Low efficiency
 - inhibitors of polymerase
 - high or suboptimal annealing temperature
 - old/inactive Taq
 - poorly designed primers
 - secondary structures



$$Y=N 2^n$$

$$Y=N (1+E)^n$$

Amplifikace Y

N počet molekul templátu

n počet cyklů PCR

Účinnost PCR je 100% jen výjimečně, dokonce i v případě opakovaných PCR identických templátů

Účinnost PCR

Otázka:

Provádíte PCR alikvotu templátové DNA obsahujícího 3×10^5 kopií. V předchozích experimentech jste určili efektivitu reakce 85%. Kolik cyklů musíte provést, abyste dosáhli výsledného počtu kopií 2×10^{10} ?

Odpověď:

$$Y = N(1+E)^n$$

$$Y = 2 \times 10^{10}$$

$$N = 3 \times 10^5$$

$$E = 0,85$$

$$n = ?$$

$$2 \times 10^{10} = 3 \times 10^5 (1+0,85)^n$$

$$\log \frac{2 \times 10^{10}}{3 \times 10^5} = n \times \log (1+0,85)$$

$$\log \frac{2 \times 10^{10}}{3 \times 10^5} = n \times \log (1+0,85)$$

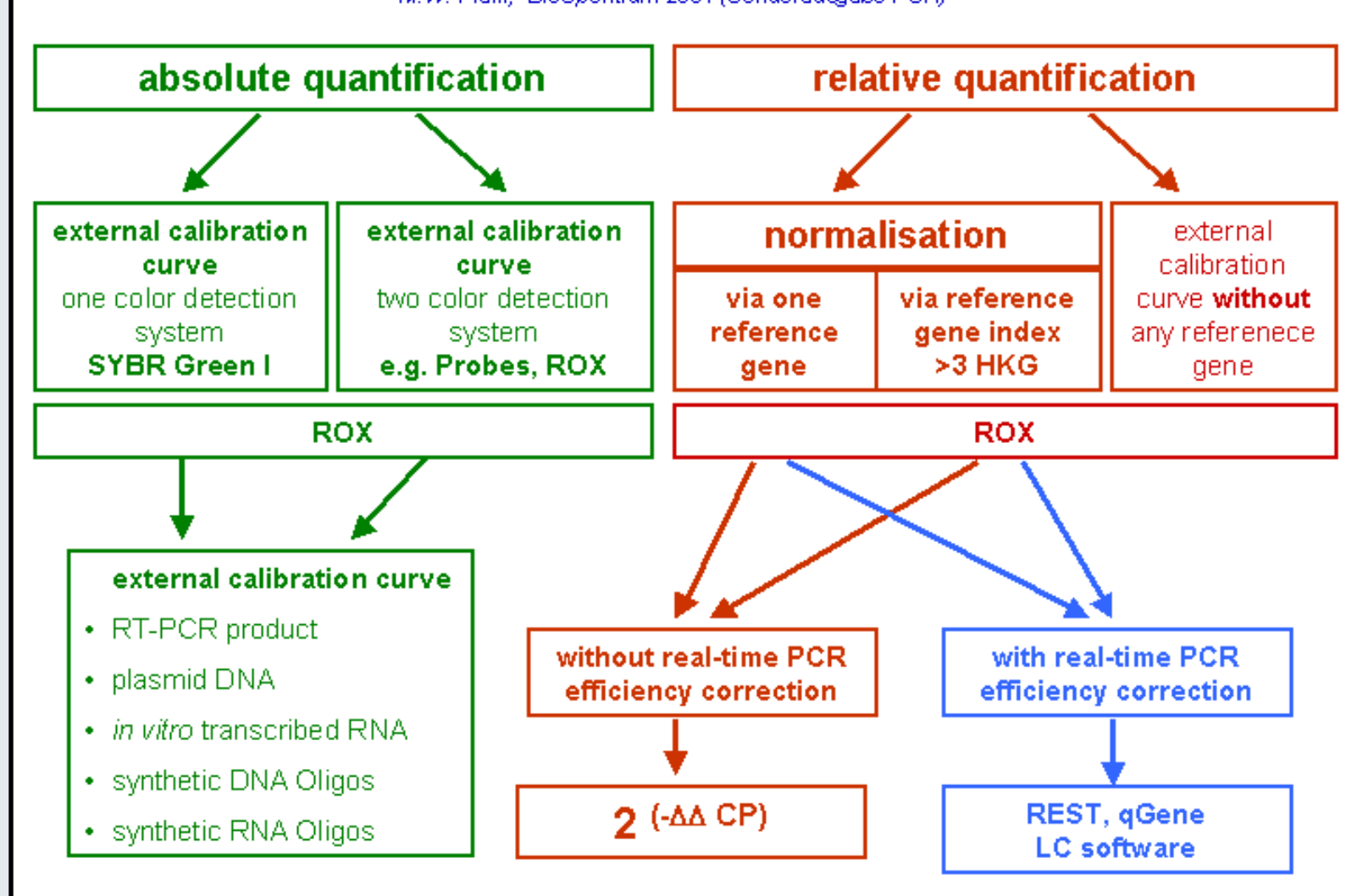
$$n = \frac{\log 0,67 \times 10^5}{\log 1,85}$$

