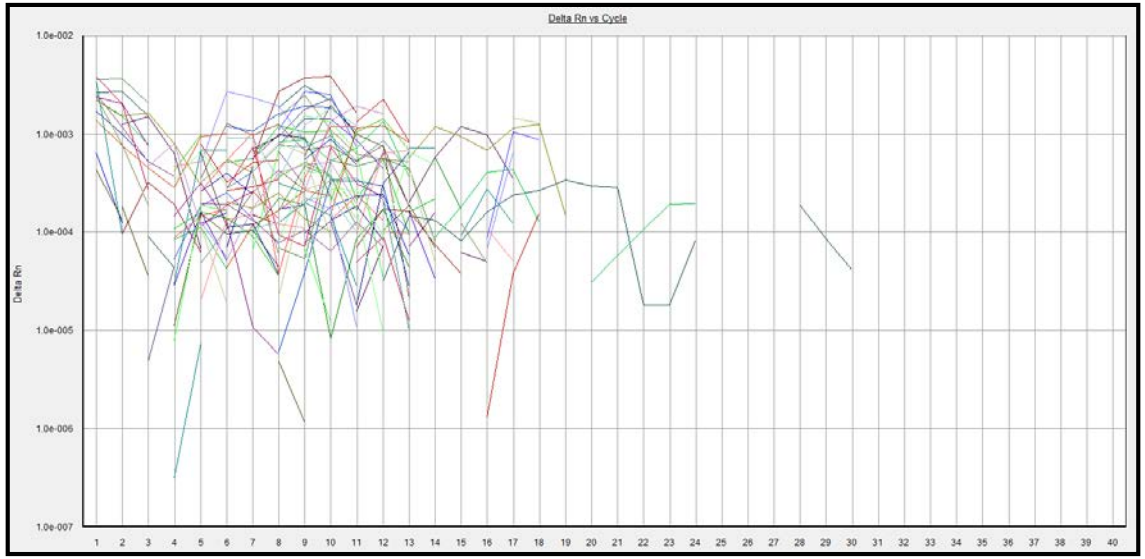
ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

