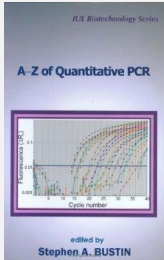


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD
BMS, UPF LF MU

- I. Teorie PCR, kvantifikační strategie, instrumentace
- II. Interkalační barviva a sondy, design primerů, sond
- III. Aplikace, troubleshooting, design experimentů, MIQE



Bustin SA: A-Z of quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, Vol. 5, La Jolla, California, 2004-2006



Dorak T: Real Time PCR. BIOS Advanced Methods, Taylor & Francis Group, NY, 2007



Pfaffl MW. Methods (in Enzymology), The ongoing evolution of qPCR. 50(4), 2010

Další zdroje

- <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/technical-reference-library/real-time-digital-PCR-applications-support-center/gene-expression-support/gene-expression-support-getting-started.html>
- <https://lifescience.roche.com/documents/First-Steps-in-Relative-Quantification-Analysis-of-Multi-Plate-Gene-Expression-Experiments.pdf>
- https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4454239_IntrotoGeneEx_GSG.pdf
- https://www.bioprocess.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin_6894.pdf

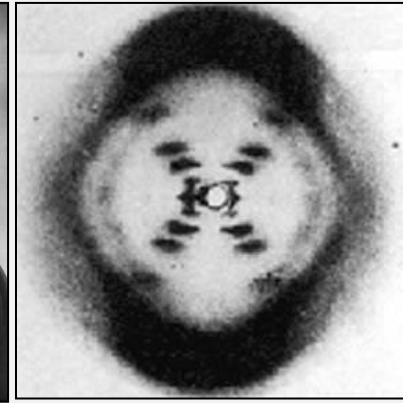
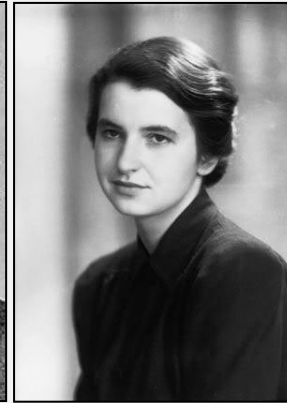
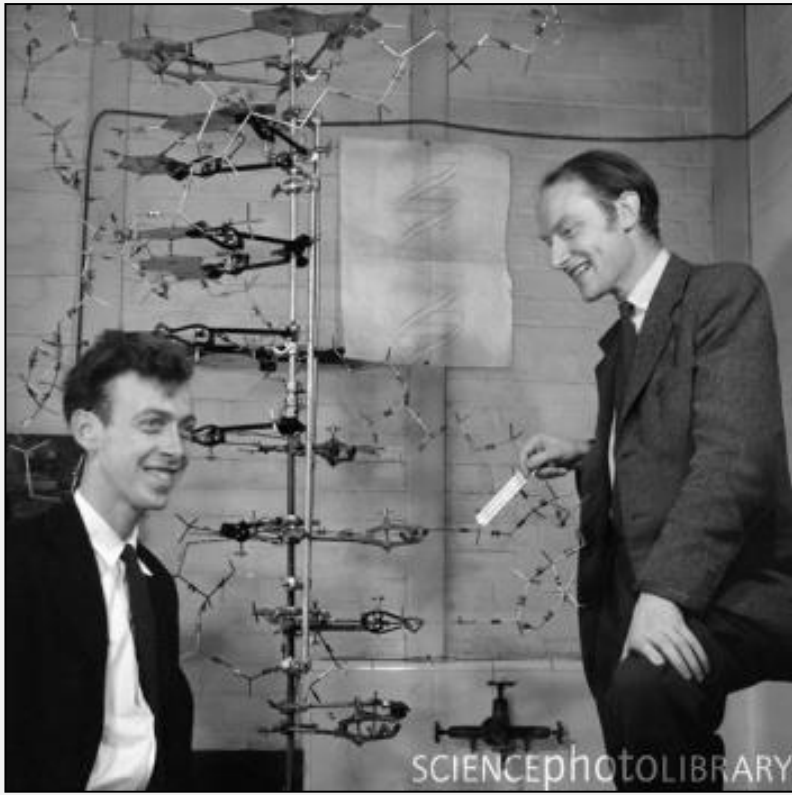
Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none"> • Rekombinantní DNA • Objev DNA ligázy
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none"> • Restrikční endonukleázy • Reverzní transkriptáza
1972	Klonování
1973	In vitro konstrukce bakteriálního plazmidu
1975	Southern blot
1977	Sekvenování DNA
1980	Koncept RFLP
1981	Western blotting
1982	<ul style="list-style-type: none"> • Manipulace s genomem Drosophily – P elementy • Whole genome shotgun

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	 <ul style="list-style-type: none"> • PCR • DNA fingertying
1987	<ul style="list-style-type: none"> • YACs • Místně cílená mutagenese
1988	Taq Polymeráza ChIP
1990	BLAST
1992	BACs
1995	Microarrays
1998	RNAi
2002	UCSC Genome Browser
2003	DNA assembly programs
2004	Anotace genů – ENSEMBL
2005	<ul style="list-style-type: none"> • Projekt HapMap • Ligační sekvenování
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick- **Rosalind Franklin**, 1953
- Dr. Franklin zemřela v roce 1958
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London



Jakým způsobem zjistíte:

1. zda pacient nese nějakou klinicky významnou bodovou mutaci, která určuje jeho další léčbu?
2. který ze dvou genů je v nějaké tkáni exprimován více než druhý ?
3. druh patogenní bakterie u nemocného?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?

Southern blot, RFLP, ...

**Northern/Western blot,
Flowcytometrie, ...**

Kultivace, biochemické analýzy

Cytogenetické vyšetření

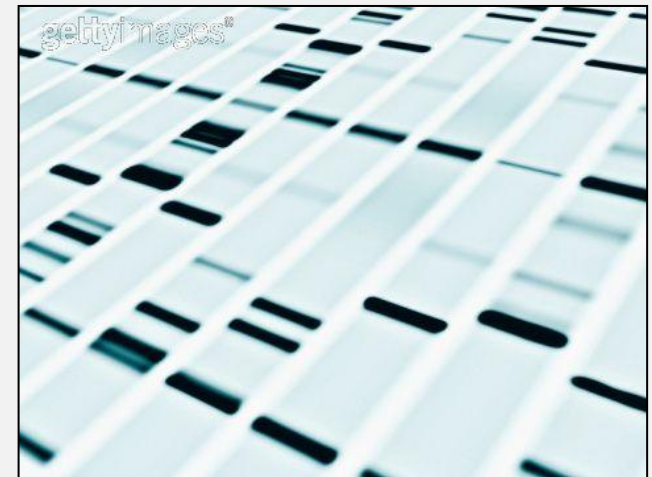


Jakým způsobem zjistíte:

1. zda pacient nese nějakou klinicky významnou bodovou mutaci, která určuje jeho další léčbu?
2. který ze dvou genů je v nějaké tkáni exprimován více než druhý ?
3. druh patogenní bakterie u nemocného?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?



PCR

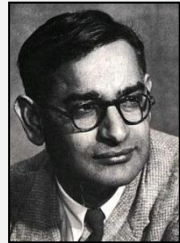


Studies on polynucleotides XCVL. Repair Replication of Short Sythetic DNAs as catalysed by DNA polymerases.

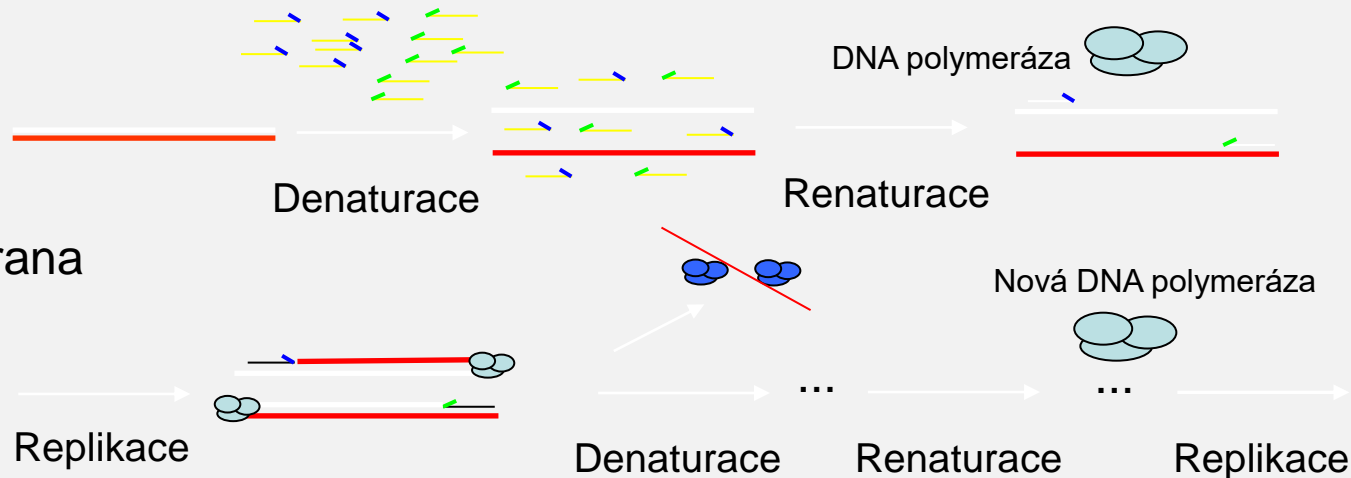


Kjell Kleppe

Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971): J.Mol.Biol.56,341-361.



Har Gobind Khorana



Práce popsala některé parametry reparativní replikace – účinnost replikace, minimální délky primerů a templátu, sekundární struktury atd.

Proč se nerozšířila tato metoda už v 70.letech?

Extrémně nákladná syntéza oligonukleotidů, nedokonalé sekvenování, termolabilita a nákladná purifikace DNA polymeráz, nedostupná instrumentace...

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

The logo for the journal Science, featuring the word "Science" in red and "AAAS" in blue.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific beta-globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the beta A and beta S alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified beta-globin sequences. The beta-globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.

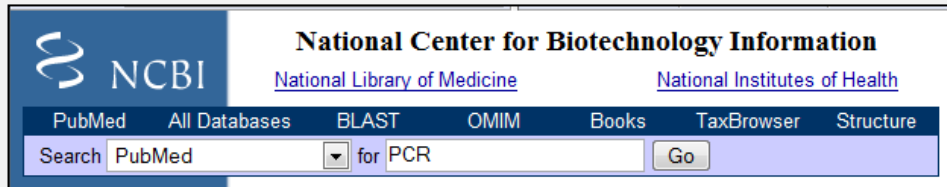
Kary B. Mullis



Nobelova cena za chemii
1993



- Použití termostabilní DNA polymerázy
- Rozvedení konceptu navrženého K. Kleppem
- Obrovský boom PCR díky technologickému pokroku



• 577,326 článků (19.4.2022)

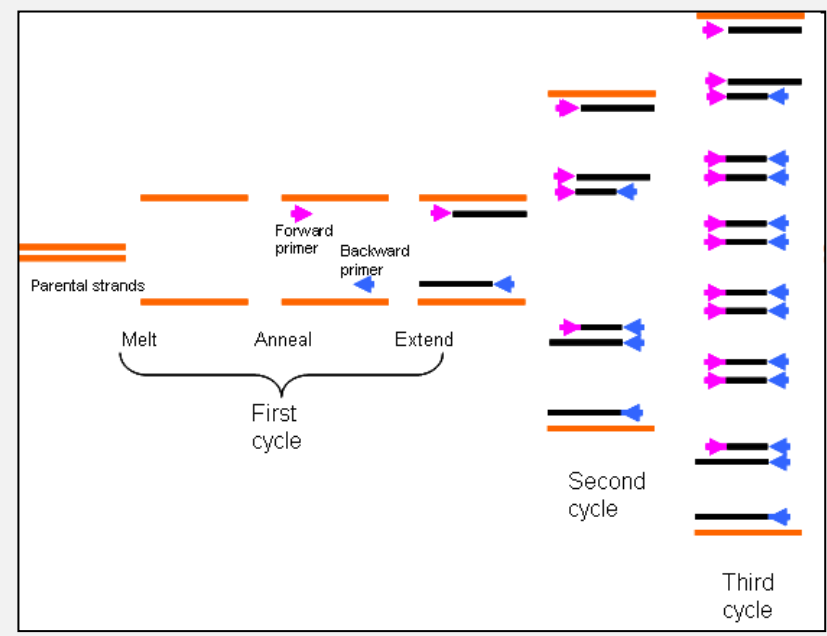
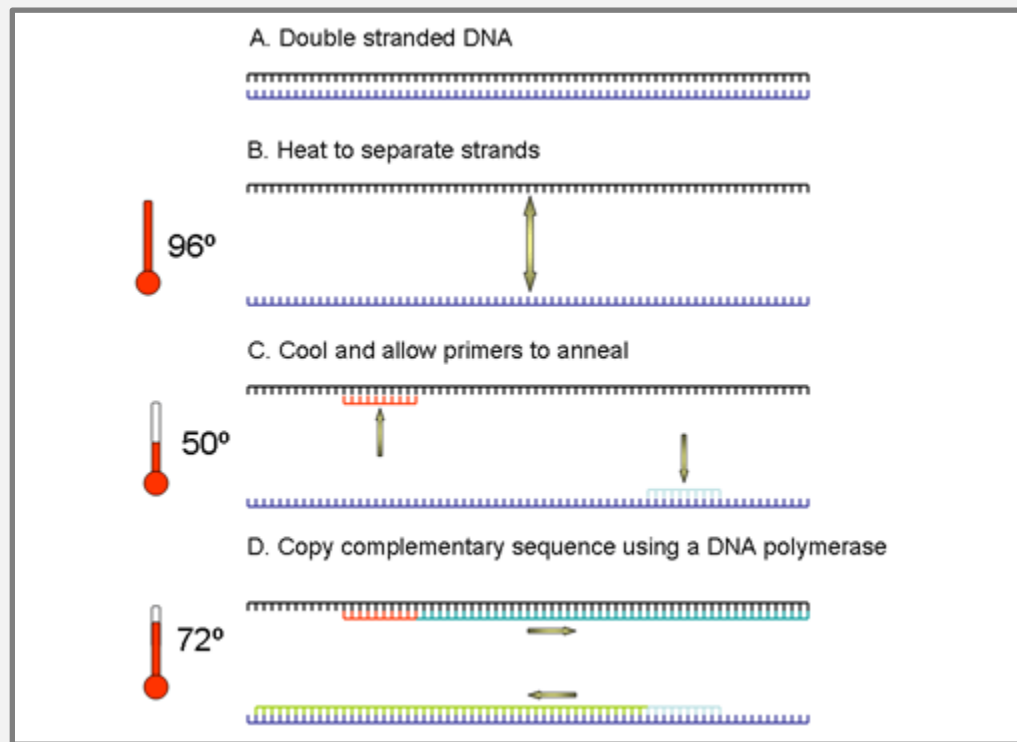
Rok 1989

- PCR vyhlášena časopisem Science objevem roku a Taq polymerázu molekulou roku

PCR

Cyklické střídání fází denaturace, annealingu a extenze jednoduchou změnou teploty reakční směsi

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



Amplifikace DNA



Základní komponenty reakce

- voda
 - pufr
 - dNTP (dATP+dTTP+dCTP+dGTP)
 - Mg ionty
 - Polymeráza
-
- primery
 - templát

Templát- co jde do reakce
Amplikon- co se amplifikuje

$$\text{Amplifikace (y)} = N \times 2^n$$

N= počet molekul templátu, n počet cyklů PCR

Otázka:
Jedna molekula DNA je amplifikována v **25 cyklech**. Teoreticky, kolik molekul amplikonu (y) je vytvořeno?

1. Počáteční množství molekul templátu je **N=600**. Kolik molekul amplikonu je vytvořeno?
2. Reakce je provedena v 100 μ l. Kolik molekul amplikonu bude přítomno v **1 nI** (0,001 μ l)?

