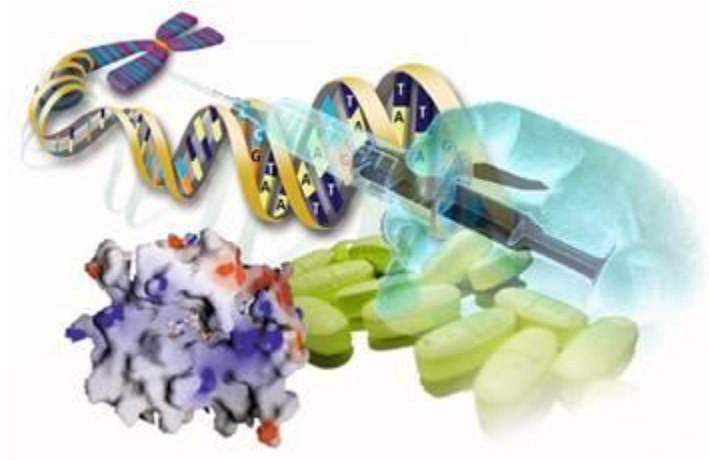


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VI. Aplikace qRT-PCR

1. Detekce DNA

- Diagnóza infekčních onemocnění (přítomnost patogenů v krvi, séru, plazmě ...)
- Sledování minimální reziduální nemoci
- Detekce patogenů v potravinách a v životním prostředí
- Detekce GMO
- Autenticita potravin

2. Detekce RNA

- Minimální reziduální onemocnění
(Her2 – karcinom prsu, Bcr-Abl – CML, ELAVL-4 – neuroblastom)
- Detekce RNA virů
- Diagnóza nádorových onemocnění (PSA – karcinom prostaty)
- Validace microarray experimentů

3. Detekce SNP

4. High Resolution Melting Analysis

5. Kvantifikace množství (konkrétních) proteinů

Aplikace

Aplikace v klinické mikrobiologii

Diagnóza - rychlá, citlivá a přesná determinace patogenů

Klasické kultivační metody – časově náročné (24-48hod), nízká citlivost, omezené spektrum druhů

qRT-PCR – např. geny kódující 23S rRNA nebo 16S rRNA

Rutinní diagnostika

- *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*

Monitoring zneužitelných druhů - **biodefense**

- *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*

Výzkum – testování antibiotik – *multidrug resistant strains*

(analýza bodových mutací v genech zodpovědných za metabolismus ATB)

- *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*

Houbová a parazitární onemocnění

- *Aspergillus fumigatus*, *Candida* sp.
- *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*

Aplikace

Aplikace v klinické mikrobiologii

Příklad protokolu:

Detekce *Prevotella intermedia*

Stěr z úst

Resuspendovat stěr v 1xPBS

Vortex 30s, cfg. 20min/15 000g

Izolovat bakteriální DNA ze supernatantu



Návrh primerů (Primer Express) – oblast 16S rDNA

Např.:

Forward: 5'-AATACCCGATGTTGTCCACA-3'

Reverse: 5'-TTAGCCGGTCCTTATTCGAA-3'

Reakční směs

2x SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) 26,0 μ l

Forward primer (10 μ M) 2,0 μ l

Reverse primer (10 μ M) 2,0 μ l

PCR grade H₂O 15,0 μ l

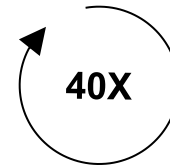
Vzorek DNA nebo standard 5,0 μ l

PCR

95°C 1min

95°C 15s

60°C 1min



Disociační křivka – 60-95°C

Aplikace

Aplikace v klinické virologii

Typizace virů (např. chřipka)

- nepřítomnost signálu - variabilita v sekvencích/falešně negativní výsledky
- Hydrolyzační (TaqMan) i hybridizační sondy

Kvantifikace – virový titr

- např. hepatitida B/C, HIV, EB, cytomegalovirus atd.
- Transplantace

Detekční limity – genomové ekvivalenty (ge)

- End-point analýza – detekční limit 5×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^4 ge
- Hybridizační analýzy - detekční limit 2×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^4 ge

Inter- a intra assay variabilita >40%

- qRT-PCR - detekční limit 1×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^8 ge

Inter- a intra assay variabilita <5-10%

Interní amplifikační kontrola

- Paralelní PCR známého standardu
- Tzv. „Spiking“ vzorků známými sekvencemi
- Paralelní analýza příbuzného viru (např. pro lidský HSV - tulení PhHV)

Aplikace

Aplikace v klinické virologii

Příklad protokolu:

Detekce viru chřipky (Influenza A) – 5' nukleázová assay

Stěr z nosohltanu

Resuspendovat stěr v 1xPBS

Vortex 30s,

Izolovat virovou RNA ze supernatantu

Návrh primerů a sondy (Primer Express) – oblast M1 (influenzaA matrix gene)

Např.:

Forward: 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'

Reverse: 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3'

Sonda: Fam-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ+

Reakční směs – One Step PCR (Qiagen)

Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix 1,0 μ l

Qiagen One Step RT-PCR Buffer (5x) 5,0 μ l

Qiagen One Step RT-PCR dNTP mix (10mM) 1,0 μ l

Forward primer (10 μ M) 2,0 μ l

Reverse primer (10 μ M) 2,0 μ l

Sonda (20 μ M) 0,2 μ l

PCR grade H₂O 8,8 μ l

Vzorek DNA nebo standard 5,0 μ l

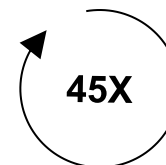
PCR

50°C 20min (Reverzní transkripce)

95°C 15min (Aktivace polymerázy)

95°C 15s

60°C 1min



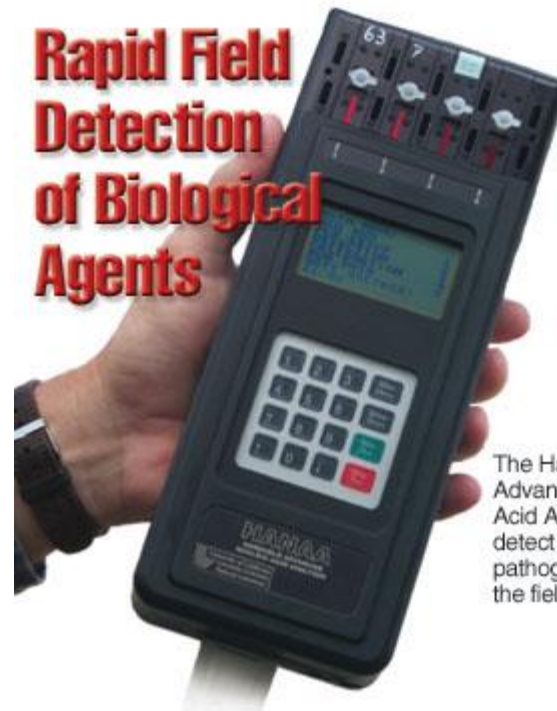
Terénní qRT-PCR

- Detekce patogenů mimo laboratoř
- Komerční specializovaná řešení
- „Lab on chip“



<http://www.idahotec.com/BioDefense/>

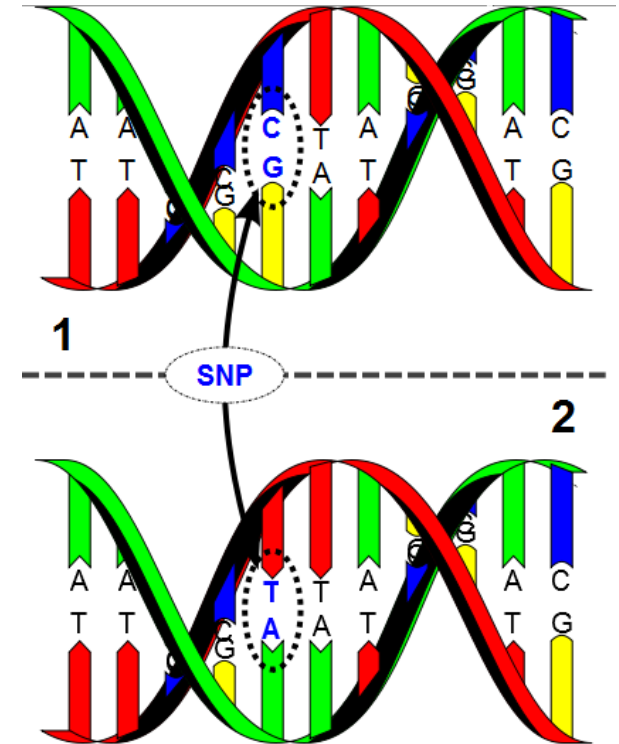
Rapid Field Detection of Biological Agents



The Handheld Advanced Nucleic Acid Analyzer can detect biological pathogens in the field.