$$n = 18,5$$

K amplifikaci z 3×10^5 na 2×10^{10} s účinností 85% je nutných minimálně 18 cyklů.

Quantification Strategies in real time qRT-PCR

M.W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)



1. Absolutní kvantifikace

- srovnání Ct jednotlivých vzorků s externím standardem (kalibrační křivkou)
- Exaktní výsledek – zvolená jednotka (např. počet kopií/ng RNA/ml krve/ genom/buňku/hmotnost tkáně... atd.)
- Vysoká reprodukovatelnost, specifita a přesnost kalibračních křivek
- Velký dynamický rozsah – 10^1 - 10^{10} molekul templátu
- Validace
- Volba externího standardu (recDNA, gDNA, RT-PCR produkt, recRNA, syntetické oligonukleotidy...)
- Reprodukovatelnost výsledků

Externí standardy



Výsledek absolutní kvantifikace závisí na

1. Volbě standardu

2. Good laboratory practice

DNA

- Plazmidová DNA, genomová DNA, cDNA, syntetické oligonukleotidy
- Velmi stabilní, odolné vůči náhodnému štěpení
- Úseky DNA cca 2kb mají podobné vlastnosti jako mRNA/cDNA
- Reprodukovatelné výsledky
- Snadné stanovení koncentrace
- Kalibrační křivky založené na DNA nereflektují RT krok
- Externí standardy nezohledňují přítomnost PCR inhibitorů

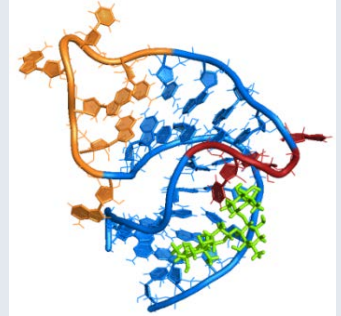


Externí standardy

RNA

- RecRNA (rekombinantní RNA)
 - syntetizována přímo nebo in vitro z plazmidové DNA, obsahující klonovaný RT-PCR fragment
- Reverzní transkripce
 - Odlišná kinetika reakce než u nativní RNA
 - Neodráží zastoupení jednotlivých RNA frakcí (rRNA 80%, tRNA 10-15% a další)
- Externí standardy nezohledňují přítomnost PCR inhibitorů
- Stabilita a citlivost k nukleázám

- Komerčně dodávaná celková RNA nebo její frakce (polyA, tRNA) jako tzv. background RNA – zvýšení účinnosti RT RecRNA