Odpověď:

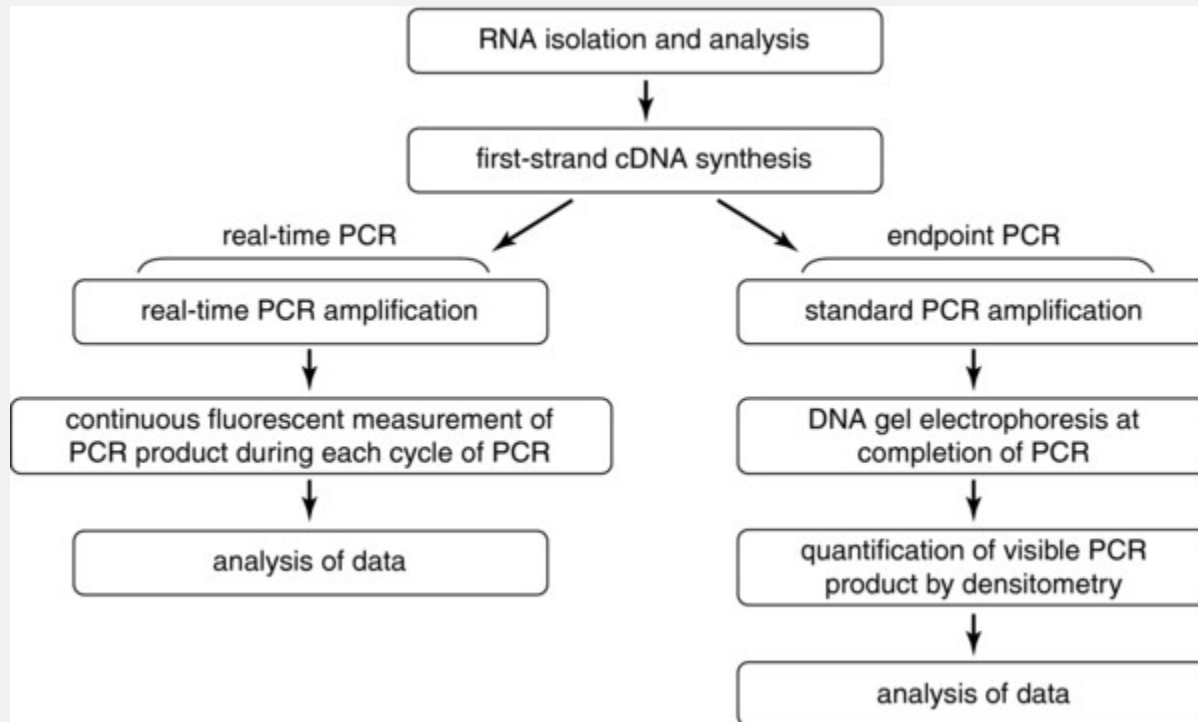
1. $2^{25} = 33\,554\,432$
 2. $600 \times 2^{25} = 2 \times 10^{10}$
 3. 2×10^{10} ve 100 μ l
- **v 0,001 μ l bude 2×10^5 (200 000) molekul amplikonu**

KONTAMINACE JE PROBLÉM

Jediná molekula DNA může způsobit velké problémy

(forenzní genetika, rutinní screening a diagnostika, GMO...)

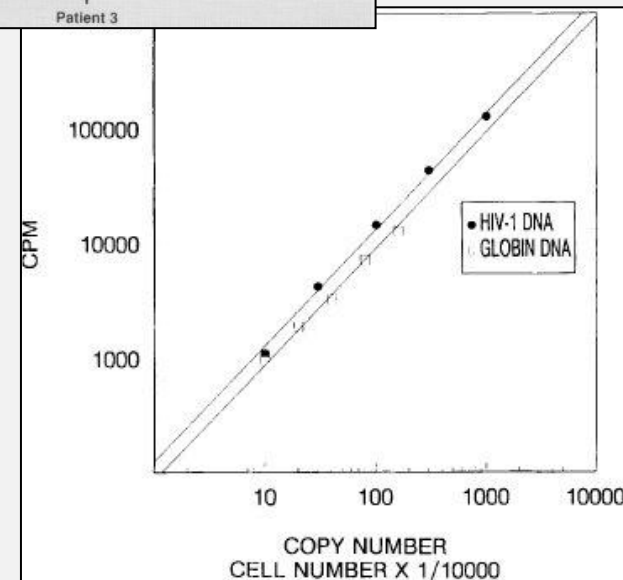
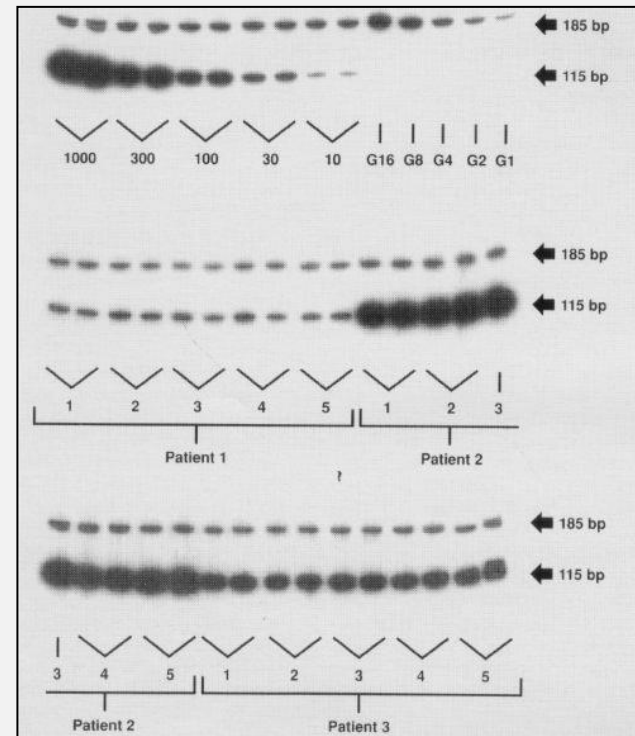
PCR vs real time PCR



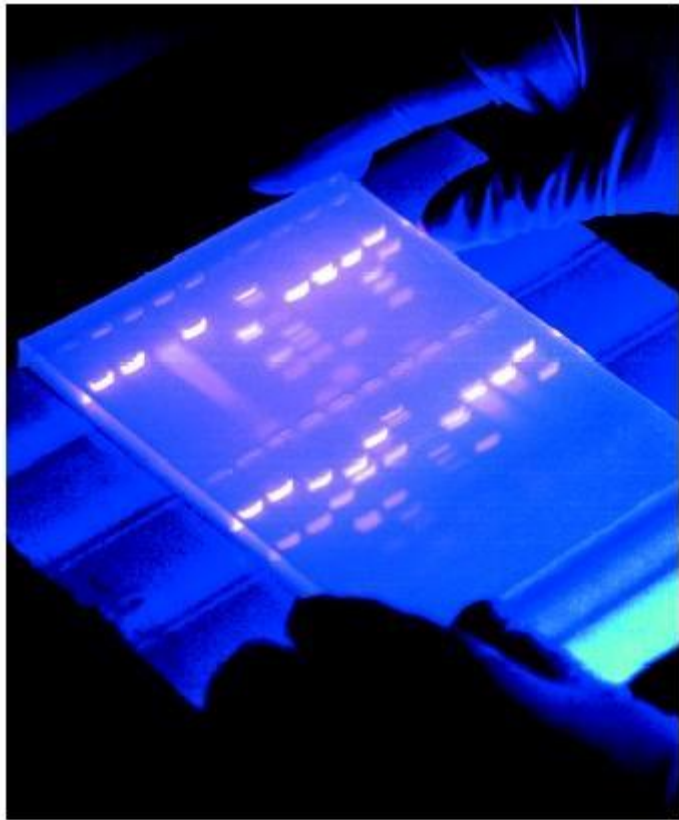
Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

- Kvalitativní odpověď YES/NO
- Extenzivní validace, kontroly
- Denzitometrie
- Minimální rozptyl v parametrech reakce má obrovský vliv na množství amplikonu
- Interní heterologní kontrola (housekeeping gene)
- *Viral load* u HIV+ pacientů
- Výskyt minimální reziduální choroby u onkologických pacientů



Zásadní omezení – gelová elektroforéza

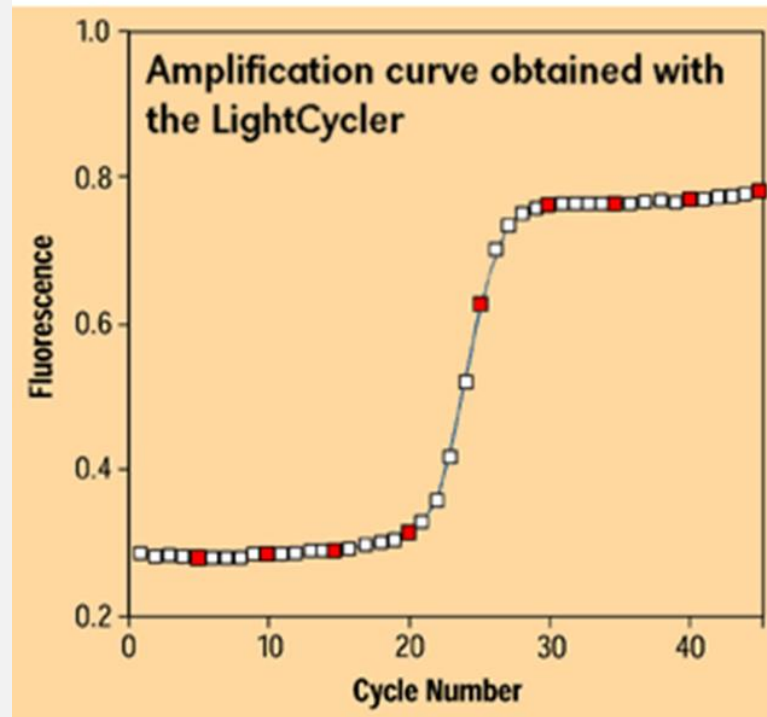
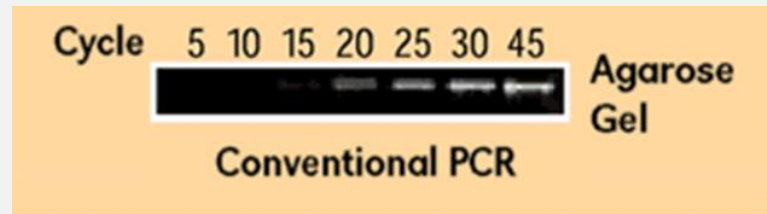


- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2 log
- Nízké rozlišení, pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace

Real-time PCR

- Metoda detekce amplifikace v reálném čase
- Nečekáme do konce reakce
- Detekce změn fluorescence

PCR vs qPCR



qPCR

- Přibližně 100krát víc citlivá než PCR
- Dynamický rozsah 9 logs

qPCR Advantages

- Specific
- Simple, rapid, relatively inexpensive
- Amplifies from low quantities
- Works on damaged DNA
- Sensitive
- Flexible

qPCR Limitations

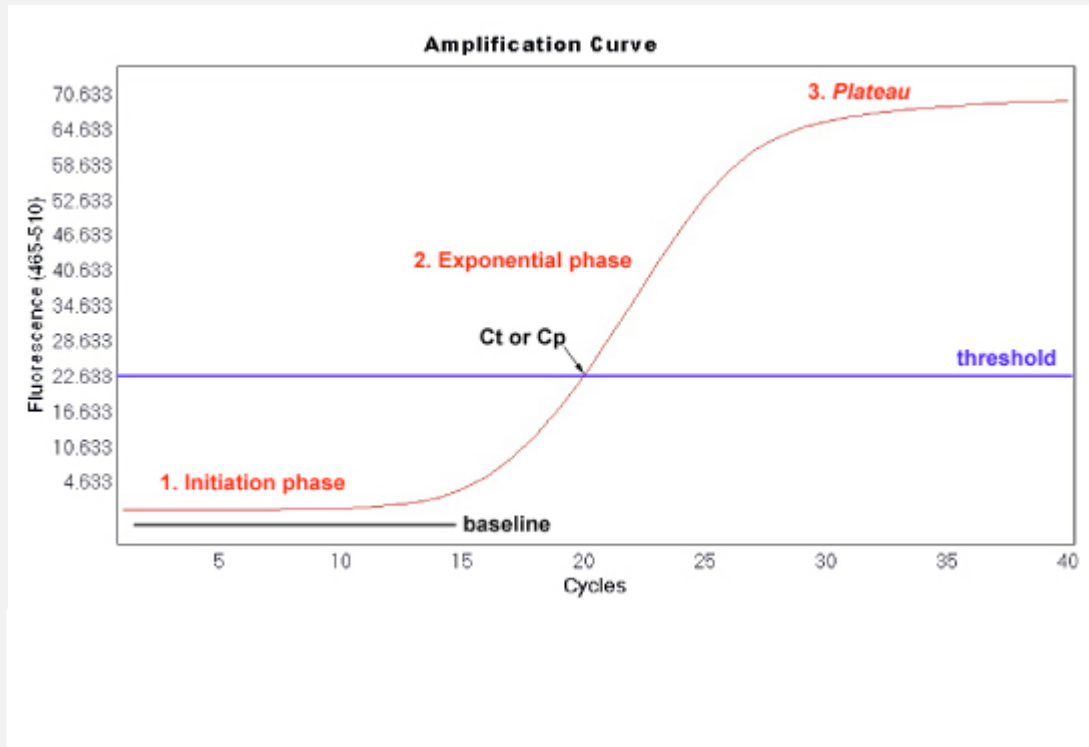
- Contamination risk
- Primer complexities
- Primer-binding site complexities
- Amplifies rare species
- Detection methods

qPCR reakce

- Voda
- Master mix (Mg, dNTP, polymeráza)
- Primery
- Fluorescenčně značená sonda

- Velikost amplikonu – 70-100 nt

Real time PCR



Baseline Value

During PCR, changing reaction conditions and environment can influence fluorescence. In general, the level of fluorescence in any one well corresponds to the amount of target present. Fluorescence levels may fluctuate due to changes in the reaction medium creating a background signal. The background signal is most evident during the initial cycles of PCR prior to significant accumulation of the target amplicon. During these early PCR cycles, the background signal in all wells is used to determine the “baseline fluorescence” across the entire reaction plate. The goal of data analysis is to determine when target amplification is sufficiently above the background signal, facilitating more accurate measurement of fluorescence.

Threshold

The threshold is the numerical value assigned for each run, which reflects a statistically significant point above the calculated baseline.

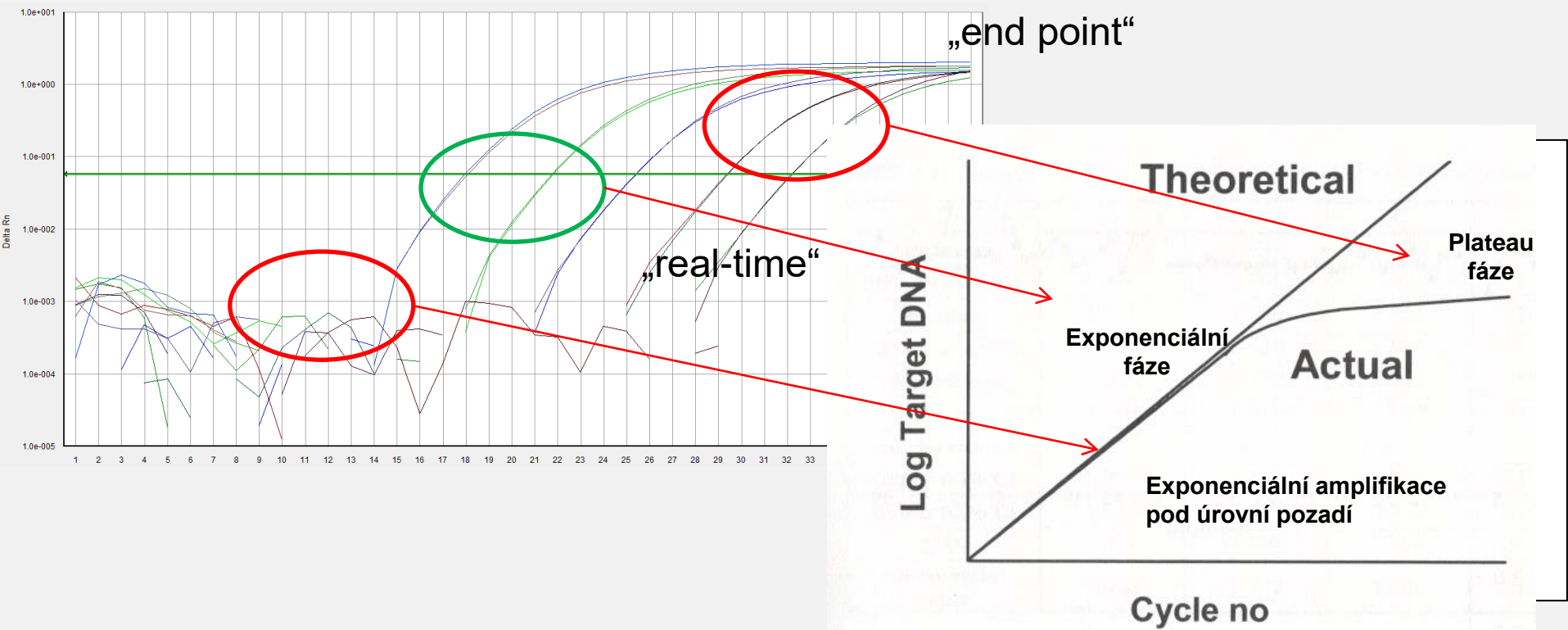
Ct Value

The Threshold Cycle (Ct) reflects the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses the threshold. The Ct value assigned to a particular well thus reflects the point during the reaction at which a sufficient number of amplicons have accumulated, in that well, to be at a statistically significant point above the baseline.