Jednonukleotidové polymorfismy SNP

- DNA sekvence lišící se v jediném nukleotidu
- Kódující i nekódující oblasti
- Záměna nukleotidu nemusí nutně vést k záměně AA
- Variabilita v odpovědi k patogenům, léčivům, atd.
- Senzitivita k onemocněním
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>



NCBI Single Nucleotide Polymorphism

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Books SNP

Search for SNP on NCBI Reference Assembly

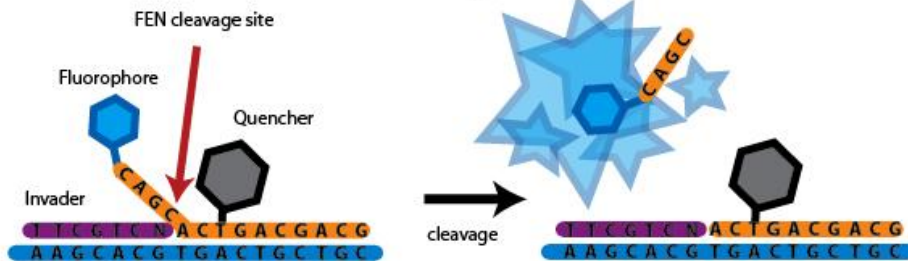
Search Entrez SNP for Go

Aplikace

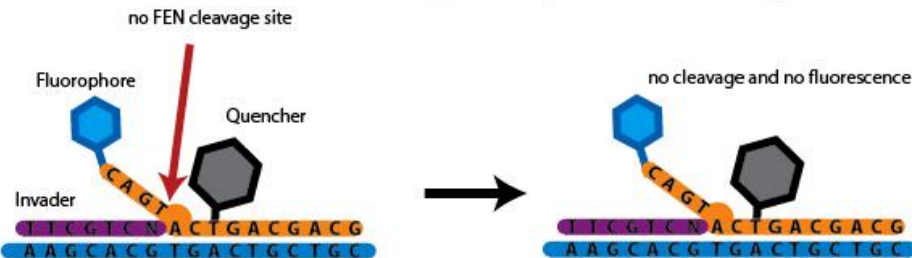
SNP genotypizace

- TaqMan
- Invader assay (Flap endonukleáza)
- SNP microarray

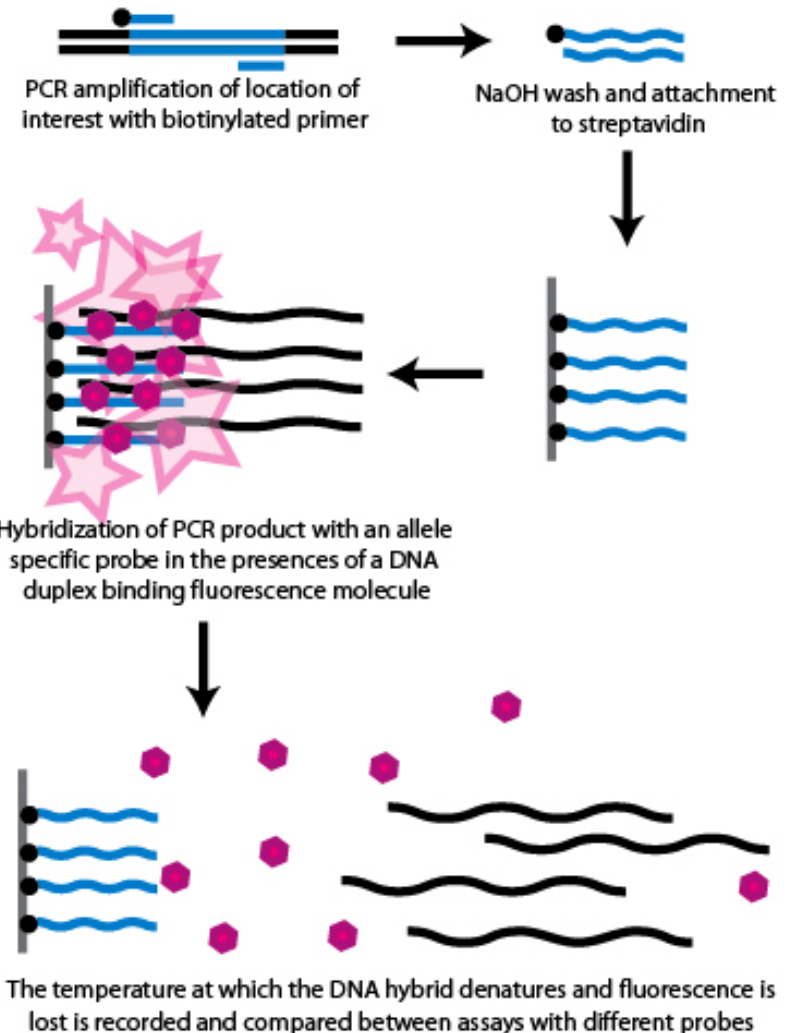
Invader assay in which probe complements the SNP resulting in fluorescence



Invader assay in which probe mismatches at the SNP location preventing cleavage from occurring



Reference: Based on Olivier M. 2005. The Invader assay for SNP genotyping.

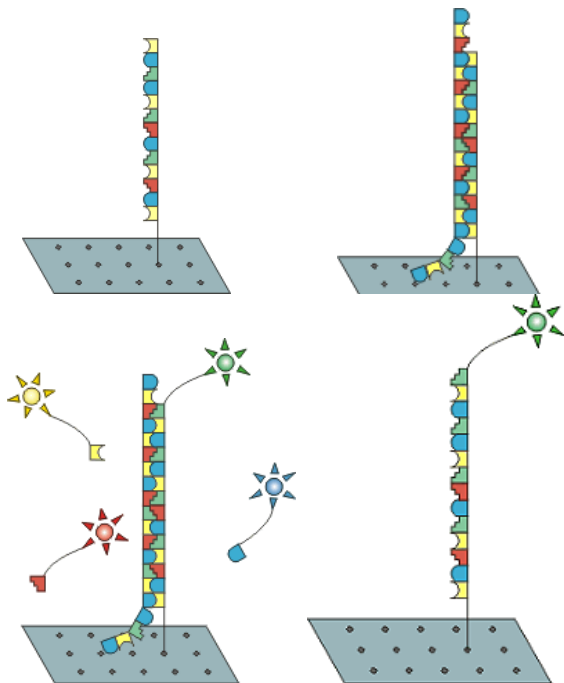


Aplikace

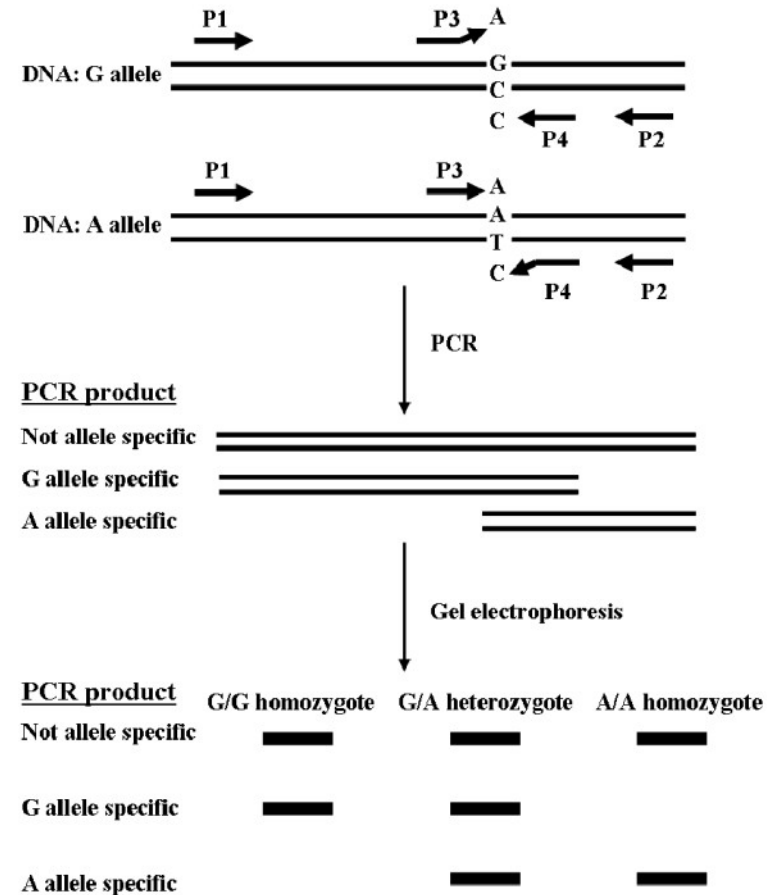
SNP genotypizace

APEX (Arrayed primer extension)

- 2D matice, oligonukleotidy imobilizované 5'koncem
- PCR produkt je hybridizován a prodloužen DNA polymerázou
- Fluorescenčně značené terminátorové nukleotidy



Tetra-primer based PCR

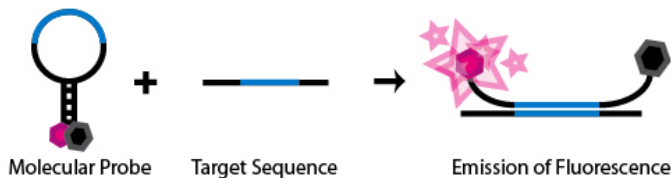
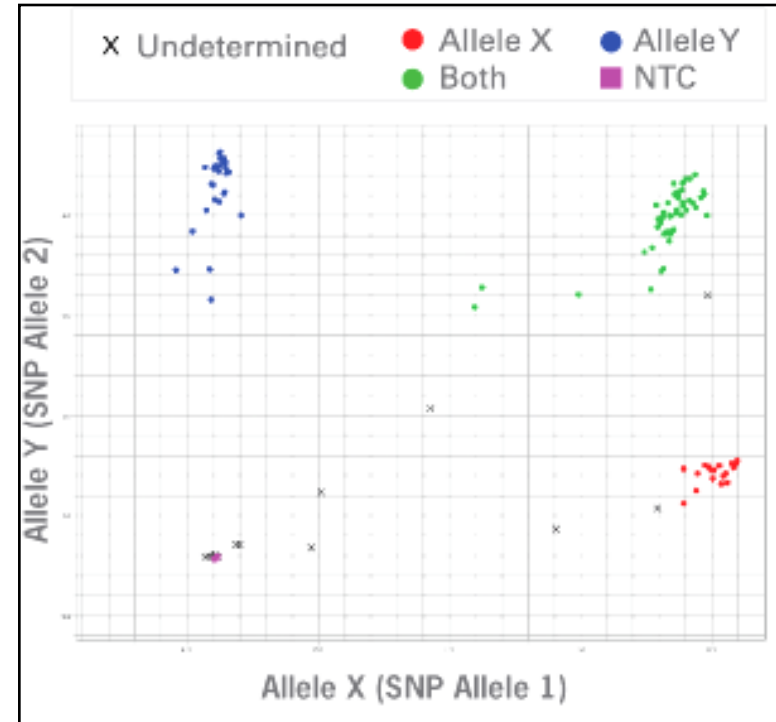
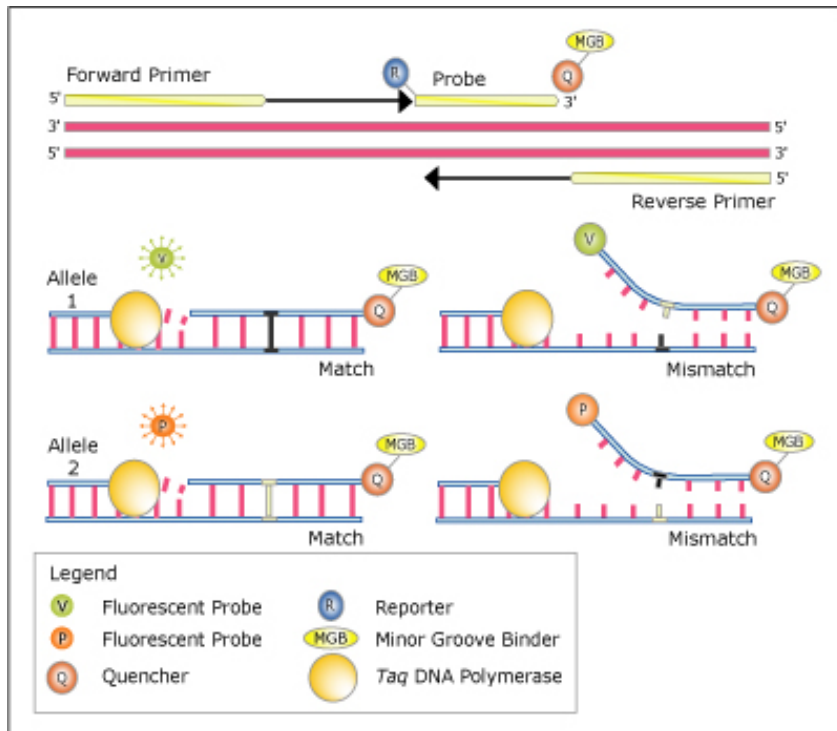