Kvantifikační strategie

Externí standardy

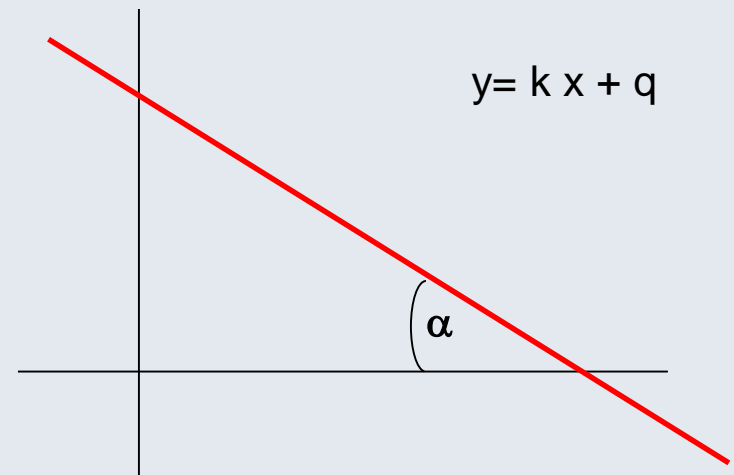
Je nutné vytvářet pokaždé novou kalibrační křivku? Jaká je její reproducibilita?

Předpokládáme stejnou instrumentaci, reagentie i templát (opakujeme stejnou kalibrační křivku)

variabilita

2-3% směrnice (k)

10% posun (q)



- Některé přístroje (např. Roche Lightcycler) umožňují ukládání standardních křivek a jejich kalibraci (korekce q) prostřednictvím jediného datového bodu v každé analýze (za předpokladu konzistentního designu analýzy)

Kvantifikační strategie

Efekt počátečního počtu kopií

Odhady množství templátu nad 1000 kopií jsou relativně přesné (chyba 1%)

Ale - malý vstupní počet templátových molekul – chyba narůstá

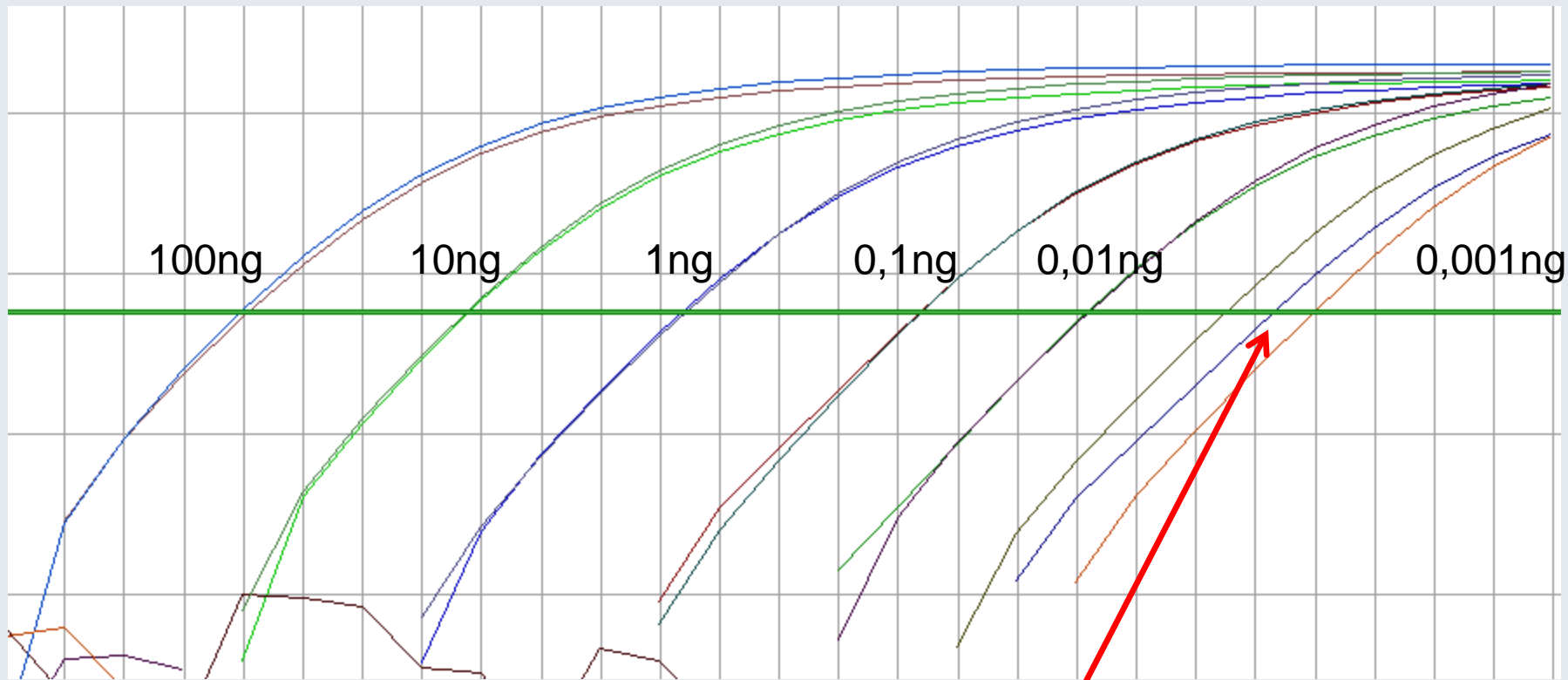
Např. účinnost PCR 80% → v každém cyklu pravděpodobnost 20%, že nedojde ke zdvojnásobení počtu molekul