Kvantitativní vztah mezi

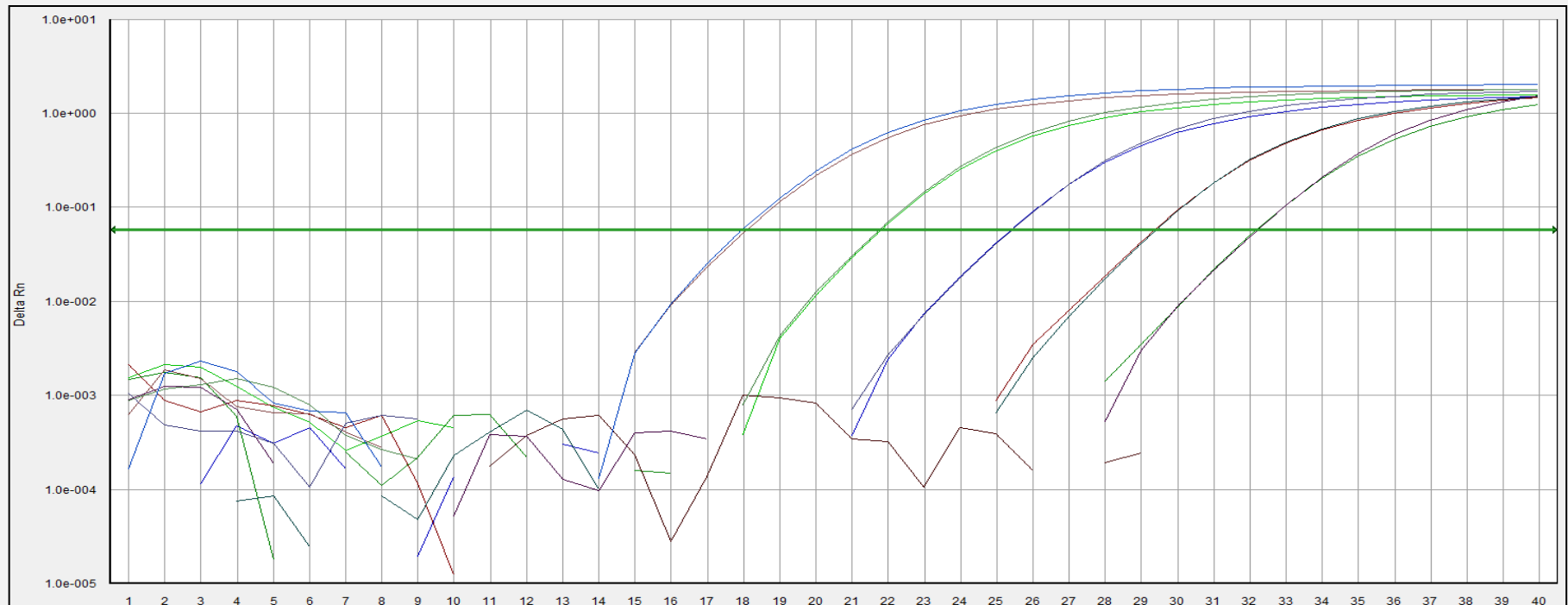
množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Amplifikační práh detekce (Ct)



Real-time Fluorescence Based PCR

Fluorescence R je zajištěna např. vazbou fluorescenčního interkalačního barviva na DNA, použitím hydrolyzační sondy atd. Fluorescence reportérového fluoroforu je normalizována vůči pasivnímu fluoroforu (Rox) - R_n . Změnu fluorescence v čase vůči pozadí udává ΔR_n . ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$).



Reportérový fluorofor

Intenzita fluorescence závisí na amplifikaci templátu během PCR

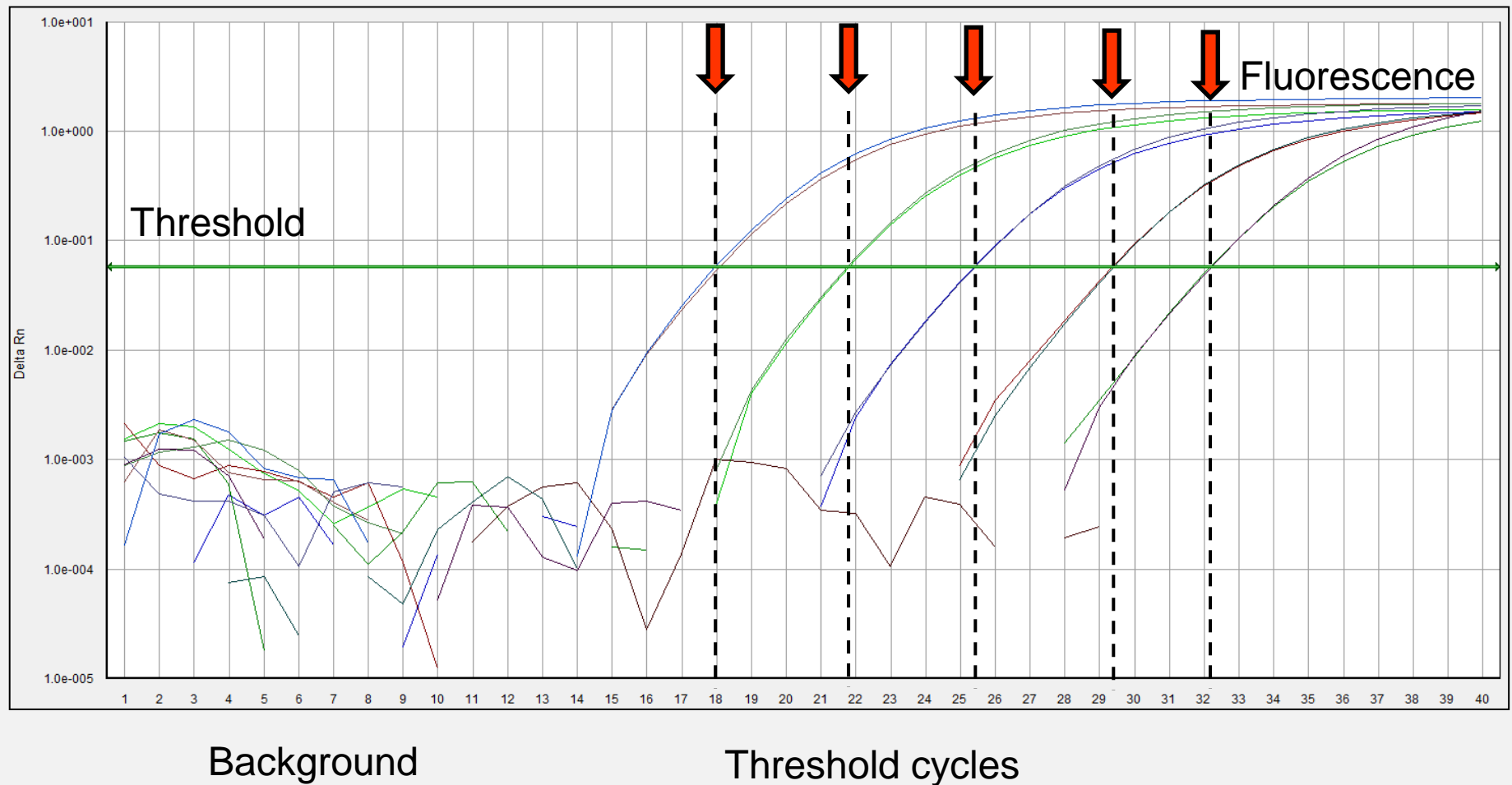
Pasivní fluorofor

Intenzita fluorescence je během PCR konstantní.

Zahrnutí fluorescence pasivního fluoroforu do výpočtu technicky zpřesňuje analýzu

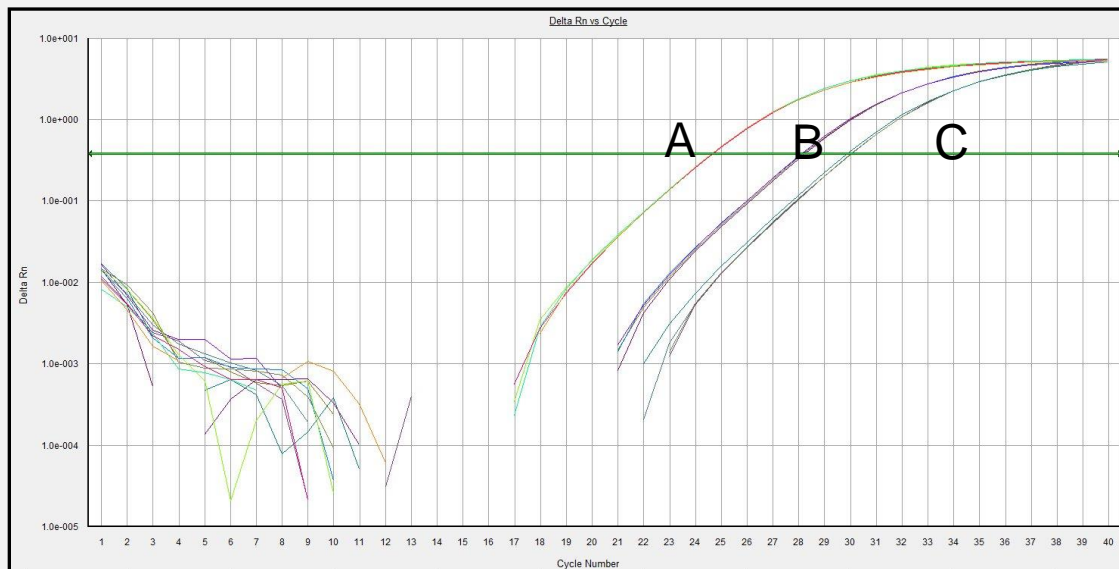
Threshold cycle „Ct“

- určený na základě hodnoty fluorescence pozadí (background) a aktuální fluorescence vzorku
- kvantitativní výstup pro každý vzorek



Threshold cycle „Ct“

- počáteční množství kopií templátu
- definovaný v exponenciální fázi PCR
- stejná účinnost PCR ve všech reakcích
- účinnost štěpení fluorogenní sondy nebo vazby fluoroforu na DNA
- citlivost detekce
- čím menší Ct - tím větší počet kopií templátu na začátku reakce



A > B > C

Threshold cycle „Ct“

- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu

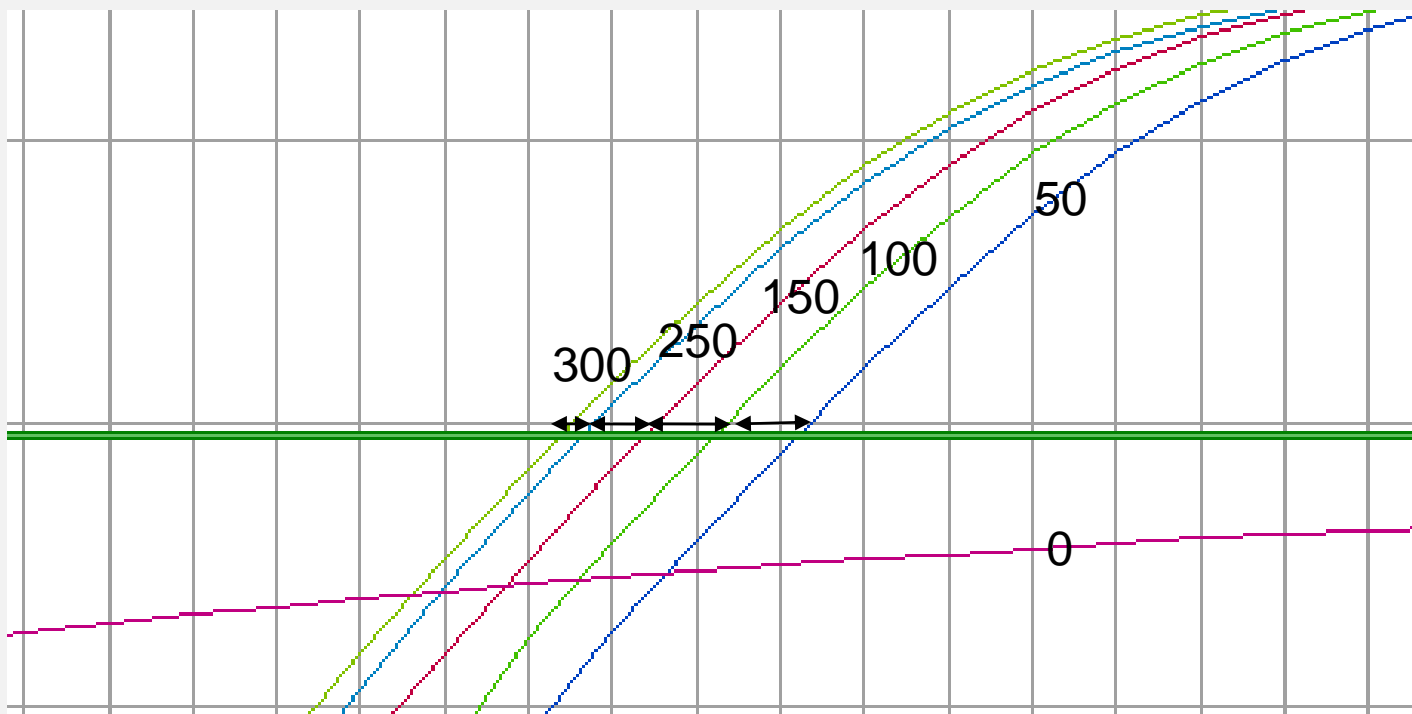
$$2^1 = 2$$

- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR)

$$2^n = 10$$

$$n=3,32$$



c [ng/μl]	Ct
50	28,16
100	27,16
150	26,66
250	26,06
300	25,66

Izolace NK

Izolace DNA a RNA

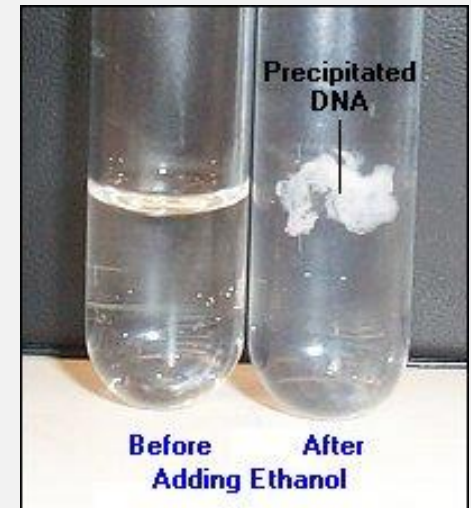
- Zisk DNA nebo RNA v dostatečném množství a čistotě
- Kvalita rozhoduje o úspěchu dalších metod
- Vliv metody na další použití

Obecné podmínky

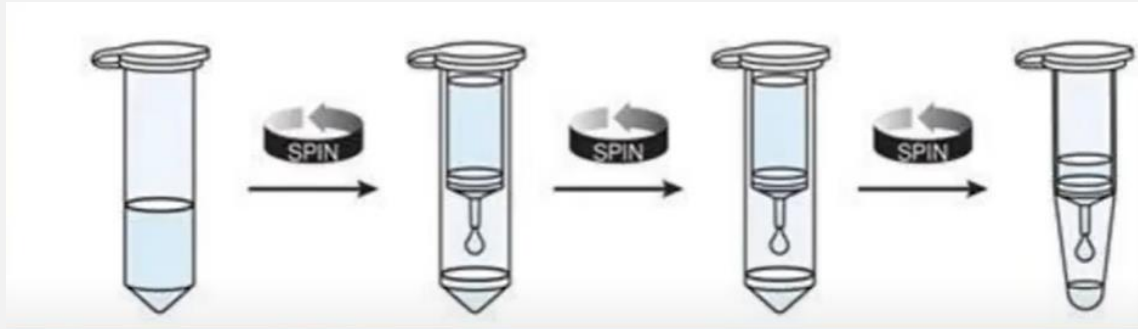
- Uvolnění NK z buněk/tkání
 - Detergenty
- Očištění od kontaminantů
 - Enzymaticky (chceme RNA → odstraníme DNA pomocí deoxyribonukleázy)
- Celou dobu nutné zabránit degradaci NK, kterou chceme izolovat
 - Inaktivace nukleáz (ribonukleáza u RNA)
 - Optimální teplota a pH

Typy metod

- Extrakční/precipitační metody
 - Využívají **rozdílné rozpustnosti**
 - Fenol-chloroformová extrakce
 - Fenol = organické rozpouštědlo
 - Po centrifugaci proteiny v organické fázi, denaturované proteiny a zbytky buněk v mezifázi, NK ve vodné fázi
 - Ethanolová precipitace
 - Po přidání ethanolu k vodné fázi se NK vysráží
- Adsorpční metody
 - Využívají schopnosti NK **adsorbovat na silikátový povrch**
 - Komerční izolační soupravy (kolonky)
- Další (např. magnetická separace)



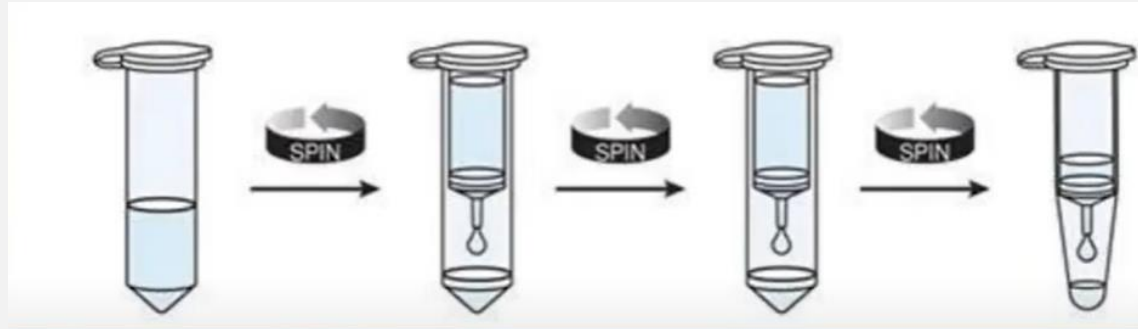
Adsorpční metoda izolace NK



1. Lýze

- Lýze buněk → uvolnění NK
- Detergenty – narušují membránu buněk
- Enzymy – degraduje proteiny a nukleázy