Aplikace

SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

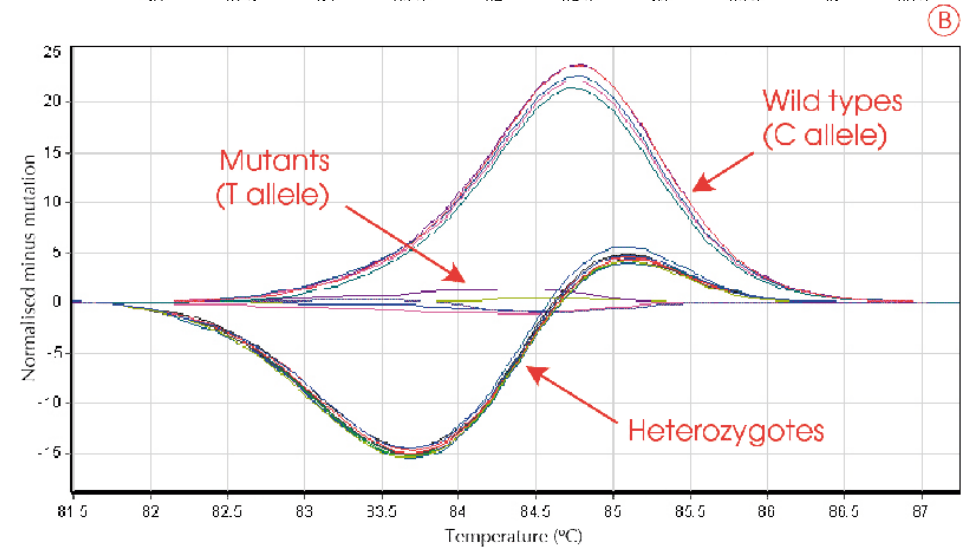
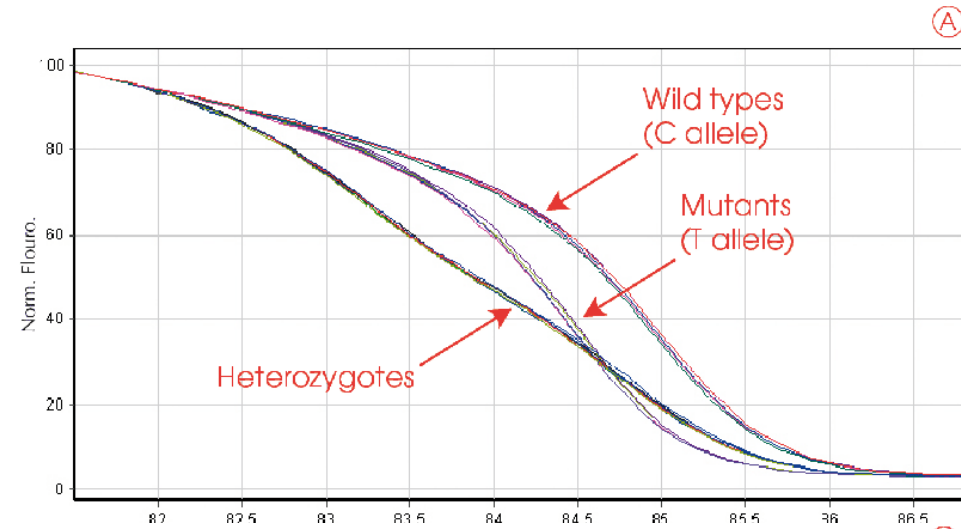
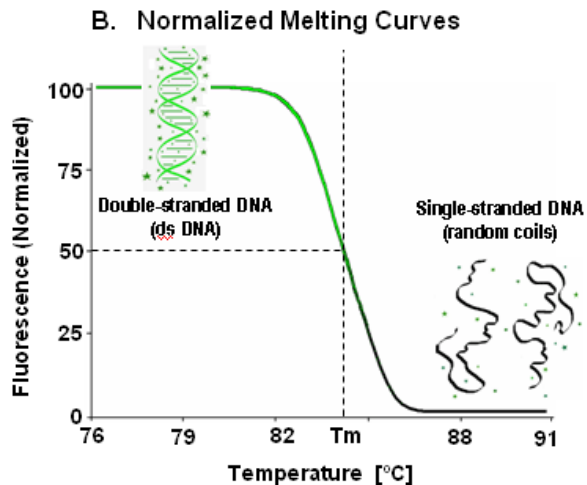
End-point analýza



Aplikace

Analýza křivek teplot tání = High resolution melting analysis

- Analýza komplexních sekvencí
- PostPCR analýza
- Snadná analýza neznámých sekvencí
- Sledování disociace řetězců DNA v závislosti na teplotě



Aplikace

Analýza křivek teplot tání = High resolution melting analysis

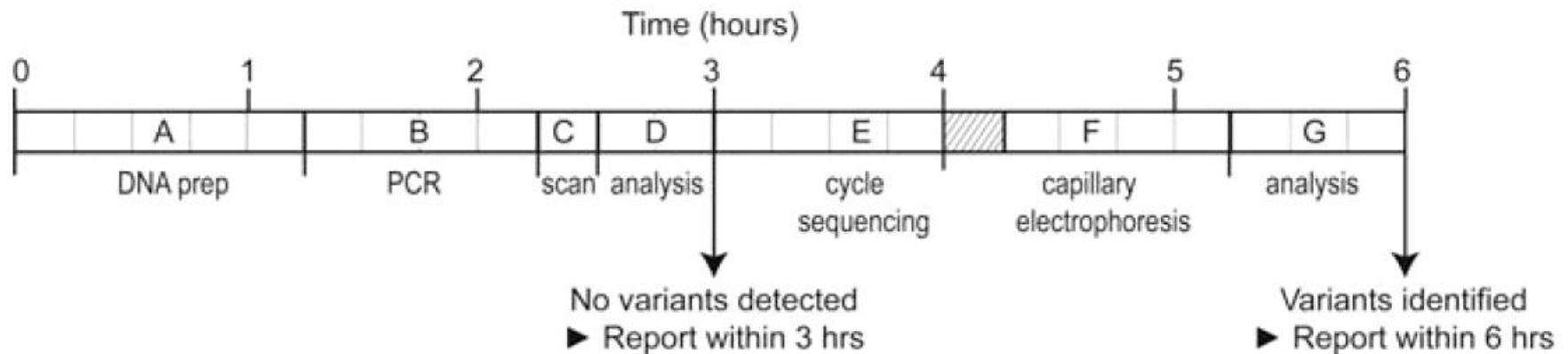
Výhody:

- Univerzální primery pro oblast nesoucí hledaný polymorfismus
- Jediný fluorofor (SYBR Green)
- „High throughput“, automatizace

Aplikace:

- SNP, mutace - genotypizace
- Typizace mikroorganismů

VÝHODA: ČAS



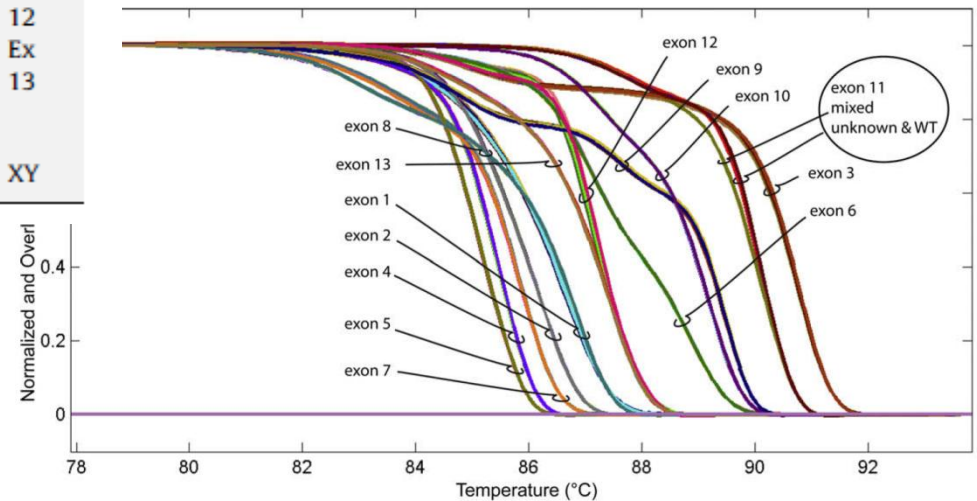
Příklad: Screening X-linked chronic granulomatous disease (OMIM 300481)