Monte Carlo effect

závisí na množství templátu – čím je menší množství templátu, tím je i menší pravděpodobnost, že množství amplikonu bude odrážet skutečné množství templátu (nárůst variability)



Monte Carlo effect



Přesto, lze úspěšně kvantifikovat i extrémně malá množství templátu:

Stanovení 10 kopií genomu viru hepatitidy C v plazmě

Intra-assay variabilita (CV) 3,1%

Inter-assay CV 4,4% (4,15% CV pro 100000 kopií)



Journal of Virological Methods 105 (2002) 253–263



Sensitivity and reproducibility of HCV quantitation in chimpanzee sera using TaqMan real-time PCR assay

Montserrat Puig^a, Kathleen Mihalik^a, Mei-ying W. Yu^b,
Stephen M. Feinstone^a, Marian E. Major^{a,*}

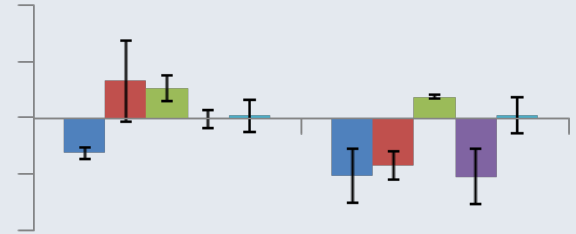
^a Laboratory of Hepatitis Viruses, Division of Viral Products, CBER, FDA, Building 29A, Room 1D02, 8800 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA

^b Laboratory of Plasma Derivatives, Division of Hematology, CBER, FDA, 8800 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA

Received 13 February 2002; received in revised form 20 May 2002; accepted 21 May 2002

2. Relativní kvantifikace

- Nevyžaduje externí standardy
 - Srovnání Ct jednotlivých vzorků (genů) (např. u pacienta po léčbě) s expresí referenčního genu (housekeeping gene) a vůči biologické kontrole
 - (např. pacient před léčbou, zdravý člověk...)
 - Kontrola = **kalibrátor**
 - Určení poměru exprese
-
- $\Delta\Delta Ct$
 - Korekce účinnosti PCR
 - Hodnocení skupin vzorků – software REST/REST XL