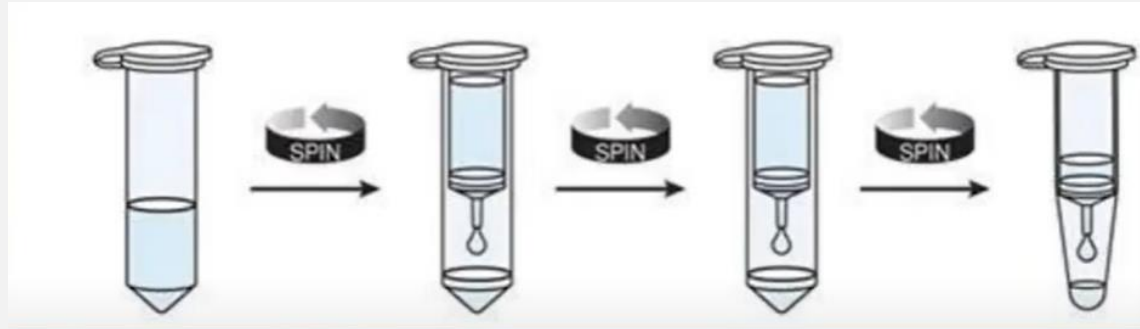
Adsorpční metoda izolace NK



1. Lýze 2. Navázání NK

- Navázání NK na silikagel
- Pufr s chaotropními solemi – v jejich prostředí narušena vazba molekul vody na silikát → místo vody se váží NK
- Ethanol – podporuje navázání (dehydratace silikagelu)

Adsorpční metoda izolace NK



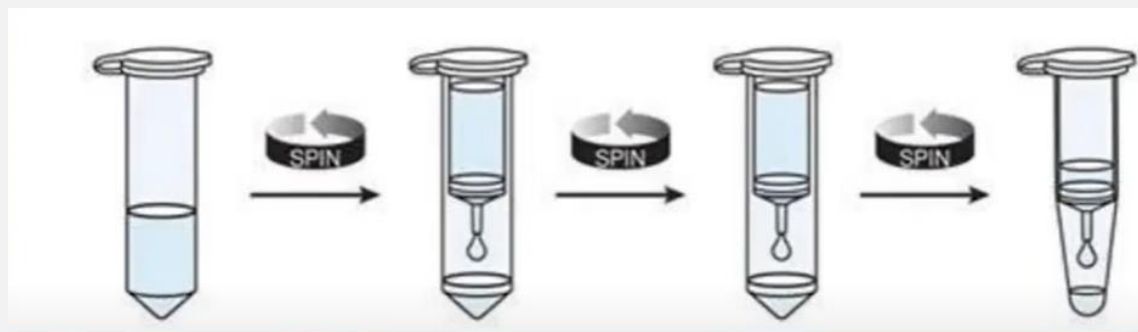
1. Lýze

2. Navázání NK

3. **Promývání**

- Zbavení se nečistot
- Pufř s chaotropními solemi → odstraní proteiny
- Ethanol → odstraní soli

Adsorpční metoda izolace NK



1. Lýze 2. Navázání NK 3. Promývání **4. Eluce**

- Eluce DNA ze silikagelu
- Pufř (voda bez nukleáz)

Izolace DNA

- Izolace nebuněčné cfDNA
 - QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)
 - Ze séra (plazmy)
- Izolace DNA z buněk
 - QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- Izolace DNA z malých množství buněk
 - QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)

Izolace RNA

- Izolace celkové RNA
 - RNeasy Mini Kit (Qiagen)
 - Materiál: buňky, tkáně

Izolace miRNA

- Izolace celkové RNA obohacené o krátké RNA
 - Ze séra
 - miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)
 - Z buněk a tkání
 - miRNeasy Mini Kit (Qiagen)
 - miRNeasy Micro Kit (Qiagen) – z malých množství

Izolační kolonky

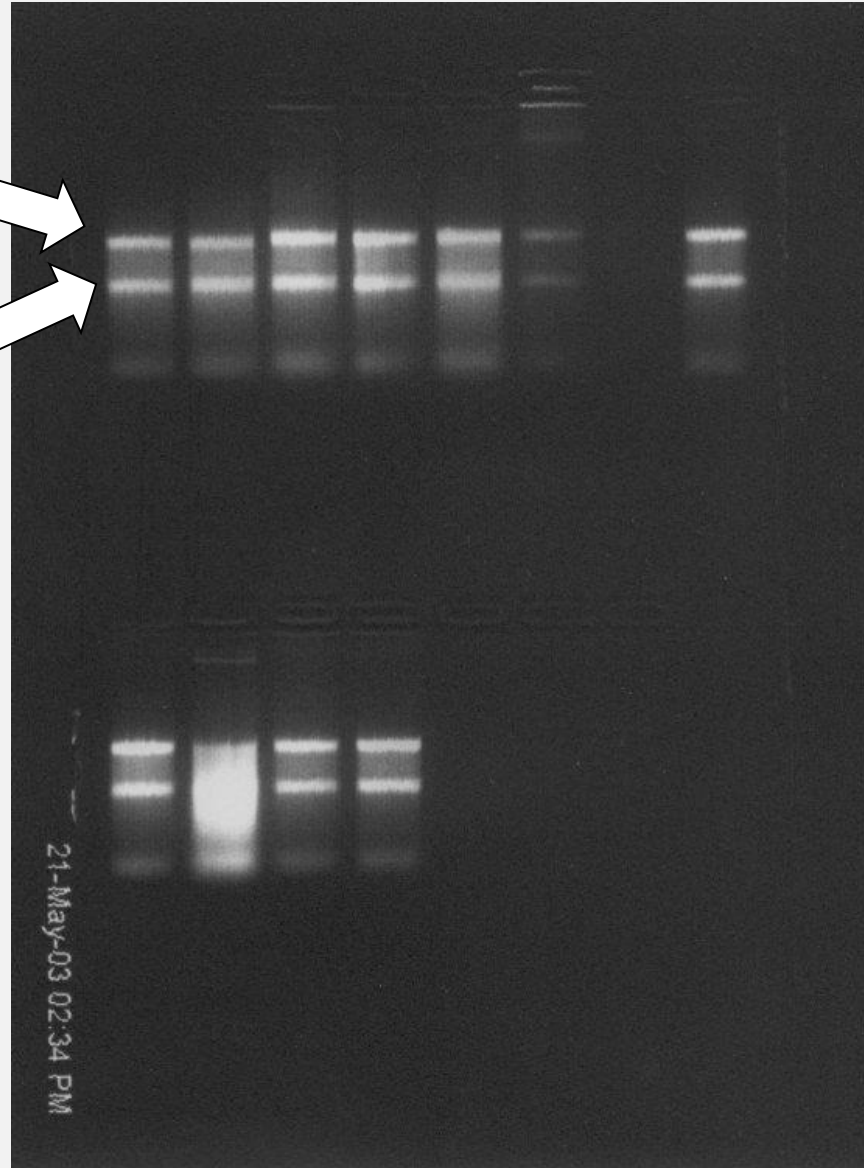


Izolace RNA

28S



18S

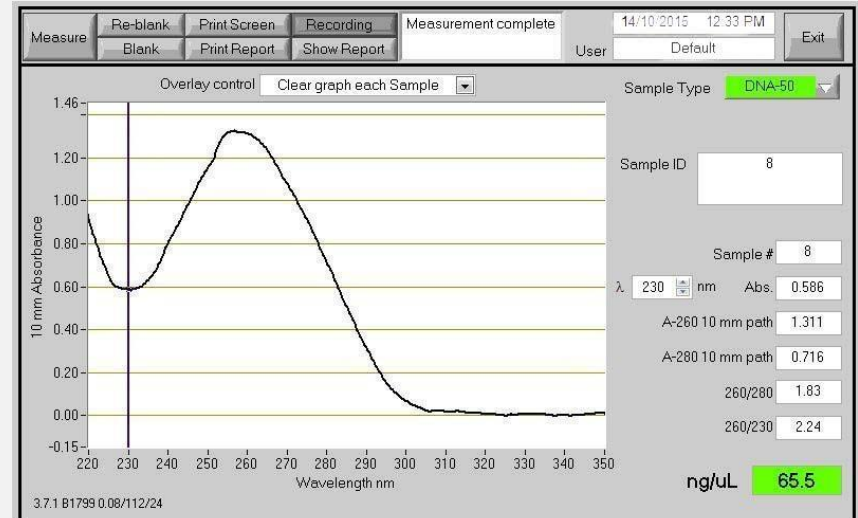


Kvantifikace NK

- Nanodrop
- Qubit
- Tape station

Kvantifikace NK - nanodrop

- Kvantifikace DNA, RNA, proteinů
- Měří 0,5-2ul vzorku
- Od 5ng/ul do 3000 ng/ul
- 260/280nm
- 260/230 nm

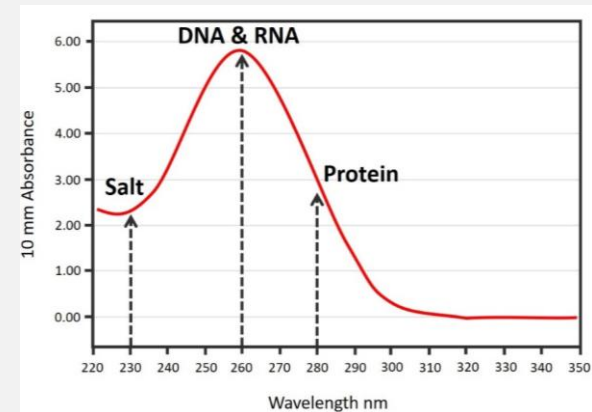


Nanodrop

- Spektrofotometr – absorpce UV záření
- Stanovení koncentrace a čistoty
- Čím vyšší koncentrace, tím více světla vzorek absorbuje
- Měří absorbanci
 - A_{260} – nukleové kyseliny, A_{280} – proteiny, A_{230} – fenol, chaotropní soli
 - $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$
 - $A_{260}/A_{230} > 2,0$
- Koncentrace DNA 1,0 \approx 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RNA 1,0 \approx 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$



NanoDrop 1000 Spectrophotometer



Nanodrop

- Výhody
 - Jednoduché použití
 - Stanovení čistoty - nejen koncentrace
 - Identifikace kontaminace
- Nevýhody
 - Měření absorpance není selektivní
 - Nepřesné při nízkých koncentracích

Qubit

- Detekce fluorescence
- Stanovení koncentrace
- Využívají se standardy k vytvoření kalibrační křivky



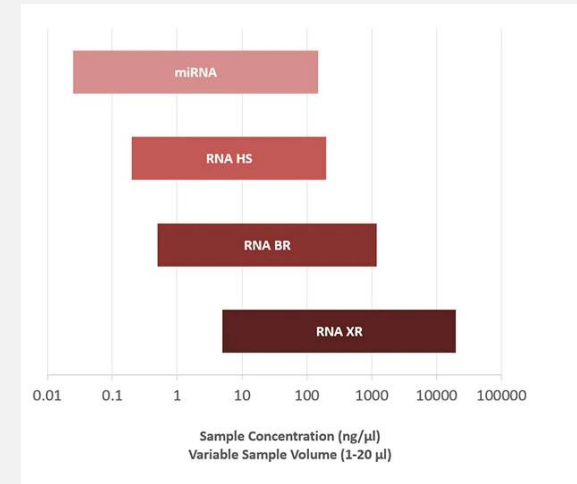
Qubit 4 Fluorometer

Qubit - kity



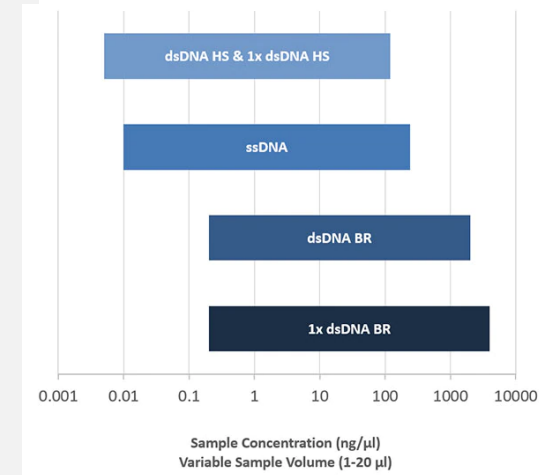
RNA

Assay Kit	Initial sample concentration
Qubit RNA HS Assay Kit	0,25 - 100 ng/μL
Qubit RNA BR Assay Kit	1 - 1000 ng/μL
Qubit RNA XR Assay Kit	10 - 10000 ng/μL
Qubit microRNA Assay Kit	0,05 - 100 ng/μL



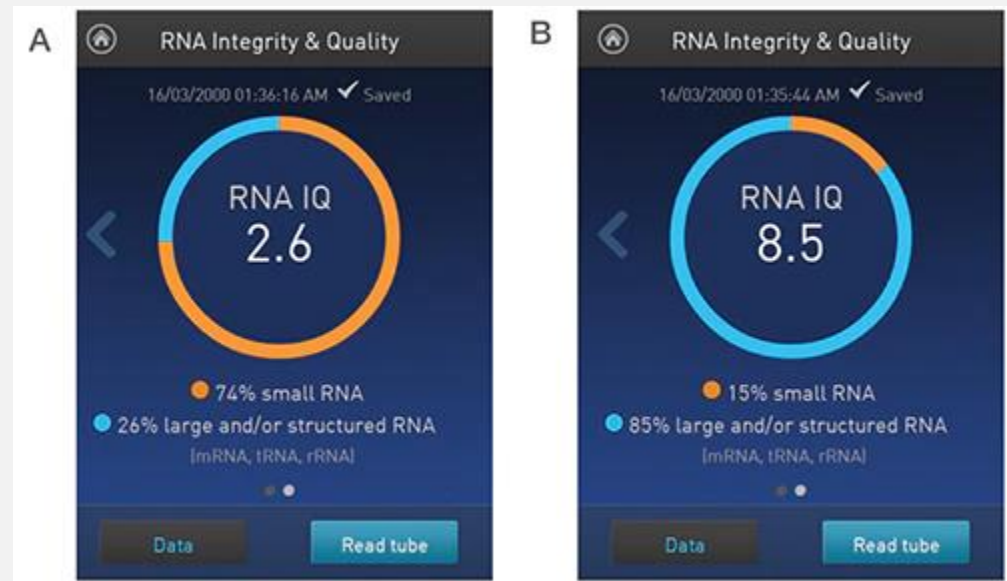
DNA

Assay Kit	Initial sample concentration
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	0,005 - 120 ng/μL
Qubit dsDNA HS Assay Kit	0,005 - 120 ng/μL
Qubit 1X dsDNA BR Assay Kit	0,2 - 4000 ng/μL
Qubit dsDNA BR Assay Kit	0,2 - 2000 ng/μL
Qubit ssDNA Assay Kit	0,05 - 200 ng/μL



Qubit - kity

- Qubit RNA IQ Assay
 - Integrita RNA
 - Dvě barviva
 - RNA IQ: hodnoty 1 - 10



Qubit

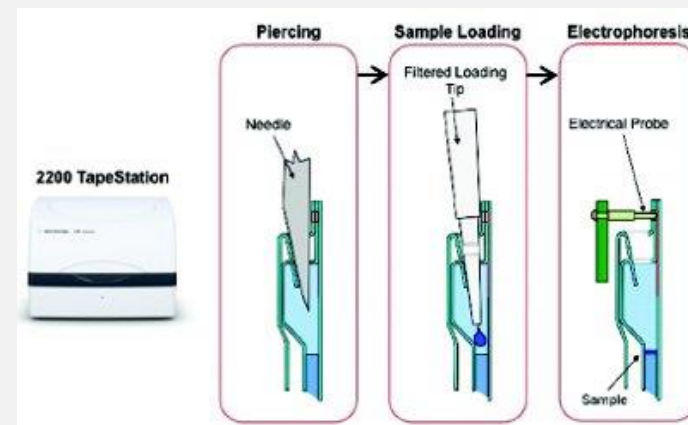
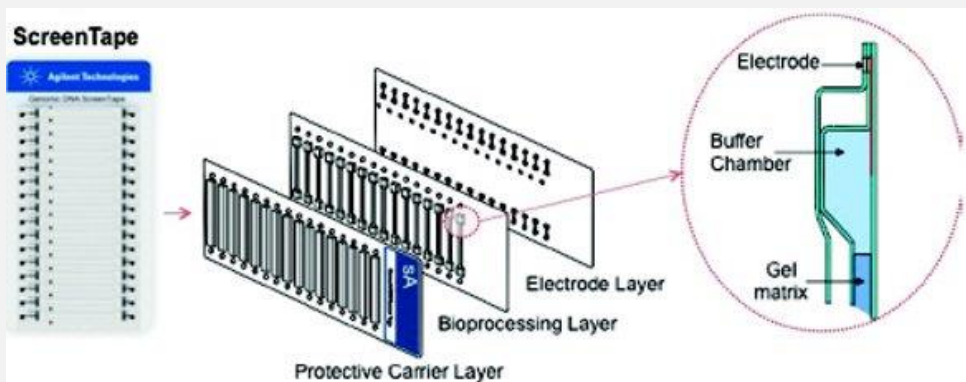
- Výhody
 - Dokáže měřit i nepatrné koncentrace
 - Přesnější - kontaminace neovlivňují koncentraci
 - Barviva se vážou selektivně
- Nevýhody
 - Neměří čistotu
 - Delší doba přípravy

Tapestation

- Založen na kapilární elektroforéze
- Kontrola kvality vzorků – koncentrace, velikost, integrita
- ScreenTape