13 exonů + amelogenin

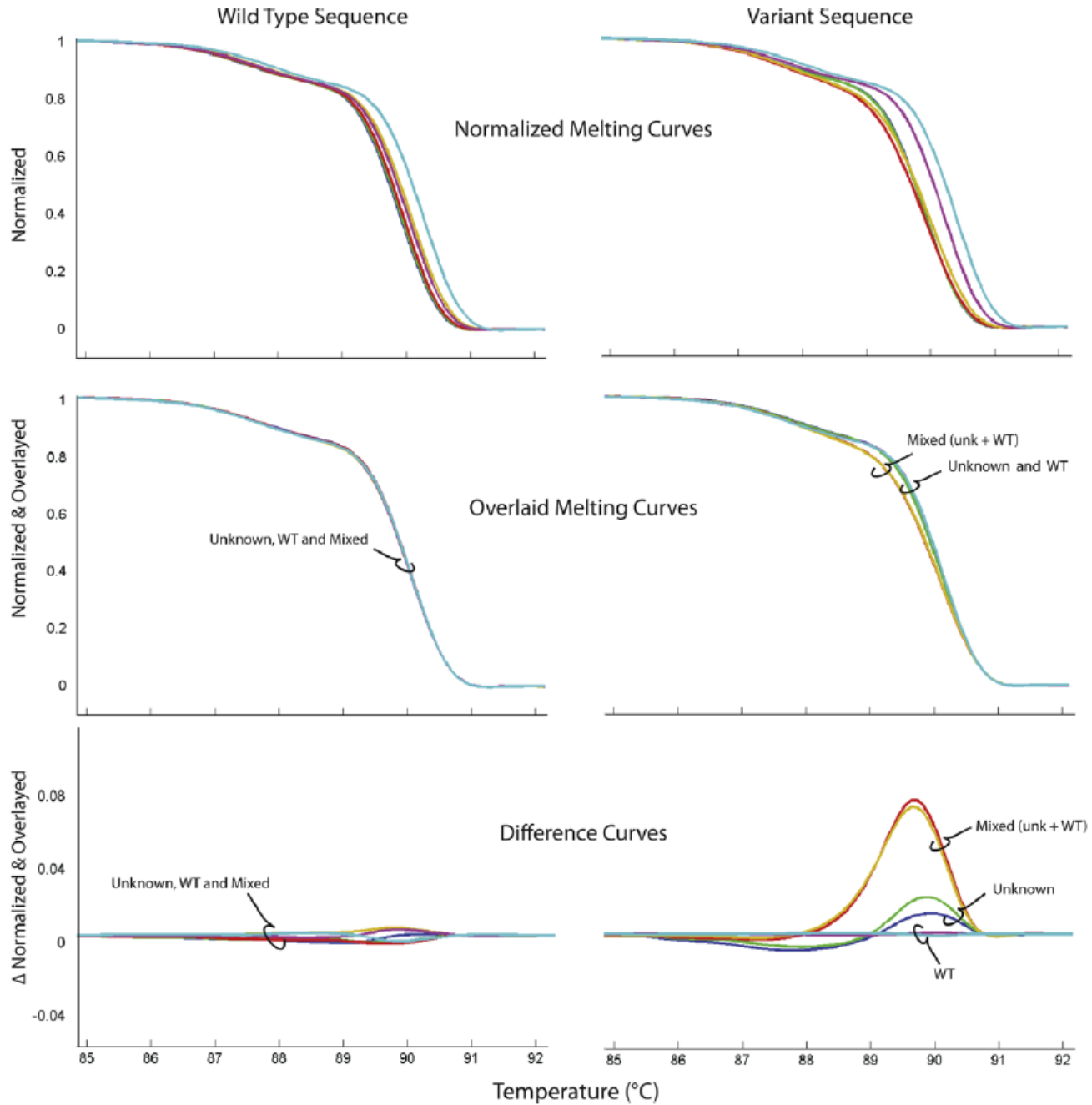
alternativa: sekvenování

Location of *CYBB* and amelogenin primers on X-linked chronic granulomatous disease primer plates.

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
1	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
B	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
2	9	2	9	2	9	2	9	2	9	2	9	2
C	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3
D	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
4	11	4	11	4	11	4	11	4	11	4	11	4
E	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5
F	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
6	13	6	13	6	13	6	13	6	13	6	13	6
G	Ex		Ex		Ex		Ex		Ex		Ex	
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
H		XY		XY		XY		XY		XY		XY



Aplikace

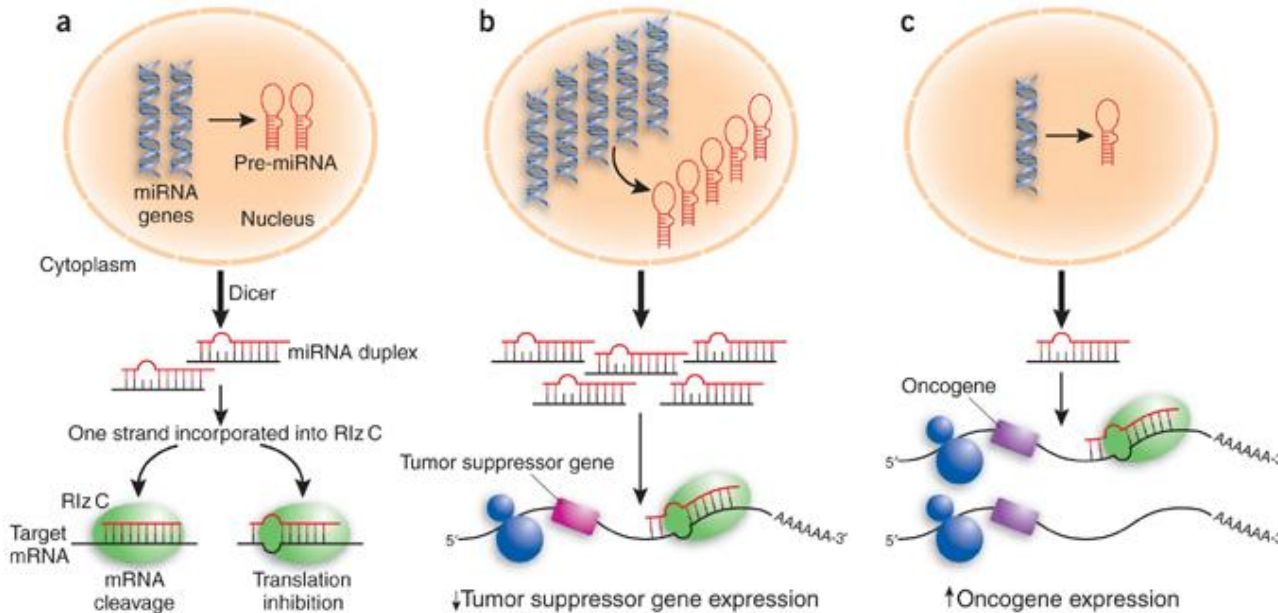
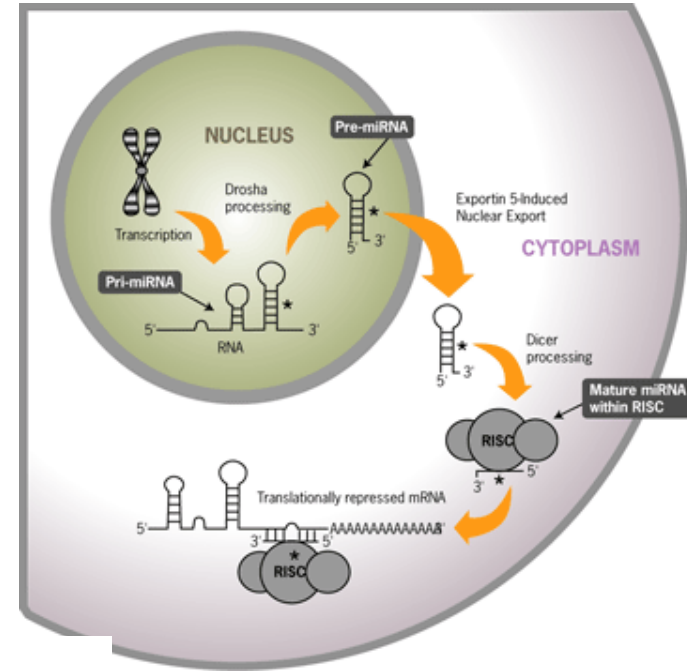


Aplikace

miRNA detekce

MikroRNA (miRNAs)

- Malé molekuly RNA
- rostliny i živočichové
- konzervativní sekvence
- 21mery
- regulují expresi genů vazbou na 3' nepřekládaný region mRNA (3'UTR)