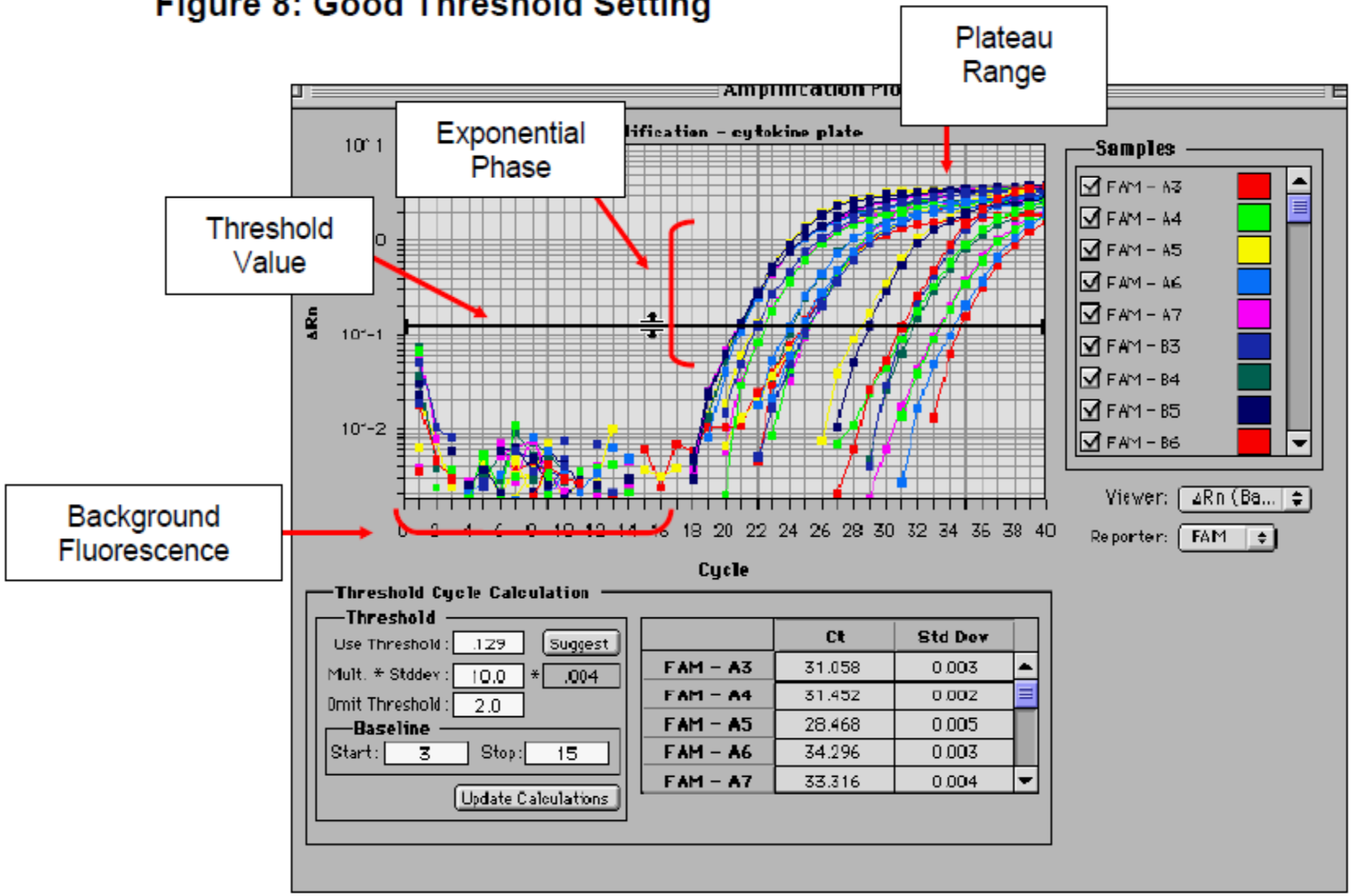


VII. Troubleshooting

3 qPCR parameters

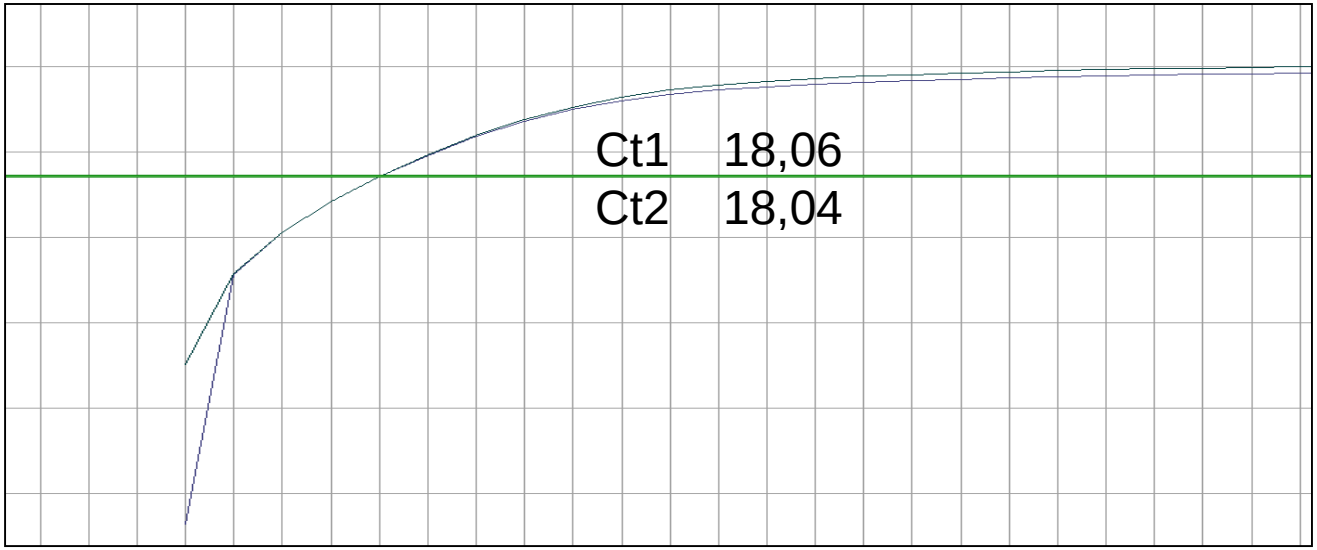
- **Baseline** – determined during early phases of qPCR across the entire plate, background signal
- **Threshold** – numerical value determined for each run, statistically significant point above the calculated baseline
- **Ct** – threshold cycle – cycle number where fluorescence crosses the threshold