Kvantifikační strategie

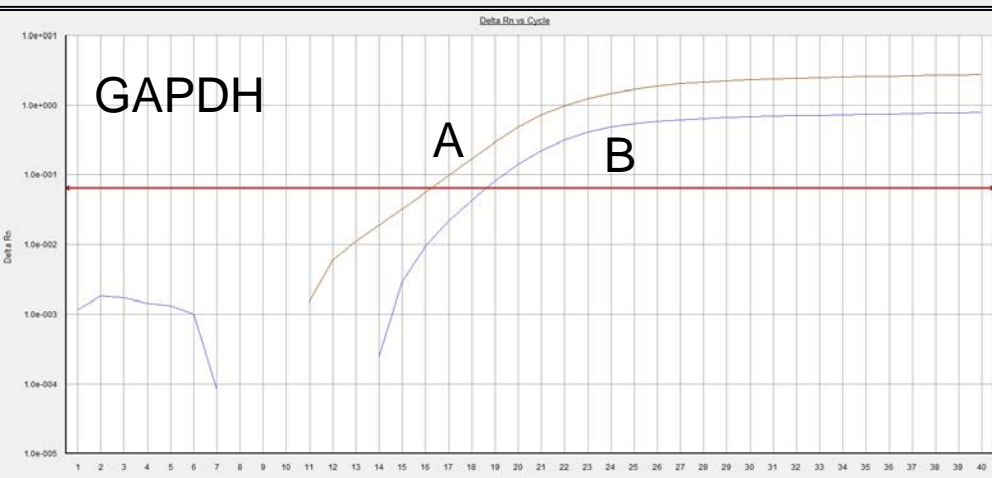
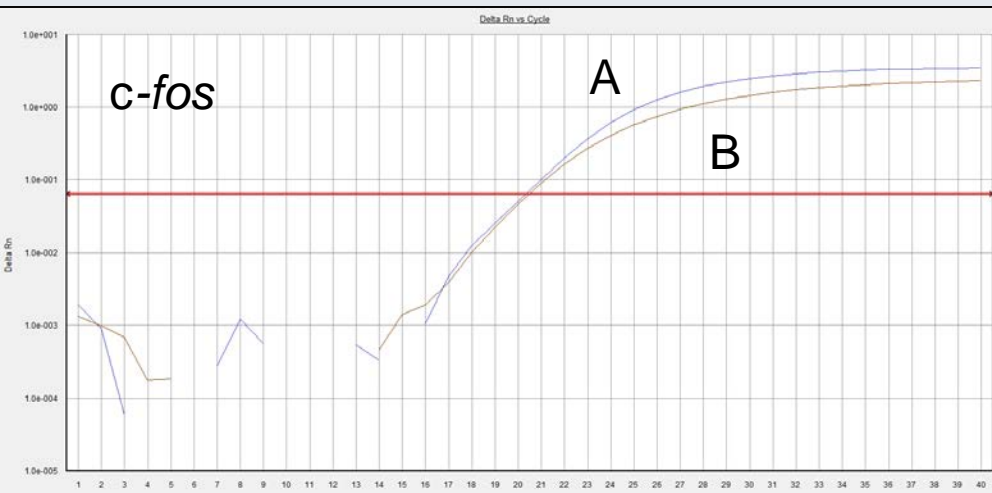
2. Relativní kvantifikace $\Delta\Delta Ct$

Bez zahrnutí efektivity jednotlivých reakcí

Předpokládáme 100%

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$



vzorek	c-fos	GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	R
A	22,00	18,18	3,82	0	1
B	22,34	15,76	6,58	2,76	1,15

Kvantifikační strategie

Korekce relativní kvantifikace zahrnující účinnost PCR

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen (kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen (PRŮMĚR kontrola - PRŮMĚR vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (PRŮMĚR kontrola - PRŮMĚR vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{referenční gen}})^{\text{Ct vzorek}}}{(E_{\text{cílový gen}})^{\text{Ct vzorek}}} \div \frac{(E_{\text{referenční gen}})^{\text{Ct kalibrátor}}}{(E_{\text{cílový gen}})^{\text{Ct kalibrátor}}}$$

Účinnost PCR

I malý rozdíl v účinnosti PCR mezi stanovovaným genem a referenční kontrolou může dramaticky změnit výsledný poměr

Např. rozdíl v účinnosti (ΔE) = 3%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 47%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 209%

= 5%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 28%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 338%

= 10%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 7,2%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 1083%

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

Pacienti: $dCt = 32 - 26 = 6$

Kontrola: $dCt = 35 - 27 = 8$

$ddCt: 6 - 8 = -2$

Poměr exprese: $2^{-ddCt} = 4$

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Efektivita PCR (YFG) 80%; (GAPDH) 90%

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen(kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{1,8^3}{1,9^1} = \frac{5,832}{1,9} = 3,07$$

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Efektivita PCR (YFG) 60%; (GAPDH) 105%

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen(kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{1,6^3}{2,05^1} = \frac{4,096}{2,05} = 1,998 \quad !$$