Agilent 2200
TapeStation



Tapestation - kity

RNA

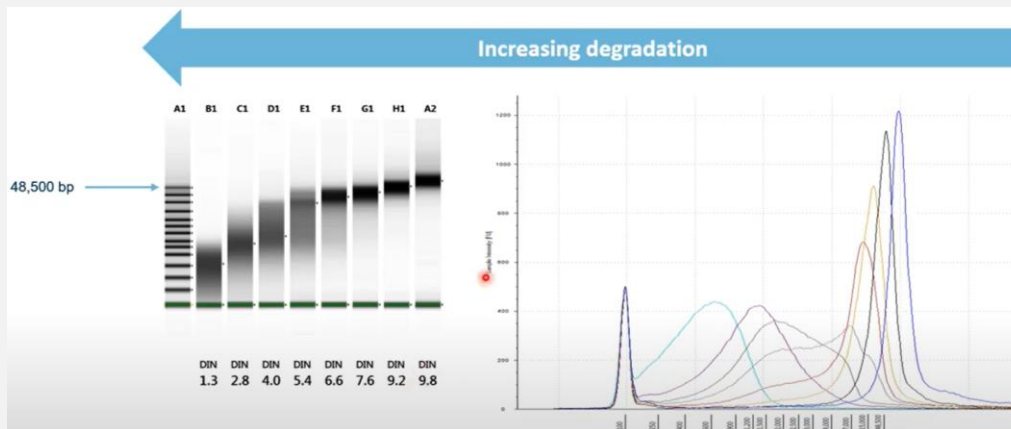
Assay kit	Organism	Concentration range	Loading volume
RNA	Eukaryote or Prokaryote	25 - 500 ng/ μ l	1 μ l
High Sensitivity RNA	Eukaryote or Prokaryote	0,5 - 10 ng/ μ l	2 μ l

DNA

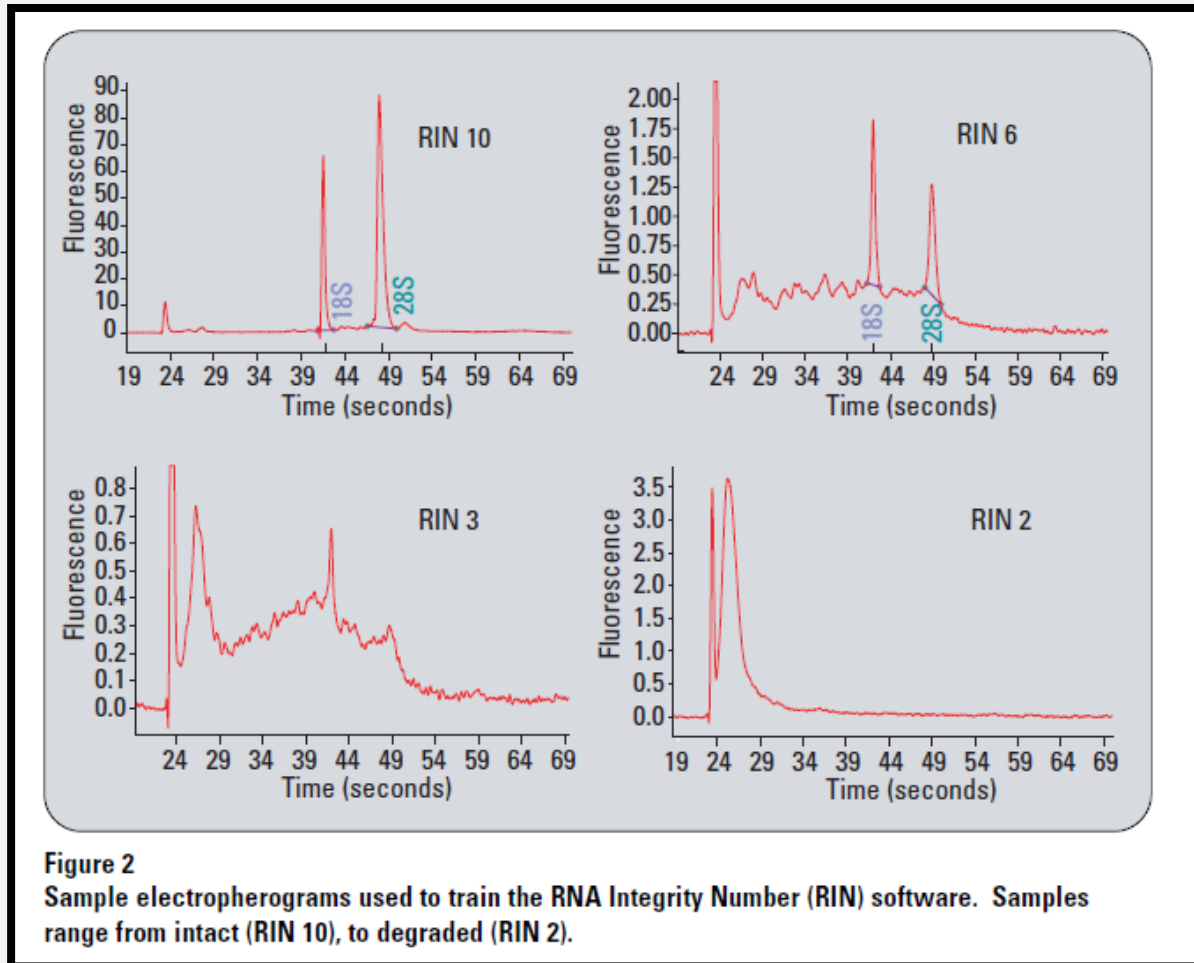
Assay kit	Size range	Concentration range	Loading volume
D1000	35 - 1000 bp	0,1 - 50 ng/ μ l	1 μ l
High Sensitivity D1000	35 - 1000 bp	0,01 - 1 ng/ μ l	2 μ l
D5000	100 - 5000 bp	0,1 - 50 ng/ μ l	1 μ l
High Sensitivity D5000	100 - 5000 bp	0,01 - 1 ng/ μ l	2 μ l
Genomic DNA	200 - >60000 bp	10 - 100 ng/ μ l	1 μ l

Tapestation

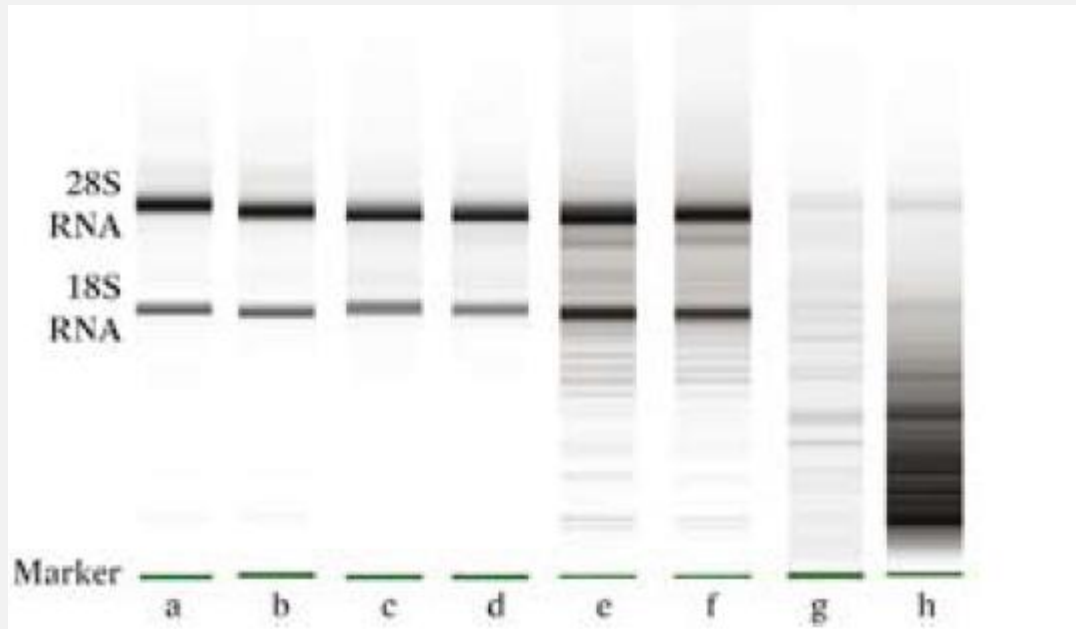
- DNA integrity number (DIN)
- RNA integrity number equivalent (RIN^E)
 - Stupeň degradace
 - Hodnoty 1 (nejvíce degradována) – 10 (intaktní)
- Koncentrace - srovnání se známou koncentrací



RIN



Integrita RNA



Založena na poměru dvou ribozomálních RNA – 18S a 28S
Tyto RNA přibližně 85% celkové RNA

Čistota

- 260/280 nm – 1,8 čistá DNA, 2,0 čistá RNA (nižší – proteiny, fenol)
- 260/230 nm – 2-2,2 (EDTA, fenol)
- Záleží na koncentraci – pokud moc nízká, čistota nebude dobrá
- Cut-off pro vzorky

Manipulace s NK

- RNA velice nestabilní, pracovat na ledu, okamžitě zamrazit
- Stabilita v -80C cca 1 rok – lepší skladovat cDNA
- DNA poměrně stabilní
- Co udělá UV s NK?

Faktory ovlivňující qPCR

Koncentrace Mg^{II+} (Mn^{II+})

- Kritický faktor pro DNA polymerázy

- Např. Tth (*Thermus thermophilus* HB-8) Mn^{II+} (3-6mM)

Taq (*Thermus aquaticus*) Mg^{II+} (3-4mM)

- Některé polymerázy preferují určitou formu Mg^{II+} , $MgCl_2$, $MgSO_4$

Koncentrace primerů

-obvykle 100-900nM

- ne vždy poskytuje ekvimolární koncentrace nejlepší výsledek

Koncentrace sondy

- obvykle 100-400nM

- volba sondy podle typu analýzy a žádaného výstupu (genová exprese, SNP, absolutní kvantifikace...)

DNA polymerázy

- Vyžadují 3'OH primer
- Teplotní stabilita - nejvyšší katalytická účinnost mezi 70-80°C
- Výrazná ztráta aktivity při nižších teplotách
- např. Taq při 37°C má pouze 10% své normální aktivity
- *Fidelity*, maximální amplifikovatelná délka ampliconu
- bakteriální Taq *Thermus aquaticus*
- nízká *fidelity* - absence 3' > 5' exonukleázové aktivity (proofreading)
- Archeální enzymy
- *Thermococcus* sp. (*T. gorgonarius*, *litolaris*, *kodakaraensis*)
- *Tgo*, *Vent*, *Pfx*
- *Pyrococcus* sp. (*P. furiosus*)
- *Pfu*



DNA polymerázy a PCR

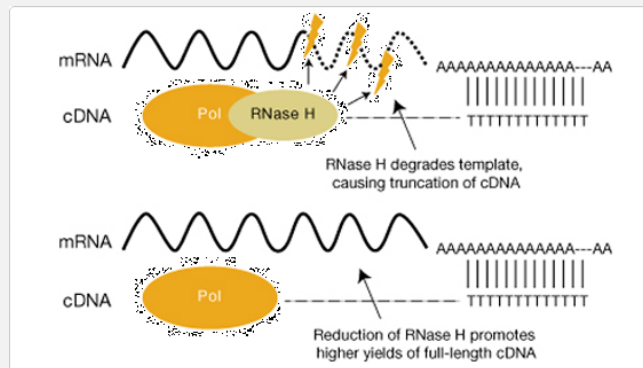
Jméno	3'>5' Exoaktivita	Zdroj	Poznámka
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 1,6 hod.
Pfu	+	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nejmenší error-rate
Vent (Tli)	+	<i>Thermococcus litoralis</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 7 hod.

- Zajištění 3' > 5' exonukleázové aktivity zvyšuje specifitu reakce
- Některé aplikace (TaqMan) vyžadují 5' > 3' exonukleázovou aktivitu polymerázy (odbourání sondy, in vivo RNA primerů při syntéze Okazakiho fragmentů), jiné aplikace (molekulární majáky, scorpions) naopak vyžadují polymerázy bez nukleázové aktivity

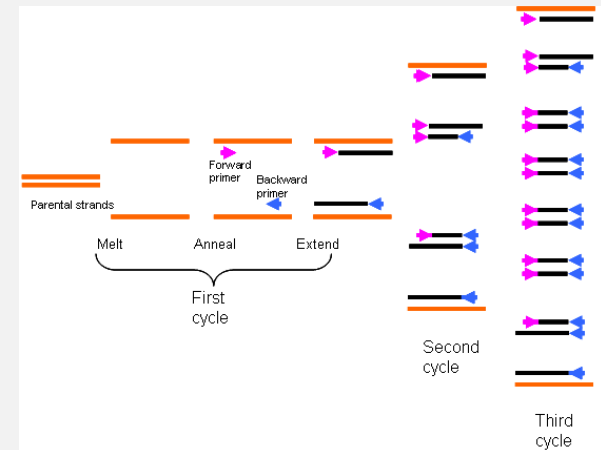
RT PCR Reverse Transcription PCR

- dvě na sebe navazující enzymatické reakce

Reverzní transkripce



PCR

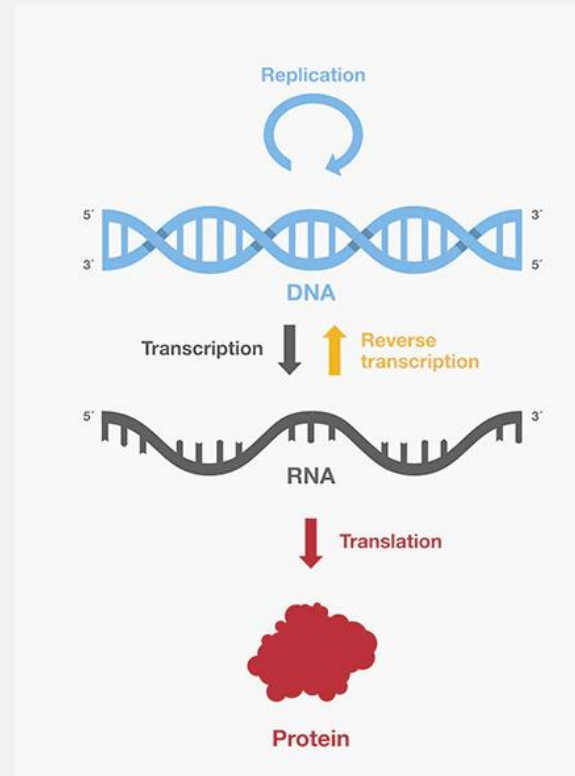


- mnohonásobně citlivější než např. northern/dot blot, RNase /S1 protection assays, nebo ISH

- exprese mRNA, detekce a kvantifikace virů atd.

Reverzní transkripce

- Narušila centrální dogma molekulární biologie
- Reverzní transkriptázy



Nobelova cena za fyziologii a lékařství, 1975

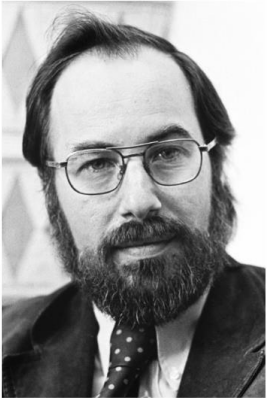


Photo from the Nobel
Foundation archive.
David Baltimore
Prize share: 1/3



Photo from the Nobel
Foundation archive.
Renato Dulbecco
Prize share: 1/3



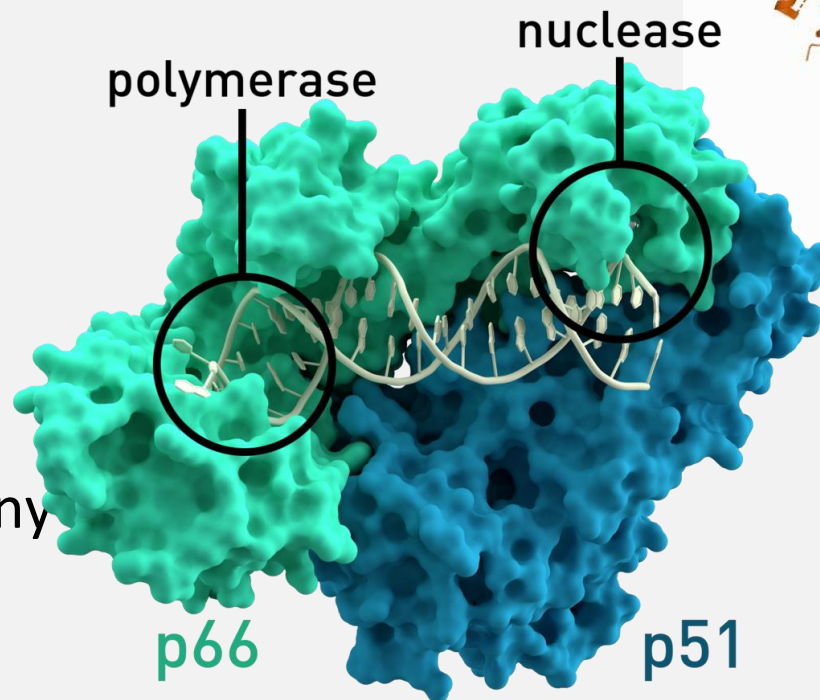
Photo from the Nobel
Foundation archive.
Howard Martin Temin
Prize share: 1/3