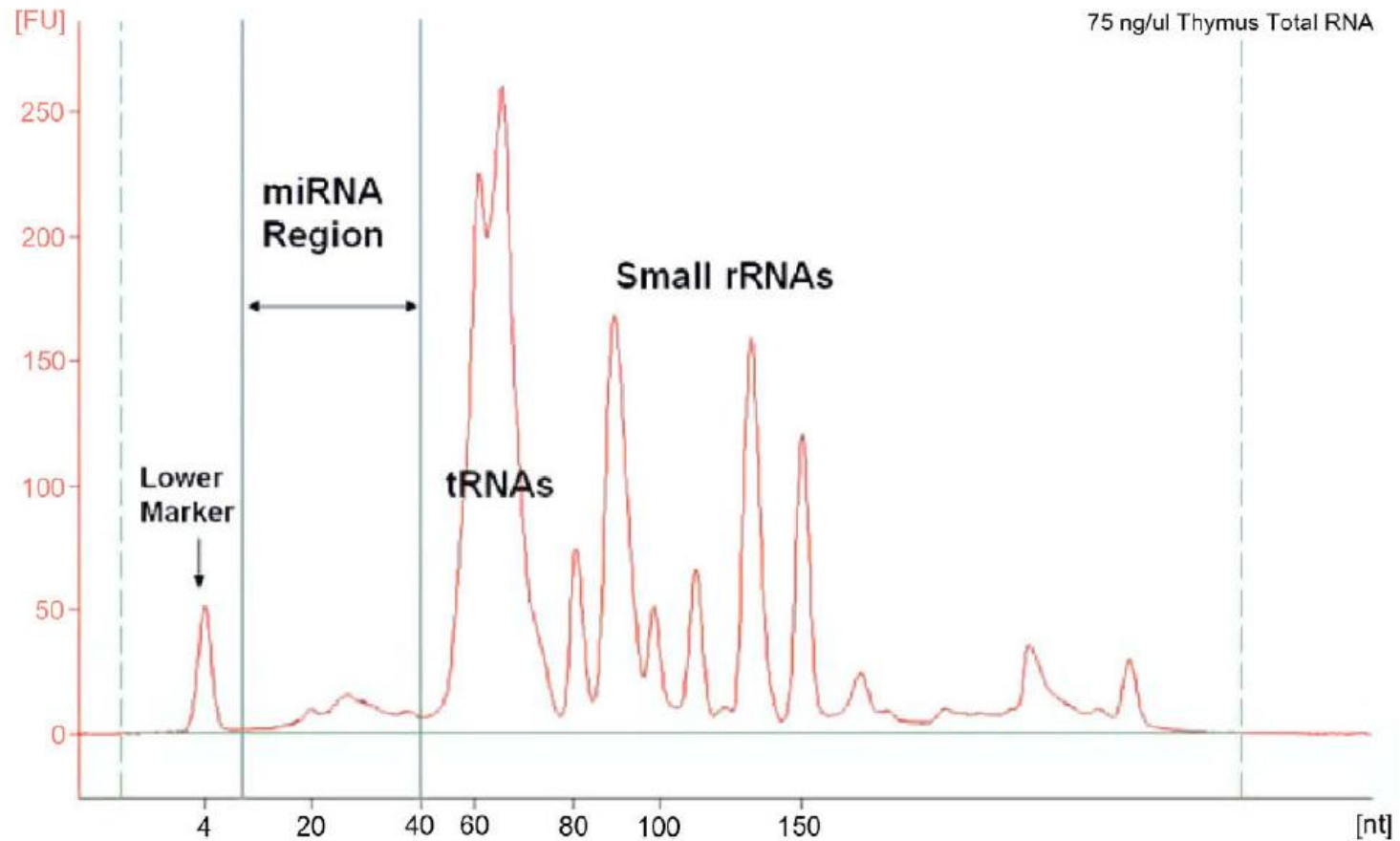


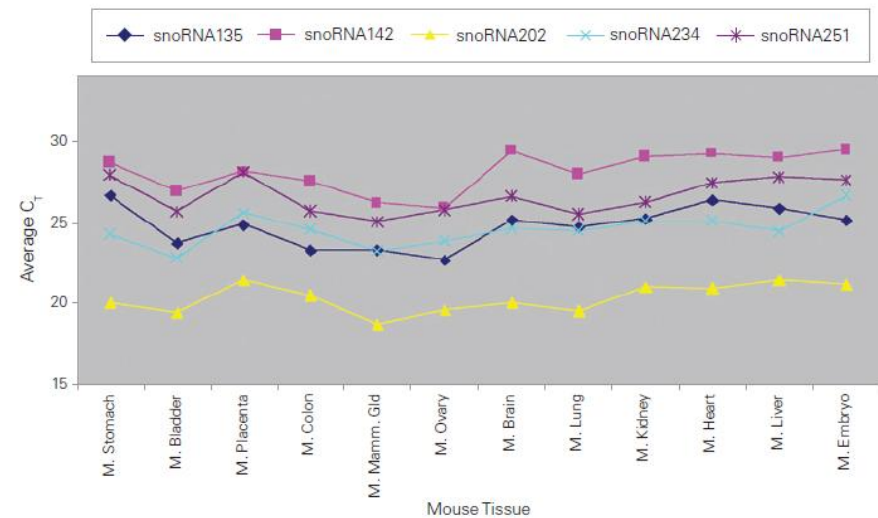
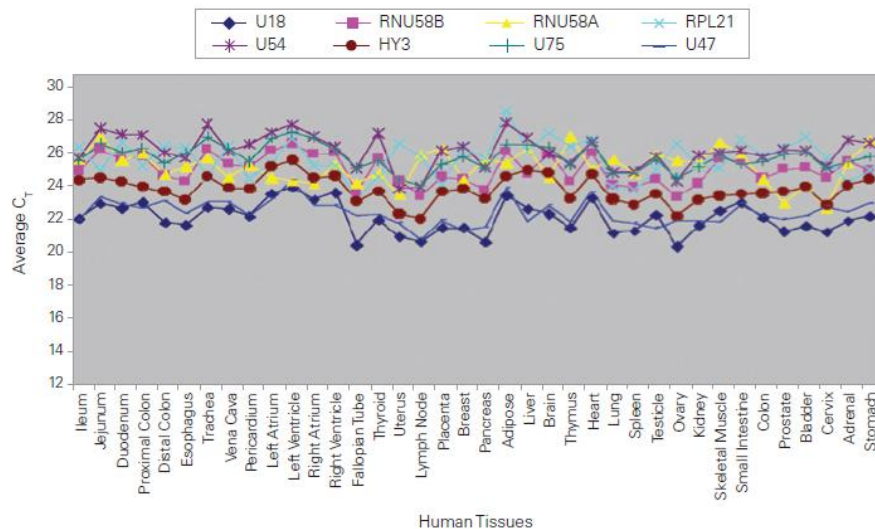
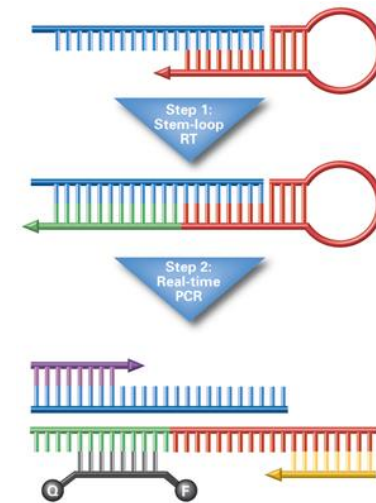
Fig. 1A. Image of a typical electropherogram for small RNA analysis performed with the Small RNA Assay on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-7002EN.pdf>).

Aplikace

miRNA detekce

- Specifický primer pro RT
- 5' nuclease assay (TaqMan) PCR

Endogenní kontrola: malá jaderná RNA (snRNA)

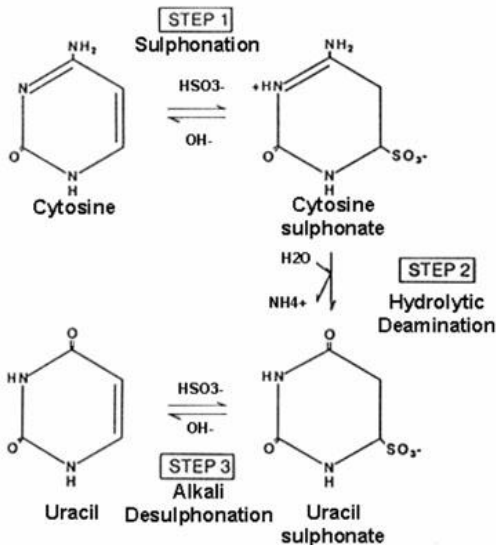


Aplikace

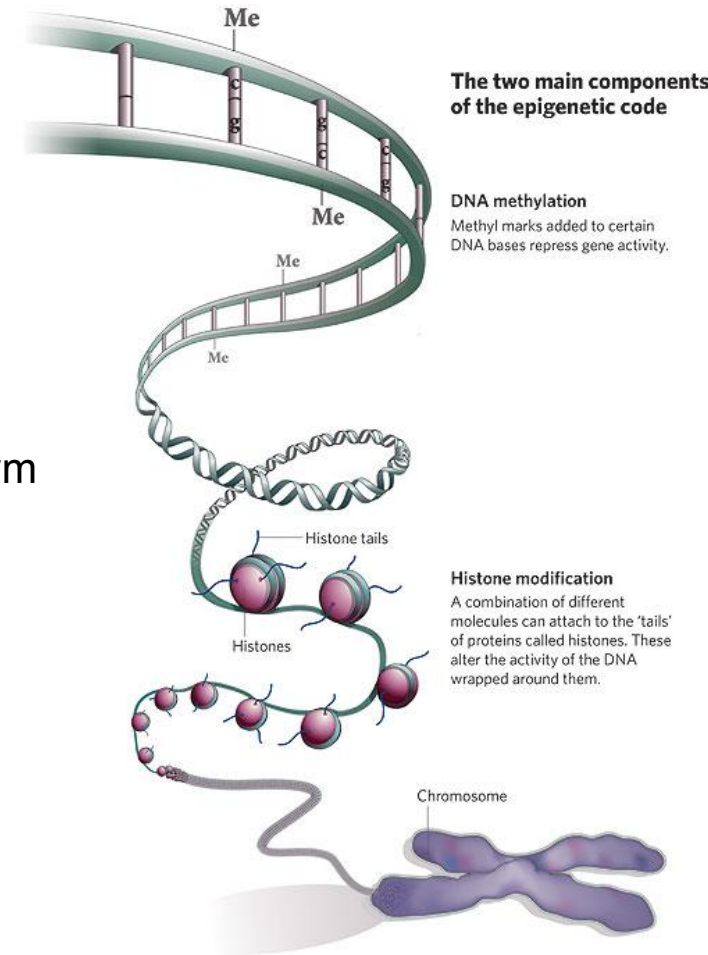
Analýza DNA metylací

- Více než 70% C lidského genomu v sekvenci CpG je metylováno
- Významná modifikace, regulující např. architekturu chromozomu i řadu dějů na buněčné úrovni
- regulační úseky genů - promotory