Kvantifikační strategie

Normalizace v relativní kvantifikaci

Sample-to-sample variation

Run-to-run variation

Korekce variability mezi jednotlivými vzorky, způsobené

- Charakterem vzorků
- Integritou RNA
- Efektivitou RT
- Pipetovací chybou

Normalizace vůči

- Neregulovanému endogennímu referenčnímu genu
- Celkové buněčné RNA/DNA

Referenční geny

GAPDH



Referenční geny

GAPDH

Albumin

Aktin

Histon H3

Tubulin

Cyklofilin

Mikroglobuliny (B2M)

Ubiquitin

18SrRNA

28SrRNA

GAPDH je regulovaná za nejrůznějších experimentálních i fyziologických podmínek

Experimentální podmínky	Tkáň	Extracelulární faktory	Onemocnění
Věk Apoptóza Buněčný cyklus Vývojové stádium Hladovění Hypoxie Oxidativní stres Těhotenství Sérum	Leukocyty Erytrocyty Střevní biopsie Endothelie T-lymfocyty Thyrococyty	UV IL2 NO TPA Dexamethason Cholinergní agonisté Kreatin Inzulín Retinová kyselina Růstový hormon Vitamin D Mn ^{II+}	Karcinom - prsu - cervixu - kolorekta - plic - jater - prostaty - slinivky Neurodegenerativní onemocnění

Referenční geny

Programy geNorm a BestKeeper

(freeware)

Určení expresních profilů více housekeepingových genů,
zhodnocení jejich variability (pairwise correlation),
geometrický průměr více opakování

Vyhodnocení nejstabilnějšího housekeepingového genu za definovaných podmínek.

Jak na to?

$$\text{BestKeeper Index} = \sqrt[2]{CP_1 \times CP_2 \times CP_3 \times \dots \times CP_z}$$

Tkáňové kultury

- normalizace vůči počtu buněk, referenčnímu genu, RNA...
- replikáty

Mononukleární krevní buňky

- heterogenní populace
- FACS – normalizace vůči počtu buněk definovaného typu
- kvantifikace vůči expresi genu pro příslušný CD (CD-19 B-lymf.)
- totální RNA

Kvantifikační strategie

Jak na to?

Biopsie solidních tkání

- Nádorová tkáň
- Heterogenita
- Otázkou je, zda-li je vůbec objektivně možné relativně kvantifikovat klasické biopsie (problémy s referenčním genem a jeho expresí v daném místě, počtem buněk...)

Laser Capture Microdissection

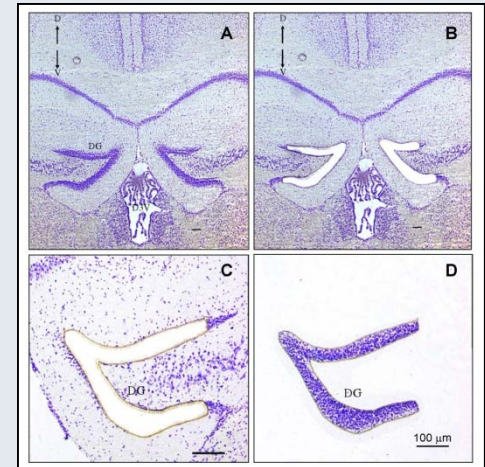
- Normalizace exprese vůči referenčnímu genu
- Výhodou je histologická informace a znalost počtu buněk

Celková RNA

- Nutné přesné určení koncentrace RNA
- Nereflektuje RT a PCR krok

rRNA

- Jiný charakter exprese, jiné polymerázy, atd.
- Její hladina je ale ovlivněna méně než v případě mRNA (s výjimkou krevních buněk)
- Otázka volby subpopulace (28S, 18SrRNA)



Shrnutí

Umíte odpovědět na následující otázky?

- design experimentu, např. je vzorek tkáně reprezentativní? Jaké biologické kontrolní vzorky musím použít?
- volba metody, jaký templát bude vstupovat do mých reakcí?
mám použít pouze poly-A RNA nebo celkovou RNA? Má dostatečnou kvalitu? One step nebo two step PCR?
- s jakou účinností běží moje PCR?
- absolutní nebo relativní kvantifikace?
- je zvolený housekeepingový gen vhodný?
- proběhla má real-time PCR správně? Jsou Ct stanoveny správně?