- **D. Baltimore** – zkoumal 2 onkogenní viry-virus myší leukémie a virus Rousova sarkomu, objevil reverz. transkriptázu a retroviry
- **H. Temin** – zkoumal virus Rousova sarkomu, popsal reverzní transkripci a izoloval reverz. transkriptázu
- **R. Dulbecco** – zkoumal onkoviry, učil H. Temina



Využití a výskyt

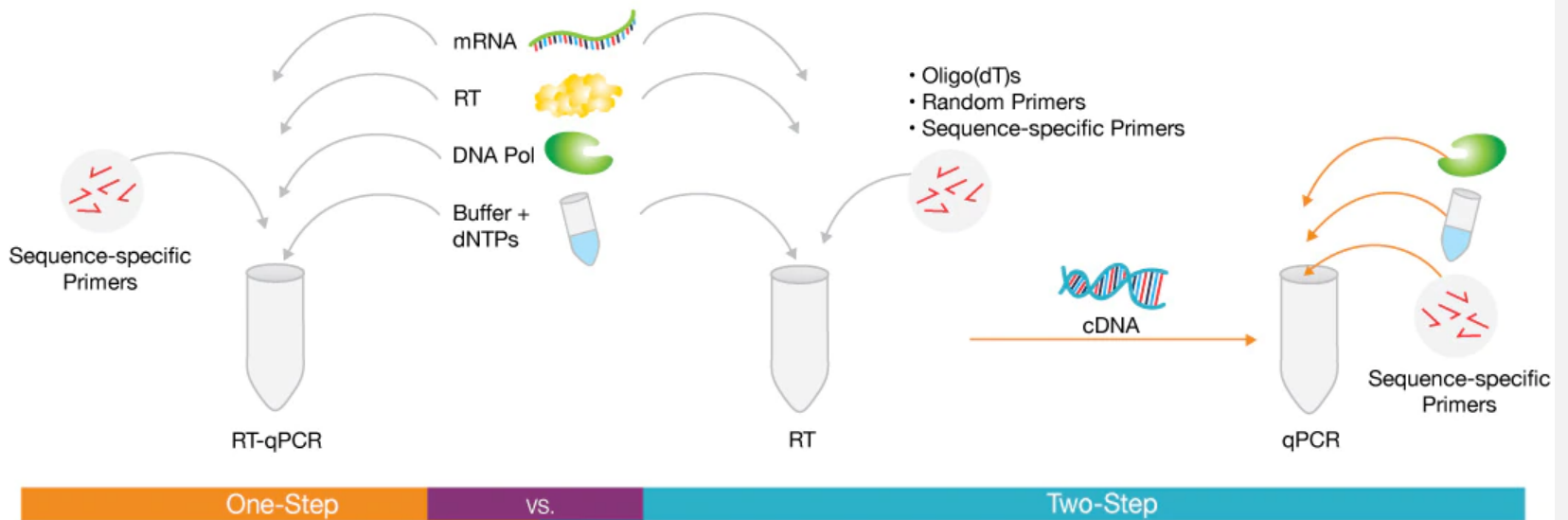
- Studium RNA
 - cDNA knihovny
 - RT-qPCR
- Viry
- Bakterie
- Živočichové a rostliny

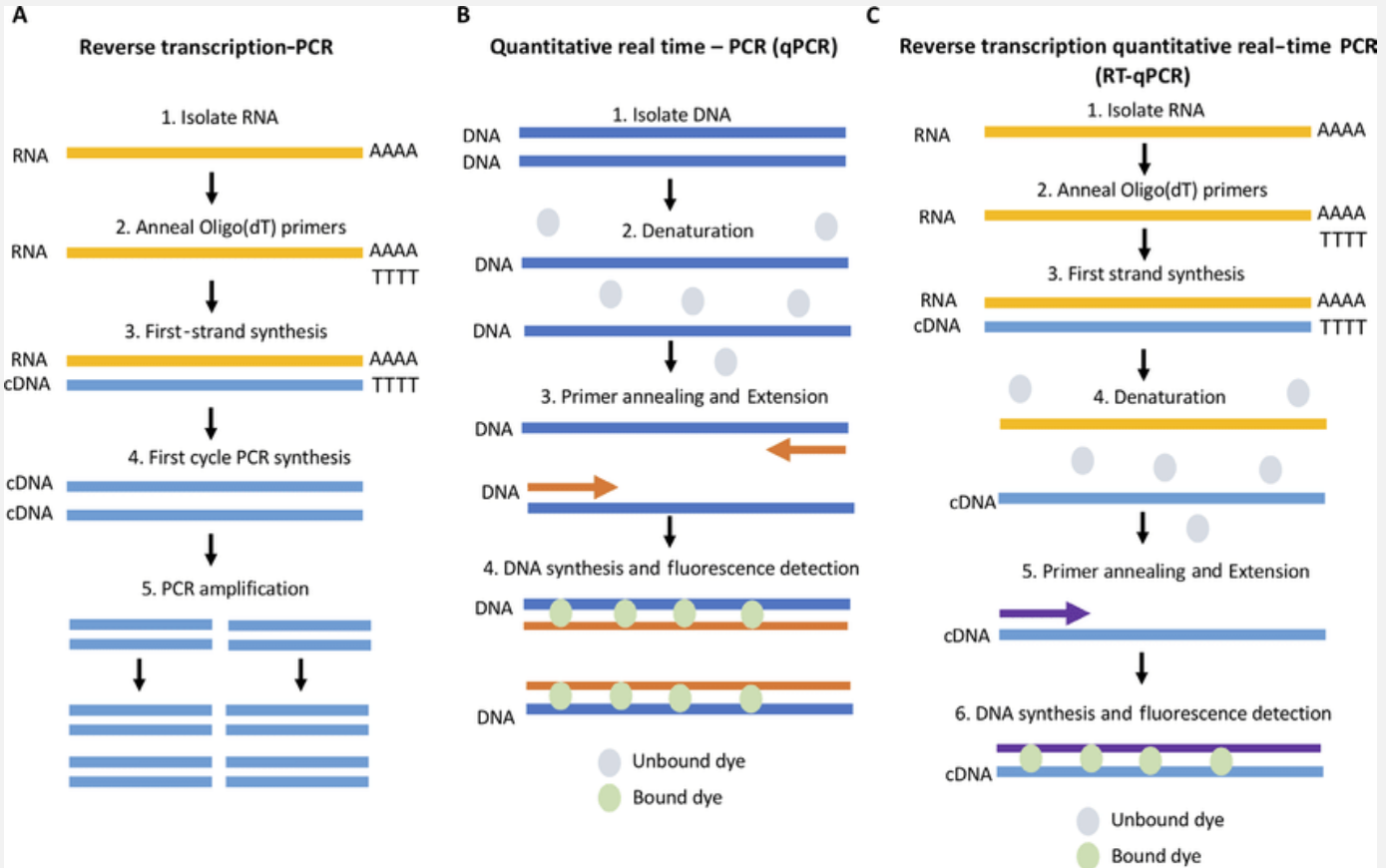


RT viru HIV



RT-qPCR





cDNA knihovny

- Studium RNA – porozumění aktivně exprimovaným genům a jejich funkcím
- cDNA jako templát pro microarraye a sekvenování
- Reprodukce genetické informace bez nekódujících oblastí
- Exprese eukaryotických genů v prokaryotických organismech
- Funkční klonování pro identifikaci genů na základě proteinu

High-Capacity cDNA Reverse Transcription

- Schéma náhodných primerů
- mRNA a rRNA
- 20 ng - 2 µg RNA
- ss cDNA vhodná ke qPCR i krátkodobému či dlouhodobému uskladnění



TaqMan Advanced miRNA Assays



- 1 – 10 ng RNA nebo 2 μ l plazmy či séra
- Specifita-jen zralé miRNA a rozlišuje mezi homologními miRNA
- Senzitivita-60 kopií vložené miRNA



	TaqMan miRNA	TaqMan Advanced miRNA
RT chemistry	miRNA- specific RT	Universal RT
Throughput	Best for 1-10 targets	Best for > 10 targets
Coverage	205 species available, coverage for miRbase v.21	Focused on human miRNAs; coverage for miRbase v.21



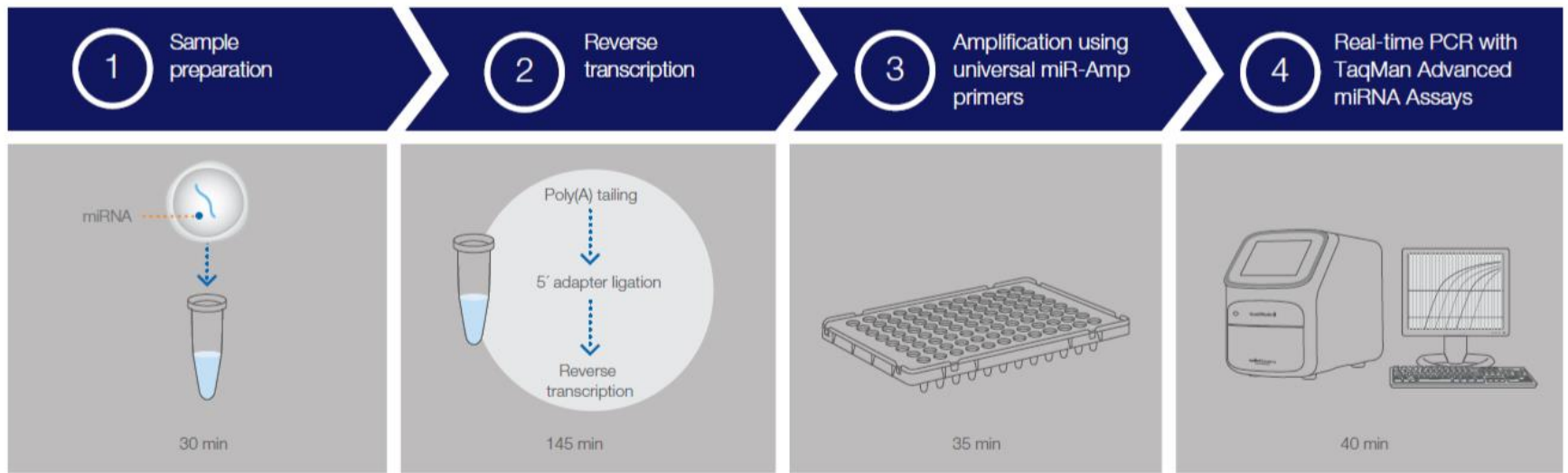
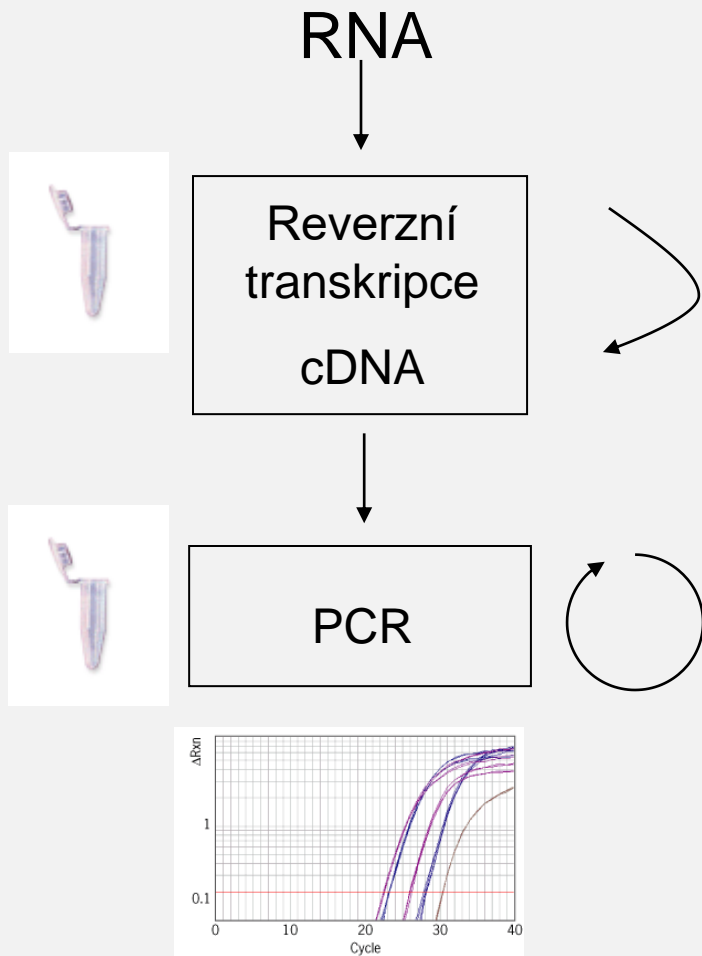


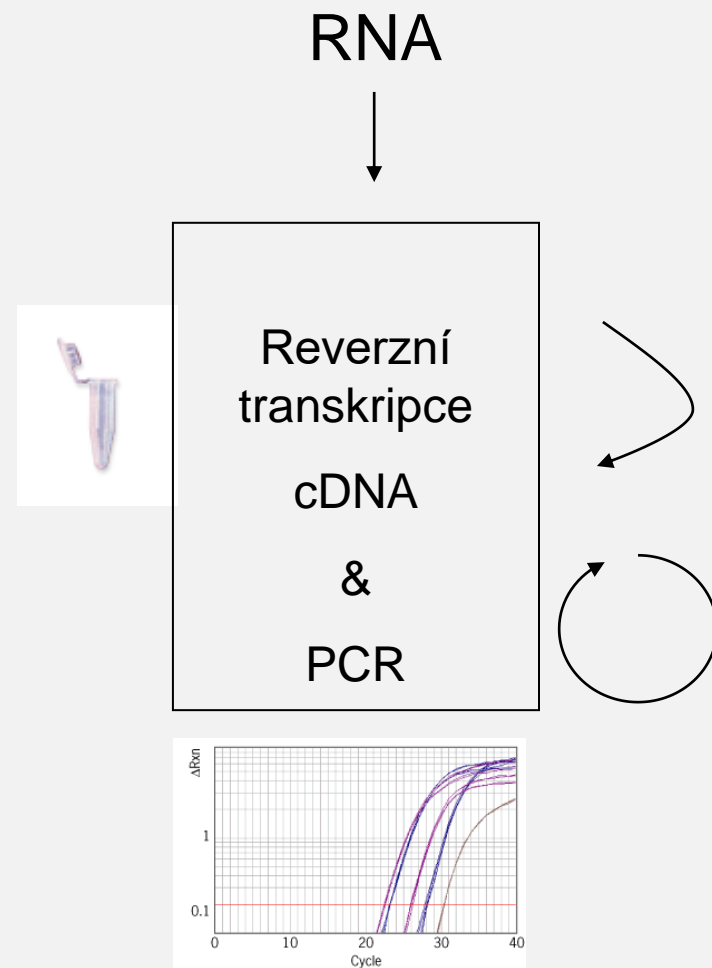
Figure 1. The TaqMan Advanced miRNA Assay workflow.

<https://www.youtube.com/watch?v=bsYQowakt0E>

„two step“ RT-PCR



„one step“ RT-PCR



One step or two step PCR?