C + bisulfit = U
^mC intaktní



Endonukleázy citlivé metylovaným sekvencím
BsoFI, HpaII, MspI and HhaI



Aplikace

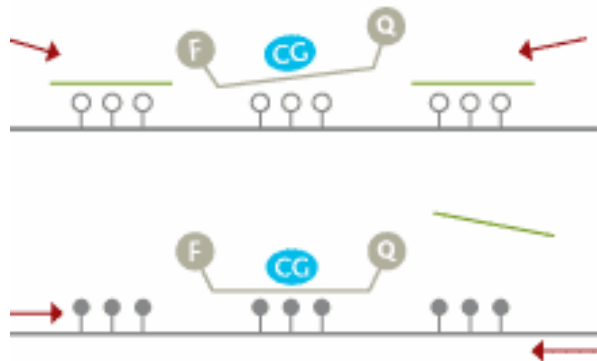
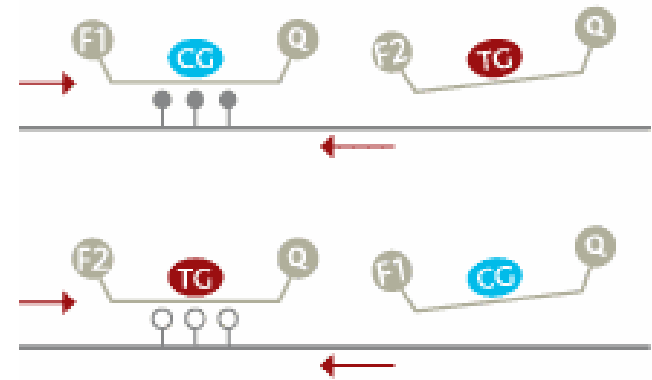
Kvantitativní analýza DNA metylací pomocí real-time PCR

Nemetylované cytosiny jsou konvertovány na U bisulfitovou metodou

1. Pro každou sekvenci dva páry primerů

nebo

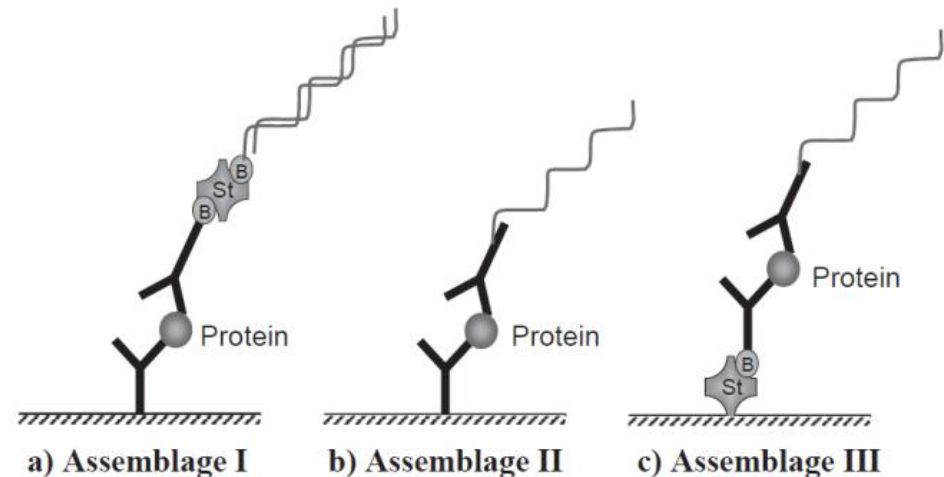
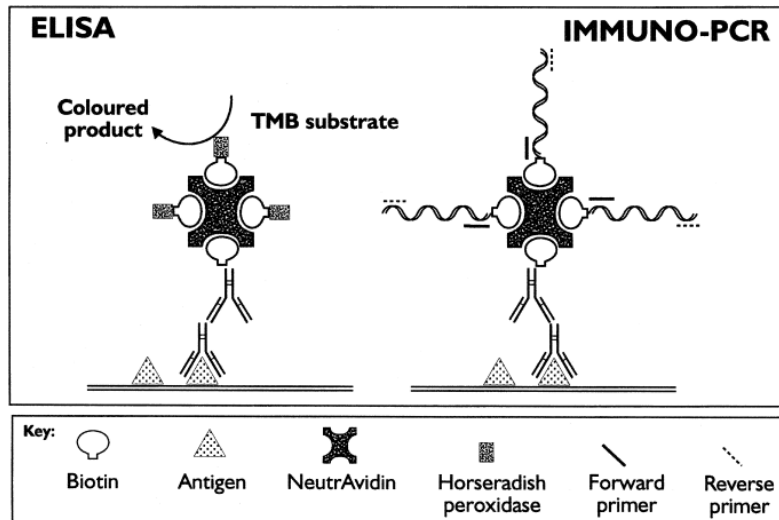
2. Jsou použity oligonukleotidy hybridizující k nemetylovaným sekvencím a blokující PCR



Aplikace

ImunoPCR

- Vazba specifického oligonukleotidu k monoklonální protilátce
- Protein (Antigen) je imobilizován jinou monoklonální protilátkou
- Vzniká sendvič (assemblage) - podobně jako ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- tzv. PCR- ELOSA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Sorbent Assay)
- Množství oligonukleotidu imobilizovaného prostřednictvím mAb je kvantifikováno PCR



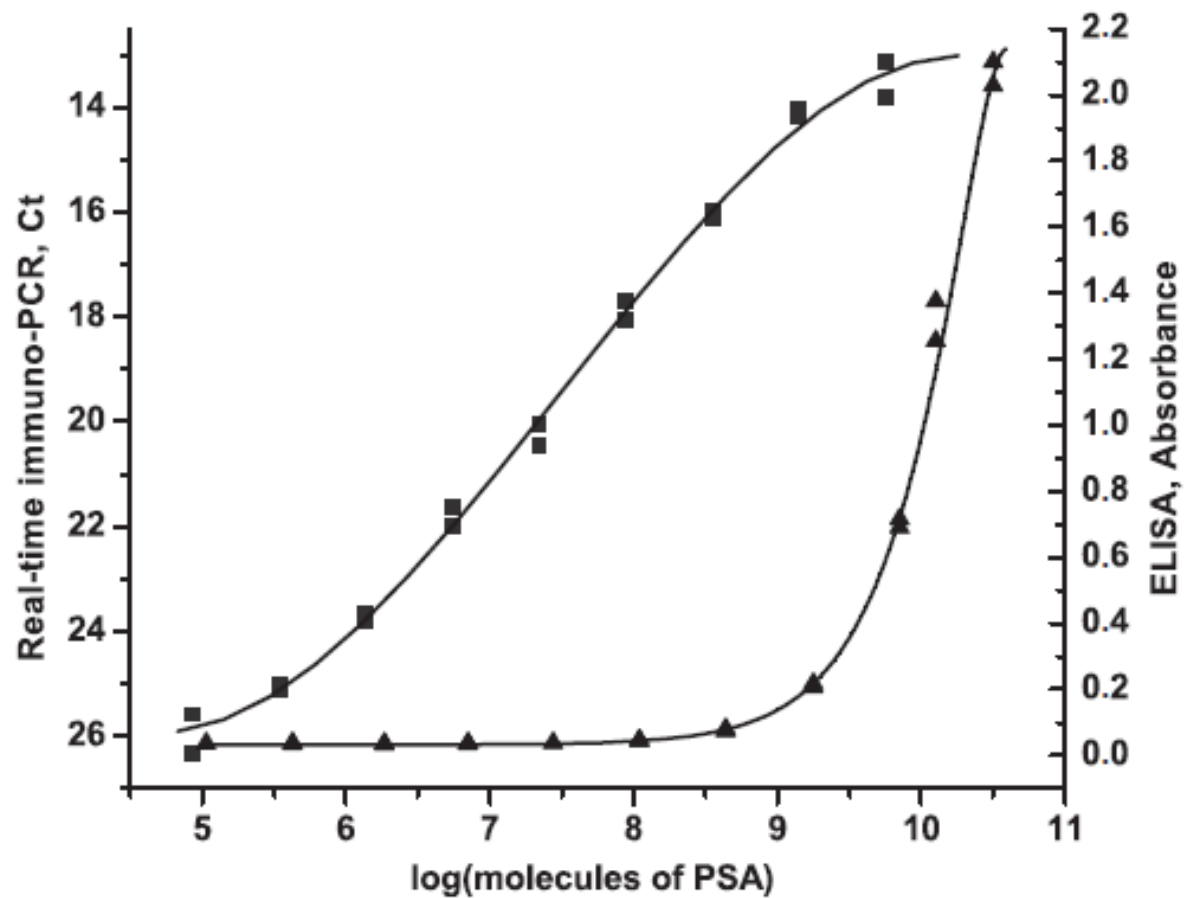


Fig. 5. Real-time immuno-PCR (assemblage II) (■) and ELISA (▲) readouts of standard samples (logarithmic scale).