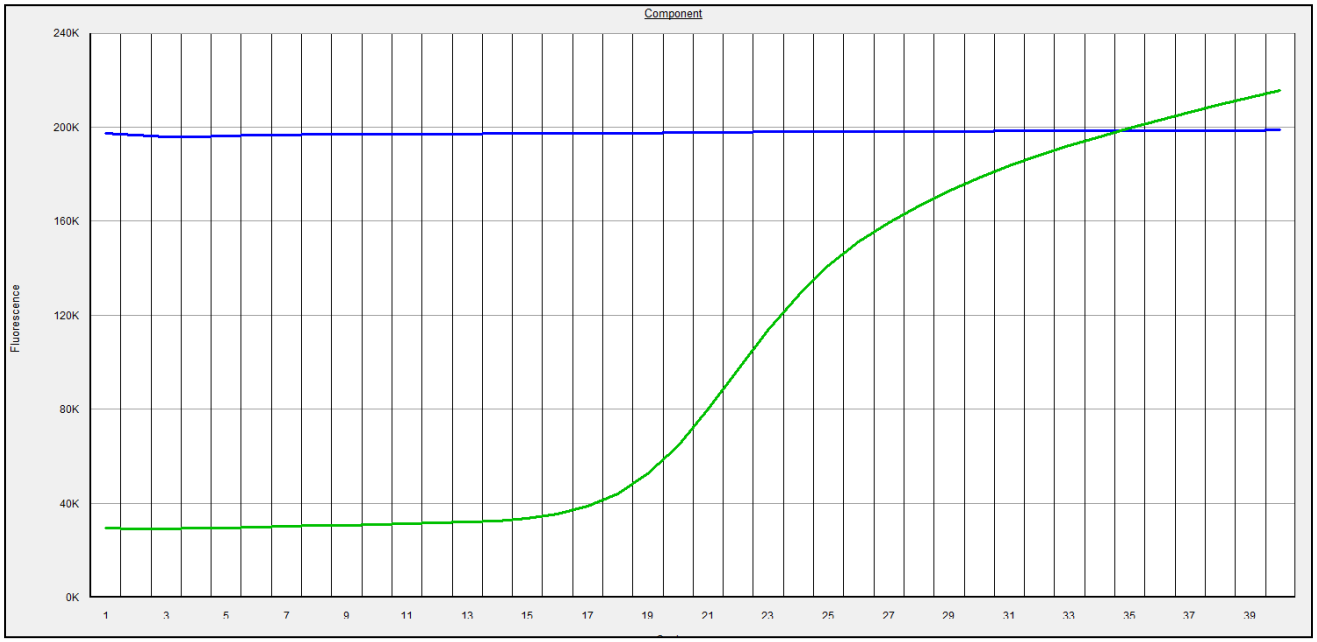
Figure 8: Good Threshold Setting



Problémy v qRT-PCR analýze

Jak vypadá správný amplifikační výstup?





Duplikátní reakce

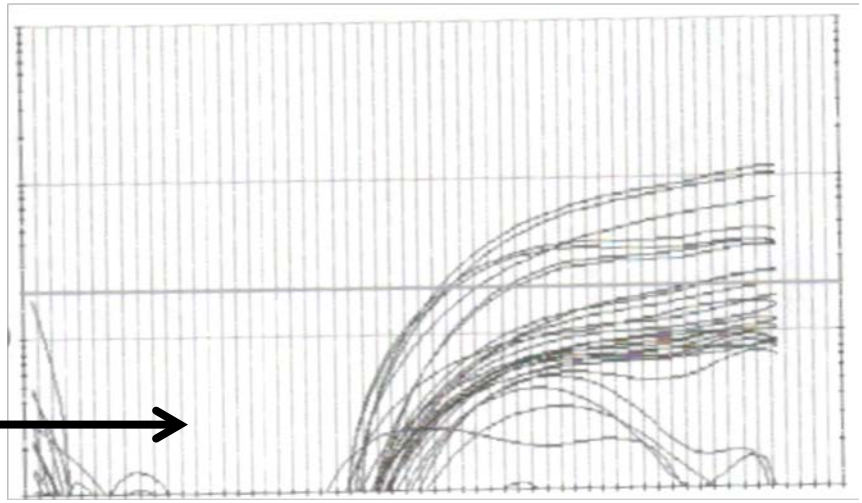
- Exponenciální amplifikace
- Identická amplifikace
- Podobné/shodné Ct
- Odpovídající fluorescence jednotlivých reportérů

Problémy v qRT-PCR analýze

Problém 1:

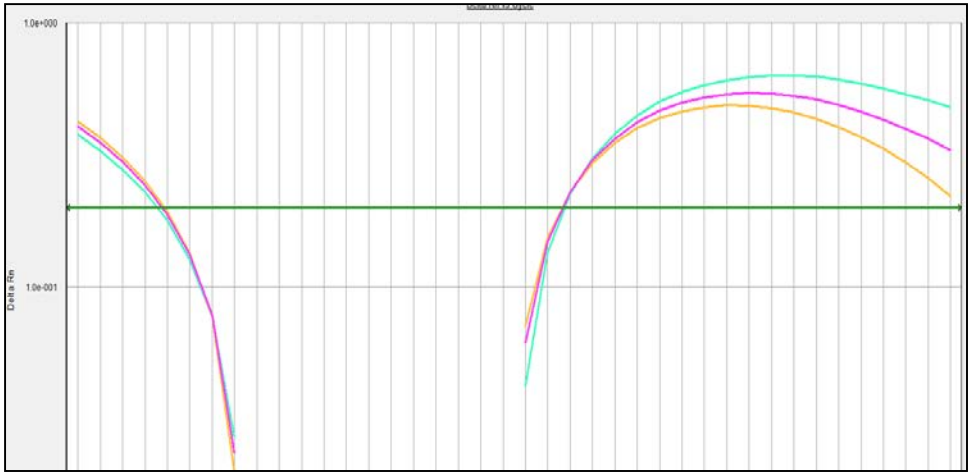
Příliš mnoho templátu

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



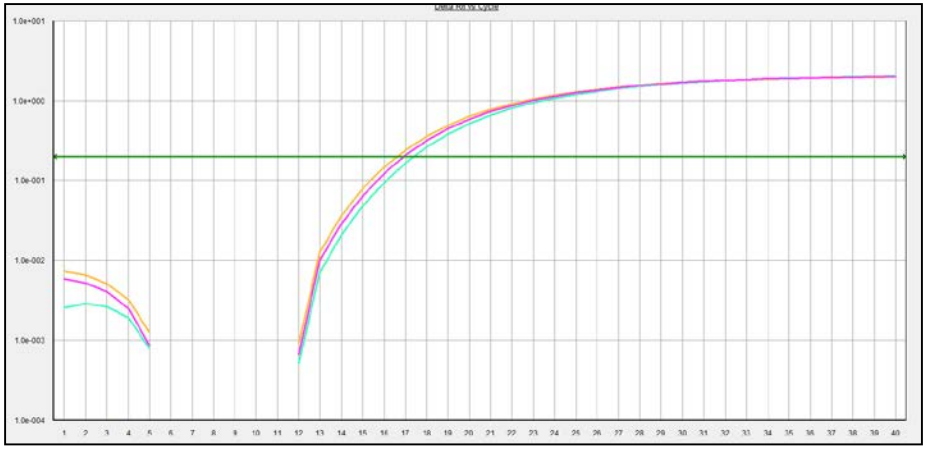
Řešení:

- 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

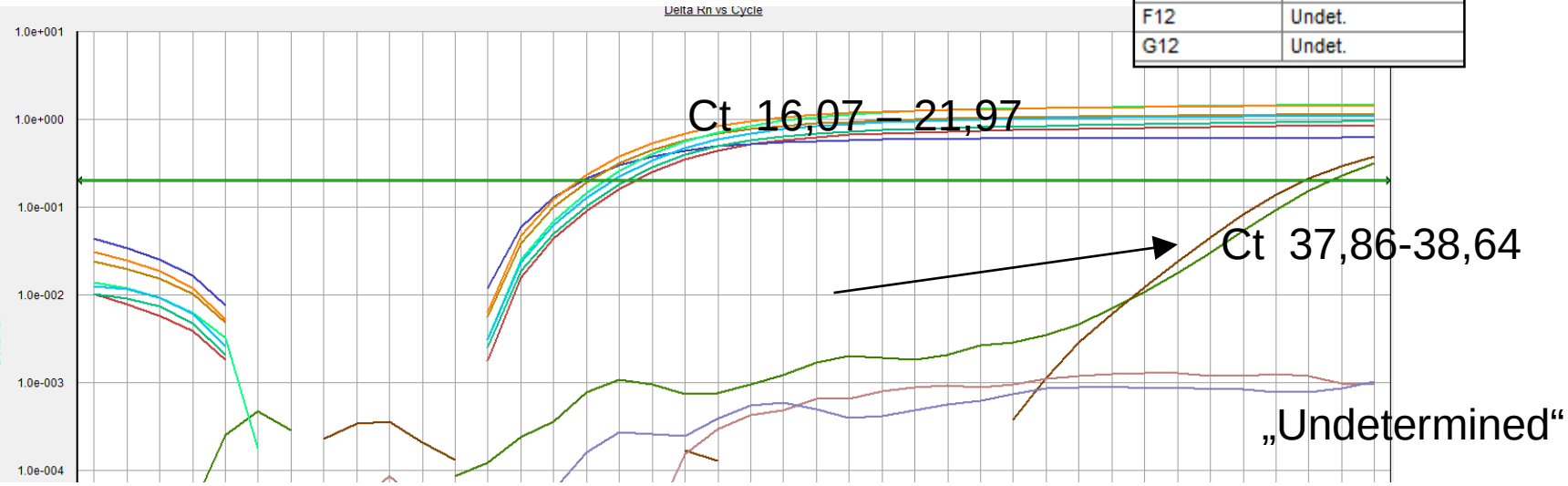
Problém 2:

Amlifikace není exponenciální

Pravděpodobně přítomnost inhibitorů v konkrétním vzorku

Řešení: Ředění templátu 1:10-100

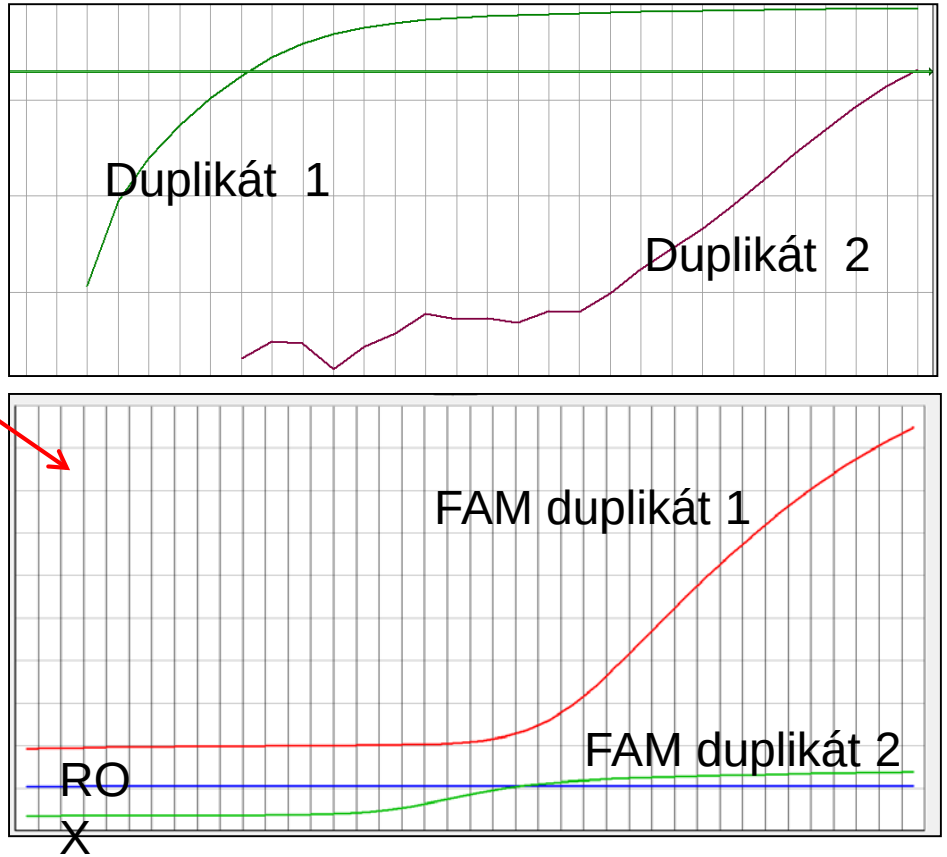
Well	Ct
A10	17.46
A10	21.97
A12	15.85
A12	19.26
B10	38.64
B10	Undet.
B12	37.86
B12	Undet.
C10	17.18
C10	20.35
C12	16.07
C12	19.16
D10	Undet.
D10	Undet.
D12	Undet.
D12	Undet.
E10	16.49
E10	21.55
E12	15.71
E12	20.11
F10	16.75
F10	17.93
F12	Undet.
G12	Undet.



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, reagencie atd.)

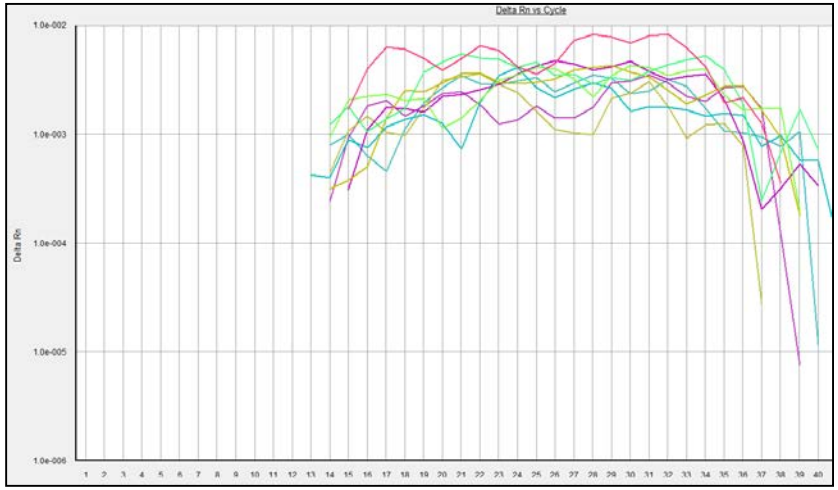
Problémy v qRT-PCR analýze

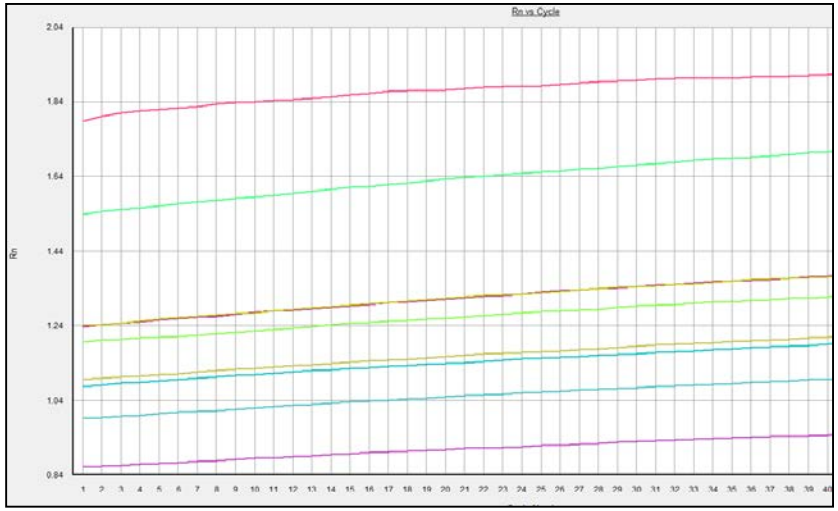
Problém 4:

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 vzoků 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

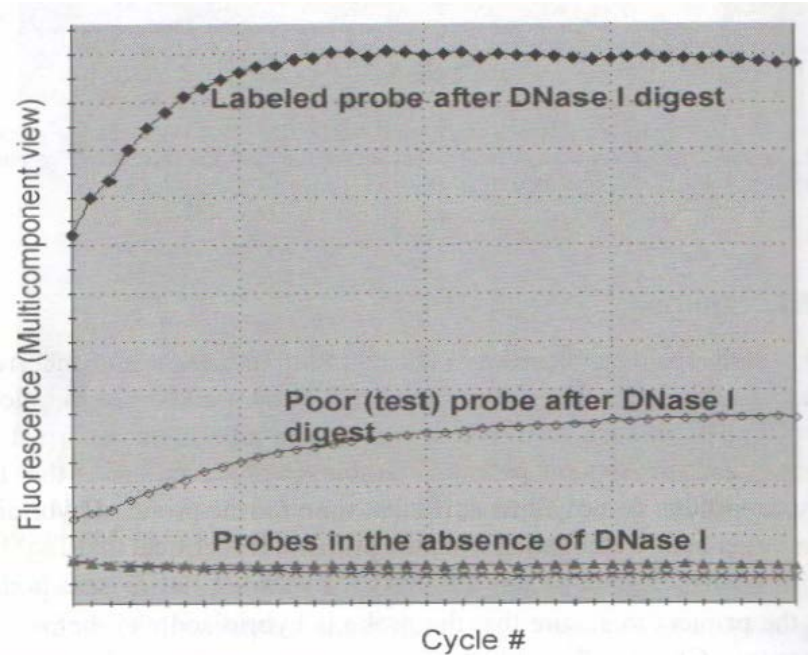
• Kontrola pomocí SYBR Green nebo v agarózovém gelu

• Pokud je vyloučeno selhání amplifikace, provést test s DNázou I

DNázaI

- oddělí fluorofor od zhášeče a umožní fluorescenci

- problémy ve značení nebo purifikaci sondy



Problémy v qRT-PCR analýze

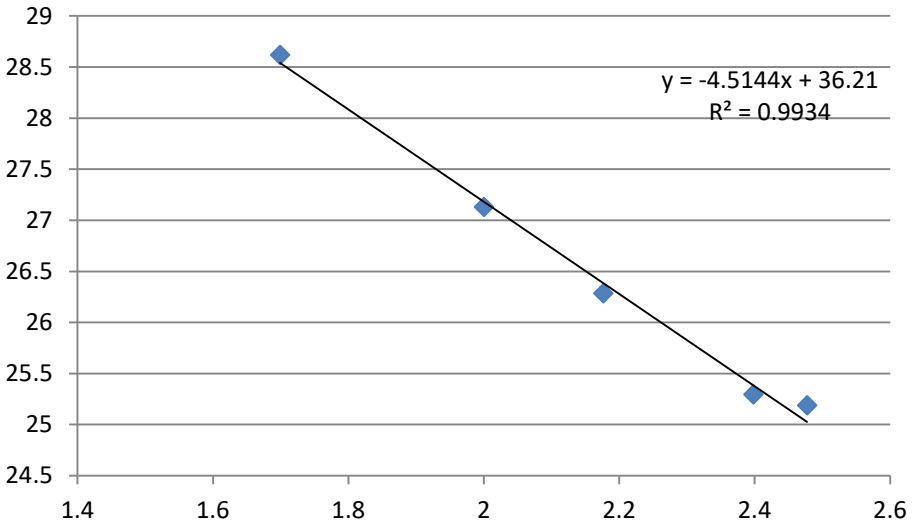
Problém 6:

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 $MgCl_2$



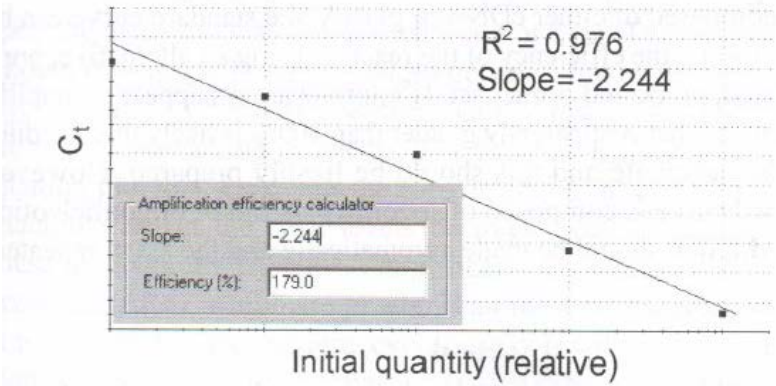
Problémy v qRT-PCR analýze

Problém 7:

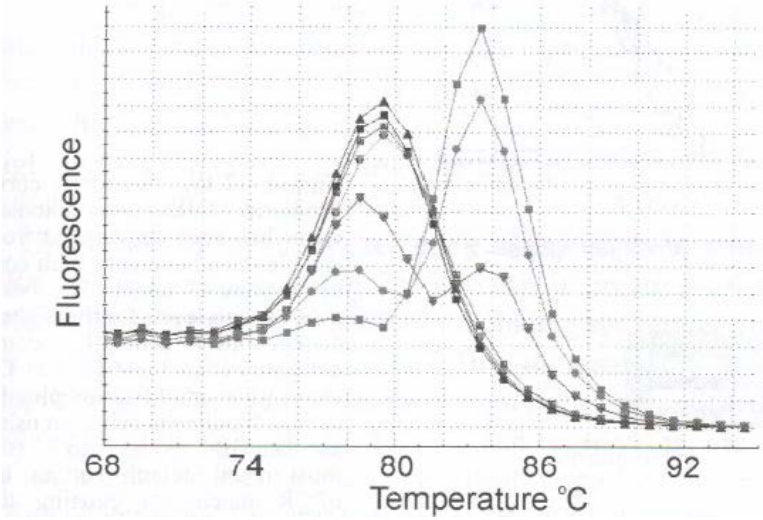
Směrnice kalibrační křivky je větší než -3,3

- 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

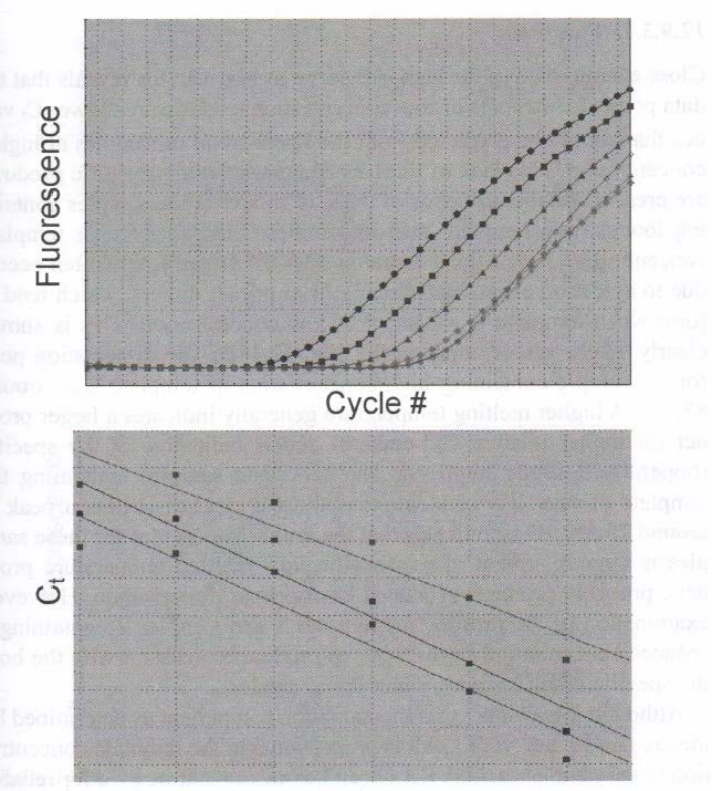
Problém 8:

Nelze naředit standardy na nižší koncentraci

- Přítomnost kontaminující DNA

Řešení:

- nové standardy
- ověřit čistotu RNA vstupující do procesu



Problémy v qRT-PCR analýze

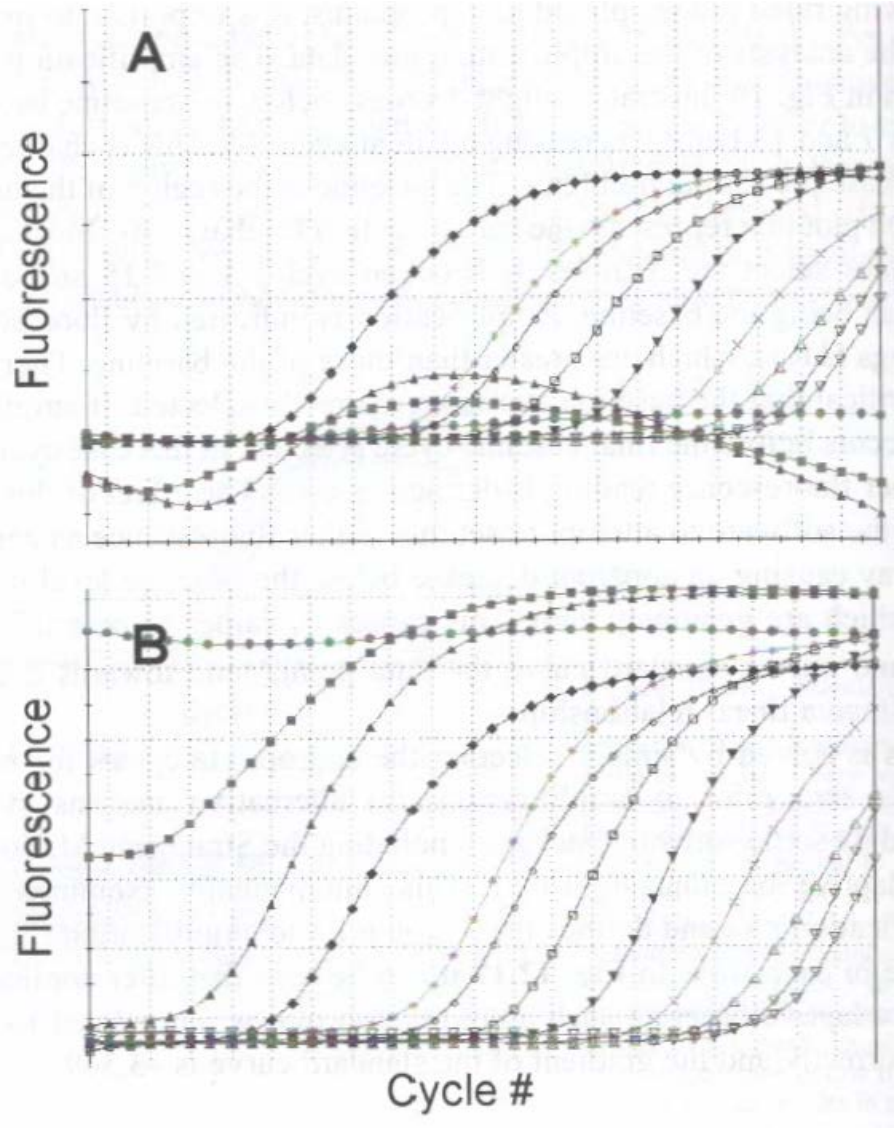
Problém 9:

Amplifikační grafy vypadají divně

- příliš mnoho templátu
- chybné nastavení baseline

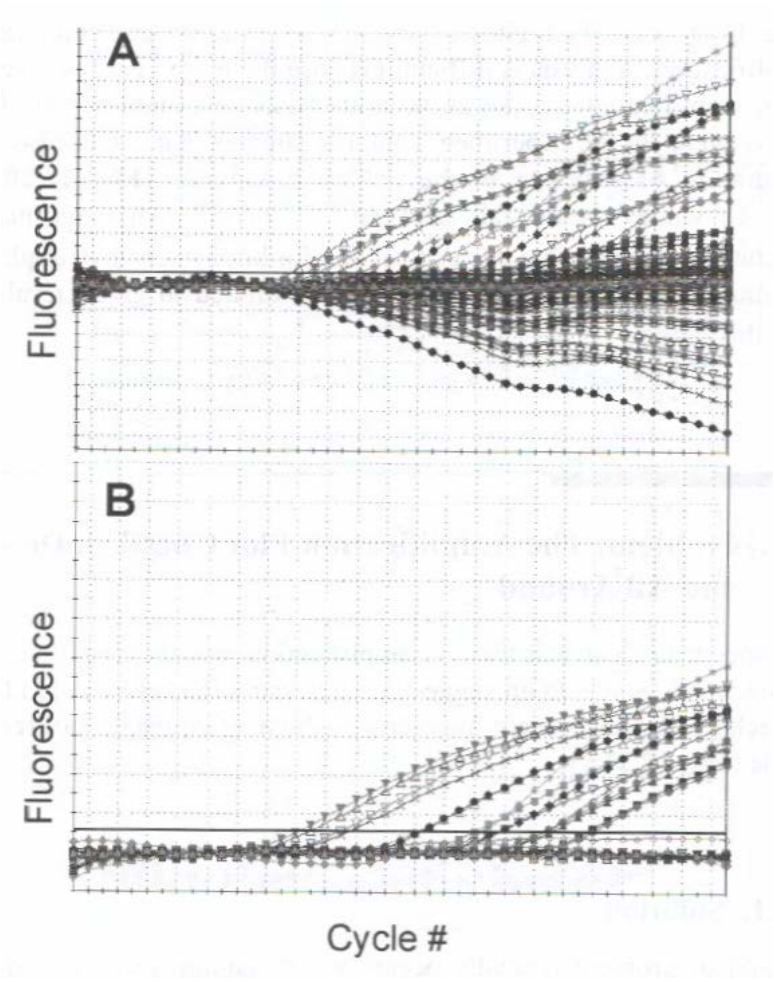
Řešení:

- 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