One tube/two enzymes			Two tubes/two enzymes		
Feature	Advantages	Disadvantages	Feature	Advantages	Disadvantages
Reduced hands-on time	Fewer errors More rapid Higher throughput		Dedicated enzymes	Separate optimisation enhanced sensitivity	More pipetting errors
Less pipetting	Fewer errors		Multiple priming options	Separate cDNA pool Multiple targets	
Reagents added at start	Less contamination	No separate optimization	cDNA synthesis	Safer long term storage	
Higher temperature	Higher specificity	Target specific priming only			

Reverzní transkripce

- templát polyribonukleotidy i polydeoxyribonukleotidy
- syntéza DNA na základě RNA templátu - tzv. RDDP nebo DDDP aktivita (RNA/DNA directed DNA polymerase)
- replikace retrovirů (HIV)

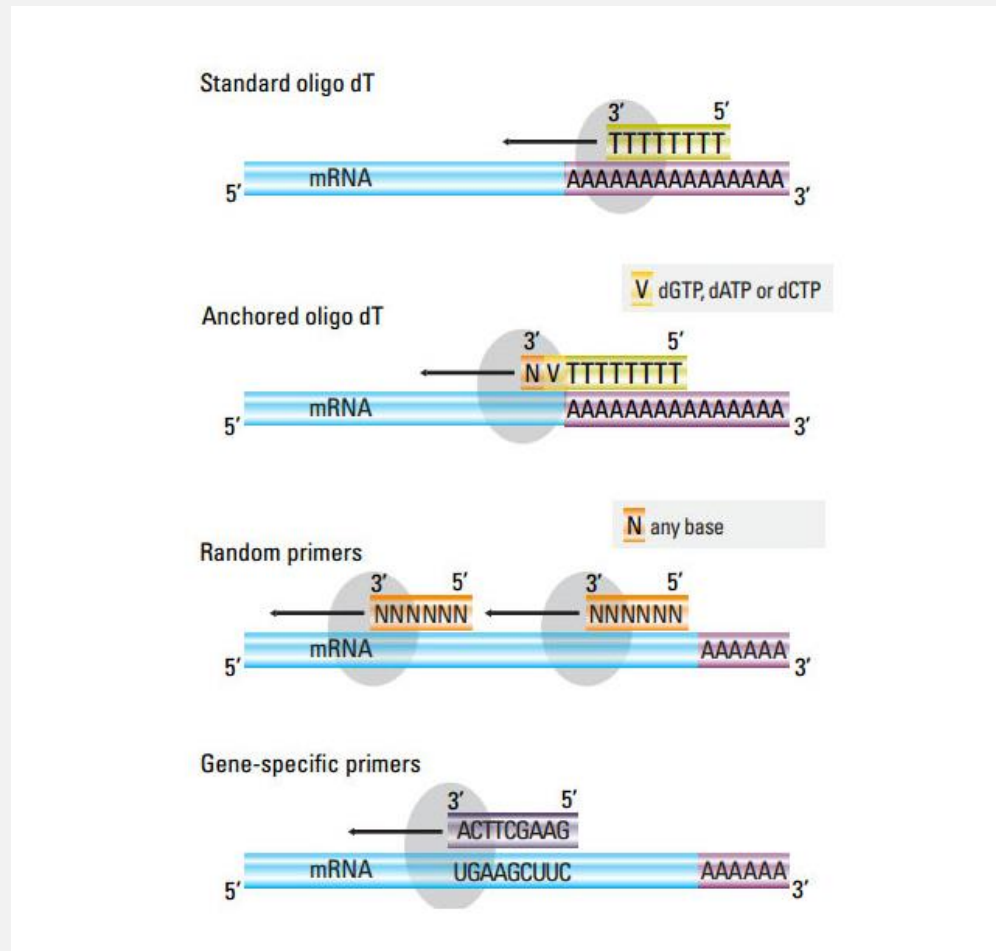
Průběh RT

1. RDDP syntéza DNA řetězce podle RNA templátu
2. odbourání RNA, RNase H
3. DDDP syntéza druhého DNA řetězce

Primery

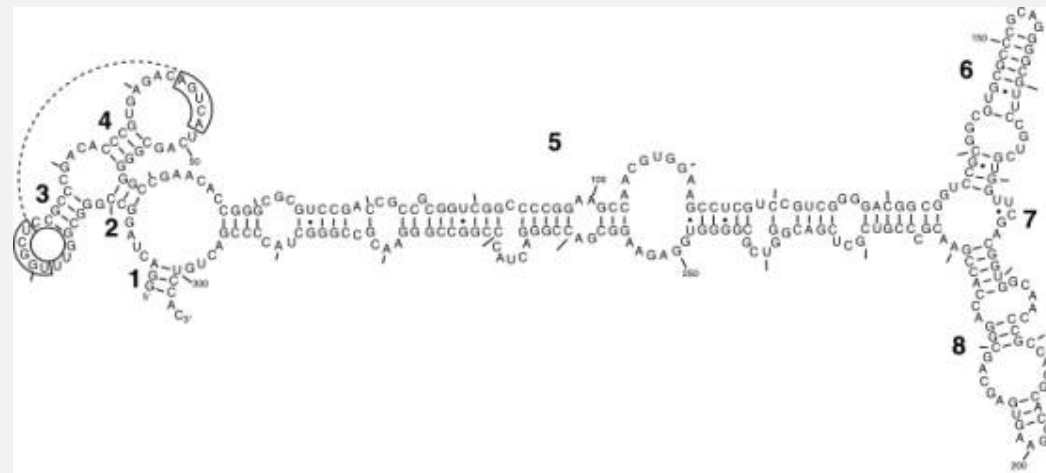
- endogenní náhodný priming – nežádoucí variabilita v PCR
- náhodné primery (hexamery, oktamery, dekamery)
 - převažující frakce cDNA – rRNA, problematická determinace low copy targets
 - nadhodnocuje množství mRNA vůči specifickým primerům
- oligo dT
 - poly A mRNA TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
NNNNNNNNNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 - histony nebo virové geny postrádají poly A
 - nutná RNA o vysoké kvalitě (nefragmentovaná)
- specifické primery
 - nejvhodnější pro kvantifikaci
 - separátní reakce pro jednotlivé stanovované sekvence

Primery pro RT



Reverzní transkriptázy

- vysoké procento chyb (nemají proofreading)
- citlivost k sekundárním strukturám
 - způsobí terminaci polymerace nebo vynechání úseku sekundární struktury
- vysoká procesivita v případě malých amplikonů - krátké molekuly cDNA
- optimální reakční teplota 50-55°C
- dvojmocné ionty, Mn^{II+} , Mg^{II+}



Aditiva

- optimalizace účinnosti RT
- mechanismus nejasný, pravděpodobně ovlivňují termostabilitu enzymu nebo tvorbu sekundárních struktur templátu
- různé výsledky s různými enzymy a reakčními podmínkami

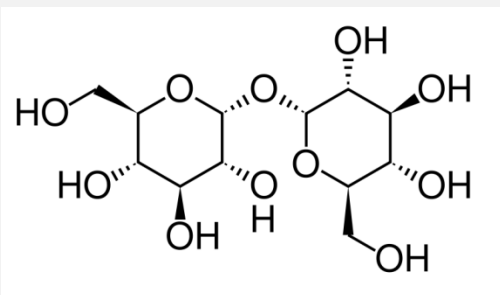
Trehalóza

0,6M/15% glycerol - brání tepelné inaktivaci enzymu

Zvyšuje enzymatickou aktivitu MMLV-RT při 60°C

Úspěšná syntéza řetězců o délce 10kb

Zvýšení specifiky odT primerů (Superscript II)



Betain (trimethylglycerin)

Osmoprotektant

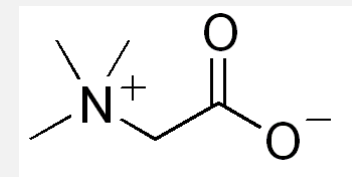
Stabilizace AT párů

Snížení termostability GC párů – snížení T_m

Kombinace 2M betainu a 0,6M trehalózy

Závislost na templázu a ampliconu

Optimalizace



RNáza H

degradace duplexu cDNA/RNA

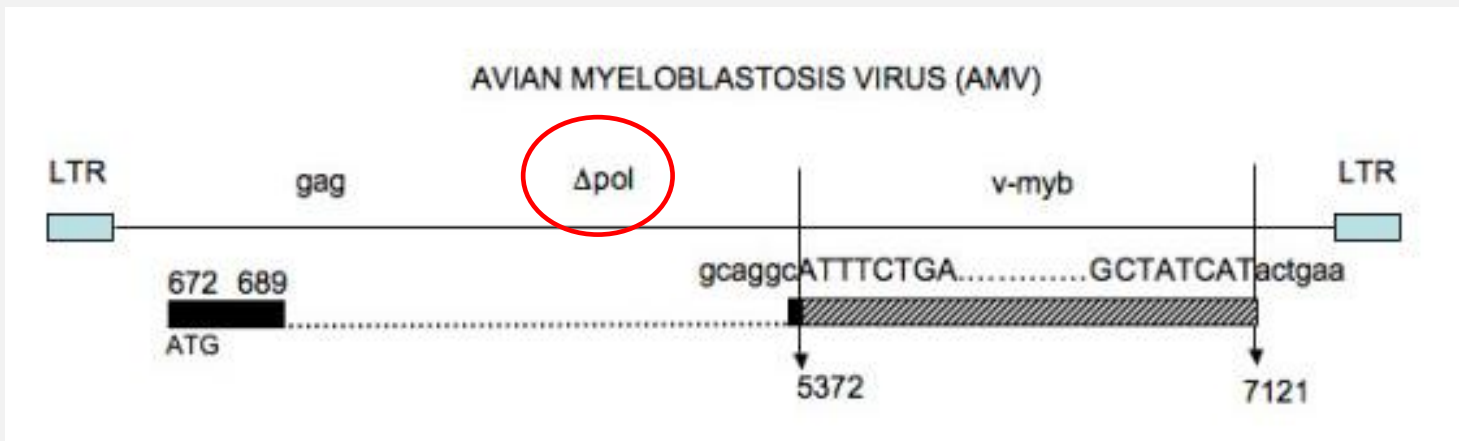
Kompetuje se syntetickou aktivitou RT (Degradace duplexu DNA primer/RNA proběhne s větší pravděpodobností než extenze řetězce)
= snížený výtěžek cDNA

Ale:

- neodbouraná RNA může omezovat hybridizaci primerů a snižuje citlivost PCR
- PCR primery mohou být zbytkovou RNA vyvázány

AMV RT (Avian myeloblastosis virus)

- Syntéza DNA z DNA nebo RNA templátu
- DNA primery, oktamery a delší jsou efektivnější než hexamery
- Nekompetetivně inhibovaná tRNA
- Optimální reakční teplota 42°C
- Modulární enzym
- *Thermoscript* (Invitrogen) – vyšší teplotní stabilita (65°C), redukovaná aktivita RNázy H (tvorba cDNA knihoven)
- Četnost chyb $4,9 \times 10^{-4}$



MMLV RT (Moloney murine leukemia virus)

- Nižší aktivita RNázy H než v případě AMV-RT
- Termolabilní, optimum 37°C
- DNA i RNA primery, DNA primery 9-15bp vhodnější
- Modulární enzym
- Modifikované MMLV RT (redukce aktivity RNázy H, termostabilita)
 - *Superscript II* (Invitrogen), *Powerscript* (Clontech)
- Mg^{II+} - syntéza dlouhých cDNA



DNA polymerázy s RT aktivitou

Tth (*Thermus thermophilus*), **Tfl** (*T. flavus*), **BcaBEST** (*Bacillus caldotenax*) -Takara

RDDP i DDDP aktivita

Vyšší termostabilita než RT

Vysoká četnost chyb (nemají 3' - 5' exonukleázovou aktivitu)

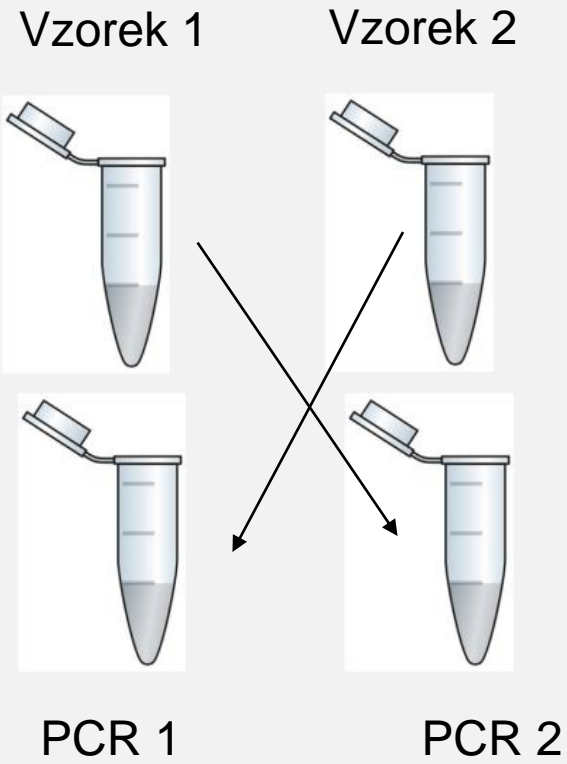
C. therm polymerase (Roche)

Klenowův fragment z *Carboxydotherrnus hydrogenoformus*

Vysoká teplotní stabilita a přesnost syntézy

(četnost chyb poloviční ve srovnání s Tth)

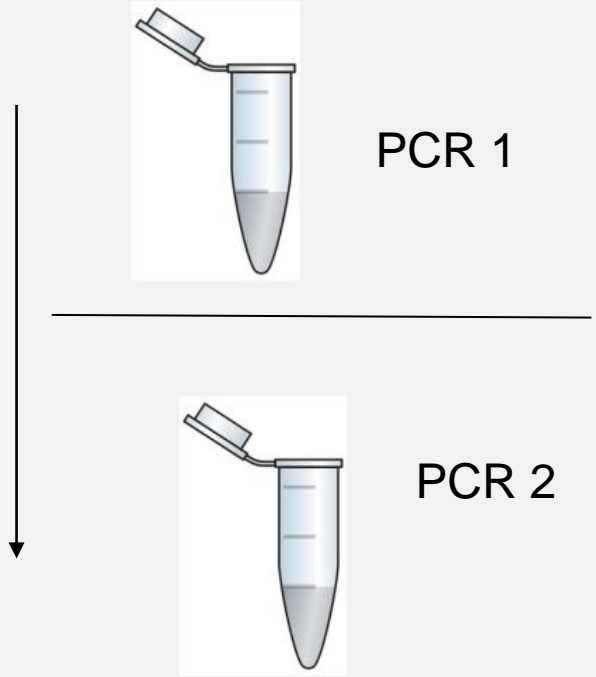
Cross contamination



Vzájemná
kontaminace
vzorků

Přenos amplikonu
do dalších PCR

Carry-over contamination



Jak předejít kontaminaci

- Správná laboratorní praxe
- Plastik v RNA kvalitě
- Automatizace



×

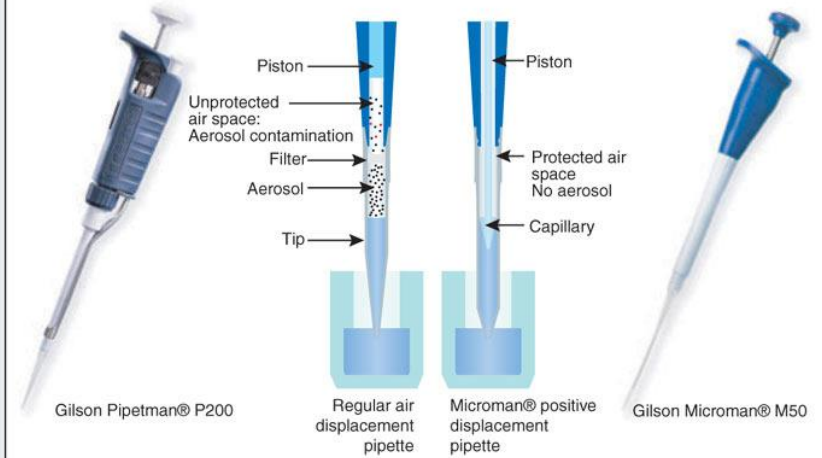
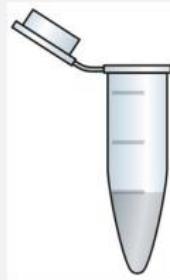
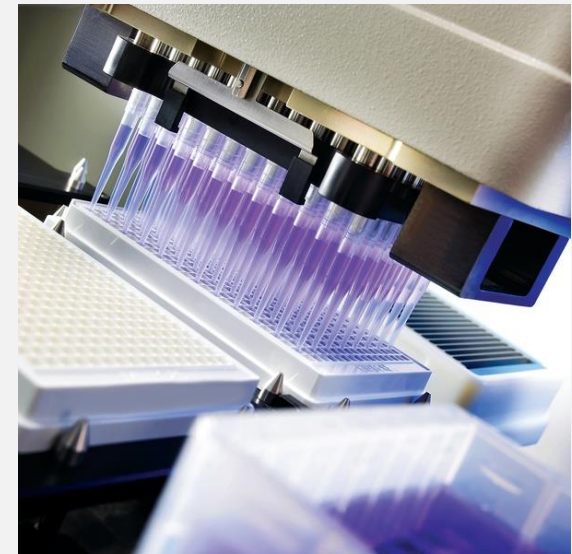


Figure 1 | Two pipetting concepts: air displacement using standard filter tips, and positive displacement as applied in the Microman pipette.