ImunoPCR – stanovení PSA v laser-mikrodisekovaných buňkách

Human Pathology (2008) 39, 1474–1482



ELSEVIER

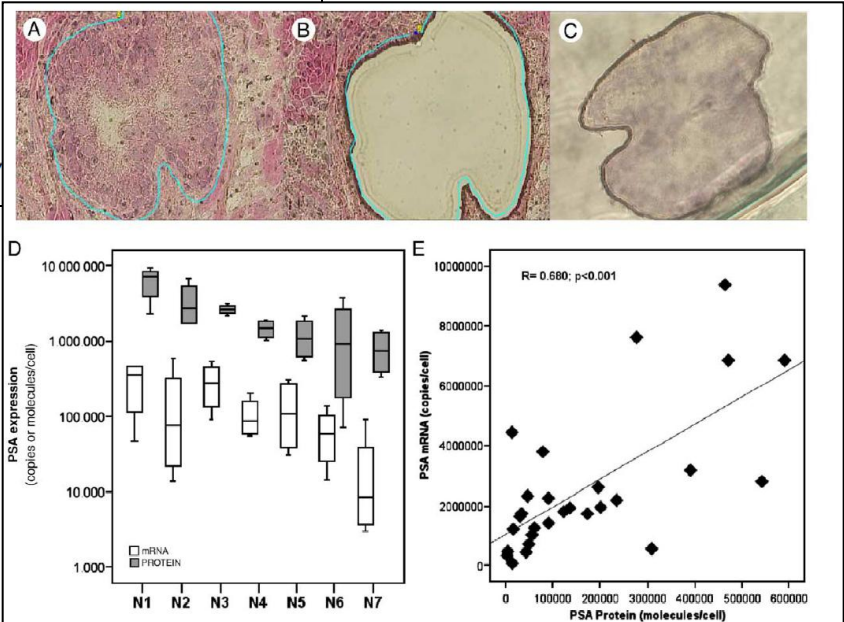
Human
PATHOLOGY

www.elsevier.com/locate/humpath

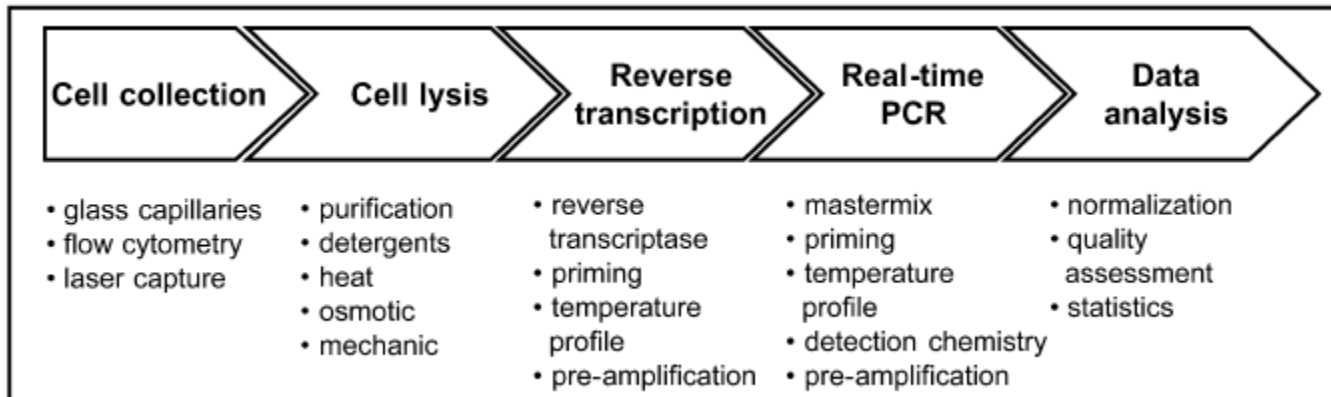
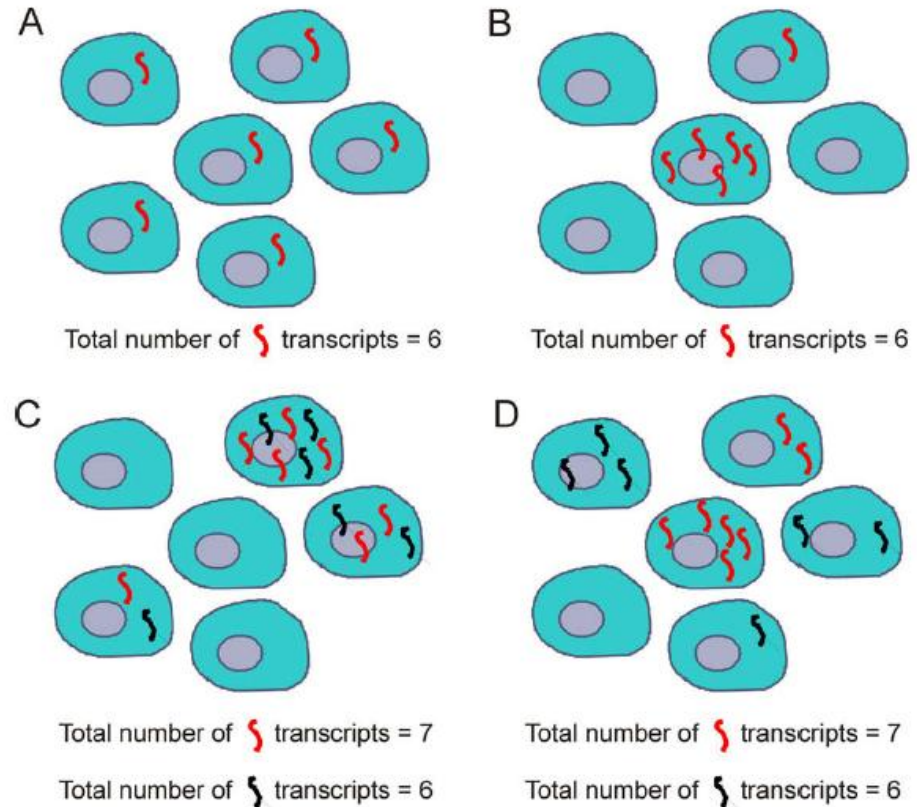
Original contribution

Prostate-specific antigen mRNA and protein levels in laser microdissected cells of human prostate measured by real-time reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction and immuno–quantitative polymerase chain reaction

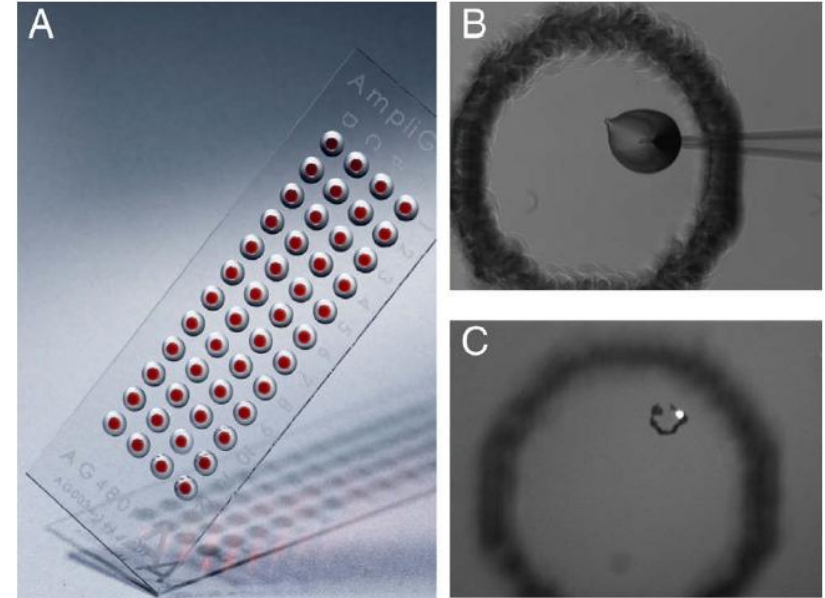
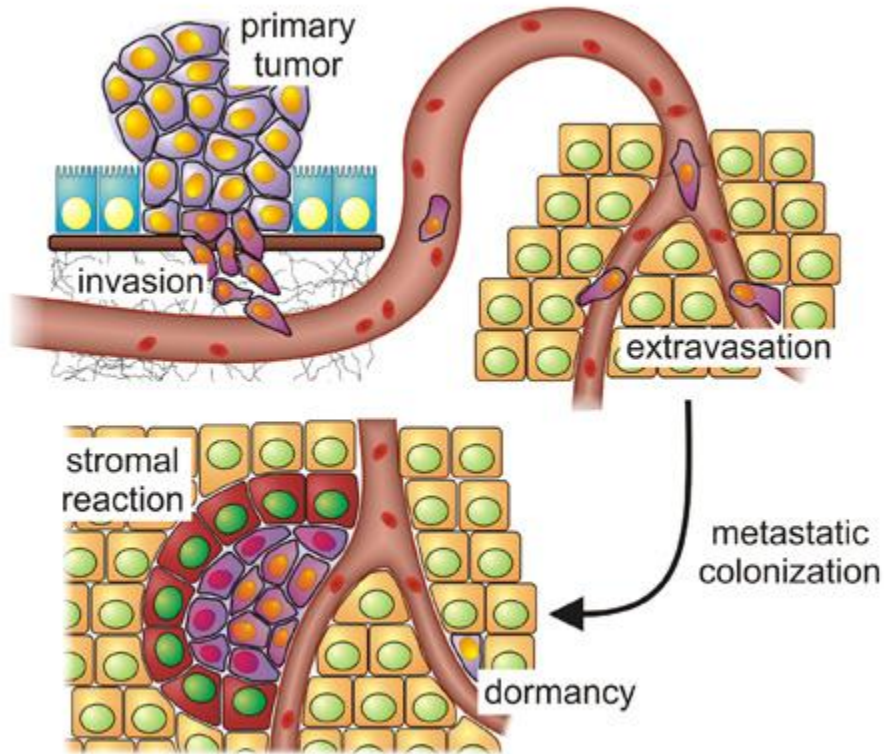
Pamela Pinzani PhD^a, Kristina Lind PhD^{b,d}, Francesca Malentacchi Gabriella Nesi MD^c, Francesca Salvianti PhD^a, Donata Villari MD^f, Mikael Kubista PhD^{d,e}, Mario Pazzagli PhD^a, Claudio Orlando PhD^a