HotStart Taq

- Modifikace polymerázy (Chemická modifikace, MoAb)
- Upravená, teplotně senzitivní polymeráza

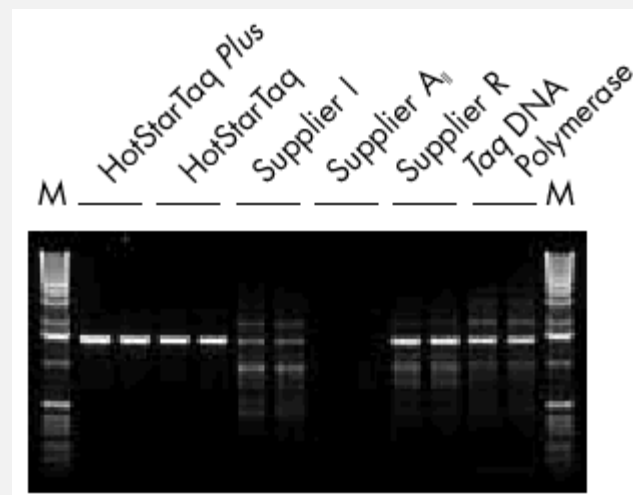
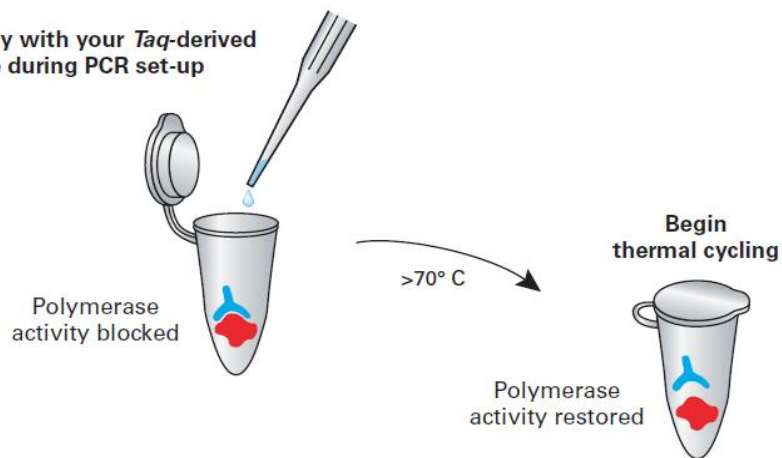
Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 21 6139–6147
DOI: 10.1093/nar/gkg813

Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR

Milko B. Kermekchiev, Anatoly Tzekov and Wayne M. Barnes*

DNA Polymerase Technology Inc., 1508 South Grand Avenue, St Louis, MO 63104, USA and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St Louis, MO 63110, USA

Add TaqStart Antibody with your *Taq*-derived DNA Polymerase during PCR set-up



HotStart dNTPs

- Modifikace termolabilní tetrahydrofuranovou (THF) skupinou (cyklický ether)
- Brání extenzi a dimerizaci primerů
- Zvýšením teploty dojde k uvolnění THF

Fig 1: Proposed activation mechanism of CleanAmp™ dNTPs

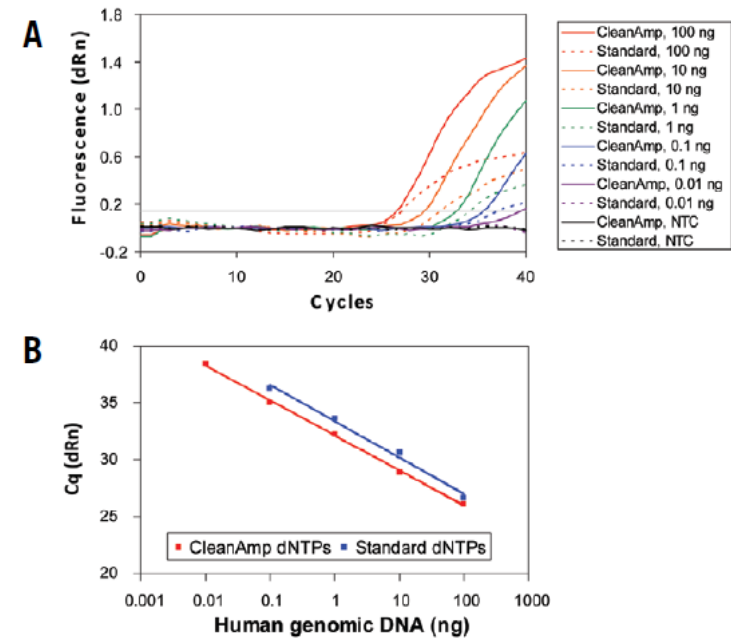
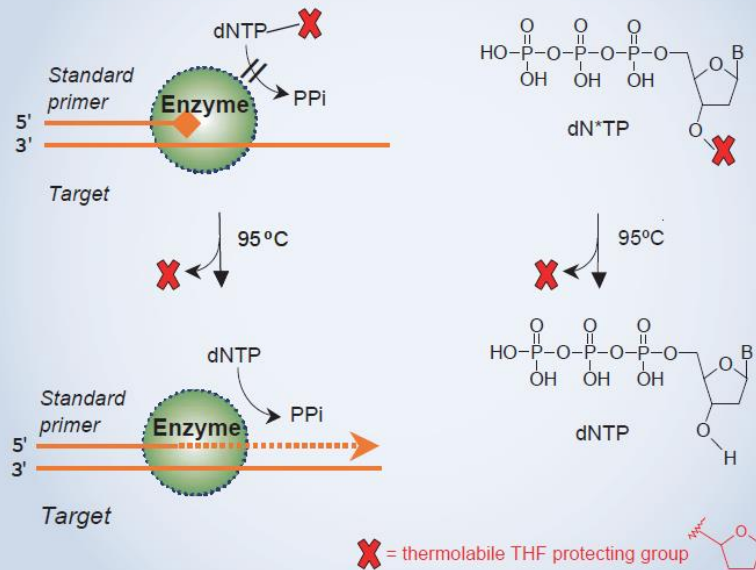


Figure 2. Comparison between standard dNTPs and CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 187 bp target from human genomic DNA in quantitative PCR. Results are presented as an amplification plot (A) and a standard curve (B) with standard dNTPs: $Y = -3.191 \cdot \text{LOG}(X) + 33.36$, Eff. = 105.8%) and CleanAmp™ dNTPs ($Y = -3.079 \cdot \text{LOG}(X) + 32.12$, Eff. = 111.2%).

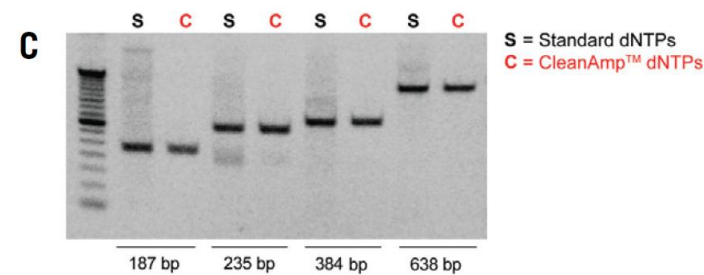


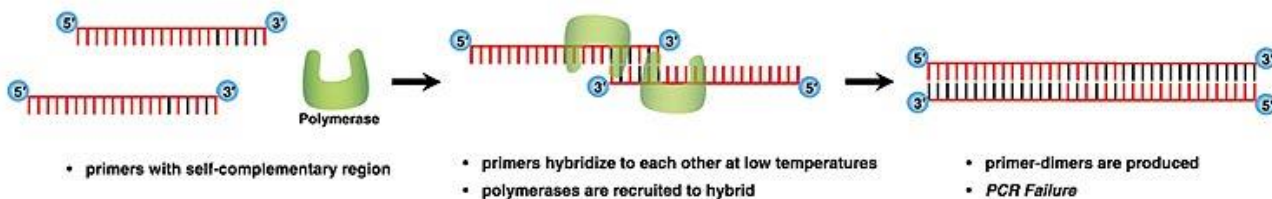
Figure 1. Comparison of (A) standard dNTPs and (B) CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 235 bp target from human genomic DNA over a range of annealing temperatures. (C) Performance of standard and CleanAmp™ dNTPs for the amplification of four targets from human genomic DNA.

Alternativní HotStart přístupy

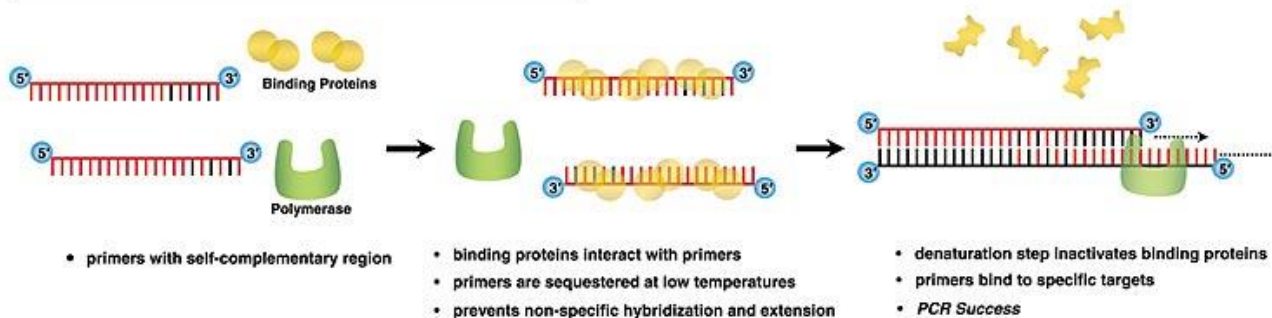
- Fyzické oddělení jednotlivých reakčních složek
- Vyvázení nebo chemická modifikace primerů

Fig. 1. USB HotStart-IT Method: Primer Sequestration

PCR Reaction Preparation without Hot Start



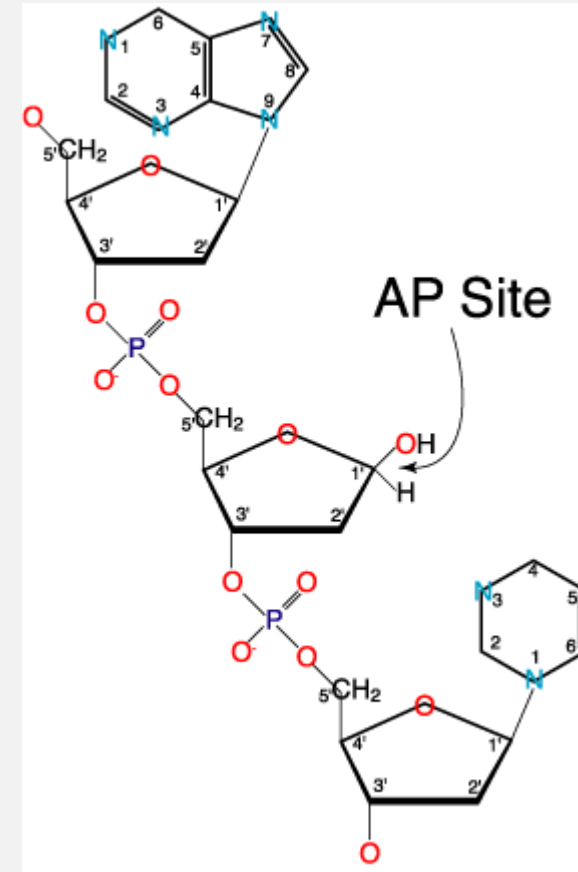
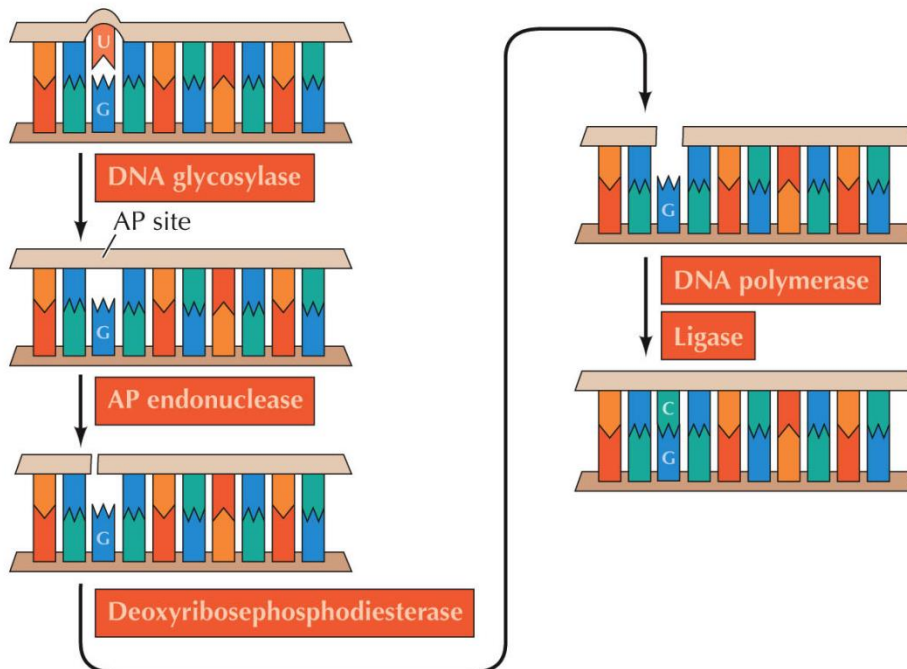
PCR Reaction Preparation with USB Hot Start Method



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

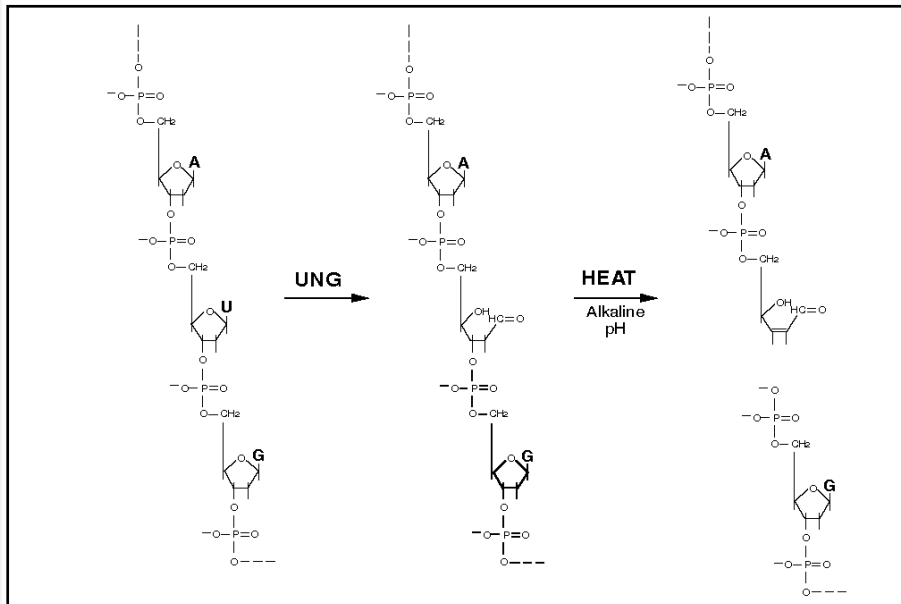
- odstraňuje uracil z DNA
- zahajuje bazovou excizní reparaci – dochází k odštěpení poškozené báze (deaminovaný cytosin) a vzniku AP místa (apurinové, apyrimidinové místo)

DNA containing U formed by deamination of C



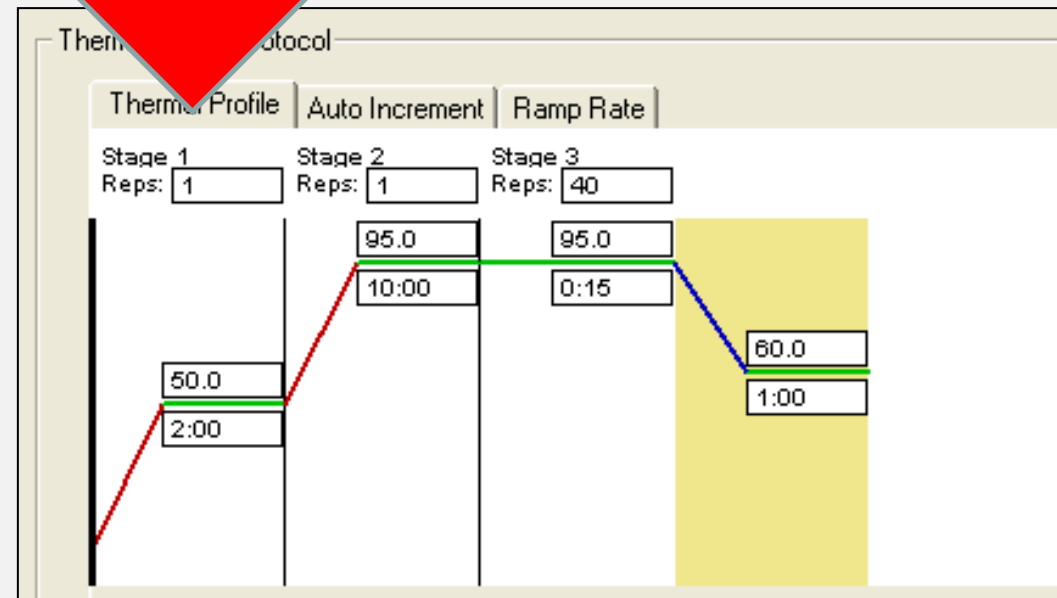
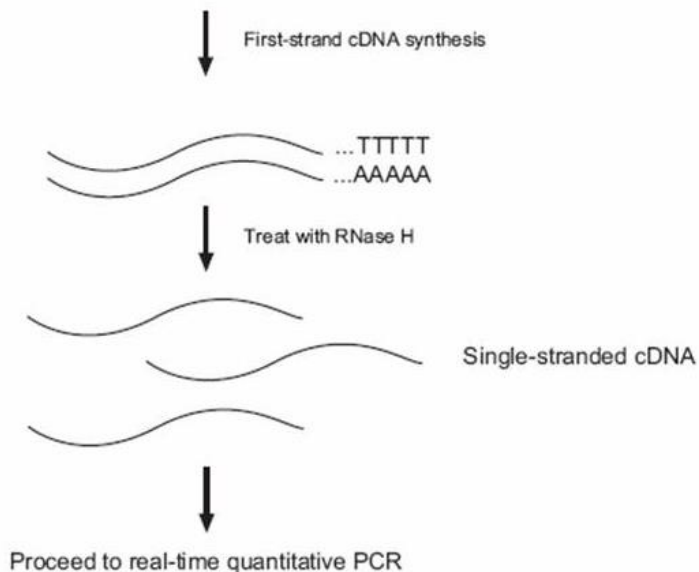
Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Pokud reakční PCR master mix obsahuje dUTP místo dTTP, výsledný amplicon bude obsahovat „U“ místo „T“
- UNG rozpozná místa v DNA, která obsahují „U“ a štěpí je za vzniku AP místa
- DNA obsahující AP místa je termolabilní
- Lze tak zabránit „carry over“ kontaminaci – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný
- Na začátku qPCR reakce – odstranění produktů předchozích reakcí



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Použitím UNG a vhodné směsi dNTP, lze zabránit „carry over“ kontaminacím v laboratoři – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný
- Vlastnosti DNA obsahující „U“ místo „T“:
 - dU mají stejnou schopnost hybridizace jako dT
 - lze ji použít i pro dideoxy-NTP sekvenování
 - PCR fragment lze přímo klonovat do vektorů



YouTube

- <https://www.youtube.com/watch?v=matsiHSuoOw>
- Na YouTube je několik velice pěkných videí – podívejte se