Single cell profiling



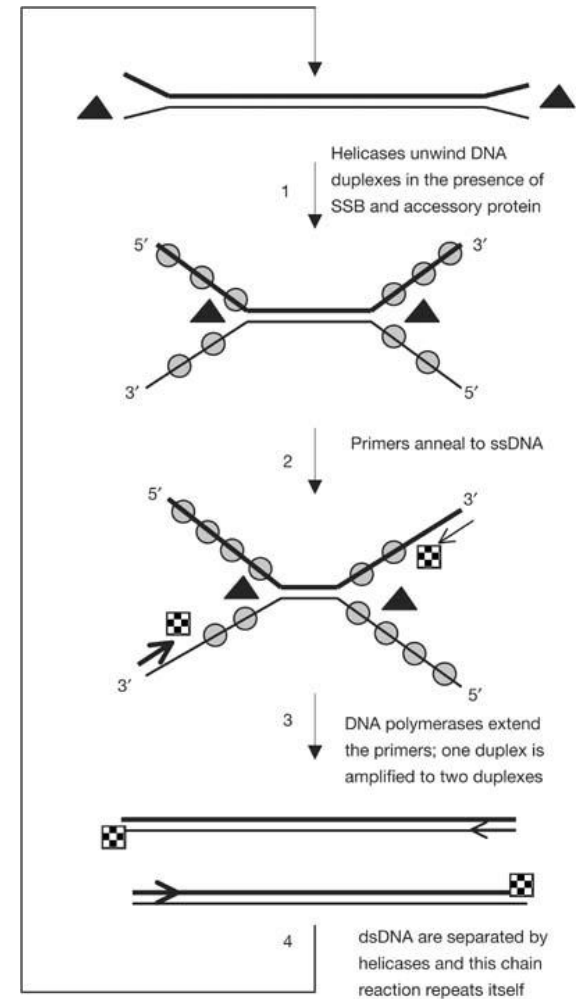
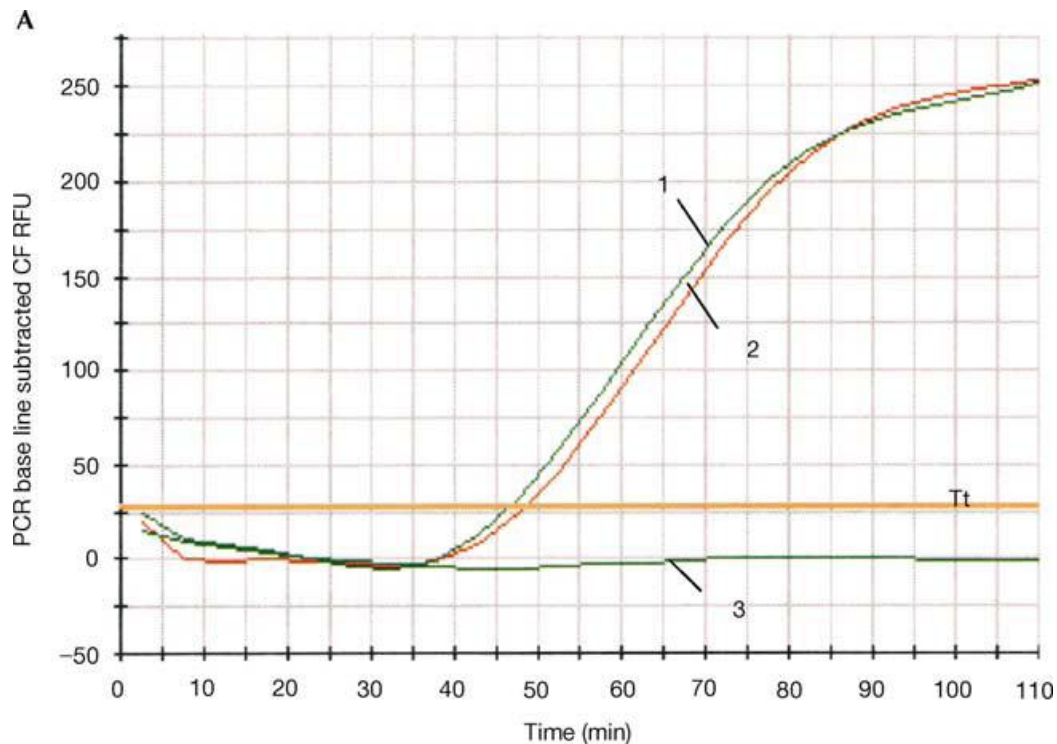
Circulating tumor cells (CTCs)



Amplifikace DNA bez PCR?

Helicase-dependent isothermal DNA amplification

1. dsDNA je denaturována pomocí helikáz a SSB proteinů
2. Primery hybridizují ke komplementární sekvenci
3. Polymeráza doplní ssDNA na dsDNA, která slouží jako substrát helikázám



Droplet digital PCR

- Precizní sensitivní stanovení NK
- Kombinuje klasické PCR postupy s fluorescenčním stanovením produktu
- Rozdělení PCR reakce na stovky až tisíce subreakcí – někde dojde k replikace, někde ne – přítomnost/nepřítomnost hledané sekvence
- Subreakce individuálně analyzovány
- Ratio pozitivních a negativních reakcí – počáteční množství molekul templátu
- Absolutní kvantifikace bez externích standard

ddPCR - využití

- Kvantifikace virů a patogenů
- Genové exprese – pokud rozdíly menší než dva krát
- Copy number variations
- Single cell analysis
- Rare mutations....

ddPCR

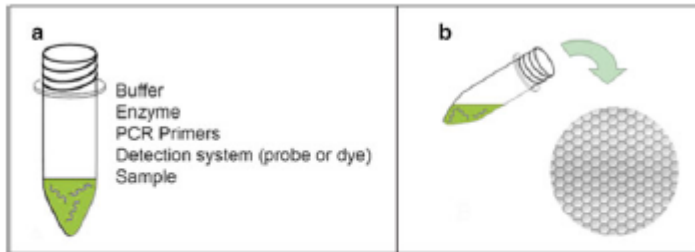


Fig. 3 Components of a Digital PCR reaction and Partitioning. ddPCR reactions contain similar components to that typically used in a qPCR reaction. These components should be thoroughly mixed and then partitioned into uniform subpartitions

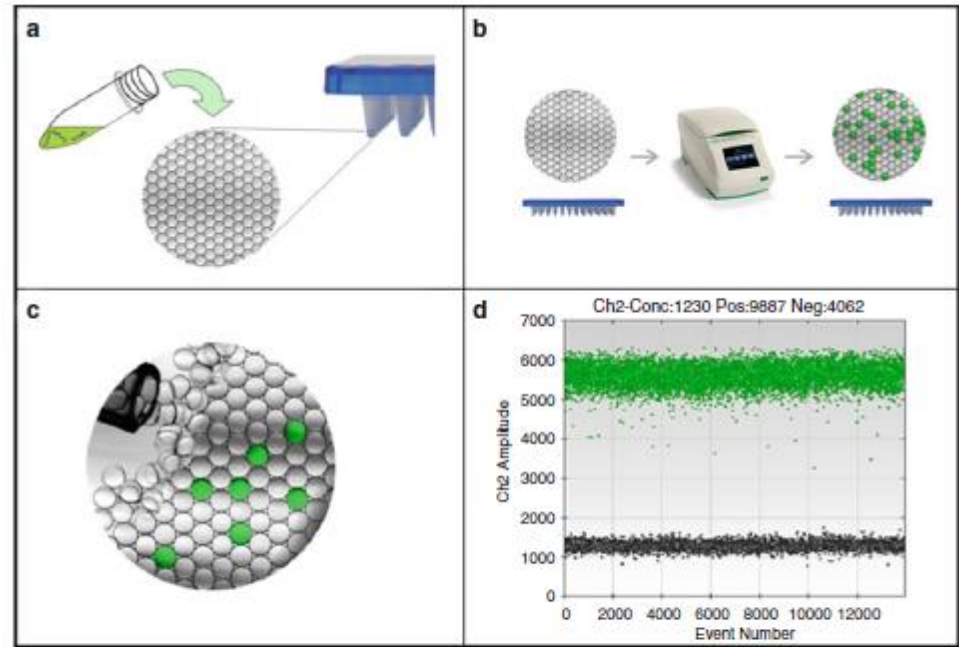


Fig. 4 (a) Partitioned reactions are placed in a vessel compatible for the PCR amplification to take place. (b) Amplification can take place in a standard thermocycler using typical qPCR protocols. For example 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s and 60 °C for 1 min. No optical analysis is required at the amplification phase. (c) Individual subreactions are collected and subsequently interrogated for the presence of a positive fluorescent signal. (d) Individual reactions are deemed either a positive or negative event, counted, and the concentration is calculated

ddPCR

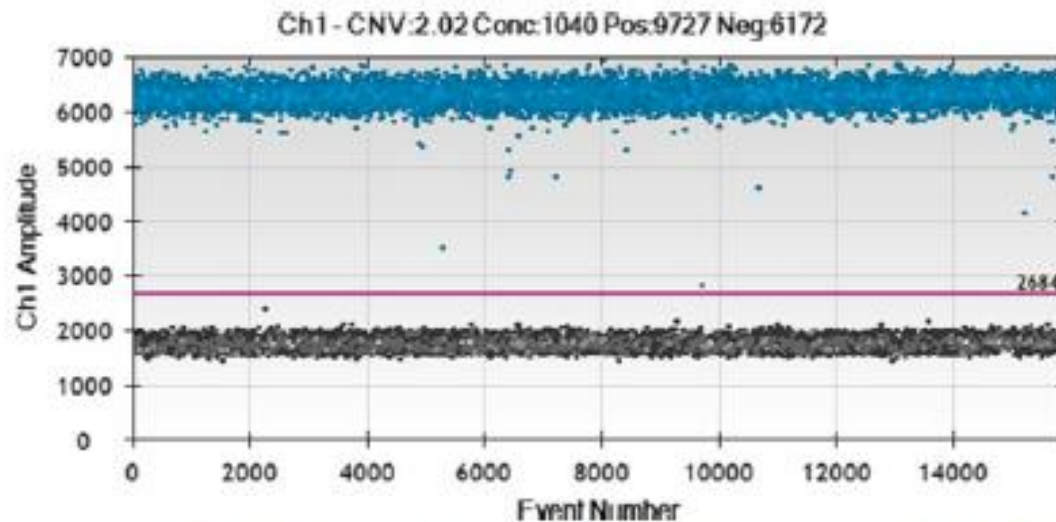


Fig. 5 Temporal plot of a ddPCR reaction. *X* axis represents individual subreactions in the order they were analyzed. *Y* axis represents fluorescent signal generated in each corresponding subreaction. *Blue dots* are deemed as positive events; *grey dots* are deemed negative. *Purple line* is the threshold for determining what is positive from negative (can be set automatically by software algorithms or manually as in the case above)